

**Eine Charakterisierung *cis*-regulatorischer Elemente
des Zebrafisch *deltaD* Gens**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Stefan Hans

aus Schaffhausen/Saar

Köln 2001

Berichtersteller:

Prof. Dr. José A. Campos-Ortega

Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung:

5. Juli 2001

Für meine Mutter.

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Entwicklungsbiologie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. José A. Campos-Ortega angefertigt. Ihm danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Insbesondere für den gewährten Freiraum im wissenschaftlichen Arbeiten und die kritische Auseinandersetzung danke ich ihm. Die gegebene Unterstützung empfand ich immer als äußerst angenehm und das durch ihn vorgelebte Beispiel war mir sehr lehrreich.

Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Die Durchführung dieser Arbeit wäre ohne die Mitwirkung unserer TAs nicht möglich gewesen. Hier möchte ich mich vor allen Dingen bei den beiden „weltbesten“ TAs Christel und Iris bedanken, die diese Arbeit von Anfang an begleitet haben. Christel half mir hier insbesondere in der Übernahme histologischer Arbeiten, deren Ausführung mich oftmals verzweifeln liessen. Iris hatte stets ein offenes Ohr für meine molekularbiologischen Probleme (und nicht nur dafür) und wusste auch die dazugehörige Lösung.

Bedanken möchte ich mich auch bei den weiteren Mitgliedern der Fischgruppe für das mehr als angenehme Arbeitsklima. Die gegenseitige Unterstützung und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft aller wird mir immer in Erinnerung bleiben. Annes ansteckende Fröhlichkeit sei hier genauso erwähnt wie die Lösung aller Computerprobleme durch André und Benedikt. Dem ehemaligen Fischgruppenmitglied Nico gilt mein besonderer Dank. Im Kampf mit dem durch Iris Frauenpower dominierten Labor waren wir uns immer gegenseitig Stütze. Neben diesem nicht zu unterschätzenden Beitrag habe ich aber vor allen Dingen von seinen Erfahrungen und Pionierleistungen in der Zebrafischforschung profitiert.

Bei Isa möchte ich mich bedanken für die Durchsicht dieser Arbeit (aber nicht nur dafür).

Thomas und Susanne danke ich für das Korrekturlesen und die vermittelten Einsichten in Sinn und Unsinn der neuen deutschen Rechtschreibung.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Ruth bedanken, mit der zusammen vieles einfacher, leichter und schöner zu bewältigen war und ist.

<u>1. EINLEITUNG</u>	9
1.1 ZELLDIVERSITÄT	10
1.2 DELTA-NOTCH-SIGNALTRANSDUKTIONSWEG IN <i>DROSOPHILA</i>	10
1.2.1 Laterale Inhibition während der Neurogenese	10
1.2.2 Proneurale Proteine in <i>Drosophila</i>	11
1.3 DELTA-NOTCH-SIGNALTRANSDUKTIONSWEG IN VERTEBRATEN	12
1.3.1 Primäre Neurogenese.....	12
1.3.2 Proneurale Proteine in Vertebraten.....	13
1.3.3 Somitogenese.....	14
1.4 TRANSKRIPTIONELLE REGULATION VON DELTA.....	15
1.5 MODELLSYSTEM: ZEBRAFISCH <i>DANIO RERIO</i>	16
1.6 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	16
<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	18
2.1 CHEMIKALIEN	18
2.2 PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN	18
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN:.....	20
2.3.1 Phagenbank, Bakterienstämme und Plasmide.....	20
2.3.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien.....	21
2.3.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	21
2.3.4 Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	22
2.3.5 Quantifizierung von DNA und RNA.....	22
2.3.6 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	22
2.3.7 Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten.....	22
2.3.8 Dephosphorylierung von Vektorenden.....	22
2.3.9 Agarosegelelektrophorese.....	23
2.3.10. Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen.....	23
2.3.11 Ligation von DNA-Fragmenten.....	23
2.3.12 Sequenzierung von DNA-Konstrukten.....	23
2.3.13 Transfer von Phagen-DNA auf Nylonmembranen.....	24
2.3.14 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	24
2.3.15 Hybridisierung von radioaktiv markierten DNA-Sonden an filtergebundene DNA.....	24
2.3.16 In vitro mRNA-Synthese.....	24
2.3.17 CAT-Assays.....	25
2.3.18 Mutagenese der CAT-Konstrukte.....	26
2.3.19 Mutagenese des deltaC-Promotors.....	27
2.3.20 Western-Blot-Analyse.....	28
2.4 HISTOLOGISCHE METHODEN.....	28
2.4.1 Fixierung von Zebrafischembryonen.....	28
2.4.2 Herstellung Digoxigenin / Fluorescein-markierter RNA-Sonden.....	28
2.4.3 Digoxigenin-Färbung.....	29
2.4.4 Digoxigenin / Fluorescein-Doppelfärbung.....	30
2.4.5 Kombinierte in situ Hybridisierung und Antikörperfärbung.....	31
2.4.6 X-Gal Färbungen zum Nachweis von β -Gal-Aktivität.....	31

<u>2.5 FISCHHALTUNG UND EIABLAGEN</u>	31
<u>2.5.1 Haltung</u>	31
<u>2.5.2 Eiablage</u>	32
<u>2.6 MIKROINJEKTION</u>	32
<u>2.6.1 Reinigung der zu injizierenden DNA-Fragmente</u>	32
<u>2.6.2 Injektionslösung</u>	32
<u>2.6.3 Injektionen</u>	32
<u>2.7 SICHTUNG POTENTIELL TRANSGENER GRÜNDERFISCHE UND ISOLIERUNG TRANSGENER FISCHLINIEN</u>	33
<u>2.7.1 FLUORESCENZ-BEOBACHTUNGEN ZUR IDENTIFIKATION TRANSGENER ZEBRAFISCHEMBRYONEN</u>	34
<u>2.7.2 Extraktion genomischer DNA aus F₁-Embryonen und Schwanzflossen</u>	35
<u>2.7.3 PCR zur Identifikation transgener Zebrafische</u>	35
<u>2.12 ABKÜRZUNGEN, SYMBOLE UND KONVENTIONEN</u>	36

3. ERGEBNISSE 38

<u>3.1 KLONIERUNG DES <i>DELTA^D</i> LOCUS</u>	38
<u>3.2 HERSTELLUNG STABILER TRANSGENER LINIEN</u>	39
<u>3.3 QUANTITATIVE ENHANCER-ELEMENTE INNERHALB DES <i>DELTA^D</i> LOCUS</u>	40
<u>3.4 GFP-EXPRIMIERENDE LINIEN SPIEGELN DIE ENDOGENE EXPRESSION VON <i>DELTA^D</i> WIEDER</u>	42
<u>3.5 WIEDERHERSTELLUNG DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT VON <i>DELTA^D</i> IN <i>AFTER EIGHT</i></u>	47
<u>3.6 MESODERMALE <i>CIS</i>-REGULATORISCHE ELEMENTE</u>	49
<u>3.7 NEURALE <i>CIS</i>-REGULATORISCHE ELEMENTE</u>	50
<u>3.8 DIE NEURALEN EXPRESSIONSMUSTER DER KONSERVierten REGIONEN HI UND HII WEISEN GROßE ÜBEREINSTIMMUNGEN MIT DEN EXPRESSIONSMUSTERN DER PRONEURALEN GENE <i>NEUROGENIN1</i> UND <i>ZASH1A / ZASH1B</i> AUF</u>	52
<u>3.9 HI UND HII ENTHALTEN <i>NGN1</i> UND <i>ZASH1A / ZASH1B</i> SENSITIVE E-BOXEN</u>	54
<u>3.9.1 <i>ngn1</i> und HI</u>	55
<u>3.9.2 <i>zash1a / zash1b</i> und HII</u>	57
<u>3.10 VERGLEICH DER PROMOTOREN <i>DELTA^D</i> MIT <i>DELTA^C</i></u>	59
<u>3.10.1 Klonierung des <i>deltaC</i> Locus</u>	59
<u>3.10.2 Herstellung stabiler transgener Linien</u>	60
<u>3.10.3 GFP-exprimierende Linien spiegeln Teile der endogenen Expression von <i>deltaC</i> wieder</u>	60

4. DISKUSSION 63

<u>4.1 DIE <i>CIS</i>-REGULATORISCHE ELEMENTE DES <i>DELTA^D</i> LOCUS UMFASSEN 12.5KB</u>	63
<u>4.1.1 Quantitative Enhancer-Elemente</u>	63
<u>4.1.2 Qualitative, räumliche Elemente</u>	65
<u>4.2 NEURALE <i>CIS</i>-REGULATORISCHE ELEMENTE</u>	65
<u>4.2.1 Proneurale Elemente</u>	66
<u>4.2.2 Nachgeschaltete Elemente</u>	70

4.3 MESODERMALE <i>CIS</i> -REGULATORISCHE ELEMENTE	72
4.4 VERGLEICH DES <i>DELTAΔ</i> PROMOTORS MIT ANDEREN PROMOTOREN	73
<u>5. LITERATUR</u>	76
<u>6. ANHANG</u>	83
6.1 KONSERVIERTE SEQUENZBEREICHE ZWISCHEN <i>DELTA-LIKE-1</i> UND <i>DELTAΔ</i>	83
6.2 KONSERVIERTE SEQUENZBEREICHE ZWISCHEN <i>DELTAΔ</i> UND <i>DELTAΔ</i>	83
6.3 GENOMISCHE SEQUENZ DES <i>DELTAΔ</i> -LOCUS	84
6.4 GENOMISCHE SEQUENZ DES <i>DELTAΔ</i> -LOCUS	85
<u>7. ZUSAMMENFASSUNG</u>	90
<u>8. ABSTRACT</u>	91
<u>9. LEBENS LAUF</u>	92
<u>10. ERKLÄRUNG</u>	93

1. Einleitung

Die meisten Erkenntnisse der heutigen Entwicklungsbiologie wurden durch das Studium einiger weniger Modellorganismen gewonnen. Vertreter dieser Modellorganismen sind auf Seiten der Invertebraten die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Nematodenwurm *Caenorhabditis elegans*. Die Modellorganismen der Vertebraten werden durch den Krallenfrosch *Xenopus laevis*, das Huhn *Gallus gallus*, die Hausmaus *Mus musculus* und den Zebrafisch *Danio rerio* repräsentiert. Trotz der Unterschiede der verschiedenen Modellorganismen in ihrer frühen Entwicklung können bestimmte ähnliche Entwicklungsschritte unterschieden werden. In allen Organismen führen die Furchungsteilungen nach der Befruchtung der Eizelle zu einer multizellulären Blastula oder einem Blastodermstadium. Bei der anschließenden Gastrulation werden die drei Keimblätter – Endoderm, Mesoderm und Ektoderm – in ihre zukünftige Position gebracht. In den meisten Organismen sind zukünftiges Endoderm und Mesoderm zunächst an der Oberfläche des Embryos und werden erst durch die Gastrulation in das Innere des Embryos verbracht. In Vertebraten folgt auf die Gastrulation die Neurulation, bei der das zentrale Nervensystem geformt wird. Während der Gastrulation, Neurulation und anderer einsetzender Gestaltbildungsprozesse ändert sich das Erscheinungsbild des Organismus von einer Kugel oder Scheibe zu einem erkennbaren Embryo mit anteroposteriorer sowie dorsoventraler Körperachse. Alle diese Entwicklungsprozesse unterliegen einer genetischen Kontrolle und können somit durch Mutationen identifiziert und analysiert werden. Systematische Mutationsanalysen in verschiedenen Modellorganismen wurden bereits durchgeführt und konnten anhand ihrer Ausfallphänotypen in unterschiedliche Klassen eingeordnet werden (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980; Anderson und Nüsslein-Volhard, 1984; Driever *et al.*, 1996; Haffter *et al.*, 1996). Die Klonierung der Gene und deren anschließende biochemische und molekularbiologische Untersuchungen führten zu einer detaillierten Analyse der Genprodukte und ihrer Funktion während der Entwicklung. Vergleichende Studien konnten weiter zeigen, dass bestimmte Mechanismen und Signalwege, die in Invertebraten eine wichtige Rolle übernehmen, auch bei der Entwicklung der Vertebraten eine ähnliche Bedeutung besitzen.

1.1 Zelldiversität

Die Grundlage aller gestaltbildender Prozesse ist die Ausbildung unterschiedlicher Zellschicksale. Dies kann über verschiedene Wege erreicht werden. So entstehen z. B. bei der asymmetrischen Zellteilung durch die einseitige Verteilung von cytoplasmatisch lokalisierten Faktoren zwei Tochterzellen mit verschiedenen Eigenschaften. Ein anderer Weg zur Herstellung von Zelldiversität wird vermittelt durch Zell-Zell-Interaktionen, wobei man diffusible Signale und direkten Zell-Zell-Kontakt unterscheidet. Der evolutionär konservierte Delta-Notch-Signaltransduktionsweg ist ein gut untersuchtes Beispiel des letzteren.

1.2 Delta-Notch-Signaltransduktionsweg in *Drosophila*

Der Delta-Notch-Signaltransduktionsweg ist am besten untersucht während der Neurogenese, spielt aber auch eine wichtige Rolle bei vielen anderen entwicklungsbiologischen Prozessen wie z.B. der Darm- und Herzentwicklung (Tepass und Hartenstein, 1994), der Myogenese (Corbin *et al.*, 1991; Carmena *et al.*, 1995) und der Oogenese (Ruohola *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1992).

1.2.1 Laterale Inhibition während der Neurogenese

Im Neuroektoderm von *Drosophila* werden einzelne neurale Vorläuferzellen aus einer Äquivalenzgruppe, den sogenannten proneuralen Clustern, ausgelesen (Ghysen und Dambly-Chaudière, 1989; Romani *et al.*, 1989). Diese Selektion der neuralen Vorläuferzellen wird durch die Genprodukte der proneuralen und der neurogenen Gene vermittelt (Übersicht: Campos-Ortega, 1993; Ghysen *et al.*, 1993). Die proneuralen Gene werden in den sogenannten proneuralen Clustern exprimiert, wodurch diese Zellen die Fähigkeit erhalten, ein neurales Schicksal einzuschlagen (Cabrera *et al.*, 1987; Romani *et al.*, 1987; Cabrera *et al.*, 1990; Martín-Bermudo *et al.*, 1991). Als eines der ersten Zielgene aktivieren die proneuralen Proteine das Gen *Delta* (Hinz *et al.*, 1994; Kunisch *et al.*, 1994), den Startpunkt eines Signaltransduktionsweges, der von den neurogenen Genen vermittelt wird. *Delta* agiert dabei als Quelle eines inhibierenden Signals, das durch seinen Rezeptor *Notch* empfangen und durch *Suppressor of Hairless* [*Su(H)*] und die Gene des *Enhancer of split*-Komplexes [*E(spl)-C*] verarbeitet wird (Technau und Campos-Ortega, 1987; Knust *et al.*, 1987; Klämbt *et al.*, 1999; Heitzler und Simpson, 1991; Knust *et al.*, 1992; Schrons *et al.*, 1992; Lieber *et al.*, 1993; Rebay *et al.*, 1993; Struhl *et al.*, 1993; Bailey und Posakony, 1995; Lecourtois und

Schweissguth, 1995). Die Genprodukte des *E(spl)*-Komplexes sind negative transkriptionelle Regulatoren der proneuralen Gene (Tietze *et al.*, 1992; Oellers *et al.*, 1994; Ohsako *et al.*, 1994; Nakao und Campos-Ortega, 1996; Heitzler *et al.*, 1996) und führen durch deren Repression die Zellen dem epidermalen Schicksal zu. Anfänglich minimale Unterschiede im Gehalt an proneuralen Proteinen in den Zellen einer Äquivalenzgruppe werden durch diesen Mechanismus amplifiziert. Je mehr inhibierendes Signal eine Zelle von ihren Nachbarzellen empfängt, desto weniger inhibierendes Signal kann diese Zelle an ihre Nachbarzellen aussenden. Dieses Prinzip der lateralen Inhibition erlaubt die Selektion einer Zelle aus einer Äquivalenzgruppe (Bild 1.1). Diese Zelle verlässt dann den epithelialen Verband und segregiert in das Innere des Embryos.

1.2.2 Proneurale Proteine in *Drosophila*

Die proneuralen Gene in *Drosophila* kodieren für Transkriptionsfaktoren mit einem basischen Helix-Loop-Helix-Motiv (bHLH). Diese gewebespezifisch exprimierten Transkriptionsfaktoren bilden Heterodimere mit dem ubiquitär exprimierten Protein *daughterless*, ebenfalls ein bHLH (Caudy *et al.*, 1988).

Man unterscheidet zwei Familien von proneuralen Proteinen in *Drosophila*:

- die Gene des *achaete-scute-Komplex (AS-C)*
- die Gene *atonal* und *amos*

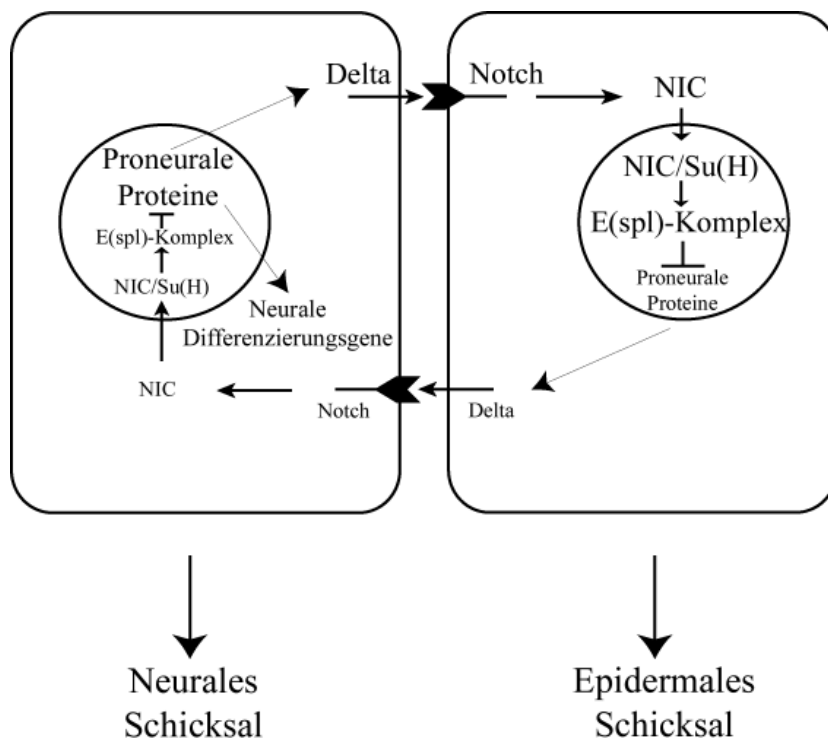


Bild 1.1:

Laterale Inhibition

Die Aktivität der proneuralen Proteine führt zur Expression von *Delta*, welches *Notch* in den benachbarten Zellen aktiviert. Die Abspaltung der intrazellulären Domäne (*N I C*) und ihre Dimerisierung mit dem kernständigen *Su(H)* führt zur Expression der Gene des *E(spl)*-Komplexes. Die Produkte des *E(spl)*-Komplexes reprimieren die proneuralen Gene, den Startpunkt des Signalweges. Ein anfangs leichtes Ungleichgewicht in der Notch-Aktivität zwischen den Zellen wird rasch amplifiziert und führt zur Festlegung zweier unterschiedlicher Zellschicksale.

Im *achaete-scute Komplex (AS-C)* liegen die vier Gene *achaete (ac)*, *scute (sc)*, *lethal of scute (l'sc)* und *asense (ase)* (Ghysen und Dambly-Chaudiere, 1988). Ihre Funktion wird für die Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems (ZNS und PNS) benötigt (Garcia-Bellido und Santamaria, 1978; Garcia-Bellido, 1979; Dambly-Chaudiere und Ghysen, 1987; Ruiz-Gomez und Modolell, 1987; Skeath und Carrol, 1991). Im PNS spezifiziert ihre Expression die Vorläuferzellen der externen Sinnesorgane (ESOs) und einiger multidendritischer Neurone.

Die Gene *atonal (ato)* und *amos* werden ebenfalls im PNS exprimiert. *atonal* Expression ist unerlässlich für die Produktion der Chordotonalorgane (CHOs), einiger multidendritischen Neurone und einiger olfaktorischer Sinnesorgane (Jarman *et al.*, 1993; Gupta und Rodrigues, 1997). *Amos* hingegen ist hinreichend und notwendig für die Entwicklung von multidendritischen Neuronen und *atonal* unabhängiger olfaktorischer Sinnesorgane (Goulding *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000).

Die Spezifität der proneuralen Proteine wird durch ihre basische Domäne bestimmt. So wurde gezeigt, dass *scute* mit einer basischen Domäne von *atonal* in *atonal* mutanten Embryonen, die keine CHOs ausbilden, in der Lage ist, diese zu erzeugen (Chien *et al.*, 1996).

1.3 Delta-Notch-Signaltransduktionsweg in Vertebraten

Im Laufe der letzten Jahre wurden eine Reihe von Homologen der proneuralen und der neurogenen Gene in den verschiedenen Vertebraten-Modellsystemen kloniert und analysiert.

1.3.1 Primäre Neurogenese

Im Zebrafisch werden drei der vier Delta Homologe während der primären Neurogenese exprimiert (Dornseifer *et al.*, 1997; Haddon *et al.*, 1998; Appel und Eisen, 1998). Überexpression von *deltaD* oder *deltaA* führt zum Verlust von primären Neuronen (Dornseifer *et al.*, 1997; Appel und Eisen, 1998), wohingegen die Überexpression einer dominant-negativen Form von *deltaD* bzw. eine Ausfallmutation von *deltaD* (*after eight [aei]*) zu einer Zunahme von primären Neuronen führt (Takke *et al.*, 1999; Holley *et al.*, 2000). Eine konstitutiv aktive Form des Rezeptors *Notch* aktiviert *her4*, ein E(spl)-Homolog, und reprimiert *neurogenin1 (ngn1)*, ein *atonal*-Homolog. Die Überexpression von *ngn1* löst eine ektopische Aktivierung von *deltaA* und *deltaD* aus (Takke *et al.*, 1999). Diese Resultate bestätigten die Arbeiten in *Xenopus*, die des Weiteren zeigen konnten, dass das inhibierende

Signal ausgehend von *X-Delta-1* und *Notch* über ein Su(H)-Homolog die nachgeschalteten E(spl)-Homologe aktiviert (Wettstein *et al.*, 1997). Zusätzliche Daten durch die Analysen von Ausfallmutationen in Maus (Ishibashi *et al.*, 1995; de la Pompa *et al.*, 1997; Fode *et al.*, 1998) zeigen, dass der Mechanismus der Selektion der primären Neurone im Neuroepithel der Vertebraten sehr ähnlich dem Mechanismus der lateralen Inhibition im Neuroektoderm von *Drosophila* ist.

1.3.2 Proneurale Proteine in Vertebraten

Die funktionelle Charakterisierung der proneuralen Gene in *Drosophila* hat gezeigt, dass sie nicht nur für die neurale Determination von Zellen, sondern auch für die Spezifikation von bestimmten Sinnesorganen notwendig sind. Dieses Prinzip findet sich auch während der Neurogenese der Vertebraten wieder.

Man unterscheidet, wie in *Drosophila*, zwei Familien:

- achaete-scute Homologe (ash)
- atonal Homologe (ath)

Das Maus achaete-scute Homolog *Mash1* wird in neuralen Vorläuferzellen sowohl im ZNS als auch im PNS exprimiert (Johnson *et al.*, 1990; Guillemot und Joyner, 1993; Guillemot *et al.*, 1993). Innerhalb des PNS ist seine Expression auf autonome Vorläuferzellen beschränkt (Lo *et al.*, 1991). Das atonal Homolog *neurogenin1* (*ngn1*) ist ebenfalls sowohl im ZNS als auch im PNS exprimiert, wohingegen diese Expression im PNS sensorische Vorläuferzellen determiniert (Ma *et al.*, 1996). Sorgfältige Analysen der Expressionsdomänen von *Mash1* und *ngn1* zeigen, dass diese Gene in komplementären, aber nicht überlappenden Domänen innerhalb von CNS und PNS exprimiert werden (Ma *et al.*, 1997). Eine solch genaue Analyse der Expression der proneuralen Proteine wurde in den anderen Modellsystemen noch nicht durchgeführt. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass auch hier die proneuralen Proteine komplementär exprimiert werden. Eine vorläufige Analyse der Expressionen von *ngn1* und *zash1a* / *zash1b* im Telencephalon des Zebrafisches bestätigt diese Annahme (P. Blader, persönliche Mitteilung).

Die bis heute bekannten proneuralen Proteine der Vertebraten sind in der unten angegebenen Tabelle aufgeführt.

Drosophila	Zebrafisch	Xenopus	Maus	Huhn
<i>achaete-scute</i> Komplexgene	<i>Zash1a</i> <i>Zash1b</i> (Allende und Weinberg, 1994)	<i>Xash1</i> (Ferreiro <i>et al.</i> , 1993) <i>Xash3</i> (Papalopulu <i>et al.</i> , 1996)	<i>Mash1</i> (Johnson <i>et al.</i> , 1990) <i>Mash2</i> (Johnson <i>et al.</i> , 1992)	<i>Cash1</i> (Jasoni <i>et al.</i> , 1994) <i>Cash4</i> (Henrique <i>et al.</i> , 1997)
<i>atonal</i> <i>amos</i>	<i>neurogenin1</i> (Blader <i>et al.</i> , 1997) <i>neuroD</i> (Korzsh <i>et al.</i> , 1998)	<i>neurogenin related-1</i> (Ma <i>et al.</i> , 1996) <i>neuroD</i> (Lee <i>et al.</i> , 1995) <i>Xath1</i> (Kim <i>et al.</i> , 1997) <i>Xath3</i> (Takebayashi <i>et al.</i> , 1997) <i>Xath5</i> (Kanekar <i>et al.</i> , 1997)	<i>neurogenin1</i> (Ma <i>et al.</i> , 1996) <i>neurogenin2</i> <i>neurogenin3</i> (Sommer <i>et al.</i> , 1996) <i>Math1</i> (Akazawa <i>et al.</i> , 1995) <i>Math2</i> (Schimizu <i>et al.</i> , 1995) <i>Math3</i> (Tsudai <i>et al.</i> , 1998) <i>Math4</i> (Gradwohl <i>et al.</i> , 1996) <i>Math5</i> (Brown <i>et al.</i> , 1998)	<i>neuroM</i> (Roztocil <i>et al.</i> , 1997)

1.3.3 Somitogenese

In Vertebraten ist die Somitogenese der elementare Musterbildungsprozess, der das Mesoderm in regelmäßige Einheiten unterteilt, die sogenannten Somiten (Übersicht: Gossler und Hrabe de Angelis, 1998). Die Somiten werden als bilaterale Strukturen auf beiden Seiten des Notochords entlang der anterior-posterioren Achse am rostralen Ende des paraxialen Mesoderms gebildet.

Die Somitogenese umfasst drei aufeinanderfolgende Prozesse:

- Spezifizierung des paraxialen Mesoderms
- Kondensation der Somiten durch mesenchymale-epitheliale Transition
- Differenzierung der Somiten in Sklerotom und Dermamyotom

In Zebrafischembryonen werden viele Gene des Delta-Notch-Signaltransduktionsweges im präsomitischen Mesoderm exprimiert und behalten ein segmentales Expressionsmuster während der Somitogenese bei (Bierkamp und Campos-Ortega, 1993; Wülbeck und Campos-Ortega, 1997; Dornseifer *et al.*, 1997; Westin und Lardelli, 1997; Haddon *et al.*, 1998; Takke *et al.*, 1999). Misexpressionen von *deltaC*, *deltaD*, *her1*, *her4*, konstitutiv-aktivem *Notch* und dominant-negativem *deltaD* führen zu Segmentierungsdefekten (Takke und Campos-Ortega,

1999), genauso wie die Deletionsanalysen von *Notch1* und *Delta-like-1* in Mausembryonen ebenfalls schwere Somitendefekte zeigen (Conlon *et al.*, 1995; Hrabe de Angelis *et al.*, 1997). In *Notch1* mutanten Embryonen scheint die Epithalisierung unvollständig, und die geformten Somiten sind schwächer ausgeprägt im Vergleich zu Wildtypembryonen (Conlon *et al.*, 1995). In *Delta-like-1* mutanten Embryonen ist keine anterior-posteriore Segmentpolarität vorhanden, die mesenchymale-epitheliale Transition bleibt aus, und die Myoblasten dehnen sich über die Segmentgrenzen hinaus aus. Dies legt den Schluss nahe, dass *Delta-like-1* an der Kompartimentierung der Somiten mitwirkt (Hrabe de Angelis *et al.*, 1997). Einen ähnlichen mutanten Phänotyp zeigt die Ausfallmutante für *RBPYK*, ein Su(H)-Homolog (Oka *et al.*, 1995).

1.4 Transkriptionelle Regulation von Delta

Die Bedeutung des Delta-Notch-Signaltransduktionsweges während vieler Entwicklungsvorgänge in verschiedenen Modellorganismen wurde aufgezeigt, jedoch ist wenig über die transkriptionelle Regulation von Delta und seinem Rezeptor Notch bekannt. In einem ersten Schritt zur Identifikation dieser Regulatoren wurden bereits Deletions- und Mutationsanalysen des *Delta* Promotors in *Drosophila* und des *Delta-like-1* Promotors in Maus durchgeführt (Haenlin *et al.*, 1994, Kunisch *et al.*, 1994, Beckers *et al.*, 2000).

In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass die meisten *cis*-regulatorischen Elemente auf 6,6kb der stromaufwärts vom Transkriptionsstart gelegenen DNA verstreut liegen. Ein quantitativer Enhancer konnte im 1. Intron lokalisiert werden. Innerhalb der stromaufwärts gelegenen Sequenz wurde eine Region definiert, die in Clustern von neuroektodermalen Zellen vor und während der Neuroblastensegregation Expression treibt und von den Genen des *achaete-scute Komplexes* reguliert wird (Haenlin *et al.*, 1994). In einer detaillierten Analyse konnte dann gezeigt werden, dass die proneuralen Proteine an spezifische Stellen innerhalb dieser Region binden (E-Box) und dass die Mutation dieser Stellen zum Verlust der Bindung und der Störung der lateralen Inhibition führt (Kunisch *et al.*, 1994).

Die Analyse in Maus konnte zeigen, dass verschiedene regulatorische Elemente innerhalb von 4,3kb der stromaufwärtsgelegenen DNA genügen, um spezifische Genexpression in Teilbereichen des endogenen Expressionsmusters zu treiben. Die Expression innerhalb des paraxialen Mesoderms hängt dabei von vielen positiven und negativen regulatorischen Elementen ab. Durch den Vergleich der stromaufwärts vom Transkriptionsstart gelegenen DNA von *Delta-like-1* und *deltaD* konnten zwei Regionen Homologie I (HI) und Homologie

II (HII) identifiziert werden, die zwischen Maus und Zebrafisch hochgradig konserviert sind. Die Sequenzen dieser beiden Regionen HI bzw. HII im Kontext mit dem *Delta-like-1*-Basalpromotor sind hinreichend für eine spezifische Expression im ventralen bzw. dorsalen Neuralrohr, was auf eine Konservierung des regulatorischen Signalweges innerhalb des Neuralrohres schließen lässt (Beckers *et al.*, 2000).

1.5 Modellsystem: Zebrafisch *Danio rerio*

Der Zebrafisch, der der Gruppe der Knochenfische (Teleostier) zugeordnet wird, besitzt im Vergleich zu anderen Modellsystemen viele Vorzüge, die ihn zu einem geeigneten Modellsystem der Wirbeltierentwicklung machen. Er ist einfach und kostengünstig in grosser Zahl haltbar, die Zahl der Nachkommen ist sehr groß und keinen saisonbedingten Schwankungen unterlegen. Die Befruchtung und Entwicklung erfolgt extrakorporal und die Embryonen sind während der gesamten Entwicklung durchsichtig, was die Untersuchung verschiedener Entwicklungsvorgänge erleichtert. Die Embryonalentwicklung ist relativ kurz, weil mit 72 Stunden schon alle morphologischen Merkmale des adulten Fisches ausgeprägt sind (Übersicht: Kimmel *et al.*, 1995). Die Generationszeit beträgt 8-12 Wochen, wodurch die Herstellung und Sichtung induzierter Mutanten im grossen Maßstab (Driever *et al.*, 1996; Haffter *et al.*, 1996) und die Erzeugung von transgenen Organismen ermöglicht wird (Stuart *et al.*, 1988; Bayer und Campos-Ortega, 1992; Scheer und Campos-Ortega, 1999). Trotz einiger offensichtlicher Besonderheiten der Zebrafiscentwicklung gleicht diese den Entwicklungsvorgängen der anderen Modellsystemen, so dass die gewonnen Erkenntnisse übertragbar sind (Kimmel, 1989; Eyal-Giladi, 1997).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

deltaD wird während der Embryogenese in einem komplexen und dynamischen Muster im paraxialen Mesoderm und im Neuroektoderm exprimiert. Es ist dabei essentiell für den korrekten Verlauf der Somitogenese und der neuralen Differenzierung. Viele der molekularen Komponenten, die nachgeschaltet auf die Ligandenbindung und Notch Aktivierung reagieren, sind in den verschiedenen Modellorganismen identifiziert worden. Im Gegensatz dazu ist in Vertebraten sehr wenig bekannt über die transkriptionelle Regulation von Delta, den Startpunkt dieses Signaltransduktionsweges. In einem ersten Schritt zur Identifikation der

vorgeschalteten Faktoren wurden in dieser Arbeit *cis*-regulatorische Regionen des *deltaD* Promotors gesucht, die Teile des endogenen Expressionsmusters in transgenen Organismen steuern können. Ausgangspunkt dieser Analyse waren dabei die aus dem Promotorvergleich von *deltaD* und *Delta-like-1* gewonnenen Daten, welche die Identifikation der beiden konservierten Regionen HI und HII erbrachte.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Verbrauchskemikalien wurden, soweit erhältlich, in der Qualität pro analysis (p.A.), wenn nicht anders genannt, von folgenden Firmen bezogen:

Aldrich (Steinheim); Biometra (Göttingen); Biomol (Hamburg); Biozym (Hameln); Roche Diagnostics GmbH (Mannheim); Fluka (Neu-Ulm); Gibco/BRL (Eggenstein); Merck (Darmstadt); Pharmacia/LKB (Freiburg); Roth (Karlsruhe); Sigma (Deisenhofen)

Zum Ansetzen von Medien und für sämtliche molekularbiologischen Arbeiten wurde Reinstwasser (Milli-Q Wasserreinigungssystem, Millipore Eschborn), im Folgenden einfacherweise mit „H₂O“ bezeichnet, verwendet.

Lösungen für die Molekularbiologie wurden autoklaviert bzw. sterilisiert (0,2 µm Filter, Schleicher und Schüll). Glaswaren wurden entweder autoklaviert oder hitzesterilisiert.

Enzyme für die Molekularbiologie wurden, soweit nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen:

Genecraft (Münster); Roche Diagnostics GmbH (Mannheim); Gibco/BRL (Eggenstein)

Das im folgenden aufgelistete Material für Fotoarbeiten wurde von Annacker (Köln) bezogen: Farbnegativfilm – Ektar 25, Kodak

Farbumkehrfilm – Ektachrom 100, Kodak

Die in dieser Arbeit gezeigten Bildtafeln wurden im Graphikprogramm *Adobe Photoshop* an einem *Macintosh Power PC 8500/120* zusammengestellt und über einen *AGFA PCR II Plus*-Photobelichter oder einen *Epson Stylus* (Photo)Drucker auf *Epson Glossy Paper* (Photo Quality) ausgegeben.

2.2 Puffer, Lösungen und Medien

Ampicillin	50 mg / ml in 70 % Ethanol
Auftragungspuffer	0,1 % Bromphenolblau
BCIP-Lösung	50 mg / ml BCIP-Toluidinsalz in DMF
DAB-Stocklösung	1 mg / ml Diaminobenzidin-Hydrochlorid in PBT
DEPC-H ₂ O	0,1 % (w/v) DEPC in H ₂ O ü.N. auf 37 °C stellen, dann autoklavieren
DNA-Extraktionspuffer (für gen. DNA)	10 mM Tris, pH 8,2; 10 mM EDTA; 200 mM NaCl; 0,5 % SDS; 200 µg / ml Proteinase K, frisch zugefügt
Embryowasser	40 mg „Instant Ocean“ auf 1 l ddH ₂ O
Hyb ⁺	976 µl Hyb ⁻ ; 10 µl denaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg / ml); 5 µl Heparin (10 mg / ml); 4 µl Hefe-tRNA (25 mg / ml)
Hyb ⁻	50 % Formamid; 5 x SSC; 0,1 % Tween 20

5 x Injektionspuffer	25 mM Tris pH 8,0; 2,5 mM EDTA pH 8,0; 0,5 M KCl
LB-Medium	1 % Bacto Trypton; 0,5 % Bacto Yeast Extrakt; 1 % NaCl; pH 7,4 (+ 2 % Agar für Platten zusetzen)
Mesab	400 mg 3-amino benzoic acidethylester (Sigma); 97,9 ml H ₂ O; 2,1 ml 1 M Tris (pH 9); auf pH 7 einstellen Zur Betäubung: 4,2 ml Mesab + 100 ml Tankwasser
Methylzellulose	3 % in Zebrafischringer
NH ₄ Ac / Isopropanol	10 M NH ₄ -Acetat mit Isopropanol 1:4 mischen
NBT-Lösung	100 mg / ml NBT-Salz in 70 % DMF
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4% (w/v) PFA in 1 x PBS
PBS	130 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,6
PBT	0,3 % Triton-X-100 in PBS (für AK-Färbungen) 0,1 % Triton-X-100 in PBS (für <i>in situs</i>)
Phenolrot	2 % in H ₂ O
Proteinase K	14-22 mg / ml (Roche Diagnostic GmbH)
RNase	Stocklösung (10 mg / ml in H ₂ O) zur Inaktivierung von DNasen 10 min kochen Lassen
RNase-Wasser	50 µg RNase / ml
SDS-Puffer	63 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10 % Glycerin; 5 % β-Mercaptoethanol; 3,5 % SDS
SOC-Medium	2 % Bacto Trypton; 0,5 % Bacto Yeast Extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose
20 x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat
STET	8 % Saccharose; 5 % Triton-X-100; 50 mM EDTA, pH 8; 50 mM Tris-HCl, pH 8
TAE	40 mM Tris-Acetat, pH 8; 1 mM EDTA
TE	10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA
X-Gal Färbelösung	930 µl X-Gal Puffer; 30 µl 100 mM K ₄ Fe(CN) ₆ ; 30 µl 100 mM K ₃ Fe(CN) ₆ ; 10 µl 10 % X-Gal in DMF
X-Gal Puffer	150 mM NaCl; 1 mM MgCl ₂ ; 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2
Zebrafischringer (ZFR)	38,7 mM NaCl; 0,97 mM KCl; 1,7 mM Hepes (Sigma); 3,17 mM CaCl ₂

2.3 Molekularbiologische Methoden:

2.3.1 Phagenbank, Bakterienstämme und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die genomische DNA-Bank „*Easy-to-handle eukaryotic genomic library*“ (*zebrafish*) der Firma *Mo Bi Tec*, Göttingen verwendet. Zur Vermehrung und/oder Ausplattierung der Lamdaphagen diente der Bakterienstamm *C-600*. Für die in vivo-Exzision wurde der Stamm *BNN 132* verwendet (Genotypangaben: siehe Hersteller).

Für allgemeine Klonierungen mit pBluescript-Derivaten oder dem Expressionsvektor pCS2+ wurde der Bakterienstamm *DH5 α* verwendet. Die Genotypen dieses Bakterienstammes sind Sambrook *et al.* (1989) oder den Angaben von *Stratagene* zu entnehmen.

Verwendete und hergestellte Vektoren:

Name des Vektors	kurze Beschreibung	verwendet für
pBS 5,1 N/B	5,1 kb des <i>deltaD</i> - Promotors in pBS (siehe: Diplomarbeit Hans, S.)	Screen nach weiteren genomischen Abschnitten des <i>deltaD</i> -Promotors
PS 1	In vivo Exzisionsplasmid der genomischen Bank; enthält das <i>deltaD</i> -Promotorfragment -18kb bis -2,9kb	Herstellung von Promotorkonstrukten
PS 3	In vivo Exzisionsplasmid der genomischen Bank; enthält das <i>deltaD</i> -Promotorfragment -5kb bis +6,5kb	Herstellung von Promotorkonstrukten
pBS gfpSV40	GFP-Variante (mut2 von Cormack <i>et al.</i> , 1996) mit PolyA-Signal	Herstellung von Promotorkonstrukten
pBS 1,3 gfp	1,3 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 1,8 gfp	1,8 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 3,5 gfp	3,5 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 6 gfp	6 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 0,5 gfp +3'	0,5 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor GFP und 6,5 kb stromabwärts Region von <i>deltaD</i> hinter GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 1,3 gfp +3'	1,3 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor GFP und 6,5 kb stromabwärts Region von <i>deltaD</i> hinter GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 1,8 gfp +3'	1,8 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor GFP und 6,5 kb stromabwärts Region von <i>deltaD</i> hinter GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 3,5 gfp +3'	3,5 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor GFP und 6,5 kb stromabwärts Region von <i>deltaD</i> hinter GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 6 gfp +3'	6 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor GFP und 6,5 kb stromabwärts Region von <i>deltaD</i> hinter GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 6 Δ 1,8-1,3 gfp	6 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> mit einer Deletion von 1,8-1,3 vor GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 6 Δ 3,5-1,3 gfp	6 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> mit einer Deletion von 3,5-1,3 vor GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 6 Δ 3,5-1,8 gfp	6 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> mit einer Deletion von 3,5-1,8 vor GFP	Herstellung von Transgenen
pBS 6 Δ 3,5-0,5gfp	6 kb stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> mit einer Deletion von 3,5-0,5 vor GFP	Herstellung von Transgenen
pBS <i>deltaD</i>	cDNA von <i>deltaD</i>	Hergestellt von P. Dornseifer
pBS C-ter. <i>deltaD</i> myc	C-terminales Ende von <i>deltaD</i> mit myc-Epitopen fusioniert	Herstellung von Promotorkonstrukten
pBS <i>deltaD</i> rescue	6 kb stromaufwärts und 4,5 kb stromabwärts Region von <i>deltaD</i> fusioniert mit C-ter. <i>deltaD</i> myc	Herstellung von Transgenen
pBS lacZ	lacZ-Gen mit PolyA-Signal	Herstellung von Promotorkonstrukten
PSC 4	In vivo Exzisionsplasmid der genomischen Bank; enthält das <i>deltaC</i> -Promotorfragment -9kb bis +4kb	Herstellung von Promotorkonstrukten
PSC gfp	4,5 kb stromaufwärts Region von <i>deltaC</i> vor GFP	Herstellung von Transgenen
PSC gfp Δ E-Boxen	4,5 kb stromaufwärts Region von <i>deltaC</i> vor GFP mit Deletion von 42bp	Herstellung von Transgenen

Weitere Vektoren, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, finden sich in den dazugehörigen Abschnitten.

2.3.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Plasmide wurden durch Elektroporation in Bakterien transformiert. Als transformationskompetente Bakterien wurde der E.coli-Stamm *DH5 α* verwendet. Die Herstellung erfolgte nach folgendem Verfahren:

- Animpfen von 1 l LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur im Verhältnis 100:1
- Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1
- 15-20 min auf Eis kühlen
- 15 min bei 4°C und 4000 rpm in einem GSA-Rotor zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 1 l kaltem bidestillierten Wasser lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 0,5 l kaltem bidestillierten Wasser lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 20 ml 10 % Glycerin / H₂O lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 2-3 ml 10 % Glycerin / H₂O lösen
- Suspension in 40 μ l Aliquots aufteilen und in flüssigem Stickstoff einfrieren
- Lagerung bei -70°C

Für die Transformation wurden die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut, mit 0,5-2 μ l der gewünschten Plasmid-DNA gemischt und in, auf Eis gekühlte, 0,2 cm Elektroporationsküvetten überführt. Die Küvette wurde in einen *Gene PulserTM* (Biorad) gestellt und es wurde für 4-5 ms eine Feldstärke von 12,5 kV / cm angelegt (Geräteeinstellung: Kapazität 25 μ F; Spannung 2,5 kV; Widerstand 200 Ω). Anschließend wurde die Küvette schnell entnommen, 1 ml bei 37°C vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz für ca. 60 min bei 37°C belassen. Schließlich wurde ein geeignetes Volumen auf selektive Agarplatten (LB-Agarplatten mit 50 μ g Ampicillin / ml) ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert.

2.3.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur schnellen analytischen Charakterisierung von Plasmiden in transformierten Bakterien wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Animpfen einer einzelnen Bakterienkolonie von Platte in ca. 2 ml LB / Amp-Medium
- Inkubation in einem Roller bei 37°C ü.N.
- Bakterienkultur bei 13000 rpm für 30 sec in Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand absaugen und Pellet in 250 μ l STET-Puffer lösen
- 2 min im Wasserbad kochen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit sterilem Zahnstocher entfernen
- Fällung der DNA durch Zugabe von 200 μ l eines 1:4-Gemisches aus 10 M NH₄OAc / Isopropanol
- 5-10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet mit 70 % Ethanol waschen und unter Tischlampe trocknen
- Pellet in 50-100 μ l H₂O / RNase A (50 μ g / ml) lösen
- Charakterisierung der DNA durch geeignete Restriktionsanalyse

2.3.4 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer DNA-Mengen für präparative Zwecke wurde das *Jet Star 2.0, Plasmid Midi Prep Kit* der Firma Genomed verwendet, wobei entsprechend den Herstellerangaben vorgegangen wurde.

2.3.5 Quantifizierung von DNA und RNA

In der Regel wurde die DNA-Menge durch Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt, wobei eine 1 kb-Leiter von Gibco/BRL mit bekannter Konzentration als Referenz diente.

Für eine genauere Quantifizierung wurde eine photometrische Bestimmung vorgenommen. Dazu wurden geeignete Verdünnungen in Wasser hergestellt und deren Extinktion bei $\lambda=260\text{nm}$ gemessen. Für eine Schichtdicke von 1cm gilt hier:

Doppelsträngige DNA: 1 OD=40 μg
Einzelsträngige DNA oder RNA: 1 OD=50 μg

Zur Überprüfung der Sauberkeit wurde auch die Extinktion bei $\lambda=280\text{nm}$ gemessen und ein Quotient gebildet. Hier gilt für DNA bzw. RNA guter Reinheit: OD 260nm/280nm = 1.8-2.

2.3.6 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Analytische Restriktionsverdau zur Charakterisierung von Plasmid-DNA wurden in Endvolumina von 20 μl durchgeführt, präparative Totalverdau in Endvolumina von 50-200 μl . Die Inkubation erfolgte für 1-2 Stunden bei für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur- und Pufferbedingungen (beides laut Herstellerangaben).

2.3.7 Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten

Während die meisten Klonierungsschritte über kohäsive Enden („sticky ends“) erfolgten, war es manchmal notwendig, die Enden von zu ligierenden DNA-Fragmenten durch eine Auffüllreaktion kompatibel zu machen („blunt ends“). Hierzu wurde das „Klenow-Fragment“ der Polymerase I aus *E.coli* verwendet, welches die Fähigkeit besitzt, die komplementären Nukleosidtriphosphate (dNTPs) an 5'-überhängenden Enden einzufügen. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 30 μl unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 1 μg DNA;
- 0,5 mM dNTPs;
- 1 x Klenow-Puffer;
- 1 U Klenow-Enzym;
- Inkubation: 30' auf Eis.

Anschließend wurde das Enzym bei 70°C inaktiviert und die DNA durch Phenol / Chloroform-Extraktion gereinigt.

2.3.8 Dephosphorylierung von Vektorenden

Die Dephosphorylierung linearisierter Vektorenden zur Vermeidung von Religation erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). 1 U Enzym wurde dem Restriktionsansatz direkt zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Phosphatase 15 min bei 70°C inaktiviert und die DNA durch Phenol / Chloroform-Extraktion gereinigt.

2.3.9 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) in 0.8-1.5% TAE-Agarosegelen bei einer Feldstärke von ca.10V/cm aufgetrennt. Pro 100ml Gelvolumen wurden 0.5µl einer Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) zugegeben. Mit einem UV-Transluminator ($\lambda=312\text{nm}$) konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht, über Videokamera und das *Bioprint DS*-System (*Froebel Labor-Technik*, Software *Amibios* von *American Megatrends*) fotografiert und das Bild über einen *Mitsubishi Video Copy Processor*-Thermodrucker ausgegeben werden.

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte über Vergleich der Laufstrecken mit Fragmenten bekannter Länge (1 kb-Leiter von *Gibco/BRL*).

2.3.10. Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen

DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese in 0,8-1,2 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden mit Hilfe einer sauberen Rasierklinge auf einem UV-Tisch ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des *JETsorb* DNA-Extraktionskits (*Gel Extraction Kit / 300*) der Firma Genomed entsprechend der Herstellerangaben eluiert.

2.3.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen erfolgten durch das Enzym T4-DNA-Ligase (Roche). Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl durchgeführt. Es wurden 100-200 ng geschnittene und mit CIP behandelte Vektoren eingesetzt. Die zu klonierenden Restriktionsfragmente wurden in einem dreifachen molaren (sticky ends) bzw. zehnfachen molaren (blunt ends) Überschuß hinzugegeben. Die Reaktionen wurden bei 16°C ü.N. unter den empfohlenen Pufferbedingungen durchgeführt. Bei „blunt end“-Ligationen wurden, anstelle der sonst üblichen 1U Ligase, 2-3 U des Enzyms eingesetzt.

2.3.12 Sequenzierung von DNA-Konstrukten

Die Sequenzierung von DNA-Konstrukten wurde entweder mit Standardprimern (T3, T7, SP6) oder mit, für das jeweilige Konstrukt, spezifischen Primern durchgeführt. Für die Sequenzreaktion wurde das DNA-Sequenzierungskit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* der Firma Perking Elmer Applied Biosystems unter Beachtung der Herstellerangaben verwendet. Als automatischer Sequenzierer stand das Modell ABI 3.77 der Firma Perking Elmer Applied Biosystems zur Verfügung.

Die Verarbeitung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der *Lasergene / DNASTAR-Biocomputing* Software der Firma DNASTAR, INC., Madison Wisconsin.

2.3.13 Transfer von Phagen-DNA auf Nylonmembranen

Für die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurde die Phagen-DNA auf Nylonmembranen übertragen.

- Hybond-N+ Membranen für 1' auf ausplattierte Phagenbank auflegen
- Membranen 7' auf mit Denaturierlösung getränktes Wattman-Papier legen
- Membranen 2x 3' auf mit Neutralisationslösung getränktes Wattman-Papier legen
- Membranen trocknen und DNA durch UV-Bestrahlung fixieren (120µJoules x 100).

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Neutralisationslösung: 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris (pH:7,2), 1mM EDTA

2.3.14 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA-Sonden durch radioaktives [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP erfolgte mit Hilfe des *Nick Translation System* der Firma *Gibco/BRL*.

2.3.15 Hybridisierung von radioaktiv markierten DNA-Sonden an filtergebundene DNA

An Nylonfilter gebundene DNA wurde in der Regel nach einem von Church und Gilbert (1988) vorgestellten Protokoll mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert.

- Filter für 30'-120' in Church-Hybridisierungslösung bei 65°C präinkubieren
- frische Hybridisierungslösung mit radioaktiv markierter, aufgekochter Sonde (10') zugeben und für wenigstens 16h bei 65°C hybridisieren
- Hybridisierungslösung abnehmen und zwei- bis dreimal für 20' mit Waschlösung waschen
- Aktivität des Filters mit Geigerzähler messen, Filter in Frischhaltefolie einschlagen bei -70°C für geeigneten Zeitraum in Röntgenkassette gegen Röntgenfilm exponieren.

Church Hybridisierungslösung: 100ml Church Stocklösung, 70ml 20% SDS, 30ml H₂O

Church Waschlösung: 40ml Church Stocklösung, 50ml 20% SDS, 910ml H₂O

Church Stocklösung: 1 M Na₂HPO₄, mit H₃PO₄ pH 7,2 einstellen

2.3.16 In vitro mRNA-Synthese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *SP6-RNA-Polymerase Message Kit* der Firma *Ambion* verwendet. Pro Reaktion wurden 1µg linearisierte DNA eingesetzt und gemäss den Herstellerangaben eingesetzt.

Konstrukt	Linearisiert mit:	Hergestellt durch:
CS2+ <i>zash1a</i>	Not I	C. Takke
CS2+ <i>zash1b</i>	Not I	C. Takke
CS2+ <i>ngn1</i>	Not I	P. Blader
CS2+ <i>deltaD myc</i>	Not I	selbst hergestellt

2.3.17 CAT-Assays

Zur Bestimmung der *neurogenin1* (*ngn1*) und *zash1a* sensitiven Promotorelemente wurden quantitative Bestimmungen von Reportergenen der unterschiedlichen Promotorkonstrukte vorgenommen. Hierzu wurden die unten aufgeführten Reportergenkonstrukte hergestellt und deren Aktivität mit Hilfe des CAT ELISA und des β -Gal ELISA der Firma *Roche* bestimmt. Es wurde immer wie folgt vorgegangen (Vize, 1996):

- Injektion des zu testenden Promotorkonstruktes mit der jeweiligen mRNA und des Kontrollplasmides pBS 6lacZ in das Ein- bis Vierzellstadium,
- Entwicklung bis zum 5 Somitenstadium,
- Entfernung des Chorions mittels Pronase-Behandlung (*Zebrafischnote*),
- Aufnahme der Embryonen in 1x Lysispuffer (5 μ l pro Embryo),
- Vortexen bis Lösung klar ist,
- Zentrifugation bei 14000 rpm für 10',
- Überführung des Überstandes in frisches Eppendorfgefäß,
- Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei -70°C,
- Durchführung des CAT ELISA und des β -Gal ELISA nach Herstellerangaben,
- Berechnung des CAT-Wertes durch Festlegung des β -Gal-Wertes gleich 1.

Untersuchte Reportergenkonstrukte:

Name des Vektors	kurze Beschreibung
pBS 0.5 CAT	0.5 kb der stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor CAT-Gen
pBS 1.3 CAT	1.3 kb der stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor CAT-Gen
pBS 1.8 CAT	1.8 kb der stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor CAT-Gen
pBS 3.5 CAT	3.5 kb der stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor CAT-Gen
pBS 6 CAT	6 kb der stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor CAT-Gen
pBS 6 lacZ	6 kb der stromaufwärts Region von <i>deltaD</i> vor lacZ-Gen
pBS 6 Δ 3.5-0.5 CAT	pBS 6 CAT mit Deletion der Region von 3.5-0.5
pBS 6 Δ 3.5-1.3 CAT	pBS 6 CAT mit Deletion der Region von 3.5-1.3
pBS 6 Δ 3.5-1.8 CAT	pBS 6 CAT mit Deletion der Region von 3.5-1.8
pBS 6 Δ 1.8-1.3 CAT	pBS 6 CAT mit Deletion der Region von 1.8-1.3
pBS HI 0.5 CAT	Homologe Region HI kloniert vor pBS 0.5 CAT
pBS HI mut1 0.5 CAT	pBS HI 0.5 CAT mit Mutation der distalen E-Box
pBS HI mut2 0.5 CAT	pBS HI 0.5 CAT mit Mutation der proximalen E-Box
pBS HI mut1+2 0.5 CAT	pBS HI 0.5 CAT mit Mutation beider E-Boxen
pBS HII 0.5 CAT	Homologe Region HII kloniert vor pBS 0.5 CAT
pBS HII 6 mut1 CAT	pBS 6 CAT mit Mutation der distalen E-Box von HII
pBS HII 6 mut2 CAT	pBS 6 CAT mit Mutation der proximalen E-Box von HII
pBS HII 6 mut1+2 CAT	pBS 6 CAT mit Mutation beider E-Boxen von HII

2.3.18 Mutagenese der CAT-Konstrukte

Zur Einführung von Punktmutationen wurde das *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma *Stratagene* verwendet. Für jede Reaktion wurden 10ng Plasmid-DNA eingesetzt.

Primer:

Name	Sequenz (5' ->3')	Länge (bp)
HI 1s	GTGAAAAAACGCTATATCGTTGGGAGCAG	29
HI 1a	CTGCTCCCAACGATATAGCGTTTTTTCAC	29
HI 2s	CATTTGGTTGGGAGTATATCGTTGGCTTGGG	31
HI 2a	CCCAAGCCAACGATATACTCCCAACCAATG	31
HI 1+2s	GTGAAAAAACGCTATATCGTTGGGAGTATATCGTTGGCTTGGG	43
HI 1+2a	CCCAAGCCAACGATATACTCCCAACGATATAGCGTTTTTTCAC	43
HII 1s	GTGAGGGGAGTAGTTCCTGTGTGAATTACC	30
HII 1a	GGTAATTCACACAGGAAGTACTCCCCTCAC	30
HII 2s	GTGAATTACCATATAGTTCAGAGCACAGAG	30
HII 2a	CTCTGTGCTCTGAACTATATGGTAATTCAC	30
HII 1+2s	GTGAGGGGAGTAGTTCCTGTGTGAATTACCATATAGTTCAGAGCACAGAG	50
HII 1+2a	CTCTGTGCTCTGAACTATATGGTAATTCACACAGGAAGTACTCCCCTCAC	50

Orientierung der Primer: s=sense, a=antisense

Mutierte Basen in **fett**.

Für die Mutagenese wurden folgende Primerkombinationen ausgewählt:

Hergestelltes Konstrukt	Primerkombination
HI mut1	HI 1s / HI 1a
HI mut2	HI 2s / HI 2a
HI mut1+2	HI 1+2s / HI 1+2a
HII mut1	HII 1s / HII 1a
HII mut2	HII 2s / HII 2a
HII mut1+2	HII 1+2s / HII 1+2a

Die PCR wurde nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt.

PCR-Programm zur Mutagenese von HI:

- Schritt 1: 95°C, 30''
- Schritt 2: 95°C, 30''
- Schritt 3: 55°C, 60''
- Schritt 4: 68°C, 12'
- Schritte 2-4 12x durchlaufen
- Schritt 5: 4°C, Pause

Matrizen-DNA: pBS HI 0,5CAT

PCR-Programm zur Mutagenese von HII:

- Schritt 1: 95°C, 30''
- Schritt 2: 95°C, 30''
- Schritt 3: 55°C, 60''
- Schritt 4: 68°C, 18'
- Schritte 2-4 12x durchlaufen
- Schritt 5: 4°C, Pause

Matrizen-DNA: pBS6CAT

2.3.19 Mutagenese des *deltaC*-Promotors

Im Rahmen dieser Arbeit bestand die Notwendigkeit eine kleine Deletion im *deltaC*-Promotor einzufügen. Hierzu wurde die Methode der PCR gewählt, bei der zwei an die Deletion angrenzende Fragmente amplifiziert wurden. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass die beiden äusseren Primer unique Schnittstellen haben, mit denen sie wieder in den *deltaC*-Promotor eingefügt werden konnten, und die beiden inneren Primer eine künstlich geschaffene Schnittstelle erzeugten, mit denen sie aneinander gefügt werden konnten.

Name	Sequenz (5' ->3')	Länge (bp)	Lage des Primers
dIC Acc	GCATCATTAGATTAAGTAGACTG	23	stromaufwärts Region von <i>deltaC</i> 5' Primer des 5'-Fragmentes
dIC S/B	GCGGAGCTCGGATCCGTGTTTGC GCTTCGC	30	stromaufwärts Region von <i>deltaC</i> 3' Primer des 5'-Fragmentes
dIC A/B	CATGGTACCGGATCCAAAGCCCC CTCCCAG	30	stromaufwärts Region von <i>deltaC</i> 5' Primer des 3'-Fragmentes
dIC Xba	CTCCTTCTTAAATCTAGACCTTC	23	stromaufwärts Region von <i>deltaC</i> 3' Primer des 3'-Fragmentes

Konstrukt	Primerkombination	Länge des amplif. Bereiches (bp)
deltaC 5'-Fragment	dIC Acc / dIC S/B	905
deltaC 3'-Fragment	dIC A/B / dIC Xba	1022

PCR-Programm zur Mutagenese des *deltaC*-Promotors:

- Schritt 1: 94°C, 3'
- Schritt 2: 94°C, 1'
- Schritt 3: 52°C, 1'
- Schritt 4: 72°C, 1'
- Schritte 2-4 28x durchlaufen
- Schritt 5: 72°C, 7'
- Schritt 6: 4°C, Pause

Matrizen-DNA: PSC

Nach Amplifikation wurden die Fragmente in pBluescript subkloniert und nach Sequenzierung für die Herstellung des Konstrukts PSC gfp Δ E-Boxen verwendet.

2.3.20 Western-Blot-Analyse

Western-Blot Analysen wurden zum Nachweis der myc-Epitope durchgeführt. Die Protein-Extraktion erfolgte nach einem Protokoll aus dem *Zebrafischbuch* (Seite 9.1). Dabei wurde im Wesentlichen folgendermaßen vorgegangen:

- Entfernung des Chorions durch 5 minütige Pronasebehandlung bei RT (1 mg Pronase / ml ZFR)
- 3 x kurz mit ZFR waschen
- in SDS-Puffer homogenisieren
- 1' im Wasserbad kochen
- 5' bei 13.000 rpm zentrifugieren

Der Überstand wurde auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine für 2 h bei 12,5 A aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe des Gerätes *Power Pac 2000* der Firma BIO RAD für 30' bei 10 V in Transfer-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin; 0,037 % SDS; 20 % MeOH) auf Nitrozellulose Membranen transferiert. Die Membranen wurden wie folgt weiterbehandelt:

- 1 h mit 10 % Milchpulver in TTBS (20 mM Tris; 500 mM NaCl; 0,05 % Tween 20; pH 7,5) blocken
- ü.N. bei 4°C mit dem für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper inkubieren
- 3 x 10' bei RT mit TTBS waschen
- 1 h bei RT mit dem für den 1. Antikörper spezifischen 2. Antikörper inkubieren
- 3 x 10' bei RT mit TTBS waschen

Färbung mit NBT / BCIP auf die in Kapitel 2.4.3 beschriebene Weise

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Fixierung von Zebrafischembryonen

Um die nachfolgend beschriebenen Färbungen durchzuführen, wurden Zebrafischembryonen wie folgt fixiert und gegebenenfalls gelagert:

- Embryonen im gewünschten Stadium ÜN bei 4°C in 4% PFA,
- 3x kurz in PBT waschen,
- Embryonen mit feinen Uhrmacherpinzetten dechorionisieren,
- Embryonen für 5' in Methanol,
- Methanol durch frisches ersetzen und bei -20°C lagern (mindestens 1 Jahr möglich).

2.4.2 Herstellung Digoxigenin / Fluorescein-markierter RNA-Sonden

Folgendes Protokoll wurde verwendet:

- zur Herstellung von Gegenstrang („antisense“-)Sonden den Vektor im 5'-Bereich des als Matrize dienenden cDNA-Fragmentes mit einem geeigneten Enzym linearisieren
- den linearisierten Vektor mit Phenol und Chloroform extrahieren, mit EtOH fällen und in einem geeigneten Volumen DEPC-H₂O aufnehmen
- die Markierung erfolgt für 2 h bei 37°C in folgendem Reaktionsansatz:

- x µl linearisierter Vektor (x µl sollen 1 µg Vektor enthalten)
 - 2 µl 10 x Transkriptionspuffer
 - 2 µl Dig / Flu-NTP labeling mix
 - 1 µl RNase-Inhibitor (40 U / µl)
 - 2 µl T3 oder T7-Polymerase
 - auf 20 µl mit DEPC-H₂O auffüllen
- nach Ablauf der Inkubationszeit U RNase-freie DNase (Roche) zugeben, und die noch vorhandene Vektor-DNA abzubauen, und den Reaktionsansatz für weitere 30' bei 37°C inkubieren,
 - die Reaktion mit 2 µl 0,1 M EDTA abstoppen und die Sonde zur Aufreinigung auf eine mit RNase freiem Sephadex (G-50, Fluka; in DEPC-H₂O gelöst und autoklaviert) beladene Säule (QIAquick™ PCR Purification Kit (50) der Firma QIAGEN) geben (Vorbereitung der Säule: ca.600 µl Sephadex-Lösung auf die Säule geben 1' bei 4.000 rpm zentrifugieren) Eluat verwerfen),
 - die Säule in ein Eppendorf-Zentrifugenröhrchen stellen und 1' bei 4.000 rpm zentrifugieren,
 - dem Eluat zur Fällung 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl 100 % EtOH zugeben und für mindestens 2 h bei -20°C stehen lassen,
 - 30' bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen, mit 70 % EtOH waschen, kurz zentrifugieren und Pellet trocknen,
 - Aufnehmen in 80 µl DEPC-H₂O / 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U / µl).

Folgende Sonden wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Sonde	Name des Vektors	Vektor erhalten von	linearisieren mit	Polymerase
<i>deltaD</i>	pBS <i>deltaD</i>	P. Dornseifer	HindIII	T3
<i>gfp</i>	pBS <i>gfp</i> insi	N. Scheer	XbaI	T3
<i>her1</i>	pBS <i>her1</i>	E. von Weizäcker	XhoI	T3
<i>myoD</i>	pBS <i>myoD</i>	E. Weinberg	BamHI	T7
<i>mesp-a</i>	pBS <i>mesp-a</i>	L. Durbinn	BamHI	T7
<i>ngn</i>	pBS <i>ngn1</i>	U. Strähle	XhoI	T7
<i>elav/HuC</i>	pBS <i>elav/HuC</i>	O. Muraoka	SacI	T7
<i>islet-1</i>	pBS <i>isl-1</i>	V. Korzh	EcoRI	T7
<i>zash 1a</i>	pBS <i>zash 1a</i>	M. Allende	BamHI	T7
<i>zash 1b</i>	pBS <i>zash 1b</i>	M. Allende	BamHI	T7

2.4.3 Digoxigenin-Färbung

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Embryonen in 4 % PFA ü.N. bei 4°C oder 2 h bei RT fixieren,
- 2 x kurz in PBT waschen und dechorionisieren,
- Embryonen 3 x kurz mit kaltem 100 %igen MeOH waschen und dann entweder längerfristig bei -20°C in MeOH lagern oder für die weitere Verwendung mindestens 3 h unter den gleichen Bedingungen inkubieren,
- für 5' mit 50 % MeOH / PBT waschen,
- für 5' mit 30 % MeOH / PBT waschen,
- 2 x 5' in PBT waschen,
- für 20' in 4 % PFA nachfixieren,

- 2 x 5' in PBT waschen,
- zur stärkeren Permeabilisierung der Embryonen Taumeln mit 2 µg / ml Proteinase K/ PBT inkubieren (bis 2 Somiten-Stadium für 3'; bis 24 Somiten-Stadium für 5'; ältere Stadien für 8'),
- kurz mit PBT spülen, dann 5' mit PBT waschen,
- für 20' in 4 % PFA nachfixieren,
- 5' mit PBT waschen,
- zur Unterdrückung endogener Phosphatasen Embryonen in 1 ml 0,1 M Triethanolamin pH 7 mit 2,5 µl Acetanhydrid für 10' inkubieren,
- 2 x 5' in PBT waschen,
- Embryonen für 5' in Hyb⁻ bei 65°C inkubieren, dann 4 h bei 65°C in Hyb⁺ prähybridisieren,
- 100 µl frisches Hyb⁺ mit 1 µl denaturierter, digoxigenin-markierter RNA-Probe zugeben und für 6 h bei 65°C inkubieren,
- Hybridisierungslösung entfernen (kann wiederverwendet werden),
- 10' bei 65°C mit 75 % Hyb⁺ / 25 % 2 x SSC waschen,
- 10' bei 65°C mit 50 % Hyb⁺ / 50 % 2 x SSC waschen,
- 10' bei 65°C mit 25 % Hyb⁺ / 75 % 2 x SSC waschen,
- 10' bei 65°C mit 2 x SSC waschen,
- 2 x 30' bei 65°C mit 0,2 x SSC waschen,
- 10' mit 75 % 0,2 x SSC / 25 % PBT waschen,
- 10' mit 50 % 0,2 x SSC / 50 % PBT waschen,
- 10' mit 25 % 0,2 x SSC / 75 % PBT waschen,
- 10' mit PBT waschen,
- 2 h in 1 % BSA / PBT präinkubieren,
- Inkubation bei 4°C ü.N. mit alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Fab₂-Fragmenten (zuvor auf unbehandelten Embryonen präabsorbiert), 1:1000 verdünnt in 1 % BSA / PBT
- 8 x 15' mit PBT waschen,
- Embryonen 2 x 5' in Dig-Färbelösung waschen,
- 1 ml frische Dig-Färbelösung mit 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP zugeben und in Dreierblockschälchen überführen,
- Im Dunklen inkubieren und bei ausreichender Färbung Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBT abstoppen,
- je nach Bedarf in Araldit oder Glycerin einbetten.

2.4.4 Digoxigenin / Fluorescein-Doppelfärbung

In manchen Fällen wurde eine Dig (blau) / Flu (rot)-Doppelfärbung an Embryonen durchgeführt, um die Expression zweier unterschiedlicher RNA-Typen in einem Embryo beobachten zu können. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Protokoll von oben verfolgen, nur die Embryonen jetzt mit beiden markierten Sonden ü.N. bei 65°C inkubieren und bei der Inkubation mit den Fab-Fragmenten den anti-Flu Antikörper (1:1000) verwenden,
- nach den 8 x 15'-Waschschritten in PBT die Embryonen 2 x 5' in 0,1 M Tris pH 8,2 / 0,1 % Tween 20 waschen,
- während des Waschens eine Fast-Red-Tablette (Roche) in 2 ml 0,1 M Tris pH 8,2 / 0,1 % Tween 20 auflösen,
- Embryonen zusammen mit der Färbelösung in Dreierblockschälchen überführen und wie bei der Dig-Reaktion färben lassen,
- bei ausreichender Färbung 3 x 5' mit PBT waschen,

- freie Phosphataseaktivität durch Inkubation für 10' in 0,1 Glycin-HCl pH 2,2 / 0,1 % Tween 20 blockieren,
- 4 x 5' mit PBT waschen,
- Inkubation bei 4°C ü.N. mit alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Dig-Fragmenten, wie oben beschrieben und danach das Protokoll für die Färbung zu Ende führen.

2.4.5 Kombinierte *in situ* Hybridisierung und Antikörperfärbung

In manchen Fällen wurde eine *in situ* Hybridisierung und eine myc-Antikörperfärbung an den selben Embryonen durchgeführt, um gleichzeitig das Expressionsmuster eines bestimmten RNA-Typs beobachten und das Vorhandensein von myc-Epitopen nachweisen zu können. In diesen Fällen wurden die Embryonen mit EtOH, anstelle von MeOH behandelt, da sich herausgestellt hatte, daß das myc-Epitop nach Behandlung mit MeOH nicht mehr von diesem Antikörper erkannt wird. Die *in situ* Hybridisierung wurde wie beschrieben durchgeführt, wobei der anti-myc Antikörper zusammen mit den alkalische Phosphatase gekoppelten anti-Dig Fab-Fragmenten inkubiert wurde. Danach wurde die *in situ* Hybridisierung beendet und anschließend der zweite Antikörper der Immunofärbung bei 4°C inkubiert.

2.4.6 X-Gal Färbungen zum Nachweis von β -Gal-Aktivität

Das für die CAT-Assays notwendige Konstrukt pBS-CAT wurde durch Injektion in Zebrafischembryonen getestet.

- Fixieren der Embryonen für 10' bei RT in 12,5 % Glutaraldehyd / PBS,
- kurz mit H₂O waschen, dann 3 x mit PBS / 3 % Triton X-100,
- Embryonen mit Uhrmacherpinzetten dechorionisieren,
- für mehrere Stunden oder ü.N. in X-Gal Färbelösung (Roche) bei 37°C inkubieren,
- Reaktion durch mehrmaliges Waschen in PBT stoppen.

2.5 Fischhaltung und Eiablagen

2.5.1 Haltung

Als Wildtyp-Stamm des Zebrafisches (*Danio rerio*) wurden Tiere verwendet, die ursprünglich aus einem Kölner Aquarienfachgeschäft bezogen und in eigener Zucht vermehrt wurden. Die Haltung erfolgte in einem geschlossenen Aquariensystem (Aquarienbau Schwarz, Göttingen), bei einer Wassertemperatur von ca. 28°C und einem Lichtrythmus von 14 h hell und 10 h dunkel. Die Aquarienfüllung erfolgte durch ein 1:1-Gemisch von entmineralisiertem (VE) Wasser und Leitungswasser.

Jungfische wurden ohne Fütterung bis zum 5. Tag ihrer Entwicklung in mit Embryowasser oder Zebrafischringer gefüllten Petrischalen in einem 29°C-Brutschrank gehalten. Anschließend wurden die Fische in 2 l Wassercontainern aufgezogen. Bis zu einem Alter von zwei Wochen wurde ein spezielles Trockenfutter (Tetra) für Jungfische verfüttert, danach zunächst Artemien und schließlich Bosmidien und Drosophila-Larven. In Fällen, in denen das Auskreuzen einzelner Fische notwendig war, wurden geschlechtsreife Fische separat in 1 l Plastikboxen gehalten.

2.5.2 Eiablage

Eier wildtypischer Fische wurden in aller Regel aus Kreuzungen mehrerer adulter Tiere erhalten. Dazu wurden 4 Monate bis 2 Jahre alte Zebrafisch-Männchen und -Weibchen bis zu einer Gesamtzahl von maximal 20 Tieren in großen 20 l-Tanks zusammengesetzt. Einmal in der Woche wurde abends eine Laichbox in den jeweiligen Tank gestellt und am nächsten Morgen wurden die Embryonen ca. eine halbe Stunde nach Beginn der Hellzeit abgesammelt. Einzelkreuzungen wurden in 2 l Wassercontainern durchgeführt, deren Böden mit Murmeln bedeckt waren. Die zu kreuzenden Männchen und Weibchen wurden bis zu 6 Stunden vor Beginn der Dunkelzeit zusammengesetzt und die Eier kurz nach dem Beginn der darauffolgenden Hellzeit abgesammelt.

2.6 Mikroinjektion

2.6.1 Reinigung der zu injizierenden DNA-Fragmente

Zur Herstellung transgener Linien wurden geschnittene und von Vektorsequenzen befreite DNA-Fragmente injiziert. Für die Aufreinigung dieser Sequenzen wurden ca. 50-100 µg Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und die Fragmente durch Gelelektrophorese in 1 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Das gewünschte DNA-Stück wurde über einem UV-Tisch mit einem Rasiermesser ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *JETsorb Gel Extraktions-Kits (Gel Extraction Kit / 300)* der Firma Genomed extrahiert. Dabei wurden die Herstellerangaben befolgt. Die Elution der DNA von den Glasmilchkugeln erfolgte mit 50 µl H₂O. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des *Jet Star 2.0, Plasmid Midi Prep Kit* der Firma Genomed weiter aufgereinigt. Dazu wurde der DNA-Lösung zunächst ein 9-faches Volumen des Äquilibrierungspuffers aus dem Aufreinigungs-Kit hinzugefügt. Danach wurde die Lösung über eine äquilibrierte Säule gegeben und alle weiteren vom Hersteller empfohlenen Schritte für die Aufreinigung von Plasmid-DNA befolgt. Die gefällte DNA wurde schließlich in 50 µl H₂O aufgenommen.

2.6.2 Injektionslösung

Die Injektionslösung enthielt die folgenden Komponenten: 35-50 ng / µl des zu injizierenden DNA-Fragmentes; 0,2 % Phenolrot zur Abschätzung des Injektionsvolumens; 1 x Injektionspuffer zur Erzeugung physiologischer Bedingungen; H₂O zur Verdünnung.

2.6.3 Injektionen

Die DNA-Lösung wurde vornehmlich in die sich bildende Plasmakappe des frühen Zygotenstadiums injiziert. Die Mikroinjektionen erfolgten unter einem *Zeiss-Stereomikroskop (Stemi DRC)*. Der für die Injektionen notwendige Druck wurde mit gasförmigem Stickstoff erzeugt und durch ein WPI-Injektionsgerät (*PV 820*) reguliert. Die Bewegungen der Kapillare wurden mit Hilfe eines Leitz-Mikromanipulators ausgeführt.

Als Mikropipetten wurden 1 mm Hilgenberg-Glaskapillaren mit Innenfilament verwendet, die auf einem *Flaming / Brown P-97 Micropipette Puller* der Firma Sutter Instruments Co ausgezogen und unmittelbar vor der Injektion unter dem Stereomikroskop mit einer feinen Uhrmacherpinzette auf eine geeignete Länge gekürzt wurden. Als Geräteeinstellung wurden

folgende Parameter zur Herstellung geeigneter Injektionsnadeln empirisch ermittelt: *heat*-537; *pull*-100; *velocity*-100; *time*-150.

Die Injektionen erfolgten in Zebrafischringer. Dabei wurde das Ei mit der Kapillarenspitze in eine für die Injektion günstige Orientierung gebracht und die Kapillare in steilem Winkel durch das Chorion hindurch in das Zytoplasma eingeführt. Daraufhin wurde durch Betätigung eines Fußschalters für eine Sekunde der Injektionsdruck aufgebaut und die DNA-Lösung ins Ei injiziert. Erfolgreiche Injektionen waren durch eine leichte Rotfärbung des Cytoplasmas zu erkennen. Aus der Zahl der Embryonen, die mit einem gegebenen Volumen Lösung injiziert werden konnten ergab sich, daß pro Embryo ungefähr 5-10 nl Injektionslösung injiziert wurden.

Am Tag nach der Injektion mit einem bestimmten DNA-Fragment wurde überprüft, wieviele der befruchteten, injizierten Eier sich normal entwickelt hatten. Gegebenenfalls wurde daraufhin die DNA-Konzentration neu eingestellt, so daß gewährleistet war, daß bei folgenden Injektionen etwa 70 % der Embryonen keine erkennbaren morphologischen Defekte zeigten.

2.7 Sichtung potentiell transgener Gründerfische und Isolierung transgener Fischlinien

Sowohl der Nachweis der injizierten DNA-Fragmente in der Keimbahn der manipulierten Fische (F_0) und somit eine mögliche Integration ins Genom, wie auch die endgültige Isolierung transgener Linien wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Methode zur gezielten Amplifikation geringer Mengen spezifischer DNA-Fragmente um einen Faktor von 10^5 - 10^9 (Mullis, 1990). Das gesamte Protokoll zur Herstellung, Identifizierung und Etablierung transgener Fischlinien ist in Bild 2.1 dargestellt. Injizierte, potentielle Gründerfische wurden untereinander oder gegen Wildtyppartner ausgekreuzt und Gruppen von 24 h alten F_1 -Embryonen durch PCR auf das Vorhandensein des injizierten DNA-Fragmentes getestet. Da durch Mikroinjektion erzeugte Gründerfische aufgrund eines späten Insertionsereignisses einen starken Keimbahnmosaizismus aufweisen können (Stuart *et al.*, 1988) wurden mindestens 100 F_1 -Nachkommen jedes injizierten Fisches getestet. Konnten PCR-Signale reproduzierbar nachgewiesen werden, so wurde der entsprechende Gründerfisch erneut gegen einen Wildtyppartner gekreuzt und mindestens 100 F_1 -Nachkommen wurden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen. Nach Gewinnung genomischer DNA aus den Schwanzflossen der einzelnen Adulttiere wurden mittels PCR transgene Individuen jeder Linie identifiziert. Der Nachweis des Transgens in der Schwanzflosse wurde auch in den folgenden Generationen für jedes Einzeltier in der beschriebenen Weise erneut durchgeführt. In aller Regel wurde ein Transgen nicht über mehrere Generationen in Homozygose gehalten, sondern Träger der Insertion wurden immer wieder gegen Wildtyppartner gekreuzt, da sich Inzuchtlinien als weniger robust im Vergleich zu heterogenen Fischen erwiesen haben (Cyrus Papan und Christoph König, persönliche Mitteilung).

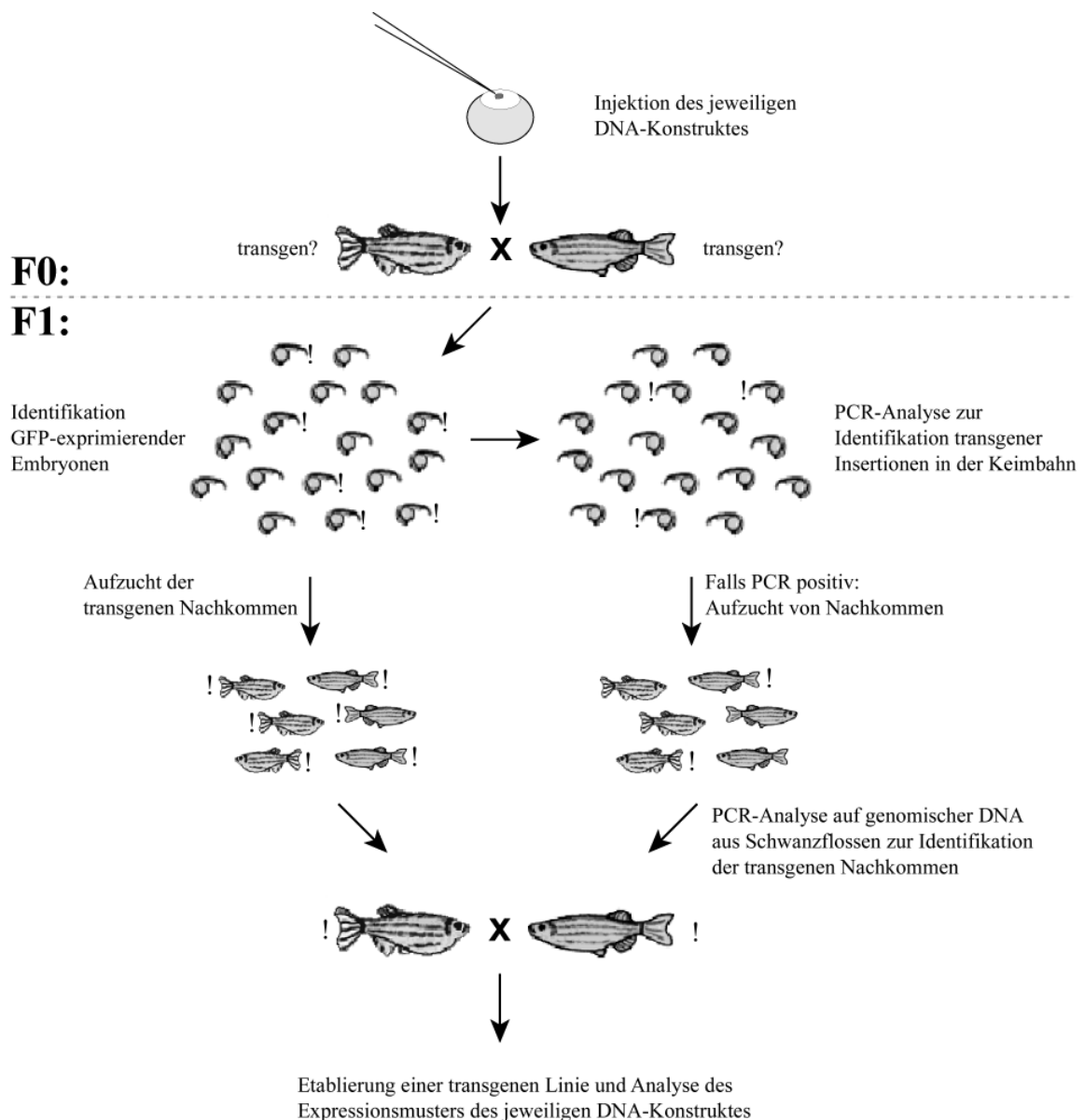


Bild 2.1: Schema der Methode zur Herstellung, Identifizierung, Etablierung und Analyse transgener Linien beim Zebrafisch. Injizierte, potentielle Gründerfische (F0) wurden untereinander gekreuzt und deren Nachkommen (F1) mit Hilfe eines Fluoreszenz-Stereomikroskopes nach GFP-exprimierenden Embryonen gesichtet. Positive Tiere wurden ausgewählt und aufgezogen. Wurde kein GFP-exprimierender Embryo gefunden, wurde eine PCR-Analyse auf aus den Embryonen gewonnene, genomische DNA durchgeführt. Transgene Nachkommen PCR-positiver Gründerfische wurde durch PCR-Analysen auf genomische DNA aus Schwanzflossen identifiziert. Transgene F1-Nachkommen wurden zur Etablierung der transgenen Linie und zur Analyse des jeweiligen DNA-Konstruktes untereinander gekreuzt. Transgene Insertionen sind durch ein Ausrufezeichen (!) markiert.

2.7.1 Fluoreszenz-Beobachtungen zur Identifikation transgener Zebrafischembryonen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das aus der Qualle stammende „Green Fluorescent Protein“ (GFP) als Reportergen verwendet. Die Fluoreszenz wurde unter einem Leica-

Stereomikroskop (*MZ FLIII*) mit Fluoreszenzlampe und einem speziellen gfp-Filter beobachtet. Identifizierte Individuen, die das Protein exprimieren, wurden auf einen Hohlschliff-Objektträger in Methylzellulose überführt. Bei älteren Stadien (ab. 18 Stunden) wurden der Lösung einige Mikroliter Mesab hinzugefügt, um unerwünschte Bewegungen zu unterbinden. Sollten Beobachtungen an Individuen gemacht werden, die älter als 30 Stunden waren, so wurden die Embryonen ab ca. 18 Stunden in einer PTU-haltigen Lösung gehalten (0,003 % 1-Phenyl-2-thiourea in Zebrafischringer), wodurch die Pigmentierung verhindert wird. Die Aufnahmen der fluoreszierenden Organismen wurden mit Hilfe des Programms *Diskus* für den IBM-PC erstellt.

2.7.2 Extraktion genomischer DNA aus F₁-Embryonen und Schwanzflossen

F₁-Embryonen wurden für einen Tag in Embryowasser oder Zebrafischringer bei 29°C gehalten. Adulte Fische wurden für die Schwanzflossen-Amputation mit Mesab betäubt und die Schwanzflosse mit einer feinen Schere abgeschnitten. Die Fische wurden danach bis zur Auswertung des Ergebnisses in Einzelboxen gehalten. Nach einer Woche hatte sich die Schwanzflosse in aller Regel regeneriert und die Fische konnten gekreuzt werden.

Die Extraktionen wurden nach einem Protokoll aus dem *Zebrafischnotebook* durchgeführt:

- Überführen von bis zu 5 Embryonen bzw. einer abgeschnittenen Schwanzflosse in ein Eppendorf-Zentrifugenröhrchen und Absaugen der Flüssigkeit,
- Waschen mit H₂O,
- Absaugen der Flüssigkeit,
- Zugabe von 50 µl DNA-Extraktionspuffer / Proteinase K zur Schwanzflosse oder zu den Embryonen oder bei mehr als fünf Embryonen 10 µl pro Embryo,
- Inkubation bei 50°C für mindestens 3 h unter gelegentlichem Vortexen,
- Zugabe eines doppelten Volumens EtOH, mischen und 30' auf Eis stellen,
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren,
- Überstand verwerfen, Pellet mit 70 % EtOH waschen und für 2' zentrifugieren,
- Überstand verwerfen und Pellet trocknen,
- Pellet aus Schwanzflossen-Präparation in 40 µl TE lösen, Pellet genomischer DNA aus Embryonen in 20 µl TE oder in 4 µl pro Embryo bei mehr als fünf Embryonen lösen,
- Lagerung bei -20°C.

Für die 25 µl PCR-Reaktionen wurden 5 µl genomischer DNA-Lösung eingesetzt.

2.7.3 PCR zur Identifikation transgener Zebrafische

Für die PCR-Analysen wurden Primer verwendet, die mit dem Programm *PRIMERS* für den *Apple Macintosh PC* nach folgenden Kriterien ausgewählt wurden:

- Der vom jeweiligen Primerpaar amplifizierte Bereich sollte nicht mehr als 1 kb betragen, um eine schnelle und effiziente Amplifikation zu ermöglichen.
- Die Anlagerungstemperatur T_A („annealing“) sollte bei über 55°C liegen, damit eine hohe Spezifität gewährleistet ist.
- Störende Interaktionen der Primer mit sich selbst (Haarnadelschleifen, Dimerisierung) und mit dem anderen Primer sollten möglichst ausgeschlossen werden.
- Unspezifische Bindungen in der Zielsequenz sollten minimiert werden.

Folgende Primer wurden ausgewählt und von der Firma Eurogentec synthetisiert:

Name	Sequenz (5'→3')	Länge (bp)	Lage des Primers
gfp	CGTGTCTTGTAGTTCCCCTCATC	23	Codierende Region von GFP
deltaD	CAACAGAGCATCAACCCGAGC	21	Promotorregion von <i>deltaD</i>
deltaC	TATCTGGTTGTGGTTAGCGTGGG	23	Promotorregion von <i>deltaC</i>
aei s	ACCCACAAGGACAAGCCATCGTT	23	Codierende Region von <i>deltaD</i>
aei a	ATAGTTCTAGAGGCTCGAGAGGCC	24	Codierende Region der myc-Epitope

Für die spezifische Erkennung der injizierten Konstrukte wurden folgende Primerkombinationen ausgewählt:

Erkanntes Konstrukt	Primerkombination	T _A (°C)	Länge des amplif. Bereiches (bp)
<i>deltaD gfp</i>	deltaD / gfp	62	480
<i>deltaC gfp</i>	deltaC / gfp	62	600
<i>deltaD rescue</i>	aei s /aei a	62	720

PCR-Programm zur Identifizierung von transgenen Zebrafischen:

- Schritt 1: 94°C, 3'
- Schritt 2: 94°C, 1'
- Schritt 3: 61°C, 1'
- Schritt 4: 72°C, 1'
- Schritte 2-4 32x durchlaufen
- Schritt 5: 72°C, 7'
- Schritt 6: 4°C, Pause

Matrizen-DNA: Genomische DNA gewonnen aus Embryonen oder Schwanzflossen

2.12 Abkürzungen, Symbole und Konventionen

AP	–	alkalische Phosphatase
BCIP	–	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	–	Basenpaar(e)
BSA	–	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
cDNA	–	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
DAB	–	Diaminobenzidin
DEPC	–	Diethylpyrocarbonat
Dig	–	Digoxygenin
DTT	–	Dithiothreitol
EDTA	–	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
h	–	Stunde
HEPES	–	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethan)-Sulfonsäure
kB	–	Kilobasenpaare
kDa	–	Kilodalton
LB	–	Luria Bertani-Medium
min	–	Minute

mRNA	–	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NBT	–	Nitro-Blue-Tetrazolium
OD	–	optische Dichte
PCR	–	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PBS	–	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBT	–	PBS mit Tween 20
PFA	–	Paraformaldehyd
rpm	–	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	–	Raumtemperatur
SDS	–	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	–	Sekunden
SSC	–	<i>standard saline citrate</i>
TAE	–	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Tris	–	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	–	Einheit (<i>unit</i>)
ü.N.	–	über Nacht
UV	–	ultraviolette Strahlung
X-Gal	–	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid
`	–	Minute(n)
``	–	Sekunde(n)

Genetische Nomenklatur in dieser Arbeit: Gene, -mRNAs und -Phänotypen klein und kursiv. Proteine nicht-kursiv und Anfangsbuchstaben groß.

Bezeichnung von Entwicklungsstadien beim Zebrafisch: Die Einteilung und Bezeichnung jüngerer Stadien erfolgte im Wesentlichen nach den Kriterien von Kimmel et al. (Kimmel *et al.*, 1995). Bei älteren Stadien wurde die Zeit nach der Befruchtung unter standardisierten Aufzuchtbedingungen zur Bezeichnung eines Stadiums verwendet. Da sich selbst unter diesen Bedingungen nicht alle Individuen genau gleich schnell entwickeln (Kimmel *et al.*, 1995), mag es zu leichten Unterschieden im Alter zweier Vergleichstiere kommen. Da in dieser Arbeit aber in allen Fällen mit einer relativ großen Zahl von Nachkommen gearbeitet werden konnte, sollten sich solche Unterschiede über die betrachtete Organismenzahl herausmitteln. Zeitangaben zur Bezeichnung eines Entwicklungsstadiums beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, immer auf den Zeitpunkt der Befruchtung. In Fällen bei denen der Ausdruck Larve verwendet wurde, müssen drei Tage zur Berechnung der seit der Befruchtung vergangenen Zeit hinzugezählt werden, da Larven mit ca. drei Tagen aus dem Chorion schlüpfen.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung des *deltaD* Locus

Durch die Verwendung einer ^{32}P -radioaktiv markierten Sonde, die einen proximalen Teil der stromaufwärtsliegenden Region von *deltaD* umfasste (genomischen Klon erhalten von P. Dornseifer), wurden vier positive Klone aus einer genomischen Bank isoliert. Vorläufige Restriktionsanalysen zeigten, dass einer der Klone „falsch positiv“ und ein Klon doppelt vorhanden war. Die beiden verbliebenen Klone, PS1 und PS3, umfassen ca. 21 kb flankierende Sequenz des *deltaD* Locus, wobei sie sich mit 3,5 kb überlappen. Insgesamt wurden im Laufe dieser Arbeit 12,5 kb des *deltaD* Locus sequenziert, davon 6 kb der stromaufwärts- und 6,5 kb der stromabwärtsliegenden Region (siehe Anhang). Der stromaufwärtsliegende Bereich wurde mit dem stromaufwärtsliegenden Teil des *Delta-like-1* (*Dll1*) Promotors aus Maus verglichen und führte zur Identifikation zweier stark konservierter Regionen, Homologie I (HI) und Homologie II (HII). HI bzw. HII aus Zebrafisch haben eine Größe von 267 bzw. 172 bp und eine Sequenzidentität von 80% bzw. 84% in einer optimierten Gruppierung mit HI bzw. HII aus Maus (Beckers *et al.*, 2000; siehe Anhang). Des Weiteren zeigt die Sequenzanalyse, dass die kodierende Region von *deltaD* sich in 11 Exons und 10 Introns verschiedenster Größen aufteilt (Bild 3.1).

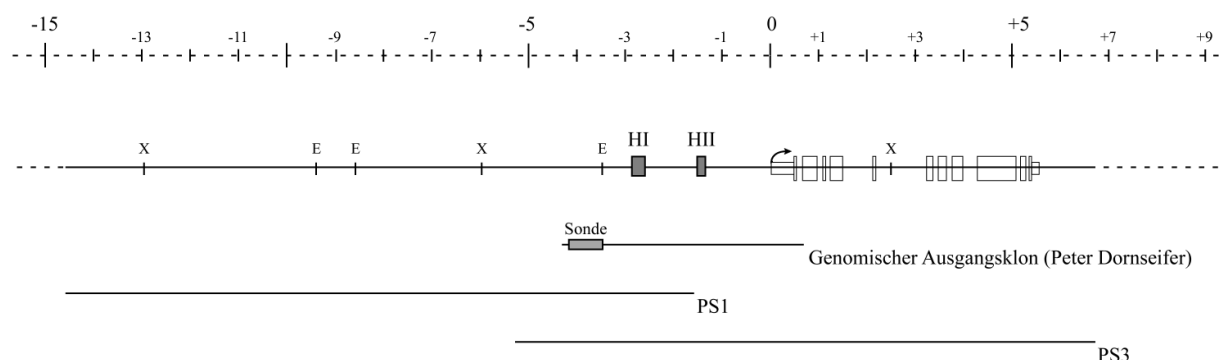


Bild 3.1: Der *deltaD* Locus.

Die oberste Karte bezeichnet die Koordinaten des *deltaD* Locus in kb vom Transkriptionsstartpunkt. Darunter dargestellt ist die genomische Karte mit den beiden konservierten Regionen HI und HII im stromaufwärtsliegenden Bereich, der Intron-Exon-Struktur des *deltaD* Gens im stromabwärtsliegenden Bereich und den Bindestellen für die Restriktionsenzyme EcoRI (E) bzw. XbaI (X). Der Umfang und die Größe der mit Hilfe einer Sonde aus dem Ausgangsklone isolierten genomischen Klone, PS1 und PS3, ist ebenfalls dargestellt. Die ungefärbten Boxen im stromabwärts vom Transkriptionsstart liegenden Bereich repräsentieren die Sequenz der cDNA von *deltaD*, wobei die kleineren Boxen am Anfang bzw. am Ende die „leader-“ bzw. die „trailer-Sequenz“ darstellen.

3.2 Herstellung stabiler transgener Linien

Mit Hilfe der beiden genomischen Klone, PS1 und PS3, wurden alle in Bild 3.2 aufgelisteten Konstrukte zur Herstellung von transgenen Linien erzeugt. Für jedes der Konstrukte war es möglich, stabile Insertionen mit einer Insertionsfrequenz von 5% bis 15% herzustellen. Die durch zufällige Integration ins Genom erzeugten transgenen Gründerfische lassen sich betreffend ihrer Expressionsstärke in drei verschiedene Klassen einordnen (Tabelle 3.1). Starke Expression bezeichnet die Beobachtung von GFP in vivo unter Fluoreszenzlicht, wohingegen schwache oder keine Expression nur mit Hilfe einer *gfp* Sonde in einer in situ Hybridisierung nachgewiesen werden konnte. Es wurden stets mindestens zwei unabhängige Integrationsereignisse zur Analyse des jeweiligen Reportergenkonstruktes charakterisiert.

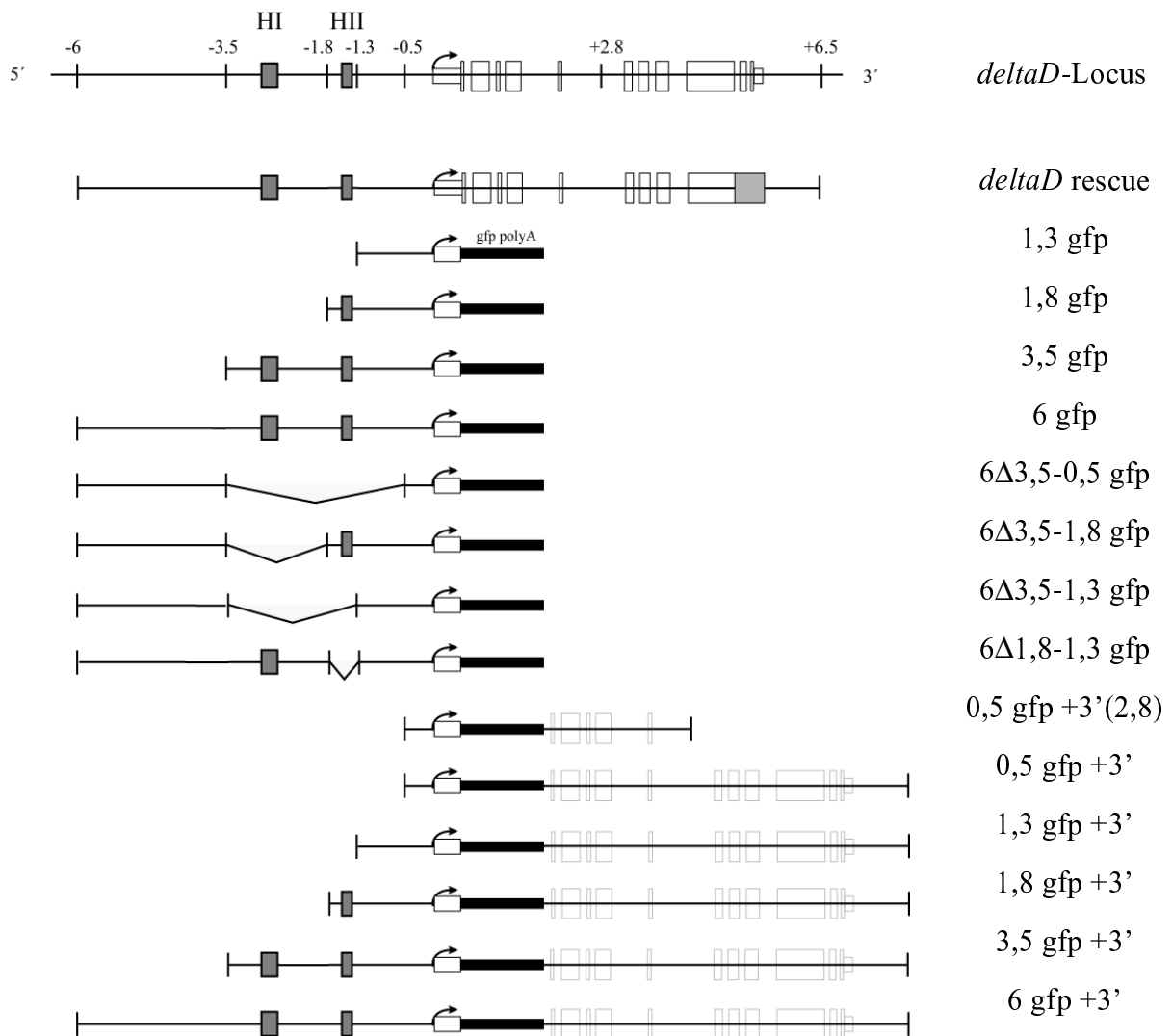


Bild 3.2: Verwendete Konstrukte zur Herstellung von stabilen transgenen Linien.

Dargestellt ist der Aufbau und die Grösse der Konstrukte. Die Zahlen in der obersten Karte repräsentieren den Gehalt an genomischer DNA relativ zum Startpunkt der Transkription. Die konservierten Regionen und die Intron-Exon-Struktur sind wie in Bild 3.1 wiedergegeben, wobei die verblasste Darstellung nicht-transkribierten Bereich symbolisiert. Das *deltaD* rescue Konstrukt ist markiert mit myc-Epitopen (graue Box).

3.3 Quantitative Enhancer-Elemente innerhalb des *deltaD* Locus

Die Konstrukte für die Herstellung von stabilen Transgenen waren so gewählt, dass sukzessive Deletionen in den *deltaD* Locus eingeführt wurden, welche die durch die Sequenzanalyse gefundenen Homologiebereiche einschließen (Konstrukte: 1,3 gfp / 1,8 gfp / 3,5 gfp / 6 gfp). Die Analyse der durch die Konstrukte getriebenen Expressionsmuster (im Folgenden immer als Expression der Konstrukte bezeichnet) zeigte dann, dass große Unterschiede in der Menge der hergestellten Transkripte bestehen. Einzig das Konstrukt 6 gfp

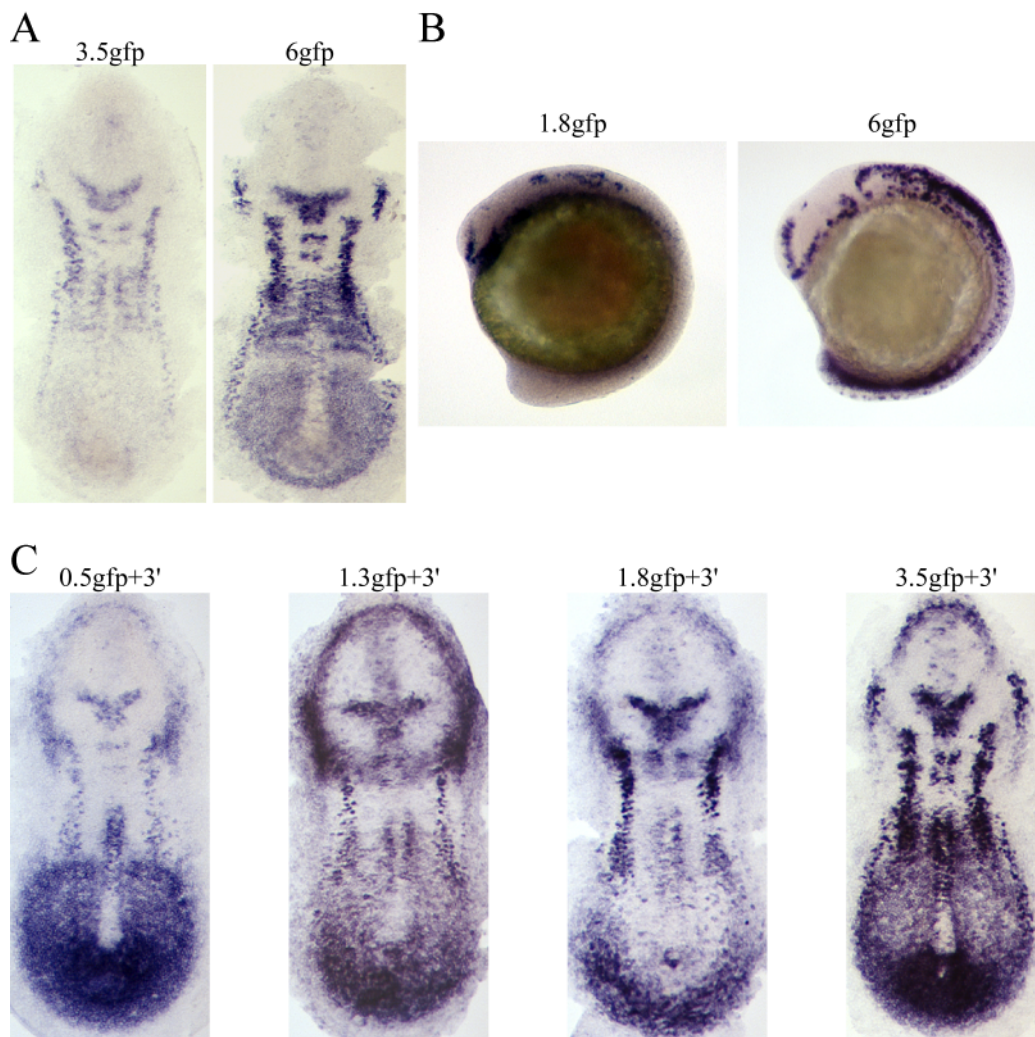


Bild 3.3: Darstellung der aufgetretenen Probleme bei der Analyse der Expression der Reportergerkonstrukte. (A,B) Alle Embryonen, transgen für die Konstrukte 3,5gfp, 1,8gfp und 1,3gfp, zeigen eine sehr schwache Expression, die nur nach langen Färbepetoden sichtbar gemacht werden kann. In (A) ist ein Vergleich der Expressionsmuster der Konstrukte 3,5 gfp (Färbereaktion beendet nach 24h) und 6gfp (Färbereaktion beendet nach 3h) im 2-Somitenstadium, in (B) ein Vergleich der Expressionsmuster der Konstrukte 1,8gfp (Färbereaktion beendet nach 24h) und 6gfp (Färbereaktion beendet nach 3h) im 12-Somitenstadium abgebildet. (C) Alle Embryonen, transgen für Konstrukte mit stromabwärtsliegender Region, zeigen ein sehr ähnliches Expressionsmuster, deren Unterschiede erst nach der Analyse weiterer Reportergerkonstrukte offensichtlich wurden. Dargestellt sind die Expressionsmuster der Konstrukte 0,5gfp+3', 1,3gfp+3', 1,8gfp+3' und 3,5gfp+3' im 2-Somitenstadium.

weist starke GFP Expression auf, das sich in dem stromaufwärtsliegenden Teil von -6 bis -3,5 von den anderen Konstrukten unterscheidet (Bild 3.3: A/B). Die Analyse der schwach exprimierenden Konstrukte ist sehr unzuverlässig, da mögliche weitere Expressionsdomänen übersehen werden können. Aus diesem Grund wurden die Konstrukte 1,3 gfp +3', 1,8 gfp +3', 3,5 gfp +3' und 6 gfp +3' in die Keimbahn transformiert, weil im *Drosophila Delta* Promotor ein quantitatives Enhancer-Element im 1. Intron vorhanden ist (Haenlin *et al.*, 1994). Diese Konstrukte werden zwar stark exprimiert, ihre Expressionsmuster sind jedoch annähernd identisch (Bild 3.3: C) und zum Teil nicht mit den schwachen Expressionsmustern der Konstrukte 1,3 gfp, 1,8 gfp und 3,5 gfp in Deckung zu bringen. Die Analyse der Transformanten mit dem stromabwärtsliegenden Bereich im Kontext mit dem Minimalpromotor (0,5 gfp +3') zeigte dann, dass diese Region viele regulatorische Elemente enthält. Eine weitere Eingrenzung dieser Region führte zu Transgenen mit nur noch schwacher Expression. Die anfangs verwendeten Konstrukte (1,3 gfp / 1,8 gfp / 3,5 gfp) wurden daraufhin um den stromaufwärts-liegenden Teil von -6 bis -3,5 erweitert, was zu Transformanten mit starker GFP Expression führte. Die Analyse der Expressionsmuster dieser Konstrukte konnte dann auch die minimalen Unterschiede zwischen den Konstrukten mit der stromabwärtsliegenden Region erklären.

Konstrukt	Insertionen (Insertionsfrequenz)	Keine Expression	Schwache Expression	Starke Expression
<i>deltaD</i> rescue	6 (6%)	-	2	1
1,3 gfp	8 (15%)	6	2	-
1,8 gfp	9 (13%)	7	2	-
3,5 gfp	4 (10%)	2	2	-
6 gfp	5 (15%)	-	1	4
6Δ3,5-0,5 gfp	2 (6%)	-	2	-
6Δ3,5-1,8 gfp	2 (8%)	-	-	2
6Δ3,5-1,3 gfp	3 (6%)	-	2	1
6Δ1,8-1,3 gfp	5 (10%)	-	2	3
0,5 gfp +3' (2,8)	7 (10%)	1	6	-
0,5 gfp +3'	4 (5%)	-	2	2
1,3 gfp +3'	4 (11%)	-	3	1
1,8 gfp +3'	3 (8%)	-	1	2
3,5 gfp +3'	3 (7%)	-	1	2
6 gfp +3'	3 (5%)	-	-	3

Tabelle 3.1: Einteilung der identifizierten Insertionen in drei Klassen nach ihrer Expressionsstärke.

Die Expressionsmuster der analysierten Konstrukte lassen sich in die drei Klassen „starke Expression“, „schwache Expression“ und „keine Expression“ einteilen. Am Fluoreszenzstereomikroskop beobachtbare GFP-Fluoreszenz wurde als „Starke Expression“ definiert. „Schwache Expression“ bzw. „keine Expression“ wurde mit Hilfe einer *gfp*-Sonde in einer in situ Hybridisierung nachgewiesen.

Die Auflistung aller transgener Insertion, die mit den verschiedenen Reportergerkonstrukten erzeugt wurden, sind in Tabelle 3.1 wiedergegeben. Durch die Einteilung in die drei Expressionsstärken und die Vielzahl der Konstrukte lassen sich ein stromaufwärtsliegendes (-6 bis -3,5) und ein stromabwärtsliegendes (+2,8 bis +6,5) quantitatives Enhancer-Element lokalisieren.

3.4 GFP-exprimierende Linien spiegeln die endogene Expression von *deltaD* wieder

Die Expressionsmuster der verschiedenen Reportergerkonstrukte wurden immer mit Hilfe eines Entwicklungsprofils analysiert, das den Zeitraum von 30% Epibolie bis 20 Somiten umfasste, und mit dem Entwicklungsprofil von *deltaD* verglichen, um alle embryonalen Expressionsdomänen abzudecken (Bild 3.4).

Im Mesoderm beginnt die Transkription von *deltaD* bei 30% Epibolie innerhalb der Marginalzone (Bild 3.4: A). Diese Expressionsdomäne bleibt während der Epiboliebewegung in Richtung des vegetalen Poles bestehen und kommt nach Ende der Gastrulation in der Schwanzknospe zu liegen, wo sie bis zum Ende der Somitogenese aktiv ist (Bild 3.4: A/C/F/H/K). Bei 50% Epibolie verschwindet die Expression im axialen Mesoderm, dem zukünftigen Notochord, so dass das Expressionsmuster einem geöffneten Ring ähnelt (Bild 3.4: B). Ab ungefähr 80% Epibolie taucht anterior zur Expression in der Marginalzone eine transversale Bande auf, die durch die dorsale Mittellinie getrennt wird (Bild 3.4: C). Diese Expressionsdomäne bleibt ebenfalls während der gesamten Somitogenese bestehen, und es zeigt sich nach Entstehung der ersten Somiten, dass sie im präsomitischen Mesoderm liegt (Bild 3.4: E/H/K). Neben diesen beiden Domänen, Schwanzknospe und präsomitisches Mesoderm, wird *deltaD* noch in der rostralen Hälfte der zuletzt entstandenen sechs bis acht Somiten exprimiert (Bild 3.4: H).

Die Expression von *deltaD* im Neuroektoderm beginnt ab 90% Epibolie und markiert im Verlaufe der Entwicklung alle Regionen, in denen primäre Neurone gebildet werden (Bild 3.4: D). In der anterioren Neuralplatte lassen sich neben der Expression im Trigeminalganglion vier weitere Expressionsdomänen unterscheiden, die nach ihrem Auftreten nummeriert werden. Die erste Domäne ist transversal auf Höhe des zukünftigen Mesencephalon, die zweite, in Form eines Hufeisens, ist prosencephal, die dritte verläuft entlang der anterior-posterioren Achse zwischen Prosencephalon und Mesencephalon und bildet mit der Domäne 1 ein charakteristisches Kreuz („Notch-Kreuz“), und die vierte Expressionsdomäne besteht aus zwei paramedialen Gruppen im Metencephalon. In der posterioren Neuralplatte wird *deltaD* in drei longitudinalen Streifen exprimiert, einem

medialen, einem intermediären und einem lateralen (Bild 3.4: D/E). Im Verlaufe der Neurulation (Schwanzknospenstadium bis 14 Somiten) verstärken sich alle Expressionsdomänen und werden durch die morphologischen Bewegungen von einer lateral-medialen Lage in eine dorsal-ventrale Orientierung gebracht (Bild 3.4: D-L).

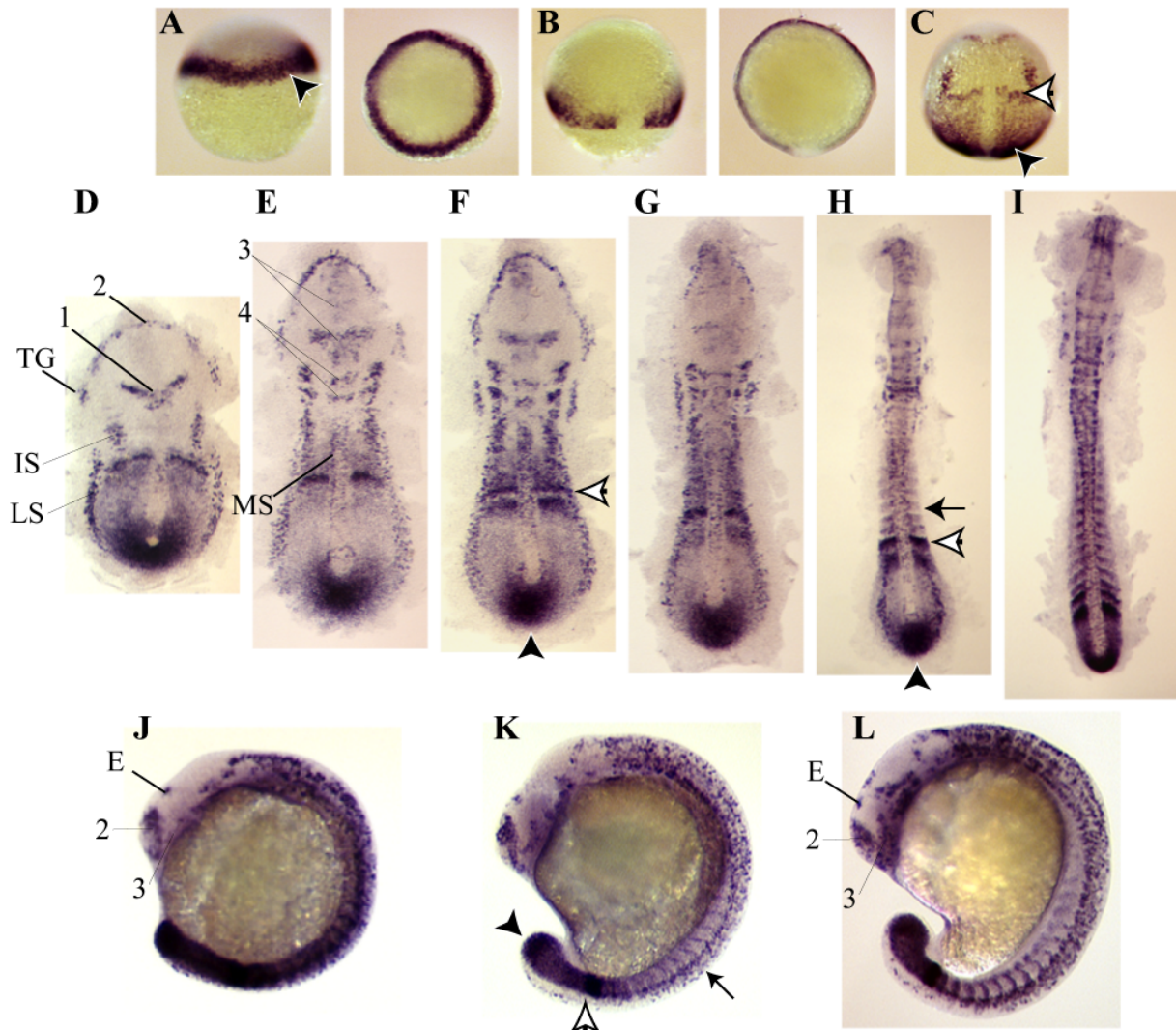


Bild 3.4: *deltaD* Entwicklungsprofil.

Pfeile markieren mesodermale, Buchstaben und Zahlen neurale Expressionsdomänen.

(A) 30% Epibolie, laterale und animale Ansicht, (B) 60% Epibolie, laterale und animale Ansicht, (C) 95% Epibolie, (D) Schwanzknospenstadium, (E) 2-Somiten, (F) 4-Somiten, (G) 6-Somiten, (H) 8-Somiten, (I) 12-Somiten, (J) 12-Somiten, (K) 16-Somiten, (L) 20-Somiten. (C-I) dorsale Ansicht, (J-L) laterale Ansicht.

Schwarzer Pfeilkopf: Marginale Zone bzw. Schwanzknospe; Weißer Pfeilkopf: Präsomitisches Mesoderm; Pfeil: Somiten; E: Epiphyse; IS / LS / MS: Intermediärer / Lateraler / Medialer Streifen; TG: Trigeminalganglion; 1 / 2 / 3 / 4: Kopfexpressionsdomänen.

Alle hier beschriebenen Expressionsdomänen von *deltaD* lassen sich mit Hilfe des Reportergens GFP unter UV-Licht in lebenden Embryonen beobachten. Dabei fällt auf, dass sich die beschriebene, verzögert einsetzende Fluoreszenz im Mesoderm stärker auswirkt als im Neuroektoderm (Brand, 1995). Beobachtbare Fluoreszenz im Mesoderm ist erst ab dem Schwanzknospenstadium sichtbar, rund fünf Stunden nach Beginn der Transkription (Bild 3.5: A). Diese Schwanzknospenexpression bleibt bis zum Ende der Somitogenese bestehen und verschmilzt mit der Expression im präsomitischen Mesoderm. Aufgrund der Stabilität des in dieser Arbeit verwendeten GFP ist kein Streifenmuster zu erkennen und somit lässt sich die Markierung des gesamten präsomitischen Mesoderms erklären (Bild 3.5: B/D). Auch die somitische Expression unterscheidet sich deshalb vom Transkriptmuster. So bleibt die Fluoreszenz nicht auf die zuletzt gebildeten sechs bis acht Somiten beschränkt, sondern lässt sich in allen Somiten beobachten (Bild 3.5: G). Im Neuroektoderm setzt mit einer Verzögerung von ca. zwei Stunden eine beobachtbare Fluoreszenz im 4-Somitenstadium ein. In diesem Stadium lassen sich der intermediäre und der mediale Streifen gut erkennen (Bild 3.5: C). Im Laufe der Entwicklung nimmt die Stärke der Fluoreszenz immer mehr zu, und alle Expressionsdomänen werden deutlich unterscheidbar (Bild 3.5: B/D). Unter UV-Licht konnte die Fluoreszenz im neuralen Gewebe in bis zu fünf Tage alten Embryonen beobachtet werden (Bild 3.5: E/F).

Die durch die verschiedenen Konstrukte getriebenen Expressionen in mesodermalen und neuralen Domänen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. In den nachfolgenden Teilen der Ergebnisse wird hierbei nicht auf jedes einzelne der Konstrukte eingegangen, sondern nur noch die Lokalisation der regulatorischen Elemente innerhalb des *deltaD* Locus betrachtet.

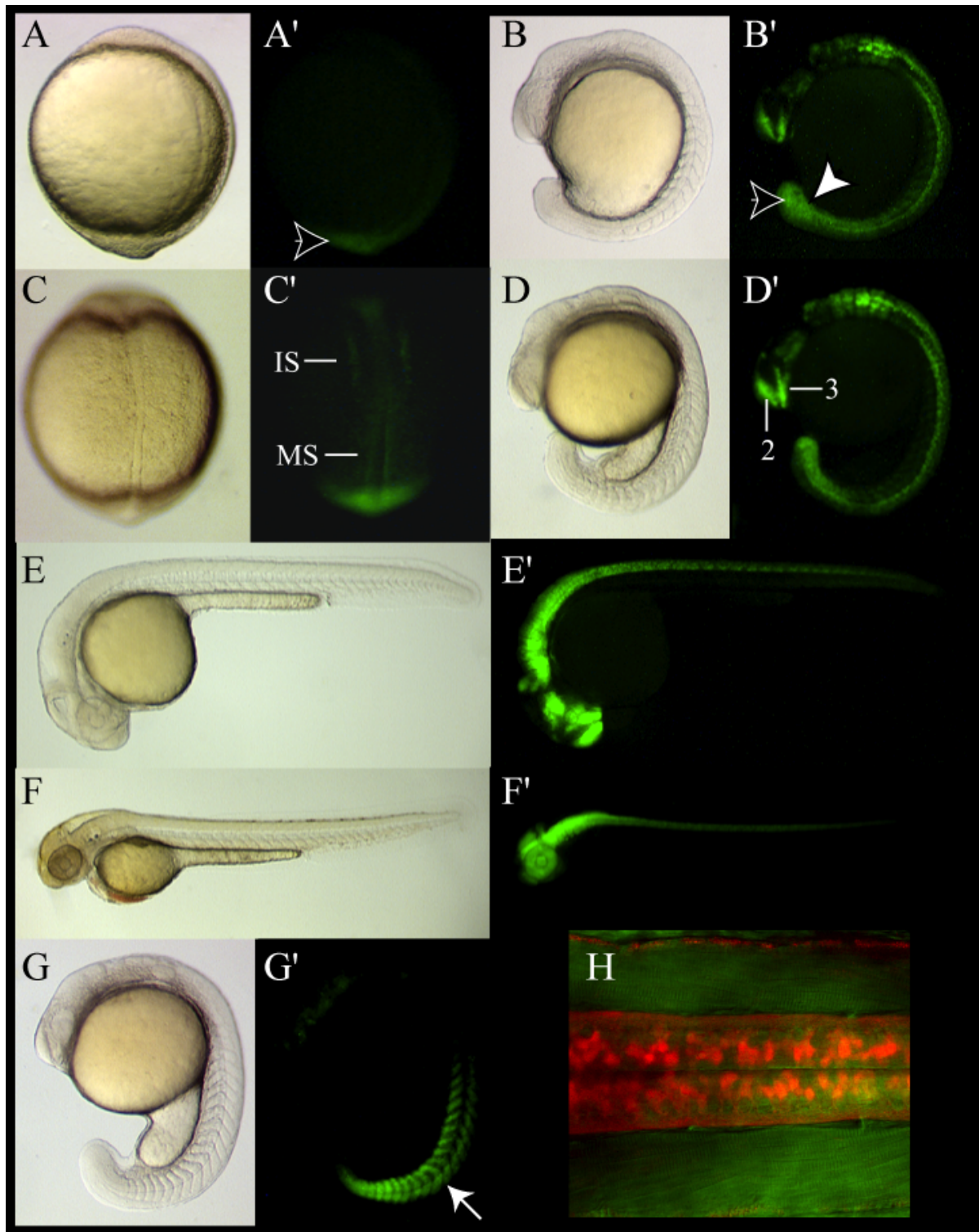


Bild 3.5: Fluoreszenzbeobachtung des Reportergens GFP, getrieben durch verschiedene Promotorkonstrukte in stabil transformierten Zebrafischembryonen.

(A-F) zeigen die Expression von GFP im Laufe der Entwicklung, getrieben durch das Konstrukt 3,5gfp+3', welches bis auf die somitische Expression alle endogenen *deltaD* Expressionsdomänen widerspiegelt: (A) Schwanzknospenstadium, (B) 12-Somiten, (C) 4-Somiten, (D) 20-Somiten, (E) 24 h, (F) 72h. (G) verdeutlicht die somitische Expression von GFP, getrieben durch das Konstrukt 6Δ1.8-1.3gfp im 20-Somitenstadium. (H) zeigt eine Aufnahme eines konfokalen Mikroskops, welche die subzelluläre Verteilung von GFP (rot) innerhalb des Neuralrohrs veranschaulicht. Die Bedeutung der Symbole und Abkürzungen ist Bild 3.4 zu entnehmen.

Konstrukt	Marginal Zone bzw. Schwanzknospe				Präsomitisches Mesoderm				Somitisches Mesoderm				Trigeminalganglion				Domäne 1				Domäne 2				Domäne 3				Domäne 4				Epiphyse				Lateraler Streifen				Intermediärer Streifen				Medialer Streifen			
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
1,3 gfp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
1,8 gfp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
3,5 gfp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
6 gfp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
6 Δ 1,8-1,3 gfp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
6 Δ 3,5-1,8 gfp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
6 Δ 3,5-1,3 gfp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
6 Δ 3,5-0,5 gfp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
0,5 gfp +3' (2,8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
0,5 gfp +3'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
1,3 gfp +3'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
1,8 gfp +3'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
3,5 gfp +3'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
6 gfp +3'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

Tabelle 3.2: Expressionsverhalten der verschiedenen Reportergenkonstrukte in den mesodermalen und neuralen Domänen des *deltaD* Gens

3.5 Wiederherstellung der biologischen Aktivität von *deltaD* in *after eight*

Für die Eingrenzung der *cis*-regulatorischen Elemente und deren funktionelle Bedeutung wurde ein Rettungskonstrukt in den *deltaD* mutanten Hintergrund eingebracht. Die *deltaD* Ausfallmutante *after eight* (*aei*) ist benannt nach ihrem Phänotyp, der sich in einem Verlust der Somitengrenzen ab dem siebten bis neunten Somiten äussert (Bild 3.6: A). Diese Störung der Somitogenese ist auch molekular nachweisbar (van Eeden *et al.*, 1996; Durbin *et al.*, 2000), hier am Beispiel des Zebrafisch hairy Homologs *her1* (Müller *et al.*, 1996). *her1* wird in der Schwanzknospe und in zwei bis drei Streifen exprimiert, die das präsomitische Mesoderm in rostral Richtung durchlaufen. Vor Erreichen der morphologisch sichtbaren Somitengrenzen verschwindet die rostralste *her1* Expressionsdomäne, während sich eine neue Domäne aus der Schwanzknospe abspaltet (Müller *et al.*, 1996; Holley *et al.*, 2000). In *aei* können keine sich von der Schwanzknospe abspaltenden Streifen beobachtet werden.

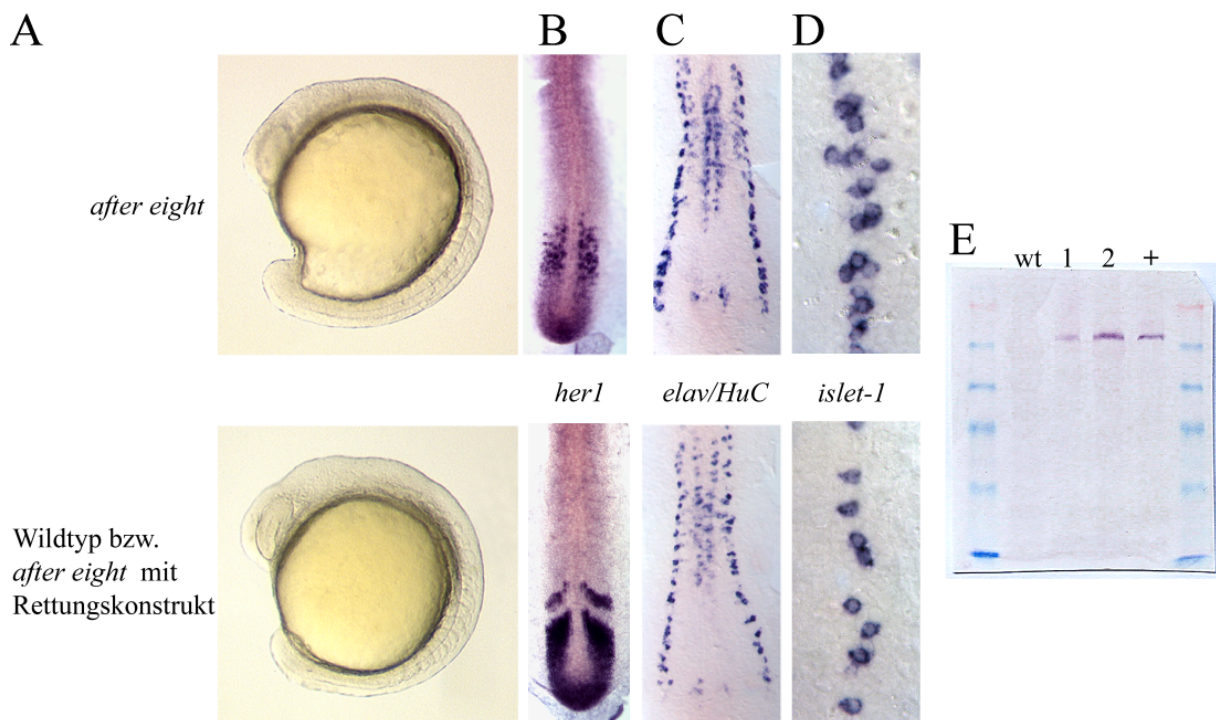


Bild 3.6: Wiederherstellung der biologischen Aktivität von *deltaD* in *after eight*.

Dargestellt sind verschiedene phänotypische Merkmale von *after eight* im Vergleich zu wildtypischen Embryonen bzw. zu *after eight* Embryonen, die für das Rettungskonstrukt „*deltaD* rescue“ transgen sind. (A) zeigt die ab dem siebten bis neunten Somiten morphologisch sichtbare Störung der Somitogenese im 14-Somitens Stadium. (B-D) Störungen in der Expression von Markergenen. (B) *her1* im präsomitischen Mesoderm im 14-Somitens Stadium; (C) *elav/HuC* in der Neuralplatte im 4-Somitens Stadium; (D) *islet-1* in der Neuralplatte im 4-Somitens Stadium; Vergrößerung der *islet-1* Expression in der Region der primären sensorischen Neurone. (E) Western-blot-Experiment zum Nachweis der myc-Epitope. wt: Proteinextrakt aus Wildtypen (negative Kontrolle); 1: Proteinextrakt aus der Kreuzung eines für das Rettungskonstrukt „*deltaD* rescue“ heterozygoten Zebrafisches mit Wildtyp; 2: Proteinextrakt aus der Kreuzung zweier für das Rettungskonstrukt „*deltaD* rescue“ heterozygoter Zebrafische; +: Proteinextrakt aus der Kreuzung dId GAL4 mit UAS NIC::myc (positive Kontrolle).

Stattdessen findet sich eine dauerhafte Expressionsdomäne im anterioren präsomitischen Mesoderm, innerhalb derer sich der Gehalt an *her1*-Transkripten auf Zellebene stark unterscheidet (Bild 3.6: B). Neben den mesodermalen Effekten zeigt *aei* eine neurale Hyperplasie, analog zu dem neurogenen Phänotyp der *Delta* Mutante in *Drosophila*. Die Expressionen von *elav/HuC* und *islet-1* wurden als frühe, postmitotische Marker für die neurale Determination einer Zelle beschrieben (Kim *et al.*, 1996; Korzh *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu wildtypischen Embryonen ist die Anzahl an *elav/HuC* positiven Zellen in *aei* erkennbar erhöht und die Anzahl *islet-1* positiver Zellen fast verdoppelt (Bild 3.6: C / D; Holley *et al.*, 2000). Trotz der beschriebenen phänotypischen Merkmale ist *aei* eingeschränkt lebensfähig, was eine direkte Transformation im mutanten Hintergrund erlaubt. Das Rettungskonstrukt (*deltaD* rescue) umfasst 6kb der stromaufwärts- und 4,5kb der stromabwärtsliegenden genomischen Region des *deltaD* Locus. An den stromabwärtsliegenden, genomischen Teil, der bis zum einschließlich neunten Exon reicht, wurde der noch fehlende und mit myc-Epitopen markierte C-terminale Bereich der *deltaD* cDNA fusioniert (Rettungskonstrukt siehe: Bild 3.2).

Die Analyse der stabil transformierten Mutanten zeigt eine vollständige Rettung des *after eight* Phänotyps in allen bisher untersuchten Bereichen. Die offensichtlichste Wiederherstellung der *deltaD* Funktion kann an der Einführung von Somitengrenzen nach dem 8-Somitestadium beobachtet werden. Die transformierten Mutanten lassen sich morphologisch nicht von wildtypischen Embryonen unterscheiden. Auch die Expression von *her1* zeigt ein wildtypisches Muster in den transformierten Mutanten. Neben dem gestörten *her1* Expressionsmuster ist eine Störung weiterer im präsomitischen Mesoderm in Streifen exprimierter Gene, wie z.B. *myoD*, *mesp-a*, *papc*, *deltaC*, beschrieben worden (van Eeden *et al.*, 1996; Holley *et al.*, 2000; Durbin *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2000). Auch diese Gene zeigen in transformierten Mutanten eine Wiederherstellung des Wildtypmusters. Die Einführung des Rettungskonstruktes in den *aei* Hintergrund wirkt sich auch auf die Anzahl der postmitotischen Neurone aus. Die neurale Hyperplasie verschwindet, und die transformierten Mutanten lassen sich auch in diesem Aspekt von wildtypischen Embryonen nicht mehr unterscheiden. Das Rettungskonstrukt ist mit myc-Epitopen versehen, so dass die transformierten Mutanten mit Hilfe einer Antikörperfärbung identifiziert werden sollten. Die Antikörperfärbung konnte in „whole-mounts“ jedoch niemals erfolgreich durchgeführt werden. In Western-blot-Experimenten kann jedoch gezeigt werden, dass das Rettungskonstrukt exprimiert wird, was den Schluss nahe legt, dass die myc-Epitope im

Embryo durch die Faltung der intrazellulären Domäne von *deltaD* maskiert werden (Bild 3.6: E).

3.6 Mesodermale *cis*-regulatorische Elemente

Alle drei mesodermalen Expressionsdomänen von *deltaD*, Schwanzknospe, präsomitisches Mesoderm und anteriore Hälfte der Somiten lassen sich in flachpräparierten, 8 bis 14-Somiten alten Embryonen gut analysieren (Bild 3.7: A). Im Laufe dieser Arbeit konnten drei Regionen mit mesodermalen Elementen lokalisiert werden. Die *cis*-regulatorischen Elemente der marginalen Zone und späteren Schwanzknospe finden sich in dem stromabwärtsliegenden Bereich, da alle Konstrukte mit dieser Region diese Expression zeigen (Bild 3.7: B). Des Weiteren finden sich regulatorische Elemente des präsomitischen Mesoderms und „älterer“ Somiten in diesem Bereich. Somitische Expression wird auch von den beiden anderen Regionen gesteuert. Die Region -6 bis $-3,5$ exprimiert dabei jedoch im Gegensatz zum stromabwärtsliegenden Bereich nur in den zuletzt gebildeten, „jungen“ Somiten, was insbesondere am Konstrukt $6\Delta 3,5-0,5$ gfp gezeigt werden kann (Bild 3.7: C). In diesem Punkt

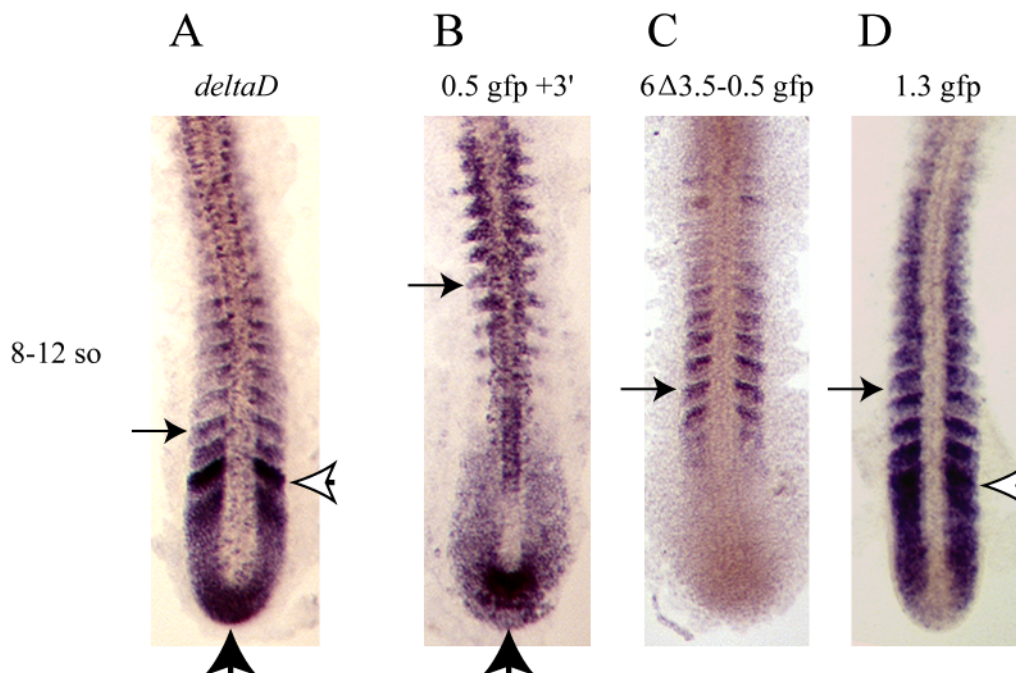


Bild 3.7: Expressionsmuster verschiedener Reportergenkonstrukte in mesodermalen Derivaten im 8 bis 12-Somitenstadium.

Im Vergleich zum endogenen *deltaD* Expressionsmuster (A) zeigen Embryonen, transgen für das Konstrukt $0.5gfp+3'$, eine Expression in der Schwanzknospe, die in das präsomitische Mesoderm ausläuft, und ab dem 8-Somitenstadium eine somitische Expression (B). Transgene Embryonen, die das Konstrukt $6\Delta 3.5-0.5gfp$ tragen, exprimieren im somitischen Mesoderm (C). Ebenfalls somitische, aber auch präsomitische Expression wird in transgenen Embryonen durch das Konstrukt $1.3gfp$ gesteuert (D). Die Bedeutung der Symbole ist wie in Bild 3.4. Schwarzer Pfeilkopf: Marginale Zone bzw. Schwanzknospe; Weißer Pfeilkopf: Präsomitisches Mesoderm; Pfeil: Somiten

überlappt diese Region mit der Region $-1,3$ bis 0 , die ebenfalls Expression in „jungen“ Somiten treibt. Vor allen Dingen finden sich aber in dieser Region die regulatorischen Elemente, die für die transversalen Banden im präsomitischen Mesoderm verantwortlich sind (Bild 3.7: D).

3.7 Neurale *cis*-regulatorische Elemente

Es konnten drei Regionen mit neuronalen *cis*-regulatorischen Elementen lokalisiert werden, wovon zwei die konservierten Bereiche HI und HII enthalten.

Der stromaufwärtsliegende Bereich (Konstrukt: $6gfp$) ist ausreichend für das nahezu vollständige neurale Expressionsmuster von *deltaD* (Bild 3.8: A). Ausgenommen ist dabei die frühe hufeisenförmige Expressionsdomäne 2, die aber ab dem 5 Somitenstadium räumlich korrekt wiedergegeben wird (Bild 3.8: B). Die Deletion der Region $-3,5$ bis $-1,8$ (Konstrukte: $6\Delta 3.5-1.8gfp$ und $1.8gfp$), die den konservierten Bereich HI einschliesst, führt im 2-Somitenstadium zum Verlust der Expression im Trigeminalganglion, der Expressionsdomäne 4 und des lateralen und medialen Streifens in der posterioren Neuralplatte. Im 12-Somitenstadium sind die Expressionsdomänen 2 und 3, die Expressionsdomäne der Epiphyse sowie eine starke Hinterhirnexpression vorhanden, wohingegen im Rückenmark nur eine schwächere ventrale Expression nachgewiesen werden kann (Bild 3.8: D). Die Deletion der Region $-1,8$ bis $-1,3$ (Konstrukt: $6\Delta 1.8-1.3gfp$), die den Homologiebereich HII einschliesst, führt dagegen zu einem spiegelbildlichen Resultat. Im 2-Somitenstadium fehlt im Vergleich zum *deltaD* Expressionsmuster neben der Expressionsdomäne 2 nur die Expressionsdomäne 3. Im Gegensatz zum Konstrukt $6gfp$ wird die Expressionsdomäne 2 später aber nicht wiederhergestellt, so dass im 12 Somitenstadium die Expressionsdomänen 2 und 3 sowie die Expressionsdomäne der Epiphyse fehlen. Auch die Hinterhirnexpression wirkt im Vergleich zum Expressionsmuster von *deltaD* oder von Konstrukt $6gfp$ nicht vollständig (Bild 3.8: C).

Bild 3.8 (folgende Seite): Expressionsmuster verschiedener Reportergerkonstrukte in neuronalen Domänen im Schwanzknospen- (tb), 2-Somiten- und 12-Somitenstadium.

Im Vergleich zum endogenen *deltaD* Expressionsmuster (A) zeigen Embryonen, transgen für das Konstrukt $6gfp$ ein nahezu vollständiges Expressionsmuster (B). Deletion des die Region HII umschliessenden Bereiches (C) oder des die Region HI umschliessenden Bereiches (D) führt zum Verlust bestimmter neuronaler Expressionsdomänen. Deletion des beide Regionen HI und HII umschliessenden Bereiches führt zum Verlust aller neuronaler Expressionsdomänen (E). Embryonen, transgen für das Konstrukt $0,5gfp+3'$, zeigen ein verzögertes, aber qualitativ mit dem endogenen *deltaD* Expressionsmuster vergleichbares Expressionsmuster (F). Die Wiedergabe der frühen Expression der Expressionsdomäne 2 von *deltaD* durch das Reporterger ist nur in Embryonen, transgen für die Konstrukte $3,5gfp+3'$ und $6gfp+3'$, räumlich und zeitlich korrekt (G). Die Bedeutung der Symbole ist wie in Bild 3.4. E: Epiphyse; IS / LS / MS: Intermediärer / Lateraler / Medialer Streifen; TG: Trigeminalganglion; 1 / 2 / 3 / 4: Kopfexpressionsdomänen.

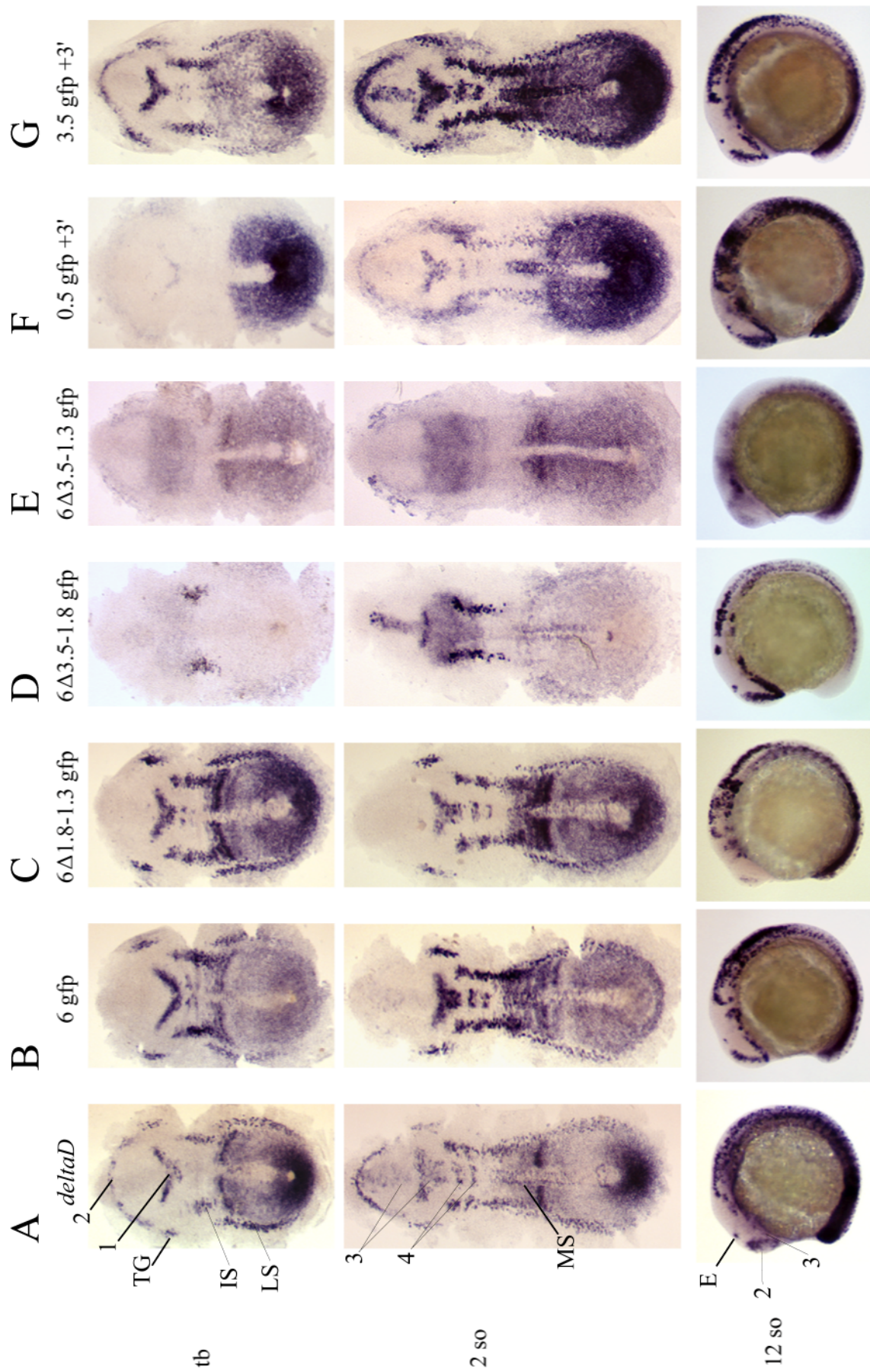


Bild 3.8 : Expressionsmuster verschiedener Reportergenkonstrukte in neuralen Domänen im Schwanzknospent- (tb), 2-Somiten- und 12-Somitenstadium. (Legende vorherige Seite).

Die Deletion beider Homologiebereiche (Konstrukte: $6\Delta 3.5-1.3gfp$ und $1.3gfp$) lässt sämtliche neurale Expression verschwinden. Im 2-Somitenstadium zeigt sich lediglich eine diffuse Expressionsdomäne, die nicht dem endogenen *deltaD* Expressionsmuster entspricht, aber auch schon beim Konstrukt $6\Delta 3.5-1.8gfp$ zu finden ist. Im Gegensatz zu diesem Konstrukt verschwindet diese Expressionsdomäne nicht im Verlauf der Entwicklung, sondern bleibt auch über das 12-Somitenstadium hinaus bestehen (Bild 3.8: E). Die dritte Region mit neuronalen *cis*-regulatorischen Elementen liegt im stromabwärtsgelegenen Bereich (0 bis +2,8). Dabei fällt auf, dass alle Regionen der Neuralplatte vorhanden sind, in denen neurale Zellen postmitotisch werden und ihren Differenzierungsweg einschlagen. Ihr Auftauchen ist jedoch verzögert und ihre Ausmaße sind kleiner. So ist während des Schwanzknospenstadiums bis auf die Expressionsdomäne 1 noch keinerlei Expression innerhalb der Neuralplatte zu beobachten. Ab dem 2-Somitenstadium tauchen dann alle fehlenden Expressionsdomänen auf, um sich weiter zu intensivieren und bis zum 12-Somitenstadium qualitativ ununterscheidbar vom endogenen *deltaD* oder $6gfp$ Expressionsmuster zu sein (Bild 3.8: F).

Die frühe Expression der hufeisenförmigen Expressionsdomäne 2 (Schwanzknospenstadium bis 2 Somiten) nimmt eine Sonderstellung innerhalb der neuronalen Expressionsdomänen ein, weil sie ausschließlich von den Konstrukten $6gfp +3'$ und $3,5gfp +3'$ sowohl räumlich als auch zeitlich exakt wie das endogene *deltaD* Expressionsmuster wiedergegeben wird und daher nicht auf eine bestimmbar Region eingegrenzt werden kann (Bild 3.8: G).

3.8 Die neuronalen Expressionsmuster der konservierten Regionen HI und HII weisen große Übereinstimmungen mit den Expressionsmustern der proneuralen Gene *neurogenin1* und *zash1a / zash1b* auf

Die neuronalen Expressionsmuster der Konstrukte $6\Delta 1.8-1.3gfp$ mit der konservierten Regionen HI und $6\Delta 3.5-1.8gfp$ mit der konservierten Region HII zeigen eine auffällige Übereinstimmung mit den Expressionsmustern der proneuralen Gene *neurogenin1* (*ngn1*) und *zash1a / zash1b*.

Die Überlappung der Expressionsmuster von *ngn1* und des Konstruktes $6\Delta 1.8-1.3gfp$ lässt sich besonders gut im 2-Somitenstadium darstellen, da *ngn1* in allen neuronalen Expressionsdomänen des Konstruktes $6\Delta 1.8-1.3gfp$ exprimiert wird, wie z. B. Trigeminalganglion, Expressionsdomäne 1 und 4 und longitudinale Streifen der posterioren Neuralplatte. Im Laufe der Entwicklung bleibt diese Übereinstimmung weiter bestehen (Bild 3.9: A).

Die Überlappung der Expressionsdomänen von *zash1a* / *zash1b* mit dem Konstrukt 6Δ3.5-1.8gfp zeigt sich dagegen besonders gut im 12-Somitenstadium, da hier die Expressionsdomäne der Epiphyse und die Expressionsdomänen 2 und 3 sehr charakteristisch sind. Aber auch die frühen Expressionen im 2-Somitenstadium überschneiden sich schon, wobei die Expressionsmuster von *zash1a* und *zash1b* als sich ergänzend betrachtet werden müssen (Bild 3.9: B).

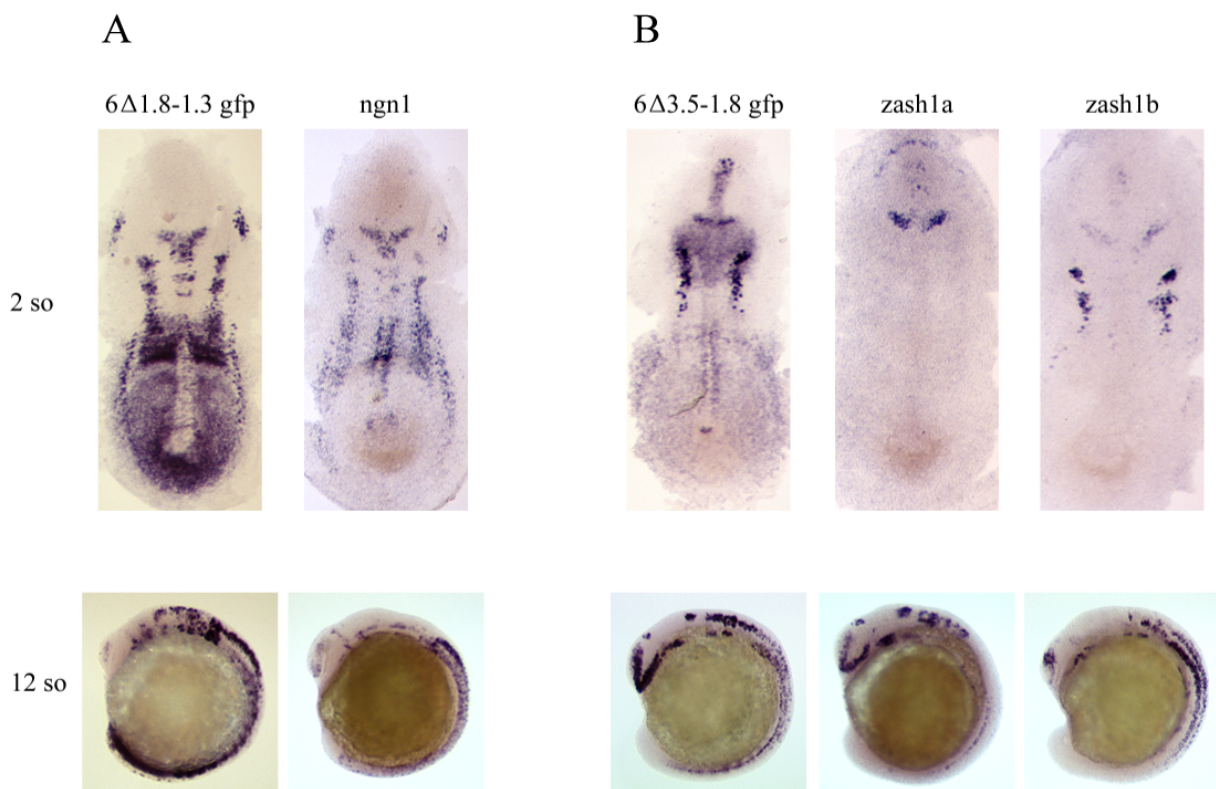


Bild 3.9: Überlappungen der Expressionsmuster proneuraler Gene mit Reportergenkonstrukten im 2- und 12-Somitenstadium.

(A) Das neurale Expressionsmuster des Konstruktes 6Δ1.8-1.3gfp mit der konservierten Region HI zeigt eine auffällige Übereinstimmung mit dem Expressionsmuster des proneuralen Gens *neurogenin1* (*ngn1*). Insbesondere im 2-Somitenstadium, wenn *ngn1* wie das Konstruktes 6Δ1.8-1.3gfp im Trigeminalganglion, in den Expressionsdomänen 3 und 4 sowie in den drei Streifen der posterioren Neuralplatte exprimiert wird, zeigt sich diese Übereinstimmung. (B) Das neurale Expressionsmuster des Konstruktes 6Δ3.5-1.8gfp mit der konservierten Region HII zeigt dagegen eine auffällige Überlappung mit den Expressionsmustern der proneuralen Gene *zash1a* und *zash1b*. Dies wird besonders deutlich im 12-Somitenstadium, wenn die Expressionsdomäne der Epiphyse und die Expressionsdomänen 2 und 3 ein charakteristisches Muster bilden.

3.9 HI und HII enthalten *ngn1* und *zash1a / zash1b* sensitive E-Boxen

Die Überlappungen in den Expressionsmustern und die aus *Drosophila* und anderen Modellorganismen bereits bekannten Daten, der Interaktion von proneuralen Proteinen mit dem Delta Promotor, legten den Schluss nahe, dass innerhalb der stromaufwärts vom Transkriptionstart gelegenen DNA *ngn1* bzw. *zash1a / zash1b* sensitive Elemente lokalisiert sind. Um diese sensitiven Elemente zu bestimmen, wurde eine Vielzahl von Konstrukten mit

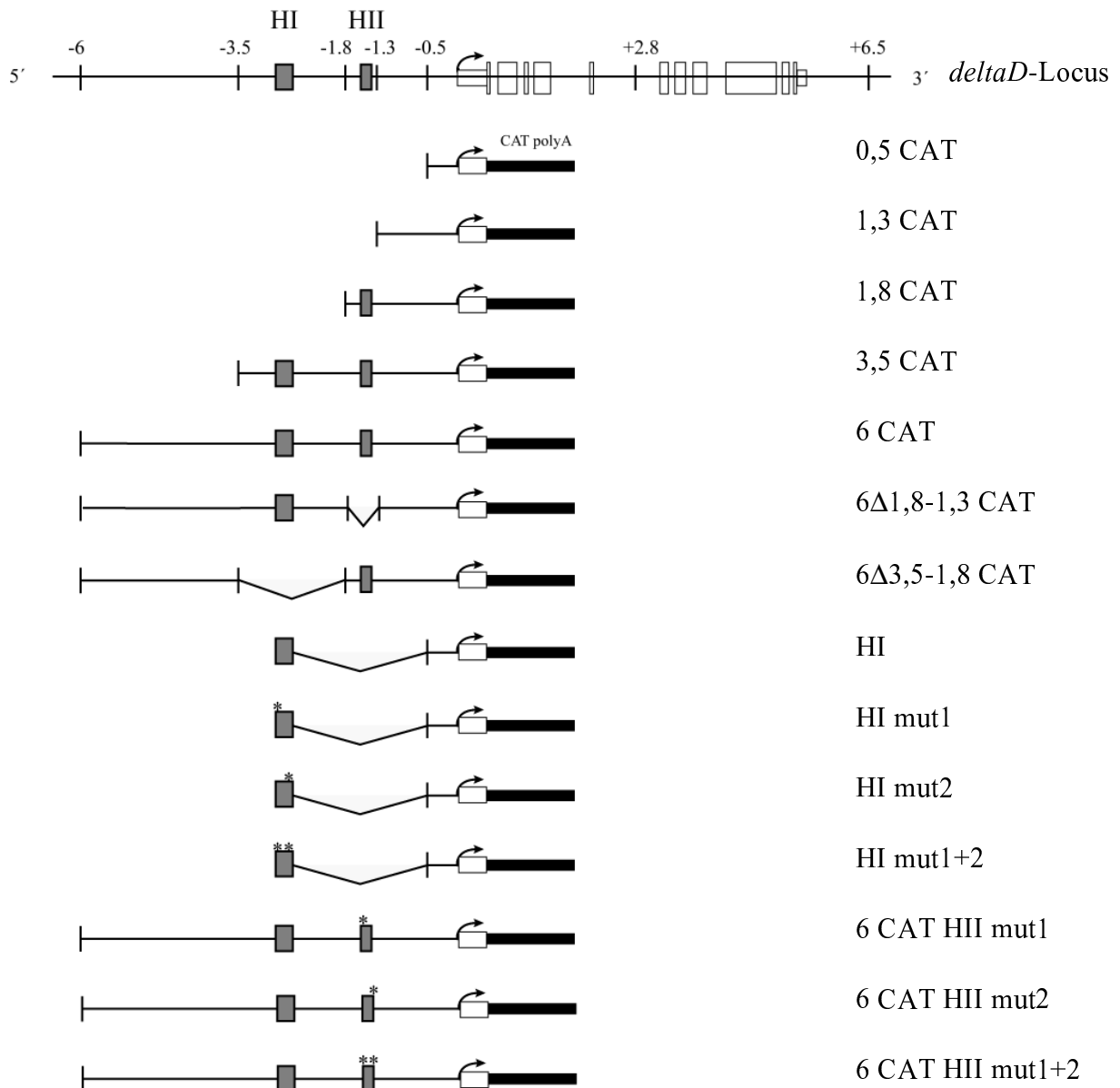


Bild 3.10: Verwendete Konstrukte zur Durchführung der CAT-Assays.

Dargestellt ist der Aufbau und die Größe der Konstrukte. Die Zahlen in der obersten Karte repräsentieren den Gehalt an genomischer DNA relativ zum Startpunkt der Transkription. Die konservierten Regionen sind wie in Bild 3.1 wiedergegeben. Die Mutation einer E-Box innerhalb eines Konstruktes ist mit * gekennzeichnet.

dem Reportergen „Chloramphenicol Acetyltransferase“ versehen (Bild 3.10) und deren Aktivitäten in Anwesenheit von *ngn1* bzw. *zash1a* getestet (Durchführung der CAT-Assays siehe: 2.3.17).

3.9.1 *ngn1* und HI

In Anwesenheit von *ngn1* werden nur die Konstrukte 3,5 CAT und 6 CAT stark aktiviert, die die konservierte Region HI enthalten. Das Konstrukt 1,8 CAT, das noch die konservierte Region HII einschließt, zeigt dagegen nur schwache Aktivität, die sich nicht von dem Konstrukt 1,3 CAT unterscheiden lässt. Beide letztgenannten Konstrukte weisen im Gegensatz zu dem Konstrukt 0,5 CAT, das lediglich eine basale Aktivität zeigt, dennoch eine messbare Aktivität auf. Durch die Verwendung des Konstruktes 6 Δ 3.5-1.8 CAT konnte weiter bestätigt werden, dass die durch *ngn1* vermittelte Aktivierung auf den Promotorbereich -3.5 bis -1.8 eingrenzbar ist (Diagramm 3.1).

Innerhalb dieses Promotorbereiches liegt die konservierte Region HI. Um zu prüfen, ob die durch *ngn1* vermittelte Aktivierbarkeit auf die Region HI eingegrenzt werden kann, wurde die Region HI vor den Basalpromotor kloniert und getestet. Dieses Konstrukt HI wird in Anwesenheit von *ngn1* stark aktiviert. *ngn1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der bHLH-Familie. Diese Proteine binden an eine spezifische DNA-Sequenz (CANNTG), die sogenannte E-Box (Lasser *et al.*, 1989; Dang *et al.*, 1992). Innerhalb der konservierten Region HI finden sich zwei E-Boxen, die sich in Position und Orientierung in Maus und Zebrafisch

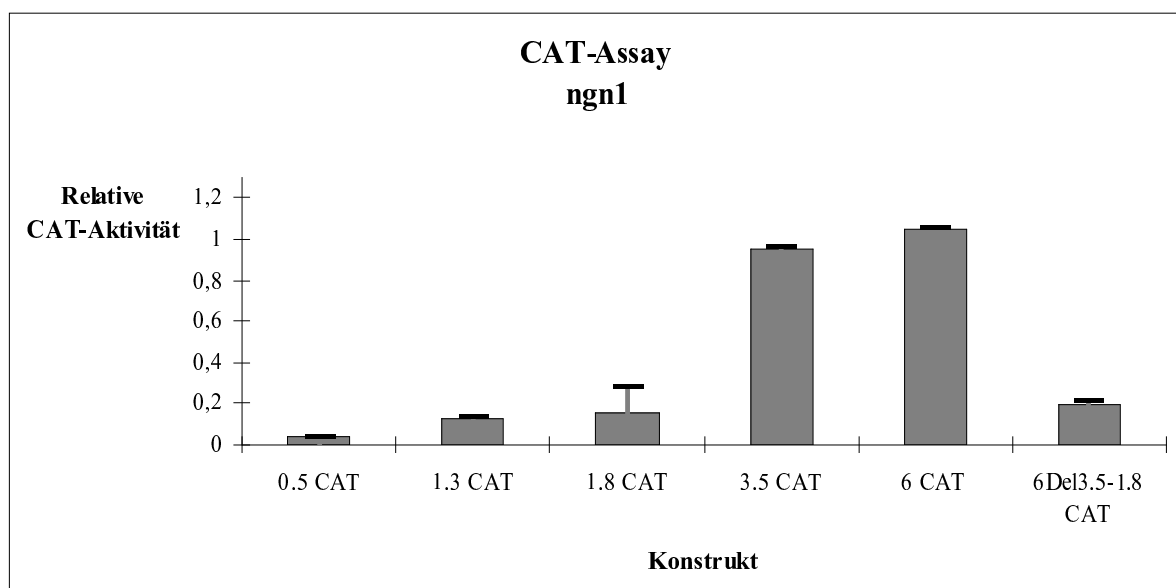


Diagramm 3.1

wt: GTGAAAAAACGC **CATTTG** GTTGGGAG **CAGATG** GTTGGCTTGGG
 mut: GTGAAAAAACGC **TATATC** GTTGGGAG **TATATC** GTTGGCTTGGG

Bild 3.11: E-Boxen und flankierende Sequenz der konservierten Region HI

Die Sequenz der wildtypischen Situation aus dem *deltaD* Promotor (wt) ist der in den CAT-Assays verwendeten veränderten Situation (mut) gegenübergestellt. Die veränderten Basen innerhalb der Sequenz sind fett dargestellt und die Lokalisation der beiden E-Boxen bzw. mutierten E-Boxen sind grau unterlegt.

entsprechen. In diese E-Boxen wurden gezielt Punktmutationen mit dem Zweck der Zerstörung der Zielsequenzen eingeführt (Bild 3.11). Die Konstrukte mit den veränderten E-Boxen wurden dann auf ihre Aktivierbarkeit durch *ngn1* getestet. Sowohl die Zerstörung der distalen E-Box (Konstrukt: HI mut1) als auch die Zerstörung der proximalen E-Box (Konstrukt: HI mut2) führt zu einer Halbierung der durch *ngn1* vermittelten Aktivität. Noch drastischer wirkt sich die Kombination beider Mutationen in einem Konstrukt (HI mut1+2) aus. In Anwesenheit von *ngn1* zeigt dieses Konstrukt lediglich eine basale Aktivität, die dem Konstrukt 0,5 CAT entspricht (Diagramm 3.2).

Innerhalb der konservierten Region HI gibt es also zwei E-Boxen, die für die Aktivierbarkeit durch *ngn1* unerlässlich sind.

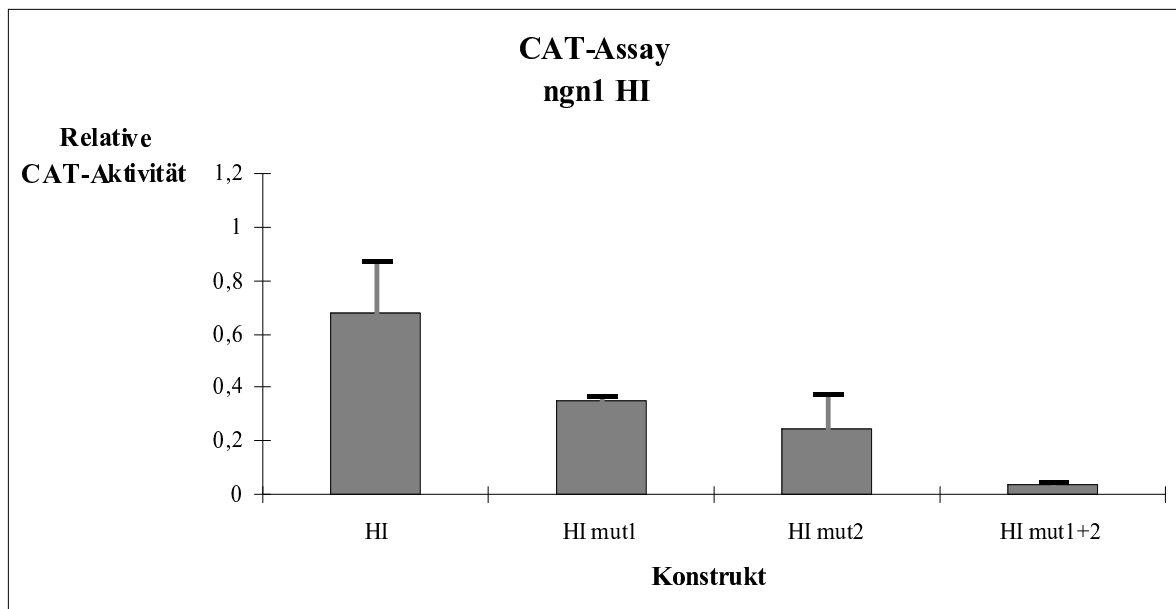


Diagramm 3.2

3.9.2 *zash1a* / *zash1b* und HII

In einem analogen Verfahren wurde nach den *zash1a* / *zash1b* sensitiven Elementen innerhalb des *deltaD* Promotors gesucht. Da *zash1a* und *zash1b* eine 100%ige Sequenzidentität innerhalb ihrer basischen Domäne, der DNA-Bindungsdomäne, aufweisen und in einem Test die gleiche Aktivierbarkeit des Konstruktes 6 CAT durch *zash1a* bzw. *zash1b* gemessen wurde, wurden die Versuche ausschliesslich mit *zash1a* ausgeführt.

Wie im Falle von *ngn1* entspricht die Aktivierbarkeit des Konstruktes 0,5 CAT durch *zash1a* nur einer basalen Aktivität. In Anwesenheit von *zash1a* zeigen die Konstrukte 1,8 CAT, 3,5 CAT und 6 CAT, die alle die konservierte Region HII enthalten, eine starke Aktivität. Die Konstrukte 1,3 CAT, ohne konservierte Bereiche, und 6 Δ 1.8-1.3 CAT, mit einer die konservierte Region HII umfassenden Deletion, lassen sich nur gering, aber immer noch messbar aktivieren (Diagramm 3.3). Die gewonnenen Resultate deuteten darauf, dass der Promotorbereich -1,3 bis -1,8 die *zash1a* sensitiven Elemente enthält. Innerhalb dieses Bereiches liegt die konservierte Region HII. Wie im Falle von *ngn1* wurde diese konservierte Region vor den Basalpromotor kloniert und getestet, zeigte jedoch keinerlei Aktivierbarkeit. Durch die Verwendung von weiteren Konstrukten konnte ermittelt werden, dass der korrekte Abstand der konservierten Region HII von 1,3 kb zum Basalpromotor für die Aktivierbarkeit notwendig ist. Für die weiteren Experimente wurde deshalb das Konstrukt 6 CAT verwendet. *zash1a* ist wie *ngn1* ein Transkriptionsfaktor der bHLH-Familie. Innerhalb der konservierten Region HII finden sich zwei putative Bindestellen für diese Proteinklasse. Beide E-Boxen

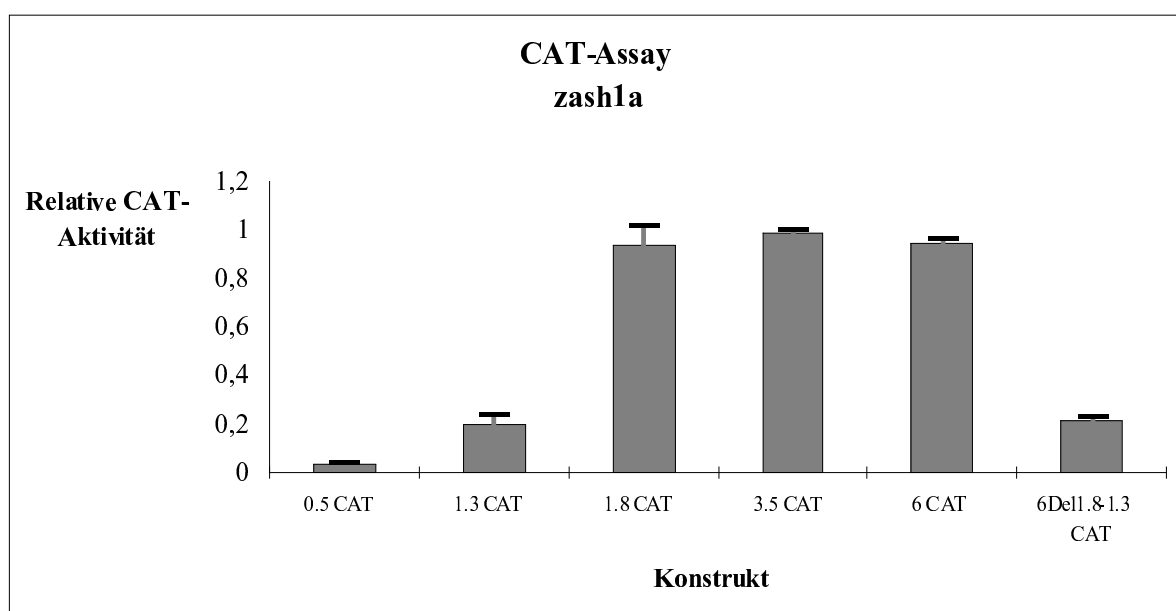


Diagramm 3.3

wt: GTGAGGGGAG**CAGGTG**CTGTGTGAATTACCATA**CAGCTG**AGAGCACAGAG
 mut: GTGAGGGGAG**TAGTTC**CTGTGTGAATTACCATA**TAGTTC**AGAGCACAGAG

Bild 3.12: E-Boxen und flankierende Sequenz der konservierten Region HII

Die Sequenz der wildtypischen Situation aus dem *deltaD* Promotor (wt) ist der in den CAT-Assays verwendeten veränderten Situation (mut) gegenübergestellt. Die veränderten Basen innerhalb der Sequenz sind fett dargestellt und die Lokalisation der beiden E-Boxen bzw. mutierten E-Boxen sind grau unterlegt.

sind in Position und Orientierung in Maus und Zebrafisch identisch. Wieder wurden spezifische Punktmutationen mit dem Ziel der Zerstörung der Bindestellen eingeführt und getestet (Bild 3.12). Die Zerstörung der distalen E-Box in HII macht sich nicht bemerkbar, da das Konstrukt 6 CAT HII mut1 in Anwesenheit von *zash1a* immer noch stark aktiviert wird, vergleichbar wie das Konstrukt 6 CAT. Im Gegensatz dazu führt die Mutation der proximalen E-Box in HII zum Abfall der Aktivierbarkeit durch *zash1a*. Das Konstrukt 6 CAT HII mut2 zeigt dabei eine vergleichbare Aktivität wie Konstrukte ohne die Promotorregion -1,3 bis -1,8. Die Kombination beider mutierter E-Boxen in dem Konstrukt 6 CAT HII mut1+2 vermag keine weitere Änderung in der Aktivierbarkeit aufzuzeigen.

Innerhalb der konservierten Region HII gibt es also eine E-Box, die für die Aktivierbarkeit durch *zash1a* / *zash1b* unerlässlich ist.

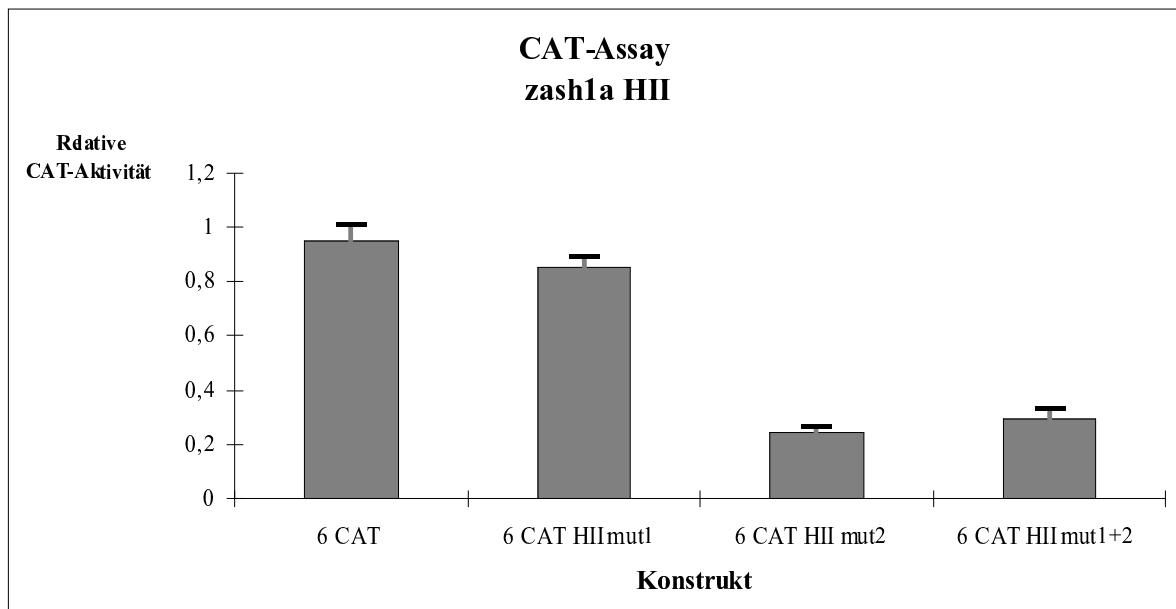


Diagramm 3.4

3.10 Vergleich der Promotoren *deltaD* mit *deltaC*

Der Sequenzvergleich der stromaufwärts vom Transkriptionstart gelegenen DNA der Promotoren *deltaD* und *Delta-like-1* deckte zwei konservierte Regionen, HI und HII, auf, deren Bedeutung in Zebrafisch (diese Arbeit) und Maus (Beckers *et al.*, 2000) gezeigt werden konnte. In einem analogen Ansatz wurde der *deltaD* Promotor mit dem *deltaC* Promotor verglichen.

3.10.1 Klonierung des *deltaC* Locus

Durch die Verwendung einer ^{32}P -radioaktiv markierten Sonde, die den kodierenden Teil der intrazellulären Domäne von *deltaC* (Haddon *et al.*, 1998) umfasste, wurde ein positiver Klon aus einer genomischen Bank isoliert. Vorläufige Restriktions- und Hybridisierungsanalysen zeigten, dass der Klon PSC ca. 18 kb der flankierenden Sequenz des *deltaC* Locus beinhaltet. Diese Sequenz teilt sich auf in 12,5kb stromaufwärts und 5,5kb stromabwärts vom Translationsstart (Bild 3.13). Insgesamt wurden 4,7kb der stromaufwärts vom Translationsstart liegenden DNA sequenziert und mit dem stromaufwärtsliegenden Bereich des *deltaD* Promotors verglichen (siehe Anhang). Dabei wurden zwei E-Boxen identifiziert, deren Position und Sequenz in einem hohen Masse den E-Boxen der konservierten Region HI ähnelt.

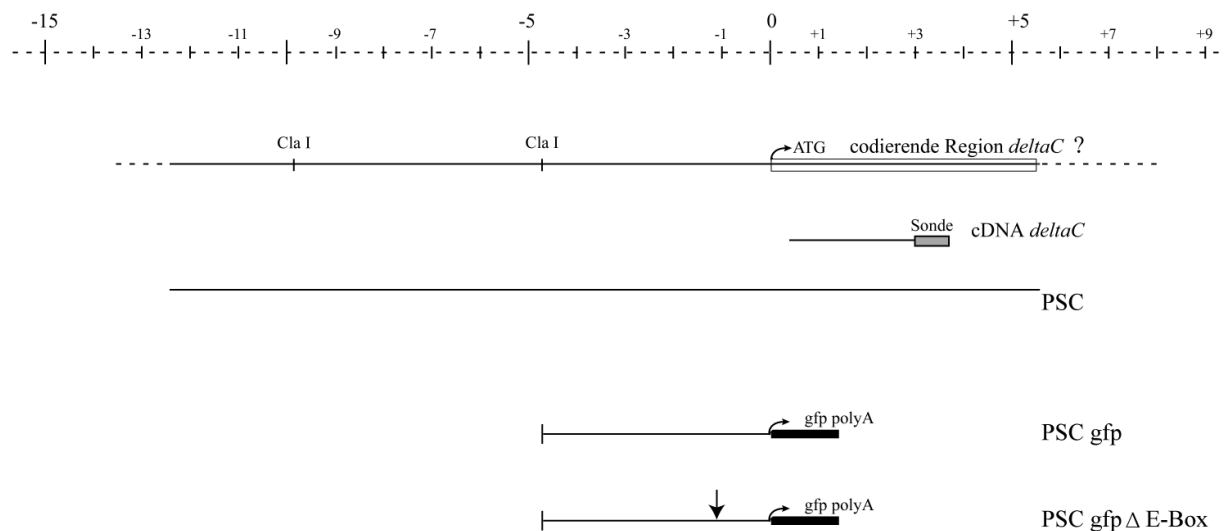


Bild 3.13: Der *deltaC* Locus und die verwendeten Konstrukte zur Herstellung stabil transformierter Zebrafische. Die oberste Karte bezeichnet die Koordinaten des *deltaC* Locus in kb vom Transkriptionstartpunkt. Darunter dargestellt ist die genomische Karte des stromaufwärtsliegenden Bereich des *deltaC* Gens mit den Bindestellen für das Restriktionsenzym Cla I. Der Umfang und die Größe des isolierten genomischen Klons PSC, der mit Hilfe der Sonde aus der *deltaC* cDNA isoliert wurde, ist ebenfalls dargestellt. Der Aufbau der beiden durch Verwendung des Klons PSC hergestellten Reportertransgenkonstrukte, PSC gfp und PSC gfp Δ E-Box, ist darunter abgebildet. Die Lokalisation der in das Konstrukt PSC gfp Δ E-Box eingefügten Deletion von 42 Basenpaaren ist durch einen Pfeil markiert.

3.10.2 Herstellung stabiler transgener Linien

Mit Hilfe des genomischen Klon's PSC wurden die beiden in Bild 3.13 dargestellten Konstrukte zur Herstellung von transgenen Linien erzeugt. Beide Konstrukte beinhalten den stromaufwärtsliegenden und sequenzierten Bereich von 4,7 kb und unterscheiden sich nur in einer 42 Basenpaare umfassenden Deletion, welche die beiden möglicherweise konservierten E-Boxen einschließt. Für beide Konstrukte war es möglich stabile Insertionen herzustellen, von denen jeweils zwei unabhängige Integrationsereignisse analysiert wurden.

3.10.3 GFP-exprimierende Linien spiegeln Teile der endogenen Expression von *deltaC* wieder

Das Expressionsmuster von *deltaC* ist in Bild 3.14 dargestellt, dass insbesondere in seiner mesodermalen Expression *deltaD* ähnelt. Wie *deltaD* wird *deltaC* ab 30% Epibolie in der marginalen Zone exprimiert, die nach Ende der Gastrulation in der Schwanzknospe zu liegen kommt. Die Expression von *deltaC* erlischt ebenfalls in der medialen Region bei 50% Epibolie und bei 80% Epibolie taucht eine Expressionsdomäne anterior zur Expression in der Marginalzone auf. Diese Expressionsdomäne bleibt während der gesamten Somitogenese bestehen und es zeigt sich nach Entstehung der ersten Somiten, dass sie im präsomitischen Mesoderm liegt. Neben diesen beiden Domänen, Schwanzknospe und präsomitisches Mesoderm, wird *deltaC* noch in den posterioren Hälften der zuletzt gebildeten sechs bis zehn

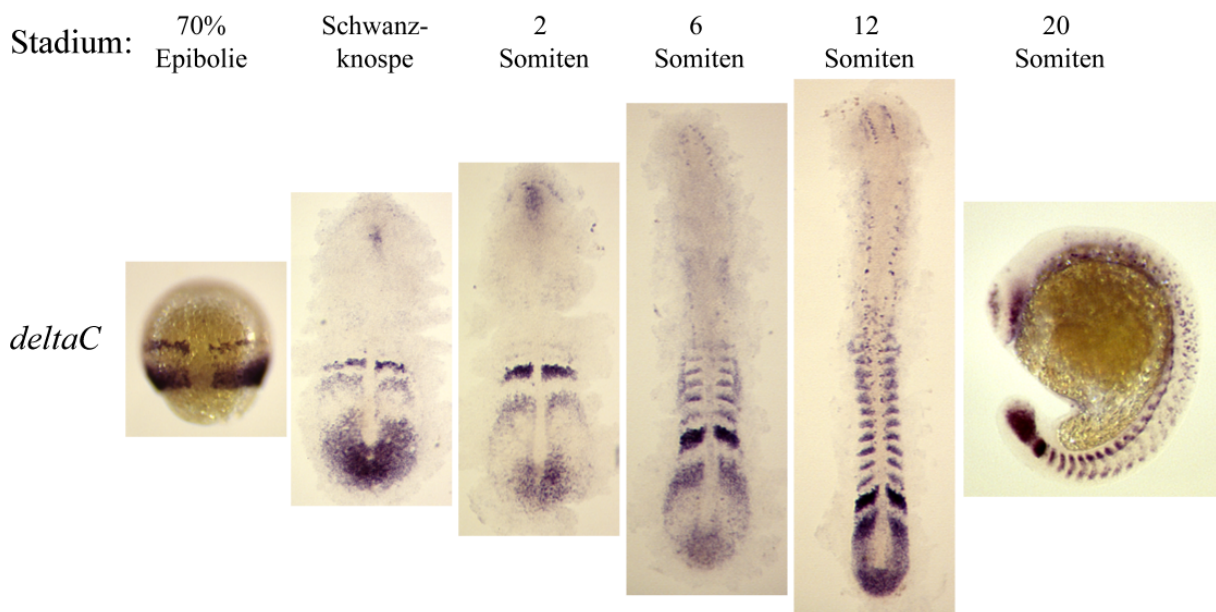


Bild 3.14: *deltaC* Entwicklungsprofil.

Dargestellt ist das *deltaC* Entwicklungsprofil des Zeitraums 70% Epibolie bis 20-Somiten. Insbesondere in mesodermalen Derivaten besteht eine grosse Ähnlichkeit in den Expressionsmustern von *deltaC* und *deltaD* (Vergleiche mit Bild 3.4).

Somiten exprimiert. Im Neuroektoderm wird *deltaC* ab dem Schwanzknospenstadium in zwei Domänen innerhalb der anterioren Neuralplatte schwach exprimiert, die der hufeisenförmigen Expressionsdomäne 2 und dem anterioren Teil der Expressionsdomäne 3 von *deltaD* ähneln. Zusätzlich zu diesen beiden Domänen wird *deltaC* ab dem 6 Somitenstadium schwach in vereinzelt Zellen innerhalb der Regionen der primären Neurogenese exprimiert. Neben diesen mesodermalen und neuralen Expressionsdomänen von *deltaC*, die mit den Expressionsdomänen von *deltaD* überlappen, wird *deltaC* ab dem 6 Somitenstadium im Pronephros und ab dem 20 Somitenstadium in der dorsalen Aorta exprimiert.

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte, PSC gfp und PSC gfp Δ E-Box, zeigen ein identisches Expressionsmuster (Bild 3.15: A). Hieraus kann abgeleitet werden, dass innerhalb des deletierten Bereiches mögliche, aber keine notwendigen Bindestellen liegen. Beide Konstrukte enthalten die positiven regulatorischen Elemente für alle neuralen Expressionsdomänen. Mesodermale Expression kann im präsomitischen Mesoderm, den Somiten und ganz schwach in der Schwanzknospe beobachtet werden. Vergleicht man die Expressionsstärken von *deltaC* in mesodermalen und neuralen Geweben mit der Stärke der durch die beiden Konstrukte vermittelten Expression in Mesoderm und Neuroektoderm, so fällt die verstärkte neurale Expression des Reportergens auf. Dies deutet auf das Fehlen von entweder positiven mesodermalen Elementen oder negativen neuralen Elementen hin. Die zweite Möglichkeit ist hier eher wahrscheinlich, da beide Konstrukte so stark exprimiert werden, dass die Fluoreszenzbeobachtung des Reportergens GFP in vivo gemacht werden kann (Bild 3.15: B). Neben diesen Elementen fehlen in den Reportergenkonstrukten des Weiteren die regulatorischen Elemente für die *deltaC* spezifische Expression im Pronephros oder der dorsalen Aorta.

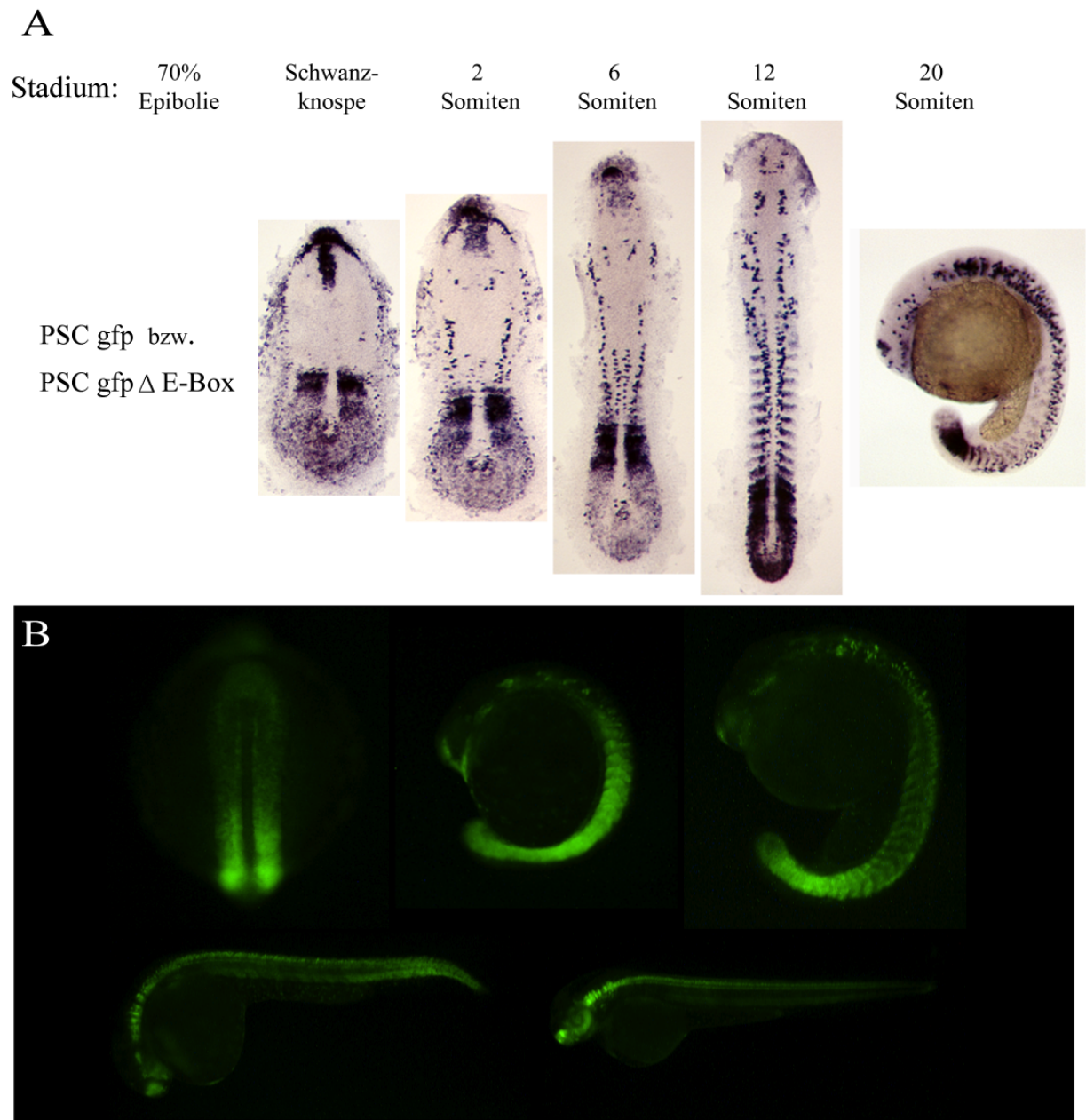


Bild 3.14: Entwicklungsprofil der beiden Reportergernekonstrukte (A) und Fluoreszenzbeobachtung des Reportergens GFP, getrieben durch das Konstrukt PSC *gfp* (B). (A) Beide Reportergernekonstrukte zeigen eine starke Expression im präsomitischen Mesoderm und in den Somiten. Die neurale Expression ist im Verhältnis zur mesodermalen Expression im Vergleich zum *deltaC* Expressionsmuster verstärkt. (B) Die beobachtbare Fluoreszenz setzt wie im Falle der Reportergernekonstrukte des *deltaD* Locus verspätet ein und markiert aufgrund der Stabilität des Proteins das komplette präsomitische und somitische Mesoderm.

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit ausgeführte Analyse der Organisation der *cis*-regulatorischen Regionen des *deltaD* Promotors ist ein erster Schritt zur Identifizierung der stromaufwärtsgelegenen Transkriptionsfaktoren. Die Ergebnisse der analysierten Promotorkonstrukte lassen sich in einem Bild zusammenfassen, das die *deltaD* Promotorstruktur schematisch widerspiegelt (Bild 4.1).

4.1 Die *cis*-regulatorischen Elemente des *deltaD* Locus umfassen 12.5kb

4.1.1 Quantitative Enhancer-Elemente

Die Konstrukte für die Herstellung der Transgenen waren so gewählt, dass die in der stromaufwärtsgelegenen Region identifizierten Homologiebereiche nachfolgend deletiert werden konnten. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass Konstrukte ohne den stromaufwärtsliegenden Teil von -6 bis -3.5 nur sehr schwach exprimiert wurden. Auch die Transformation der Deletionskonstrukte mit dem kompletten stromabwärtsliegenden Bereich führte zu keinen weiteren Erkenntnissen, weil dieser Teil viele regulatorische Elemente enthält, die das Expressionsmuster der stromaufwärtsliegenden regulatorischen Elemente überlagern. Erst die Erweiterung der anfangs verwendeten Konstrukte mit dem stromaufwärtsliegenden Teil von -6 bis -3.5 brachte den Durchbruch in der Analyse. Insgesamt trugen deshalb sechs der vierzehn verschiedenen Reporter-genkonstrukte nur ergänzend zur qualitativen Analyse des *deltaD* Promotors bei. Trotzdem war deren Analyse nicht vergebens, weil aus ihrem Expressionsverhalten Rückschlüsse auf ein stromaufwärtsliegendes und ein stromabwärtsliegendes quantitatives Enhancer-Element geschlossen werden kann. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Art der Transformation von Zebrafischen wird das DNA-Konstrukt zufällig in das Genom integriert. Die verschiedenen Integrationsereignisse lassen sich dabei wahrscheinlich aufgrund von Positionseffekten immer in eine Gruppe mit guter und eine Gruppe mit schlechter Expression einteilen. Dies war auch bei den hier verwendeten Reporter-genkonstrukten der Fall (Tabelle 3.1). Die beobachtete Stärke der Expression zeigte dabei kein gewebespezifisches Verhalten, sondern wirkte sich auf alle Expressionsdomänen gleich aus. Bei Betrachtung der Tabelle 3.1 fällt auf, dass Konstrukte ohne den distalen stromaufwärtsgelegenen Bereich (-6 bis -3.5) gar nicht oder nur

schwach exprimiert, während hingegen Konstrukte mit diesem Bereich schwach oder stark exprimiert werden. Ein ähnliches Verhalten lässt sich auch im stromabwärtsgelegenen Bereich beobachten. Das Konstrukt 0,5 gfp+3' (2,8), das sich durch einem verkürzten stromabwärtsgelegenen Bereich von den anderen Konstrukten unterscheidet, weist keine oder nur eine schwache Expression auf. Im Gegensatz dazu zeigen alle anderen Konstrukte mit vollständigem stromabwärtsgelegenen Bereich eine schwache oder eine starke Expression. Die Interpretation dieser Ergebnisse führt zu dem Schluss, dass in diesen Regionen Elemente lokalisiert sind, die sich positiv auf die Transkription des Reportergens auswirken. Die Literatur bezeichnet Elemente, die ungeachtet ihrer Position und Orientierung die Transkription eines Gens verstärken können, als Enhancer. Ob es sich bei den beiden in dieser Arbeit identifizierten Regionen um „echte“ Enhancer handelt, wurde nicht näher untersucht. Aufschluss würden weitere Reporter-genkonstrukte bringen, in denen die Elemente in anderen Zusammenhängen zum *deltaD* Promotor oder auch anderen Promotoren gebracht würden.

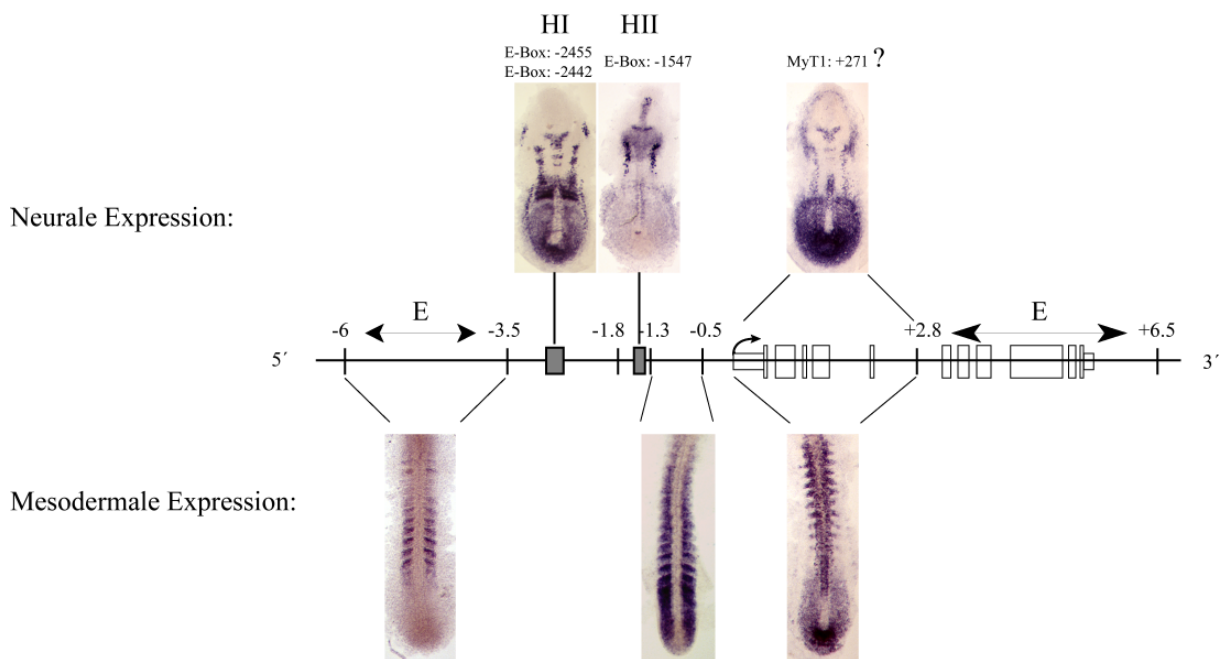


Bild 4.1: Schematische Präsentation der Organisation der *cis*-regulatorischen Elemente des *deltaD* Promotors. Dargestellt ist der *deltaD* Locus, wie in Bild 3.1, und die mit den verschiedenen Regionen assoziierten neuronalen (obere Hälfte) und mesodermalen (untere Hälfte) Expressionsdomänen. Expressionsdomänen, hinreichend für die Expression umschließen die verantwortliche Region, wohingegen notwendige, aber nicht hinreichende Expressionsdomänen dem verantwortlichen Bereich mit einem Balken zugeordnet worden sind. HI und HII bezeichnen die konservierten Bereiche und die in ihnen enthaltenen *ngn1* bzw. *zash1a* / *zash1b* sensitiven E-Boxen. Die Regionen und Ausmaße der quantitativen Enhancer-Elementen (E) sind durch Pfeile markiert.

4.1.2 Qualitative, räumliche Elemente

In dieser Arbeit wurde insbesondere Wert auf die Analyse der mesodermalen und neuroektodermalen Expressionsdomänen gelegt. Die Analyse erfolgte dabei durch die Auswertung der Entwicklungsprofile, die den Zeitraum von 30% Epibolie bis 20 Somiten umfassten. Diese zeigen, dass 6kb der stromaufwärts- und 6.5kb der stromabwärtsgelegenen Region ausreichend sind, um das komplette endogene Muster von *deltaD* widerzuspiegeln. Weiter konnte gezeigt werden, dass mesodermale und neuroektodermale Elemente getrennt werden können, da Reportergerkonstrukte, die nur Teilbereiche der gesamten Region umfassen, auch nur Teilbereiche der endogenen *deltaD* Expression wiedergeben. Die aus den verschiedenen Reportergerkonstrukten gewonnenen Daten wurden benutzt, um das Rettungskonstrukt herzustellen. Die biologische Aktivität von *deltaD*, getrieben durch die in diesem Konstrukt beinhalteten Elemente im *after eight* Hintergrund, zeigt auf eindrucksvolle Weise, dass die regulatorischen Elemente des *deltaD* Locus auf 12.5kb eingegrenzt werden können. Bis zum heutigen Stand der Forschung werden alle beschriebenen Merkmale des *after eight* Phänotyps (van Eaden *et al.*, 1996; Durbin *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2000) durch die Transformation mit dem Rettungskonstrukt ununterscheidbar zum Wildtyp. Der Nachweis, dass *after eight* den Phänotyp der *deltaD* Ausfallmutante repräsentiert, wurde aber erst kürzlich geführt (Holley *et al.*, 2000). Da aber *deltaD* an einer Vielzahl von Prozessen auch nach dem 20-Somitenstadium beteiligt ist, ist es durchaus möglich, dass weitere regulatorische Elemente, die zu einem späteren Zeitraum benötigt werden, nicht von dem Rettungskonstrukt abgedeckt werden.

4.2 Neurale *cis*-regulatorische Elemente

Durch die in den letzten Jahren klonierten und analysierten Homologen der proneuralen und neurogenen Gene in den verschiedenen Vertebratensystemen hat sich gezeigt, dass der Delta-Notch-Signaltransduktionsweg stark konserviert ist. Analog zum Prinzip der lateralen Inhibition in *Drosophila* werden in Vertebraten einzelne Zellen aus Äquivalenzgruppen selektioniert (Dornseifer *et al.*, 1997; Blader *et al.*, 1997; Haddon *et al.*, 1998; Appel und Eisen, 1998; Takke *et al.*, 1999). Diese Zellen werden postmitotisch und schlagen ihren Differenzierungsweg ein. Die fortgesetzte Delta Expression in den postmitotischen Vorläuferzellen, vermittelt u. a. durch die den proneuralen Proteinen nachgeschalteten Genen (Dubois *et al.*, 1998), hindert deren Nachbarn am Einschlagen des Differenzierungsweges und hält sie in einem proliferativen Status (Chitnis *et al.*, 1995; Haddon *et al.*, 1997, Appel *et al.*,

2001). Andere Experimente deuten auf die zusätzliche Möglichkeit, dass die Aktivität von Notch in den Nachbarzellen die Spezifizierung bestimmter Zelltypen, insbesondere Gliazellen, fördert (Furukawa *et al.*, 2000; Scheer *et al.*, 2001). Vor der Selektion aus der Äquivalenzgruppe stehen die proneuralen Gene, welche im sich entwickelnden Nervensystem exprimiert werden (Allende und Weinberg, 1994; Blader *et al.*, 1997; Korzh *et al.*, 1998). Dabei zeigen die beiden Gruppen, *achaete-scute*-Homologe und *atonal*-Homologe, bei anderen Vertebraten als dem Zebrafisch ein nicht-überlappendes, komplementäres Expressionsverhalten (Johnson *et al.*, 1990; Lo *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1997), ein Phänomen, das auch schon im peripheren Nervensystem von *Drosophila* beobachtet werden konnte (Übersicht: Hassan und Bellen, 2000).

Die theoretische Betrachtung eines Delta-Promotors würde aus diesen Daten zwei qualitativ unterschiedliche, neurale *cis*-regulatorische Elemente erwarten lassen. Ein Element sollte die Aktivität von Delta während des Selektionsprozesses steuern, während ein zweites Element nach dem Selektionsprozess Delta in der postmitotischen Vorläuferzelle aktiv hält.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Regionen mit *cis*-regulatorischen Elementen lokalisiert, die genau diesen beiden oben genannten Gruppen entsprechen. Die ersten beiden Regionen enthalten die zwischen Maus und Zebrafisch konservierten Bereiche Homologie I (HI) und Homologie II (HII) und folgen in ihrem Expressionsverhalten den Elementen der ersten Gruppe. Die dritte Region liegt im stromabwärtsgelegenen Bereich zwischen 0 bis +2,8 und verhält sich nach dem Merkmal der zweiten Gruppe.

4.2.1 Proneurale Elemente

Die Analyse des stromaufwärtsliegenden Bereiches hat gezeigt, dass die Region -3.5 bis -1.3, welche die beiden konservierten Regionen HI und HII umschließt, für eine neurale Expression notwendig ist. So ist der stromaufwärtsliegende Bereich ausreichend für das nahezu vollständige neurale Expressionsmuster, während eine Deletion des Bereiches -3.5 bis -1.3 zu einem kompletten Verlust der neuralen Expression führt (Bild 3.7). Die neuralen Expressionsmuster der beiden Konstrukte $6\Delta 1.8-1.3gfp$ und $6\Delta 3.5-1.8gfp$ mit nur einer der konservierten Regionen zeigen eine auffällige Übereinstimmung mit den Expressionsmustern der proneuralen Gene *neurogenin1* (*ngn1*) und *zash1a / zash1b*. Für beide Regionen konnte gezeigt werden, dass sie *ngn1* bzw. *zash1a / zash1b* sensitive E-Boxen enthalten.

***ngn1* und HI**

neurogenin1 kodiert für ein basisches Helix-Loop-Helix Protein, das strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten mit dem durch das proneurale Gen *atonal* kodierten Protein aus *Drosophila* aufweist (Ma *et al.*, 1996; Blader *et al.*, 1997; Korzh *et al.*, 1998). Seine Expression findet sich in fast allen Regionen der primären Neurogenese in der frühen Neuralplatte, wobei die Anzahl der *ngn1* positiven Zellen grösser ist als die der primären Neurone. *ngn1* Expression überlappt mit Regionen, in denen Notch Liganden exprimiert werden (Ma *et al.*, 1997; Blader *et al.*, 1997). Missexpression von *ngn1* reprimiert die Entstehung der primären Neurone, während außerhalb der Neuralplatte ektopische Neurone induziert werden. Weitergehende Studien konnten zeigen, dass die Aktivität von *ngn1* durch den Prozess der lateralen Inhibition moduliert wird (Ma *et al.*, 1997; Blader *et al.*, 1997; Takke *et al.*, 1999).

Die Überlappung der Expressionsmuster von *ngn1* mit dem Konstrukt 6Δ 1.8-1.3gfp, das nur noch die konservierte Region HI trägt, lässt sich besonders gut im 2 Somitenstadium erkennen. *ngn1* wird hier in allen neuralen Regionen des Konstruktes exprimiert (Bild 3.9: A). Das Konstrukt umfasst die konservierte Region HI, deren Bedeutung für eine *ngn1*-abhängige Aktivierung in den CAT-Assays bestätigt werden konnte. Alle Konstrukte mit HI zeigen eine starke Aktivierbarkeit in Anwesenheit von *ngn1*, während Konstrukte ohne HI nur schwach oder gar nicht aktivierbar sind. Die hohe Aktivität des Konstruktes HI 0.5 CAT lässt eine Eingrenzung der durch *ngn1* vermittelten Aktivierung auf HI zu. In den in dieser Arbeit gewählten Konstrukten wurde jedoch nicht weiter untersucht, ob es zusätzliche *ngn1*-sensitive Elemente im stromaufwärts- oder stromabwärtsliegenden Bereich von HI gibt. Alle getesteten CAT-Konstrukte wurden in ihrem Aufbau so gewählt, dass sie mit den in den Transgenen verwendeten gfp-Konstrukten übereinstimmten. Dabei wurde jedoch die Größe der deletierten, HI umschließenden Region in dem Konstrukt 6Δ3.5-1.8gfp nicht berücksichtigt. HI ist im stromaufwärtsliegenden Bereich in Position -2,8 lokalisiert. Ausgehend von dieser Position wurden 700bp stromaufwärts Region und rund 1kb stromabwärts Region nicht getestet. Nur die Verwendung von CAT-Konstrukten mit diesen Regionen könnten weitere Erkenntnisse über *ngn1*-sensitive Elemente in der Umgebung von HI bringen.

***zash1a* und HII**

zash1a und *zash1b* kodieren, wie *ngn1*, für basische Helix-Loop-Helix Proteine. Beide Gene sind aber strukturell näher mit den proneuralen Genen des *achaete-scute-Komplexes* aus *Drosophila* verwandt (Allende und Weinberg, 1994). Aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten mit *Mash1* und *Xash1* wurden beide Gene der ash-1 Familie zugeordnet. In ihrem Expressionsverhalten weisen die beiden Zebrafischgene große Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede auf. *zash1a* wird während der Entwicklung in definierten Bereichen des Telencephalon, Diencephalon, der Epiphyse, des ventralen Mesencephalons und im Hinterhirn exprimiert. *zash1b* wird ebenfalls im Telencephalon und Diencephalon exprimiert, aber auch im dorsalen Mesencephalon und bestimmten Zellen im Hinterhirn und Rückenmark. Im Vergleich der Expressionsdomänen zu *Mash1* und *Xash1* treten dabei große Unterschiede auf, so dass es sich bei den beiden Zebrafischgenen möglicherweise nicht um Orthologe zu *Mash1* und *Xash1* handelt (Allende und Weinstein, 1994).

Der Vergleich der Expressionsmuster von *zash1a* / *zash1b* mit dem Konstrukt 6Δ 3.5-1.8gfp, das nur die konservierte Region HII trägt, lässt sich besonders gut im 12-Somitenstadium anstellen, da hier die Expressionsdomänen 2 und 3 zusammen mit der Expression in der Epiphyse ein charakteristisches Muster ergeben. Auch hier konnten die CAT-Assays die Bedeutung der Region HII für eine *zash1a*-abhängige Aktivierung zeigen. Konstrukte mit HII sind in Anwesenheit von *zash1a* stark aktivierbar, wohingegen Konstrukte ohne HII nur schwache bis gar keine Aktivität aufweisen. Im Gegensatz zu *ngn1* und HI konnte die *zash1a*-abhängige Aktivierung allerdings nicht weitereingegrenzt werden. So lässt sich keine Aktivität nachweisen in einem Konstrukt, in dem der Abstand von HII zum Basalpromotor verändert wurde. Dies legt den Schluss nahe, dass der physikalische Abstand der an die Region HII bindenden Faktoren zum Transkriptionskomplex am Basalpromotor wichtig ist. Des Weiteren kann über mögliche unterstützende Faktoren spekuliert werden, die an die dazwischenliegende DNA binden könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur die *zash1a*-abhängige Aktivierbarkeit getestet, von der dann auf eine *zash1b*-abhängige Aktivierbarkeit geschlossen wurde. In einem Test wurde anfangs sichergestellt, dass sowohl *zash1a* als auch *zash1b* das Konstrukt 6 CAT im gleichen Ausmaß aktivieren. Anschließend wurden alle weiteren Experimente mit *zash1a* ausgeführt, da „Domänen-Austausch-Experimente“ zeigen, dass die Spezifität der bHLH-Proteine durch ihre basische, die DNA-bindende Domäne bestimmt wird (Chien *et al.*, 1996). Aufgrund der hundertprozentigen Übereinstimmung in ihrer basischen Domäne sollten deshalb die mit *zash1a* erhaltenen Ergebnisse auf *zash1b* übertragbar sein.

Die in dieser Arbeit mit Hilfe der Transformation von Zebrafischen und der CAT-Assays erzielten Resultate fügen sich sehr gut in die bereits bekannten Daten ein. Sowohl die in *Xenopus* und Zebrafisch durchgeführten Überexpressionsstudien als auch die Analysen der Ausfallmutationen in Maus weisen auf eine Aktivierung der Delta Promotoren durch die proneuralen Proteine hin (Ferreiro *et al.*, 1994; Turner und Weintraub, 1994; Ma *et al.*, 1996; Blader *et al.*, 1997; Takke *et al.*, 1999; Ishibashi *et al.*, 1995; de la Pompa *et al.*, 1997; Fode *et al.*, 1998). Die direkte Bindung der proneuralen Proteine des *achate-scute-Komplexes* an bestimmte Elemente des *Delta* Promotors, die sogenannten E-Boxen, konnte in *Drosophila* nachgewiesen werden (Kunisch *et al.*, 1994). Es ist sehr wahrscheinlich, dass der *deltaD* Promotor ebenfalls durch die direkte Bindung der proneuralen Proteine reguliert wird. So konnten in der konservierten Region HI zwei *ngn1*-sensitive E-Boxen und in der konservierten Region HII eine *zash1a / zash1b*-sensitive E-Box identifiziert werden. Mit Hilfe der CAT-Assays ist aber lediglich eine Aktivierung des Reportergens in Abhängigkeit eines bestimmten Faktors nachweisbar, nicht aber die direkte Bindung des Faktors an den Promotor. Um diese direkte Bindung nachzuweisen, müssten Gelretentionsanalysen durchgeführt werden (besser bekannt unter dem Begriff: EMSA, Electro Mobility Shift Assay). Die Umsetzung dieser Experimente war auch beabsichtigt, scheiterte jedoch an der technischen Ausführung. Im Laufe der letzten Jahre wurde offensichtlich, dass die Expression der proneuralen Gene zu der Induktion einer Kaskade verschiedener, neuraler bHLH Proteine führt (Kageyama *et al.*, 1997; Cau *et al.*, 1997; Roztocil *et al.*, 1997). Da alle Transkriptionsaktivatoren der bHLH Familie an die Zielsequenz der E-Box binden (Fisher und Caudy, 1998), wäre es möglich, dass die in dieser Arbeit beobachtbare Aktivierung des *deltaD* Promotors auf *ngn1* bzw. *zash1a / zash1b* nachgeschaltete bHLH Proteine zurückzuführen ist. Diese Möglichkeit ist jedoch ziemlich unwahrscheinlich, da die *deltaD* Expression zeitlich und räumlich unmittelbar auf die Expression von *ngn1* bzw. *zash1a / zash1b* folgt. So ist z. B. die *deltaD* Expression noch vor der Expression des *ngn1* nachgeschalteten bHLH Proteins *NeuroD* zu beobachten (Blader *et al.*, 1997; Korzh *et al.*, 1998). Weitere detaillierte Analysen von *X-ngn-1* nachgeschalteter Gene zeigen, dass schon geringe Konzentrationen von *X-ngn-1* für eine Aktivierung von *X-Delta-1* ausreichend sind, wohingegen für die Expression von *NeuroD* höhere Konzentrationen benötigt werden (Koyano-Nakagawa *et al.*, 1999).

Die beiden verschiedenen Klassen der proneuralen Proteine werden in *Drosophila* für die Entwicklung verschiedener Klassen von Sinnesorganen benötigt. So ist das Gen *atonal* für die Entwicklung der Chordotonalorgane unerlässlich, wohingegen die Gene des *achate-scute-*

Komplexes für die Bildung der externen Sinnesorgane notwendig sind (Jarman *et al.*, 1993; Skeath und Carroll, 1991). Im Laufe ihrer Entstehung verwenden beide Sinnesorgane den Delta-Notch-Signaltransduktionsweg zur Generierung unterschiedlicher Zellschicksale (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Die bereits erwähnten „Domänen-Austausch-Experimente“, welche den Nachweis der Spezifität der basischen Domäne zeigen (Chien *et al.*, 1996) und die DNA-Bindungsstudien, der Interaktion der Proteine des *achate-scute-Komplexes* mit dem *Delta* Promotor (Kunisch *et al.*, 1994), legen den Schluss nahe, dass die beiden verschiedenen Klassen der proneuralen Proteine unterschiedliche Bindestellen verwenden. Dies konnte in *Drosophila* jedoch bisher nicht gezeigt werden. Die Unterscheidung der beiden proneuralen Familien findet sich auch in der Neurogenese der Vertebraten wieder. Auch hier bestimmt die Expression eines proneuralen Gens das zukünftige Zellschicksal (Lo *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1996). Aus den in dieser Arbeit erzielten Resultaten kann nun abgeleitet werden, dass die beiden verschiedenen Klassen der proneuralen Proteine unterschiedliche Regionen innerhalb des *deltaD* Promotors verwenden. Diese Beobachtungen werden durch die Analyse des *Delta-like-1* Promotors in transgenen Mausembryonen noch bestärkt. Transformierte Mausembryonen, die ein Konstrukt bestehend aus der konservierten Region HI bzw. HII im Zusammenhang mit dem basalen *Delta-like-1* Promotor tragen, zeigen eine spezifische Expression im ventralen bzw. dorsalen Neuralrohr (Beckers *et al.*, 2000). Vergleicht man diese Expressionsdomänen der Konstrukte mit den Expressionsdomänen der proneuralen Gene *ngn1* und *Mash1*, so fällt eine starke Überlappung auf (Ma *et al.*, 1997). Wie in den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen ist dabei die durch HI vermittelte Expression mit *ngn1* und die durch HII vermittelte Expression mit *Mash1* assoziiert.

4.2.2 Nachgeschaltete Elemente

Die stromabwärtsgelegene Region 0 bis +2.8 ist hinreichend für eine Expression in allen neuralen Domänen von *deltaD* (Bild 3.8: F). Dabei fällt jedoch ein verzögertes Auftreten der Expressionsdomänen auf. Dieses Verhalten kann durch einen Faktor verursacht werden, der durch die proneuralen Proteine reguliert wird. In *Xenopus* sind bis zum heutigen Stand der Forschung zwei Faktoren, *X-MyT1* und *XCoe2*, beschrieben worden, die sich entsprechend verhalten (Bellefroid *et al.*, 1996; Dubois *et al.*, 1998). Hierbei handelt es sich nur um zwei mögliche Kandidaten, die nachfolgend diskutiert werden sollen, ohne dem Anspruch auf Vollständigkeit zu genügen.

MyT1

X-MyT1 kodiert für ein Zinkfinger Protein, das kurz nach *X-ngn-1* und in identischen Domänen wie *X-Delta-1* exprimiert wird. *X-MyT1* wird positiv durch *X-ngn1* und negativ durch den Prozess der lateralen Inhibition reguliert. Überexpression von *X-MyT1* führt zu einer Überproduktion primärer Neurone innerhalb der proneuralen Domänen, während eine dominant-negative Form die primäre Neurogenese verhindert. *X-MyT1* fungiert als ein Transkriptionsaktivator und bindet an die Konsensussequenz: AAA^{G/C}TTT (Bellefroid *et al.*, 1996). Im stromabwärtsliegenden Bereich des *deltaD* Promotors findet sich an Position +271 diese Sequenz wieder. Da ein Ortholog im Zebrafisch noch nicht verfügbar ist, lässt sich über eine Regulation durch MyT1 nur spekulieren. Einige der in *Xenopus* erzielten Resultate, wie die identische Expression von *X-MyT1* und *X-Delta-1*, sprechen für eine mögliche regulatorische Funktion. Andererseits finden sich auch gegenteilige Argumente. So führt die Überexpression von *X-MyT1* zur Induktion von Markern primärer Neurone, wie z. B. *N-tubulin*. In den gleichen Überexpressionsstudien ist die *X-Delta-1* Expression allerdings nicht betroffen (Bellefroid *et al.*, 1996). Ob die im *deltaD* Promotor identifizierte Konsensussequenz eine biologische Funktion hat, müssen zukünftige Experimente zeigen.

Coe2

XCoe2 kodiert für einen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor mit einer bis vor kurzem unbekanntem Art von DNA-Bindungsdomäne. Wie *X-MyT1* wird es zeitlich kurz nach *X-ngn1* und in identischen Domänen wie *X-Delta-1* exprimiert. Überexpression von *XCoe2* führt zu einer Induktion ektopischer Neurone inner- und außerhalb der Neuralplatte, während eine dominant-negative Form neuronale Differenzierung verhindert. Im Gegensatz zur Überexpression von *X-ngn1* führt die Überexpression von *XCoe2* zur Induktion ektopischer, aber vereinzelt liegender Neurone, die auf eine Aktivierung von *X-Delta-1* und dem darauffolgenden Mechanismus der lateralen Inhibition schließen lassen. In der Tat führt die ektopische Expression von *XCoe2* zu einer ektopischen, uniformen Expression von *X-Delta-1*, die anschließend verarbeitet wird, bis sich vereinzelt liegende Zellen mit stabiler *X-Delta-1* Expression herausgebildet haben (Dubois *et al.*, 1998). Das Zebrafischortholog *ZCoe2* zeigt in seinem Expressionsmuster große Parallelen zum Expressionsmuster des Konstruktes 0,5gfp+3' (Bally-Cuif *et al.*, 1998). Da leider noch keinerlei Daten über mögliche Bindestellen dieses Transkriptionsfaktors verfügbar sind (Alain Vincent, persönliche Mitteilung), wurde eine mögliche Aktivierung des *deltaD* Promotors durch *ZCoe2* nicht weiterverfolgt.

4.3 Mesodermale *cis*-regulatorische Elemente

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Regionen mit mesodermalen Elementen lokalisiert, die hinreichend sind für eine Teilexpression des endogenen *deltaD* Musters (Bild 3.7). Dabei fällt auf, dass insbesondere der stromabwärtsliegende Bereich des *deltaD* Promotors ein weiterhin komplexes Expressionsmuster aufweist. Weitere Reportergenkonstrukte mit verschiedenen Anteilen der verbliebenen 2.8 kb sollten Auskunft darüber geben, ob die Expression in Schwanzknospe, präsomitischen Mesoderm und sich differenzierenden Somiten getrennt werden können. Eine weitere Auftrennung in regulatorische Elemente sollte zu einer möglichen Aufdeckung übergeordneter Transkriptionsfaktoren in einem Ansatz analog zur Aufdeckung neuraler Transkriptionsfaktoren verhelfen.

Im Gegensatz zu der Funktion von Delta während der Neurogenese liegt die Bedeutung von Delta während der Somitogenese noch immer im Dunkeln (Gossler und Hrabe de Angelis, 1998). Vertebraten mit Mutationen in Genen des Delta-Notch-Signaltransduktionsweges zeigen Störungen der Somitengrenzen bis hin zu deren Abwesenheit (Conlon *et al.*, 1995; Oka *et al.*, 1995; del Barco Barrantas *et al.*, 1999). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Delta-like-1* im paraxialen Mesoderm für die Transition von mesenchyalem Mesoderm zu epithelialisierten Somiten notwendig ist, eine Funktion, an der *Delta* auch in *Drosophila* beteiligt ist (Hrabe de Angelis *et al.*, 1997; Hartenstein *et al.*, 1992).

Die Herstellung unterschiedlicher Zellschicksale innerhalb des präsomitischen Mesoderms zur Etablierung der Somitengrenzen versucht das sogenannte „clock-and-wavefront“ Modell zu erklären (Cooke, 1998). Ein biochemischer Oszillator agiert dabei innerhalb der Zellen des präsomitischen Mesoderms („clock“). Durch ein Signal („wavefront“) wird dieser in einer bestimmten Phase seines Zyklus arretiert und die Differenzierung der Somiten am rostralen Ende des präsomitischen Mesoderms ausgelöst (Palmeirim *et al.*, 1997). Arretiert in unterschiedlichen Phasen, exprimieren die Zellen unterschiedliche Genprodukte, welche die nachfolgende Etablierung der Somitengrenzen steuern. In dem bisherigen Modell stellt der Delta-Notch-Signaltransduktionsweg dabei einen Teil des Oszillators und / oder ein stromabwärtsgelegenes Element zur Ausbildung der Somitengrenzen dar (Saga *et al.*, 1997; Durbin *et al.*, 1998). In einer anderen Interpretation wurde kürzlich aus der Analyse verschiedener Zebrafischmutanten auf eine Funktion des Signalweges zur Synchronisation der zellautonomen Oszillatoren zwischen benachbarten Zellen geschlossen (Jiang *et al.*, 2000).

Die in dieser Arbeit identifizierten Regionen mit mesodermalen *cis*-regulatorischen Elementen könnten dazu dienen, die Bedeutung von *deltaD* während dieser verschiedenen

Prozesse näher zu beleuchten. So könnten nach einer weitergehenden Aufklärung des stromabwärtsliegenden Bereiches, geeignet aufgebaute Rettungskonstrukte in den *deltaD* mutanten Hintergrund (*after eight*) gebracht werden. Über die damit erreichbare Teilrettung sollten Rückschlüsse auf die biologische Funktion von *deltaD* während der Somitogenese möglich sein.

4.4 Vergleich des *deltaD* Promotors mit anderen Promotoren

Mit dieser Arbeit liegen die Analysen dreier Delta Promotoren vor, die eine erste Betrachtung der Gemeinsamkeiten und Unterschiede erlaubt. Neben dem *deltaD* Promotor (diese Arbeit) wurden bereits der *Delta* Promotor in *Drosophila* und der *Delta-like-1* Promotor in Maus untersucht (Haenlin *et al.*, 1994; Kunisch *et al.*, 1994; Beckers *et al.*, 2000). Der *deltaD* Promotor zeigt hierbei eine größere Ähnlichkeit zum *Delta-like-1* Promotor als zum *Delta* Promotor, was aber aufgrund der evolutionären Abstände nicht überrascht. Die Analyse des Mauspromotors war beschränkt auf den stromaufwärtsliegenden Bereich, führte dennoch zur Identifikation von zwei neuralen und zwei mesodermalen Elementen. In einer schematischen Darstellung ergibt sich für den *Delta-like-1* Promotor ein ähnliches Bild wie beim *deltaD* Promotor (Bild 4.1). Die neuralen Elemente, die durch den Vergleich des *deltaD* Promotors mit dem *Delta-like-1* Promotor identifiziert wurden, werden mit Homologie I (HI) und Homologie II (HII) bezeichnet. Beide Elemente sind in Position und Orientierung ähnlich lokalisiert, HI distal und HII proximal zum Basalpromotor. Ihr biologische Funktion ist für die Aktivierung durch die proneuralen Determinierungsgene *neurogenin1* und *Mash1* bzw. *zash1a* / *zash1b* unerlässlich und wurde in Abschnitt 4.2.1 ausführlich betrachtet. Die zwischen den Promotoren *deltaC* und *deltaD* konservierte Region zeigt weiter, dass zumindest die konservierte Region HII mehr als die Bindestellen für die proneuralen Proteine beinhalten muss. Die zwischen *deltaC* und *deltaD* identifizierte Region besteht aus dem Teilbereich der konservierten Region HII, welche die *zash1a* / *zash1b* sensitive E-Box enthält. Diese E-Box ist in beiden Promotoren ähnlich lokalisiert und inklusive flankierender Sequenz 100%ig identisch. Ihr Vorhandensein in beiden Zebrafischpromotoren führt aber nicht zu identischen Expressionsmuster, und ihre Deletion im *deltaC* Promotor bewirkt auch keine Änderung im Expressionsmuster des Reportergens. Diese Ergebnisse können nur durch das Vorhandensein weiterer Bindestellen innerhalb der konservierten Regionen erklärt werden. Die geringe Spezifität in der Erkennungssequenz der bHLH Proteine (CANNTG) und das Auftreten zahlreicher möglicher Bindestellen außerhalb der konservierten Region bzw. ausserhalb der Delta Promotoren bestärken diese Interpretation.

Die beiden mesodermalen Elemente des *Delta-like-1* Promotors werden mit msd bzw. msdII bezeichnet und sind distal zwischen den beiden neuronalen Elementen bzw. proximal unmittelbar vor dem Basalpromotor lokalisiert. Das Expressionsmuster der mit msdII bezeichneten Region wird gesteuert durch 1,6 kb des stromaufwärtsgelegenen Bereiches und weist eine auffallende Ähnlichkeit mit dem Konstrukt 1,3 gfp aus dieser Arbeit auf. In beiden Organismen findet sich eine starke Expression im präsomitischen Mesoderm und eine sich abschwächende Expression in den Somiten. Das distale mesodermale Element msd des *Delta-like-1* Promotors zeigt ebenfalls eine Expression im präsomitischen Mesoderm und bemerkenswerterweise eine starke Expression in neu gebildeten Somiten. In diesem Punkt zeigt die verantwortliche Promotorregion ein ähnliches Verhalten wie das distale mesodermale Element des *deltaD* Promotors.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Deletionsanalysen der beiden Promotoren *deltaD* und *Delta-like-1* ein sehr einheitliches Bild ergeben.

Der Vergleich mit dem *Delta* Promotor aus *Drosophila* gelingt dagegen nur unvollständig. Die Analyse des *Delta* Promotors zeigte, dass regulatorische Elemente ausschließlich im stromaufwärtsliegenden Bereich zu finden sind (Haenlin *et al.*, 1994). Die Regulation durch die proneuralen Proteine wurde dabei weitgehend am *Delta* Promotor aufgedeckt (Kunisch *et al.*, 1994). Die neuronalen Elemente erstrecken sich über große Bereiche und können nicht einzelnen, konkreten E-Boxen zugeordnet werden. Vielmehr zeigte sich, dass viele der E-Boxen, die innerhalb eines bestimmten Promotorabschnitts liegen, notwendig für die biologische Aktivität von *Delta* sind. Die Regulation der *Delta* Promotoren durch die proneuralen Proteine stellt dabei trotzdem eine große Gemeinsamkeit dar. Bei oberflächlicher Betrachtung erscheint es, als ob die Regulation im Laufe der Evolution vereinfacht worden wäre. In den Vertebratenmodellssystemen sind nur noch einzelne, konkrete Elemente für eine Aktivierung durch die proneuralen Proteine notwendig, wohingegen in *Drosophila* komplexere Interaktionen proneuraler Proteine benötigt werden. Abgeleitet aus den vorliegenden Daten, trifft dies auf die transkriptionelle Regulation auch zu. Die durch den *Delta*-Notch-Signaltransduktionsweg ausgeführten Prozesse sind aber wohl auf die nächsthöhere Ebene der Proteine verschoben worden. So werden im Zebrafisch die drei Homologe *deltaA*, *deltaB* und *deltaD* und in Maus die beiden Homologe *Delta-like-1* und *Delta-like-3* im sich entwickelnden Nervensystem exprimiert (Haddon *et al.*, 1998; Appel und Eisen, 1998; Dunwoodie *et al.*, 1997). Eine Konservierung mesodermaler Elemente zwischen *Drosophila* und den Vertebratenmodellssystemen ist bisher noch nicht gefunden worden, kann aber noch mit den wenigen Daten begründet werden. Die Konservierung dieser Funktionen

kann später aber bestimmt gezeigt werden, da vergleichende Studien beweisen, dass viele der aus *Drosophila* bekannten Signalwege auch in den Vertebraten eine wichtige Rolle besitzen.

5. Literatur

- Akazawa, C., Sasai, Y., Nakanishi, S. and Kageyama, R.** (1995); Molecular characterisation of a rat negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem* 267, 21879-21885
- Allende, M. L. and Weinberg, E. S.** (1994); The expression pattern of two zebrafish achaete-scute homolog (ash) genes is altered in the embryonic brain of the cyclops mutant. *Dev Biol* 166, 509-530
- Anderson K.V. and Nüsslein-Volhard, C.** (1984); Information for the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311, 223-227
- Appel, B. and Eisen, J.S.** (1998); Regulation of neuronal specification in the zebrafish spinal cord by Delta function. *Development* 125, 371-380
- Appel, B., Givian, L. A. and Eisen, J. S.** (2001); Delta-Notch mediated lateral inhibition regulates specification of zebrafish spinal neurons. in press
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J.** (1999); Notch signalling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* 84, 770-776
- Bailey, A.M. and Posakony, J.W.** (1995); Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev* 9, 2609-2622
- Bally-Cuif, L., Dubois, L. and Vincent, A.** (1998); Molecular cloning of Zco2, the zebrafish homolog of Xenopus Xco2 and mouse EBF-2, and its expression during primary neurogenesis. *Mech Dev* 77, 85-90
- Bayer, T. A. and Campos-Ortega, J. A.** (1992); A transgene containing the lacZ is expressed in primary sensory neurons in zebrafish. *Development* 115, 421-426
- Beckers, J., Caron, A., Hrabe de Angelis, M., Hans, S., Campos-Ortega, J. A. and Gossler, A.** (2000); Distinct regulatory elements direct Delta1 expression in the nervous system and paraxial mesoderm of transgenic mice. *Mech Dev* 95, 23-34
- Bellefroid, E. J., Bourguignon, C., Hollemann, T., Ma, Q., Anderson, D. J., Kintner, C. and Pieler, T.** (1996); X-MyT1, a Xenopus C²H²-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell* 87, 1191-1202
- Bierkamp, C. and Campos-Ortega, J.A.** (1993); A zebrafish homologue of the Drosophila neurogenic gene Notch and its pattern of transcription during early embryogenesis. *Mech Dev* 43, 87-100
- Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemont, F. and Strähle, U.** (1997); The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development* 124, 4557-4569
- Brand, A.** (1995); GFP in Drosophila. *TIG* 11 (8), 324-325
- Brown, N. L., Kanekar, S., Vetter, M. L., Tucker, P. K., Gemza, D. L. and Glaser, T.** (1998); Math5 encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis. *Development* 125, 4821-4833
- Cabrera, C.V.** (1990); Lateral inhibition and cell fate during neurogenesis in Drosophila: the interaction between scut, Notch and Delta. *Development* 109, 733-742
- Cabrera, C.V., Martinez-Arias, A. and Bate, M.** (1987); The expression of three members of the achaete-scute gene complex correlates with neuroblast segregation in Drosophila. *Cell* 50, 425-433

- Campos-Ortega, J.A.** (1993) in: Bate, C.M. and Martinez-Arias, A.(eds.); The development of *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Press*, 1091-1129
- Carmena, A., Bate, M. and Jimenez, F.** (1995); Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 9 2373-2383
- Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C. and Giullemont, F.** (1997); Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Dev Suppl* 124, 1611-1621
- Caudy, M., Vassin, H., Brand, M., Tuma, R., Jan, L.Y. and Jan, Y. N.** (1988); daughterless, a *Drosophila* gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequence similarities to myc and the achaete-scute complex. *Cell* 55, 1061-1067
- Chien, C.T., Hsiao, C.D. Jan, L.Y. and Jan, Y.N.** (1996); Neuronal type information encoded in the basic helix-loop-helix domain of proneural genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13239-13244
- Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowitz, D. and Kintner, C.** (1995); Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature* 375, 761-766
- Church, G. M. and Gilbert, W.** (1988); Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81; 1991-1995
- Conlon, R. A.; Reaume, A. G. and Rossant, J.** (1995); Notch1 is required for the coordinated segmentation of somites. *Development* 121, 1533-1545
- Cooke, J.** (1998); A gene that resuscitates a theory-somitogenesis and a molecular oscillator. *TIG* 14, 85-88
- Corbin, V., Michelson, A. M., Abmyr, S. M., Neel, V., Alcamo, E., Maniatis, T. and Young, M. W.** (1991); A role for the *Drosophila* neurogenic genes in mesoderm differentiation. *Cell* 67, 311-323
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S.** (1996); FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38
- Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A.** (1987); Independent subpatterns of sense organs require independent genes of the achaete-scute complex in *Drosophila*. *Genes Dev* 1, 297-306
- Dang, C. V., Dolde, C., Gillison, M., L. and Kato, G. J.** (1992); Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 599-602
- de la Pompa, J.L., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J. Nakano, T., Honjo, T., Mak, T.W. and Rossant, J.** (1997); Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 124, 1139-1148
- del Barco Barrantas, I., Elia, A. J., Wünsch, K., Hrabe de Angelis, M., Mak, T. W., Rossant, J., Conlon, R. A., Gossler, A. and de la Pompa, J. L.** (1999); Interaction between Notch signalling and lunatic fringe during somite boundary formation in the mouse. *Curr Biol* 9, 470-480
- Dornseifer, P., Takke, C. and Campos-Ortega, J.A.** (1997); Overexpression of a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta perturbs differentiation of primary neurons and somite development. *Mech Dev* 63, 159-171
- Driever W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhaus, S.C.F., Malicki, J., Stemple, D.L. Stanier, D.Y.R., Zwartkruis, F. Abdelilah, S., Rangini, Z. Belak, J. and Boggs, C.** (1996); A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123, 37-46
- Dubois, L., Bally-Cuif, L., Crozatier, M., Moreau, J., Paquereau, L. and Vincent, A.** (1998); XCoE2, a transcription factor of the Col/Olf-1/EBF family involved in the specification of primary neurons in *Xenopus*. *Curr Biol* 8 (4), 199-209
- Dunwoodie, S. L., Henrique, D., Harrison, S. M. and Beddington, R. S.** (1997); Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* 124, 3065-3076

- Durbin, L., Brennan, C., Shiomi, K., Cooke, J., Barrios, A., Shanmugalingum, S., Guthrie, B., Lindberg, R. and Holder, N.** (1998); Eph signalling is required for segmentation and differentiation of the somites. *Gen Dev* 12, 3096-3109
- Durbin, L., Sordino, P., Barrios, A., Gering, M., Thisse, C., Thisse, B., Brennan, C., Green, A., Wilson, S. and Holder, N.** (2000); Anteroposterior patterning is required within segments for somite boundary formation in developing zebrafish. *Development* 127, 1703-1713
- Eyal-Giladi, H.** (1997); Establishment of the axis in chordates: facts and speculations. *Development* 124, 2285-2296
- Ferreiro, B., Kintner, C., Zimmermann, K., Anderson, D. and Harris, W. A.** (1994); XASH genes promote neurogenesis in Xenopus embryos. *Development* 120, 3649-3655
- Fisher, A. and Caudy, M.** (1998); The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *BioEssays* 20, 298-306
- Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMeur, M., Goridis, C. and Guillemot, F.** (1998); The bHLH protein Neurogenin2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 20, 483-494
- Furukawa, T., Mukherjee, S., Bao, Z. Z., Morrow, E. M. and Cepko, C. L.** (2000); rax, Hes1, and notch1 promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* 26, 383-394
- Garcia-Bellido, A.** (1979); Genetic analysis of the achaete-scute system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 91, 491-520
- Garcia-Bellido, A. and Santamaria, P.** (1978); Developmental analysis of the achaete-scute system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 88, 469-486
- Ghysen, A. and Dambly-Chaudière, C.** (1988); From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes Dev* 2, 495-501
- Ghysen, A. and Dambly-Chaudière, C.** (1989); Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends Genet* 5, 251-255
- Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C., Jan, L.Y. and Jan, Y.-N.** (1993); Cell interactions and gene interactions in peripheral neurogenesis. *Genes Dev* 7, 723-733
- Gossler, A. and Hrabe de Angelis, M.** (1998); Somitogenesis. *Curr Top Dev Biol* 4, 225-287
- Goulding, S.E., zur Large, P. and Jarman, A.P.** (2000); amos, a proneural gene for *Drosophila* olfactory sense organs that is regulated by lozenge. *Neuron* 25, 69-78
- Gradwohl, G., Fode, C. and Guillemot, F.** (1996); Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. *Dev Biol* 180, 227-241
- Guillemot, F. and Joyner, A. L.** (1993); Dynamic expression of the murine achaete-scute homologue Mash1 in the developing nervous system. *Mech Dev* 42, 171-185
- Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J. and Joyner, A. L.** (1993); Mammalian achaete-scute homolog-1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476
- Gupta, B. P. and Rodrigues, V.** (1997); Atonal is a proneural gene for a subset of olfactory sense organs in *Drosophila*. *Genes Cells* 2, 225-233
- Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D. and Lewis, J.** (1998); Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development* 125, 359-370
- Haenlin, M., Kunisch, M., Kramatschek, B. and Campos-Ortega, J. A.** (1994); Genomic regions regulating early embryonic expression of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Mech Dev* 47, 99-110

- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Jiang, Y.-J., Heisenberg, C.-P., Kelsh, R.N., Fabian, C. and Nüsslein-Volhard, C.** (1996); The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1-36
- Hans, S.** (1997); Eine Analyse des Zebrafisch deltaD Promotors. Diplomarbeit
- Hartenstein, A. Y., Rugendorff, A., Tepass, U. and Hartenstein, V.** (1992); The function of the neurogenic genes during epithelial development in the *Drosophila* embryo. *Development* 116, 1203-1220
- Hassan, B. A. and Bellen, H. J.** (2000); Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes Dev* 14, 1852-1865
- Heitzler, P. and Simpson, P.** (1991); The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083-1092
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C. and Simpson, P.** (1996); Genes of the enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* 122, 161-171
- Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J.** (1997); Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* 7, 661-670
- Hinz, U., Giebel, B. and Campos-Ortega, J.A.** (1994); The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* 76, 77-87
- Holley, S. A., Geisler, R. and Nüsslein-Volhard, C.** (2000); Control of *her1* expression during zebrafish somitogenesis by a delta-dependent oscillator and an independent wavefront activity. *Genes Dev* 14, 1678-1690
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J. and Gossler, A.** (1997); Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue *Dll1*. *Nature* 386, 717-721
- Huang, M.-L., Hsu, C.-H. and Chien, C.-T.** (2000); The proneural gene *amos* promotes multiple dendritic neuron formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Neuron* 25, 57-67
- Ishibashi, M., Ang, S.L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R. and Guillemot, F.** (1995); Targeted disruption of mammalian hairy and enhancer of split homolog-1 (*HES-1*) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis and severe neural tube defects. *Genes Dev* 9, 3136-3148
- Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1993); *atonal* is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell* 73, 1307-1321
- Jiang, Y. J., Aerne, B. L., Smithers, L., Haddon, C., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J.** (2000); Notch signalling and the synchronisation of the somite segmentation clock. *Nature* 408, 475-478
- Johnson, J. E., Birren, S. J. and Anderson, D. J.** (1990); Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346, 858-861
- Johnson, J. E., Zimmermann, K., Saito, T. and Anderson, D. J.** (1992); Induction and repression of mammalian achaete-scute homologue (*MASH*) gene expression in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Development* 114, 75-87
- Kageyama, R., Ishibashi, M., Takebayashi, K. and Tomita, K.** (1997); bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1389-1399
- Kanekar, S., Perron, M., Dorsky, R., Harris, W. A., Jan, L. Y., Jan, Y. N. and Matter, J. M.** (1997); *Xath5* participates in a network of bHLH genes in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* 19, 981-994
- Kim, C., Ueshima, E., Muraoka, O., Tanaka, H., Yeo, S., Huh, T. and Miki, N.** (1996); Zebrafish *elav/HuC* homologue as a very early marker. *Neuroscience Lett* 216, 109-112
- Kimmel, C. B.** (1989); Genetics and early development of zebrafish. *TIG* 5, 283-288

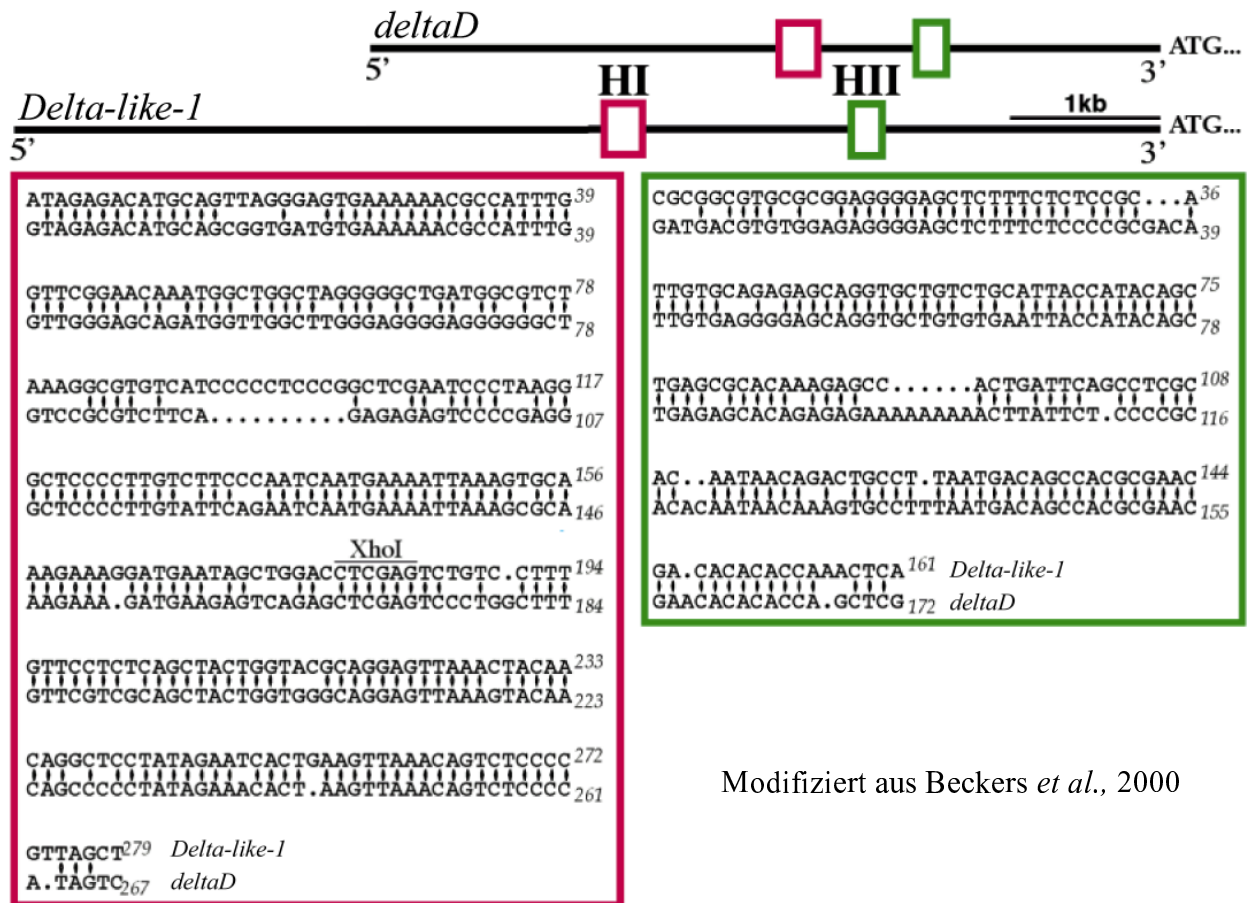
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995); Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310
- Klämbt, C., Knust, E., Tietze, K. and Campos-Ortega, J. A.** (1989); Closely related transcripts encoded by the neurogenic gene complex enhancer of split of *Drosophila melanogaster*, *EMBO* 8, 203-210
- Knust, E., Bremer, K. A., Vässin, H., Ziemer, A., Tepass, U. and Campos-Ortega, J. A.** (1987); The enhancer of split locus and neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 122, 262-273
- Knust, E., Schrons, H., Grawe, F. and Campos-Ortega, J. A.** (1992); Seven genes of the enhancer of split complex of *Drosophila melanogaster* encode helix-loop-helix proteins. *Genetics* 132, 505-518
- Korz, V., Edlund, T. and Thor, S.** (1993); Zebrafish primary neurons initiate expression of the LIM homeodomain protein *Isl-1* at the end of gastrulation. *Development* 118, 417-425
- Korz, V., Sleptsova, I., Liao, J., He, J. and Gong, Z.** (1998); Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nrd* defines distinct stages of neural differentiation. *Dev Dyn* 213, 92-104
- Koyano-Nakagawa, N., Wettstein, D. and Kintner C.** (1999); Activation of *Xenopus* genes required for lateral inhibition and neuronal differentiation during primary neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 14, 327-339
- Kunisch, M., Haenlin, M. and Campos-Ortega, J.A.** (1994); Lateral inhibition mediated by the *Drosophila* neurogenic gene *Delta* is enhanced by the proneural proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10139-10143
- Lassar, A. B., Buskin, J. N., Lockshon, D., Davis, R. L., Apone, S., Hauschka, S. D. and Weintraub, H.** (1989); MyoD, is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatin kinase enhancer. *Cell* 58, 823-831
- Lecourtois, M. and Schweissguth, F** (1995); The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signalling *Genes Dev* 9, 2598-2608
- Lee, J. E., Hollenberg, S. M., Snider, L., Turner, D. L., Lipnick, N. and Weintraub, H.** (1995); Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844
- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V. and Young, M.W.** (1993); Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev* 7, 1940-65
- Lo, I., Johnson, J. E., Wuenschell, C. W., Saito, T. and Anderson, D. J.** (1991); Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev* 5, 1524-1537
- Ma, Q., Kintner, C. and Anderson, D. J.** (1996); Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52
- Ma, Q., Sommer, L., Cserjesi, P. and Anderson, D. J.** (1997); Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing Notch ligands. *J Neurosci* 17; 3644-3652
- Martín-Bermudo, M. D., Martínez, C., Rodríguez, A. and Jiménez, F.** (1991); Disruption and the function of the lethal of scute gene product during early neurogenesis in *Drosophila*. *Development* 113, 445-454
- Müller, M., Weizäcker, E. v. and Campos-Ortega, J. A.** (1996); Expression domains of a zebrafish homologue of the *Drosophila* pair-rule gene *hairy* corresponds to primordia of alternating somites. *Genes Dev Evol* 206, 153-160
- Mullis, K. B.** (1990); The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* April 1990, 36-43

- Nakao, K., and Campos-Ortega, J. A.** (1996); Persistent expression of genes of the enhancer of split complex suppresses neural development in *Drosophila*. *Neuron* 16, 275-286
- Nüsslein-Volhard C. and Wieschaus E.** (1980); Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801
- Oellers, N., Dehio, M. and Knust, E.** (1994); bHLH proteins encoded by the enhancer of split complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes. *Mol Gen Genet* 465-473
- Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I. and Caudy, M.** (1994); Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev* 8, 2743-2755
- Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J. L. Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T. W. et al.,** (1995); Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* 121, 3291-3301
- Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. and Pourquie, O.** (1997); Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 91, 639-648
- Paplopulu, N. and Kintner, C.** (1996); A posteriorising factor, retinoic acid, reveals that anteroposterior patterning controls the timing of neuronal differentiation in *Xenopus* neuroectoderm. *Development* 122, 3409-3418
- Rebay, I., Fehon, R.G. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1993); Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* 74, 319-29
- Romani, S., Campuzano, S. and Modolell, J.** (1987); The achaete-scute complex is expressed in neurogenic regions of *Drosophila* embryos. *EMBO* 6, 2085-2092
- Romani, S., Campuzano, S., Macagno, E.R. and Modolell, J.** (1989); Expression of achaete and scute genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes Dev* 3, 997-1007
- Roztocil, T., Matter-Sadzinski, L., Alliod, C., Baallivet, M. and Vetter, M. L.** (1997); NeuroM, a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis. *Development* 124, 3263-3272
- Ruiz-Gomez, M. and Modolell, J.** (1987); Deletion analysis of the achaete-scute locus of *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 1, 1238-1246
- Ruohola, H., Bremer, K. A., Baker, D., Swedlow, J. R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1991); Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis of *Drosophila*. *Cell* 66, 433-449
- Saga, Y., Hata, N., Koseki, H. and Taketo, M. M.** (1997); Mesp2: a novel mouse gene expressed in the presegmented mesoderm and essential for segmentation initiation. *Genes Dev* 11, 1827-1839
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989); Molecular cloning. A laboratory manual; second edition; Cold Spring Harbor, New York. *Cold Spring Harbor Press*
- Scheer, N. and Campos-Ortega, J. A.** (1999); Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech Dev* 80, 153-158
- Scheer, N., Groth, A., Hans, S. and Campos-Ortega, J. A.** (2001); An instructive function for Notch in promoting gliogenesis in the zebrafish retina. *Development* 128, 1099-1107
- Schrons, H., Knust, E. and Campos-Ortega, J. A.** (1992); The enhancer of split complex and adjacent genes in the 96F region of *Drosophila melanogaster* are required for segregation of neural and epidermal progenitor cells. *Genetics* 132, 481-503
- Singson, A., Leviten, M.W., Bang, A.G., Hua, X.H. and Posakony, J.W.** (1994); Direct downstream targets of proneural activators in the imaginal disc include genes involved in lateral inhibitory signaling. *Genes Dev* 8, 2058-2071

- Skeath, J.B. and Carrol, S.B.** (1991); Regulation of achaete-scute gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev* 5, 984-995
- Sommer, L., Ma, Q. and Anderson, D. J.** (1996); neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* 8, 221-241
- Struhl, G., Fitzgerald, K. and Greenwald, I.** (1993); Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domain in vivo. *Cell* 74, 331-345
- Stuart, g. W., McMurray, J. V. and Westerfield, M.** (1988); Replication, integration and stable germline transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* 109, 577-584
- Takke, C. and Campos-Ortega, J. A.** (1999); her1, a zebrafish pair-rule like gene, acts downstream of Notch signalling to control somite development. *Development* 126, 3005-3014
- Takke, C., Dornseifer, P., v. Weizsäcker, E. and Campos-Ortega, J.A.** (1999); her4, a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *E(spl)*, is a target of Notch signalling. *Development* 126, 1811-1821
- Technau, G.M. and Campos-Ortega, J.A.** (1987); Cell autonomy of expression of neurogenic genes of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 4500-4504
- Tepass, U. and Hartenstein, V.** (1994); Neurogenic and proneural genes controll cell fate specifications in the *Drosophila* endoderm. *Development* 121, 393-405
- Tietze, K., Oellers, N. and Knust, E.** (1992); Enhancer of splitD, a dominant mutation of *Drosophila* and its use in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6152-6156
- Tsuda, H., Takebayashi, K., Nakanishi, S. and Kageyama, R.** (1998); Structure and promoter analysis of the *Math3* gene, a mouse homolog of *Drosophila* proneural gene *atonal*. Neural-specific expression by dual promotor elements. *J Biol Chem* 273, 6327-6333
- Turner D. L. and Weintraub, H.** (1994); Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* 8, 1434-1447
- Vize, P. D.** (1996); DNA sequences mediating the transcriptional response of the *Mix.2* homeobox gene to mesoderm induction. *Dev Biol* 177, 226-231
- Westerfield, M.** (1994); The zebrafish book – A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *University of Oregon Press Edition 2.1*
- Westin, J. and Lardelli, M.** (1997); Three novel Notch genes in zebrafish: implications for vertebrate Notch gene evolution and function. *Dev Genes Evol* 207, 51-63
- Wettstein, D.A., Turner, D.L. and Kintner, C.** (1997), The *Xenopus* homologue of *Drosophila* Suppressor of Hairless mediates Notch signalling during primary neurogenesis. *Development* 124, 693-702
- Wülbeck, C. and Campos-Ortega, J. A.** (1997); Two zebrafish homologues of the *Drosophila* neurogenic gene *groucho* and their pattern of transcription during early embryogenesis. *Dev Genes Evol* 207, 156-166
- Xu, T, Caron, L. A., Fehon, R. G. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1992); The involvement of the Notch locus in *Drosophila* oogenesis. *Development* 115, 913-922

6. Anhang

6.1 Konservierte Sequenzbereiche zwischen *Delta-like-1* und *deltaD*



Modifiziert aus Beckers *et al.*, 2000

6.2 Konservierte Sequenzbereiche zwischen *deltaC* und *deltaD*

GCAGGTGc-GCGCAGATTATCATAcAGCTG

deltaC

GCAGGTGCTGTGTGAATTACCATAcAGCTG

deltaD

6.3 Genomische Sequenz des *deltaC*-Locus

GGTACCGATGGATTTGCTCTTCAGTGTTTGGACTCTCAGTATTGAATATTGAACCACAGTG
AACTGAGCTAAACTGAACTGATACTGTTTCAGTTTACTATAATATTCTATGTGAAATTGCT
TTGACACAATCTACATTGTAAAAGTGCTATACAAATAAAGGTGAATTGAATTGAACTTGA
ATGTTTTACACAGCGGATGCCCTTTCAGGTGCAACTCAGAACTGAACATCCATACACACA
TAGTACGGCCAATTAAGTTCATTTATTTACCTATAGTGCATGTCCTTGGGAAACCGGAGC
ACAAAGACAAAACCCTCACCAACATGGGGAGAACATGCAAACCTCCATACAGAAATGCCA
ATTAGCCAGGATTCGAACCAGTGACTTTCTTACTGTGAGGCGACAGTGCTAACCCCTGAG
CCACCGTGTGACCATGAACAAATTCATATTTGAAAAATAGTAAGCAGTAAGTCCCTGGAT
GACCTATGGACACTTTACTATCCATGAAGCCTGACAAATGGTAATTCAAGTTTAAAACAG
CTGATCATAAGTGGGGCTAGATGGAATCTGCAGATTTTTGCAGAATTTTTTGGTAGTATC
ATAACTAAACCTTAATATGCTAAATAAAAAAAATCATATCTTTTTAACTTTTATTTAATGT
TTAGAATGCAAAATCCAATTAGATTCACTTTATTTGGTAAACAAGTCTCATATAATATATAT
ATATCTACTAAAATAAAAATATTACTTTACAAACTGCATTGTATAAATCAGATGAACATTTT
CATATTAGTCAATAATATTACTGTACTTTATTTAAAACTGAATAAATATAGATTTACACA
CGTTTACTCAAGCAAACAGAATTAATGATGGGCTAAAAATGCGGAAAAGCTGCGGAAT
TATGCGCGCGTACATTCGGTGTGGGCCTAAGAAATTTTACTTGAGGGATTCAAGCAAATA
ATCTACAGAAATAATAGTAGCTGTTTTGTGTATGTTTGGCATAGAAGGGAACAGTCATAA
AAATTAGTCAGTTCTGTGTTTTGGAGGGATAGTTTATCCAAAAATGAAAATATTGTTATTT
ATTTAATCTTCCACTTGTTCCAAACCTGTTTTGGTTTTCTTCTTCTGTTAAAGACAAAATA
TATTTGGATGAATATTGAAAAGTAGTATAGGCATTGACGAGTGACGACTATAATATAAAA
TAGAAACTCATAAAGGAGAATAGAACACTTCACAAAGACGTAGAACCAAAAGGCGTGTA
GCCTTATGGTGAGTAATTTTCATTTTAGGGTGAACCTATCCCTTGCATTACATAAAATG
TGTTCCCTTCCCTGCTAAATGATTCGCCAGGTTTCAGAGCTTAACCCTAACAGAATGTGTC
CTAAAAGTGTGAGCAAATGACATGTGGATAAATTGACACCTCAGAGCATGATGCACGTG
CAGGGAGCCTGGGAACCGGTCCGCGCCGGGCACCGCGTGTGCACTTCACACCTAGGCA
GAGGGGCACCAATTCACATTTATGGATGCGCCTTCTGCCACTGGATCACACCTCACCATA
GCTGTGCCATGTGTCATTCCACCCCATGTGCCAATCCTCCTCCTCCCTATATGAGCCC
ATTCACAGACACGCTTACCCCGCCAAAGCGACGGCTTTACACCGTTTGGATGTCGGAC
ACGTGGATGGGAAAGTGTTAAGCACTGACGCGCAAAGCAAACATGGAGCGCTTAATTT
TGTAAGCCGCAAAGCAGGCGATGAAACCATTACGTTAGTGAGTTTATTACACTTATAAA
TGTCCTGGGGGAAGAGGGGGTTCGTGTTAGTTTGATCTACCATTACCTATATTGGGGG
ACATCAGAGATGCTCCATGCGCGTCTTCGATTGAGCCAGATGGCTATTGATTTTGTGACTT
TTCCCGCTTTCCCTCATCACTCTCTTGTGCAATGAACATAATGGGCACACGACACCTA
TTTTGCTGAACATGTACCCCATGCGCGCATCAATACCAGTGGATGCGCTTCATGGGACG
GGCCAGGTCAAGAAAAAAAAAAAAAAAAACAGCAAACGTCTGCTaTTTAAAAGACACAC
ATATACATATAATTTTTTAAAATGATTGAAAGACATAGGGtGGtGCTTTTACAGAAATAA
ATTAATTCAGCCTAAACTACTTTGCTACAATGGTAATAAAGAACATTAACAACTTAAACA
CTTTTTCCATATTTTGATTTAGCTATCATTTATTTCTATTAAGTATTATGTAACCACTTAT
TTTTTTCTTAAGTGTTCCTTGCTACTATAATGTCGTTTTGAATAAGTAATTGCACGGCGTCC
TTCCATCTTTGTCATCAAAATATCTTAGTTCTTGTATGATGTTTTAATAAGGTTATTTAGTA
ATTTACTAGCACACACTCCTTAAAATAAAGGTCCCAGTAAGAACAAAAGGGGTTTCACGT
GATGCCAGAAAACTTTTGGTTGCCAACCTTTCAGTGAATAGTTCTTCAAAGATTTTTTCAT
AAATTTCAATAATTTAAAGAACCTGTGGAACATATGTGGAACCATATGTGGCAGTAAAGA
ACCTATATTTTAAAGACTTTACTTTGAGCTATGTTAAaAAAGCACCTGTTTGGTCACAC
TTTATAATAGATGGTCCGTTGAATTTGTTACATTGCATCATTAGATTAAGTAGACTGTAA
GTTGGGGTAGGGTTAGTGTAAGTGGCATGTACTTGCAGGTTTCTTATAGTCAGTATAAGT
CTGTAAAGACAGTACCAGATATTAAGCAGCAGTATTGGCCCATGAAAATAAAGTGTTACC
CCATGTTTTGCTAACCAAGTTATTTACTATACTTGCCTTTTATACAGATAATAACTCTTAAT
GCTAAAGTATGTTGTTATATCAACACTGTTAATCATGATGGTATTCAAATGAACGACATA
ATTCGTAGAGTCCCTTCATTTACTCGCCTTTTCTGTTTACACAGATAATAAGTTTTGTTA
CGTGTTACCCCTTGTTTATCAAAAGCCAAGAAACCAGACGGTCTTGATAATTGTCCGA
CAATAAATTAACAATAGCGGACCTTCTTAACCCCTAATCATATGGTGCCGTCCAGTGG

GCAAAGCGTGCCTGGGGTAAATATGGGGCCAGCGGAGGCACGCGCTGCTCTCATTAGAA
TCACAATAGAAAATCACTAAAGCACGAGCAACAGTTTGGAACGCCGCGCATTGTTAGCG
CGTGTCTCCTATGTTTATCCCTCAACATGACCCAAAACACAGCGACAGAATATTCATTTAA
TACTCTGACGTAAAAAATAAECTCGCAAAGTAATTTATTGTTTGTATTTTAATTTTATTT
ATTTTCAGCACATCTGAGTAACATTTTCAGATGCATGCAAACCTTTGATTTTCATGCATACAAGC
TACGGATTGAATAGCCTACGTTTTTTTTTAAAAATATATAGACTTTGTAAAAATGAATGCAT
CAGAGGCTAGAAAGCATGCAAGGTGTGGTGATAACGCGGTGTGTGTAATACACAAACCA
AGATTGCGAAGCGCAAACACAGTGCAGGTGCGCGCAGATTATCATAACAGCTGTATTG
AAAGCCCCCTCCAGCACACGTACACACACTCTTACTCCAGAAAGCAATTATCTGCAATC
TTAAATGTTCTATGCAACCCCCACCATTTCCGCCCTCTTACCAGAAAGACCTACAATCCAAAC
CCAAGATAACAAAAGAGCCCTCCGGATCTTTCCAGCGCACAAAAAAGCGCTTGCCGGTTT
AACGACTCACACGCGTCAGAACAATTACAGATTTTGAAGTGAATTAAGGGATGTGCC
AATCCCCTCCACCCAAAGCCCTCCGCGATCGTAGACGAATATTCTTAAGACAAAAACAA
ACTTTTAGAGAATTGCTTGGCACGCGACATTGTTAAAAATACAATGGACCGGTAGTCCAA
ATTAATTAATTTTTCACATAATACAGGGCGGAACAGTTAAAGAACCCTCATTAATAT
GTTTTTAGTTTTTTAAAGTTCAGAATATATTCCTATAATTTTCAGGAAAACAATATGTCC
AACAAATTGTGATTTGGCTTTTGTAAATAATTTATAAACCAGCACGAGATAATTTGATATCT
GGTTGTGGTTAGCGTGGGTTTCCAAAAGTTTTTAGGCTTACAAATTGTTTCAGCGTTCAT
GTAATATCAGTTTTACTATAAAATGAACGTAAAGCGTCATGACGTATAGTTGCTCATCAA
ATAAATTAATGAAAGAACATTTATGACTTCATTTGCATTGGCCACGCCTCTACCGGTGCG
TACAAAAGCCAAGCGCAGCCTTCACTCCATAAGAAATGTAAGTGAAGGGTCCAAAGTCC
CCTGGAGCTAGAAATCTGTTTTTATTTGCTTTGTAGGCTCCAAACACATGCGACATTGAGA
TACTTTTTTTATAAGAAATGTTTCAATTCGTTAACTTTTTAACTTTACGCATTTTTACAATA
CTTTTTTCCTTTAAACGGGATAATACTCAAACATTCATATCGGACTACTCTCACAGTCTGC
TATCGTTCAGTAGCAGACAAGAAGGTCTAGATTTAAGAAGGAGATATACATATG

6.4 Genomische Sequenz des *deltaD*-Locus

TCTAGAAGACTTCATTTATTTAATCAAAAACAATTGTGAATACAAAGTTGAAAGATAGAT
AGACATTCAGACAGACAGACAGACAGACAACCAGACAACCAGCCAGCCAGCCAGACAG
ACAGACAGAAGGAGACAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAG
ATAGATAGATACCATCTACGCCTAGAGTACTTTACTAGTCTGTCTTTGGAAACGTTATATA
TATAAAAAAGTATATAAAAAAGCACTATAGAAATGTTATATGTATATATATATATATAT
ATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAACATTGAACATT
TAACATTGACCTTTTTTCGTTAATATTTTTCTGGGGTAATATATTTTACTACACAACATACT
TTAATGAATACAAAGTGCAAATAATAAAACACGTGTATGTAATATTTTTCTGAACCTTT
GACCATTTGTGCAAAAAAATTCAAGAAGTCTTCATTACAGAGGGTAACGTTAATTTAC
TATAATGTCAAATCATAACTGTTTTTTACCTAAAGCACTACAGAAATGTTAAGTTCCCTCT
GTACATTTTAGTTATTTTATTAGTAAGCAACATTTAATTACCAACNCAAGCAGCTCGTGT
ATTTAACACGGCGTATGACATGTTTATATTTTCATATATCATATTTGAAGTCTGGCTTATG
TTTTAAAACATTCATTAATATATCCTCATAACAACGACCTTCTTATGTACCTAAATTTCA
GAAAACGAAGAAAATGAATATATTGTTTGTCTGTTTCTCACTTCTTAGAACATTATTCTTA
CTCCTTTATACTGTGATCAGATGAGAGTGAATGCTGACTAGTGCGCCGCTGCTATAGTAC
GGACATGGACAACTGCTGTCCTTTATCACTTATTATGTCACTGATAATCCCTCCGTGGTG
CTAAAAACAAAAACTGACTCACAGTTTGTGTTGCAGGAATAACCTGACTAGAATACTA
CAGGTAATTGGCGTGAGATGCTCTCATGCTGAAAGCTGCATGTCTAACTGAAATACCGCT
GGTGTTTACAATGTTGCGTTTACTTCCGTGTTCCGGCGCGTCGTTCTCATCAGCAGCCAATC
AGCATTTCTAGCATAATAATTGTAAATATGGCGACTTGGTGACGCAGTGGGCAAGAAGGT
CGCTGGTTCGAGCCCCGACTGAGTCAGTAGGTATTTCTGTTTGATCCGGGTGCTCCGGTTT
CCCCACAGCCCAGACATGCGCTGTAGGTGAAGTGAATAAGCTAAGCTGGCCATAGT
GTATGTTTGGGTGTGAATGCAAGAGTGTGTGGGTGTTTCCAGTGTGGGTTGTGGCTGG
AAGGGCATCCGCAGATTGCAATAAAAAGTCCCCTAGATTAATCAGTTGACTTTTATTATTT
TTAAATCCATTCAACTGATTTCTGGGTCTGGATGAGCTGAATTTTAGCTTAGCTTAGCATA
AATCATTGAATTGGATTAGACCATTAGCATCACGATCAATAATAATAATAATAATAA

TAATAATAATTTTGATAGTTTTTCTAATTAAGCTGAATTGTTCTATGATTACAAATACTA
AGACCAACGGAAAACGAAAAGTTGCTAAATGTTTATCATTTTTGACAAGATAAAGAGATTGT
AAAATGCATGCAATTTTTTTAGTTAACACTGTCCTGAATAATTTCCAGAGATGGGGGCA
TCCGCTGTGTA AACATATGCTGGATAAGTTGGCGGTTCAATCCGCTGTGGCGACCCCTG
ATGAATAAATAGACTAAGCCGAAAAAAAAACGAATGATTGAATGATAATTGCAAATATG
AAAGCTAAAAATAGATTAGAAATATTTTTATGCCTCACCAAATACTTTGTCAGTGATAAAT
TTGACAGAAAATATTTTTGTTTTAGATAAGAAAAAAAAATTAATAGGCTACATAAATTGTAGT
CTTTTAGATAAAAAGCCAAATTAATGGTAAATAAGATAAATTTAAAATTCATTAATTAAA
TAATGATGATGTTTTTTATGTTGTGATTTATGATTATATGAATAAATTGTAGCATACTATCTT
ATAAGACAGTGATTAGCATAATTGAGTACAGCACATTTTGCAAATGTTTTTATTAATTTAT
CAGTGAATATAGGCAAAGTATTTTGATGCCGTTGAACAAAACAGATTTATTGAATAGAT
ATAATTATTACATTAATTTTTATTACCAAATATTTTTAGAAATAAATAATACCGTT
TTAATTCAAGCAAATACTAGAAAACAAAATTACAACCTACAAAATTTCCACTAAATTTT
TAATTATTTTTTTCTTGAATTTTACTCTTTTCcAAATTTTTGTTAAATATTTTTCCCTAACAT
ATAAATTTGGATGTGCTAATTTTGGAAATGTTATTCATTAGGGTTATTTTGAACCAGGATTA
GGCTCCCGGATTTGGGCTTCCAGGTAATAATTCTAATGTATATGGCACCAAATATAATATT
GTTAAGCTTCCTACAGAAAATATTAATTTAAAATTACAGGTTTGTAAAAAGGGGTGTAAC
TCATACACTCAACTAATTTAATAATGAGCTGAAACAACACAATTCTTCAGATTTTATT
GAGACAACCTATTTTTTTATGTTCAATTCACACAAATTTGTTAAAAGGGTTAAATTAACCT
AATCACTTTGTGTTGGGACAACACTGTACTGTGTATATGCTGAGCACTGTATCTCTCCTTT
AGGTTTTCTATATGCTATAATTTCCAAAAGAGAAATTATACAAACAAAATGTCAGGGAGT
GGGTTACGAATGGACATCATATATAATTAATAATATGGATAAAAATAATATTTGAGCACTA
ATTTTATCTAGTTTACCCACTTATGAGTTTACACAGGGAAGGGCCCCCTGCCTAACACAG
GCGGCATAAATTGGCGATTCTTCCGCTGTGGCGACCCAGATTA AAAAAGGTACTAAGCT
GAAAAGAAAATAAATGAATGAATAAATGAATGACTGAACGAATGACTGGATGAATGAAT
GATTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATTA
TCTCTTTTAGTTTCGACAATCCTGATTAAAGTCAGCCCCATAGTTTCACAAACTGTAGCCTA
AATAAACCAAACCTCCAGTAACAATATGTCTCAATGTATCTCTACATGTATGCTATCAATC
ATACGTGCATAACAGAAATAACAGATGTGCGGACACATTTGGCAGACGCAGGAATTCCG
CGTCTCCAGCATCAACACACGGGCCGGTGAACCTATTGATTTTTCTTCCCTTGTGGACCAA
GTTTCTCACATAAACAAAACCGCCCCAGGGGAAAGGGGCAGATGTTCCCTAAAGGACGA
TGGCACGCGACAGTCTCAAGCCTGTGAAAATCCACCCCTCCTGCTCGCACGCACGCAC
GCGCGCTCCAAACGCACGAGCTTCCCTTACCTATACTGCATATTAGTTTGATCAAAGTTC
TTTGTGAGTAACTTTTCAAAGCGGATGCAACTCTGCGTTCTTGTCTCTGCTCACTTGTGTT
GCTTTTTTTTCATAATGAAGTGCGCCAACCCGAAGCCACGCGACACGTCTTTGTTATTTT
AATCAGCTGCTGCGTCATGATTTGGGAACCTACTGTTACTTtGGTATATTGTCCTCTTCcTG
GACAcAcAAATGACCTTAAAGCGCATTCaACATGCATGAAGCACTTTCATCGCCAGCGcGT
TTCTGTTGCACGTGCAGAGGCATTGCGCGCGTTCTGGGTCTTCTTTTCAGTTTGCCTCT
ACTTAATTTGGCGGATTTTTCGACACTCTCCACCACGAGCCGTTAGTGCGGTCTGTTGC
GTTCCACGGCCACTTACTGCAGCTTCCCTAACCATATGGCCGGTCAGCGGCGTTCTTTTG
CATGCTTTCCAGCCTCATTGGAGGAAGCCTGCGTGCCTCGCGCTACCCAGAGAGGCTG
TAGAGACATGCAGCGGTGATGTGAAAAACGCCATTTGGTTGGGAGCAGATGGTTGGCTT
GGGAGGGGAGGGGGGCTGTCCGCGTCTTTCAGAGAGAGTCCCCGAGGGCTCCCTTGTATT
CAGAATCAATGAAAATTAAGCGCAAAGAAAGATGAAGAGTCAGAGCTCGAGTCCCtGG
CTTTGTTTCGTCGACGCTACTGGTGGGCAGGAGTTAAAGTACAACAGCCCCCTATAGAAAC
ACTAAGTTAAACAGTCTCCCCATAGTCCACCTTCAGAAAAAGAGGAGGAATGCGAGAAA
GGAGCTTTTGCTTGATTTAAaCCAGGACAGTtCGCGTGGCcATAAATTATgGCGCGCAAAG
AAaACGCGAAGTGGGCATAAATCTTAAGGTTTTTATTGACGCTTTGCTGGGCTAATCGGG
AAATGTGTGCAACGTCAGGCCGAAAGAATTGTGGGCGAAAGTGTGATGATAGCTGTGTG
GCGCTTATTTATGGCCTGCGTTTCAAATACTAACTCTTGAATGTGATGCAATGACACCTGT
CGGTCGCATGACGCTTTCGATAAAAATAATAATACCAATGAACAACTAAAATACGCGAT
CTCTTTCAGAAAATATTCTGAATAGAGTGCTAAAAGTCTTTCAGTTTAAACAGTGTCAACGA
TATTGTGCGATTCTCTGGACCGAGCGCTTTAATTAACGCGCTAATGAAGACCACCCTCGC
GCGCGCACACAAACAAACGCTCACGAGACCAGAGCTCGACTCATTTGACAATATGAACG
ATTA AAAAGAAAACCTCCTCGTCAATCAAACGCGAAATAATTGATAAAAACACCAAACA
ACAGAAGCTGCTAGGTACTTTTGTGAGGGATGACGTGTGGAGAGGGGAGCTCTTTCTCC

CGCGACATTGTGAGGGGAGCAGGTGCTGTGTGAATTACCATACAGCTGAGAGCACAGAG
AGAAAAAAAAACTTATTCTCCCCGCACACAATAACAAAGTGCCTTTAATGACAGCCACGC
GAACGAACACACACCAGCTCGATGTTACTATCCAGTTTTAGAGATGAAAACTTTCAAAA
CTTAATAGTTCGTCCAAAACCTCTGAAAATGCATTGTTTGTAAAAATAAATAATTCCA
GAATTAGGCTCGTGTTTTAGTTTACCCCGAACTATGTTGAAGGTCTAGCAATGTTTTGGTT
CTTTAATGGTATTTGTTTATTATTATAACAACATTTTATTCTCCTGATTTTCGAATTTTCCTTT
TAGCAAAAAGTTTCTCTGTTCAACAAAATTCCGATCACTAAAAGAATCTAAAATGTATTGC
ATTGAAAAGTTTTTCAAAAATTGTTTAGTTGTTTCGTATTATTTTAAAAACAAACTCTGGTT
TATGTGTAAATGTTTGATTAATCAACAATAACTATGCTATTACTATGAAATATTATTTGTT
ATTACATGATGTGCATCCTATTGTGTAATTAATATCACATTTTACTGTAGGCTACTAGCCT
TTTTATTAGTTTAAAGCTGATTTATAAATAGTTTGGAAATGACAAACTTAAGCAACAATATT
TTATCAAACCTATGCTAAAAGAAAAAAACTTTTACTTAATCAAACCTGCATTGAACAGCT
TTGAATCTCCTCAATCCCTGCTTCACTGTTGTCCCGTTATCAGGAATGCGACATTCCTGCA
ATGTGTGATGTAATTTGTGGTTTTATGTCAGAGTGGGATGTACAGGATTCTCAAGGTTGCT
TATTTTCTCTGATGTAATTAGATTTTTTTTTTCTTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCCACT
CTCTCCCAGTGGCAAGGAGTTGCACATTTTACAGCTCATTGCGGATTTTTTTTTTTCTTGG
GGGTTGGGGGTGGTGTAGATTGAAAAGTGTCCCTTGTGACAAGCAGAGCCAGATTCCA
GATTCCCCGTAGCTCATTGCATCTCATTACCCTAGCAGCGCTGCCTGTATATAACCGGCT
GCAGGAGGACTTGGACATTAACACGCACAATCCAGTCAGTCTCTCACATGGAAACAAG
AGTACGGGATGAAAGTTTGGATCAGTAGTTTGGATCATCTCCACATGAACTTTTGAACG
GAAAATAAGCGCATAAATAACCCTGTGCTTGGGGCTTTGTAATTTTTTCCGGCTTCTAAA
CTACCCGAAAGTGGACTGCTAACTTTTTTGAACAATTGGAGTACTCGACTTGTGAGGGAT
TTCCAATCGTCTCCCTTTTGCGCATCGGGGTTTCTCCTTCTACATTCGTATTTGGGATTT
AATTGCTGATTTATTTTCCAAGGGGGGACTTTGATGGGCTTGCATGAGCAGATAAACTGA
ACACAACAGAGCATCAACCCGAGCTGCCTCCACTGAGCGGAGAACGACGAGTCTCAAT
GATTTATTGAGACACGGTCTCACACAATTGCCTGGCCCGTGGAAGTTTCAACAACAGTTCA
GATCCTCTCCGCCATGGGACGACTAATGATAGCTGTTTTGCTTTGTGTCATGATAAGCCAG
GTAATTAAGCCAGCATCTGATTTCTTTGCAATGATCTCACTTCAGATGTCTGCCTTATG
ATGGTAACTTTTCGTGAATTAAGTGTGTGCGTTTTATTTCTCAGGGGTTTGTTCAGGGG
TTTTTGAGCTAAAGTTGCAGGAGTTTCTGAACAAGAAAGGAGTGACAGGCAACGCAAAC
TGCTGCAAGGGATCCGCGGCAGAGGGTCATCAGTGTGAATGCAAACTTTTTTTAGGATT
TGCCTGAAACATTACCAAGCCAACGTATCTCCAGATCCTCCGTGCACCTACGGTGGCGCA
GTTACCCCGGTGCTCGGATCAAACCTTCCAAGTTCCCGATAGCTTCCCTGACAGCTCGT
TCACCAACCCATTCTTTTCGCGTTTTGGGTTTACATGGCCAGTGAGTACCGTTATTTATTT
AATTATTTTAGACATTATATTGTATGTAGATAATTGTATACATTTAGACGAGGGTTAAGC
ATATAAAAGCTACAATAATGACTCATAAGGAGTCAGGATGTGGGTATTTAGTCGCTTTAG
CGGTGTTACTGGGGTGGGAAAAGTCACATCCCCTGGGTTGGAACATAATTGTCGGCTCAG
TGTGAAATTCCGAAACCTTTCATTTTACTGCAAGAAGTAAGTGTGAAATGGGAGAAATGA
AGCTTGAATCCCAGTGCATCACACCTCAAGCCATTCACATCTTCCGTTATATGTAAAAC
AGCATGGGAGTGTGGAGGAATGCAGTTTTAAATCTATCGATTCGGTTTTTCAAAAACATCT
TGTGTGTGTTTGTGTTCCAGGGAACATTTTCGCTGATTATTGAAGCgCTGCACACCG
ACTCCACTGATGACCTGTCTACAGGTAACGTTAAATGGGAGTGCAATTCAGACCGGCTTA
TTCCTTATTCTTATGATGCAGTGATGTAACCTAACGTCAAACCGTTCACAGAAAACCCAG
ACCGTCTGATCAGTCGCATGACCACCCAGAGGCATCTAACAGTAGGCGAGGAATGGTCCC
AAGATCTACAGTTGGTGGGAGGACAGAGCTGAAGTACTCATAACAGATTCGTTTGTGATG
AGCATTACTACGGCGAGGGCTGCTCGGTCTTCTGCCGTCCGCGCGATGATACTTTCCGGCC
ACTTCACCTGCGGAGAGCGCGGAGAAATTATCTGCAACTCCGGATGGAAAGGACAGTAC
TGCACAGAACGTAAGTGTGAATTATATACATCACCTGTATTTTGTGTGTAAGTGTGAGCG
TGTTTTGGCATTTCGCGAGAAAAACAACAACAACCTTCGTCCTATGGTTGCAACAGGCG
TTTTGTGTGATTCAAATGAGGGACGTTGGCCAAATAATGGCACGCGTGCCATAGATTAAT
GTAACGCCTGATTGGTTACTTGGCAGTGCCTCGGCGCTGATTGGCTCAGAGCGGTGAGG
TATTGTTGGAAGGGGGCAGCTGCAGAGTGAAGGTTAGACAATAGAGCAGCTGTCTTGA
CTTGGCACCATGACACCAGCTGTCCACCCCTTATTTGCGGGACNTNTGGGACGTTATGG
GGAGGGGGTTGNATGAACAGAGTGAAAAAGGGGACTTCTGACCCACAGTTAGAGGAAAA
AAGGGGCTTTTGTGGGAAGCTTTTGTATGAGTGCAACTGTGTTAACCAGAGTGTCTTCC
CCAATAGTAGTGAGGAGAACATTTTACTTATTTTTGCTTGTGCTGCCACAATGTACAAGAG

AGCAGCTTGTTTAATACTGTGGCGGAATAATAATTGAGTCTGTCCGAAAAAACTGGTGA
CAATAAAATCATATTTCTCTTTACAGCAATCTGTCTTCCGGGGTGTGATGAAGACCATGGC
TTTTGCGACAAACCCGGTGAATGCAAGTAAGTGATGGAGATTTTAAACGCTCTTAAGAGG
ATAGATCACCACACAATTACACTTTTCTACCATTTTATCACCTTAAGTGGTTCATAACC
TTTATGAGTTTCTTTTTCTGTTGAACACAAATATACATATATATTTATAGAAATGATCTG
TAACTCTGGATATATACATACAGTTGAAGTCAGAATTATTAGCCGCCCTGAATTATTA
GCCTCCCTGTTTACTTTTCAACCCAATTTCTGTTTAAACAGAGGGAAGATTTCTTTAGCACA
TTTCTAAACATAATAGTTTTGATAACTGATTTCTTTTTATGTTTGCCATGATGACAGTAAAT
ACAATTTTTCTAGATATTTTTCAAGACACTTCTATACAGCTTAAAGTGACTTTCAAAGGC
TTAACTAGGTTAATTAGGTTAGCTAGGCAGGTTAGAGTAATTAGGAAAGTTATTGTATAA
CAATGGTTTGTCTGTAGACTATTAATAAAATAGCGTAAAGGAGCTAATGATTTTGACCTT
AAAATGGATTTAAAAAAATTTAAAACCTGCTTTTATTCTAGCGGAAATAAAACAATAAG
ACTTCTCCAGAAGAAAAAATTTTTAGACATACTGTGAAAATTTGTTGCTAAACATA
ACTTCGGAATATTTAAAAGAGAAAAAATATATATAAAGGGGGGTTAATAATTATATATA
CATTATGAAAAATCATAAAAAAAATAAAAATCAAAATATCTTTAGTTTTCCAGTACTT
GGTTGTGGCTGGTATTGGGTTTATGCATCCACTGTGTAACACATATGTTTCGAATAGTTGGC
AGTACATTCTGCAGTGGCGACCTCTGATAAATAGGTGATTTAGCCGAAGGAAAATGAATG
AATCTTCTTAGTGTTGTTGAATAGCAAAGGTTTGTGGCAAGTGAACAATAAGAAAATGA
TGACAGAATTTCTGTTTCCAGTAACTATNCCTCTAACAAAATGTTTCAACTTTCTTCAC
TTTGAAAGTTACTTACGGGTCCTCTCTGATGTTTTAGATGCAGAGTAGGATTTAGTGGA
AGTACTGTGACGACTGCATTCGCTACCCAGGCTGCTTGCATGGCACCTGCCAACAGCCCT
GGCAATGCAACTGCCAAGAGGGTTGGGGAGGTCTCTTCTGTAACCAAGGTGAGCGTCGTA
AACCGAGCAGTTGATCAAGTTGTTGGTTCAAAGGTGCCATTGACTCTAGCTGACTAAAC
TACATGTTTTATTTGTTTGCAGATCTCAATTACTGCACACATCACAAGCCGTGCCAGAAT
GGAGCCACTTGCACCAACACAGGCCAGGGAAGCTACACCTGCTCATGCAGACCTGGCTTC
ACCGGGGACAGCTGTGAGATTGAGGTCAACGAATGCTCCGGCAGCCCGTGCAGAAATGG
AGGAAGTTGCACTGTAAGTTTTGTTCTGTTTTATAAATATGATAAGCAATTTAGGTGTCG
TATGAGTTGACTTTATTATTAATGTCTAACTCGCTCGTTTATTGGATTTGGCAGGATCTT
GAAAACACCTACAGCTGCACCTGTCCTCCTGGTTTCTACGGAAGAACTGCGAGCTGAGT
GCCATGACTTGTGCCGACGGCCCTGCTTCAATGGTGGACACTGTGCTGACAACCCAGAG
GGAGGATATTTCTGCCAGTGCCCGATGGGTTATGCTGGATTCAACTGTGAGAAGAAGATC
GATCACTGCAGCTCCAACCTTGCTCGAATGGTACATTGAATGCTTCTTTGTACATTGAT
AGTTTACCCAAAAAATGAACTTCTACAATCATTTACTCAATTTTTTTGGTTGTTGGTGG
TCTGTTGAAGTATTTGGTTGtCCTACTAGGGATGTCAGgGGGtTTTCAACATCCTTCAGAAT
ATCAACAGAACAACCTCAAACCTTTGTGGTTTCATTTTTGGGGGAACCTATCTTTAATG
CCTGAAATGCAGATGAGAGTGTGTTTAAACCAATCATCTCATGTCTTCTGTCTTTCTTCAT
CCGAGATGcTCAGTGTCTCGATCTTGTGGACTCCTATCTTTGCCAGTGTCTGAGGGATT
CACAGGAACGCACTGCGAAGACAACATCGACGAGTGTGCCACCTATCCCTGCCAGAATG
GCGGCACTTGCCAAGACGGACTCAGCGACTACACcTGCACCTGCCCCGCCaGGATACCCG
GCAAGAAGTGCACCTCTGCGGTCAACAAGTGCCTCCACAACCCTTGCCACAACGGTGCCA
CTTGTTCATGAAATGGACaaTCGATATGTGTGCGCTTGCATCCAGGTTATGGAGGACGCAA
CTGTGAGTTCTTACTCCCTGAAAACCCACAAGGACAAGCCATCGTTGAGGGAGCCGACAA
GAGATACTCTTACGAAGAAGACGACGGTGGTTTTCCATGGACGGCGGTTTGCCTGGGAT
TATTTTAGTGCTTTTAGTGCTGATCGGCGGCTCgTCTTTGTTCATTTACaTCCGTCTCAAGC
TGCAGCAGAGGAGCCAGCAAATCGATAGCCATAGTGAAATCGAGACCATGAACAACCTG
ACCAACAACCGCAGCCGAGAGAAGGACTTGTCCGTAAGCATCATCGGAGCCACGCAaGT
GAAAAACATCAACAAGAAAGTGGACTTTcAGAGCGACGGCGACAAAAACGGATTCAAAT
CGCGATACTCGCTAGTGGATTACAATCTTGTTCATGAGCTGAAGCAGGAGGACTTGGGGA
AAGAGGATTCTGAGAGGAGCGAAGCCACAAAATGCGAGCCTCTCGATTCCGACTCAGAG
GAGAAGCACAGAAATCATTTAAAAGGTAAATGAGTGTGAATTTTGGCTAGCGCAGATC
CATTTGTGATGTAAGCAGTACTAAAGTTGCCTCTTTTCGTTTTAGTACTCCTCAGAGA
GGAAACGAACAGAATCTTTGTGCAAGGACACAAAGTACCAGTCAAGTCTTTGTTTTATCAG
AGGAGAAAGATGAATGTATTATTGCAACCGAGGTAAGTCCAAAACCTTTCTTTTACTTG
TAACCATGAAATGTGGCAAATTTAGATATCTGAATGCTAAACTAACGTTTTGTTTCTCGT
TTCAGGTGTAACGCCACAACAGAGCTGTAGCTCATCTTGTtCTACAGGAGGTTTTACTCCA
GTAATGCTGCTCAAACAGAGGGAAGGTTCCCTTCACGTGACTGCTGCTGTGAAACTAAT

GTTGAAGGTATATTCAGAATGAGCTGGTTCTCAACTGAAGTAAACACAGTGACTGCAGGA
ATGGACGTTGGGCCATACTGGCTCGGACTCTCAAAGTTTGTTCAGGAACGTGCCAAA
TGGACTTGCTTGCACTTCCTGTAGGGACGTTTTTTTTTTTACCTCATTGCACTATGATGGGT
TGTATTTTTATTGTATTTAACACACAATTGAATCGAATACTGTGTATGCATATGCACTGAC
TGCAGTGTGCATCTGGAAGTTCTCGGATCATTGGATCGCGAGAGGAAGAACACTGCCATC
AATGATGTTTGTAACTGATTCGTTGTTTTATTTCCGGAAAGCTTGTGTTTTCTTTATTTAAA
TGTATTTGTGATCGACGTGTTTGTGGTTTACTTTGTGTGTGTGTGTGTGAAGTTTGATA
TAATTTAAAATCTTTTTTTTCATTTTCGCAGATATGTCTATTGTAAATAAGGCACTTCGGGTC
GACGTGACTGTTCTCTGTAAATGTATTTAAACGTGCTGGTAAAACCTTACAGGAGTTGTTTT
TATGACTGTTGTCCAATGAAAAAAAATCACCTTAATATTTTTCCAAATAAATCCTGTATG
AACTTCATGAAACTGGTCAGTTAATTAATGCTTTGAGTTCATTAATGTCTGACAAATGTA
TTGTTTTTTTTCTTTCTTGCTCACAAAGTGAGACAAAGACACGCCCGGTAATCACAAATTAC
AGCCTTGATCTTGATGGCGGGATATTTTTGGGATGCAAGAGGGACAAAAACATCAAACC
ACTTTTTTTTTTTTTTTTTGCAAATGGTTTGCTTGAAGTTGCTGTTTTGGTGGAACATTTTGT
GTCAAAGCTGTAGCCAAGCTCATTACGTGACATATATAAATAGAGAGCGAATGTAGAAC
AGGAACACTCCCTAACACTCATTCAATTTTTCTTCAGCTTAGTGTCTATTTTCAGAGG
TCGCCACAGCGGAATGACCCACCCAACTAGTCCAGCATATGTTAATGCAGTGGATGCA
CTTCTTAGCTGCAACCCAATATTGGGAAACACTTCATTCACACGGCACTCATTATACACT
ACTGCCAATTTAGCTCATCCAATTCACCTACAGCACATGTCTTTGGACTGTGGAGGAAAC
CCACGCCAACACAGGGAGAACATGCGAACTCCACACTCCATCTTAATATAAAAATAAAA
GAACAGAGCTTTCTTTTTTTAGCAATTTAATATATTTAAGGGAGTTAAATGACTATTTATC
CATTTTTTCGGTACATATAATGAATACAAAGTTTAATAACTTGTCTTATACAGAAAGTA
CTGAATCTGTGTCTGATATTTCTTTAAACCAACAACCTCTAAGCTCTGTAGGACTTGTGCA
GTCTTTGGTTGTGGGTTTACAGGGAGGATACAGTGTAAGTATTCAGTGGTATTACCCAAC
GTTGGACAGTTGCTTTCACATACCACGCTAAGCTTTTAACTTAACTTTTTTTCACGCGCACA
ATGGGATTTTCGCTGAGTTGGAAAATATCAGGAGACAGGCCTAAAGCAATTCTTTTGTTC
TTCATTACAGCGTAGGCCTGACGCACTGCTCAGTAGCCTGCGGCAAATATCTTCTATTAGAT
CCT

7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche *cis*-regulatorische Regionen des *deltaD* Promotors identifiziert und Teile davon analysiert. Durch die Verwendung stabil transformierter Zebrafische war es möglich mesodermale und neurale regulatorische Elemente aufzuschlüsseln und zu trennen. Alle im Laufe der Embryonalentwicklung aktiven Elemente sind in 12.5kb des *deltaD* Locus zu finden, aufgeteilt in 6kb der stromaufwärts- und 6.5kb der stromabwärtsliegenden Region (5'- bzw. 3'-Region). Zwei äußere, distal liegenden Bereiche dieser 5'- bzw. 3'-Region wirken dabei als quantitative Verstärker der Transkription. Die 12.5kb in einem Konstrukt sind ausreichend, die biologische Aktivität von *deltaD* im *deltaD* mutanten Hintergrund *after eight* wiederherzustellen. Die mesodermalen und neuronalen regulatorischen Elemente sind sowohl über die 5'- als auch die 3'-Region verteilt. Zwei stromaufwärtsliegende Regionen mit mesodermalen regulatorischen Elementen sind ausreichend für eine Expression im paraxialen bzw. somitischen Mesoderm. Eine dritte Region für die Expression in Schwanzknospe, paraxialen und somitischen Mesoderm ist im stromabwärtsliegenden Bereich lokalisiert. Ebenfalls in diesem Bereich sind neurale regulatorische Elemente, die eine Expression in neuronalen Vorläuferzellen steuern. Eine weitere Region mit neuronalen Elementen befindet sich in der 5'-Region zwischen den beiden Regionen mit den mesodermalen Elementen. Innerhalb der 5'-Region mit den neuronalen Elementen lassen sich zwei Sequenzabschnitte identifizieren, Homologie I (HI) und Homologie II (HII), die zwischen dem Maus *Delta-like-1* und dem Zebrafisch *deltaD* Promotor hochgradig konserviert sind. HI bzw. HII sind für verschiedene neurale Expressionsdomänen notwendig und zeigen in ihren durch sie vermittelten neuronalen Expressionsmustern grosse Ähnlichkeiten mit den Expressionsmustern der proneuralen Genen *neurogenin1* bzw. *zash1a / zash1b*. Mit Hilfe von CAT-Assays konnte gezeigt werden, dass HI bzw. HII sensitive Elemente (E-Boxen) für die Genprodukte von *neurogenin1* bzw. *zash1a / zash1b* enthalten. Mutation bestimmter E-Boxen in HI bzw. HII führt zum Verlust der durch *neurogenin1* bzw. *zash1a / zash1b* vermittelten *deltaD* Promotoraktivität.

8. Abstract

Characterisation of the zebrafish *deltaD* promoter

The zebrafish transmembrane molecule *deltaD* is involved in a wide range of processes during development, as lateral inhibition during primary neurogenesis and somite development. To investigate the temporal and spatial regulation of *deltaD* expression I searched for *cis*-regulatory regions in the *deltaD* promoter able to drive reporter gene expression in a tissue specific manner in transgenic zebrafish. Using constructs containing genomic sequences flanking the coding region of *deltaD* and the green fluorescent protein (GFP) reporter gene, I identified distinct regulatory domains required for mesodermal and neural expression. A minigene comprising the genomic DNA analysed with the reporter gene and the *deltaD* coding sequences was able to rescue the abnormal phenotype of a *deltaD* loss of function mutation *after eight* (Holley *et al.*, 2000). My analysis showed that two modules upstream and one module downstream the transcription start site are sufficient to direct reporter gene expression in subdomains of the mesodermal expression pattern of *deltaD*. Expression in the neural tube depends on two regions upstream the transcription start site that are highly conserved between zebrafish *deltaD* and mouse *Delta1*. CAT-assays revealed that these regions contain sensitive sites for the products of the neural determination genes *neurogenin1* (*ngn1*) and *zash1a / zash1b*, respectively. Mutagenesis showed that distinct E-box motifs within the conserved regions are essential for *deltaD* promoter activity. A third neural regulatory element acting downstream of the neural determination genes is located downstream of the transcription start site.

9. Lebenslauf

Name:	Stefan Matthias Hans
Geburtsdatum/-ort:	23. Oktober 1970 in Schaffhausen/Saar
Schulbildung:	
1977-1981	Gemeinschaftsgrundschule Köln-Poll
1981-1990	Städtisches Gymnasium Thusneldastr. in Köln-Deutz Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife
Wehrdienst:	
1990–1992	Sanitätsbataillon 6 Gegenwärtiger Dienstgrad: Leutnant der Reserve
Studium:	
1992-1994	Grundstudium der Biologie an der Universität zu Köln
1994	Vordiplom
1994-1996	Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln
1996	Diplomprüfung in den Fächern: Entwicklungsbiologie (Hauptfach), Biochemie und Genetik
1996-1997	Diplomarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln mit dem Titel: „Eine Analyse des Zebrafisch <i>deltaD</i> Promotors“
Promotion:	
1997-2001	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
Berufliche Tätigkeit:	
1996-1997	Studentische Hilfskraft am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
1997-1998	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
seit 1998	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
Köln, Mai 2001	

10. Erklärung

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 Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega betreut worden.

Teilpublikationen:

Beckers, J., Caron, A., Hrabe de Angelis, M., Hans, S., Campos-Ortega, J.A. and Gossler, A., (2000). Distinct regulatory elements direct Delta1 expression in the nervous system and paraxial mesoderm of transgenic mice. *Mech Dev* 95, 23-34.

Scheer, N., Groth, A., Hans, S. and Campos-Ortega, J.A. (2001). An instructive function for Notch in promoting gliogenesis in the zebrafish retina. *Development* 128, 1099-1107.

