

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Anne Glaser
aus Meiningen

Tag der mündlichen Prüfung:

Analyse der Redundanz von SHOX und SHOX2 und Identifizierung von Shox2-Zielgenen

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Herbert Steinbeisser
Institut für Humangenetik, Sektion Entwicklungsgenetik

Prof. Dr. rer. nat. Gudrun Rappold
Institut für Humangenetik, Abteilung Molekulare Humangenetik

Meiner Familie

“Die Welt ist für uns stets eine Antwort,
die von der Frage abhängt, die wir an sie stellen”

Stanisław Brzozowski

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den 9. August 2011

Anne Glaser

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Publikationen angefertigt:

Glaser A, Puskaric S, Arora R, Li L, Gretz N, Schneider KU, Papaioannou VE und Rappold G (2011). *Interplay between Shox2 and Tbx4 in early limb development* (in Vorbereitung).

Glaser A, Durand C, Puskaric S, Decker E, Bacon C und Rappold G (2011). *Comparative analysis of Shox and Shox2 expression in brain development* (in Vorbereitung).

Decker E, Durand C, Bender S, Rodelsperger C, **Glaser A**, Hecht J, Schneider KU, and Rappold G (2011). *FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development*. Hum Mol Genet 20, 1524-35.

Puskaric S, Schmitteckert S, Mori AD, **Glaser A**, Schneider KU, Bruneau BG, Blaschke RJ, Steinbeisser H und Rappold G (2010). *Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart*. Hum Mol Genet 19:4625-33.

Puskaric S, Berger I, **Glaser A**, Bacon C, Li L, Schneider KU, Gretz N, Steinbeisser H, Just S, Rappold G (2011). *Isl1 is a target of the homeodomain transcription factor Shox2 in the sinoatrial node of the developing heart* (in Vorbereitung).

Schneider KU, **Glaser A**, Kleinschmidt K, Scholl I, Niesler B, Li L, Gretz N, Meckersheimer G, Richter W, Marchini A, Blaschke RJ, Rappold G (2011). *A transgenic mouse model for the characterization of the molecular pathways of the human SHOX gene during embryonic limb development* (in Vorbereitung).

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Gudrun Rappold, die mir die Möglichkeit gab, an diesem Thema zu arbeiten. Für ihre fortwährende Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung während meiner gesamten Doktorarbeit sowie ihre konstruktive Kritik beim Schreiben dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Herbert Steinbeisser danke ich für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit, für seine Mithilfe, die vielen anregenden Gespräche und stete Ansprechbarkeit während meiner Promotion.

Mein besonderer Dank richtet sich außerdem an Herrn PD Dr. Rüdiger J. Blaschke († 26.01.2007), der anfänglich meine Arbeit betreute, und mir als hervorragender Wissenschaftler und Betreuer und auch als guter Freund stets in Erinnerung bleiben wird.

Für eine gute Zusammenarbeit möchte ich außerdem meinen Kollaborationspartnern Ripla Arora und Dr. Virginia Papaioannou (Columbia University, New York) danken, deren Mithilfe wichtige Erkenntnisse zu meiner Doktorarbeit beigesteuert hat.

Einen ganz wichtigen Beitrag zum Gelingen meiner Arbeit lieferte auch unser Tierpfleger Roland Knopf, bei dem ich mich für seine Zuverlässigkeit und seinen Humor bedanken möchte.

Ganz herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe. Im besonderen Maße gilt mein Dank Dr. Claire Bacon, Dr. Johannes Kapeller und Dr. Claudia Durand, die in jeglichen Situationen mit Rat und Tat zur Seite standen und darüber hinaus zu sehr guten Freunden geworden sind. Dankbar bin ich auch Dr. Eva Decker und Dr. Katja Schneider für konstruktive Diskussionen und hilfreiche Ratschläge während meiner Promotionszeit.

Vor allem aber danke ich meiner lieben Kollegin und Freundin Dr. Sandra Puskaric, die mit unendlicher Geduld, fachlichem Wissen und großem Verständnis immer für mich da war und mit mir durch gute und schwere Zeiten unserer Promotion gegangen ist.

Ein dickes Dankeschön auch an all meine Freunde, vor allem Anne Faßl, Kathrin Hesse, Sascha Hölig, Julia Mössinger, Katja Müller, Birte Seiffert und Heike Uhlemann, die in guten und in „Katastrophen“-Zeiten immer da waren.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner lieben Schwester bedanken, die mich stets mit Vertrauen auf meinem Weg begleitet haben.

Zusammenfassung

Die paralogen Gene *SHOX* und *SHOX2* kodieren für Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren mit wichtigen Funktionen innerhalb der Embryonalentwicklung. *SHOX* wurde als menschliches Wachstumskontrollgen identifiziert. Mutationen dieses Gens führen zu den skelettalen Fehlbildungen, die bei Léri-Weill-, Langer-, und Turner-Syndrom beobachtet werden, und sind zudem mit isoliertem Kleinwuchs assoziiert. Analysen mit Hilfe des Mausmodells zeigten, dass *Shox2* ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Extremitäten spielt und darüber hinaus für weitere Prozesse, wie z.B. die Herzentwicklung erforderlich ist. Funktionelle Analysen beider Gene ergaben weitgehende Übereinstimmungen hinsichtlich ihrer Expression, subzellulären Lokalisierung, DNA-Bindung sowie ihrer transaktivierenden Eigenschaften. Diese Befunde sprechen für überlappende Funktionen beider Gene. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Redundanz beider Gene mit Hilfe des Maus- und des Hühnermodells genauer zu untersuchen.

Da die Maus kein *SHOX*-Ortholog besitzt, wurde eine *targeting*-Strategie entwickelt, um menschliches *SHOX* unter dem endogenen *Shox2*-Promotor in die Maus einzubringen und gleichzeitig *Shox2* auszuschalten. Dieses *Shox2-knockout* / *SHOX-knockin*-Mausmodell würde ein geeignetes Modell darstellen, um die gemeinsamen Funktionen beider Gene zu untersuchen, allerdings war dessen Generierung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Daher wurde die Redundanz von *Shox* und *Shox2* mit Hilfe vergleichender Expressionsanalysen in Maus und Huhn untersucht. Es zeigte sich dabei, dass *Shox* und *Shox2* in unterschiedlichen Bereichen des Kiefers und der Extremitäten exprimiert sind. Im Nervensystem stimmen die Expressionsmuster beider Gene weitgehend überein, wobei *Shox2* etwas breiter exprimiert ist. Dies spricht für gemeinsame Funktionen beider Gene und könnte erklären, warum der Verlust von *SHOX* bisher mit keinem menschlichen neuronalen Phänotyp in Verbindung gebracht werden konnte. Möglicherweise kann *SHOX2* bei einem Verlust des *SHOX*-Gens die Funktion in der neuronalen Entwicklung vollständig übernehmen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von *Shox2* in der murinen Gliedmaßenentwicklung näher untersucht. Um Einblicke in *Shox2*-abhängige Signalwege zu erlangen sollten Zielgene von *Shox2* isoliert werden. Mit Hilfe von *microarray*-Analysen und nachfolgenden qRT-PCR-Analysen wurde *Tbx4* als interessantestes Kandidatengen identifiziert. Unter Verwendung des *Shox2-knockout*-Mausmodells konnte durch *whole mount in situ* Hybridisierungen und quantitative Analysen gezeigt werden, dass *Shox2* die Expression von *Tbx4* spezifisch in den Vordergliedmaßen beeinflusst. Nachfolgende Experimente mit Hilfe eines *Tbx4*-defizienten Mausmodells ergaben wiederum, dass *Tbx4* *Shox2* in Vorder- und Hinterbeinen positiv reguliert und es sich bei dem zuvor beobachteten Effekt von *Shox2* auf *Tbx4* wahrscheinlich um einen *feedback*-Mechanismus handelt. Luziferase-Assays und EMSA-Studien zeigten außerdem, dass es drei TBX4-Bindestellen im genomischen Promotorbereich von *SHOX2* gibt und es sich bei dem Einfluss von *Tbx4* auf *Shox2* um eine direkte Regulation handelt.

Damit konnte *Tbx4* im Rahmen dieser Arbeit als erster direkter Regulator von *Shox2* in der Gliedmaßenentwicklung charakterisiert werden, was auf eine mögliche Rolle von *Shox2* bei der Initiation des Auswachsens und der Identitätsgebung von Extremitätenknospen hinweist. Weiterhin trägt die Regulation von *Shox2* durch *Tbx4* zur Aufklärung der *Tbx4*-involvierten Signalwege in Prozessen wie Muskel- und Skelettentwicklung bei. Erstmals konnte damit die Beteiligung von *Shox2* an einem transkriptionellen *feedback*-Mechanismus demonstriert werden.

Abstract

The paralogous genes *SHOX* and *SHOX2* code for homeodomain transcription factors with important functions during embryonal development. *SHOX* was identified as the first human growth control gene. Mutations in this gene lead to the skeletal deformities seen in Léri-Weill, Langer and Turner syndrome as well as idiopathic short stature. Analysis of *Shox2* knockout mouse models has revealed that *Shox2* also plays a crucial role in limb development as well as embryonic heart development. Functional analyses of both genes have revealed that the expression, subcellular localisation, DNA binding and transactivating properties of *Shox* and *Shox2* overlap to a large extent. These data suggest that these two genes have overlapping functions. One goal of this work was to investigate the redundancy of *Shox* and *Shox2* using mouse and chicken models.

As the mouse has no *Shox* ortholog, I developed a targeting strategy to bring human *Shox* into the mouse under the control of the endogenous *Shox2* promoter, thereby knocking out *Shox2*. This *Shox2* knockout / *Shox* knockin mouse model would provide an excellent model with which to study the redundancy of *Shox* and *Shox2* but the generation of this model was not possible in this work. Therefore I chose to investigate the redundancy of *Shox* and *Shox2* by comparative expression analyses in mouse and chicken. These analyses revealed that *Shox* and *Shox2* are expressed in different regions of the jaw and limbs. In the nervous system the expression patterns of both genes are largely overlapping, although *Shox2* expression was more ubiquitous. This indicates redundant functions for both genes; *Shox2* could compensate for the loss of *Shox* in developing neuronal tissues.

In the second part of my thesis, I investigated the role of *Shox2* in limb development. In order to gain insight into *Shox2* dependent signalling pathways, I wanted to uncover potential target genes of *Shox2*. Using microarray and qRT-PCR, *Tbx4* was identified as the most interesting candidate gene. By analysing *Tbx4* expression in *Shox2* mutant mice using whole mount *in situ* hybridisation and quantitative analysis I was able to confirm that *Shox2* regulates *Tbx4* specifically in the forelimbs. Subsequent experiments using *Tbx4* deficient mice in turn revealed that *Tbx4* positively regulates *Shox2* in both fore and hindlimbs. Taken together, these results show that the effect of *Shox2* on *Tbx4* is possibly a feedback mechanism. Luciferase assays and EMSA studies identified three TBX4 binding sites in the genomic promoter region of *SHOX2* demonstrating that TBX4 has a direct effect on *SHOX2*. In conclusion, my work has identified *Tbx4* as the first direct regulator of *Shox2* in limb development and has uncovered a possible role for *Shox2* in the initiation and identity of the limb buds. In addition, the regulation of *Shox2* by *Tbx4* provides further insight into *Tbx4* related signalling pathways in developmental processes such as muscle and skeletal development. This work has also revealed the involvement of *Shox2* in a feedback mechanism for the first time.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor SHOX.....	9
1.2	Der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor SHOX2.....	13
1.3	Die Entwicklung der Gliedmaßen.....	19
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Puffer, Lösungen und Medien.....	22
2.1.1	Nährmedien und Zusätze für Bakterienkulturen.....	22
2.1.2	Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	22
2.2	Bakterienstämme und Zelllinien.....	23
2.2.1	Bakterienstämme.....	23
2.2.2	Zellen.....	24
2.3	Plasmide und Oligonukleotide.....	24
2.3.1	Plasmide.....	24
2.3.2	Oligonukleotide.....	25
2.4	DNA- und RNA-Sonden.....	29
2.5	Antikörper.....	29
2.6	Datenbanken, Internetressourcen, Software.....	30
2.7	Reagenzien und Kits.....	30
2.8	DNA-basierte Methoden.....	32
2.8.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	32
2.8.2	Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.....	32
2.8.3	DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gelen und Reaktionsansätzen.....	33
2.8.4	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA.....	33
2.8.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	33
2.8.6	Restriktionsverdau.....	34
2.8.7	Dephosphorylierung von DNA.....	34
2.8.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	34
2.8.9	„TA-Klonierung“.....	35
2.8.10	Transformation von Bakterienzellen.....	35
2.8.10.1	Transformation durch Elektroporation.....	35
2.8.10.2	Transformation durch Hitzeschock.....	36
2.8.11	Sequenzierung.....	36
2.8.12	Southern Blot.....	37
2.8.13	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	40
2.9	RNA-basierte Methoden.....	45
2.9.1	Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben.....	45
2.9.2	cDNA-Synthese.....	46
2.9.3	Quantitative <i>real time</i> -PCR (qRT-PCR).....	46
2.9.4	<i>nCounter</i> -Analyse.....	47
2.9.5	Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix GeneChip Array Technologie.....	47
2.9.6	<i>In vitro</i> Synthese markierter RNA-Sonden.....	48
2.9.7	<i>In situ</i> Hybridisierungen.....	48

2.9.7.1	<i>Whole mount in situ</i> Hybridisierungen	49
2.9.7.2	<i>In situ</i> Hybridisierungen auf Gefrierschnitte.....	51
2.10	Protein-basierte Methoden	53
2.10.1	Gewinnung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zellen	53
2.10.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Assay).....	53
2.10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.10.4	Western Blot-Analysen	54
2.10.5	Proteinexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	55
2.10.6	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	56
2.11	Zellbasierte Methoden.....	57
2.11.1	Kultivierung von Zelllinien und MEFs.....	57
2.11.2	Transfektion von Zelllinien	58
2.11.3	Luziferase-Reporterassays.....	58
2.11.4	Histologische Knorpel-Knochen-Färbungen	60
2.11.5	Isolierung von embryonalen Mausfibroblasten (MEFs)	60
2.11.6	Kultivierung und Manipulation muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)	61
2.11.6.1	Kultivierung muriner ES-Zellen.....	61
2.11.6.2	Inaktivierung der MEFs.....	62
2.11.6.3	Elektroporation der ES-Zellen	62
2.11.6.4	Selektion der ES-Zellen.....	62
2.11.6.5	Vereinzeln der ES-Zellklone	62
2.11.6.6	Splitten und Einfrieren von ES-Zellen.....	63
2.11.6.7	DNA-Isolierung aus ES-Zellen im 96-well-Format.....	63
2.12	Tierexperimentelle Methoden.....	64
2.12.1	Tierhaltung und Versuchstiere.....	64
2.12.2	Genotypisierung von <i>Shox2-knockout</i> -Embryonen	64
2.12.3	Präparation von Mausembryonen und -geweben.....	65
3	Ergebnisse	66
3.1	Analyse der Redundanz von SHOX und SHOX2.....	66
3.1.1	Generierung eines <i>Shox2-knockout</i> / <i>SHOX-knockin</i> Mausmodells.....	66
3.1.1.1	<i>Targeting</i> -Strategie.....	66
3.1.1.2	Generierung von murinen embryonalen <i>Shox2-knockout</i> / <i>SHOX-knockin</i> Stammzellen.....	67
3.1.1.3	Analyse einer Mehrfachintegration des <i>targeting</i> -Konstrukts	71
3.1.2	Vergleichende Expressionsanalyse von <i>SHOX/Shox</i> und <i>SHOX2/Shox2</i> in neuronalen Strukturen	72
3.1.2.1	Expression von <i>Shox2</i> im Nervensystem der Maus	72
3.1.2.2	Identifizierung der <i>Shox2</i> -exprimierenden Interneurone	75
3.1.2.3	Vergleichende Expression von <i>Shox</i> und <i>Shox2</i> im Nervensystem von Maus- und Hühnerembryonen.....	78
3.2	Identifizierung und Charakterisierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors <i>Shox2</i> in der Gliedmaßen-entwicklung.....	82
3.2.1	Analyse des Gliedmaßenphänotyps von <i>Shox2-knockout</i> -Mäusen	82
3.2.2	<i>Microarray</i> -Analysen zur Identifizierung von <i>Shox2</i> -Zielgenen	83
3.2.3	Experimentelle Verifizierung ausgewählter putativer Zielgene	86
3.2.3.1	Quantifizierung der mRNA-Expression in WT- und <i>Shox2-knockout</i> -Gliedmaßen.....	86
3.2.3.2	Analyse der mRNA-Expression mittels <i>in situ</i> Hybridisierung	88
3.2.4	Untersuchung von <i>Tbx4</i> als Zielgen von <i>Shox2</i>	90

3.2.4.1	Vergleich der Expressionsdomänen von <i>Shox2</i> und <i>Tbx4</i> in der murinen Gliedmaßenentwicklung	90
3.2.4.2	Expressionsanalyse von <i>Tbx4</i> in <i>Shox2</i> -defizienten Gliedmaßen	91
3.2.4.3	Luziferase-Reporteranalysen	93
3.2.4.4	Expressionsanalyse von <i>Pitx1</i> in <i>Shox2</i> -defizienten Gliedmaßen	97
3.2.5	Untersuchung von <i>Shox2</i> als Zielgen von <i>Tbx4</i>	98
3.2.5.1	Expressionsanalyse von <i>Shox2</i> in <i>Tbx4</i> -defizienten Gliedmaßen	98
3.2.5.2	qRT-PCR-Analysen nach <i>Tbx4</i> -knockdown	100
3.2.5.3	Luziferase-Reporteranalysen und <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	101
4	Diskussion	105
4.1	Die Redundanz von SHOX und SHOX2	105
4.1.1	Vergleich der funktionellen Eigenschaften von SHOX und SHOX2	105
4.1.2	Generierung eines <i>Shox2</i> -knockout / <i>SHOX</i> -knockin Mausmodells	107
4.1.3	Das Expressionsmuster von SHOX und SHOX2 und die Redundanz beider Gene	110
4.2	Zielgene von <i>Shox2</i> in der Gliedmaßenentwicklung	115
4.2.1	Die Rolle von <i>Tbx4</i> und <i>Tbx5</i> in Initiation und Identitätsgebung während der Gliedmaßenentwicklung	116
4.2.2	Die regulatorische Wechselwirkung von <i>Shox2</i> und <i>Tbx4</i>	119
4.2.3	Die biologische Bedeutung des <i>Tbx4</i> - <i>Shox2</i> -feedback-Mechanismus	121
4.2.4	Fazit und Ausblick	125
5	Literaturverzeichnis	128
6	Anhang	138
6.1	<i>Microarray</i> -Ergebnisse	138

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das menschliche <i>SHOX</i> -Gen und seine Isoformen.....	10
Abbildung 2: Die Expression von <i>Shox</i> im Hühnerembryo.....	12
Abbildung 3: Vergleich der Aminosäuresequenzen von menschlichem <i>SHOX</i> , <i>SHOX2</i> und murinem <i>Shox2</i>	13
Abbildung 4: Das menschliche <i>SHOX2</i> -Gen und seine Isoformen.....	14
Abbildung 5: Die Expression von <i>SHOX</i> und <i>SHOX2</i> in menschlichen Embryonen des Stadiums CS 21.....	15
Abbildung 6: Die Expression von <i>Shox2</i> in der murinen Embryonalentwicklung.....	16
Abbildung 7: Der Gliedmaßenphänotyp <i>Shox2</i> -defizienter Mausembryonen.....	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Initiation der murinen Gliedmaßenentwicklung.....	20
Abbildung 9: Schematische Darstellung der <i>targeting</i> -Strategie.....	67
Abbildung 10: Klonierung des <i>targeting</i> -Konstrukts.....	68
Abbildung 11: Integrationsanalyse mittels PCR.....	69
Abbildung 12: Integrationsanalyse mittels Southern Blot.....	70
Abbildung 13: Nachweis der Mehrfachintegration des <i>targeting</i> -Konstrukts mit Hilfe von PCR und Fluoreszenz- <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	71
Abbildung 14: <i>Shox2</i> -mRNA-Expression in der Embryonalentwicklung des murinen Gehirns.....	73
Abbildung 15: <i>Shox2</i> -mRNA-Expression in der Embryonalentwicklung des murinen Rückenmarks.....	74
Abbildung 16: Identifizierung der <i>Shox2</i> -exprimierenden Interneurone.....	76
Abbildung 17: Expressionsanalyse von <i>En1</i> und <i>Chx10</i> im Rückenmark von <i>Shox2</i> -defizienten Mausembryonen.....	77
Abbildung 18: Vergleichende Expressionsanalysen von <i>Shox2</i> und <i>Shox</i> im Nervensystem von Maus- und Hühnerembryonen.....	78
Abbildung 19: Vergleichende Expressionsanalysen von <i>Shox2</i> und <i>Shox</i> in Maus- und Hühnerembryonen.....	80
Abbildung 20: Histologische Färbungen zur Analyse des Gliedmaßenphänotyps in <i>Shox2</i> -defizienten Mausembryonen.....	83
Abbildung 21: Zusammenfassung der <i>Microarray</i> -Ergebnisse.....	84
Abbildung 22: Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression ausgewählter Gene mit qRT-PCR.....	86
Abbildung 23: Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression ausgewählter Gene mit dem nCounter-System.....	87
Abbildung 24: Analyse der mRNA-Expression putativer <i>Shox2</i> -Zielgene mittels <i>whole mount in situ</i> Hybridisierung.....	89
Abbildung 25: <i>Shox2</i> - und <i>Tbx4</i> -Expression in sich entwickelnden Gliedmaßen.....	90
Abbildung 26: Expressionsanalyse von <i>Tbx4</i> in <i>Shox2</i> -defizienten Gliedmaßen verschiedener Entwicklungsstadien.....	92
Abbildung 27: In Luziferase-Reportergenkonstrukten verwendete genomische Bereiche des <i>TBX4</i> -Gens.....	94
Abbildung 28: Luziferase-Assays mit verschiedenen <i>TBX4</i> -Reporterkonstrukten.....	95
Abbildung 29: Luziferase-Assay mit den P1- und P2-Reporterkonstrukten und steigenden <i>SHOX2</i> -Konzentrationen.....	96
Abbildung 30: Expressionsanalyse von <i>Pitx1</i> in <i>Shox2</i> -defizienten Gliedmaßen.....	97
Abbildung 31: Expressionsanalyse von <i>Shox2</i> in <i>Tbx4</i> -defizienten Gliedmaßen von E10.5 Embryonen.....	99

Abbildung 32: <i>TBX4/Tbx4</i> -Knockdown in NHDF-Zellen und primären Gliedmaßen-Zellen der Maus.....	100
Abbildung 33: Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen Proteine TBX4 und TBX5	102
Abbildung 34: Untersuchung des regulatorischen Effekts von TBX4 auf <i>SHOX2</i> mit Hilfe von Luziferase-Reporteranalysen und Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA).....	103
Abbildung 35: <i>SHOX</i> -assoziierte Phänotypen und die Redundanz von <i>SHOX</i> und <i>SHOX2</i>	113
Abbildung 36: Die Redundanz von <i>SHOX</i> und <i>SHOX2</i> – Zusammenfassung der Diskussion.	114
Abbildung 37: Die regulatorische Wechselwirkung von <i>Tbx4</i> und <i>Shox2</i> in der murinen Gliedmaßenentwicklung.	120
Abbildung 38: Vergleich der Skelett- und Muskelphänotypen von <i>Shox2</i> - und <i>Tbx4</i> -defizienten Mausembryonen.	122
Abbildung 39: Modell für die Rolle der <i>Shox2-Tbx4</i> -Wechselwirkung innerhalb der Gliedmaßenentwicklung.	124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Plasmide	24
Tabelle 2: Vektorprimer.....	25
Tabelle 3: Primer zur Generierung des <i>Targeting</i> -Vektors und Integrationsanalyse	25
Tabelle 4: Primer zur Genotypisierung und zur Klonierung von <i>in situ</i> Hybridisierungs-Sonden bzw. <i>Tbx4</i> -Expressions-Konstrukten.....	26
Tabelle 5: qRT-PCR-Primer.....	27
Tabelle 6: Primer zur Klonierung der TBX4-Reporterkonstrukte	27
Tabelle 7: siRNAs (Silencer Select siRNA, Invitrogen).....	28
Tabelle 8: Oligonukleotide für EMSA.....	28
Tabelle 9: verwendete Sonden für <i>in situ</i> Hybridisierungen (ISH), Southern Blot und Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierungen (FISH)	29
Tabelle 10: Primärantikörper.....	29
Tabelle 11: Sekundärantikörper.....	29
Tabelle 12: Zusammenfassung der <i>Shox2</i> -Expression in der Embryonalentwicklung des murinen Nervensystems	75
Tabelle 13: Zusammenfassung vergleichender Expressionsanalysen von <i>Shox2</i> und <i>Shox</i> in E12.5 Maus- und Tag 5 Hühnerembryonen.	81
Tabelle 14: Ausgewählte signifikant regulierte Gene mit relevanter Funktion bzw. Expression in der Gliedmaßenentwicklung.	85
Tabelle 15: Zusammenfassung der quantitativen Analysen mit qRT-PCR und dem nCounter-System.....	88
Tabelle 16: Signifikant positiv und negativ regulierte Gene im <i>Microarray</i>	139

Abkürzungsverzeichnis

BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	<i>copyDNA</i> (aus mRNA revers umgeschriebene DNA)
CNE	<i>conserved non-coding element</i> (konserviertes Sequenzmotiv)
CS	<i>carnegie stage</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	und andere
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	je nach Kontext: Gramm oder Erdbeschleunigung
GFP, RFP	grün fluoreszierendes Protein, rot fluoreszierendes Protein
h, min	Stunden, Minuten
HH	Einteilung der Embryonalstadien beim Huhn nach Hamburger und Hamilton (1951)
HOS	Holt-Oram-Syndrom
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
kb	Kilobasenpaare
LWD	Léri-Weill-Dyschondrosteosis
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Mb	Megabasenpaare
MEFs	embryonale Fibroblasten der Maus
mg	Milligramm
ml	Milliliter
M, mM	Molar, Millimolar
miRNA	<i>micro</i> Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
NS	Nervensystem
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PAR	pseudoautosomale Region
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (negativer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
SPS	<i>small patella</i> -Syndrom
T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur (Anlagerungstemperatur der Primer)
U	<i>units</i> (Einheit der Aktivität von Enzymen)
Ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett
(w/v)	<i>weight per volume</i> (Gewicht-Volumen-Verhältnis)
V	Volt (Maßeinheit für elektrische Spannung)
WISH	<i>Whole mount in situ</i> Hybridisierung
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor SHOX

Homöoboxgene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Ursache segmentaler Fehlbildungen, so genannter homöotischer Transformationen identifiziert wurden (Lewis, 1978). Vertreter dieser Superfamilie sind in allen tierischen Spezies zu finden (Svingen und Tonissen, 2006) und weisen ein gemeinsames DNA-Bindemotiv von 60 Aminosäuren auf, mit dem sie in sequenzspezifischer Weise an die DNA-Doppelhelix binden können. Diese so genannte Homöodomäne wird durch ein, von der Fliege bis zum Menschen, stark konserviertes DNA-Sequenz-Motiv von 180 bp kodiert, welches man als Homöobox bezeichnet (McGinnis et al., 1984; Hoey und Levine, 1988; Scott et al., 1989; Gehring et al., 1994). Strukturanalysen ergaben, dass die Homöodomäne aus drei α -Helices besteht, die ein Helix-turn-Helix-Motiv bilden (Kissinger et al., 1990). Es existieren verschiedene Familien der Homöoboxgene, wobei die am besten charakterisierte die Familie der *HOX*-Gene ist. Während die *HOX*-Gene in erster Linie im Zusammenhang mit der Festlegung des Körperbauplans gesehen werden können, sind die Mitglieder der übrigen Familien an einer Vielzahl anderer zellulärer Prozesse wie Organogenese, Zelldifferenzierung, Zellmigration, Zelladhäsion, Apoptose usw. beteiligt (Svingen und Tonissen, 2006). Eine dieser Familien stellt die der *paired-related*-Homöoboxgene dar, zu denen auch die nahe verwandten Gene *SHOX* und *SHOX2* gehören.

Das *short stature homeobox containing gene* (*SHOX*, MIM ID 312865) wurde 1997 als menschliches Wachstumskontrollgen identifiziert (Ellison et al., 1997; Rao et al., 1997). Es liegt auf dem kurzen Arm der Geschlechtschromosomen innerhalb der pseudoautosomalen Region 1 (PAR1) und entgeht damit der X-Inaktivierung. Das *SHOX*-Gen umfasst einen Bereich von ca. 40 kb genomischer DNA und besteht aus sieben Exons. Aufgrund alternativen Spleißens werden mindestens zwei Isoformen generiert: *SHOXa* und die kürzere Variante *SHOXb* (Abbildung 1). Beide Transkripte unterscheiden sich im letzten Exon und werden in Proteine von 292 (*SHOXa*) bzw. 225 (*SHOXb*) Aminosäuren translatiert. Das Startcodon für die Translation befindet sich am Ende des zweiten Exons, folglich ist Exon 1 nicht kodierend. Die 60 Aminosäuren umfassende Homöodomäne wird von Exon 3 und 4 kodiert und enthält innerhalb der dritten α -Helix das Kernlokalisierungssignal (*NLS*, *nuclear localization signal*) mit dem Aminosäure-Motiv AKCRK (Sabherwal et al., 2004b). Exon 6a kodiert für die OAR-Domäne, welche typisch für *paired*-verwandte Homöoboxproteine ist und

als Transaktivierungsdomäne angenommen wird. Im Gegensatz zu SHOXa fehlt dem SHOXb-Protein diese Domäne. Daher fungiert SHOXb vermutlich nicht als Transaktivator, sondern eher als Modulator der SHOXa-Funktion (Rao et al., 2001). Darüber hinaus wurden in einer kürzlich veröffentlichten Studie vier neue Exons von *SHOX* entdeckt, welche weitere Isoformen hervorbringen (Durand et al., 2011). Mindestens zwei alternative Promotoren innerhalb des *SHOX*-Gens generieren mRNAs, welche mit unterschiedlicher translationaler Effizienz für identische Proteine kodieren (Blaschke et al., 2003).

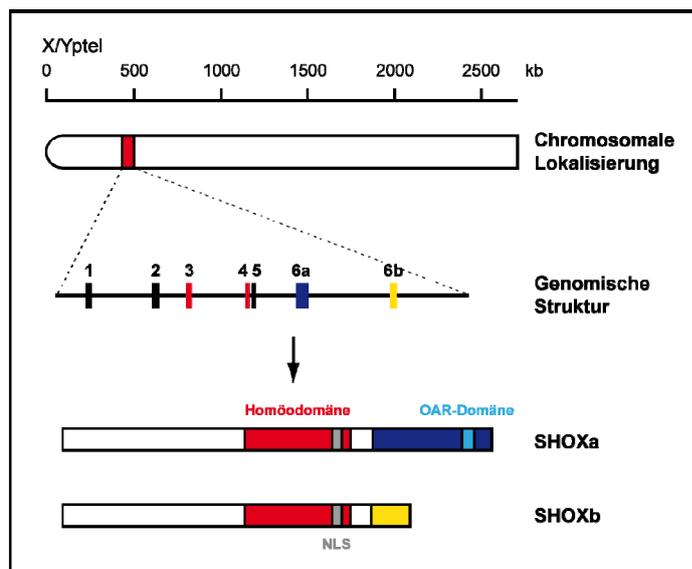


Abbildung 1: Das menschliche *SHOX*-Gen und seine Isoformen.

Das *SHOX*-Gen (rot) befindet sich auf dem kurzen Arm des X- bzw. Y-Chromosoms in der pseudoautosomalen Region 1 in der Nähe des Telomers (X/Yptel). Es umfasst 40 kb und 7 Exons (1-6b). Mit Hilfe der alternativ gespleißten Exons 6a (blau) und 6b (gelb) werden zwei Isoformen *SHOXa* und *SHOXb* generiert. Exon 3 und 4 kodieren für die Homöodomäne (rot), welche das Kernlokalisierungssignal (NLS, grau) enthält; Exon 6a kodiert für die OAR-Domäne (hellblau). Darüber hinaus konnten vier neue Exons von *SHOX* identifiziert werden, welche zur Generierung weiterer Isoformen führen (Durand et al., 2011). Abbildung verändert aus (Blaschke und Rappold, 2000).

Das *SHOX*-Gen ist innerhalb der Vertebraten hoch konserviert und in vielen Spezies wie z.B. Schimpanse, Hund, Huhn, Frosch und Fisch zu finden. Eine Ausnahme stellen Nagetiere dar. Ihnen fehlen die meisten Gene der pseudoautosomalen Region und damit auch das *Shox*-Gen (Clement-Jones et al., 2000; Gianfrancesco et al., 2001)

Durch *in situ* Hybridisierungen auf Schnitte menschlicher Embryonen konnte gezeigt werden, dass *SHOX* in den Pharyngealbögen und in sich entwickelnden Extremitäten exprimiert wird (Clement-Jones et al., 2000). Die früheste Expression ist in den Extremitätenanlagen von *carnegie stage* 14 (CS 14) Embryonen nachweisbar. Sie erscheint zunächst als breites Band im mittleren Bereich des Gliedmaßenmesenchyms und konzentriert sich in späteren Stadien

CS 15 und CS 16 um die Kondensationskerne der sich entwickelnden Knochen. Zu diesem Zeitpunkt sind *SHOX*-Transkripte im Perichondrium sowie im darüberliegenden Mesenchym und Ektoderm des medialen Bereichs zu sehen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung (CS 18 bis CS 21) ist *SHOX* um die distalen Enden von Humerus, Radius und Ulna sowie in einigen Handgelenkknöcheln und im Ektoderm, welches die Finger umgibt, exprimiert. Ein vergleichbares Expressionsmuster ist auch für die Anlagen der hinteren Extremitäten beschrieben (Clement-Jones et al., 2000). Während der Gliedmaßenentwicklung stellt das Perichondrium die Schicht dar, in der sich Chondroblasten und später Osteoblasten differenzieren. Die perichondriale Expression von *SHOX* weist auf Funktionen innerhalb der Knochenentwicklung hin. Tatsächlich wurde *SHOX* u. a. auch in hypertrophen, apoptotischen Chondrozyten der Wachstumsfugen von Föten, Kindern und Jugendlichen gefunden (Marchini et al., 2004; Munns et al., 2004; Marchini et al., 2007). Neben der Expression in sich entwickelnden Gliedmaßen menschlicher Embryonen konnten *SHOX*-Transkripte auch im ersten und zweiten Pharyngealbogen detektiert werden. Diese formen den späteren Ober- und Unterkiefer sowie verschiedene knöcherne Elemente des Ohres (Clement-Jones et al., 2000). RT-PCR-Analysen konnten *SHOX* in weiteren fötalen und adulten Geweben des Menschen wie z.B. Skelettmuskel, Haut, Niere, Leber, Darm, Auge, Fettgewebe, Plazenta, Gehirn, Rückenmark und Knochenmarksfibroblasten nachweisen (Durand, 2010). Da kein *SHOX*-Ortholog in der Maus existiert, erweist sich das Huhn als wichtiger Modellorganismus, um die Funktion von *Shox* genauer zu untersuchen. Menschliches *SHOX*-Protein stimmt in 95 % der Aminosäuren mit dem Protein des Huhns überein und alle wichtigen Domänen sind identisch, was für eine funktionelle Konservierung in beiden Spezies spricht. *In situ* Hybridisierungen zeigten, dass die *Shox*-Expression im Hamburger-Hamilton-Stadium 19 (HH19) in den Extremitätenknospen, in den Pharyngealbögen und im Rückenmark beginnt (Abbildung 2) (Tiecke et al., 2006). Im Stadium HH20-22 wird *Shox* im zentralen Mesoderm der Gliedmaßenanlagen und der Pharyngealbögen exprimiert, während die distalen und proximalen Endbereiche frei von *Shox* sind (Tiecke et al., 2006). Dieses Expressionsmusters war zuvor auch schon im menschlichen Embryo beobachtet worden (Clement-Jones et al., 2000). In späteren Stadien (HH24-25) kann *Shox* um kondensierende Knorpelbereiche herum im proximalen Teil der Gliedmaßen sowie auf der Innenseite der Oberkieferanlagen detektiert werden. Außerdem ist *Shox* in neuronalen Strukturen, wie Rückenmark, Diencephalon und Metacoel, sowie im Auge und im Gefäßsystem der Extremitäten zu finden. Im weiteren Verlauf der Entwicklung breitet sich die Expression in den Gliedmaßen in distaler Richtung aus (Tiecke et al., 2006).

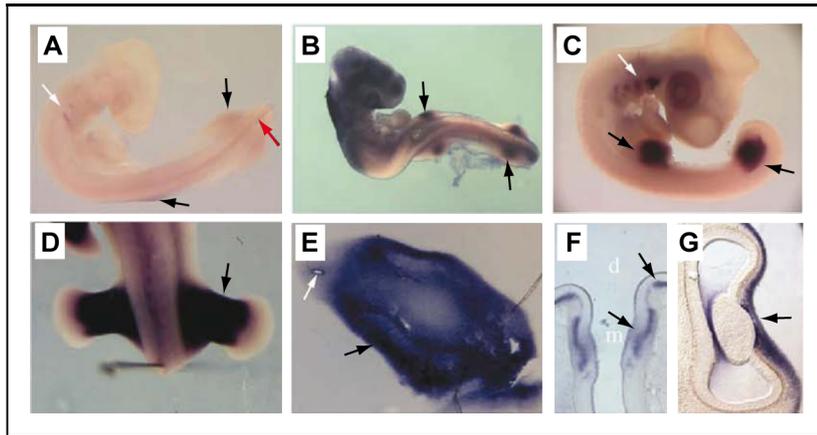


Abbildung 2: Die Expression von *Shox* im Hühnerembryo.

Whole mount in situ Hybridisierungen auf Hühnerembryonen der Stadien HH19 (A), HH20 (B), HH22 (C), HH25 (D-F) zeigen eine *Shox*-Expression in den Gliedmaßenanlagen (A-E, schwarze Pfeile), in den Pharyngealbögen (A, C, weiße Pfeile), im Gefäßsystem der Gliedmaßen (E, weißer Pfeil), im Rückenmark (A, roter Pfeil), im Gehirn (F, schwarze Pfeile) und im Auge (I, schwarzer Pfeil). E zeigt in einem Längsschnitt einer HH25 Hintergliedmaßenknospe die Expression von *Shox*, welche die kondensierenden Knorpelbereiche umgibt. d: Diencephalon, m: Metacoel
Abbildung verändert aus (Tiecke et al., 2006).

Das beschriebene Expressionsmuster von *SHOX/Shox* in Mensch und Huhn weist vor allem auf Funktionen innerhalb der Knochenentwicklung hin. Tatsächlich konnten Mutationen im *SHOX*-Gen mit verschiedenen Formen des syndromalen als auch mit isoliertem Kleinwuchs in Zusammenhang gebracht werden. *SHOX*-Haploinsuffizienz wurde zunächst als ursächlich für den Kleinwuchs bei Patienten mit Turner-Syndrom (45,X; Monosomie des X-Chromosoms) identifiziert (Ellison et al., 1997; Rao et al., 1997). Der heterozygote Verlust von *SHOX* ist weiterhin für die Symptomatik der Léri-Weill-Dyschondrosteosis (LWD; MIM ID #127300) (Belin et al., 1998; Shears et al., 1998) verantwortlich, der homozygote Verlust führt zum Langer-Syndrom (MIM ID #249700) (Belin et al., 1998; Zinn et al., 2002). Charakteristisch für LWD- und Langer-Syndrom-Patienten ist ein unproportionierter Kleinwuchs mit mesomelischer Verkürzung der Gliedmaßen sowie einer typischen Fehlbildung der Unterarme, der so genannten Madelung-Deformität. Patienten mit dem selteneren Langer-Syndrom zeigen schwerwiegende Wachstumsverzögerungen mit einer Hypo- bzw. Aplasie von Ulna und Fibula. Auch Formen des isolierten Kleinwuchses ohne skelettale Fehlbildungen, sind auf den Verlust von *SHOX* zurückzuführen. Diese Form der Wachstumsverzögerung wird aufgrund schwer zu diagnostizierender Ursachen als idiopathischer Kleinwuchs bezeichnet. Eine *SHOX*-Haploinsuffizienz ist für mindestens 5 % dieser Fälle verantwortlich (ISS; idiopathic short stature; MIM ID #300582) (Rappold et al., 2002; Huber et al., 2006; Jorge et al., 2007; Rappold et al., 2007; Chen et al., 2009).

Das Expressionsmuster und die mit einem *SHOX*-Verlust assoziierten Krankheiten machen eine Beteiligung des Gens an der Knochenentwicklung des Menschen deutlich. *SHOX* zeigt

eine transkriptionsaktivierende Funktion in osteogenen Zellen (Rao et al., 2001; Yu et al., 2007) und führt in diesen sowie auch in primären oralen Fibroblasten und Chondrozyten zum Anhalten des Zellzyklus und zu Apoptose (Marchini et al., 2004). Histologische Untersuchungen an Wachstumsfugen von Patienten mit LWD und idiopathischem Kleinwuchs zeigten eine Desorganisation hypertropher Chondrozyten (Munns et al., 2001). Diese Ergebnisse weisen auf eine Funktion als Regulator der Zellproliferation innerhalb der Knochenentwicklung hin und zeigen, dass *SHOX* vermutlich direkt an der Chondrozytendifferenzierung beteiligt ist.

1.2 Der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor SHOX2

Auf der Suche nach *SHOX*-verwandten Genen wurde zunächst das murine *Og12* mit einer Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 65 % als das Maus-Ortholog des humanen *SHOX*-Gens postuliert (Rovescalli et al., 1996). Wenig später gelang die Klonierung eines menschlichen Gens, das mit einer Homologie von 99 % auf Proteinebene nahezu identisch zu *Og12* ist (Blaschke et al., 1998). Dieses Gen wird heute als *SHOX2* (MIM ID 602504) bezeichnet und *Og12* wurde entsprechend in *Shox2* umbenannt (Abbildung 3).

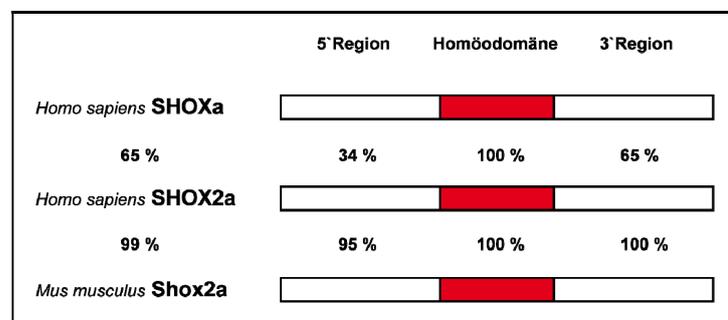


Abbildung 3: Vergleich der Aminosäuresequenzen von menschlichem SHOX, SHOX2 und murinem Shox2.

Das *short stature homeobox containing gene 2* (MIM ID 602504) liegt auf dem langen Arm des menschlichen Chromosom 3 und umfasst in einem Bereich von ca. 10 kb sieben Exons, welche mindestens vier verschiedene Transkripte generieren: *SHOX2a*⁺, *SHOX2a*, *SHOX2b* und *SHOX2c* (Abbildung 4). Das längste Transkript *SHOX2a*⁺ enthält im Unterschied zu *SHOX2a* ein zusätzliches Exon 2a⁺ und wurde bisher nur in Primaten nachgewiesen. Beide Varianten unterscheiden sich durch das alternativ gespleißte Exon 5 von *SHOX2b* und *SHOX2c*. Das *SHOX2*-Gen enthält zwei alternative Promotoren. Promotor 1 liegt vor dem

Exon 1 und ist für die Transkription von *SHOX2a⁺*, *SHOX2a* und *SHOX2c* verantwortlich. Die kürzeste Variante *SHOX2b* wird über einen zweiten Promotor generiert, welcher vor Exon 2 lokalisiert ist. Die verschiedenen Isoformen kodieren für Proteine von 355 (*SHOX2a⁺*), 331 (*SHOX2a*), 190 (*SHOX2b*) bzw. 319 (*SHOX2c*) Aminosäuren. Alle Proteine enthalten das für SHOX beschriebene Kerntransportsignal (NLS, *nuclear localization signal*) sowie die OAR-Domäne.

SHOX2 ist, ebenso wie *SHOX*, evolutionär stark konserviert und in den meisten Vertebraten zu finden. Auch Nagetiere besitzen, im Gegensatz zu *SHOX*, ein *SHOX2*-orthologes Gen (Clement-Jones et al., 2000).

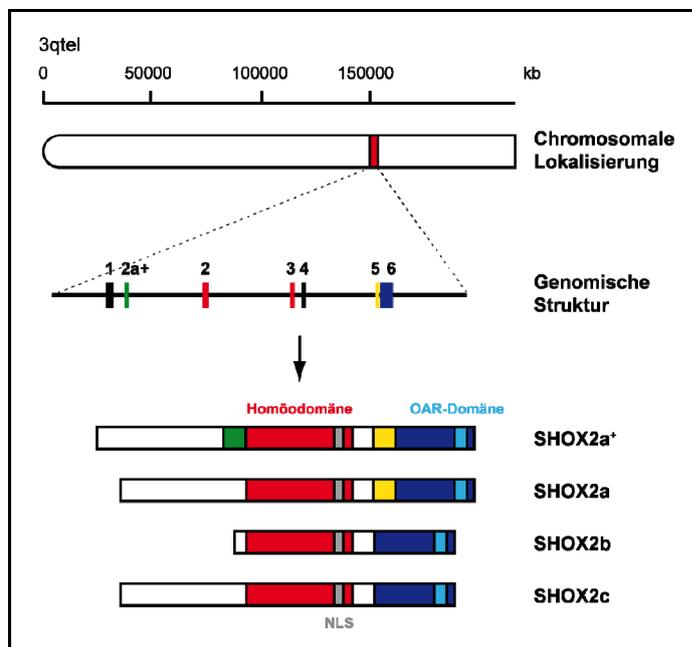


Abbildung 4: Das menschliche *SHOX2*-Gen und seine Isoformen.

Das *SHOX2*-Gen (rot) befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 3 und umfasst ca. 10 kb. Sieben Exons generieren mit Hilfe der alternativ gespleißten Exons 1 (schwarz), 2a⁺ (grün) und 5 (gelb) mindestens vier Isoformen: *SHOX2a⁺*, *SHOX2a*, *SHOX2b* und *SHOX2c*. Exon 2 und 3 kodieren für die Homöodomäne (rot), welche das Kernlokalisierungssignal (NLS, grau) enthält; Exon 6 für die OAR-Domäne (hellblau).

In situ Hybridisierungen auf Schnitte menschlicher Embryonen zeigten eine *SHOX2*-Expression in den Gliedmaßen, in den Pharyngealbögen, im Nasenfortsatz, im Gehirn, in den Spinalganglien, im Einflusstrakt des Herzens sowie in den Genitalhöckern (Clement-Jones et al., 2000). *SHOX2*-spezifische Transkripte treten erstmals in den Extremitätenanlagen des Embryonalstadiums CS 13 auf und erstrecken sich in späteren Entwicklungsstadien auf die medialen bis proximalen, skelettumgebenden Bindegewebs- bzw. Muskulaturbereiche der Extremitäten. Im Vergleich dazu ist *SHOX* vor allem in der

perichondrialen Schicht des eher medialen Teils der Gliedmaßen exprimiert. Innerhalb der Pharyngealbögen ist *SHOX2* in den äußeren mesenchymalen Schichten detektierbar, während sich die *SHOX*-Expression auf die mesodermalen Kernbereiche konzentriert (Abbildung 5). Weiterhin konnten mit RT-PCR-Analysen eine nahezu ubiquitäre Expression von *SHOX2* in adulten humanen Geweben mit besonders starken Signalen in Gehirn, Skelettmuskel und Herz gezeigt werden (Spitzer, 2006).

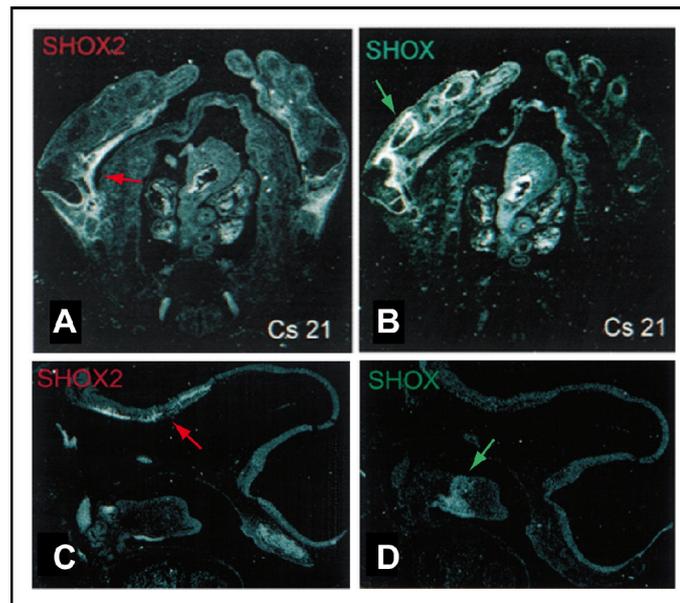


Abbildung 5: Die Expression von *SHOX* und *SHOX2* in menschlichen Embryonen des Stadiums CS 21.

Dunkelfeldmikroskopie von benachbarten Schnitten menschlicher CS 21 Embryonen. *In situ* Hybridisierungen zeigen im Vergleich die *SHOX2*- und *SHOX*-Expression in den Vorderextremitäten (A, B, Pfeile) und im ersten Pharyngealbogen (C, D, Pfeile) Abbildung verändert aus (Clement-Jones et al., 2000).

Umfassende *in situ* Hybridisierungs-Studien in der Maus konnten zeigen, dass das murine *Shox2*-Expressionsmuster in weiten Teilen mit der beobachteten Expression im Menschen übereinstimmt (Abbildung 6). *Shox2* kann bereits sehr früh in der Embryonalentwicklung, am Tag 8.5 (E8.5) im Sinus venosus des präsumptiven Herzens und einen Tag später (E9.5) in den Gliedmaßenanlagen nachgewiesen werden. In den Gliedmaßen erstreckt sich *Shox2* zunächst auf den gesamten mesenchymalen Bereich und ist verstärkt auf der Dorsalseite exprimiert (E9.5, E10.5). In späteren Stadien verlagert sich die *Shox2*-Expression in proximale Richtung und konzentriert sich im Perichondrium und im Bindegewebe, welches die Knochenanlagen umgibt. Außerdem sind ab dem Stadium E13.5 *Shox2*-Transkripte in proliferierenden Chondrozyten zu finden. Eine deutliche *Shox2*-Expression ist auch in kraniofazialen Bereichen (Derivate von Neuralleistenzellen des sich entwickelnden

Kiefergelenks, fusionierender Gaumen, Nasenhöhle und Augenlid), in neuronalen Strukturen (Gehirn, Rückenmark, vestibulochleare Ganglien und Spinalganglien), in Strukturen des Reizleitungssystems des Herzens und im Genitalbereich sichtbar (Blaschke et al., 1998; Semina et al., 1998; Yu et al., 2005; Li und Ding, 2007; Yu et al., 2007; Gu et al., 2008; Espinoza-Lewis et al., 2009).

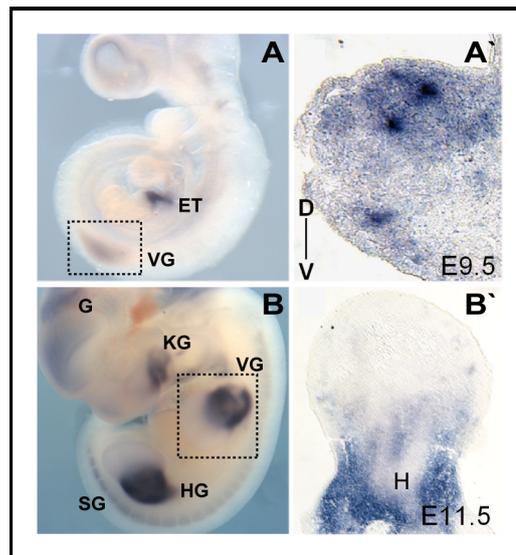


Abbildung 6: Die Expression von *Shox2* in der murinen Embryonalentwicklung.

Whole mount in situ Hybridisierungen zeigen eine frühe *Shox2*-Expression im Einflussstrakt des Herzens (ET) und in den vorderen Gliedmaßenanlagen (VG) von E9.5 Mausembryonen (A). E11.5 sind Transkripte im proximalen Bereich der Vorder (VG)- und Hintergliedmaßen (HG), im Kiefergelenk (KG), im Gehirn (G) und in den Spinalganglien (SG) sichtbar (B). A` und B` zeigen *in situ* Hybridisierungen auf Schnitte von Vordergliedmaßen der entsprechenden Stadien in A und B (gestrichelter Kasten). E9.5 ist *Shox2* besonders stark im dorsalen Bereich des Mesenchyms exprimiert (A`). E11.5 konzentriert sich die *Shox2*-Expression im proximalen Bereich und umgibt dort Knorpelkondensationen sich entwickelnder Knochen (B`). D (dorsal), V (ventral), H (Humerus) Abbildung A` und B` modifiziert aus (Yu et al., 2007).

Das ubiquitäre Expressionsspektrum in Mensch und Maus spricht für vielseitige Funktionen von *SHOX2/Shox2* innerhalb der Embryonalentwicklung. Während der Funktionsverlust von *SHOX* bereits mit Erkrankungen assoziiert werden konnte, ist für *SHOX2* bisher kein menschlicher Phänotyp bekannt. Allerdings gibt es eine Reihe von Studien im Mausmodell, in denen durch gezieltes Ausschalten (*knockout*) des *Shox2*-Gens essentielle Funktionen des Transkriptionsfaktors ermittelt werden konnten (Yu et al., 2005; Cobb et al., 2006; Blaschke et al., 2007; Gu et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass der heterozygote Funktionsverlust von *Shox2* keinen auffälligen Phänotyp hervorruft, während sich der homozygote Verlust embryonal letal auswirkt. Diese Letalität ist auf vitale Funktionen von *Shox2* innerhalb der Herzentwicklung zurückzuführen. *Shox2*^{-/-}-Embryonen sterben intrauterin zwischen E11.5 und E17.5 und weisen sichtbare Anzeichen eines Herz-Kreislauf-

Versagens wie Blutansammlungen in den externen Gefäßen sowie thorakale und perikardiale Ödeme auf. Genauere Analysen zeigten eine extreme Hypoplasie des Sinusknotens und der Venenklappen. Diese Strukturen sind Bestandteile des Reizleitungssystems des Herzens und Fehlbildungen innerhalb dieses Systems führen zu einer gestörten Schrittmacherfunktion, was als Todesursache angenommen wird (Blaschke et al., 2007; Espinoza-Lewis et al., 2009). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse einer partiellen *Shox2*-Inaktivierung in Zebrafischembryonen. Die Injektion von *antisense*-Morpholino-modifizierten Oligonukleotiden führte zu Bradykardie (verlangsamer Herzschlag) und intermittierendem Aussetzen des Sinus-Rhythmus (Blaschke et al., 2007). Ein verlangsamer Herzschlag konnte auch bei *Shox2*-defizienten Mausembryonen festgestellt werden (Espinoza-Lewis et al., 2009). Schließlich zeigten *Shox2*^{-/-}-Embryonen Störungen im transkriptionellen Netzwerk des Reizleitungssystems, wie z.B. eine Deregulation von *Bmp4*, *Tbx3*, *Hcn4*, *Cx40*, *Nppa* und *Nkx2.5* (Blaschke et al., 2007; Espinoza-Lewis et al., 2009; Puskaric et al., 2010). Die starke Expression von *SHOX2* in den sich entwickelnden Gliedmaßen und kraniofazialen Strukturen sowie seine nahe Verwandtschaft zu *SHOX* lassen eine entscheidende Funktion in der Knorpel- und Knochen-Entwicklung vermuten. Yu et al. konnten zeigen, dass der anteriore Gaumen *Shox2*-defizienter Mäuse im Wachstum beeinträchtigt ist, was eine vollständige Fusion verhindert und dadurch eine inkomplette Gaumenspalte hervorruft. *Shox2* ist damit ein wichtiger Bestandteil der Palatogenese (Yu et al., 2005). Auch in der Entwicklung des murinen Kiefers spielt *Shox2* eine Rolle. Ein konditionaler *knockout* von *Shox2* in Mesenchymzellen, welche sich von kranialen Neuralleistenzellen ableiten, führt zu Fehlbildungen im Kiefergelenk vergleichbar mit Symptomen der Ankylose beim Menschen (Gu et al., 2008). Die Funktion von *Shox2* in der Extremitätenentwicklung wurde sowohl im konditionalen als auch im klassischen *Shox2-knockout*-Mausmodell untersucht. In beiden Modellen führt der Verlust von *Shox2* zu einer drastischen Verkürzung der Extremitäten (Abbildung 7).

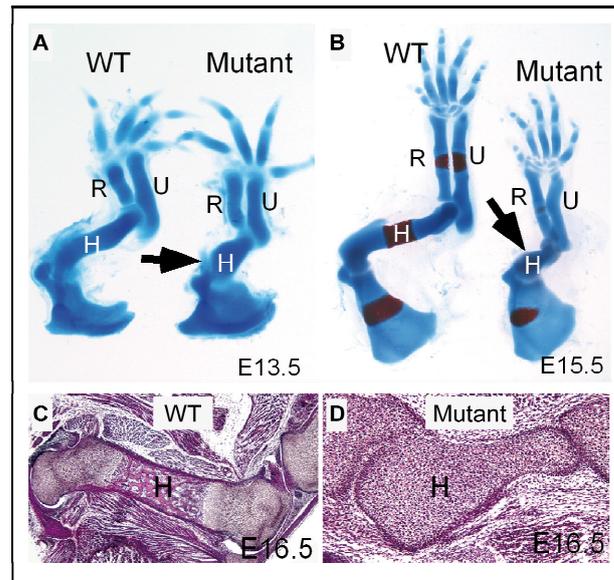


Abbildung 7: Der Gliedmaßenphänotyp *Shox2*-defizienter Mausembryonen.

Histologische Färbungen von Vordergliedmaßen der Maus (E13.5 und E15.5) zeigen eine starke Verkürzung der proximalen Skelettelemente im *knockout* (A, B, Humerus [H], Pfeil). Weiterhin sind im *Shox2*^{-/-}-Humerus (E15.5) keine knöchernen Elemente detektierbar (B, rote Färbung, Pfeil). Die distalen Elemente Radius (R) und Ulna (U) sind kaum verkürzt, zeigen aber ebenfalls Störungen in der Verknöcherung. Sagittale Schnitte durch Humeri (E16.5) zeigen eine fehlende Chondrozytenreifung sowie Verknöcherung im *knockout* verglichen zum WT (C, D). Hintergliedmaßen von *Shox2*^{-/-}-Embryonen zeigen den gleichen Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Knorpel Elemente in A und B sind blau, knöchernen Bereiche rot gefärbt. H (Humerus), R (Radius), U (Ulna) Abbildung verändert aus (Yu et al., 2007).

Im Gegensatz zur *SHOX*-bedingten Verkürzung distaler Skelettelemente (Radius, Ulna, Tibia, Fibula) bei LWD- und Langer Syndrom-Patienten handelt es sich bei *Shox2* in der Maus vor allem um Fehlbildungen der proximalen Elemente (Humerus und Femur). Die distalen Elemente von *Shox2*^{-/-}-Embryonen sind dagegen nur leicht verkürzt. Dieser Befund korreliert sehr gut mit dem *SHOX2/Shox2*-Expressionsmuster der Extremitätenanlagen menschlicher und muriner Embryonen. Genauere Analysen von *Shox2*^{-/-}-Embryonen zeigten, dass die Wachstumsverzögerung durch Störungen in der Proliferation und Reifung von Chondrozyten verursacht wird. Dabei konnte *Shox2* als Regulator einiger wichtiger Faktoren der Chondrozytendifferenzierung, wie *Runx2* und *3*, *Ihh* und *Bmp4*, identifiziert werden (Cobb et al., 2006; Yu et al., 2007). Schließlich ist *Shox2* innerhalb der Extremitätenentwicklung nicht nur für die Knochentwicklung, sondern auch für Muskelbildung und deren Innervierung notwendig. Der konditionale gliedmaßenspezifische *Shox2-knockout* zeigte Fehlbildungen in der Triceps-Muskulatur sowie Defekte in der axonalen Migration, die zum Verlust der Innervierung der Vorderextremitäten führten (Vickerman et al., 2011).

1.3 Die Entwicklung der Gliedmaßen

Die ersten sichtbaren Zeichen der Gliedmaßenentwicklung innerhalb der Vertebraten sind seitliche Ausstülpungen der Körperwand, welche mit fortschreitender Entwicklung deutlicher hervortreten, bis zum Auswachsen der Gliedmaßenknospe. Diese besteht aus einer homogenen Population undifferenzierter Mesenchymzellen, welche hauptsächlich von dem lateralen Plattenmesoderm (LPM) abstammen, und von darüber liegendem Ektoderm umgeben sind. Während des Auswachsens der Knospe beginnen die Mesenchymzellen zu differenzieren und formen Kondensationen von Knorpelvorläuferzellen, welche die späteren Skelettelemente Stylopodium (Humerus und Femur), Zeugopodium (Ulna, Radius, Tibia und Fibula) und Autopodium (Metacarpalen und Phalangen) hervorbringen. Zellen, welche die Knorpelkondensationen umgeben, differenzieren zu Knorpelhaut (Perichondrium). Während Knochen, Bänder und Teile des Gefäßsystems vom LPM abstammen, leitet sich die gesamte Extremitätenmuskulatur von migrierenden Vorläuferzellen aus benachbarten Somiten ab (Pearse et al., 2007). Die Extremitätenknochen entstehen durch den Prozess der endochondralen Ossifikation. Kondensierte Mesenchymzellen differenzieren zunächst zu proliferierenden Chondrozyten, welche mit fortschreitender Entwicklung die Teilung im Zentrum des Knorpels einstellen und sich stark vergrößern. Diese so genannten hypertrophen Chondrozyten werden apoptotisch und ermöglichen dadurch die Einwanderung von Blutgefäßen, Osteoklasten (knochen- und knorpelresorbierende Zellen) und Osteoblasten (knochenbildende Zellen). Diese Zellen bauen die Knorpelmatrix ab und sezernieren Knochenmatrix, welche schließlich durch Kalziumeinlagerung ossifiziert (Olsen et al., 2000; Kronenberg, 2003).

Der korrekte Ablauf der Gliedmaßenentwicklung erfordert ein koordiniertes regulatorisches Netzwerk verschiedenster Faktoren. Zwei Signalzentren steuern die Entwicklung der Gliedmaßen in drei Hauptrichtungen, antero-posterior (AP-Achse, vom Daumen bis zum kleinen Finger), proximo-distal (PD-Achse, von der Schulter bis zu den Fingern) und dorso-ventral (DV-Achse, vom Handrücken bis zur Handfläche). Die Zone polarisierender Aktivität (*zone of polarizing activity*, ZPA) im posterioren Mesenchym kontrolliert die Determination der antero-posterioren Achse hauptsächlich über das Signalmolekül Shh (Tickle, 2003). Die apikale ektodermale Randleiste (*apical ectodermal ridge*, AER), eine Verdickung des Ektoderms am distalen Ende der Extremitätenknospe, steuert die Initiation der Gliedmaßenentwicklung und das Auswachsen in proximo-distaler Richtung über einen positiven Fgf-*feedback*- Mechanismus (Xu et al., 1998).

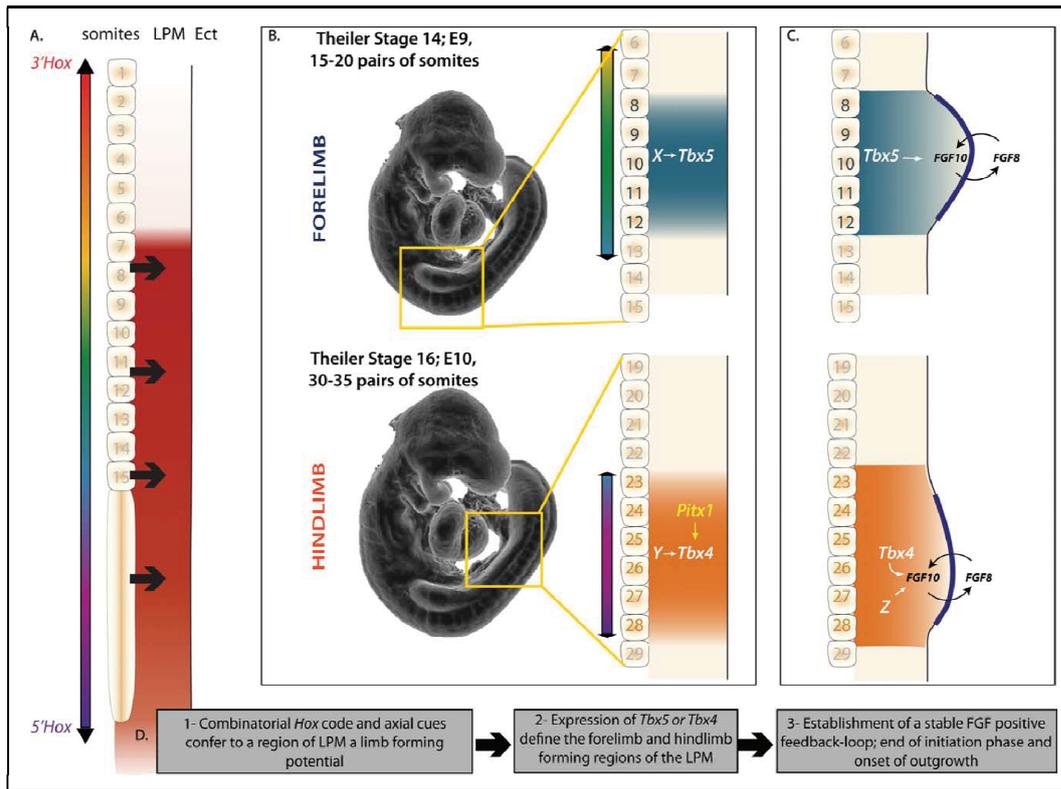


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Initiation der murinen Gliedmaßenentwicklung.
 Ect: Ektoderm, LPM: laterales Plattenmesoderm. Abbildung aus (Duboc und Logan, 2011).

Für die Etablierung und Aufrechterhaltung des *Fgf-feedback loops* sind u. a. zwei Mitglieder der T-Box-Transkriptionsfaktoren, *Tbx5* und *Tbx4*, verantwortlich (Naiche und Papaioannou, 2007; Hasson et al., 2010). Eine spezifisch kombinatorische Expression von Genen des *HoxC-clusters* im LPM legt die gliedmaßenbildenden Bereiche fest, in denen die *Tbx5*- und *Tbx4*-Expression beginnt. Dabei wird *Tbx5* im Bereich der sich entwickelnden Vordergliedmaßen, *Tbx4* in den Hintergliedmaßen exprimiert. Beide sind positive Regulatoren von *Fgf10* im Mesenchym und induzieren dadurch die Expression von *Fgf8* in der AER. *Fgf8* wiederum reguliert *Fgf10*, wodurch ein stabiler *feedback loop* entsteht (Abbildung 8). Die Entscheidung, in welchem Bereich sich Vorder- und Hintergliedmaßen herausbilden wird durch einen weiteren wichtigen Faktor gefällt. Der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor *Pitx1* ist maßgeblich für die Spezifizierung der Hinterextremitäten verantwortlich und legt damit die Morphologie des jeweiligen Gliedmaßentyps fest (DeLaurier et al., 2006). Das zeitliche und räumliche Zusammenspiel der Signalzentren ZPA und AER ist Teil eines komplexen Signalsystems, welches die Morphogenese der Gliedmaßen steuert. Einen wesentlichen Anteil an diesem Prozess haben sowohl positive als auch negative *feedback*-Mechanismen, wie beispielsweise der *Fgf-loop* (Zeller et al., 2009).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die nahe verwandten Transkriptionsfaktoren SHOX und SHOX2 besitzen eine hohe Sequenzhomologie auf Proteinebene, zeigen teilweise überlappende Expressionsmuster und sind maßgeblich in die Gliedmaßenentwicklung involviert, was die Frage nach einer möglichen funktionellen Redundanz der beiden Proteine aufwirft. Während *SHOX* und *SHOX2* in den meisten Vertebraten wie z.B. im Menschen oder im Huhn zusammen vorkommen, existiert *Shox* in Nagetieren nicht. Dies wirft die Frage einer möglichen Funktionsübernahme durch das *Shox2*-Gen in der Maus auf. Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, mit Hilfe des Maus- und des Hühner-Modells die Redundanz der beiden Gene zu untersuchen.

Während Mutationen des *SHOX*-Gens für verschiedene Formen des Kleinwuchses beim Menschen verantwortlich sind, konnte *Shox2* bisher mit keinem menschlichen Phänotyp in Verbindung gebracht werden. Allerdings führte ein gezieltes Ausschalten des *Shox2*-Gens in der Maus zu einer drastischen Verkürzung der Gliedmaßen, welche durch Störungen in der Chondrozytenproliferation und -differenzierung verursacht wird. Die Expression von *Shox2* beginnt weit vor dem Prozess der endochondralen Ossifikation, allerdings ist bisher wenig über Funktionen in der frühen Phase der Gliedmaßenentwicklung bekannt. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors *Shox2*, um so Einblicke in molekulare Signalwege der frühen Extremitätenentwicklung zu erlangen, an denen *Shox2* beteiligt ist.

2 Material und Methoden

2.1 Puffer, Lösungen und Medien

2.1.1 Nährmedien und Zusätze für Bakterienkulturen

LB-Medium :	10 g NaCl 10 g Trypton-Pepton (BD) 5 g Bacto-Hefe Extrakt (BD) ad 1.000 ml H ₂ O
LB-Agar (1,5 %) :	1.000 ml LB-Medium 15 g Bacto-Agar (BD)
SOC-Medium	0,5 g NaCl 0,186 g KCl 0,952 g MgCl ₂ 3,603 g Glukose 20 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefe Extrakt ad 1.000 ml H ₂ O
IPTG/X-Gal-Platten:	800 µl IPTG (100 mM) 2 ml X-Gal (20 mg/ml) 1 ml Ampicillin (50 mg/ml) ad 1.000 ml LB-Agar (1,5 %)
Ampicillin (Roth)	50 mg/ml in Ethanol lösen und sterilfiltrieren (Stammlösung) 50 µg/ml in LB-Medium (Endkonzentration)
Kanamycin (Roth)	30 mg/ml in H ₂ O lösen und sterilfiltrieren (Stammlösung) 30 µg/ml in LB-Medium (Endkonzentration)
IPTG (Serva)	100 mM Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
X-Gal	20 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Galaktopyranosid

2.1.2 Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryontischer Zellen

Medien und Puffer	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high Glucose (Gibco) Opti-MEM Reduced Serum Medium with GlutaMAX (Gibco) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco)
-------------------	---

Fötale Kälberserum	Fetal Bovine Serum Gold (PAA) Fetal Bovine Serum EU approved origin (Gibco) (ES-Zellkultur)
Trypsin (1 x)	0,05 % Trypsin-EDTA (Gibco)
Pen/Strep (100 x)	10.000 U/ml Penicillin; 10.000 µg/ml Streptomycin in Stammlösung (Gibco); 1:100 einsetzen
L-Glutamine	200 mM Stammlösung (Gibco), 1:100 einsetzen
β-Mercaptoethanol	Stammlösung (7 µl β-Mercaptoethanol [Sigma] in 10 ml PBS) 1:100 einsetzen
MEM NEAA (100 x)	Non essential amino acids (Gibco); 1:100 einsetzen
Sodium pyruvate	100 mM Stammlösung (Gibco) 1:100 einsetzen
Mitomycin C	2 mg Mitomycin C (Sigma) in 200 µl DMSO lösen und auf 4 ml mit PBS auffüllen, diese Lösung 1:50 einsetzen
LIF	mLIF (Leukemia Inhibitory Factor) 10 ⁶ Units/ml (Esgro), 1:1000 einsetzen
Gelatine	0,1 % Gelatine (Sigma) in PBS
G418	10 mg/ml Stammlösung, G418 sulphate-Pulver (Invitrogen)

2.2 Bakterienstämme und Zelllinien

2.2.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> TOP10F' (Invitrogen)	F ⁺ (lacIq Tn10 (TetR)) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG
<i>E. coli</i> DH5α	supE44, ΔlacU169(φ80 lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1
<i>E. coli</i> DH10β	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80d/lacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ-
<i>E. coli</i> NovaBlue (Novagene)	endA1 hsdR17(r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F [proA ⁺ B ⁺ lacI ^g ZΔM15::Tn10 (Tc ^R)]

E. coli XL2-Blue (Stratagene) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac^fZΔM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r]

E. coli Rosetta Gami (DE3)pLysS $\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL$ (DE3) F'[*lac+ lac^f pro*] *gor522::Tn10 trxB pLysSRARE* (Cam^R, Kan^R, Str^R, Tet^R)

2.2.2 Zellen

NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten (Promocell)
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen (ATCC)
MEF	murine embryonale Fibroblasten (selbst aus Mausembryonen isoliert)
R1	murine embryonale Stammzellen (ATCC)
E14	murine embryonale Stammzellen (ATCC)

2.3 Plasmide und Oligonukleotide

2.3.1 Plasmide

Bezeichnung	Firma	Anwendung
pcDNA4/TO	Invitrogen	Expression
pcDNA4/TO/myc-His A	Invitrogen	
pcDNA3	Invitrogen	
pCS2 ⁺	(Turner und Weintraub, 1994)	
pET-41a(+)	Novagen	
pGL3-basic	Promega	Luciferase-Assay
pGL3-promoter	Promega	
RL-TK	Promega	
pCR2.1-TOPO	Invitrogen	Expression/ <i>in vitro</i> Transkription
pSTBlue-1	Novagen	
RP23-103 D17	BACPAC Resources (CHORI)	Klonierung AG3
pGL4.17 [luc2/Neo]	Promega	
pBSK	Stratagene	

Tabelle 1: Plasmide

2.3.2 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')
M13 for	ACGTTGTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGACCATG
CMV for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
BGH rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
RV3	CTAGCAAAAATAGGCTGTCCC
pGL3seqRev	CAGGGCGTATCTCTTCATAGC
Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG
pGEX 5'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG

Tabelle 2: Vektorprimer

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')	Anmerkung
EcoRV-2831 liA for1 Shox2 ATG Kozak rev	TGGGAGTCAGACACTGGAGA CGCCGTAAGTTCTTCCATGGCGGCC	Klonierung des linken Arms in pSTBlue-1
AscI Neo for MluI Neo rev	ATATGGCGCGCCGCATCTAGTTCGAACACAC CGCGACGCGTGTATTGGGCGCTCTCCGCTGATC	Klonierung der Neomycin-Resistenzkassette in AG1
MluI reA for1 KpnI reA rev	CGCGACGCGTGGGAGTGTTTTGGACCCCTG CGCGGGTACCCAACCTCCAGCTGGCAGGGACGT	Klonierung des rechten Arms in AG2
Shox2 -2965 for SHOX +55 rev	AGAGGGACTATTGGGGATGG TACCGTCCTTGCTTTTCTGG	Analyse auf homologe Integration mittels PCR
A Shox2 RA2 for Shox2 LA 2400 rev	ACAATCGATCGCAGATCGCATAAC GAATAATCACAGAATTTTACTCTT	Analyse auf Tandem-Integration mittels PCR
Neo Probe for Neo Probe rev (Sonde 1)	TCGGTCACAACATCCAACAC CAGCAGGCAGAAGTATGCAA	Generierung der Southern Blot-Sonden zur Integrationsanalyse
Shox2 Probe II for Shox2 Probe II rev (Sonde 2)	AGCCAACAAGCATCCGATAG GAAGGTCGAGCCAGGTGAT	
Shox2 Probe for Shox2 Probe rev (Sonde 3)	GTGGATCCCATTACTAAATGATC GTTCTCTTGGATCCAGTACTCAGT	

Tabelle 3: Primer zur Generierung des *targeting*-Vektors und Integrationsanalyse

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')	Anmerkung
Shox2-int1/2 for Shox2-ex2 rev Neo rev	CAGGGTTTAGGAGTCTCTAGCCT TGCTTGATTTTGGTCTGGCCTTCGT TGAGCGGGACTCTGGGGTTCGA	Genotypisierungs-PCR
mChx10 ISH for2 mChx10 ISH rev2 mSim1 ISH for2 mSim1 ISH rev2 mEn1 ISH for mEn1 ISH rev mEvx ISH for mEvx ISH rev mIsl1 ISH for 2 mIsl1 ISH rev 2 mLmo1 clon1 for mLmo1 clon1 rev mRspo1 ISH for mRspo1 ISH rev mOgn ISH for mOgn ISH rev mTbx4 ISH for2 mTbx4 ISH rev2 mPitx1 ISH for mPitx1 ISH rev	TCATGACCCACAGTTGAGA TAAAGGGGGTCTTGTGGTTG ATACCACATGGAAGGGCTGA CCTTCAAAGTGGCTTGGAGA ACGCACCAGGAAGCTAAAGA ATTTTTCCCCCATAGCACCT CCCACCTGTCACCTCTCTTC TTGCTAATCAGGCTGTGTGC CAGCAAGAACGACTTCGTGA GGACTGGCTACCATGCTGTT GGAATTCATGGTGTGGACAAGGAGGACGG CCCAAGCTTGGTGCCATTGAGATGCCCTCC GCTCCAACCTCTCGGAGACAC AAGCGCTTCCCTCTCTCTC TCCAGTTCTTCTCCAAAGC CAACAAGGAGACCCTTAATGC CCGACGAGAACAATGCTTTT GCCCGAACTCGAGTACATA CTGCCGGCTACTCCTACAAC TGTCCCATTGGTGTAGTGGA	Klonierung von <i>in situ</i> Hybridisierungs-Sonden in pSTBlue-1
hTBX4 4TOHisMyc HindIII for hTBX4 4TOHisMyc XhoI rev	TGGAGAACTGGACTGACGGACAGTCGACCG CG TGGAGAACTGGACTGACGGACTCGAGCGCG	Klonierung von hTBX4 in pcDNA4/TO/myc-His A

Tabelle 4: Primer zur Genotypisierung und zur Klonierung von *in situ* Hybridisierungs-Sonden bzw. *Tbx4*-Expressions-Konstrukten

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')	Anmerkung
mIsl1 for	GCAACCCAACGACAAAATAA	Maus
mIsl1 rev	CCATCATGTCTCTCCGGACT	Maus
mLmo1 for 2	AAGCTGATCCCAGCTTTTGA	Maus
mLmo1 rev 2	GTCTCCCACGCAAATCTCT	Maus
mCtsk for	CGAAAAGAGCCTAGCGAACA	Maus
mCtsk rev	TGGGTAGCAGCAGAACTTG	Maus
mTbx4 for	GCATGAGAAGGAGCTGTGG	Maus
mTbx4 rev	TTACCTTGTAGCTGGGGAACA	Maus
mShh for	ACCCCGACATCATATTTAAGGA	Maus
mShh rev	TTAACTTGTCTTTGCACCTCTGA	Maus
mHoxd13 for	GGAACAGCCAGGTGACTGTG	Maus
mHoxd13 rev	GGCTGGTTTAAAGCCACATC	Maus
mAspn for 2	GAAGAAAATTCTCTCCTCTGACAA	Maus
mAspn rev 2	AGGGCTAAAGAAGGGTTTGG	Maus
mThbs4 for	AGACGCCTGTGATGACGAC	Maus
mThbs4 rev	TGGGACAGTTGTCCAAAATG	Maus
mRspo1 for	CGACATGAACAAATGCATCA	Maus
mRspo1 rev	CTCCTGACACTTGGTGCAGA	Maus
mOgn for	GGAATTAAGCAAACACATTCAA	Maus
mOgn rev	TTTCTGGTAAATTAGGAGGCACA	Maus
mPitx1_for1	ATCGTCCGACGCTGATCT	Maus
mPitx1_rev1	CTTAGCTGGTCTCTGCAC	Maus
mHprt1 for	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	Maus
mHprt1 rev	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	Maus

mSdha for	CATGCCAGGGAAGATTACAAA	Maus
mSdha rev	GTTCCCAAACGGCTTCT	Maus
mShox2 for	ACCAATTTTACCCTGGAACAAC	Maus
mShox2 rev	TCGATTTTGAAACCAAACCTG	Maus
SDHA For Mhg 147	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	Mensch
SDHA Rev Mhg 148	CCACCACTGCATCAAATTCATG	Mensch
HPRT1 For MHG 300	TGATAGATCCATTCTATGACTGTAGA	Mensch
HPRT1 Rev MHG 301	AAGACATTCTTTCCAGTTAAAGTTGAG	Mensch
hTBX4 for1	CCATCGCTACAAGTTCTGTGAC	Mensch
hTBX4 rev1	GAATCCGGGTGGACATACAG	

Tabelle 5: qRT-PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
hTBX4 up 2 for 2 hTBX4 up 2 rev 2	GGGGGTACCATGTGTGGCACCGTCAGTTA CCCACGCGTTCTGCAAACACCAATTTCCA	P1
hTBX4 up 1 for hTBX4 up 1 rev	GGGGGTACCGAAGAGCAAGCAACGGAAAC CCCACGCGTCCTTATCCTGCAGCATCTCC	P2
hTBX4 8 for hTBX4 8 rev	GGGGGTACCTCCTTTCCCTTTTGGAGGTT CCCACGCGTATAACTGACGGTGCCACACA	T1
hTBX4 9 for hTBX4 9 rev	GGGGGTACCCGAGCCCTCCTCTCTGAGTA CCCACGCGTGTTCCGTTGCTTGCTCTTC	T2
hTBX4 10 for hTBX4 10 rev	GGGGGTACCGGCTGGGTA ACTCTGGACAA CCCACGCGTCTGGCCAAGCATAGGAAGTT	T3
hTBX4 11 for hTBX4 11 rev	GGGGGTACCGGCCTCCTTGATCTTCTTC CCCACGCGTACCCATTGAGCCAAGACAAG	T4
hTBX4 12 for hTBX4 12 rev	GGGGGTACCTGGAAGAGGCTTGAGAACAGA CCCACGCGTAGGCCAGAAAGTCAACCTTT	T5
hTBX4 up 3 for hTBX4 up 3 rev	GGGGGTACCCTCCTGACACTGGGGTCACT CCCACGCGTCTCATGGCAACAAAGCTGAA	ECR A
hTBX4 7 for hTBX4 7 rev	GGGGGTACCCAGACCATCGAGAACATCA CCCACGCGTGCTGGCCACCTATGGAAGTA	ECR B
hTBX4 up intr for hTBX4 up intr rev	GGGGGTACCCGTAACCAAACCCAGAGA CCCACGCGTCTGGCAACAAACCCGTA ACT	ECR C
hTBX4 down 1 for 2 hTBX4 down 1 rev 2	GGGGGTACCCTGGGGTGTGAGGACTCTGT CCCACGCGTTTTCCCGTTTTTCCTCCTCT	ECR D
hTBX4 5B for hTBX4 down 1 rev2	GGGGGTACCTTTTGTGGCTCTAGGCTGCT CCCACGCGTTTTCCCGTTTTTCCTCCTCT	ECR E,F
hTBX4 down 2 for hTBX4 down 2 rev	GGGGGTACCTGCCTCCTTCCAAGTCTGTT CCCACGCGTTTTCAAAGTGCCGGGATTAC	ECR G,H

Tabelle 6: Primer zur Klonierung der TBX4-Reporterkonstrukte

Alle Konstrukte wurden in pGL3-promoter-Vektor kloniert. Zusätzlich wurden P1, P2, ECR B, ECR C, T1 und T2 in den pGL3-basic-Vektor kloniert.

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')	Oligo ID
TBX4 siRNA 2	AGCUGAAAAUUGAGAACAATT	S18204
Negative control #1 siRNA	-	4390843 (Katalognr.)

Tabelle 7: siRNAs (Silencer Select siRNA, Invitrogen)

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')
TBX5_EMSA_for1	GGGGCATCACCTGGGTCCAGACCTTTGGGCTCACACCT_CCCGTTGACGTG CAAGCGCCGCAGTCC
TBX5_EMSA_rev1	GGGGGACTGCGGCGCTTGCACGTCAACGGGAGGTGTGAGCCCAAAGGTC TGGACCCAGGTGATGC
TBX5_EMSA_for2	GGGAATCTGCATCGTAGGAAGTTTTGTTTATGACACCT_ACCCGAAACAAAA TTGGTTATCTCACG
TBX5_EMSA_rev2	GGGCGTGAGATAACCAATTTTGTTCGGGTAGGTGTCATAAACAAAACCTTCC TACGATGCAGATT
TBX5_EMSA_for3	GGGTTTTTGAGTTATTTGTGAATATGTATTTAACACCT_CAGTTTGAGAGCAC CTTGAGCACCGTA
TBX5_EMSA_rev3	GGGTACGGTGCTCAAGGTGCTCTCAAACCTGAGGTGTTAAATACATATTCAC AAATAACTCAAAAA
Brachy_EMSA_for1	GGGAAGCTCAGTAGATGAAATATGACTTCAAACCTAAAAGTCAT_GTACTTAA AAAGGCAAACAA
Brachy_EMSA_rev1	GGGTTGTTTGCCTTTTTAAGTACATGACTTTTAGGTTTGAAGTCATATTTTCAT CTACTGAGCTT
Brachy_EMSA_for2	GGGAAAGCAAGTACTGATAACAATGTATTCATACCTAAAAGCTAT AGCTGC GGAAAAATTATAGA
Brachy_EMSA_rev2	GGGTCTATAATTTTTCCGCAGCTATAGCTTTTAGGTATGAATACATTGTTATC AGTACTTGCTTT
Brachy_EMSA_for3	GGGGCCACACTTAGAGGTATATTTGTTTACACACTTAA ATATAAC ATCATAT GTAAATATTCTTT
Brachy_EMSA_rev3	GGGAAAGAATATTTACATATGATGTTATATTTAAGTGTGTAACAAATATACC TCTAAGTGTGGC

Tabelle 8: Oligonukleotide für EMSA

2.4 DNA- und RNA-Sonden

Bezeichnung	Größe	Anmerkung
mChx10-2	529 pb	<i>in situ</i> Hybridisierung (ISH)
mSim1-2	523 bp	
mEn1	545 bp	
mEvx1	720 bp	
mLmo1	447 bp	
mRspo1	508 bp	
mOgn	572 bp	
mTbx4	607 bp	
mPitx1	782 bp	
mShox2	608 bp	
Sonde 1	508 bp	Southern Blot
Sonde 2	477 bp	
Sonde 3	593 bp	
BAC RP23-103 D17	181 kb	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)
AG3	9,7 kb	

Tabelle 9: Verwendete Sonden für *in situ* Hybridisierungen (ISH), Southern Blot und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH)

2.5 Antikörper

Antikörper	Tier	Spezifität	Immunogen	Hersteller	Katalognr.
α -Digoxigenin-AP	Schaf	Digoxigenin	Digoxigenin	Roche	11 093 274 910
α -Fluorescein-AP	Schaf	Fluorescein	Fluorescein	Roche	1 426 338
Anti-c-Myc (Ab-1)	Maus	Mensch, Maus, Ratte	synthetisches Peptid (AEEQKLISEEDLLRK RREQLKHKLEQLRN SCA) entspricht den Aminosäuren 408-439 von menschlichem c- Myc	Calbiochem	OP10
α -Digoxigenin	Maus	Digoxigenin	Digoxin-KLH	Sigma	D8165

Tabelle 10: Primärantikörper

Antikörper	Tier	Konjugat	Hersteller	Katalognr.
α -Maus	Esel	IRDye 800CW	Licor	926-32212
α -Maus	Schaf	Cy3	Dianova	515-165-062

Tabelle 11: Sekundärantikörper

2.6 Datenbanken, Internetressourcen, Software

- Baylor College of Medicine, BCM Search Launcher:
<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>
- ECR-Browser: <http://ecrbrowser.dcode.org/>
- Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu/>
- Primerdesign (Primer3): http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
- Identifizierung von Restriktionsschnittstellen: <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>
- Programm für *multiple sequence alignments*: GEMSLauncher „DiAlign“ der Genomatix Software GmbH: <http://www.genomatix.de>
- Programm für die Suche von Transkriptionsfaktor-Bindestellen: „MatInspector“ der Genomatix Software GmbH: <http://www.genomatix.de>
- National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- UNSW Embryology: <http://embryology.med.unsw.edu.au/>
- Programm zur Übersetzung des DNA-Codes in Aminosäuren (*six frame translation*):
http://www.molbiol.ru/eng/scripts/01_13.html

2.7 Reagenzien und Kits

Kits und Enzyme für PCRs

- Taq DNA-Polymerase mit ThermoPol Buffer, für Kolonie- und Genotypisierungs-PCRs (New England Biolabs)
- HotStar HiFidelity-Polymerase Kit, für Klonierungen und Integrationsanalyse (Qiagen)
- FideliTaq DNA-Polymerase, für Klonierungen (USB)
- HotStarTaq DNA-Polymerase, für diverse Anwendungen (Qiagen)
- Absolute SYBR Green ROX Mix, für qRT-PCR (ABgene)

Kits zur DNA-Isolierung und -Aufreinigung

- illustra Microspin G-50 Säulen (GE Healthcare)
- illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)
- MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen)
- MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)
- MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen)
- PureLink HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen)

Kits und Reagenzien zur Sequenzierung

- Exonuclease I (Fermentas)
- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas)
- TempliPhi-Kits (GE Healthcare)
- DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare)

Kits und Enzyme zur Klonierung von DNA-Fragmenten

- pSTBlue-1 AccepTor Vector Kit (Novagen/Merck)
- Restriktionsenzyme (Fermentas)
- T4-Ligase (Promega)
- Alkalische Phosphatase (Promega)

Kits zur RNA-Isolierung und Aufreinigung

- TRIZOL Reagent (Invitrogen)
- DNA-free Kit (Ambion)

Kit zur cDNA-Synthese

- SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)

Kits zur *in vitro* RNA-Synthese

- DIG RNA Labeling Mix (Roche)
- Fluorescein RNA Labeling Mix (Roche)
- MEGAscript® T7 Kit (Ambion)
- MEGAscript® SP6 Kit (Ambion)
- MEGAscript T3 Kit (Ambion)

Kits zur Transfektion eukaryontischer Zellen

- Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen)
- Polyethylenimin (Sigma-Aldrich)
- Mouse ES cell Nucleofector Kit (Lonza)

Kit zur Messung der Luziferaseaktivität in eukaryontischen Zellen

- Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)

Kit zur Bestimmung der Proteinkonzentration

- BCA Protein Assay Kit (Pierce/Thermo Scientific)

2.8 DNA-basierte Methoden

2.8.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden Bakterienklone in 5 ml (Miniprep) bzw. 150 ml (Midiprep) LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und ü.N. bei 37°C wachsen gelassen. Die Plasmid-DNA wurde mit entsprechenden Kits (illustra plasmidPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare und PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit, Invitrogen) nach Herstellerprotokoll über Säulen isoliert, in H₂O resuspendiert und die Konzentration sowie die Reinheit photometrisch mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) bestimmt.

2.8.2 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde genomische DNA aus embryonalen Stammzellen der Maus isoliert, um Southern Blot-Analysen durchzuführen. Als Ausgangsmaterial wurden etwa 5×10^6 - 1×10^7 Zellen verwendet. Die DNA-Aufarbeitung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Zellpellet in 5 ml SE-Puffer mit Proteinase K (60 µg/ml) und SDS (1 %) resuspendieren.
- 12-16 h bei Raumtemperatur über Kopf drehen.
- Phenol/Chloroform- Extraktion.
- Fällung der DNA in 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 Volumen 100 % Isopropanol.
- DNA-Faden mit Glashaken angeln, in 70 % EtOH waschen, kurz trocknen lassen und in 0,1x TE-Puffer lösen.
- Photometrische Messung der Konzentration und Reinheit der isolierten DNA mittels Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific).

SE-Puffer: 75 mM NaCl
25 mM Na₂EDTA
pH 8,0

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min		
Denaturierung	94°C	30 sec	}	25-40 Zyklen
Primeranlagerung	T _a	30 sec		
Elongation	72°C	1 min/kb		
Abschließende Elongation	72°C	5 min		
Abkühlen	4°C	∞		

Die *annealing*-Temperatur T_a richtet ist von den jeweiligen Primersequenzen (siehe 2.3.2) sowie der verwendeten Polymerase abhängig. Als Negativkontrolle diente bei allen PCR-Reaktionen ein Ansatz, dem keine *template*-DNA zugefügt wurde.

2.8.6 Restriktionsverdau

Je nach Experiment wurde eine bestimmte Menge an Plasmid-DNA bzw. die Gesamtmenge einer PCR-Amplifikation in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer unter Zusatz der entsprechenden Restriktionsenzyme (Fermentas) für mindestens 1 h oder ü. N. bei erforderlichen Temperaturbedingungen inkubiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen).

2.8.7 Dephosphorylierung von DNA

Um einen ungewollten intramolekularen Ringschluss von Vektoren nach einem Restriktionsverdau zu verhindern, wurden diese einer Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (Promega), welche freie Phosphatreste abspaltet, unterzogen. Dem Restriktionsverdau wurden ca. 2 U SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) pro µg DNA zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.

2.8.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation eines linearisierten Vektors mit einem Insert über Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3'-OH- und dem 5'-Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA wird die T4-DNA-Ligase eingesetzt. Für die Ligrationsreaktion sollten Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt werden. Die Inkubation erfolgt bei 16°C mindestens für 4 h.

Es gilt folgender Ansatz:

Linearisierter Vektor	100 ng
Insert-DNA	3-fache molare Menge
10 x T4 DNA-Ligase Puffer	2 μ l
T4 DNA-Ligase	1 μ l
ddH ₂ O	ad 20 μ l

2.8.9 „TA-Klonierung“

Die Methode der „TA-Klonierung“ erlaubt die Klonierung eines unverdauten PCR-Produkts in einen Vektor in nur einem Schritt. Dafür ist zunächst eine Polymerase erforderlich, welche Adenin-Überhänge an den 3'-Enden des zu klonierenden PCR-Produkts erzeugt (z.B. Taq-Polymerase). Der linearisierte Vektor (pSTBlue-1 aus dem AccepTor Vector Kit der Firma Novagen/Merck) enthält einzelne 3'-Uridinreste, so dass eine Ligation von Vektor und Insert mittels T4 DNA-Ligase unabhängig von Restriktionsschnittstellen erfolgen kann. Wird der Vektor nach der Transformation in *E. coli* repliziert, wird Uridin durch Thymidin ersetzt. Die Ligation und anschließende Transformation wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.10 Transformation von Bakterienzellen

Zur Transformation von DNA in Bakterien ist die Permeabilisierung der Zellmembran erforderlich. Dies kann durch Elektroporation oder einen Hitzeschock erfolgen.

2.8.10.1 Transformation durch Elektroporation

In dieser Arbeit wurden *E.coli* DH10 β , DH5 α , XL2-Blue oder Rosetta Gami (DE3)pLysS elektrokompetente Bakterien verwendet, in welche die gewünschte Plasmid-DNA mittels Elektroporation nach folgendem Protokoll eingeschleust wurde:

- Elektrokompetente Zellen auf Eis auftauen lassen.
- Zugabe von 2-4 μ l entsalztem Ligationsprodukt und Überführen des Ansatzes in eine 2 mm Elektroporationsküvette (Peqlab).
- Applikation eines elektrischen Pulses von 1,8 kV (EasyjecT Prima, Equibio).
- Sofortige Zugabe von 500 μ l LB-Medium und Inkubation für 30-45 min bei 37°C im Schüttelheizblock.
- Ausplattieren des Ansatzes auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum. Inkubation der Platten bei 37°C ü. N..

2.8.10.2 Transformation durch Hitzeschock

In dieser Arbeit wurden *E.coli* NovaBlue Singles chemisch kompetente Bakterien verwendet, in welche die gewünschte Plasmid-DNA mittels Hitzeschock nach folgendem Protokoll eingeschleust wurde:

- Chemisch kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen.
- Zugabe von 2-4 µl Ligationsprodukt und Inkubation für 30 min auf Eis.
- Hitzeschock für 30 sec bei 42°C und weitere fünfminütige Inkubation auf Eis.
- Zugabe von 250 µl SOC-Medium und Inkubation für 1 h bei 37°C im Schüttelheizblock.
- Ausplattieren von 50-150 µl des Ansatzes auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum sowie IPTG und X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion. Inkubation der Platten bei 37°C ü. N..

Der Erfolg der Ligation und Transformation wurde standardmäßig mittels Kolonie-PCR überprüft, bei der die Bakterienklone direkt als Matrize eingesetzt wurden.

2.8.11 Sequenzierung

Die verschiedenen, innerhalb dieser Arbeit klonierten Konstrukte wurden nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Reaktion durch Didesoxynukleotid-Zugabe (Sanger et al., 1977) sequenziert. Dies erfolgte direkt aus PCR-Produkten oder aus Plasmiden, welche mit Hilfe des TempliPhi-Kits (GE Healthcare, Durchführung laut Herstellerprotokoll) vollständig amplifiziert wurden. Während aus TempliPhi-Amplifikation erhaltene DNA direkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt werden kann, müssen PCR-Produkte zunächst mittels Exonuklease I (ExoI) und „FastAP“ Thermosensitive Alkalische Phosphatase (FAP) aufgereinigt werden.

Aufreinigungs-Ansatz:

PCR-Produkt	2,5 µl
FAP (1U/µl)	0,5 µl
ExoI (20U/µl)	0,25 µl
ddH ₂ O	ad 4 µl

Inkubation:

37°C	15 min
80°C	15 min

Für die eigentliche Sequenzierreaktion wurde das DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences) wie folgt verwendet:

Sequenzierreaktion:

PCR-/TempliPhi-Produkt	0,5-2 µl
Primer (5pmol/µl)	1 µl
Premix	1-2 µl
H ₂ O	ad 5 µl

Sequenzierprogramm:

94°C	20 sec	
60°C	2 min	30 Zyklen

Nach Beendigung der Sequenzierreaktion wurden die Proben mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Aufreinigung der Sequenzierreaktion geschah mit Hilfe von Sephadex-G50 in Millipore Multiscreen-HV-Platten. Dabei werden nicht eingebaute Didesoxynukleotide, überschüssige Primer und Polymerase von den eigentlichen Sequenzprodukten abgetrennt.

Die technische Bedienung des MegaBACE100-Sequenziergerätes erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Sequenzierungen wurden standardmäßig unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Injektion der Proben: 3,5 kV für 30s.
- Lauf: 9 kV für 100-150 min je nach Länge der Fragmente, Temperatur 44°C.
- Puffer: 1 x LPA-Puffer (GE Healthcare).

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des MegaBACE Sequence Analyzer Programmes (Amersham Biosciences, 2002) ausgewertet.

2.8.12 Southern Blot

Die Methode des Southern Blots ermöglicht den Nachweis einer spezifischen Gensequenz innerhalb eines komplexen DNA-Gemischs, wie z. B. der genomischen DNA eines Organismus (Southern, 1975). Die zu untersuchende DNA wird mit Hilfe eines oder mehrerer Restriktionsenzyme verdaut, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und denaturiert. Anschließend erfolgt ein Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran, welche mit einer einzelsträngigen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert wird. Diese bindet sequenzspezifisch einen komplementären Bereich innerhalb des Genoms, welcher durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die genomische DNA von ES-Zellen auf homologe Rekombination des *Shox2-knockout* / *SHOX-knockin*-Konstrukts (AG3, siehe 3.1.1.1) nach folgendem Protokoll untersucht:

Probenvorbereitung

- Verdau von ca. 15 µg genomischer DNA mit 3 µl Restriktionsenzym bei 37°C über ü. N..
- Auf Agarosegel Verdau überprüfen.
- Wenn Verdau korrekt war, Proben auf 1 % TAE-Agarosegel laden und DNA bei 35 V ü. N. elektrophoretisch auftrennen lassen.
- Gel in Ethidiumbromid-Lösung färben, um Auftrennung zu kontrollieren, anschließend Gel in ddH₂O waschen.

Transfer der DNA auf Nylonmembran

- Hybond H⁺ Nylonmembran (Amersham Biosciences) passend zurechtschneiden und in ddH₂O inkubieren, dann Gel auf die Membran in eine Vakuumapparatur legen, Ränder luftdicht abschließen.
- Gel mit 0,25 M HCl bedecken, für 5 min Vakuum anlegen.
- 0,25 M HCl erneuern, für weitere 20 min Vakuum anlegen.
- HCl absaugen, Gel mit Denaturierungspuffer bedecken, für 10 min Vakuum anlegen.
- Denaturierungspuffer erneuern, dann für 2-3 h bei 55 mBar Vakuumtransfer der DNA auf die Membran.
- Gel verwerfen, Membran 10 min mit 2x SSC waschen, dann UV-Behandlung (UV crosslinking) der DNA-Seite des Filters mit dem Stratagene UV-Linker (700 Joule).

Sondenherstellung

- 50 ng Sonden-DNA (über PCR generiert, aufgereinigt), ad 11 µl mit ddH₂O.
- 5 min bei 95°C aufkochen, auf Eis geben, dann folgende Reagenzien hinzugeben und für 5 min bei 37°C inkubieren:
 - 4 µl High Prime Mix (Roche)
 - 5 µl α-[³²P]dCTP, 10 µCi/µl (Hartmann Analytic)
 - 10 µl ddH₂O
- Aufreinigung über illustra Microspin G-50 Säulen (GE Healthcare).

Hybridisierung

- Membran mit Prähybridisierungspuffer in Glasröhre ü. N. bei 65°C inkubieren
- Radioaktiv markierte Sonde 5 min aufkochen, dann in 5 ml Hybridisierungspuffer (auf 65°C vorgewärmt) geben, Membran über Nacht bei 65°C hybridisieren.
- Membran mit Waschpuffer mehrmals je 30 min bei 65°C waschen.
- Filter in Plastikfolie einschweißen, Film auflegen und mehrere Tage bei -80°C exponieren.
- Film entwickeln und auswerten.

Pufferlösungen

Denaturierungspuffer:	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
20x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
Prähybridisierungspuffer:	1 M NaCl 1 % Na-Pyrophosphat 50 mM TRIS/Cl pH 7,5 0,2 % BSA 0,2 % Ficoll 400 0,2 % Polyvinylpyrolidon 1 % SDS 5 mM EDTA Steril filtrieren und bei 37°C aufbewahren
Hybridisierungspuffer:	4x SET 1 % SDS 1 % NaPP (Na-Pyrophosphat) 0,5 mg/ml Heparin
10x SET:	150 mM NaCl 2 mM EDTA 30 mM Tris/Cl pH 7,4
Reaktionspuffer :	0,5 M Tris 0,1 M MgCl ₂ 1 mM DTE 2 mg/ml BSA
Waschpuffer:	2x SSC mit 1 % SDS

2.8.13 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ermöglicht die Darstellung eines definierten DNA-Abschnitts innerhalb des Genoms. Grundlage der FISH stellt die Zusammenlagerung einzelsträngiger Nukleinsäuren zu komplementären Doppelsträngen dar. Dafür wird eine einzelsträngige DNA-Sonde verwendet, welche durch *nick translation* mit z.B. Biotin oder Digoxigenin, markiert wird (Rigby et al., 1977; Langer et al., 1981). Die Sonde wird denaturiert und auf einen ebenfalls denaturierten DNA-Abschnitt eines Chromosoms der Zielzelle hybridisiert. Die Detektion erfolgt über Fluorochrom-gekoppelte Antikörper.

In der vorliegenden Arbeit wurde die FISH-Methode angewandt, um die homologe Rekombination eines *targeting*-Vektors in embryonale Stammzellen der Maus zu überprüfen. Es wurde zwei verschiedene Digoxigenin-markierte DNA-Sonden verwendet. Eine Sonde stellt das *Shox2-knockout* / *SHOX-knockin*-Konstrukt (AG3, siehe 3.1.1.1) selbst dar und umfasst 9,7 kb. Bei der zweiten Sonde handelt es sich um den BAC RP23-103 D17 mit einer Größe von 181 kb (siehe 2.3.1).

Metaphasen-Chromosomenpräparation adherent wachsender Zellen

- Zellen in 250 ml Kultuflasche bis zu einer Konfluenz von 60 % wachsen lassen
- Zugabe von 270 µl Colcemidlösung (10 µg/ml) zu 20 ml Medium (Endkonzentration: 0,135 µg/ml) und Inkubation für 2-5 h bei 37°C.
- Medium abnehmen und Zellen 1 x mit PBS waschen
- 20 ml 0,0375 M KCl-Lösung tropfenweise zugeben, dabei Suspension leicht vortexen und 15-20 min bei 37°C inkubieren
- 10 min bei 1200 rpm zentrifugieren
- Überstand bis auf 3-5 ml abnehmen und Zellen resuspendieren
- 15-20 ml frisch angesetztes Fixativ (Methanol:Eisessig 3:1) tropfenweise zugeben, Suspension dabei leicht vortexen
- 10min bei 1200 rpm zentrifugieren
- Vorgang 3 x wiederholen
- Lagerung des Pellets in Fixativ bei -20°C
- Zum Auftropfen das Zellpellet in maximal 0,5-1 ml Fixativ resuspendieren und 1 Tropfen auf Objektträger auftropfen

Herstellung der Sonden

Für eine *nick translation* werden folgende Bestandteile benötigt:

0,1 M β -Mercaptoethanol	5 μ l
Nukleotidmix	5 μ l
Digoxigeninenin-11-dUTP	1 μ l
Cosmid-DNA	1 μ g
10x NT-Puffer	5 μ l
ddH ₂ O	ad 47 μ l

- Kurz mischen, zentrifugieren und auf Eis stellen
- 1 μ l DNA-Polymerase I (5 U/ μ l) und 2 μ l DNase (frisch verdünnt auf 1:1000 in H₂O bidest) hinzu gegeben, ca. 60 Minuten bei 15°C im Wasserbad inkubieren.
- 5 μ l des Reaktionsansatzes werden anschließend mit Hilfe eines 1 %igen Agarose-Gels auf die Größe der entstandenen Fragmente analysiert, der restliche Ansatz währenddessen auf Eis gehalten. Bei einer durchschnittlichen Fragmentgröße von ca. 500 bp wird die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l Stoppmix gestoppt, liegt die durchschnittliche Fragmentgröße noch darüber, wird der Verdau fortgesetzt, eventuell unter Zugabe von DNase I. Anschließend wird die Fragmentgröße erneut mit einem 1 %igen Agarose-Gel analysiert.

Aufreinigung der DNA über eine Sephadex-G50-Säule

- Eine sterile 1 ml Spritze bis zur 0,1 ml Marke mit Watte stopfen und in ein 15 ml Falconröhrchen stellen
- Watte mit 0,5 ml 1x TE pH8 + 0,1 % SDS (bei 4°C gelagert) spülen, anschließend mit Pasteurpipette das in 1x TE pH8 + 0,1 % SDS vorgequollene Sephadex-G50 luftblasenfrei bis zum oberen Rand in die Spritze einfüllen und 7 min bei 2000 g zentrifugieren
- Zwischen Spritze und Falconröhrchen ein 1,5 ml Schraubreagiergefäß setzen, um das im nächsten Schritt entstehende Eluat aufzufangen.
- Reaktionsansatz der fertigen *nick translation* auf die Säule auftragen und 7 min bei 2000 g zentrifugieren.

Die markierte Sonde wird mit dem Eluat aufgefangen, während nicht eingebaute Nukleotide und Bromphenolblau in der Säule verbleiben.

Hybridisierung

Vorbehandlung der Objektträger:

- Die einige Tage zuvor mit ES-Zell-Suspension betropften Objektträger für 10 min in 70 %igem Ethanol waschen
- Anschließend kurz in 2x SSC-Puffer äquilibrieren.
- RNase-Behandlung: pro OT 150 µl RNase-Lösung (0,75 µl RNase-Stocklösung auf 150µl 2x SSC, d.h. 1:200 verdünnt) herstellen und auf Deckgläschen geben. Dieses mit Objektträger aufnehmen und für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3 x 5 Minuten in 2x SSC bei 37°C waschen.
- Pepsinverdau: 50 ml ddH₂O mit verdünnter HCl auf pH2 einstellen und auf 37°C vorwärmen. Zugabe von 25 – 50 µl Pepsin-Stock (je nach Verschmutzung der Objektträger mit Cytoplasmaresten o.ä.). Verdau für 10 min bei 37°C.
- 2 x 5 min in 1x PBS bei RT waschen, dann 1 x 5 min in 1x PBS + 50 mM MgCl₂ waschen.
- Postfixierung in 1 % Formaldehyd in PBS/MgCl₂ (1,3 ml 37 %iges Formaldehyd in 50 ml PBS/ MgCl₂) für 10 min bei RT.
- 1 x 5 min in 1x PBS bei RT waschen.
- 3 x 3 min in aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %) waschen. Lufttrocknen.

Denaturierung der Chromosomen-DNA

- Wasserbad auf 73°C aufheizen.
- 100 µl Formamid/SSC auf Deckglas geben und mit Objektträger aufnehmen. Präparat flach auf den Boden einer Metallschale legen und die Metallschale für exakt 90 sec in das 73°C warme Wasserbad legen.
- Objektträger aus Schale nehmen, Deckglas abschlagen und sofort in eiskaltem 70 %igem Ethanol abschrecken.
- 3 x 3 min in aufsteigender eiskalter Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %) waschen. Lufttrocknen.

Aufarbeitung der Sonden

- Pro Hybridisierung werden etwa 100 ng Sonden-DNA eingesetzt, was nach *nick translation* und Aufreinigung etwa einem Volumen von 10 µl entspricht.

H ₂ O	40 µl
DNA (p9 und spezifische Sonde)	je 10 µl
COT Human DNA	30 µl
Salmon Sperm	5 µl
3 M NaAc	5 µl
EtOH	250 µl

Kurz mischen und für mindestens 2 h bei -20°C inkubieren.

- DNA für 30 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugieren, Überstand abgießen.
- Pellet mit 70 %igem EtOH waschen und für 5 min in der Vakuumzentrifuge trocknen.
- DNA-Pellet in 5 µl deionisiertem Formamid (pH 7.0) bei 37°C im Wasserbad für mindestens 30 min lösen.
- Zugabe von 5 µl Hyb-Mix (2x SSC, 20 % Dextransulfat), gut mischen.
- Zur Denaturierung der Sonde 5 min bei 75°C im Wasserbad inkubieren.
- Die Reaktion wurde für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert, um eine Anlagerung (*preannealing*) der hochrepetitiven Sequenzen an die Chromosomen zu erreichen.

Hybridisierung:

- Die aufgearbeiteten Sonden auf ein 18 x 18 mm Deckglas pipettieren, mit Objektträger aufnehmen und mit Fixogum abdichten.
- Inkubation der Präparate über Nacht in einer Metallschale im 37°C Wasserbad.

Detektion:

- Fixogum und Deckgläschen entfernen, Waschen der hybridisierten Objektträger in Glasküvette:
 - 3 x 5 min in 2x SSC bei 37°C
 - 3 x 5 min in 0,2x SSC bei 55°C
- Objektträger kurz in auf 37°C vorgewärmtem 4x SSC-Tween (0,1 % Tween-20) äquilibrieren.
- Blocken der Objektträger in 4x SSC-Tween + 3 % BSA. 150 µl Blocking Lösung auf Deckgläschen auftropfen, mit Objektträger aufnehmen und für 30 min in feuchter Kammer bei 37°C inkubieren.
- Kurzes Waschen der Objektträger in 4x SSC-Tween.

- α -Digoxigenin (Maus) 1:500 in 4x SSC/Tween + 1 % BSA verdünnen, auf Deckglas geben und mit Objektträger aufnehmen. Inkubation für 30 min bei 37°C in feuchter Kammer.
- Waschen der Objektträger: 3 x 5 min in 4x SSC-Tween bei 37°C.
- α -Maus-Cy3 (Schaf) 1:500 in 4x SSC/Tween + 1 % BSA verdünnen, auf Deckglas geben und mit Objektträger aufnehmen. Inkubation für 30 min bei 37°C in feuchter Kammer.
- Waschen der Objektträger: 3 x 5 min in 4x SSC-Tween bei 37°C.
- Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI und Propidiumiodid:
Einstellen der Objektträger in Küvette mit Färbelösung, 3 min im Dunkeln inkubieren.
- Mehrmaliges kurzes Waschen der Objektträger mit VE-Wasser, im Dunkeln lufttrocknen lassen.
- 1-2 Tropfen DABCO (lichtempfindlich) pro OT aufbringen, mit Deckgläschen abdecken, im Trockenblock trocken streichen und bei 4°C lichtgeschützt lagern.

Puffer und Lösungen

Antikörper	α -Digoxigenin (Maus; Sigma) α -Maus-Cy3 (Schaf; Dianova)
β -Mercaptoethanol (Sigma)	100 mM
Digoxigenin-11-dUTP (Roche)	1 nmol/ μ l
BSA (AppliChem)	Rinderserumalbumin
Colcemid (Roche)	10 μ g/ml
CotI-DNA (Roche)	1 μ g/ μ l
DABCO	2,3 % Diazabicyclo [2,2,2] octan (460 g ad 20 ml) (Sigma) 9 Teile Glycerin 1 Teil 0,2 M Tris-HCl pH 8,0 (Roth)
DAPI-Stammlösung	0,2 mg/ml in H ₂ O bidest
DAPI/Propidiumiodid-Färbelösung	10 ml 4x SSC-Tween 2 μ l Propidiumiodid (1 mg/ml) (Sigma) 1,5 μ l DAPI-Stammlösung
Dextransulfat (GE)	
DNase (Roche)	1 mg/ml
DNA-Polymerase I (Roche)	<i>nick translation grade</i>
Fixogum (Marabu)	
Formaldehyd (Merck)	37%ige Stammlösung

Formamid (Merck)	
Natriumacetat (Riedel deHaen)	
NT-Puffer (10x)	0,5 M Tris HCl pH 7,5 50 mM MgCl ₂ (Merck) 0,5 mg/ml BSA
PBS (10x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl (J.T.Baker) 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O (AppliChem) 1,4 mM KH ₂ PO ₄ (Merck) ad 1 l H ₂ O
Pepsin-Stammlösung	10 % (w/v)
Phytohämagglutinin L (Remel)	
RNase A-Stock	20 mg/ml RNase A (Roche) 10 mM Tris-HCl pH7,5 15 mM NaCl 15 min kochen bei -20°C aufbewahren
Salmon Testes DNA (Sigma)	11 mg/ml
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat (AppliChem) ad 1 l H ₂ O, pH 7,4 einstellen mit HCl
4x SSC-Tween	200 ml 20 x SSC 800 ml H ₂ O 1 ml Tween-20
Stoppmix	0,1 % Bromphenolblau (Sigma) 0,5 % Dextranblau (Sigma) 0,1 M NaCl (AppliChem) 1 Teil 0,2 M Tris-HCl pH 8,0 (Roth)
Tween-20 (Roth)	

2.9 RNA-basierte Methoden

2.9.1 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen und Geweben erfolgte mit TRIZOL (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben. Alle RNAs wurden anschließend spektrometrisch mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) auf Reinheit und Konzentration getestet.

2.9.2 cDNA-Synthese

Isolierte RNA wurde mit dem SuperScript II Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen) entsprechend folgendem Protokoll in cDNA umgeschrieben:

Oligo-Anlagerung:	Oligo(dT) (50 mM)	1 µl
	Random Hexamer Primer	1 µl
	dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
	RNA	1 µg
	ddH ₂ O	ad 10 µl
Inkubation:	65°C	5 min
	4°C	1 min
Reverse Transkription:	10 x First Strand Puffer	2 µl
	MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
	DTT (0,1 M)	1 µl
	RNase OUT (40 U/µl)	1 µl
	Super Script II Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1 µl
Inkubation:	42°C	52 min
	70°C	15 min
RNaseH-Verdau:	RNaseH	1 µl
Inkubation:37°C	20 min	

Für den anschließenden Einsatz in quantitative-RT-PCRs wurden die cDNAs 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

2.9.3 Quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR)

Um die Menge an Transkripten eines bestimmten Gens in cDNA-Proben quantitativ zu bestimmen, wurden Real-Time-PCRs durchgeführt. Das PCR-Gerät (ABI 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) detektiert dabei die DNA-Amplifikation in Echtzeit. Der verwendete Reaktionsmix (Absolute SYBR Green ROX Mix, ABgene) enthält unter anderem den Farbstoff SYBR Green. Dieser interkaliert während der qRT-PCR in die neugebildete doppelsträngige DNA und erlaubt damit die Quantifizierung der entstandenen PCR-Produkte. Alle Proben wurden in Duplikaten oder Triplikaten gemessen. Die relativen Expressionswerte verschiedener Gene wurden entsprechend der delta-delta-CT-Methode (Pfaffl, 2001) durch Normalisierung auf mehrere *housekeeping*-Gene (*Sdha*, *Hprt1*) ermittelt. Alle verwendeten Primerpaare (siehe 2.3.2) wurden zuvor getestet und auf ihre Eignung für die qRT-PCR geprüft.

Reaktionsansatz:

2 x Reaktionsmix	10 µl
Primermix for/rev (je 10 pmol/µl)	0,4 µl
cDNA	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

qRT-PCR-Programm:

Initialisierungsschritt	25°C	30 min	
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	} 40 Zyklen
Primeranlagerung und Elongation	60°C	1 min	
Schmelzkurve	60-95°C		

2.9.4 *nCounter*-Analyse

Das *nCounter*-System (Nanostring Technology) stellt ein vollautomatisches System zur Analyse der Genexpression dar und wurde in dieser Arbeit, neben der qRT-PCR, zur Validierung putativer *Shox2*-Zielgene verwendet. Mittels eines Sets an Fluoreszenzmarkierten Sonden von ca. 100 bp Länge, dem so genannten *codeset*, kann die direkte Anzahl an RNA-Molekülen bestimmt werden, was eine Umschreibung der RNA in cDNA überflüssig macht. Diese Technik erlaubt die Quantifizierung von bis zu 800 Gentranskripten in einer Probe, wobei lediglich eine geringe Menge an RNA (100 ng Gesamt-RNA/Probe) erforderlich ist.

Es wurden jeweils 100 ng der Gesamt-RNA mit Reporter- und Fixierungssonden (*codeset*) versetzt und in Triplikaten gemessen. Nach Hybridisierung, Probenaufreinigung sowie Dokumentation wurde die Anzahl an Transkripten für jedes zu untersuchende Gen mit Hilfe eines speziellen Excel-Makros analysiert. Die zur Hintergrundkalkulation verwendeten Normalisierungsgene wurden mit Hilfe der geNorm Methode (Vandesompele et al., 2002) aus den Kandidatengenen des *codesets* ausgewählt und deren geometrischer Mittelwert als Normalisierungsfaktor genutzt.

2.9.5 Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix GeneChip Array Technologie

Um differentiell exprimierte Gene in embryonalen Gliedmaßen von Wildtyp- und *Shox2*-*knockout*-Embryonen zu identifizieren, wurden MOE 430 Plus2 Chips der Firma Affymetrix eingesetzt. Mit diesen Chips lässt sich die Expression von insgesamt 39.000 verschiedenen

murinen Gentranskripten untersuchen. Pro *array* wurde Gliedmaßengewebe von zwei Würfeln mit je drei Embryonen jeden Genotyps präpariert und anschließend die RNA daraus isoliert (siehe 2.9.1). Die nachfolgende Markierung der RNA, die Chip-Hybridisierungen sowie die statistische Auswertung der generierten Expressionsdaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Norbert Gretz vom Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Fakultät Mannheim und wurden laut Angaben der Hersteller durchgeführt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der JMP Genomics 4.0 Software der Firma SAS und basiert auf der Varianzanalyse (ANOVA).

2.9.6 *In vitro* Synthese markierter RNA-Sonden

Die Herstellung von RNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen erfolgte mittels *in vitro* Transkription. Hierfür wurde zunächst eine für das nachzuweisende Gen spezifische ca. 400-600 bp lange Sequenz in den Vektor pSTBlue-1 kloniert. Nach einem entsprechenden Linearisierungs-Verdau (siehe 2.8.6) des Konstrukts konnte die RNA über die Promotoren SP6 und T7 in *sense*- oder *antisense*-Richtung in RNA transkribiert werden.

Reaktionsansatz:

Linearisierter Vektor	1 µg
10 x Transkriptionspuffer	2 µl
10 x Digoxigenin oder Fluorescein Labeling Mix	2 µl
RNase OUT (40 U/µl)	1 µl
SP6-, T3- oder T7-Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

- 2-3 h bei 37°C inkubieren.
- 1 µl TurboDNase (2 U/µl) zugeben und 15 min bei 37°C inkubieren.
- DNase durch Zugabe von 0,8 µl EDTA (0,5 M) inaktivieren.
- Fällung der RNA durch Zugabe von 1,3 µl LiCl (8 M) und 70 µl EtOH und anschließende Inkubation für 1 h bei RT oder ü.N. bei -20°C .
- Abzentrifugieren, Pellet mit 75 % EtOH waschen, abzentrifugieren, Pellet trocknen und in 20 µl 1 x SSC/50 % Formamid aufnehmen.

2.9.7 *In situ* Hybridisierungen

Die Methode der *in situ* Hybridisierung (ISH) erlaubt die spezifische Darstellung der Expression von mRNA in Gewebsschnitten oder ganzen Embryonen. Grundlage dieser Methode stellt die Hybridisierung einer markierten (Digoxigenin oder Fluorescein) *antisense*-RNA-Sonde mit endogener mRNA dar. Durch Bindung eines entsprechenden alkalische

Phosphatase-gekoppelten Antikörpers (α -Digoxigenin-AP oder α -Fluorescein-AP) kann nach Zugabe des jeweiligen Substrats (BM-Purple oder INT-BCIP) eine farbliche Präzipitation erzeugt werden (blau oder rot).

2.9.7.1 *Whole mount in situ* Hybridisierungen

Mittels *whole mount in situ* Hybridisierung kann die mRNA-Expression in ganzen Embryonen dargestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Mausembryonen verschiedener Stadien (E9.5-E13.5) und Genotypen (WT, *Shox2*^{-/-}, *Tbx4*^{-/-}) verwendet.

- Rehydrierung der Embryonen durch Methanolreihe.
- 3 x 5 min mit PBS-T waschen.
- Proteinase K-Behandlung: 10 μ g/ml Proteinase K in PBS-T für 15-45 min.
- Kurz waschen mit 2 mg/ml Glycin in PBS-T.
- 3 x 5 min mit PBS-T waschen.
- 15 min fixieren mit 4 % PFA in PBS-T.
- 3 x 5 min mit PBS-T waschen.
- 3 min waschen mit 50 % PBS-T/50 % Hybridisierungspuffer.
- 3 min waschen mit Hybridisierungspuffer.
- 1 h inkubieren mit Hybridisierungspuffer bei 65°C.
- 3 h inkubieren mit 900 μ l Hybridisierungspuffer bei 65°C.
- 1 μ l RNA-Sonde zu 99 μ l Hybridisierungspuffer geben, kurz aufkochen, auf Eis abkühlen und zu den Embryonen geben.
- Ü. N. bei 70°C hybridisieren.
- 2 x 30 min waschen mit Hybridisierungspuffer bei 70°C.
- 5 min waschen in 800 μ l Hybridisierungspuffer bei 70°C, 3x im Abstand von jeweils 5 min Zugabe von 400 μ l 2x SSC pH 4,5.
- 2 x 30 min waschen mit 2x SSC pH7/0,1% CHAPS bei 70°C.
- 2 x 10 min waschen mit MAB-T bei RT.
- 2 x 30 min waschen mit MAB-T bei 70°C.
- 2 x 10 min waschen mit PBS-T bei RT.
- 1 x 5 min waschen mit PBS-T bei RT.
- Embryonen 2 h mit Blocking Reagenz ohne Antikörper bei 4°C leicht schütteln.
- α -Digoxigenin- oder α -Fluorescein-Antikörper 1:10.000 in Blocking Reagenz verdünnen, 2 h bei 4°C leicht schütteln.
- Antikörpermix zu Embryonen geben, ü. N. bei 4°C inkubieren.
- Embryonen 5 x 45 min mit 0,1 % BSA/PBS-T waschen.
- 2 x 30 min mit PBS waschen.

- 2 x 10 min mit AP1 waschen.
- Embryonen mit BM-Purple Färbelösung (Roche) im Dunkeln bei RT oder 4°C inkubieren, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht ist.
- Gründlich mit PBS-T waschen, fotografieren.

Puffer und Lösungen

1x PBS (RNase-frei):	137 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,7 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
1x PBS-T (RNase-frei):	1x PBS mit 0,1 % Tween-20
20x SSC (RNase-frei):	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7
1x MAB:	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5
MAB-T:	1x MAB mit 0,1 % Tween-20
Blocking Reagenz (RNase-frei):	10 % Pferdeserum (hitzeinaktiviert) 1 % Boehringer Blocking Reagenz (BBR) In PBS-T
AP1-Puffer:	100 mM Tris pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
Hybridisierungspuffer (RNase-frei):	1 % BBR 50 % Formamid 1 mg/ml Torula-RNA 100 µg/ml Heparin 0,1 % Tween-20 0,1 % CHAPS 5 mM EDTA In 5x SSC

2.9.7.2 *In situ* Hybridisierungen auf Gefrierschnitte

Anfertigen von Gefrierschnitten

Um Gefrierschnitte anzufertigen, wurden fixierte Embryonen bei 4°C in einer 30 %igen Saccharose-Lösung ü. N. äquilibriert und anschließend in Einbettmedium (Jung) auf einem Trockeneis-Ethanol-Gemisch eingefroren. Die Proben können so längere Zeit bei -80°C gelagert werden. Mit Hilfe eines Kryotoms CM 3050S (Leica) wurden 16 µm dicke Schnitte angefertigt, und auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Scientific) aufgezogen. Die Schnitte wurden 30 min bei RT getrocknet und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

In situ Hybridisierung auf Gefrierschnitte

- Objektträger auftauen, bei 50°C trocknen lassen.
- 20 min mit 4 % PFA in PBS-T fixieren.
- 2 x 5 min waschen mit PBS.
- Proteinase-K-Behandlung: 5 µg/ml Proteinase K in PBS, 6 min.
- 1 x 5 min waschen mit PBS.
- 15 min mit 4 % PFA in PBS-T fixieren.
- 1 x kurz in DEPC-Wasser waschen.
- Acetylierung: 10 min auf Schüttler waschen mit 0,25 % Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin-HCl pH 8.
- 1 x 5 min waschen mit PBS.
- Metallbox für Hybridisierung vorbereiten: Papiertücher mit Boxpuffer tränken und auf dem Boden der Metallschale auslegen.
- In Metallbox: Schnitte 3 h mit Hybridisierungspuffer bei 65°C prähybridisieren.
- Je Objektträger 0,5 µl unverdünnte RNA-Sonde in 500 µl Hybridisierungspuffer geben, Schnitte damit ü. N. bei 68°C hybridisieren.
- 15 min waschen mit 2x SSC bei 65°C.
- 5 min waschen mit 2x SSC bei RT.
- RNase-Behandlung: 10 µg/ml RNase A und 1 U/ml RNase T1 in 2x SSC, 40 min bei 37°C.
- 2 x 5 min waschen mit 2x SSC bei RT.
- 2 x 5 min waschen mit 0,2x SSC bei 65°C.
- 1 x 5 min waschen mit 0,2x SSC bei RT.
- 2 x 20 min waschen mit PBT bei RT.
- 1 h Blocken mit 10 % Pferdeserum in PBT.

- α -Digoxigenin-Antikörper 1:2000 in 10 % Pferdeserum in PBT verdünnen, ü. N. bei 4°C inkubieren.
- 3 x 20 min waschen mit PBT bei RT.
- 2 x 5 min waschen mit Alkaline Phosphatase-Puffer (AP-Puffer).
- NBT/BCIP (Roche) 1:100 in AP-Puffer verdünnen, auf Schnitte geben, im Dunkeln bei RT oder 4°C inkubieren, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht ist.
- Gründlich in PBS waschen.
- 15 min mit 4 % PFA in PBS-T postfixieren.
- Mit Kaiser's Glycerolgelatine (Merck) einbetten, fotografieren.

Puffer und Lösungen

Boxpuffer:	50 % Formamid 5x SSC
PBT:	1x PBS 2 mg/ml BSA 0,1 % Triton X-100
AP-Puffer:	100 mM Tris pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 0,1 % Tween-20

PBS, PBS-T, 20x SSC, Hybridisierungspuffer: siehe Protokoll WISH oben

Für die Doppel-ISH wurden zwei unterschiedlich markierte Sonden (Digoxigenin und Fluorescein) gleichzeitig hybridisiert, wobei die Sonde für das schwächer exprimierte Gen mit Fluorescein markiert und die für das stärker exprimierte Gen mit Digoxigenin markiert wurde. Um die Sonden zu detektieren, wurden die entsprechenden α -Digoxigenin-AP (Roche) und α -Fluorescein-AP (Roche) gekoppelten Antikörper nacheinander verwendet. Der Nachweis der Antikörper erfolgte mittels verschiedener Farbreaktionen. Zunächst wurde der α -Fluorescein-AP gekoppelte Antikörper mittels BM-Purple Färbelösung (Roche), welche ein blaues Präzipitat erzeugt, nachgewiesen. Bevor eine zweite Färbung erfolgen konnte, war die Hitzeinaktivierung der alkalischen Phosphatase-Aktivität (Inkubation für mehrere h bei 65-70°C) erforderlich. Anschließend wurde der α -Digoxigenin-AP gekoppelte Antikörper mit INT-BCIP Färbelösung (Roche) nachgewiesen, welche ein rotes Präzipitat erzeugt.

2.10 Protein-basierte Methoden

2.10.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zellen

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellen, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen, dann in modifiziertem RIPA-Puffer (100-300 µl/6-Well-Schale; ca. 500 µl/10 cm-Schale) lysiert und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde das Zelllysate bei 13000 rpm und 4°C für 20 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce).

Modifizierter RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8
150 mM NaCl
1 % NP-40
0,25 % Na-Deoxycholat
1 mM EDTA
Proteinase-Inhibitor-Mix G (Serva)

2.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Assay)

Um die Proteinkonzentration eines Extraktes zu bestimmen, wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce) verwendet. Hierfür wurden 5 µl Zelllysate mit 20 µl Lysispuffer verdünnt, 200 µl BCA-Reagenz (A:B = 50:1) zugegeben, die Probe bei 37°C für 30 min inkubiert und die Konzentration danach mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) anhand einer Referenzkurve bestimmt.

2.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch SDS-PAGE können Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). In der vorliegenden Arbeit wurde dafür das Novex MiniCell Systems (Invitrogen) verwendet. Zunächst wurde ein 12 %iges Trenngel hergestellt und mit ddH₂O überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wurde das Sammelgel (5 %) über das Trenngel gegossen und mit einem Kamm versetzt. Zu den Proben wurden je 5 µl 5 x SDS Probenpuffer gegeben und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die entsprechend vorbereiteten Proben sowie der Standard geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 125 V und 35 mA für ca. 2 h. Anschließend wurde das Gel entweder mit Coomassie-Lösung gefärbt oder die Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert.

5 x SDS Probenpuffer: 0,225 M Tris/HCl pH 6,8
50 % Glycerol
5 % SDS
0,05 % Bromphenolblau
0,25 M DTT

10 x Laemmli-Puffer (Gel-Laufpuffer): 0,25 M Tris / HCl pH 8,3
2,5 M Glycin
1 % SDS

2.10.4 Western Blot-Analysen

Die Methode des Western Blots ermöglicht den Transfer von Proteinen auf spezielle Membranen, um diese anschließend mit Hilfe immunhistochemischer Methoden spezifisch nachweisen zu können.

Western Blot:

- PVDF-Membran zuschneiden, kurz in Methanol äquilibrieren.
- Blot in XCell Blottingapparatur aufbauen: 3 Blottingpads, 3 Whatman 3M Papiere, Gel, Membran, 3 Whatman 3M Papiere, 3 Blottingpads, alles in 1 x Transferpuffer/ 10 % MeOH getränkt. Blotten mit 125 mA und 25 V für 2,5 h.

10 x Transfer-Puffer: 0,25 M Tris/HCl pH 8,3
2,5 M Glycin
10 % Methanol

Detektion:

Die Detektion erfolgte über das LI-COR Infrared Imaging System unter Verwendung spezieller Sekundärantikörper, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren.

- Geblottete Membran für 1 h blocken in Block-Lösung (50 % Odyssey Blocking Solution (LI-COR)/50 % PBS).
- Primären Antikörper in Block-Lösung (50 % Odyssey Blocking Solution/50 % PBS-T) verdünnen (1:500-1:5.000 je nach Antikörper), Membran über Nacht bei 4°C inkubieren.
- 4 x 5 min mit PBS-T waschen.
- Sekundären Antikörper 1:10.000 in Block-Lösung (50 % Odyssey Blocking Solution/50 % PBS-T) verdünnen, Membran 1 h bei RT inkubieren.
- 4 x 5 min mit PBS-T waschen.
- Dokumentation mit LI-COR Odyssey Infrared Imager, Auswertung mit Odyssey V3.0 Analyse Software.

2.10.5 Proteinexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für den Einsatz von TBX4-Protein im *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) wurde TBX4 als GST-Fusionsprotein bakteriell exprimiert und anschließend über den GST-Tag aufgereinigt. Hierzu wurden das in dieser Arbeit klonierte pET-41a(+) *TBX4*-Konstrukt verwendet. Das pET-Vektorsystem erlaubt eine kontrollierte Proteinexpression mit Hilfe des Lac-Repressor-Systems. Die pET-41a(+) *TBX4*-Konstrukt wurde in den *E.coli*-Stamm Rosetta Gami (DE3)pLysS transformiert, welcher für Proteinexpressionen und -aufreinigungen optimiert wurde.

Proteinexpression:

- Animpfen einer Starterkultur (15 ml LB-Medium + Antibiotikum) und Inkubation über Nacht bei 37°C.
- Ca. 5 ml dieser Übernachtskultur in 100 ml frischem LB-Medium inokulieren, so dass eine $OD_{600} = 0,1$ erreicht wird.
- Bei 25°C im Schüttler wachsen lassen, bis eine $OD_{600} = ca. 0,5$ erreicht ist.
- Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG, 100 mM Stock) auf eine Endkonzentration von 1 mM (1 μ l/ml Kultur).
- 4 h bei 25°C im Schüttler weiterwachsen lassen, anschließend bei 3500 g für 15 min in 50 ml Reaktionsgefäßen ernten.
- Das Zellpellet bis zur Weiterverwendung bei -20°C einfrieren.

Proteinaufreinigung (Frangioni und Neel, 1993):

- Zellpellet auf Eis auftauen.
- In 1 ml NETN resuspendieren.
- Zellen 4 x für 20 sec sonifizieren, dazwischen jeweils 1 min auf Eis ruhen lassen.
- Überführen in 2 ml Reaktionsgefäße und für 10 min bei 13.000 rpm bei 4°C abzentrifugieren.
- In der Zwischenzeit pro aufzureinigendem Ansatz 100 μ l Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) 3 x mit je 100 μ l NETN-Puffer waschen.
- Zellüberstand mit den gewaschenen *beads* mischen und für 2 h bei 4°C im Überkopffrotor inkubieren.
- *Beads* 4 x mit je 200 μ l NETN waschen und in 100 μ l NETN resuspendieren (5 μ l für Testgel zurückbehalten).
- Für die Elution der Proteine von den *beads* die *beads*-Protein-Mischung abzentrifugieren, das Pellet mit 30 μ l Elutionspuffer versetzen und 15 min bei 4°C im

Überkopfschüttler rotieren lassen. Nach Zentrifugation stellt der Überstand das Eluat dar.

- Den Elutionsschritt 3 x wiederholen, so dass am Ende 4 verschiedene Fraktionen erhalten werden.
- Erfolgskontrolle durch SDS-PAGE (siehe 2.10.3) mit anschließender Coomassie-Färbung (Einsatz von je 5 µl der Eluatfraktionen).

NETN-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0
 100 mM NaCl
 1 mM EDTA
 0,5 % NP-40
 Protease-Inhibitor-Mix G (10 µl/ml Puffer, Serva)

Elutionspuffer: 10 mM Glutathion
 50 mM Tris/HCl pH 8,0

2.10.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die spezifische Interaktion zwischen Proteinen und DNA wurde mit Hilfe von Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) analysiert. Dazu wurden zunächst doppelsträngige DNA-Fragmente aus einzelsträngigen Oligonukleotiden mit der zu untersuchenden Nukleotidsequenz hergestellt, und diese durch Einbau von α - ^{32}P dCTPs an die DNA-Enden radioaktiv markiert.

Oligo-Annealing:

- Je 5 µl Oligonukleotid for und rev (500 pmol)
- 5 µl 10 x PCR-Puffer
- 35 µl H₂O

5 min bei 95°C denaturieren und langsam auf RT abkühlen (30 min), um Einzelstränge zusammenzulagern. Doppelsträngige Oligonukleotide auf 0,2 pmol/µl verdünnen.

Radioaktive Markierung:

- 10 µl Annealing Reaktion (2 pmol zusammengelagerte Oligos)
- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer (EurogenTec)
- 1,5 µl MgCl₂
- 1 µl dNTP-Mix (je 5 mM) ohne dCTPs
- 3 µl α - ^{32}P dCTP, 10 µCi/µl (Hartmann Analytic)
- 2 µl Taq-Polymerase
- 6 µl ddH₂O

60 min bei 70°C inkubieren, abkühlen lassen und auf eine Endkonzentration von 20 fmol/µl verdünnen.

Die doppelsträngigen, radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden 10 min mit GST-aufgereinigten Proteinen (siehe 2.10.5) in EMSA-Puffer inkubiert und die entstehenden DNA-Proteinkomplexe auf nativen SDS-Gelen aufgetrennt (1 h, 100 V, 12 mA; Laufpuffer 0,25 x TBE). Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele getrocknet und die markierten DNA-Stücke mit einem Amersham Hyperfilm Röntgenfilm (GE Healthcare) detektiert.

10 x TBE:	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 0,02 M EDTA pH 8,0
EMSA-Puffer:	15 mM HEPES pH 7,5 60 mM 3 M NaCl 1 mM EDTA pH 7,5 0,05 % NP-40 7,5 % Glycerol 0,25 mg/ml BSA 4 mM Spermidin 0,5 mM DTT 0,5 µg/100 µl Poly (dl/dC)

Natives 5 % TBE-Polyacrylamidgel:	24,05 ml H ₂ O 0,75 ml 10 x TBE 5 ml 30 % Bis-/Acrylamid-Lösung 0,2 ml 10 % Ammoniumpersulfat 20 µl TEMED
-----------------------------------	--

2.11 Zellbasierte Methoden

2.11.1 Kultivierung von Zelllinien und MEFs

HEK293-, NHDF-Zellen und embryonale Fibroblasten der Maus (MEFs) wurden standardmäßig bei 37°C, 5% CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (Greiner) bzw. 10 cm Schalen (Falcon) inkubiert. Alle 2-4 Tage wurde der Mediumüberstand entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin von der Kulturflasche bzw. Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in geeigneten Verdünnungen (1:4 bis 1:20) in frischem Medium ausgesät. Zur Kultivierung der MEFs ist eine Beschichtung der 10 cm Schalen mit 0,1 % Gelatine in PBS vor dem Aussähen erforderlich.

HEK293, NHDF	DMEM high Glucose mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/ Streptomycin
MEFs	DMEM high Glucose mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/ Streptomycin, 1 % L-Glutamin, 1 % NEAA

2.11.2 Transfektion von Zelllinien

Je nach Experiment und Zelllinie wurden unterschiedlichen Transfektionsreagenzien verwendet. MEFs und NHDF-Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) und Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen) transfiziert. Für murine R1- und E14-embryonale Stammzellen wurde das Mouse ES Cell Nucleofector Kit (Lonza) verwendet. Die Anwendung dieser Reagenzien erfolgte nach Empfehlung der jeweiligen Hersteller.

Außerdem wurden HEK293-Zellen mit PEI (Sigma-Aldrich) in einem Verhältnis von 1:3 ($\mu\text{g DNA}:\mu\text{l PEI}$) transfiziert. Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion auf entsprechende Zellkulturschalen (6-well-Platten für Luciferase-Assays) ausgesät. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 30% nach folgendem Protokoll:

- In einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß eine entsprechende Menge serumfreies Medium vorlegen.
- Zugabe der DNA und kurzes Mischen.
- Zugabe des PEI, anschließend vortexen.
- Inkubation für 10 min bei RT.
- Zugabe des PEI-DNA Gemischs zu den Zellen.
- Die Zellen werden nach 24-48 h weiterverarbeitet.

2.11.3 Luziferase-Reporterassays

In Luziferase-Reporterassays wurden verschiedene Promotor- und andere konservierte Bereiche von *TBX4* vor eine *Firefly*-Luziferase in die Vektoren pGL3-basic oder pGL3-promoter kloniert. Außerdem wurde ein weiteres Reporter-Konstrukt verwendet, welches den genomischen Bereich von *SHOX2*, einschließlich verschiedener TBX5- und Brachyury-Bindestellen, enthält. Dieser entspricht dem Vektor hSHOX2a 3793bp-Luc (Puskaric et al., 2010). Durch Messung der Luziferase-Aktivität nach Transfektion der Reporterkonstrukte zusammen mit *SHOX2* (pDEST31 *SHOX2a*) bzw. *TBX4* (pcDNA4/TO/myc-His A *TBX4*)-Expressionsvektoren in Zellen lassen sich so Aussagen über das Regulationspotential des jeweiligen DNA-Abschnitts treffen. Verwendet wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) nach folgendem Protokoll:

HEK293-Zellen

- HEK293-Zellen bzw. wurden in 6-well-Platten ausgesät und mit PEI transfiziert (siehe 2.11.2), alle Transfektionen wurden in Triplikaten durchgeführt.
- Ansatz je Well:

100 µl	DMEM
7,5 µl	PEI
1 µg	Expressionskonstrukt
1 µg	Reporterkonstrukt
0,5 µg	pRL-TK (<i>Renilla</i> Luziferase-Konstrukt als Transfektions- und Normalisierungskontrolle)
- 24-48 h nach Transfektion Zellen mit PBS waschen, mit 300 µl PLB (*Passive Lysis Buffer*, Promega) pro well für 10 min bei RT lysieren und mindestens 2 h bei -80°C einfrieren
- anschließend die Luziferase-Aktivität in 20 µl des Zellextraktes mit dem Luminometer Lucy2 (Anthos) laut Herstellerangaben messen.
- Normalisierung der *Firefly*-Aktivität auf die *Renilla*-Aktivität.

MEFs

- MEFs wurden in 24-Well-Plates ausgesät und transfiziert; alle Transfektionen wurden in Triplikaten durchgeführt.
- Ansatz je Well:

100 µl	Opti-MEM
2 µl	Lipofectamine 2000
200 ng	Expressionskonstrukt
200 ng	Reporterkonstrukt
100 ng	pRL-TK (<i>Renilla</i> Luziferase-Konstrukt als Transfektions- und Normalisierungskontrolle)
- Nach 4-6 h Mediumwechsel.
- 24 h nach Transfektion Zellen mit PBS waschen, mit 75 µl PLB („Passive Lysis Buffer“, Promega) pro Well für 10 min bei RT lysieren und mindestens 2 h bei -80°C einfrieren
- anschließend die Luziferaseaktivität in 50 µl des Zellextrakts mit dem Luminometer Lucy2 (Anthos) laut Herstellerangaben messen.
- Normalisierung der *Firefly*-Aktivität auf die *Renilla*-Aktivität.

2.11.4 Histologische Knorpel-Knochen-Färbungen

Zur Charakterisierung des Phänotyps *Shox2*-defizienter Mausembryonen wurden histologische Färbungen von Knorpel- und Knochengewebe durchgeführt. Hierfür wurde Alizarin-Rot verwendet, was Chelatkomplexe mit Kalzium eingeht und somit die knöchernen Elemente der Gliedmaßen rot einfärbt. Nichtmineralisierte, knorpelige Bereiche wurden mit Alzianblau gefärbt, welches Proteoglykane der extrazellulären Matrix nachweist. Die Färbungen erfolgten an E16.5 WT- und *Shox2*^{-/-}-Embryonen

- Sorgfältig Haut und innere Organe der Embryonen entfernen.
- Fixieren der Embryonen ü. N. in 95 % EtOH bei RT
- Färbung der Embryonen in Alzianblau-Lösung bei RT ü. N.
- Fixieren der Embryonen für 2-5 h in 95 % EtOH bei RT
- Inkubation der Embryonen für 24 h oder länger (abhängig vom Stadium der Embryonen) in 2 % KOH
- Färbung der Embryonen in Alizarin-Rot-Lösung Alizarin-Rot-Lösung bei RT ü. N.
- Inkubation der Embryonen in 1 % KOH / 20 % Glycerin für ca. 2 Tage bei RT
- Aufbewahrung der Embryonen in 1 : 1 Glycerin / 95 % EtOH

Alzianblau-Lösung:

Alcian Blue 8 GX (Sigma)	150 mg
Essigsäure	200 ml
95 % EtOH	ad 1 l

Alizarin-Rot-Lösung:

Alizarin Red S (Sigma)	50 mg
KOH	10 g
ddH ₂ O	ad 1 l

2.11.5 Isolierung von embryonalen Mausfibroblasten (MEFs)

In der vorliegenden Arbeit wurden embryonale Fibroblasten der Maus (MEFs) sowohl zur Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen als auch zur Generierung einer primären Kultur embryonaler Gliedmaßenzellen verwendet. Die Isolierung dieser Zellen erfolgt nach folgendem Protokoll:

- Vor Beginn der Präparation Erlenmeyerkolben mit Glaskugeln und Rührfisch sowie das Präparationsbesteck autoklavieren.
- Das schwangere Muttertier durch Genickbruch (zervikale Dislokation) töten und in 70 % EtOH tauchen.

- Embryonen entnehmen, in PBS Köpfe abtrennen und innere Organe entfernen.
- Gewebe in PBS mit Pinzette so gut wie möglich zerkleinern.
- 40 ml Trypsin (auf 37°C vorgewärmt) zusammen mit den zerkleinerten Gewebestücken in Erlenmeyerkolben geben und für 30 min bei 37°C schütteln.
- Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von 100 ml Kultivierungsmedium, mit Pipette mehrmals pipettieren und auf 50 ml Reaktionsgefäße verteilen.
- Bei 900 rpm für 5 min zentrifugieren und Überstand vorsichtig abnehmen.
- Pellet in frischem Kultivierungsmedium resuspendieren und je nach Embryonenzahl Zellen auf 5-10, zuvor mit 0,1 % Gelatine beschichtete, 10 cm Schalen (Falcon) aussähen.

Um eine primäre Fibroblastenkultur von murinen Gliedmaßenzellen anzulegen, wurden die Vorder- und Hinter-Extremitäten von Mausembryonen des Stadiums E12.5 getrennt präpariert und wie oben beschrieben dissoziiert und kultiviert.

2.11.6 Kultivierung und Manipulation muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene murine embryonale Stammzelllinien (R1 und E14) zur Generierung eines *Shox2-knockout* / *SHOX-knockin*-Mausmodells verwendet, was über die genetische Manipulation dieser Zellen erfolgt. Sie besitzen die Eigenschaft der Pluripotenz und können sich in Kultur unbegrenzt vermehren (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Injiziert man die veränderten Zellen in isolierte Mausblastozysten, haben sie nach Transfer in ein scheinchwangeres Muttertier die Fähigkeit, sich am Aufbau aller fötalen Gewebe zu beteiligen (Bradley et al., 1984).

2.11.6.1 Kultivierung muriner ES-Zellen

Um die Pluripotenz der ES-Zellen zu erhalten, werden diese auf einer Zellschicht embryonaler Mausfibroblasten (MEFs), einem so genannten *feeder layer*, kultiviert (Martin und Evans, 1974). Außerdem wird dem Medium der *leukemia inhibitory factor* (LIF) beigefügt, welcher ebenfalls eine vorzeitige Differenzierung verhindert (Williams et al., 1988; Burdon et al., 1999).

ES-Zell-Medium (alle Lösungen sind in 2.1.2 aufgeführt):

DMEM high Glucose	500 ml
FBS	75 ml
Penicillin/ Streptomycin	6 ml
L-Glutamine	6 ml
NEAA	6 ml
Sodium pyruvate	6 ml
β -Mercaptoethanol-Lsg.	6 ml
LIF	0,5 ml

2.11.6.2 Inaktivierung der MEFs

Bevor ES-Zellen auf die Schicht von MEFs ausgesät werden können, muss deren Teilung durch die Verwendung von Mitomycin inaktiviert werden.

- Medium absaugen und 5 ml Mitomycin C-enthaltendes Medium (Endkonzentration 10 μ g/ml) pro 10 cm Schale auf die Zellen geben, 3 bis maximal 6 h bei 37°C inkubieren.
- Medium absaugen und Zellen 3 x mit PBS waschen.
- Ablösen der Zellen mit 2 ml Trypsin je Schale und inaktivieren des Trypsins mit 4 ml Medium.
- Bei 900 rpm für 4 min zentrifugieren, Pellet resuspendieren und Zellen auf zuvor mit 0,1 % Gelatine in PBS beschichtete 10 cm Schalen aussähen.
- Am nächsten Tag werden die ES-Zellen auf den *feeder layer* ausgesät.

2.11.6.3 Elektroporation der ES-Zellen

Zunächst wurden 60 μ g des *Shox2-knockout / SHOX-knockin*-Konstrukts (AG3) mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *KpnI* linearisiert und über eine NaAc-EtOH-Fällung aufgereinigt. Davon wurden 10 μ g unter Verwendung des Mouse ES Cell Nucleofector Kits (Lonza) nach Angaben des Herstellers in 1×10^6 ES-Zellen elektroporiert.

2.11.6.4 Selektion der ES-Zellen

Die positive Selektion von Zellen, welche den *Targeting*-Vektor in das Genom integriert hatten, erfolgte mit G418 (Endkonzentration 400 μ g/ml Medium) für 7-9 Tage.

2.11.6.5 Vereinzeln der ES-Zellklone

Nach 7-9 Tagen Selektion werden die ES-Zellkolonien mit Hilfe einer Glaskapillare und eines Schlauchs angesaugt und in 96-*well*-Platten transferiert.

- Am Tag zuvor 96-*well*-Platten (Falcon) mit MEFs beschichten.
- MEF-Medium durch 100 µl ES-Zell-Medium ersetzen.
- In eine weitere 96-*well*-Platte 30 µl Trypsin vorlegen.
- Einzelne Kolonien unter dem Mikroskop ansaugen und in die Trypsin-enthaltende 96-*well*-Platte transferieren, für 5-10 min bei RT inkubieren.
- Trypsin durch Zugabe von 100 µl ES-Zell-Medium inaktivieren, Zellen resuspendieren und in MEF-beschichtete 96-*well*-Platte transferieren.

2.11.6.6 Splitten und Einfrieren von ES-Zellen

- Am Tag zuvor 96-*well*-Platten (Falcon) mit MEFs beschichten.
- MEF-Medium durch 100 µl ES-Zell-Medium ersetzen.
- In eine weitere 96-*well*-Platte 50 µl ES-Zell-Medium + 20 % DMSO in jedes *well* vorlegen.
- Medium absaugen und ES-Zellen 1 x mit PBS waschen.
- Je 30 µl Trypsin in jedes *well* geben und für 3-5 min bei 37°C inkubieren.
- Trypsin mit 70 µl Medium pro *well* inaktivieren, Zellen resuspendieren.
- 50 µl dieser Suspension zu 50 µl ES-Zell-Medium + 20 % DMSO geben (Endkonzentration 10 % DMSO, kurz mischen, Platte in Handtuchpapier einwickeln und in Styroporbox bei -80°C einfrieren.
- Die restlichen 50 µl Zellsuspension in neuer MEF-beschichteten 96-*well*-Platte kultivieren.

2.11.6.7 DNA-Isolierung aus ES-Zellen im 96-*well*-Format

Zur Integrationsanalyse des *targeting*-Konstrukts mittels PCR wurde die DNA der vereinzelt Klone im 96-*well*-Format isoliert.

- ES-Zellen für 2 Passagen ohne MEFs kultivieren und dicht wachsen lassen.
- 1 x mit PBS waschen
- je *well* 50 µl Lyse-Puffer + Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) zugeben.
- Die Platte mit feuchten Tüchern in einer gut verschließbaren Box ü. N. bei 60°C inkubieren.
- Am nächsten Tag 100 µl Präzipitationslösung je *well* zugeben und 30 min bei RT stehen lassen, dabei nicht bewegen.
- DNA-Fäden sollten sich als weißes Netz am Boden der *wells* ablagern
- Flüssigkeit abkippen, nicht zulangsam, und 2-3 x auf Papier abtupfen
- 3 x mit 70 % EtOH waschen

- DNA in den wells trocknen lassen und in 20 µl ddH₂O resuspendieren.

Lyse-Puffer: 10 mM Tris pH 7,7
 10 mM EDTA pH 8,0
 10 mM NaCl
 0,5 % Sarcosyl (w/v)
 Proteinase K (Endkonz. 1mg/ml) immer frisch zugeben

Präzipitationslösung: 10 ml 100 % EtOH (-20°C)
 150 µl 5 M NaCl (sollte sich nicht absetzen)

Die Isolierung der ES-Zell-DNA für den Southern Blot ist unter 2.8.2 beschrieben.

2.12 Tierexperimentelle Methoden

2.12.1 Tierhaltung und Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse waren entsprechend den Haltungsvorschriften untergebracht. Sie hatten einen 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser *ad libitum*.

Das *Shox2-knockout*-Mausmodell wurde in unserer Arbeitsgruppe von PD Dr. Rüdiger J. Blaschke durch klassisches *gene targeting* (siehe 4.1.2) etabliert (Blaschke et al., 2007). In diesen Tieren ist das gesamte Exon 2 des *Shox2*-Gens durch eine PGK-Neo Selektionskassette ersetzt. Ursprünglich handelte es sich dabei um eine C57BL/6 Linie, welche in den CD-1 Hintergrund gekreuzt wurde, um die Reproduktionsrate zu erhöhen. Die dafür verwendeten CD-1 Wildtyp-Mäuse wurden von der Firma Charles River bezogen.

Homozygote *Shox2*^{-/-}-Embryonen stammten aus der Verpaarung heterozygoter *Shox2*^{+/-}-Tiere. Die Embryonen wurden in Übereinstimmung mit dem europäischen und deutschen Gesetz zum Gebrauch von Labortieren entnommen und es lag eine genehmigte Tötungsanzeige des Regierungspräsidiums Karlsruhe vor (Genehmigungsnummer: T-30/09). Zur Bestimmung der Embryonalstadien wurde ein vaginaler Schleimpfropf festgestellt, welcher den Gestationstag E0.5 definierte. Die Tötung der trächtigen Muttertiere erfolgte durch zervikale Dislokation.

2.12.2 Genotypisierung von *Shox2-knockout*-Embryonen

Um Mäuse und Embryonen während der Stammhaltung bzw. innerhalb experimenteller Analysen zu genotypisieren, wurden Schwanzbiopsien 4-6 Wochen alter Tiere oder embryonale Dottersäcke verwendet.

Die Gewebe wurden ü. N. in Lyse-Puffer (100 µg Proteinase K/ml 1 x PCR-Puffer) bei 55°C lysiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Lysate stark gevortext und die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm entfernt. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR, wobei 1 µl des Lysats eingesetzt wurde.

Zur Bestimmung der verschiedenen Genotypen des *Shox2*-Gens (Wildtyp-Allel und *Shox2*^{-/-}-Allel), wurde eine Multiplex-PCR mit 3 Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (siehe 2.3.2) durchgeführt. Dadurch können unterschiedlich große Fragmente in einer Reaktion amplifiziert werden. Das Wildtyp-Allel wurde mit dem Primerpaar *Shox2-int1/2* for und *Shox2-ex2* rev amplifiziert und ergab ein Produkt von 229 bp. Das genetisch veränderte Allel wurde mit dem Primerpaar *Shox2-int1/2* for und *Neo* rev amplifiziert (Produktgröße 748 bp).

2.12.3 Präparation von Mausembryonen und -geweben

Um Embryonen zu entnehmen, wurde das trächtige Weibchen durch zervikale Dislokation getötet und der Bauchraum geöffnet. Der Uterus wurde entnommen und für weitere Präparationen in eine Petrischale mit PBS (4°C) überführt. Es folgte die Isolation der Embryonen aus dem Uterus sowie die Abtrennung des Dottersacks. Je nach Vorhaben wurden die Mausembryonen unterschiedlich behandelt:

- Für die Isolierung von RNA (siehe 2.9.1) wurden die Vorder- und Hintergliedmaßen getrennt voneinander präpariert, direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.
- Für *in situ* Hybridisierungen (siehe 2.9.7) wurden die Embryonen ü. N. in 4 % PFA bei 4°C fixiert. Für *whole mount in situ* Hybridisierungen wurde anschließend eine Dehydrierung mit aufsteigender Methanolreihe (25 %, 50 %, 75 % und 100 %) durchgeführt, um die Embryonen bei -20°C zu lagern. Für die Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die fixierten Embryonen ü. N. in einer 30 %igen Saccharose-Lösung äquilibriert und anschließend in Einbettmedium (Jung) auf einem Trockeneis-Ethanol-Gemisches eingefroren (siehe 2.9.7.2).

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Redundanz von SHOX und SHOX2

3.1.1 Generierung eines *Shox2-knockout* / *SHOX-knockin* Mausmodells

Da die Maus kein *SHOX*-Ortholog besitzt und murines *Shox2*-Protein zu 99 % mit seinem menschlichen Gegenspieler übereinstimmt, stellt die Generierung eines *Shox2-knockout* / *SHOX-knockin*-Mausmodells ein exzellentes System zur Untersuchung der Redundanz beider Gene dar. In dieser Arbeit wurde eine *targeting*-Strategie entwickelt, um menschliches *SHOX* unter dem endogenen *Shox2*-Promotor in die Maus einzubringen und gleichzeitig *Shox2* auszuschalten.

3.1.1.1 *Targeting*-Strategie

Das Einbringen von menschlichem *SHOX* in die Maus und die gleichzeitige Inaktivierung des *Shox2*-Gens sollte mit klassischem *gene targeting* erreicht werden. Dazu wurde ein *targeting*-Vektor verwendet, welcher nach erfolgreicher homologer Integration in den endogenen *Shox2*-Lokus zu einer Expression der menschlichen *SHOXa*-cDNA unter dem *Shox2*-Promotor führt. Gleichzeitig kommt es zum Verlust von Exon 1 und 2 und damit zur vollständigen Inaktivierung beider Isoformen *Shox2a* und *Shox2b* des murinen *Shox2*-Gens (Abbildung 9). Der genomische Bereich von *Shox2* (8.5 kb) einschließlich eines ca. 5 kb *upstream*- bzw. 4 kb *downstream*-Abschnittes ist ebenfalls dargestellt (Abbildung 9A). Das Gen befindet sich auf dem Chromosom 3 der Maus und umfasst insgesamt sechs Exons. Das Startcodon der längsten Isoform *Shox2a* liegt innerhalb des Exon 1, der Transkriptionsstart von *Shox2b* vor Exon 2. Um menschliches *SHOXa* unter dem murinen *Shox2*-Promotor zu exprimieren, wurde die *SHOXa*-cDNA, flankiert von einer 2.9 kb langen 5'- und einer 5.8 kb langen 3'-genomischen *Shox2*-Homologieregion, in einen *targeting*-Vektor kloniert. Zusätzlich enthielt dieser Vektor einen Marker für Neomycin-Resistenz (Abbildung 9B). Nach erfolgreicher homologer Rekombination des Konstrukts in den entsprechenden genomischen WT-*Shox2*-Lokus ist das *Shox2*-Startcodon direkt durch das Startcodon der humanen *SHOXa*-cDNA ersetzt (Abbildung 9C). Gleichzeitig werden Exon 1 und 2 des *Shox2*-Gens deletiert.

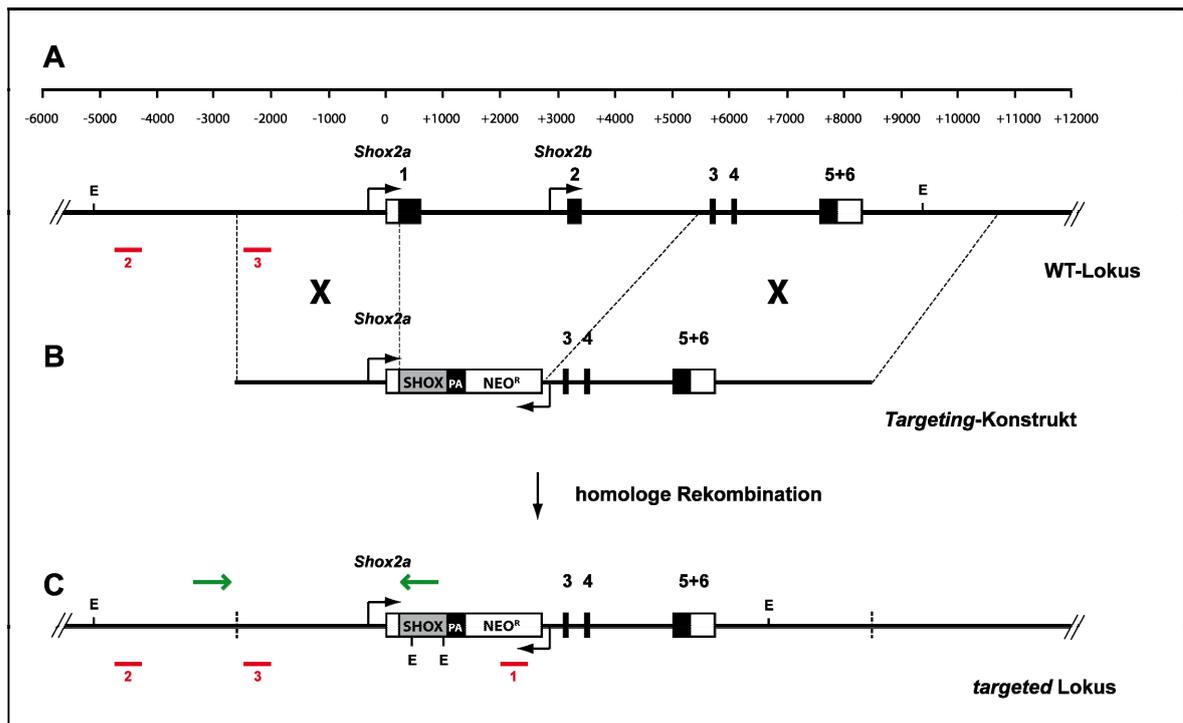


Abbildung 9: Schematische Darstellung der targeting-Strategie

In A ist die genomische Region des murinen *Shox2*-Gens (8,5 kb) zusammen mit einem ca. 5 kb *upstream*- bzw. 4 kb *downstream*-Bereiches dargestellt (kodierende Exons als schwarze Kästen, UTR's als weiße Kästen). Zusätzlich sind die Promotoren der Isoformen *Shox2a* und *Shox2b* eingezeichnet (Pfeile). B zeigt den *targeting*-Vektor, welcher die *SHOXa*-cDNA, einschließlich einer 2,9 kb 5'- und 5,8 kb 3'-Homologieregion von *Shox2* und einen Marker für Neomycin-Resistenz enthält. Nach homologer Integration in den *Shox2*-Lokus wird menschliches *SHOXa* unter dem *Shox2*-Promotor exprimiert und es kommt gleichzeitig zum Verlust der Exons 1 und 2 und damit zur vollständigen Inaktivierung von *Shox2a* und *Shox2b* (C). Für die nachfolgende Integrationsanalyse (3.1.1.2) sind Primer (grüne Pfeile), Southern Blot-Sonden (rote Balken) sowie EcoRI-Schnittstellen (E) eingezeichnet.

3.1.1.2 Generierung von murinen embryonalen *Shox2*-knockout / *SHOX*-knockin Stammzellen

Zunächst wurde der *targeting*-Vektor über mehrere Zwischenvektoren in das pSTBlue-1-Plasmid kloniert (Abbildung 10). Es wurden 2859 bp des genomischen *Shox2*-Lokus *upstream* vom Startcodon (linker Arm) mittels PCR amplifiziert und in das pSTBlue-1-Plasmid kloniert (AG1). Diesem Vektor wurde dann die menschliche *SHOXa*-cDNA, gefolgt von einem SV40-PolyA-Signal und einem Neomycin-Resistenzmarker, hinzugefügt (AG2). Dafür wurde die *SHOXa*-cDNA inklusive des PolyA-Signals aus dem Plasmid pST/SKSV40PA (*SHOXa* und SV40-PolyA in pBSK-Vektor) mittels Restriktionsverdau isoliert und die Neomycin-Resistenzkassette mit PCR aus dem pGL4.17(Luc2/Neo)-Vektor generiert. Durch Einbringen des rechten Armes (5767 bp), welcher Exon 2, 3 und 5 des genomischen *Shox2*-Lokus umfasst, konnte das komplette *targeting*-Konstrukt (AG3) generiert werden. Linker und rechter Arm wurden mittels PCR aus dem BAC RP23-103D17,

welcher 180 kb des genomischen *Shox2*-Bereichs beinhaltet, amplifiziert. Das vollständige *targeting*-Konstrukt setzt sich aus der humanen *SHOXa*-cDNA mit einem SV40-PolyA-Signal und einer Neomycin-Resistenzkassette, flankiert von 2.9 kb 5' (linker Arm)- und 5.8 kb 3' (rechter Arm)- genomischer *Shox2*-Region zusammen.

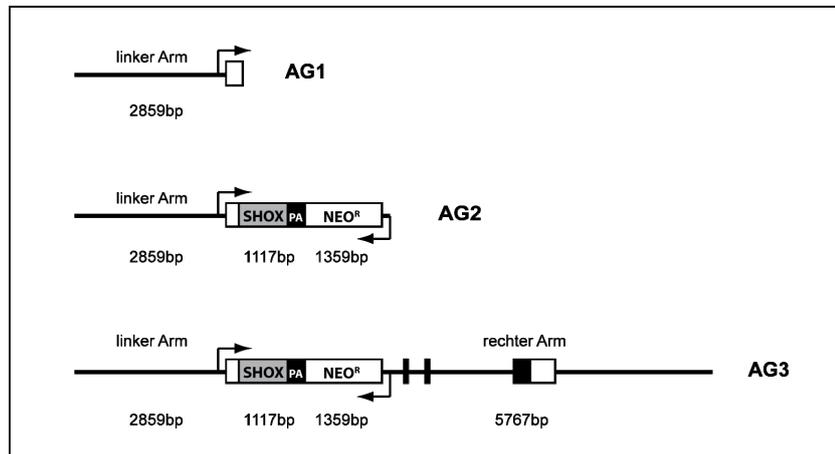


Abbildung 10: Klonierung des *targeting*-Konstrukts

Der *Shox2*-knockout / *SHOX*-knockin-Vektor (AG3) wurde mit Hilfe von zwei Zwischenvektoren kloniert. Zunächst wurden 2859 bp des genomischen *Shox2*-Lokus *upstream* vom Startcodon (linker Arm) in das pSTBlue-1-Plasmid kloniert (AG1). Diesem Vektor wurde die menschliche *SHOXa*-cDNA mit SV40-PolyA-Signal (PA) und einem Neomycin-Resistenzmarker (NEO^R) hinzugefügt (AG2). Durch Einbringen des rechten Armes (5767 bp), welcher Exon 2, 3 und 5 des *Shox2*-Gens umfasst, konnte das vollständige *targeting*-Konstrukt (AG3) generiert werden.

Das *targeting*-Konstrukt wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRV und KpnI linearisiert und mit Hilfe des AmaxaTM NucleofactorTM Technology-Systems (Lonza) in zwei verschiedene ES-Zelllinien (R1 und E14) elektroporiert. Die Zellen wurden in Antibiotikum enthaltendem Selektionsmedium kultiviert und nach neun Tagen Selektion als Einzelklone in 96-Well-Platten transferiert. Ein Teil der Zellen wurde zur Aufbewahrung bei -80°C eingefroren, der andere Teil zur Isolierung der genomischen DNA verwendet. Die Analyse auf korrekte Integration des *targeting*-Vektors in die genomische DNA erfolgte über PCR mit einem Vorwärts-Primer im WT-*Shox2*-Lokus außerhalb der Integrationsstelle und einem Rückwärts-Primer innerhalb der *SHOX*-cDNA (Abbildung 9C), welche nur bei erfolgreicher homologer Rekombination ein 3 kb Produkt generieren können. Insgesamt wurden 261 R1- und 207 E14-Klone untersucht, woraufhin bei 13 R1-Klonen und vier E14-Klonen das PCR-Produkt in der richtigen Größe detektiert werden konnte (Abbildung 11).

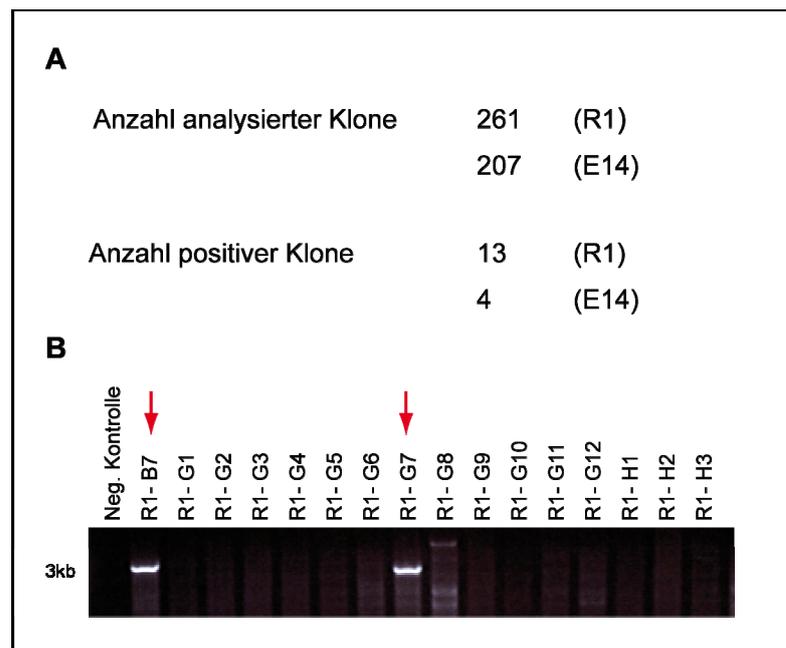


Abbildung 11: Integrationsanalyse mittels PCR

Selektionierte, vereinzelte ES-Zell-Klone wurden mit Hilfe von PCR hinsichtlich einer korrekten Integration des *Shox2-knockout* / *SHOX-knockin*-Konstruktes untersucht. Hierfür wurden ein Vorwärts-Primer außerhalb der 5' Integrationsstelle und ein Rückwärts-Primer in der *SHOX*-cDNA verwendet (Primer siehe Abbildung 9, grüne Pfeile). Somit kann ein Amplifikat nur im Falle einer korrekten Integration erwartet werden. Insgesamt konnten 13 von 261 R1-ES-Zell-Klonen und vier von 207 E14-ES-Zell-Klonen als positiv detektiert werden (A). B zeigt exemplarisch die PCR-Ergebnisse einer Reihe von getesteten R1-Klonen. Die DNA der Klone B7 und G7 erwies sich als positiv für das 3 kb Integrationsprodukt (rote Pfeile).

Die PCR-positiven R1- und E14-Klone wurden expandiert und die homologe Integration des *targeting*-Konstrukts mittels Southern Blot-Analysen überprüft (Abbildung 12). Zunächst erfolgte die Analyse, ob das *targeting*-Konstrukt tatsächlich vollständig in die DNA integriert wurde (Abbildung 12A). Dafür wurde genomische DNA von Zellen des R1-B7-Klons und des R1-Wildtyps mit den Restriktionsenzymen *HindIII*, *BamHI* und *EcoRI* verdaut. Diese schneiden mindestens zweimal innerhalb des *targeting*-Konstrukts. Die spezifisch geschnittene DNA wurde daraufhin mit einer Sonde gegen die Neomycin-Resistenzkassette (Sonde 1) hybridisiert. Die R1-B7-DNA ergab für jedes Restriktionsenzym ein spezifisches Fragment in der erwarteten Größe, während im Fall der R1-WT-DNA kein Signal detektierbar war. Das bestätigt eine vollständige Integration des Konstrukts in die DNA, gibt allerdings keine Auskunft über den Integrationsort. Um diesen zu überprüfen, wurde die DNA mit *EcoRI* verdaut und mit zwei verschiedenen Sonden (Sonde 2 und 3 hybridisiert (Abbildung 12B). Sonde 2 detektiert den genomischen *Shox2*-Lokus außerhalb der Integrationsstelle, Sonde 3 innerhalb des Konstrukts (Abbildung 9). Mit beiden Sonden wurde für die verdaute R1-WT- und R1-B7-DNA je ein 15 kb WT-Fragment, für die B7-DNA zusätzlich ein 6.5 kb *knockin*-

Fragment erwartet (Abbildung 12B). Die Hybridisierungen zeigten mit beiden Sonden das 15 kb WT-Fragment. Allerdings konnte das 6.5 kb *knockin*-Fragment mit keiner der beiden Sonden detektiert werden. Während die Hybridisierung mit Sonde 2 neben dem WT-Signal kein weiteres Fragment zeigte, waren auf dem Blot mit Sonde 3 weitere Signale von 4.5 kb und 5.5 kb zu sehen. Anzahl und Größe dieser Signale stimmen nicht mit den vorhergesagten Ergebnissen überein. Damit muss geschlossen werden, dass sich der *targeting*-Vektor nicht am *Shox2*-Lokus befindet und damit keine homologe Integration vorliegt. Weiterhin ist auffällig, dass diese 4.5 kb und 5.5 kb Signale sehr stark im Vergleich zu dem 15 kb WT-Signal sind, was für eine Mehrfachintegration des *targeting*-Konstrukts sprechen könnte. Es wurden alle weiteren PCR-positiven R1- und E14-Klone mit Sonde 3 getestet und ergaben ebenfalls sehr starke Signale nicht vorhergesagten Größen vergleichbar mit den Ergebnissen des B7-Klons (Abbildung 12B, Ergebnisse nur für R1-Klone gezeigt).

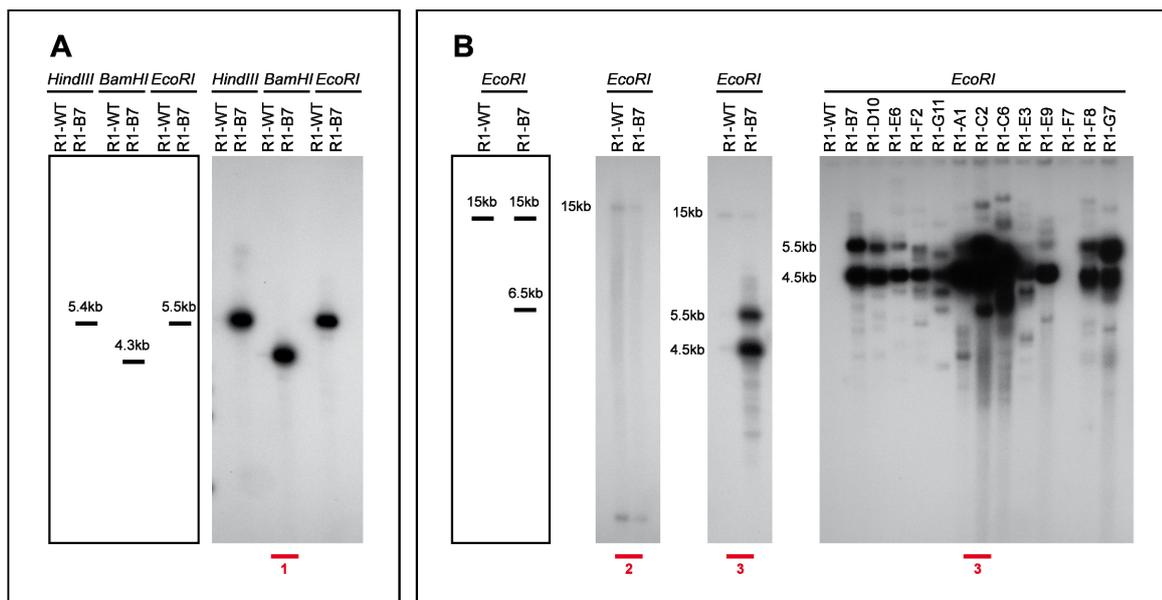


Abbildung 12: Integrationsanalyse mittels Southern Blot

Integrations-PCR-positive R1-Klone wurden mit Hilfe von Southern Blot-Analysen auf homologe Rekombination des *targeting*-Konstrukts getestet. Es wurden insgesamt drei verschiedene Sonden verwendet: Sonde 1 bindet innerhalb der Neomycin-Resistenzkassette, Sonde 2 und 3 in der genomischen *Shox2*-Region ca. 5- bzw. 3 kb *upstream* des Transkriptionsstarts. Sonde 2 detektiert den Bereich außerhalb der Integrationsstelle, Sonde 3 den Bereich innerhalb des Konstrukts (Abbildung 9). A zeigt die Hybridisierung von R1-WT- und R1-B7- genomischer DNA mit Sonde 1. Die DNA wurde zuvor mit den Restriktionsenzymen *HindIII*, *BamHI* und *EcoRI* verdaut, welche mindestens zweimal innerhalb des Konstrukts schneiden. Links ist schematisch die Anzahl und Größe der zu erwartenden Fragmente dargestellt. In B wurde die die R1-WT- und R1-B7-DNA mit *EcoRI* (Schnittstellen siehe Abbildung 9) verdaut und mit den Sonden 2 und 3 hybridisiert. Links ist wiederum schematisch das erwartete Ergebnis dargestellt. Es wurden außerdem alle weiteren PCR-positiven R1-Klone mit Sonde 3 getestet (B).

3.1.1.3 Analyse einer Mehrfachintegration des *targeting*-Konstrukts

Um eine mögliche Mehrfachintegration des *targeting*-Vektors zu bestätigen, wurden zunächst PCR-Analysen durchgeführt. Ausgehend von einer hypothetischen tandemartigen Aneinanderreihung von mehreren *targeting*-Konstrukten wurden Primer gewählt (Abbildung 13A), die nur bei tatsächlicher Mehrfachintegration ein Produkt von 1.2 kb hervorbringen können (Abbildung 13A). Es wurde die DNA von sieben positiven R1-Klonen getestet und mit jeder konnte das PCR-Produkt nachgewiesen werden (Abbildung 13B).

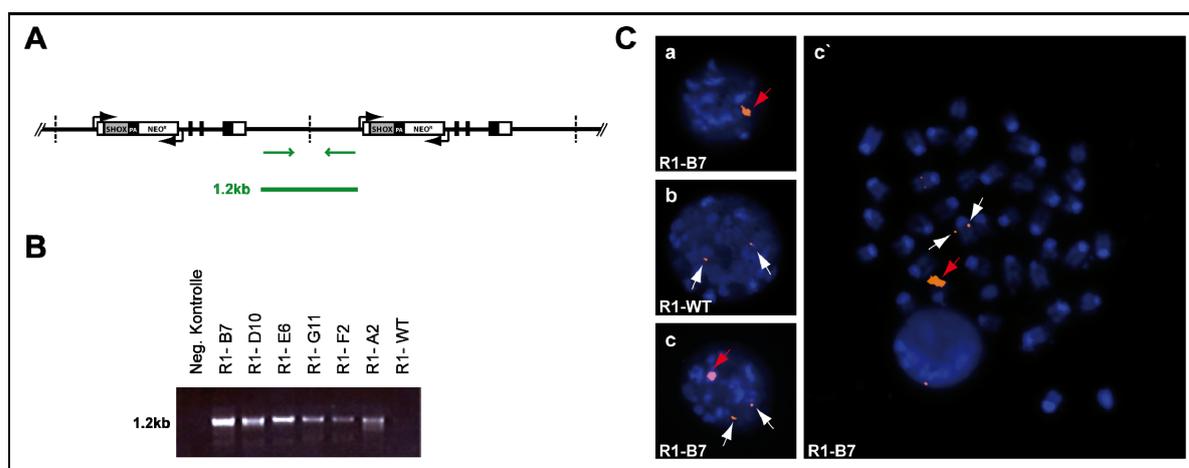


Abbildung 13: Nachweis der Mehrfachintegration des *targeting*-Konstrukts mit Hilfe von PCR und Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH)

Eine Mehrfachintegration des *targeting*-Konstrukts konnte zunächst mit PCR bestätigt werden (A, B). Ausgehend von einer hypothetischen Aneinanderreihung von mehreren *targeting*-Konstrukten (A) wurden Primer gewählt (A, grüne Pfeile), die nur bei tandemartiger Integration ein Produkt von 1.2 kb (A, grüner Balken) generieren können. Es wurden DNAs von sieben positiven R1-Klonen getestet und aus allen konnte das Tandemprodukt amplifiziert werden (B). Um die Integration auf chromosomaler Ebene genauer zu analysieren, wurden Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen auf Inter (a-c)- bzw. Metaphasenkerne (c') von R1-WT- und R1-B7-Zellen durchgeführt (C). In a ist die Anlagerung des Digoxigenin-markierten *targeting*-Konstrukts an die DNA eines R1-B7-Interphase-Kerns gezeigt. Die verwendete Sonde detektiert den integrierten *targeting*-Vektor an einer Stelle im Genom (roter Pfeil). Um festzustellen, ob der Integrationsort mit dem WT-*Shox2*-Lokus übereinstimmt, wurde eine zweite Sonde, der Digoxigenin-markierten BAC RP12-103D17, verwendet. Dieser bindet sowohl den WT-*Shox2*-Lokus (b, c, c', weiße Pfeile) als auch das integrierte *targeting*-Konstrukt (c, c', roter Pfeil). Dabei wird deutlich, dass der Integrationsort des *targeting*-Konstrukts (roter Pfeil) nicht mit dem *Shox2*-WT-Lokus (weiße Pfeile) übereinstimmt. Das Signal des integrierten *targeting*-Vektors ist außerdem wesentlich stärker als das WT-Signal, was eine Mehrfachintegration bestätigt.

Auch auf chromosomaler Ebene konnte eine Mehrfachintegration mit Hilfe von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) gezeigt werden (Abbildung 13C). Dafür wurden R1-WT- und R1-*knockin* (Klon B7)-Kerne (Meta- und Interphasen) mit zwei verschiedenen Digoxigenin-markierten Sonden hybridisiert. Eine Sonde stellt das Digoxigenin-markierte *targeting*-Konstrukt selbst dar. Es bindet den genetisch veränderten Locus und zeigt die Integration des Vektors an einer Stelle im Genom. Die Generierung der zweiten Sonde erfolgte über

Digoxigenin-Markierung des BAC RP-23103D17, welcher bereits für die Klonierung des *targeting*-Konstrukts verwendet wurde. Dieser umfasst ca. 180 kb des genomischen *Shox2*-Lokus auf dem Maus-Chromosom 3 und erkennt daher sowohl den WT-Lokus als auch das integrierte *targeting*-Konstrukt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Integrationsort des *targeting*-Konstrukts nicht mit dem WT-*Shox2*-Lokus übereinstimmt. Damit handelt es sich nicht um eine sequenzspezifische, homologe Integration des Vektors in den *Shox2*-Lokus. Außerdem ist das Signal des integrierten Vektors wesentlich stärker als das WT-Signal, was wiederum eine Mehrfachintegration bestätigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es nicht möglich war, mit dem verwendeten *targeting*-Vektor eine homologe Rekombination zu erreichen. Das Konstrukt wurde zwar in die genomische DNA von R1- und E14-ES-Zellen vollständig integriert, allerdings nicht sequenzspezifisch über homologe Rekombination in den *Shox2*-Lokus. Außerdem erfolgte der Einbau tandemartig, was mit der Sequenzbeschaffenheit des *targeting*-Konstrukts zusammenhängen könnte. Aufgrund der experimentellen Schwierigkeiten und zeitlichen Limitation innerhalb meiner Doktorarbeit wurde die Generierung dieses Mausmodells deshalb nicht fortgesetzt.

3.1.2 Vergleichende Expressionsanalyse von *SHOX/Shox* und *SHOX2/Shox2* in neuronalen Strukturen

Im Folgenden wurde die Redundanz von *Shox* und *Shox2* mit Hilfe vergleichender Expressionsanalysen in der neuronalen Entwicklung von Maus und Huhn untersucht. In einem ersten Schritt wurde die *Shox2*-Expression innerhalb der frühen Entwicklung des Nervensystems der Maus systematisch analysiert, um sie anschließend mit der Expression von *Shox2* und *Shox* im Huhn zu vergleichen.

3.1.2.1 Expression von *Shox2* im Nervensystem der Maus

Um die *Shox2*-Expression während der frühen Entwicklung des Nervensystems der Maus systematisch zu untersuchen, wurden *in situ* Hybridisierungen an Mausembryonen der Stadien E10.5, E11.5, E12.5 und E13.5 durchgeführt. Hierfür wurden koronale Gefrierschnitte des Kopfes und transversale Schnitte des Rumpfes mit *Shox2 antisense*-RNA hybridisiert. Diese Analysen zeigten, dass *Shox2* in sehr spezifischen Bereichen des sich entwickelnden Gehirns exprimiert wird (Abbildung 14) Früheste *Shox2*-Transkripte waren bereits im Stadium E10.5 in differenzierten Neuronen des Mittelhirndachs, welches sich ab E11.5 in colliculus superior und colliculus inferior unterteilt, zu sehen.

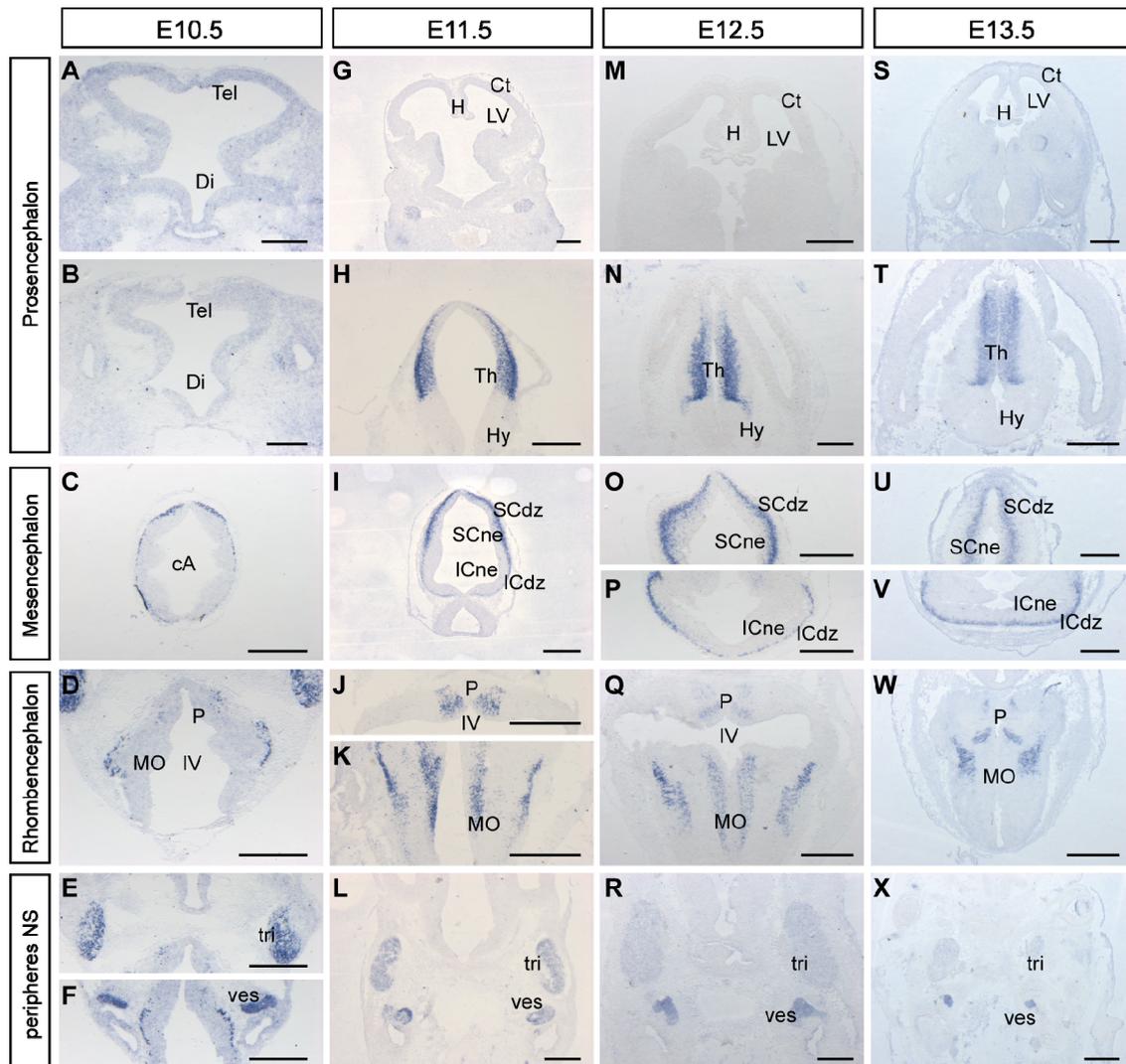


Abbildung 14: *Shox2*-mRNA-Expression in der Embryonalentwicklung des murinen Gehirns.

In situ Hybridisierungen auf 16 µm Gefrierschnitte von Mausembryonen der Stadien E10.5 bis E13.5 zeigen eine *Shox2*-Expression in spezifischen Bereichen des Pro-, Mes- und Rhombencephalons. Im Prosencephalon konnte *Shox2*-mRNA ab dem Stadium E11.5 im Thalamus (Th) detektiert werden (Prosencephalon, H-T). Im Hypothalamus (Hy) und allen Strukturen des Telencephalons (Tel), wie z.B. Cortex (Ct) und Hippocampus (H), waren in keinem Stadium Transkripte vorhanden (Prosencephalon, A, G, M, S). Bereits ab E10.5 wurde *Shox2* im Mittelhirndach (E10.5 als cerebrales Aquädukt (cA) bezeichnet, ab E11.5 in Colliculus superior (SC) und Colliculus inferior (IC) unterteilt) in einer Schicht bereits differenzierter Neurone (SCdz) exprimiert (Mesencephalon). Im Rhombencephalon ist eine *Shox2*-Expression in Pons (P) und Medulla oblongata (MO) sichtbar (Rhombencephalon). In allen beschriebenen Strukturen des Gehirns war die Expression von *Shox2* von E10.5 bis E13.5 unverändert. Weiterhin ist *Shox2* im Ganglion trigeminale (tri) sowie im Ganglion vestibulare (ves) exprimiert (peripheres NS). Alle Maßstabsbalken entsprechen 500 µm. Ct: Cortex, Di: Diencephalon, H: Hippocampus, Hy: Hypothalamus, ICdz: Differenzierungszone des Colliculus inferior, LV: lateraler Ventrikel, MO: Medulla oblongata, P: Pons, SCdz: Differenzierungszone des Colliculus superior, Tel: Telencephalon, tri: Ganglion trigeminale, ves: Ganglion vestibulare.

Weiterhin wurde *Shox2* in distinkten Bereichen der Pons und Medulla oblongata des Rhombencephalons (Hinterhirn) sowie in den Ganglien trigeminale und vestibulare des peripheren Nervensystems detektiert (Abbildung 14A-F). Im Prosencephalon (Vorderhirn) ist *Shox2* vom Stadium E11.5 an im Thalamus exprimiert, während es im Hypothalamus und in

allen Strukturen des Telencephalons, wie z.B. Cortex und Hippocampus, in keinem der getesteten Stadien detektierbar war (Abbildung 14, Prosencephalon). Die Expression im Thalamus, im Mittelhirndach, in Pons und Medulla oblongata sowie im Ganglion vestibulare bleibt in späteren Entwicklungsstadien erhalten. Im Ganglion trigeminale hingegen nimmt sie bereits vom Stadium E12.5 an deutlich ab (Abbildung 14, peripheres NS).

Auch im Rückenmark des sich entwickelnden Nervensystems der Maus konnte *Shox2* detektiert werden (Abbildung 15). Vom Stadium E11.5 an ist *Shox2* in den Spinalganglien sowie in einer distinkten Zellpopulation im ventralen Bereich des Rückenmarks exprimiert (Abbildung 15B-D). Diese spezifische ventrale Färbung ist im Stadium E11.5 beiderseits der Mittellinie zu sehen, breitet sich E12.5 in laterale Richtung aus und befindet sich im Stadium E13.5 an der ventralen Peripherie des Rückenmarks. Die Beobachtungen weisen darauf hin, dass es sich bei den *Shox2*-exprimierenden Zellen um eine Population ventraler Interneurone handeln könnte.

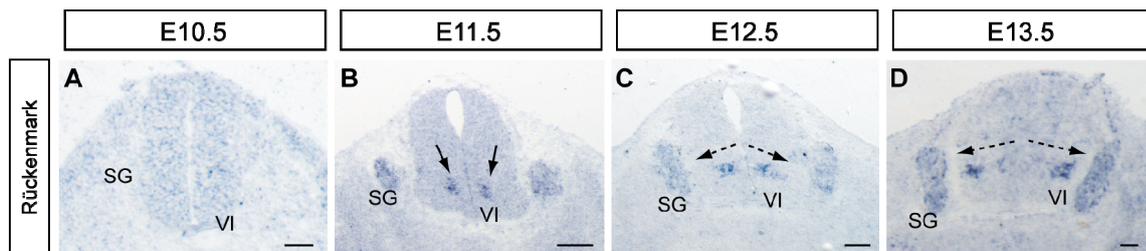


Abbildung 15: *Shox2*-mRNA-Expression in der Embryonalentwicklung des murinen Rückenmarks.
In situ Hybridisierungen auf transverseale Kryoschnitte (16µm) von Mausembryonen der Stadien E10.5 bis E13.5 zeigen ab dem Stadium E11.5 eine *Shox2*-Expression in den Spinalganglien sowie in einer spezifischen Population des ventralen Rückenmarks (B-D). E11.5 ist diese Färbung nahe der Mittellinie (B), welche sich mit fortschreitender Entwicklung lateral ausbreitet (C) bis hin zur Peripherie am Stadium E13.5 (D). SG: Spinalganglion; VI: ventrale Interneurone. Alle Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

Zusammenfassend ist *Shox2* während früher Embryonalstadien der Maus sowohl in verschiedenen Teilen des Gehirns als auch im Rückenmark in deutlich abgegrenzten Bereichen exprimiert. Diese Expressionsdomänen bleiben während der frühen Entwicklung des Nervensystems unverändert.

Eine Zusammenstellung der *Shox2*-Expression innerhalb des embryonalen, murinen Nervensystems ist in Tabelle 12 zu sehen.

	E10.5	E11.5	E12.5	E13.5
Prosencephalon				
Telencephalon				
Cortex	-	-	-	-
Hippocampus	-	-	-	-
Basalganglien	-	-	-	-
Diencephalon				
Thalamus	-	+++	+++	+++
Hypothalamus	-	-	-	-
Mesencephalon				
Colliculus superior				
Neuroepithel	-	-	-	-
Differenzierungszone	+++	+++	+++	+++
Colliculus inferior				
Neuroepithel	-	-	-	-
Differenzierungszone	+++	+++	+++	+++
Rhombencephalon				
Pons	+++	+++	+++	+++
Medulla oblongata	+++	+++	+++	+++
Rückenmark				
ventrale Interneurone	-	++	++	++
Peripheres Nervensystem				
Ganglion trigeminale	+++	++	+	(+)
Ganglion vestibulare	+++	++	++	++
Spinalganglion	-	++	++	++

Tabelle 12: Zusammenfassung der *Shox2*-Expression in der Embryonalentwicklung des murinen Nervensystems

3.1.2.2 Identifizierung der *Shox2*-exprimierenden Interneurone

Im sich entwickelnden Rückenmark werden verschiedene Populationen von Neuronen entlang der dorsoventralen Achse generiert (Tanabe und Jessell, 1996). Im ventralen Rückenmark werden die spezifischen Eigenschaften neuraler Vorläuferzellen durch einen Gradienten des sekretierten Signalmoleküls Sonic hedgehog bestimmt, welcher die Identität fünf verschiedener Domänen an Vorläuferzellen festlegt (Abbildung 16). Diese Domänen generieren Motoneuronen (MN) und vier verschiedene Subklassen von Interneuronen (V0, V1, V2 und V3), welche zu ihrem Bestimmungsort migrieren und Axone aussenden bzw. mit ihren Zielzellen verschaltet werden. Die Subtypen dieser Neurone werden durch die spezifische Expression von Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren wie *Evx1* (V0), *En1* (V1), *Chx10* (V2), *Sim1* (V3) und *Isl1/2* (MN) charakterisiert (Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000; Lee und Pfaff, 2001). Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor *Shox2* ebenfalls in lateral migrierenden Neuronen des ventralen Rückenmarks exprimiert ist (Abbildung 15).

Zur genaueren Charakterisierung dieser Neurone wurden *in situ* Hybridisierungen von *Shox2* und den Markergenen *Evx1*, *En1*, *Chx10*, *Sim1* und *Isl1* auf benachbarte, transversale Gefrierschnitte des Rückenmarks von E11.5 Mausembryonen durchgeführt (Abbildung 16A-F).

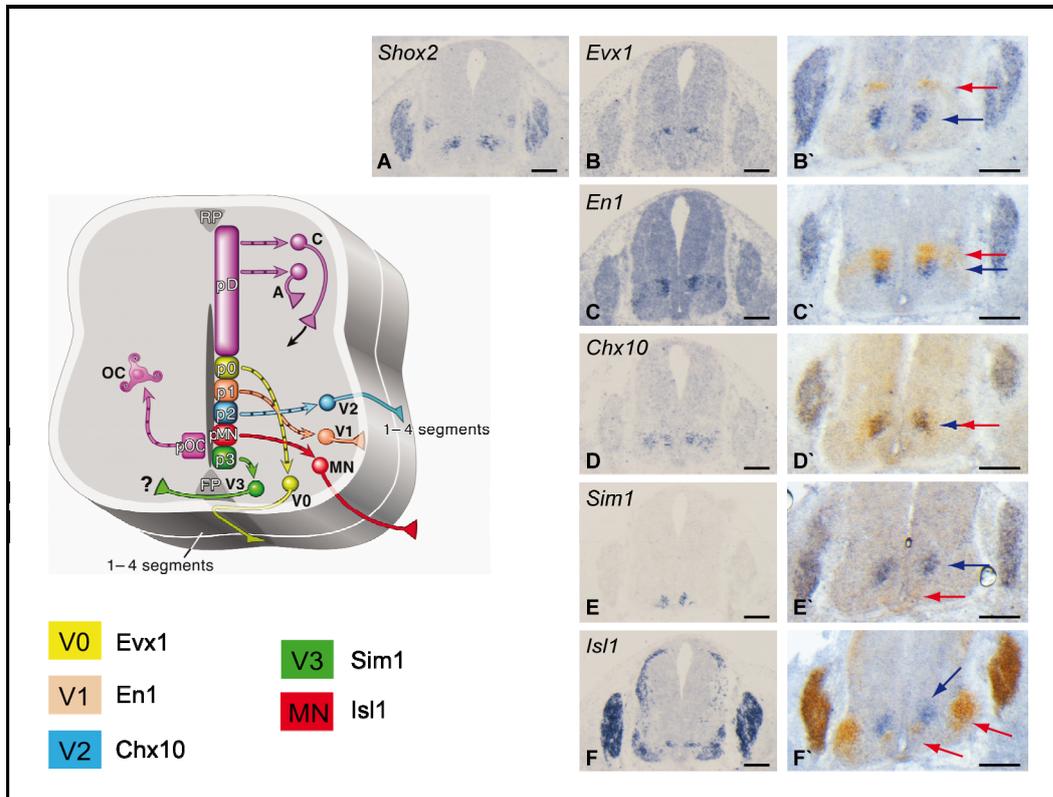


Abbildung 16: Identifizierung der *Shox2*-exprimierenden Interneurone.

In situ Hybridisierungen mit Markergenen für verschiedene Zelltypen des ventralen Rückenmarks auf benachbarte transversale 16 µm Gefrierschnitteschnitte von E11.5 Mausembryonen wurden mit *Shox2 antisense*-RNA sowie den Markergen-Sonden *Evx1* (B; V0-Interneurone), *En1* (C; V1-Interneurone), *Chx10* (D; V2-Interneurone), *Sim1* (E; V3-Interneurone) und *Isl1* (F; Motoneurone) durchgeführt. Eine schematische Übersicht der Marker ist links im Bild dargestellt. Vergleicht man die Expression der Marker mit der *Shox2*-Expression, scheinen die Färbungen von *En1* (C) und *Chx10* (D) mit der von *Shox2* zu überlappen. Doppel-*in situ* Hybridisierungen von *Shox2* (blau gefärbt) und den jeweiligen Markergenen (rot gefärbt) auf transversale 16 µm E11.5 Gefrierschnitte zeigen, dass die *Shox2*-Färbung teilweise mit der *En1*- und vollständig mit der *Chx10*-Färbung überlappt (B'-F'). Alle Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. Schema links im Bild verändert aus Lee und Pfaff, 2001

Ein Vergleich der *Shox2*- mit der Markergen-Expression könnte auf eine überlappende Expression mit *En1* und *Chx10* hinweisen (Abbildung 16A, C und D). Für eine genauere Analyse wurden Doppel-*in situ* Hybridisierungen von *Shox2* und dem jeweiligen Markergen durchgeführt (Abbildung 16B'-F'). Diese zeigen, dass die *Shox2*-Expression teilweise mit der *En1*- und vollständig mit der *Chx10*-Expression überlappt (Abbildung 16C', D'). Demnach könnte es sich bei der *Shox2*-exprimierenden Zellpopulation um V2-Interneurone handeln.

Bislang ist nur sehr wenig über die Funktion von *Shox2* in der neuronalen Entwicklung bekannt. Eine kürzlich erschienene Studie zeigte im Mausmodell, dass *Shox2* eine essentielle Rolle in der Entwicklung der Spinalganglien spielt. Der konditionale *Shox2*-Verlust in Neuralleistenzellen, welche alle Zelltypen der Spinalganglien hervorbringen, führte dort zu einer deutlichen Reduktion von *TrkB* (*tropomyosin-related kinase B*)-exprimierenden mechanosensorischen Neuronen (Scott et al., 2011). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Shox2* in einer spezifischen Population von ventralen Interneuronen des Rückenmarks exprimiert ist, und, dass diese Expression teilweise mit einem Marker für V1-Interneuronen (*En1*) und vollständig mit einem Marker für V2-Interneuronen (*Chx10*) überlappt. Um die Rolle von *Shox2* innerhalb dieser Neuronen genauer zu untersuchen, wurde das in unserer Arbeitsgruppe generierte *Shox2*-knockout-Mausmodell verwendet. Es wurden *in situ* Hybridisierungen von *En1* und *Chx10* auf transversale Gefrierschnitte von E11.5 WT- bzw. *Shox2*^{-/-}-Embryonen durchgeführt und die Expression der Marker im WT und im *knockout* miteinander verglichen (Abbildung 17). Die Rückenmarksschnitte von *Shox2*-defizienten Embryonen wiesen keine veränderte Expression der Marker *En1* und *Chx10* im Vergleich zum WT auf. Demnach besitzt *Shox2* keine entscheidende Funktion in der Generierung von V1- und V2-Interneuronen.

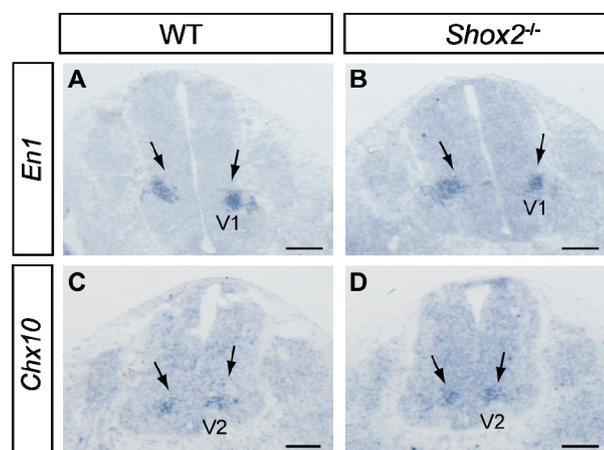


Abbildung 17: Expressionsanalyse von *En1* und *Chx10* im Rückenmark von *Shox2*-defizienten Mausembryonen

In situ Hybridisierungen auf transversale 16 µm Gefrierschnitte von E11.5 WT- und *Shox2*^{-/-}-Embryonen zeigen keine veränderte *En1* (Marker für V1-Interneuronen)- und *Chx10* (Marker für V2-Interneuronen)-Expression im *knockout* (B, D, Pfeile). Alle Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. V1: V1-Interneurone, V2: V2-Interneurone

3.1.2.3 Vergleichende Expression von *Shox* und *Shox2* im Nervensystem von Maus- und Hühnerembryonen

Nach der systematischen Analyse der *Shox2*-Expression im Nervensystem der Maus wurde eine vergleichende Analyse der *Shox*-Expression in Hühnerembryonen vorgenommen.

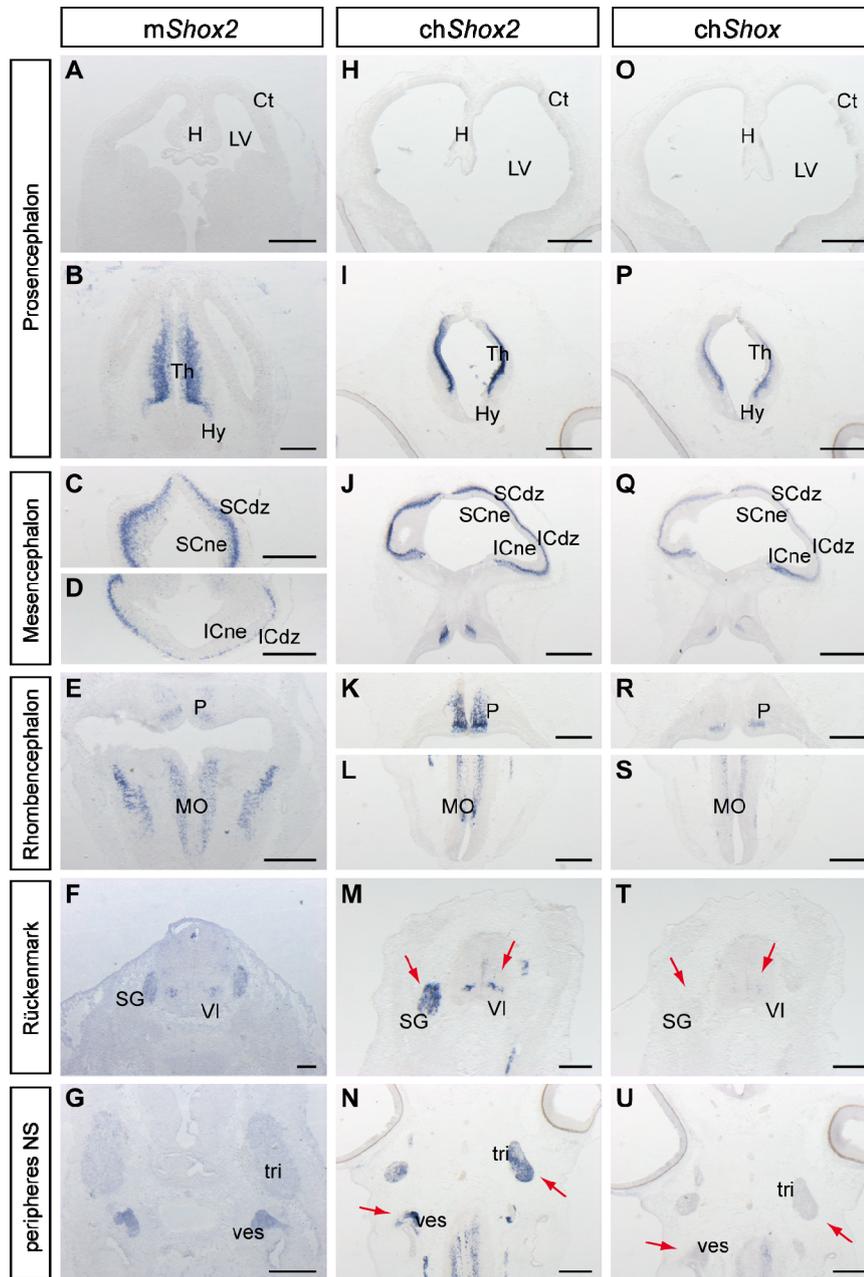


Abbildung 18: Vergleichende Expressionsanalysen von *Shox2* und *Shox* im Nervensystem von Maus- und Hühnerembryonen.

In situ Hybridisierungen auf 16 µm koronale Hirn- bzw. transversale Rückenmarksschnitte von Maus- (E12.5) und Hühnerembryonen (Tag 5) zeigen die Expression von *Shox2* im Nervensystem der Maus: im Thalamus (Th) (B), im Mittelhirndach (SCdz und ICdz) (C, D), in Pons (P) und Medulla oblongata (MO) (E), in den Spinalganglien (SG) und in ventralen Interneuronen (VI) (F) sowie in den Ganglien trigeminale (tri) und vestibulare (ves) (G). Diese stimmt vollständig mit der Expression von *Shox2* im Hühnerembryo überein (H-N). Vergleiche der *Shox*- und *Shox2*-Färbungen im Nervensystem des Huhns zeigten, dass das Expressionsmuster beider Gene im

Thalamus (Th) (I, P), im Mittelhirndach (SCdz und ICdz) (J, Q) sowie in Pons (P) und Medulla oblongata (MO) (K, L, R, S) übereinstimmt. Unterschiedliche Färbungen von *Shox* und *Shox2* sind in den Spinalganglien (SG) und in den Ganglien trigeminale (tri) und vestibulare (ves) sowie in ventralen Interneuronen (VI) zu sehen (M-U, rote Pfeile). Maßstabsbalken entsprechen in A-E: 500 μm , F: 100 μm , G: 500 μm , H-I: 1000 μm , J-N: 500 μm , O-P: 1000 μm , Q-U: 500 μm . Ct: Cortex, Di: Diencephalon, H: Hippocampus, Hy: Hypothalamus, ICdz: Differenzierungszone des Colliculus inferior, LV: lateraler Ventrikel, MO: Medulla oblongata, P: Pons, SCdz: Differenzierungszone des Colliculus superior, SG: Spinalganglien, Tel: Telencephalon, tri: Ganglion trigeminale, ves: Ganglion vestibulare, VI: ventrale Interneuronen, *mShox2* (*Mus musculus Shox2*), *chShox2* (*Gallus gallus Shox2*), *chShox* (*Gallus gallus Shox*).

In situ Hybridisierungen auf transversale Kopf- und Rumpfschnitte von Tag 5-Hühnerembryonen zeigten im Vergleich zu den entsprechenden murinen Färbungen eine vollständige Übereinstimmung der *Shox2*-Expressionsdomänen (Abbildung 18A-N). *Shox2*-Transkripte sind, wie in der Maus, im Thalamus, im Mittelhirndach, in Pons und Medulla oblongata, in den Ganglien trigeminale und vestibulare sowie in den Spinalganglien und V2-Interneuronen zu finden.

Die Analyse der *Shox*- und *Shox2*-Färbungen im Huhn zeigte ebenfalls deutliche Übereinstimmungen innerhalb der neuronalen Strukturen. Im Pros-, Mes- und Rhombencephalon entspricht das *Shox*-Expressionsmuster vollständig dem von *Shox2* (Abbildung 18H-U). Unterschiede waren lediglich im peripheren Nervensystem und im Rückenmark erkennbar. Im Gegensatz zu *Shox2* konnten keine *Shox*-Transkripte in den Ganglien trigeminale und vestibulare sowie in den Spinalganglien detektiert werden. Weiterhin zeigten die ventralen Interneurone eine sehr schwache *Shox*-Expression im Vergleich zu *Shox2* (Abbildung 18M-U).

Um ein vollständiges Bild der *Shox*- und *Shox2*-Expression innerhalb der Embryonalentwicklung von Maus und Huhn zu erhalten, wurde diese zusätzlich in Strukturen außerhalb des Nervensystems untersucht und vergleichend zusammengestellt (Abbildung 19; Tabelle 13). Es wurden *in situ* Hybridisierungen auf transversale Gefrierschnitte von Mausembryonen (E12.5) und Hühnerembryonen (Tag 5) durchgeführt (Abbildung 19). Im Auge ist *Shox2* sowohl in der Maus als auch im Huhn nicht exprimiert, während *Shox*-Transkripte in der Cornea von Hühnerembryonen detektierbar waren (Abbildung 19A-C). Im sich entwickelnden Kiefergelenk ist eine *Shox2*-Expression in mesenchymalen Zellen der Maxilla-Mandibula-Verbindung der Maus erkennbar. Im Huhn scheinen diese Bereiche keine *Shox2*-, sondern ausschließlich eine *Shox*-Färbung aufzuweisen (Abbildung 19D-F). Die Expression von *Shox2* im Flügel des Huhns ähnelt stark der Expression in den Vordergliedmaßen der Maus. Es sind Färbungen um die Kondensationskerne der sich entwickelnden Knochen herum, im proximalen Bereich, sowie in einer Zellschicht unterhalb der Dermis erkennbar, welche bis in den medialen Bereich reicht. Im Flügel des Huhns sind *Shox2*-Färbungen außerdem in einem abgegrenzten Bereich der sich entwickelnden

Handplatte zu sehen. Die *Shox*-Expression überlappt mit *Shox2* im proximalen Bereich des Flügels und unterhalb der Dermis, reicht aber weiter in den medialen Teil (Abbildung 19G-I). Im sich entwickelnden Herzen von Maus und Huhn ist *Shox2* im Einflusstrakt exprimiert, *Shox*-Transkripte dagegen waren im Hühnerherz nicht detektierbar (Abbildung 19J-L)

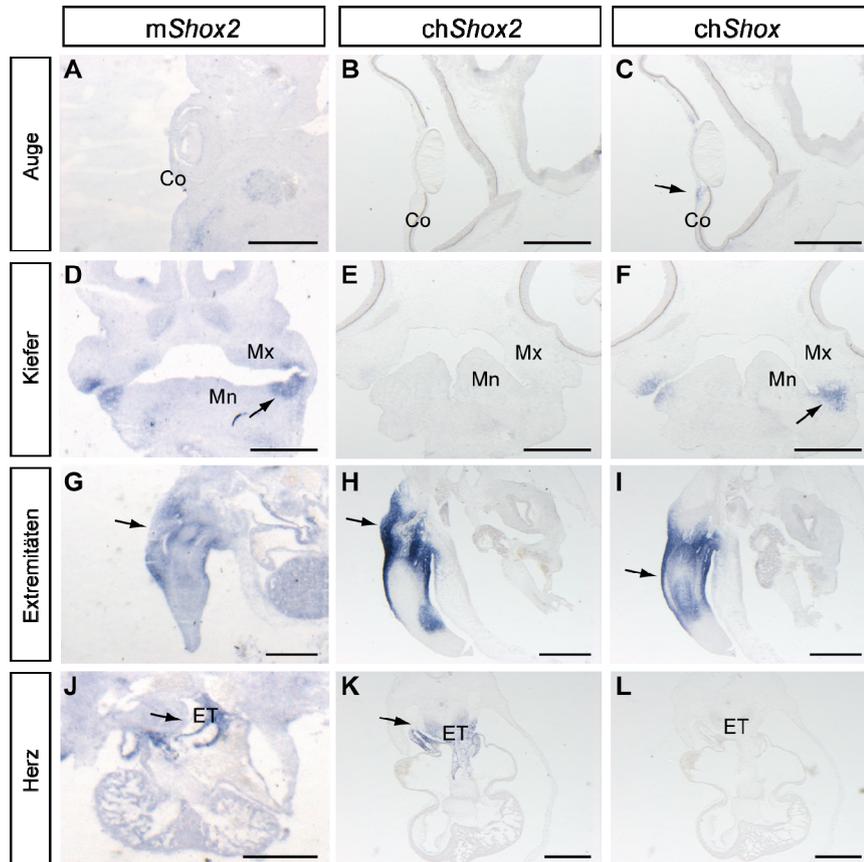


Abbildung 19: Vergleichende Expressionsanalysen von *Shox2* und *Shox* in Maus- und Hühnerembryonen.

In situ Hybridisierungen auf transversale 16 µm Gefrierschnitte von Mausembryonen (E12.5; *mShox2* A-M) und Hühnerembryonen (Tag 5; *chShox2* B-N, *chShox* C-O) zeigen die Expression von *Shox2* und *Shox* im Auge (A-C), im Kiefergelenk (D-F), in den Vorderextremitäten (G-I) sowie im Einflusstrakt des Herzens (J-L). Pfeile markieren die *Shox2*- bzw. *Shox*-Expression. Maßstabsbalken entsprechen in A: 500 µm, B-C: 1000 µm, D: 500 µm, E-F: 1000 µm, G: 500 µm, H-I: 1000 µm, J-L: 500 µm. Co: Cornea, ET: Einflusstrakt Mn: Mandibula, Mx Maxilla. *mShox2* (*Mus musculus Shox2*), *chShox2* (*Gallus gallus Shox2*), *chShox* (*Gallus gallus Shox*)

Eine Zusammenfassung der vergleichenden Expressionsanalysen von *Shox2* und *Shox* im Nervensystem, Auge, Kiefer, Extremitäten und Herz von Maus- und Hühnerembryonen ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

	mShox2	chShox2	chShox
Prosencephalon			
Telencephalon			
Cortex	-	-	-
Hippocampus	-	-	-
Basalganglien	-	-	-
Diencephalon			
Thalamus	+	+	+
Hypothalamus	-	-	-
Mesencephalon			
Colliculus superior			
Neuroepithel	-	-	-
Differenzierungszone	+	+	+
Colliculus inferior			
Neuroepithel	-	-	-
Differenzierungszone	+	+	+
Rhombencephalon			
Pons	+	+	+
Cerebellum	-	-	-
Medulla oblongata	+	+	+
Rückenmark			
Ventrale Interneurone	+	+	(+)
Peripheres Nervensystem			
Ganglion trigeminale	+	+	-
Ganglion vestibulare	+	+	-
Spinalganglion	+	+	-
Auge			
Cornea	-	-	+
Kiefer			
Maxilla-Mandibula-Verbindung	+	-	+
Herz			
Einflusstrakt	+	+	-
Extremitäten	+*	+*	+*

Tabelle 13: Zusammenfassung vergleichender Expressionsanalysen von *Shox2* und *Shox* in Maus- (E12.5) und Hühnerembryonen (Tag 5).

mShox2 (*Mus musculus Shox2*), *chShox2* (*Gallus gallus Shox2*), *chShox* (*Gallus gallus Shox*)

* *Shox2* und *Shox* sind exprimiert, allerdings in unterschiedlichen Bereichen.

Es lässt sich insgesamt feststellen, dass die Expressionsdomänen von *Shox* und *Shox2* im Nervensystem von Hühnerembryonen im Wesentlichen überlappen und diese auch mit der *Shox2*-Expression in neuronalen Strukturen der Maus übereinstimmen. Die Ergebnisse weisen auf redundante Funktionen von *Shox* und *Shox2* in der Entwicklung des Nervensystems hin. Unterschiede in der *Shox*- und *Shox2*-Expression finden sich eher in Strukturen außerhalb des Nervensystems wie im Auge, im Kiefer, in den verschiedenen Expressionsdomänen der Extremitäten und auch im Herz. In Mausembryonen scheint *Shox2* in Bereichen des Kiefergelenks exprimiert zu sein, die im Huhn ausschließlich *Shox*-

Transkripte aufweisen. Diese Aufteilung der *Shox2*-Expressionsdomänen der Maus in unterschiedliche *Shox* und *Shox2*-Expressionsdomänen im Huhn könnte für eine Funktionsübernahme von *Shox* durch *Shox2* in der Maus sprechen. Sie wäre damit ein weiterer Hinweis für eine funktionelle Redundanz der beiden Gene.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors *Shox2* in der Gliedmaßenentwicklung

3.2.1 Analyse des Gliedmaßenphänotyps von *Shox2-knockout*-Mäusen

Die Rolle von *Shox2* bei der Gliedmaßenentwicklung wurde bereits gut belegt (Cobb et al., 2006; Yu et al., 2007). Sowohl der konditionale als auch der konventionelle *knockout* von *Shox2* führt in der Maus zu einer drastischen Verkürzung der Extremitäten im proximalen Bereich, was auf Defekte in der Chondrozytenreifung und -differenzierung zurückzuführen ist. Um die in unserer Arbeitsgruppe generierten *Shox2-knockout*-Mäuse ebenfalls hinsichtlich dieses Phänotyps zu untersuchen, wurden histologische Färbungen an Wildtyp- und *Shox2^{-/-}*-Embryonen (E16.5) durchgeführt (Abbildung 20).

Hierfür wurde Alizarin-Rot verwendet, was Chelatkomplexe mit Kalzium eingeht und somit die knöchernen Elemente der Gliedmaßen rot anfärbt. Des Weiteren wurden nichtmineralisierte, knorpelige Bereiche mit Alzianblau gefärbt, welches Proteoglykane der extrazellulären Matrix nachweist. Vergleicht man gefärbte WT- und *Shox2-knockout*-Embryonen miteinander, fällt eine starke Verkürzung sowohl der Vorder- als auch der Hintergliedmaßen auf. Isoliert zeigen diese eine drastische Verkürzung der proximalen Elemente (Abbildung 20). Sowohl im *Shox2^{-/-}*-Vorder- als auch im Hinterbein sind Humerus bzw. Femur praktisch nicht ausgebildet und zeigen keine verknöcherten Bereiche. Auch die distalen Elemente Ulna und Radius bzw. Tibia und Fibula des *knockouts* sind im Vergleich zum WT etwas verkürzt und Tibia und Fibula weisen außerdem eine leichte Krümmung auf (Abbildung 20). Die histologischen Färbungen an *Shox2-knockout*-Embryonen, welche in dieser Arbeit zur Identifikation von *Shox2*-Zielgenen verwendet wurden, konnten damit den bereits von Cobb et al und Yu et al beschriebenen Gliedmaßenphänotyp bestätigen.

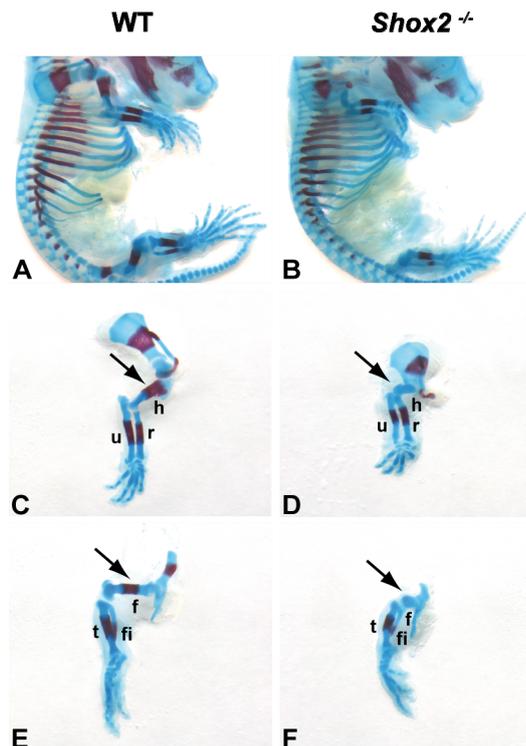


Abbildung 20: Histologische Färbungen zur Analyse des Gliedmaßenphänotyps in *Shox2*-defizienten Mausembryonen.

Alizarin-Rot (Knochen, rot)- und Alcianblau (Knorpel, blau)-Färbungen zeigen eine Verkürzung der Vorder- (C, D) und Hintergliedmaßen (E, F) von *Shox2-knockout*-Embryonen (E16.5) im proximalen Bereich (A-F). Humerus (Arm, D, Pfeil) und Femur (Bein, F, Pfeil) sind stark verkürzt und weisen im Vergleich zum WT keine Verknöcherungen auf (C, E, Pfeile). Auch die distalen Elemente (Radius, Ulna, Fibula und Tibia) zeigen eine leichte Verkürzung, außerdem sind Fibula und Tibia etwas gebogen. h: Humerus; r: Radius, u: Ulna; f: Femur, fi: Fibula; t: Tibia.

3.2.2 *Microarray*-Analysen zur Identifizierung von *Shox2*-Zielgenen

Der drastische Gliedmaßenphänotyp *Shox2*-defizienter Mäuse zeigt, dass *Shox2* eine zentrale Rolle innerhalb der Extremitätenentwicklung einnimmt. Um Einblicke in *Shox2*-abhängige Signalwege während der frühen Gliedmaßenentwicklung zu erlangen, wurde mit Hilfe des *knockout*-Mausmodells nach neuen Zielgenen von *Shox2* gesucht. Um diese zu identifizieren, wurden *microarray*-Analysen mit Gliedmaßengewebe von WT- und *Shox2*^{-/-}-Embryonen durchgeführt. Dafür wurde RNA aus E12.5 WT- und *knockout*-Extremitäten von zwei Würfen mit je drei Embryonen isoliert und gepoolt. Diese RNA wurde auf MOE 430 Plus2 Chips der Firma Affymetrix hybridisiert und die Ergebnisse anschließend statistisch ausgewertet (in Zusammenarbeit mit Dr. Norbert Gretz vom Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Fakultät Mannheim). Von insgesamt 19294 gemessenen Genen waren 2751 statistisch signifikant reguliert. Der Grenzwert für die Signifikanz lag hierbei bei $-\log_{10}[P\text{-Wert}] \geq 1.3$, was einem *P*-Wert von ≤ 0.05 entspricht. Bei einem

Grenzwert von $\log_2 > 0.45$ bzw. < 0.45 zeigten sich 58 Gene deutlich positiv und 57 deutlich negativ reguliert (Abbildung 21).

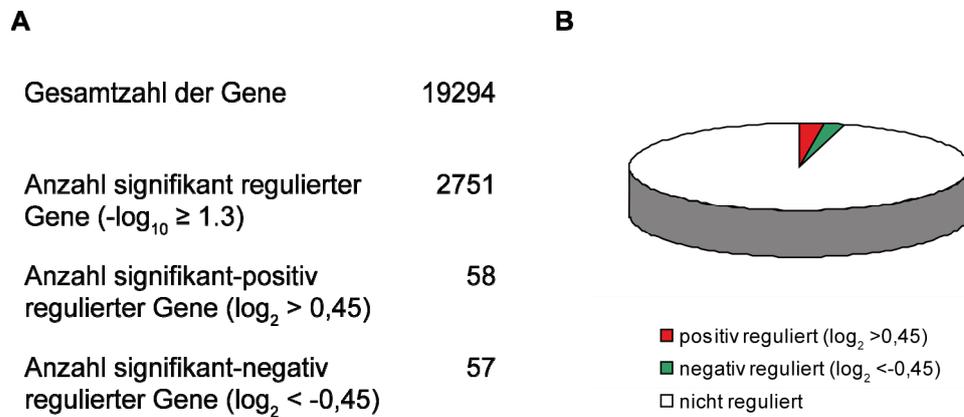


Abbildung 21: Zusammenfassung der *microarray*-Ergebnisse.

Bei einem gesetzten Grenzwert von $\log_2 > 0.45$ bzw. < 0.45 sind von 2751 statistisch signifikant regulierten Genen 58 Gene durch *Shox2* positiv und 57 Gene negativ reguliert (A und schematisch in B, Liste der Gene siehe 6.1). Der Grenzwert für die Signifikanz $-\log_{10}[P\text{-Wert}] \geq 1.3$ entspricht einem *P*-Wert von ≤ 0.05 .

Diese Gene sind in im Anhang aufgelistet (Tabelle 16). Das am stärksten negativ regulierte Gen war *Shox2*, was zeigt, dass der Versuchsansatz generell erfolgreich war. Dies wird außerdem durch einige regulierte Gene bestätigt, die bereits in einem vorangegangenen *microarray* mit *Shox2-knockout*-Gliedermaßen als putative Zielgene identifiziert wurden wie *Lmo1*, *Meox1*, *Rarres1*, *Igf1* und *Gria2* (Vickerman et al., 2011). Im Folgenden wurde eine Auswahl von Genen mit bereits bekannter Funktion bzw. Expression in der Gliedermaßenentwicklung zusammengestellt (Tabelle 14).

Gen	Funktion und/oder Expression	Gen-ID	Änderung (log ₂ [Änderung])	Signifikanz (-log ₁₀ [P-Wert])
Signifikant positiv regulierte Gene (log₂ > 0,45)				
<i>Isl1</i>	LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktor	Mm.42242_at	0,71	5,89
<i>Lmo1</i>	LIM-Domänen-Protein, transkriptioneller Regulator	Mm.360145_at	0,70	1,74
<i>Irx3</i>	Irquois-Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, Shh-abhängige Musterbildung des Nervensystems, in Extremitäten exprimiert	Mm.238044_at	0,69	7,26
<i>Ctsk</i>	Lysosomale Cystein-Protease, Knochen-Umbau und -Resorption	Mm.272085_at	0,56	2,72
<i>Efemp1</i>	Fibulin-Familie, Glykoprotein der extrazellulären Matrix	Mm.44176_at	0,56	2,85
<i>Tbx2</i>	T-Box-Transkriptionsfaktor, Entwicklung der Finger	Mm.287052_at	0,55	3,52
<i>Tbx4</i>	T-Box-Transkriptionsfaktor, Entwicklung der Hinterextremitäten	Mm.275336_at	0,55	9,21
<i>Shh</i>	Hedgehog-Familie sekretierter Proteine, Morphogen	Mm.57202_at	0,51	3,40
<i>Hoxd13</i>	Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, Morphogenese	Mm.57227_at	0,51	9,48
<i>Pitx1</i>	<i>Paired-type</i> Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, Identität der Hinterextremitäten	Mm.135195_at	0,46	8,20
Signifikant negativ regulierte Gene (log₂ < - 0,45)				
<i>Aspn</i>	<i>Small-leucine-rich</i> -Protein in extrazellulärer Matrix des Knorpels	Mm.383216_at	-0,81	6,71
<i>Thbs4</i>	Thrombospondin-Familie, Glykoprotein, Zell-Zell- und Zell-Matrix- Kontakte	Mm.20865_at	-0,76	2,64
<i>Rspo1</i>	R-Spondin-Familie, sekretiertes Aktivatorprotein, TCF-abhängige Gen-Aktivierung	Mm.42202_at	-0,72	1,93
<i>Ogn</i>	<i>Small-leucine-rich</i> -Proteoglykan in extrazellulärer Matrix	Mm.4258_at	-0,71	10,96
<i>Meox1</i>	Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, Mesoderm-Induktion, Somitogenese	Mm.3404_at	-0,68	3,51
<i>Tbx18</i>	T-Box-Transkriptionsfaktor, Segmentierung der Somiten, in Mesenchyme der Gliedmaßenanlage exprimiert	Mm.158789_at	-0,50	4,68
<i>Acan</i>	<i>Aggrecan/versican</i> -Proteoglykan-Familie, in extrazellulärer Matrix des Knorpels	Mm.358571_at	-0,46	2,17

Tabelle 14: Auswahl signifikant regulierter Gene mit relevanter Funktion bzw. Expression in der Gliedmaßenentwicklung.

Die angegebene Regulation (log₂ [Änderung]) bezieht sich auf die Expression der Gene in *Shox2-knockout*-Extremitäten im Vergleich zum WT und liegt bei einem Grenzwert von log₂ > 0.45 bzw. < 0.45. Der Grenzwert für die Signifikanz -log₁₀[P-Wert] ≥ 1.3 entspricht einem P-Wert von ≤ 0.05.

3.2.3 Experimentelle Verifizierung ausgewählter putativer Zielgene

3.2.3.1 Quantifizierung der mRNA-Expression in WT- und *Shox2-knockout*-Gliedmaßen

Die 17 ausgewählten signifikant regulierten Gene (Tabelle 14) wurden weiteren Analysen unterzogen, um sie als mögliche Zielgene von *Shox2* zu bestätigen. Dabei wurden die bereits beschriebenen Zielgene *Lmo1* und *Meox1* als Positivkontrollen verwendet (Vickerman et al., 2011). Zunächst wurde die mRNA-Expression in WT- und *knockout*-Gliedmaßen von E12.5 Embryonen verschiedener Muttertiere quantitativ bestimmt. Dies erfolgte mit qRT-PCR und dem *nCounter*-System (Nanostring Technologies). Einige Gene wurden mit beiden Systemen (*Isl1*, *Lmo1*, *Tbx4*, *Aspn*, *Thbs4*, *Rspo1* und *Ogn*), andere nur mit qRT-PCR (*Ctsk*, *Shh*, *Hoxd13* und *Pitx1*) bzw. dem *nCounter*-System (*lrx3*, *Efemp1*, *Tbx2*, *Meox1*, *Tbx18* und *Acan*) getestet.

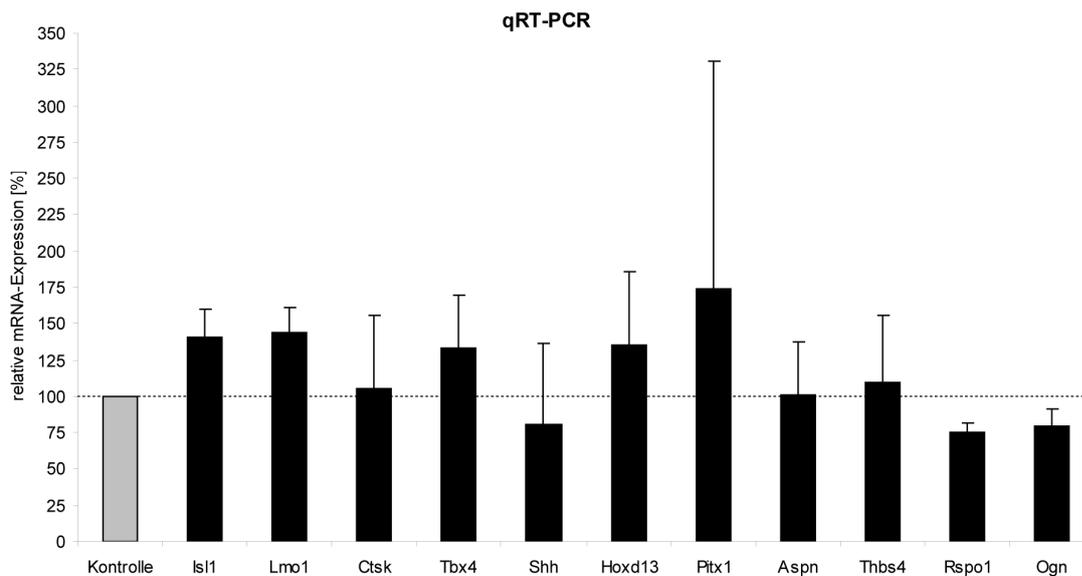


Abbildung 22: Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression ausgewählter Gene mit qRT-PCR.

Isl1, *Lmo1*, *Tbx4* und *Pitx1* zeigen im *knockout* eine Hochregulation; *Shh*, *Rspo1* und *Ogn* zeigten eine Herunterregulation. *Ctsk*, *Aspn* und *Thbs4* waren nicht reguliert. Die WT-Expression entspricht 100 % (grauer Balken, gestrichelte Linie), die *knockout*-Expression ist als schwarzer Balken dargestellt.

Abbildung 22 zeigt die qRT-PCR-Ergebnisse von gepoolten *Shox2-knockout*-Embryonen drei verschiedener Muttertiere im Vergleich zum WT. Die Gene *Isl1*, *Lmo1*, *Tbx4*, *Hoxd13* und *Pitx1* waren im *knockout* hochreguliert, während *Shh*, *Rspo1* und *Ogn* herunterreguliert waren. Die *microarray*-Ergebnisse für diese Gene, ausgenommen *Shh*, wurden damit

bestätigt. *Shh* war, im Gegensatz zu den quantitativen Analysen, im *microarray* hochreguliert und wurde deshalb nicht weiter untersucht. Keine Regulation zeigten *Ctsk*, *Aspn* und *Thbs4*.

Die *nCounter*-Ergebnisse zeigen die relative mRNA-Expression in gepoolten Extremitäten von *Shox2*^{-/-}-Embryonen sechs verschiedener Muttertiere im Vergleich zum WT (Abbildung 23). Übereinstimmend mit den *microarray*-Analysen waren *Lmo1*, *Irx3*, *Efemp1*, *Tbx2* und *Tbx4* im *knockout* positiv reguliert. *Rspo1*, *Ogn*, *Meox1*, *Tbx18* und *Acan* waren negativ reguliert. Keine Regulation zeigten *Isl1* und *Thbs4*.

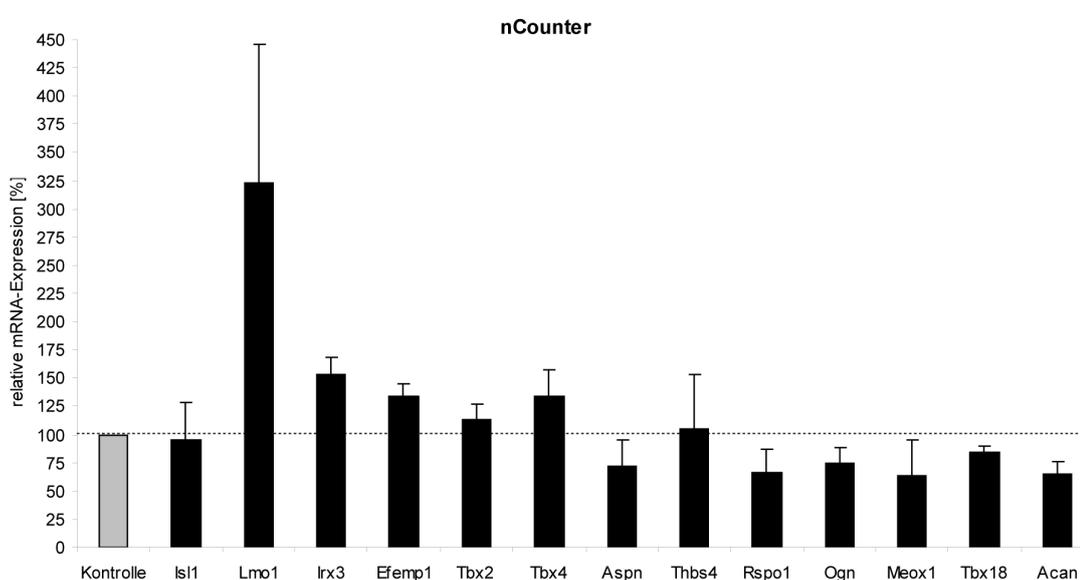


Abbildung 23: Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression ausgewählter Gene mit dem *nCounter*-System.

Lmo1, *Irx3*, *Efemp1*, *Tbx2* und *Tbx4* zeigen im *knockout* eine Hochregulation, *Rspo1*, *Ogn*, *Meox1* und *Acan* eine Herunterregulation. *Isl1* und *Thbs4* sind nicht reguliert. Die WT-Expression entspricht 100 % (grauer Balken, gestrichelte Linie), die *knockout*-Expression ist als schwarzer Balken dargestellt.

Fasst man die qRT-PCR- und *nCounter*-Ergebnisse zusammen, konnten von 17 ausgewählten Genen vier (*Lmo1*, *Tbx4*, *Rspo1* und *Ogn*) in beiden Systemen, zwei (*Hoxd13* und *Pitx1*) mit qRT-PCR und sieben (*Irx3*, *Efemp1*, *Tbx2*, *Aspn*, *Meox1*, *Tbx18* und *Acan*) mit dem *nCounter*-System bestätigt werden. Vier Gene (*Isl1*, *Ctsk*, *Shh* und *Thbs4*) waren nicht reguliert. *Shh* zeigte eine Regulation gegenteilig zum *microarray* (Tabelle 15). *Lmo1*, *Tbx4*, *Rspo1* und *Ogn* wurden in weiteren Experimenten untersucht (hervorgehoben in Tabelle 15)

Gen	Regulation bestätigt mit qRT-PCR	Regulation bestätigt mit nCounter
<i>Isl1</i>	+	-
<i>Lmo1</i>	+	+
<i>Irx3</i>	n.a.	+
<i>Ctsk</i>	-	n.a.
<i>Efemp1</i>	n.a.	+
<i>Tbx2</i>	n.a.	(+)
<i>Tbx4</i>	+	+
<i>Shh</i>	-	n.a.
<i>Hoxd13</i>	+	n.a.
<i>Pitx1</i>	(+)	n.a.
<i>Aspn</i>	-	+
<i>Thbs4</i>	-	-
<i>Rspo1</i>	+	+
<i>Ogn</i>	+	+
<i>Meox1</i>	n.a.	+
<i>Tbx18</i>	n.a.	+
<i>Acan</i>	n.a.	+

Tabelle 15: Zusammenfassung der quantitativen Analysen mit qRT-PCR und dem nCounter-System.

Die hervorgehobenen Gene *Lmo1*, *Tbx4*, *Rspo1* und *Ogn* konnten übereinstimmend mit den *microarray*-Ergebnissen in beiden quantitativen Analysesystemen als reguliert detektiert werden. N. a. (nicht analysiert)

3.2.3.2 Analyse der mRNA-Expression mittels *in situ* Hybridisierung

Im nächsten Schritt wurde die quantitativ bestimmte Deregulation von *Lmo1*, *Tbx4*, *Rspo1* und *Ogn* mittels *whole mount in situ* Hybridisierung auf *Shox2-knockout*- und WT-Embryonen des Stadiums E12.5 überprüft (Abbildung 24). *Lmo1* ist insgesamt sehr schwach in den Gliedmaßen dieses Stadiums exprimiert. Dennoch konnte in den *knockout*-Extremitäten eine etwas stärkere Färbung von *Lmo1* im Vergleich zum WT detektiert werden (Abbildung 24A, B). *Tbx4* ist im WT stark in den Hintergliedmaßen und nur schwach in den Vordergliedmaßen exprimiert. Die *Tbx4*-Expression in den *knockout*-Hintergliedmaßen ist unverändert im Vergleich zum WT, während sie in einem spezifischen, proximalen Bereich der Vordergliedmaßen verstärkt ist (Abbildung 24C, D). Die Expression von *Rspo1* ist sowohl in den hinteren als auch in den vorderen Gliedmaßen von *knockout*-Embryonen unverändert (Abbildung 24E, F). Dagegen konnte eine deutlich schwächere Färbung von *Ogn* in *Shox2*-defizienten Beinanlagen beobachtet werden (Abbildung 24G, H).

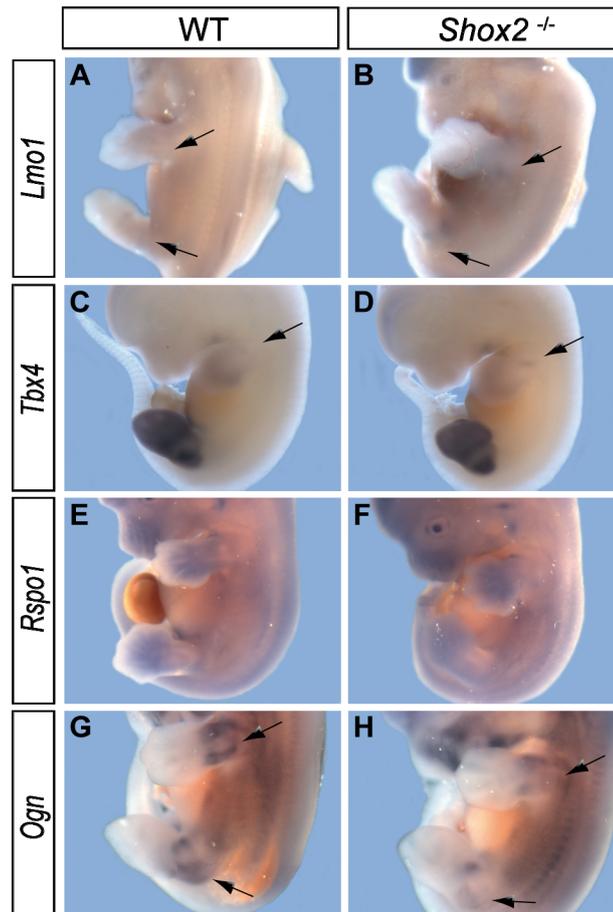


Abbildung 24: Analyse der mRNA-Expression putativer *Shox2*-Zielgene mittels *whole mount in situ* Hybridisierung

Whole mount in situ Hybridisierungen auf E12.5 WT- und *Shox2*-knockout-Embryonen zeigen eine leicht verstärkte Expression von *Lmo1* im *knockout* verglichen mit dem WT (A, B, Pfeile). Die *Tbx4*-Färbung ist in *Shox2*-defizienten Vordergliedmaßen intensiver, während sie in den Hintergliedmaßen unverändert ist (C, D, Pfeil). Für *Rspo1* sind keine Unterschiede in der Expression sichtbar (E, F), *Ogn* ist in *knockout*-Gliedmaßen herunterreguliert (G, H, Pfeile).

Von 17 ausgewählten, regulierten Genen, konnten *Lmo1*, *Tbx4* und *Ogn* mit Hilfe von quantitativen Analysen und *whole mount in situ* Hybridisierung als putative Zielgene von *Shox2* bestätigt werden. *Lmo1*, welcher für einen transkriptionellen Regulator aus der Gruppe der LIM-Domänen-Proteine kodiert, wurde bereits in einem vorangegangenen *microarray* als mögliches Zielgen von *Shox2* identifiziert (Vickerman et al., 2011) und daher in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt. *Tbx4* gehört zur Familie der T-Box-Transkriptionsfaktoren und bei *Ogn* handelt es sich um ein Proteoglykan der extrazellulären Matrix. Für diese Arbeit war *Tbx4* als mögliches Zielgen von besonderem Interesse. Wie auch *Shox2* kodiert es für einen Transkriptionsfaktor und ist maßgeblich in die murine Gliedmaßenentwicklung involviert (Naiche und Papaioannou, 2003). *TBX4*-Mutationen im Menschen führen zu Aplasie bzw. Hyplasie der Patella sowie zu Anomalien der Hüfte und

Füße, dem so genannten *Small patella*-Syndrom (Bongers et al., 2004). Im Folgenden wurden weitere Experimente durchgeführt, um *Tbx4* als Zielgen von *Shox2* zu bestätigen.

3.2.4 Untersuchung von *Tbx4* als Zielgen von *Shox2*

3.2.4.1 Vergleich der Expressionsdomänen von *Shox2* und *Tbx4* in der murinen Gliedmaßenentwicklung

Um zu zeigen, dass *Shox2* und *Tbx4* in embryonalen Gliedmaßen der Maus koexprimiert sind, wurden *whole mount in situ* Hybridisierungen auf Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt (Abbildung 25).

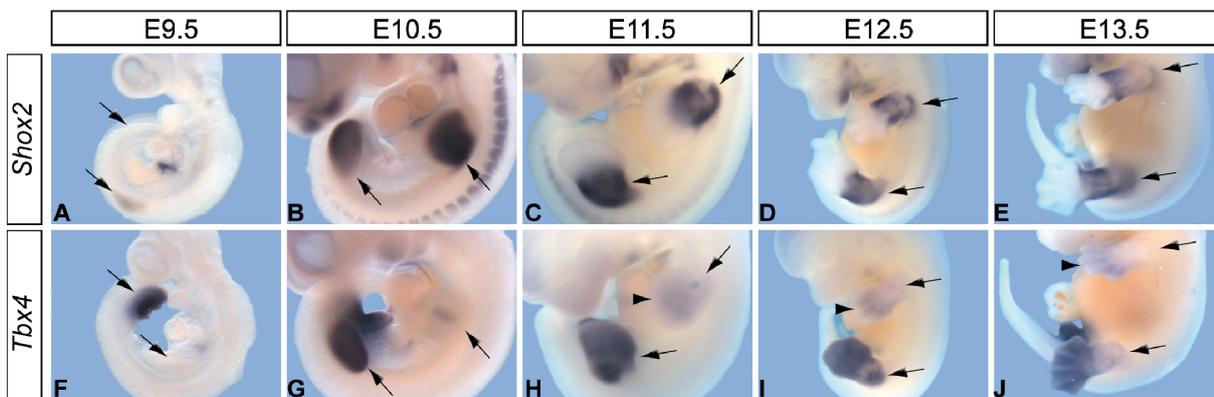


Abbildung 25: *Shox2*- und *Tbx4*-Expression in sich entwickelnden Gliedmaßen.

Whole mount in situ Hybridisierungen auf Mausembryonen verschiedener Entwicklungsstadien bestätigen eine Koexpression von *Shox2* und *Tbx4*. *Tbx4* ist im Stadium E9.5 stark in den Hintergliedmaßen exprimiert (F, Pfeil), die *Shox2*-Expression beginnt zu diesem Zeitpunkt in den Vordergliedmaßen (A, Pfeil). E10.5 ist *Shox2* im gesamten Bereich exprimiert und beschränkt sich ab E11.5 auf den proximalen Bereich (B-E, Pfeile). *Tbx4*-Transkripte sind bis zum Stadium E12.5 in der gesamten hinteren Beinknospe detektierbar (G-I, Pfeil) und ab E13.5 in den distalen Bereich verlagert (J, Pfeil). Die Expression in der Vorderbeinknospe beginnt E10.5 in einem strichförmigen Bereich (G, Pfeil) und nimmt E11.5 ab (H-J, Pfeil). Eine zweite diffuse *Tbx4*-Färbung ist im Vorderbein ab E11.5 zu sehen (H, Pfeilspitze), welche sich ab E12.5 distal verlagert (I, J, Pfeilspitze).

Beide Gene sind sehr früh in der Gliedmaßenentwicklung präsent. *Tbx4* ist bereits zum Zeitpunkt des Auswachsens der Extremitäten, im Stadium E9.5, stark in den Hinterbeinen exprimiert, während die *Shox2*-Expression in den Vorderbeinen beginnt (Abbildung 25A, F). Im weiteren Verlauf der Entwicklung ist *Shox2* relativ breit in Vorder- und Hintergliedmaßen exprimiert. Im Stadium E10.5 sind Transkripte innerhalb der gesamten Extremitätenknospe zu finden, ab E11.5 beschränkt sich die Expression auf den proximalen Bereich (Abbildung 25B-E). Die *Tbx4*-Expression ist bis E12.5 sehr stark in der gesamten hinteren Beinanlage detektierbar und verlagert sich ab E13.5 in den distalen Bereich (Abbildung 25G-J). In den Vordergliedmaßen sind *Tbx4*-Transkripte schwach und in einem kurzen Zeitfenster

detektierbar. Die Expression beginnt E10.5 in einer spezifisch abgegrenzten, strichförmigen Region, welche sich in der Mitte der Extremitätenanlage befindet, (Abbildung 25G) und wird bereits E11.5 wieder schwächer (Abbildung 25H-J). Weiterhin ist eine zweite, eher diffuse, *Tbx4*-Expressionsdomäne vom Stadium E11.5 an zu sehen, welche sich E12.5 in distale Richtung verlagert (Abbildung 25H-J)

3.2.4.2 Expressionsanalyse von *Tbx4* in *Shox2*-defizienten Gliedmaßen

Zur genaueren Analyse der Deregulation von *Tbx4* in *Shox2*-defizienten Gliedmaßen wurden *whole mount in situ* Hybridisierungen auf WT- und *Shox2-knockout*-Embryonen der Entwicklungsstadien E10.5 bis E13.5 von mindestens drei verschiedenen Muttertieren je Stadium durchgeführt (Abbildung 26). Die *Tbx4*-Expression in den Vordergliedmaßen von E10.5 *knockout*-Embryonen ist im Vergleich zum WT schwächer, während sie in den Hintergliedmaßen unverändert ist (Abbildung 26A-B'). Zum Zeitpunkt E11.5, E12.5 und E13.5 dagegen ist *Tbx4* im *Shox2-knockout* in einem spezifischen, proximalen Bereich des Vorderbeins hochreguliert, während die Expression im Hinterbein wiederum unbeeinflusst ist (Abbildung 26C-H'). Diese Beobachtungen konnten nachfolgend mit qRT-PCR-Analysen bestätigt werden (Abbildung 26I-L). Dafür wurde RNA aus Vorder- und Hintergliedmaßen von drei bis sieben WT- und *Shox2*^{-/-}-Embryonen isoliert und vereinigt. Da die *Tbx4*-Expression auf einen spezifischen Bereich der Vordergliedmaßen beschränkt ist (siehe 3.2.4.1), wurde nur der proximale Teil für die RNA-Isolation verwendet. Die Hintergliedmaßen wurden komplett präpariert. Insgesamt wurde für jedes Entwicklungsstadium die RNA von Embryonen mindestens drei verschiedener Muttertiere eingesetzt. Abbildung 26I-L zeigt je ein exemplarisches Beispiel der qRT-PCR-Ergebnisse für jedes Stadium. In Übereinstimmung mit den *in situ* Hybridisierungsdaten konnte in E10.5 *knockout*-Vordergliedmaßen eine Verminderung der *Tbx4*-Expression um 25 % (Abbildung 26I), in den Stadien E11.5, E12, E13.5 eine Hochregulation von 50 % (Abbildung 26J-L) detektiert werden. Die Menge an *Tbx4*-Transkripten im *Shox2-knockout* war in den Hintergliedmaßen unverändert (Abbildung 26J, K) bzw. leicht erhöht (Abbildung 26I, L).

Die ermittelten Ergebnisse weisen daraufhin, dass *Shox2* in der Entwicklung der Vordergliedmaßen im Stadium E10.5 einen schwach positiv- und ab E11.5 einen deutlich negativ-regulatorischen Effekt auf die *Tbx4*-Expression ausübt.

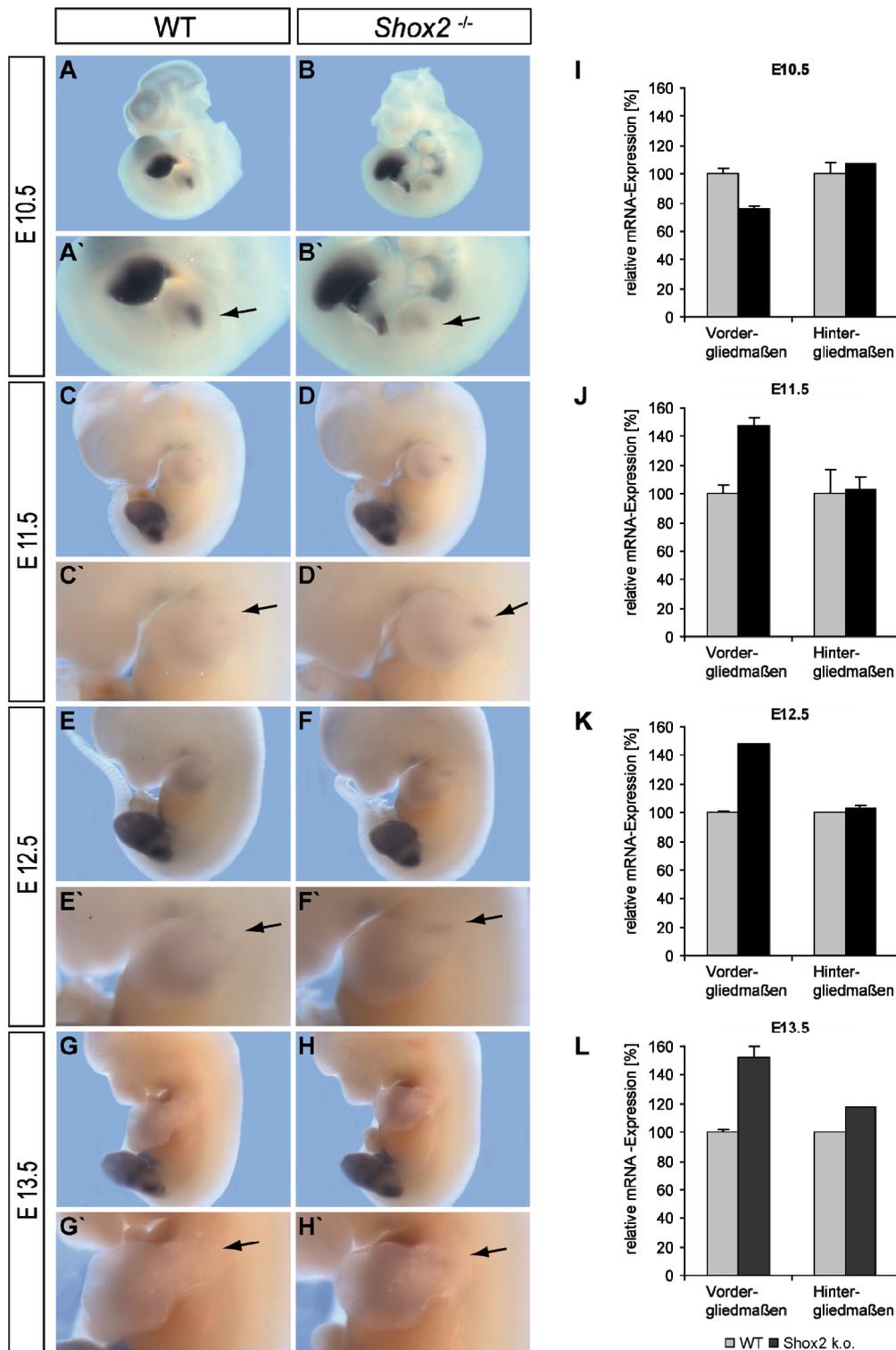


Abbildung 26: Expressionsanalyse von *Tbx4* in *Shox2*-defizienten Gliedmaßen verschiedener Entwicklungsstadien

Whole mount in situ Hybridisierungen auf WT- und *Shox2*-knockout-Embryonen der Stadien E10.5 bis E13.5 zeigen eine verminderte Expression von *Tbx4* in E10.5 (A-B', Pfeile) und eine verstärkte *Tbx4*-Expression in E11.5, E12.5 und E13.5 *Shox2*^{-/-}-Vordergliedmaßen (C-H'). Die Vorderbeine sind in A'-H' vergrößert dargestellt. Die Menge an *Tbx4*-Transkripten ist im Vergleich zum WT in *Shox2*^{-/-}-Hintergliedmaßen in allen Stadien unverändert. Quantifizierung der mRNA-Expression in WT- und *Shox2*^{-/-}-Extremitäten mittels qRT-PCR bestätigte die *in situ* Hybridisierungsdaten (I-L). Es sind exemplarisch die Quantifizierungsergebnisse der *Tbx4*-Expression in WT (entspricht 100 %, graue Balken)- und *Shox2*^{-/-}-Gliedmaßen (schwarze Balken) gezeigt.

3.2.4.3 Luziferase-Reportergenanalysen

Um zu zeigen, dass SHOX2 eine positiv- bzw. negativ-regulatorische Funktion auf den *TBX4*-Promotor oder andere Bereiche des *TBX4*-Gens ausübt, wurden Luziferase-Reportergenanalysen durchgeführt. Dafür wurden mit Hilfe des ECR Browsers (<http://ecrbrowser.dcode.org>) die genomischen Bereiche des *TBX4*-Gens verschiedener Spezies (Frosch, Huhn, Maus, Opossum, Hund und Mensch) miteinander verglichen und auf gemeinsame konservierte Bereiche (*ECRs*, *evolutionary conserved regions*) hin untersucht. Diese können potentiell regulatorische Elemente darstellen. Das menschliche *TBX4*-Gen umfasst ca. 27 kb und enthält neun Exons, wovon acht kodierend sind (Abbildung 27). In einem ca. 60 kb großen Abschnitt des *TBX4*-Lokus wurden insgesamt acht *ECRs* identifiziert und vor eine *Firefly*-Luziferase in den pGL3-promoter-Vektor kloniert. Weiterhin wurden Reporterstrukturen mit möglichen Promotorbereichen von *TBX4* hergestellt. Ein Exon 1 enthaltender Bereich von ca. 3 kb und ein ca. 2,6 kb Bereich vor Exon 2 wurden in die Vektoren pGL3-basic und pGL3-promoter kloniert. Beide Regionen enthalten CpG-Islands (Abbildung 27). Ein anderer Ansatz, um *SHOX2*-regulierte Bereiche zu finden, war die Identifikation von ATTA(N)_nTAAT-Palindromen sowie von TAATTA-Konsensussequenzen innerhalb des *TBX4*-Lokus. Diese Motive wurden bereits als putative *Shox*- bzw. Homöodomänenprotein-Bindesequenzen beschrieben (Rao et al., 2001; Berger et al., 2008). In der genomischen *TBX4*-Region waren mehrere solcher Motive zu finden und wurden in fünf pGL3-promoter-Konstrukten repräsentiert. Zusätzlich zu den pGL3-promoter-Konstrukten wurden *ECR* B und C sowie T1 und T2 in den pGL3-basic-Vektor kloniert, so dass insgesamt 19 Reporterstrukturen generiert wurden (Abbildung 27).

Durch Kotransfektion dieser Reporter-Konstrukte zusammen mit einem *SHOX2*-Expressionsplasmid in HEK293-Zellen und durch anschließende Messung der Luziferase-Aktivität ließen sich Aussagen über das Regulationspotential der verwendeten DNA-Fragmente treffen. Außerdem wurde in allen Experimenten der Vektor pRL-TK kotransfiziert. Dieser kodiert für eine *Renilla*-Luziferase und dient der Normalisierung.

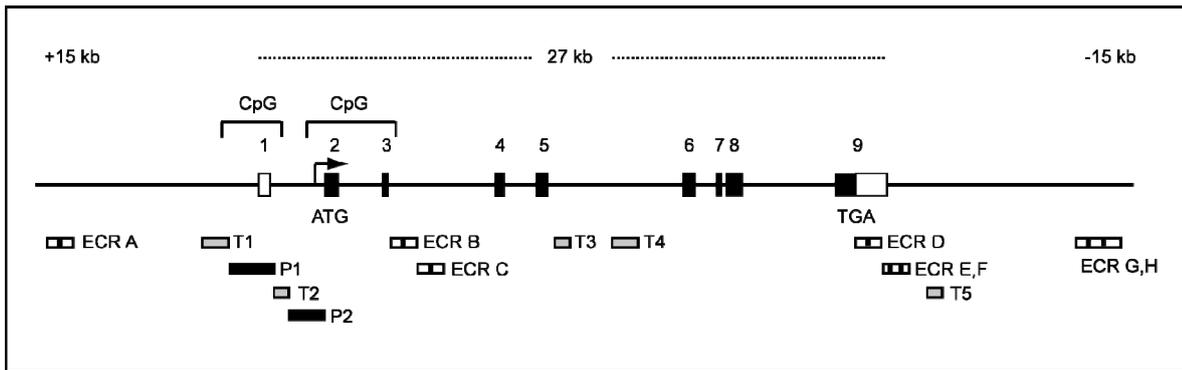


Abbildung 27: In Luziferase-Reportergenkonstrukten verwendete genomische Bereiche des *TBX4*-Gens. Schematisch ist das menschliche *TBX4*-Gen dargestellt. Es besteht aus neun Exons und umfasst genomisch 27 kb. Exon 2-9 sind kodierend (schwarze Kästen), Exon 1 ist nichtkodierend (weißer Kasten). Der Transkriptionsstart befindet sich vor Exon 2 (Pfeil). Um Exon 1, 2 und 3 befinden sich zwei CpG-Islands (CpG, Klammern). Zusätzlich sind 15 kb *up-* und *downstream* des *TBX4*-Gens eingezeichnet. Für Luziferase-Reportergenanalysen wurden sechs *ECR* (evolutionary conserved region)-enthaltende Bereiche (*ECR* A-H), fünf Bereiche mit ATTA(N)_nTAAT-Palindromen bzw. TAATTA-Konsensussequenzen (T1-T5) sowie zwei, CpG-Islands enthaltende, putative Promotorsequenzen (P1 und P2) in die Vektoren pGL3-basic und pGL3-promoter kloniert. Insgesamt wurden 19 verschiedene Reporterstrukture generiert.

In Abbildung 28 sind repräsentative Ergebnisse für alle 19 verwendeten *TBX4*-Reporter-Konstrukte in drei Experimenten (A, B, C) zusammengestellt. Sie zeigen eine schwach aktivierende Funktion von *SHOX2* auf die jeweiligen Reporter, was allerdings auf einen unspezifischen Effekt von *SHOX2* auf die Leervektoren pGL3-basic und pGL3-promoter zurückzuführen ist. Der Reporter pGL3-basic-P1 zeigte als einziger einen schwach inhibierenden Effekt mit einer Abnahme der Luziferase-Aktivität von 20 % nach Kotransfektion des *SHOX2*-Expressionsplasmids (Abbildung 28B). Mit keinem der 19 Reporter konnte eine deutliche Zu- bzw. Abnahme der Luziferase-Aktivität durch *SHOX2* erreicht werden.

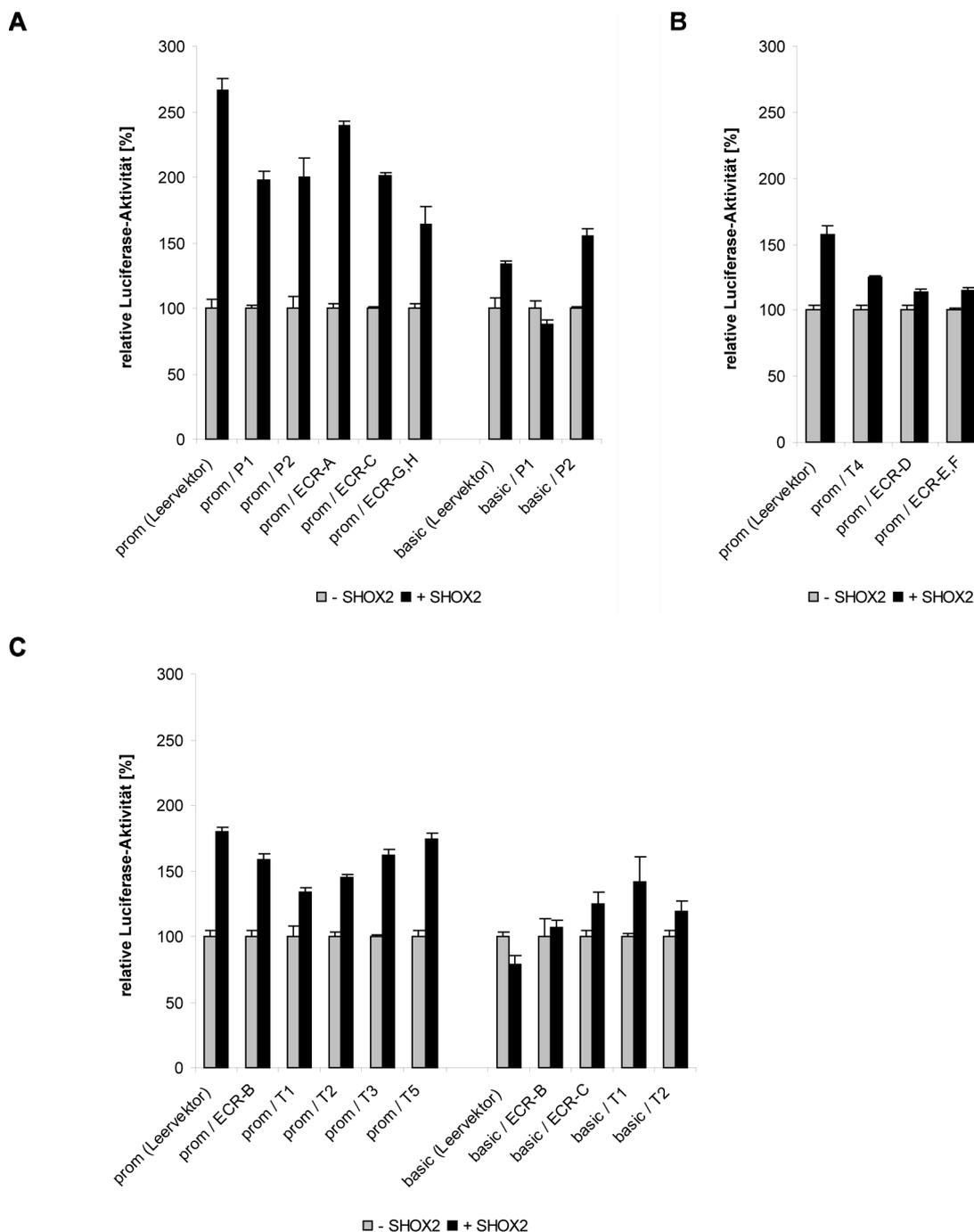


Abbildung 28: Luziferase-Assays mit verschiedenen *TBX4*-Reporterkonstrukten.

In HEK293-Zellen wurden 19 *TBX4*-Reporterkonstrukte zusammen mit einem *SHOX2*-Expressionsplasmid kotransfiziert und anschließend die Luziferase-Aktivität gemessen. Als Kontrolle wurden der pGL3-basic- bzw. pGL3-promoter-Leervektor verwendet. Prom (pGL3-promoter), basic (pGL3-basic), graue Balken (Reporter ohne *SHOX2*), schwarze Balken (Reporter mit *SHOX2*).

In einem weiteren Experiment wurden die Reporterkonstrukte pGL3-basic-P1 und P1, welche die putativen Promotor-Sequenzen von *TBX4* enthielten, genauer analysiert. Sie wurden zusammen mit verschiedenen Konzentrationen des *SHOX2*-Expressionsplasmids kotransfiziert (Abbildung 29). Um unspezifische Effekte von *SHOX2* auf den pGL3-basic-

Leervektor auszuschließen, diente dieser als Kontrolle. Abbildung 29 zeigt für P1 nach Transfektion von 250 ng und 500 ng *SHOX2* zunächst einen Anstieg der Luziferase-Aktivität. Höhere Konzentrationen des *SHOX2*-Plasmids (1 µg und 2 µg) konnten P1 immer noch aktivieren, allerdings weniger stark. Da *SHOX2* auf den pGL3-Leervektor die gleiche Wirkung hat, handelt sich um einen unspezifischen Effekt. Die im vorangegangenen Experiment beobachtete schwache Verminderung der Luziferase-Aktivität durch *SHOX2* konnte in diesem Versuch nicht bestätigt werden. Für P2 war die gleiche unspezifische Aktivierung wie für P1 detektierbar, mit Ausnahme der Transfektion von 2 µg *SHOX2*. Diese Konzentration von *SHOX2* wirkt sich immer noch aktivierend auf pGL3-basic-P2 aus, wohingegen das für den Leervektor nicht der Fall ist. *SHOX2* scheint in diesem System bei höheren Konzentrationen einen aktivierenden Einfluss auf den P2-Reporter zu besitzen.

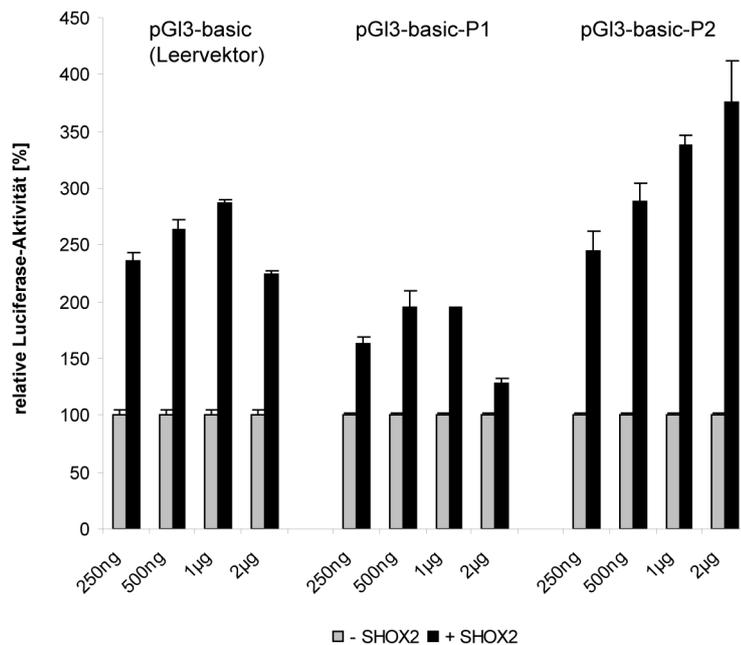


Abbildung 29: Luziferase-Assay mit den P1- und P2-Reporterkonstrukten und steigenden *SHOX2*-Konzentrationen

In HEK293-Zellen wurden die P1- und P2-pGL3-basic-Reporterkonstrukte zusammen mit ansteigenden Konzentrationen des *SHOX2*-Expressionsplasmids kotransfiziert und anschließend die Luziferase-Aktivität gemessen. Als Kontrolle wurde der pGL3-basic-Leervektor verwendet. Graue Balken (Reporter ohne *SHOX2*), schwarze Balken (Reporter mit *SHOX2*).

In Luziferase-Assays konnte weder der aktivierende noch der inhibierende Effekt von *Shox2* auf die *Tbx4*-Expression in den Vordergliedmaßen bestätigt werden. Dies könnte auf eine indirekte Regulation von *Tbx4* durch *Shox2* hinweisen. Eine andere mögliche Erklärung

wäre, dass in den verwendeten HEK293-Zellen für die Regulation notwendige Kofaktoren fehlen.

3.2.4.4 Expressionsanalyse von *Pitx1* in *Shox2*-defizienten Gliedmaßen

Wenn es sich bei dem Einfluss von *Shox2* auf die *Tbx4*-Expression um eine indirekte Regulation handelt, müssen ein oder mehrere Faktoren zwischengeschaltet sein. Ein solcher Faktor könnte der *paired-type* Homöodomänen-Transkriptionsfaktor *Pitx1* sein, welcher ebenfalls als putatives *Shox2*-Zielgen im *microarray* identifiziert wurde (siehe 3.2.2). Wie *Tbx4* ist er hauptsächlich in den Hintergliedmaßen, aber auch in einer spezifischen Region der Vordergliedmaßen exprimiert ist (Logan et al., 1998; Logan und Tabin, 1999; Szeto et al., 1999) (Abbildung 30). *Pitx1* ist für die Festlegung der Identität der Hinterbeine verantwortlich und induziert eine verstärkte *Tbx4*-Expression, wenn es ektopisch in Vorderbeinen exprimiert wird (DeLaurier et al., 2006). Aufgrund dieser Befunde kann über *Pitx1* als möglicher, *Shox2*-nachgeschalteter, *upstream*-Regulator von *Tbx4* spekuliert werden. Um das zu untersuchen, wurden *whole mount in situ* Hybridisierungen auf WT- und *Shox2*-knockout-Embryonen der Stadien E11.5 und E12.5 durchgeführt (Abbildung 30). In beiden Stadien konnten sowohl in Vorder- als auch in Hintergliedmaßen keine Unterschiede festgestellt werden. *Pitx1* ist demnach nicht an der Regulation von *Tbx4* durch *Shox2* beteiligt.

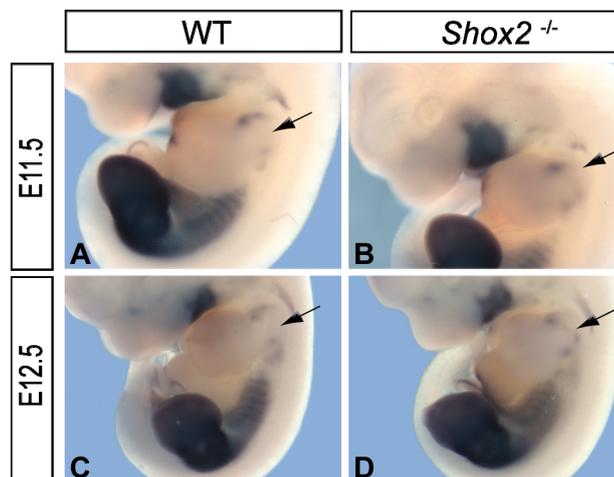


Abbildung 30: Expressionsanalyse von *Pitx1* in *Shox2*-defizienten Gliedmaßen.

Whole mount in situ Hybridisierungen auf E11.5 und E12.5 WT- und *Shox2*-knockout-Embryonen zeigen, dass *Pitx1* hauptsächlich in den Hintergliedmaßen, aber auch in einer spezifischen Region der Vordergliedmaßen exprimiert ist (Pfeile). Es sind keine Unterschiede zwischen der WT- und *Shox2*^{-/-}-Expression von *Pitx1* detektierbar.

3.2.5 Untersuchung von *Shox2* als Zielgen von *Tbx4*

Der regulatorische Einfluss von *Shox2* auf *Tbx4* ist auf einen sehr spezifischen Bereich in den Vordergliedmaßen beschränkt und konnte in Luziferase-Assays nicht bestätigt werden. Eine mögliche Hypothese in diesem Zusammenhang könnte sein, dass *Tbx4* der Regulator von *Shox2* ist und der beobachtete Einfluss von *Shox2* auf die *Tbx4*-Expression auf einen *feedback*-Mechanismus zurückzuführen ist. Ein Argument dafür wäre auch, dass *Tbx4* zu einem früheren Zeitpunkt als *Shox2* in den Extremitäten exprimiert ist (Abbildung 25). Um dieser Frage nachzugehen, wurde im Folgenden der regulatorische Einfluss von *Tbx4* auf *Shox2* untersucht.

3.2.5.1 Expressionsanalyse von *Shox2* in *Tbx4*-defizienten Gliedmaßen

Um die *Shox2*-Expression in einem *Tbx4-knockout*-Mausmodell (Naiche und Papaioannou, 2003) zu untersuchen wurden in Zusammenarbeit mit Ripla Arora und Dr. Virginia Papaioannou (Columbia University, New York) *whole mount in situ* Hybridisierungen von *Shox2* auf *Tbx4^{-/-}*-Embryonen des Stadiums E10.5 durchgeführt (Abbildung 31). Die Analyse von späteren Entwicklungsstadien war nicht möglich, da der *Tbx4-knockout* aufgrund von Defekten in der Allantoisentwicklung embryonal letal ist und die Embryonen bereits nach dem Stadium E10.5 sterben. Abbildung 31 zeigt eine deutliche Reduktion der *Shox2*-Expression in *Tbx4^{-/-}*-Vorder- und Hintergliedmaßen im Vergleich zum WT. Dies konnte in zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt sieben Embryonen jeden Genotyps nachgewiesen werden. Zur weiteren Untersuchung wurden quantitative Analysen durchgeführt. Dafür wurde RNA aus Vorder- und Hintergliedmaßen von E10.5 WT- und *Tbx4-knockout*-Embryonen von zwei verschiedenen Muttertieren isoliert. Diese wurde in drei *pools* aus zwei bis drei Embryonen pro Genotyp vereinigt und mit qRT-PCR auf die *Shox2*-Expression hin untersucht. Somit wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Abbildung 31G zeigt ein repräsentatives Beispiel der Ergebnisse. Es konnte eine Reduktion der *Shox2*-Expression um ca. 40 % in *Tbx4^{-/-}*-Vordergliedmaßen und ca. 80 % in *Tbx4^{-/-}*-Hintergliedmaßen gemessen werden. Dieser wesentlich stärkere Effekt in den Hinterbeinen im Vergleich zu den Vorderbeinen könnte mit der differenziellen Expression von *Tbx4* in den entsprechenden Beinanlagen erklärt werden (siehe 3.2.4.1).

Die Expressionsanalysen weisen darauf hin, dass *Tbx4* einen positiv-regulatorischen Effekt auf *Shox2* ausübt. Sie stellen damit eine erste Bestätigung der Hypothese dar, dass die *Shox2*-Expression tatsächlich von *Tbx4* abhängig ist.

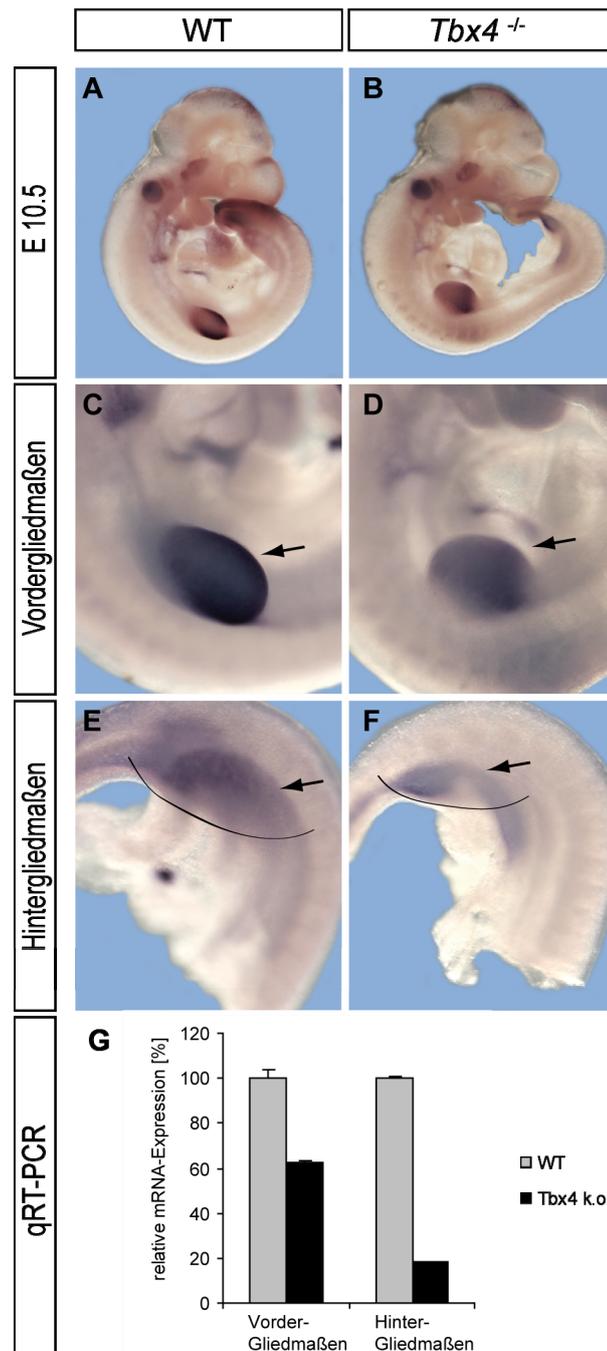


Abbildung 31: Expressionsanalyse von *Shox2* in *Tbx4*-defizienten Gliedmaßen von E10.5 Embryonen.

Whole mount in situ Hybridisierungen auf WT- und *Tbx4*^{-/-}-Embryonen des Stadiums E10.5 zeigen eine deutliche Reduktion der *Shox2*-Expression in *Tbx4*^{-/-}-Vorder- und Hintergliedmaßen (C-F, Pfeile). C-D stellt die Extremitäten der Embryonen in A und B vergrößert dar. Die Hintergliedmaßen sind durch eine schwarze Linie gekennzeichnet. Mit qRT-PCR konnte eine Verminderung der *Shox2*-Expression um 40 % in *Tbx4*^{-/-}-Vorderbeinen und um 80 % in Hinterbeinen detektiert werden (G, schwarze Balken).

3.2.5.2 qRT-PCR-Analysen nach *Tbx4*-knockdown

Um auszuschließen, dass die beobachtete Reduktion der *Shox2*-Expression in *Tbx4*-knockout-Gliedmaßen eine Folge von Gewebeverlust ist, wurde sie in einem weiteren System untersucht. Dafür wurde ein siRNA-vermittelter *knockdown* von *TBX4* in NHDF-Zellen durchgeführt.

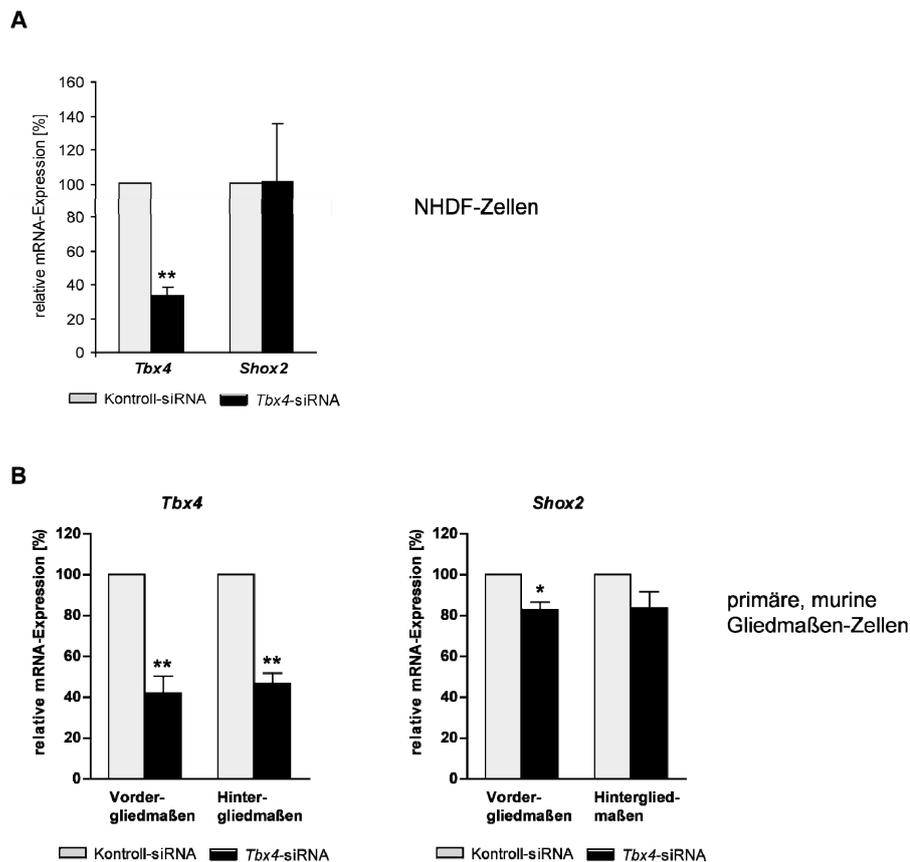


Abbildung 32: *TBX4/Tbx4*-knockdown in NHDF-Zellen und primären Gliedmaßen-Zellen der Maus.

qRT-PCR-Ergebnisse der *Tbx4*- und *Shox2*-Expression nach siRNA-vermitteltem *Tbx4*-knockdown. Während in NHDF-Zellen keine Änderung der *Shox2*-Expression detektiert wurde (A, rechts), konnte in primären Zellen aus murinen E12.5 Vorder- und Hintergliedmaßen eine Reduktion von *Shox2* um ca. 20 % erreicht werden (B, rechts).

Bei diesen Zellen handelt es sich um eine humane dermale Fibroblastenlinie, welche als eine der wenigen getesteten Zelllinien endogen *TBX4* exprimiert (Daten nicht gezeigt). Die Zellen wurden in 6-*well*-Platten kultiviert und mit 40 pmol siRNA gegen menschliches *TBX4* bzw. Kontroll-siRNA pro *well* transfiziert (verwendete siRNA siehe 2.3.2). Nach 24 h Kultivierung wurde die RNA isoliert und als cDNA mittels qRT-PCR auf die *TBX4*- und *SHOX2*-Expression hin untersucht. In drei voneinander unabhängigen Experimenten konnte bei einer *TBX4*-knockdown-Effizienz von 67 % keine Verminderung der *SHOX2*-Expression erreicht

werden (Abbildung 32A). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass NHDF-Zellen nicht die molekulare gliedmaßenspezifische Umgebung reflektieren, welche für die Regulation benötigt wird. Um ein besseres System zu verwenden, wurden primäre Kulturen aus embryonalen Extremitäten der Maus hergestellt. Dafür wurden Vorder- und Hintergliedmaßen von E12.5 WT-Embryonen getrennt präpariert, dissoziiert und auf Gelatine-beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Diese wurden wiederum in 6-*well*-Platten mit 40 pmol Kontroll- bzw. *Tbx4*-siRNA transfiziert, die RNA nach 24 h isoliert und in cDNA umgeschrieben. In Abbildung 32B sind die qRT-PCR-Ergebnisse der *Tbx4*- und *Shox2*-Expression von drei unabhängigen Experimenten dargestellt: bei einer *Tbx4*-Knockdown-Effizienz von ca. 55 % konnte in primären Zellen von murinen Vorder- und Hintergliedmaßen eine Verminderung der *Shox2*-Expression um ca. 20 % erreicht werden.

In *knockdown*-Experimenten konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem Effekt von *Tbx4* auf *Shox2* in embryonalen Gliedmaßen der Maus tatsächlich um eine Regulation handelt und diese nicht auf einer Fehlentwicklung des Extremitätengewebes beruht.

3.2.5.3 Luziferase-Reporteranalysen und *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)

Um zu zeigen, dass TBX4 eine positiv-regulatorische Funktion auf den *SHOX2*-Promotor ausübt, wurden Luziferase-Reporteranalysen durchgeführt. Dafür wurde der genomische Bereich *upstream* des menschlichen *SHOX2*-Gens auf potentielle T-Box-Bindestellen untersucht. Die T-Box-DNA-Bindesequenz (TBE, *T-box binding element*) wurde ursprünglich als Bindestelle für Brachyury, das erste identifizierte Mitglied der T-Box-Familie, entdeckt (Kispert und Hermann, 1993). Verschiedene Studien konnten daraufhin zeigen, dass generell alle T-Box-Proteine als Monomer an die *T-half site* der palindromischen Brachyury-Bindesequenz T(G/C)ACACCT/AGGTGTGAAATT binden können (Naiche et al., 2005). Allerdings wurden für einige Mitglieder der T-Box-Familie spezifische, optimale Bindestellen identifiziert. Ein Beispiel ist TBX5, welches bevorzugt an die Sequenz (A/G)GGTGT(C/T/G)(A/G) bindet (Ghosh et al., 2001), während für TBX4 bisher keine solchen Elemente bekannt sind. TBX5 und TBX4 stellen das am nächsten verwandte Paar innerhalb der T-Box-Proteine dar (Tada und Smith, 2001). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen beider Proteine miteinander, lässt sich eine Übereinstimmung von 95 % innerhalb der T-Box-Sequenz feststellen (Abbildung 33). Aufgrund ihrer nahezu identischen DNA-Binde-Domänen kann angenommen werden, dass beide Proteine an die gleiche DNA-Sequenz binden können.

Experimente wurden auch mit primären Zellen aus E12.5 Hintergliedmaßen durchgeführt und lieferten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

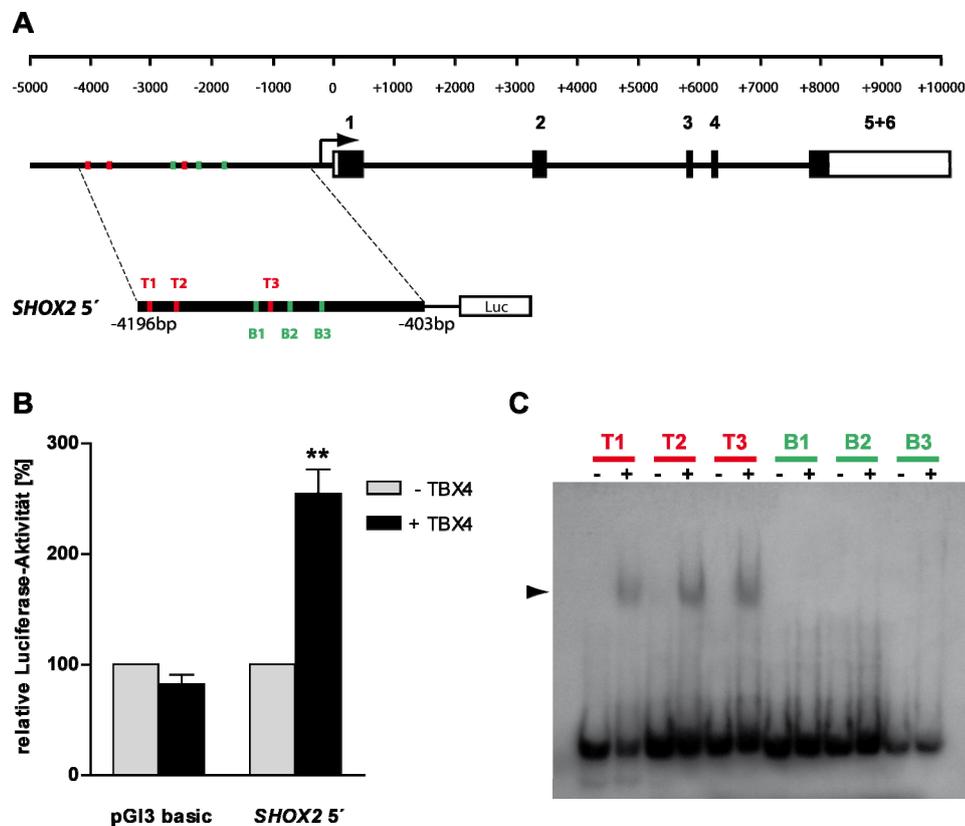


Abbildung 34: Untersuchung des regulatorischen Effekts von TBX4 auf *SHOX2* mit Hilfe von Luciferase-Reportergenanalysen und *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA)

Für Luciferase-Reportergenanalysen wurden 5 kb *upstream* des Transkriptionsstarts von *SHOX2* vor eine *Firefly*-Luciferase in den pGL3-Promoter-Vektor kloniert (*SHOX2* 5', A). Dieser genomische Bereich enthält drei TBX5 (T1-T3, rot)- und drei Brachyury (B1-B3, grün)-Bindestellen. Nach Kotretransfektion dieses Reporterkonstrukts zusammen mit einem TBX4-Expressionsplasmid konnte ein 2,5 facher Anstieg der Luciferaseaktivität gemessen werden (B, rechts, schwarzer Balken). TBX4 hat dabei keinen Einfluss auf den pGL3-Leervektor (B, links, schwarzer Balken). EMSA-Studien zeigen einen *shift* der TBX5-Oligos T1-T3 nach Inkubation mit aufgereinigtem TBX4-Protein (C, T1-T3, Pfeilkopf). Für die Brachyury-Oligos war kein *shift* zu beobachten (C, B1-B3). + (mit TBX4-Protein), - (ohne TBX4-Protein).

Um zu zeigen, dass es sich bei der Aktivierung des *SHOX2*-Promotors durch TBX4 um eine direkte Regulation handelt und um die TBX4-Bindestellen innerhalb des 5 kb *upstream*-Bereiches von *SHOX2* näher einzugrenzen, wurden EMSA-Studien durchgeführt (Abbildung 34C). Dafür wurden sechs 65 bp lange Oligonukleotide der genomischen *SHOX2*-Sequenz verwendet, welche die TBX5 (T1-T3)- bzw. Brachyury (B1-B3)-Bindestellen enthielten (siehe 2.3.2). Diese wurden mit aufgereinigtem TBX4-Protein inkubiert und über nicht-denaturierende PAA-Gele aufgetrennt. Die Oligos T1-T3 zeigen alle einen *shift* im Vergleich zur Negativkontrolle, welcher durch Bindung des TBX4-Proteins entsteht (Abbildung 34C).

Für die Oligos B1-B3 war kein solcher *shift* zu beobachten, was bedeutet, dass TBX4 eine spezifische Affinität zu den TBX5-Bindestellen im *SHOX2*-Promotor aufweist.

Die beschriebenen Luziferase- und EMSA-Experimente konnten damit zeigen, dass TBX4 durch direkte Bindung an den Promotorbereich von *SHOX2* in der Lage ist, diesen zu aktivieren. Außerdem wurde erstmalig die TBX5-Bindesequenz (A/G)GGTGT(C/T/G)(A/G) auch als Bindestelle für TBX4 nachgewiesen und könnte somit in Zukunft zur Identifikation von TBX4-Zielgenen beitragen.

In diesem Teil der Arbeit konnten mit Hilfe von *microarray*-Analysen, *in situ* Hybridisierungen und quantitativen Studien *Lmo1*, *Tbx4* und *Ogn* als neue putative Zielgene von *Shox2* identifiziert und charakterisiert werden, wobei im Hinblick auf die Gliedmaßenentwicklung *Tbx4* das interessanteste Gen darstellte. Unter Verwendung des *Shox2-knockout*-Mausmodells konnte in *whole mount in situ* Hybridisierungen und quantitativen Analysen gezeigt werden, dass *Shox2* die *Tbx4*-Expression spezifisch in den Vorderextremitäten negativ reguliert. Nachfolgende Experimente im *Tbx4-knockout*-Mausmodell und in Zellkultur identifizierten *Tbx4* weiterhin als positiven Regulator von *Shox2* während der Gliedmaßenentwicklung. *In vitro* Studien bestätigten dann, dass es sich dabei um eine direkte Regulation über drei TBX4-Bindestellen im genomischen Promotorbereich von *SHOX2* handelt. Da der regulatorische Einfluss von *Shox2* auf *Tbx4* in Luziferase-Assays nicht bestätigt werden konnte, wurde ein *feedback*-Mechanismus postuliert, in dem *Tbx4* der Regulator von *Shox2* ist und *Shox2* wiederum einen rückwirkenden Einfluss auf die *Tbx4*-Expression besitzt. Die zeitlich etwas frühere Expression von *Tbx4* im Vergleich zu *Shox2* in sich entwickelnden Extremitäten sowie der Vorderbein-spezifische Einfluss von *Shox2* auf *Tbx4* unterstützen diese These.

4 Diskussion

4.1 Die Redundanz von SHOX und SHOX2

4.1.1 Vergleich der funktionellen Eigenschaften von SHOX und SHOX2

Die nahe Verwandtschaft, ebenso wie das in vielen Geweben überlappende Expressionsmuster führten bereits seit einigen Jahren immer wieder zu Spekulationen redundanter Funktionen von SHOX und SHOX2 (Blaschke et al., 1998; Clement-Jones et al., 2000; Cobb et al., 2006). Beide Proteine wurden bereits funktionell untersucht und stimmen in vielen Eigenschaften überein. Für SHOX konnte gezeigt werden, dass ein Kernlokalisierungssignal (*NLS, nuclear localization signal*) mit dem Motiv AKCRK innerhalb der Homöodomäne für den Kerntransport verantwortlich ist (Sabherwal et al., 2004a). SHOX und SHOX2 besitzen identische Homöodomänen, demnach weist SHOX2 ebenfalls dieses Motiv auf. Untersuchungen hinsichtlich der subzellulären Lokalisierung in humanen Osteosarkomzellen (U2OS) und Kardiomyozyten der Ratte (H9c2) zeigten, dass SHOX2 ebenso wie SHOX spontan in den Zellkern transportiert wird (Blaschke, 2005). EMSA-Studien bestätigten weiterhin Übereinstimmungen im DNA-Bindungsverhalten. Sowohl SHOX als auch SHOX2 binden an das für *paired-related*-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren typische palindromische Bindemotiv 5'-TAAT (N)₃ ATTA -3' (Rao et al., 2001; Blaschke, 2005; Puskaric et al., 2010). Die transaktivierende Funktion von SHOX konnte auf die OAR-Domäne am C-terminalen Ende des Proteins zurückgeführt werden (Rao et al., 2001). Aufgrund einer Homologie der Domäne von 93 % (13 von 14 Aminosäuren) zwischen SHOX und SHOX2, kann von einem ähnlichen Transaktivierungspotential des SHOX2-Proteins ausgegangen werden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen Bereiche von SHOX und SHOX2 wichtig für entsprechende transaktivierende und reprimierende Eigenschaften beider Proteine sind (Yu et al., 2005) und dass beide einen reprimierenden Effekt auf den *Nkx2.5*-Promotor ausüben (Liu et al., 2011). Außerdem wurden in verschiedenen Studien gemeinsame putative Zielgene von *SHOX* und *SHOX2* identifiziert. Beispielsweise zeigten *in situ* Hybridisierungen auf Schnitte *Shox2*-defizienter Mausembryonen, dass *Shox2* für die Aktivierung von *Runx2* und *3* (*Runt-related transcription factor 2 and 3*), welche maßgeblich in die Chondrozytendifferenzierung involviert sind, notwendig ist (Yu et al., 2005; Cobb et al., 2006). Eine Überexpression von *SHOX* in U2OS- und NHDF-Zellen führte ebenfalls zu einem Anstieg der *RUNX3*-Expression (Decker, 2010). In *rescue*-Experimenten in *Xenopus laevis* konnten *Shox* und *Shox2* einen durch LiCl erzeugten dorsalisierten Phänotyp teilweise

retten. Dies erfolgte über die Aktivierung der *Bmp4* (*Bone morphogenetic protein 4*)-Expression. Beide Proteine waren in der Lage, den *BMP4*-Promotor zu binden und diesen in Luziferase-Reporterexperimenten zu aktivieren (Schneider, 2007; Puskaric et al., 2010; Puskaric, 2011). Allerdings muss der regulatorische Einfluss von *Shox* in diesen Experimenten kritisch betrachtet werden. Voraussetzung für eine direkte Regulation von *Bmp4* durch *Shox* ist die Koexpression beider Gene. In *Xenopus laevis* existieren jedoch keine überlappenden Expressionsdomänen. Da *Bmp4* auch in der Maus als direktes *Shox2*-Zielgen im Einflusstrakt des Herzens nachgewiesen wurde und beide Gene in diesem spezifischen Bereich koexprimiert sind, ist anzunehmen, dass *Shox* lediglich aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu *Shox2* einen regulatorischen Effekt auf *Bmp4* ausübt und diese Regulation keine physiologische Bedeutung hat (Puskaric, 2011). Neben Gemeinsamkeiten gibt es auch Hinweise auf spezifische Eigenschaften von *SHOX* und *SHOX2* in der Regulation von Zielgenen. Eines dieser Beispiele stellt *FGFR3* dar, welches als direktes *SHOX*-Zielgen identifiziert und bestätigt wurde (Decker et al., 2011). Eine Überexpression von *SHOX* führt zu einem Anstieg der *FGFR3*-Expression in U2OS- und NHDF-Zellen, während *SHOX2* keinen Einfluss auf die Menge an *FGFR3*-Transkripten in diesen Zellen besitzt (Decker, 2010). Für die Regulation von Zielgenen ist, neben der DNA-Bindungsaffinität und -spezifität, die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit anderen Proteinen entscheidend. Für *SHOX* und *SHOX2* konnten mit Hilfe des *yeast two hybrid*-Systems und nachfolgenden Validierungsexperimenten FHL2 und 3, PSMA3 sowie EFEMP1 und 2 als Interaktionspartner von *SHOX* und *SHOX2* identifiziert werden (Hristov, 2005; Glaser, 2006; Spitzer, 2006).

Ziel dieser Arbeit war es, die Redundanz von *SHOX* und *SHOX2* genauer zu untersuchen sowie *Shox2*-abhängige Zielgene innerhalb der Gliedmaßenentwicklung zu identifizieren. Einige der ermittelten Daten in Zusammenhang mit der Identifizierung von Zielgenen konnten zur Klärung der Frage nach der Redundanz beitragen. Mit Hilfe eines transgenen *SHOX*-Mausmodells, welches in unserer Arbeitsgruppe generiert wurde, konnten *Ogn* (*Osteoglycin*) und *Efemp1* (*EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1*) als *SHOX*-regulierte Gene identifiziert werden (Schneider et al., 2011, in Vorbereitung). Weiterhin zeigten *Shox*-Überexpressionsexperimente in Hühner-*Micromass*-Kulturen sowie Luziferase-Reporteranalysen in U2OS-Zellen eine Aktivierung der Expression von *Acan* (*Aggrecan*) (Tiecke et al., 2006; Aza-Carmona et al., 2011). Mit Hilfe von *microarray*-Analysen wurden *Ogn*, *Efemp1* und *Acan* in dieser Arbeit auch als *Shox2*-regulierte Gene identifiziert und quantitativ bestätigt. Sie kodieren für Proteine der extrazellulären Matrix, beispielsweise ist *Acan* am Aufbau der extrazellulären Knorpelmatrix beteiligt. Während der Gliedmaßenentwicklung differenzieren Mesenchymzellen zu Knorpelzellen, welche u. a. *Acan* sezernieren (Kronenberg, 2003). Mutationen im menschlichen *ACAN*-Gen wurden

bereits mit Kleinwuchs, frühzeitig beginnender Osteoarthritis sowie Osteochondritis dissecans (OCD), einer Form der Knochennekrose, in Verbindung gebracht (Stattin et al., 2010). *Acan* als putatives Zielgen von sowohl *Shox* als auch *Shox2* könnte auf redundante Funktionen beider Transkriptionsfaktoren in der Chondrozytendifferenzierung hinweisen.

4.1.2 Generierung eines *Shox2-knockout* / *SHOX-knockin* Mausmodells

SHOX und *SHOX2* sind innerhalb der Vertebraten hoch konserviert und bereits im Fisch, einem der niedrigsten Vertebraten zu finden. Während in den meisten Spezies beide Gene gemeinsam vorkommen, besitzen Nagetiere interessanterweise nur *Shox2*. Ihnen ist *Shox*, wie die meisten Gene der pseudoautosomalen Region, verloren gegangen (Clement-Jones et al., 2000; Gianfrancesco et al., 2001). Clement-Jones et al. mutmaßten daher eine Funktionsübernahme von *Shox* durch *Shox2* in der Maus und postulierten redundante Funktionen beider Gene (Clement-Jones et al., 2000). Der Funktionsverlust von *Shox2* in der Maus führt zu einer Reihe von drastischen Phänotypen, wie der embryonalen Letalität aufgrund von Herzdefekten, der Fehlentwicklung von Gaumen und Kiefer sowie der starken Verkürzung der Gliedmaßen. Ein solches *Shox2-knockout*-Mausmodell, welches zusätzlich menschliches *SHOX* unter dem endogenen *Shox2*-Promotor exprimiert, stellt ein ideales System dar, um die Redundanz von *SHOX* und *SHOX2* *in vivo* zu untersuchen. Wenn beide Gene redundante Funktionen besitzen, sollte *SHOX* die fehlende *Shox2*-Funktion übernehmen und so z.B. die embryonale Letalität aufheben. In dieser Arbeit wurde eine *targeting*-Strategie entwickelt, um menschliches *SHOX* unter dem endogenen *Shox2*-Promotor in die Maus einzubringen und gleichzeitig *Shox2* auszuschalten.

Klassisches *gene targeting* erlaubt die sequenzspezifische Integration eines bestimmten DNA-Fragments in das Genom durch homologe Rekombination und findet weit reichende Anwendungen in der Analyse von Struktur und Funktion von Genen, in der Generierung von Tiermodellen sowie in der Gentherapie (Ng und Baker, 1999). Die häufigste Anwendung von *gene targeting* ist die Generierung von *knockout*-Mäusen, in deren Genom meist eine essentielle kodierende Region durch einen Resistenzmarker ersetzt ist. Bereits im Jahr 2009 waren ca. 11000 Gene in Mausmodellen ausgeschaltet, was etwa die Hälfte aller Mausgene ausmacht (Hall et al., 2009). Die Generierung von *knockout*-Mausmodellen erfolgt über die genetische Manipulation embryonaler Stammzellen (ES-Zellen). Sie besitzen die Eigenschaft der Pluripotenz und können sich in Kultur unbegrenzt vermehren (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Injiziert man die veränderten Zellen in isolierte Mausblastozysten, haben sie nach Transfer in ein scheinchwangeres Muttertier die Fähigkeit, sich am Aufbau aller fötalen Gewebe zu beteiligen (Bradley et al., 1984).

In der vorliegenden Arbeit wurden gleichzeitig eine *knockout*- und eine *knockin*-Strategie angewandt. Die *knockin*-Technologie erlaubt die Expression einer beliebigen cDNA unter der Kontrolle cis-regulatorischer Elemente eines anderen Gens (Cohen-Tannoudji und Babinet, 1998). Um menschliche *SHOXa*-cDNA in den *Shox2*-Lokus der Maus einzubringen, wurde ein *Shox2-knockout* / *SHOX-knockin*-Konstrukt für die sequenzspezifische Integration hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit war es allerdings nicht möglich, eine homologe Rekombination des *targeting*-Vektors in den *Shox2*-Lokus zu erreichen. Die Gründe dafür sind unklar, da der Vektor alle essentiellen Eigenschaften zur erfolgreichen Rekombination beinhaltet. Der Aufbau des Vektors ist entscheidend, da die Rekombinationseffizienz generell sehr gering ist. Lediglich 0.1 bis 1 % der Integrationen erfolgen tatsächlich über homologe Rekombination und ungefähr 6 bis 14 kb DNA, welche homolog zur Zielsequenz ist, sind dafür notwendig (Melton, 2002; Hall et al., 2009). Für diese Arbeit wurde ein 2.9 kb kurzer sowie ein 5.8 kb langer *Shox2*-Homologiebereich gewählt, welche die *SHOXa*-cDNA und einen Resistenzmarker flankierten. Es handelte sich dabei um isogene DNA, d.h. der Mausstamm der verwendeten DNA stimmte mit dem Herkunftsstamm der ES-Zellen überein. Die Verwendung von nicht-isogener DNA kann die Rekombinationsfrequenz um das 20 fache vermindern (te Riele et al., 1992). Der Vektor wurde mittels Elektroporation, welche die effizienteste Transfektionstechnik für das *gene targeting* darstellt, in R1- und E14-ES-Zellen eingebracht (Vasquez et al., 2001). Zuvor wurde der Vektor linearisiert, da das zelleigene DNA-Reparatur-System lineare DNA als Substrat für die homologe Rekombination bevorzugt (Hasty et al., 1992). Die Zellen wurden positiv selektioniert, vereinzelt und mit Hilfe von PCR, Southern Blot und FISH auf eine homologe Integration des *targeting*-Konstrukts hin untersucht. Diese Analysen zeigten, dass keiner der positiv selektionierten ES-Zellklone einen spezifischen Einbau des Konstrukts in den *Shox2*-Lokus aufwies. Der Vektor war in beliebige Bereiche des Genoms, in mehreren Kopien hintereinander, integriert. Bereits zuvor war von verschiedenen Autoren eine Mehrfachintegration von *targeting*-Vektoren in einen Genort beschrieben worden (Jasin und Berg, 1988; Fell et al., 1989; Thompson et al., 1989; Schwartzberg et al., 1990; Hasty et al., 1991; Bautista und Shulman, 1993). Beispielsweise konnten repetitive Integrationen in den *Hprt*-Lokus beobachtet werden. Die Autoren dieser Studie postulierten, dass mehrere *targeting*-Vektoren bereits vor der Integration Konkatemere gebildet hatten (Hasty et al., 1991). Es wäre also denkbar, dass die Sequenzbeschaffenheit des Vektors zu tandemartigen Zusammenlagerungen bereits vor dem Einbau führte, was möglicherweise eine homologe Integration verhinderte.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte ein *Shox2-knockout* / *SHOX-knockin*-Mausmodell erfolgreich generiert werden, was einen entscheidenden Beitrag zur

Beantwortung der Frage nach der Redundanz lieferte (Liu et al., 2011). Die Autoren konnten zeigen, dass Mausembryonen, in deren Genom *Shox2* durch die menschliche *SHOXa*-cDNA homozygot ersetzt ist (bezeichnet als *Shox2*^{Ki/Ki}), die durch Herzdefekte verursachte embryonale Letalität eines *Shox2*-Verlusts überlebten. Histologische, molekulare und physiologische Analysen konnten nachweisen, dass diese Embryonen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Entwicklung der Venenklappen und des Sinusknotens sowie eine normale Herzschlagrate aufwiesen. Auch die mit *Shox2*-Defizienz assoziierte inkomplette Gaumenspalte sowie Ankylose des Kiefergelenks waren in *Shox2*^{Ki/Ki}-Embryonen nicht nachweisbar. Allerdings entwickelten diese Tiere eine andere Form von Kiefergelenksdefekten, eine vorzeitige Abnutzung der Gelenkscheibe. Diese ist vermutlich eine Ursache für schwerwiegende Verfallserscheinungen von *Shox2*^{Ki/Ki}-Mäusen, welche wenige Tage nach der Geburt auftreten und zum Tod führen. Es wird angenommen, dass die Fehlbildungen des Kiefergelenks die Nahrungsaufnahme beeinträchtigen und so eine normale Entwicklung verhindern. Der Verlust von *Shox2* in den Extremitäten der Maus führt aufgrund einer gestörten Chondrozytendifferenzierung zu proximalen Verkürzungen der Vorder- und Hintergliedmaßen. Diese Defekte können in *Shox2*^{Ki/Ki}-Mäusen nur teilweise aufgehoben werden. Während sich die Vordergliedmaßen normal entwickelten, blieben die Fehlbildungen in den Hintergliedmaßen bestehen. Die Ergebnisse zeigen, dass *SHOX* im Herzen die *Shox2*-Funktion vollständig, in kraniofazialen Strukturen und Gliedmaßen nur teilweise übernehmen kann. *SHOX* und *SHOX2* besitzen offensichtlich gewebsspezifisch redundante Funktionen (Liu et al., 2011).

Es könnte also sein, dass *SHOX* und *SHOX2* innerhalb der eigenen Expressionsdomänen spezifische Proteininteraktionen eingehen und damit voneinander unabhängige Funktionen in DNA-Bindung und transkriptioneller Regulation erlangen. Aza-Carmona et al. konnten beispielsweise zeigen, dass *SHOX* mit den Transkriptionsfaktoren *SOX5* und *SOX6* interagiert und diese nur zusammen mit einem weiteren Faktor, *SOX9*, in kooperativer Weise die *Acan*-Expression aktivieren können (Aza-Carmona et al., 2011). *SHOX* und *SHOX2* interagieren außerdem mit dem *four-and-a-half LIM domain*-Protein *FHL2*, was für die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist und als Bestandteil tertiärer, transkriptionell aktiver Proteinkomplexe beschrieben wird (Martin et al., 2002; Hill und Riley, 2004; Spitzer, 2006). Es ist also vorstellbar, dass *SHOX* und *SHOX2* ihre regulatorischen Eigenschaften in höhermolekularen Komplexen ausüben und über deren Zusammensetzung ihre Spezifität erlangen.

4.1.3 Das Expressionsmuster von SHOX und SHOX2 und die Redundanz beider Gene

SHOX und *SHOX2* werden in vielen Geweben überlappend exprimiert und besitzen dennoch jeweils spezifische Expressionsdomänen. Dies gibt einen ersten Hinweis auf ähnliche, wenn auch nicht vollständig übereinstimmende Funktionen beider Gene. Ein Vergleich der *Shox*- und *Shox2*-Expression eines Modellorganismus, wie beispielsweise im Huhn, welches beide Gene besitzt, mit der *Shox2*-Expression der Maus, in der *Shox* nicht vorhanden ist, stellt eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Redundanz dar. Interessant wäre hier eine *Shox2*-Expressiondomäne in der Maus, welche in anderen Organismen, wie z.B. dem Huhn, in eine *Shox* und *Shox2*-Expressiondomäne aufgeteilt ist. Dies würde für eine Funktionsübernahme von *Shox* durch *Shox2* in der Maus sprechen. Da es in dieser Arbeit nicht möglich war, ein *Shox2-knockout* / *SHOX-knockin*-Mausmodell zu generieren, wurde die Redundanz von *Shox* und *Shox2* mit Hilfe vergleichender Expressionsanalysen in der neuronalen Entwicklung von Maus und Huhn untersucht.

In situ Hybridisierungen auf Schnitte von Mausembryonen verschiedener Stadien zeigten eine sehr spezifische Expression von *Shox2* im embryonalen Gehirn. Über die Funktion von *Shox2* im Gehirn ist bisher allerdings sehr wenig bekannt. Interessanterweise waren im gesamten Telencephalon keine *Shox2*-Transkripte detektierbar. Es konnte gezeigt werden, dass das *aristaleless-related homeobox (ARX)*-Gen die *Shox2*-Expression in der *telencephalon ganglionic eminence* unterdrückt (Fulp et al., 2008). Diese Struktur ist für die Generierung kortikaler Interneurone verantwortlich. *Arx*-defiziente Mäuse zeigen Störungen in der Migration von Interneuronen (Kitamura et al., 2002; Colombo et al., 2007) und man kann postulieren, dass die Regulation von *Shox2* durch *Arx* ebenfalls einen inhibitorische Einfluss auf diese Prozesse hat. Mutationen innerhalb des *ARX*-Gens wurden bereits mit zahlreichen neurologischen Erkrankungen des Menschen, wie der Lissenzephalie, in Zusammenhang gebracht und es wäre interessant herauszufinden, ob *SHOX2* ebenfalls in die Pathologie dieser Störungen involviert ist (Kitamura et al., 2002; Uyanik et al., 2003; Hahn et al., 2004; Kato et al., 2004; Bhat et al., 2005).

In den Expressionsanalysen dieser Arbeit zeigte *Shox2* in den Stadien E11.5 bis E13.5 eine distinkte Expression im sich entwickelnden Thalamus, welcher sich im postnatalen Gehirn aus verschiedenen thalamischen Kernbereichen (Nuclei) zusammensetzt. Man kann annehmen, dass die Identität der einzelnen Nuclei in der Phase der Neurogenese (E10.5 bis E12.5) festgelegt wird, allerdings sind die molekularen Zusammenhänge bisher weitestgehend unbekannt. Gene, welche in dieser Entwicklungsphase zwischen E10.5 und E12.5 in spezifischen Bereichen des Thalamus exprimiert sind, stellen Kandidaten in der Entwicklung und Identitätsgebung verschiedener neuronaler Zellpopulationen dar. Aufgrund

seines spezifischen Expressionsmusters in der Entwicklung des Thalamus kann *Shox2* als möglicher Kandidat angesehen werden. In einer kürzlich erschienenen, groß angelegten *in situ* Hybridisierungs-Studie, welche das Expressionsmuster verschiedener Gene im sich entwickelnden Thalamus der Maus beschreibt, wurde auch die Expression von *Shox2* in diesem Bereich beschrieben (Suzuki-Hirano et al., 2011). Das Expressionsmuster von *Shox2* war exklusiv und nicht vergleichbar mit dem anderer untersuchter Gene, was auf eine Expression von *Shox2* in einer spezifischen Subpopulation thalamischer Neurone hinweist. Um Einblicke in die Rolle von *Shox2* während der Entwicklung des Thalamus zu erlangen, wären morphologische und molekulare Untersuchungen an thalamischem Gewebe *Shox2*-defizienter Mäuse sinnvoll. Da der konventionelle *Shox2-knockout* embryonal letal ist, könnte man *Shox2* mit Hilfe des Cre-Lox-Systems konditional im Gehirn ausschalten und hätte damit ein geeignetes Modell, die Rolle von *Shox2* in der Gehirnentwicklung zu untersuchen. Vergleiche des murinen *Shox2*-Expressionsmusters mit dem des Huhns zeigten eine vollständige Übereinstimmung sowohl im Gehirn als auch im peripheren Nervensystem. Die Analyse von *Shox*- und *Shox2*-Färbungen in Hühnerembryonen zeigte ebenfalls deutliche Überlappungen in der neuronalen Expression. Transkripte beider Gene wurden im Pros-, Mes-, und Rhombencephalon des Gehirns detektiert und wiesen identische Expressionsmuster auf. Unterschiede waren ausschließlich im peripheren Nervensystem und im Rückenmark erkennbar. In diesen Strukturen ist *Shox*, im Gegensatz zu *Shox2*, nicht bzw. nur sehr schwach exprimiert. Somit sind die Expressionsmuster von *Shox2* in Maus und Huhn identisch und die *Shox2*-Expression im Huhn überlappt im Wesentlichen mit der von *Shox*, wobei *Shox2* etwas breiter exprimiert ist. Es konnte folglich keine Aufteilung der *Shox2*-Expression innerhalb der Entwicklung neuronaler Strukturen der Maus in unterschiedliche *Shox*- und *Shox2*-Expressionsdomänen in Hühnerembryonen mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen beobachtet werden.

Weitere Analysen mittels *in situ* Hybridisierung zeigten hingegen eine unterschiedliche Expression in Geweben außerhalb des Nervensystems, wie im Auge, im Kiefer, in den verschiedenen Expressionsdomänen der Extremitäten und im Herz. Interessant im Hinblick auf die Redundanz von *SHOX* und *SHOX2* ist die unterschiedliche Expression im Kiefer und in den Extremitäten. Murines *Shox2* ist im sich entwickelnden Kiefergelenk exprimiert, während diese Bereiche im Huhn keine *Shox2*-, sondern ausschließlich eine *Shox*-Expression aufzuweisen scheinen. Diese Beobachtungen deuten auf eine Aufteilung der Expressionsdomänen im Huhn hin und sprechen damit für eine Funktionsübernahme von *Shox* durch *Shox2* in der Maus. Die Expression von *Shox2* im Flügel des Huhns konzentriert sich im proximalen Bereich um die Kondensationskerne sich entwickelnder Knochen. Färbungen von *Shox* überlappen mit denen von *Shox2* im proximalen Bereich des Flügels, die *Shox*-Expression reicht aber weiter in den medialen Teil. Folglich besitzen *Shox* und

Shox2 Expressionsdomänen an unterschiedlichen proximodistalen Positionen im Huhn. In den Extremitäten der Maus bleibt das proximale *Shox2*-Muster erhalten, demnach handelt es sich hier nicht um eine Aufteilung der Expressionsdomänen. Die Ergebnisse für Kiefer und Extremitäten ähneln den menschlichen Expressionsdaten und sind deshalb von Interesse, da LWD-, Langer-Syndrom-, und Turner-Syndrom-Patienten Fehlbildungen in entsprechenden Strukturen aufweisen. So könnte die *SHOX*-Expression im medialen Gliedmaßenbereich die beobachtete charakteristische bilaterale Verkrümmung des Radius und die dorsale Subluxation der distalen Ulna erklären, die zur charakteristischen Madelung-Deformität bei LWD-, Langer-Syndrom-, und Turner-Syndrom-Patienten führen. Weiterhin können die beim Turner-Syndrom auftretenden Gelenkfehlbildungen sowie die Verkürzung einiger Metakarpalen in Turner- und LWD-Patienten mit der *SHOX*-Expression erklärt werden. Die Detektion von *SHOX* in den ersten und zweiten Pharyngealbögen ist im Hinblick auf Fehlbildungen kraniofazialer Strukturen bei Turner-Syndrom-Patientinnen interessant. Betroffene Frauen zeigen gelegentlich einen hohen Gaumenbogen, Mikrognathie, sowie Veränderungen des Mittelohrs (Espiritu et al., 1975; Fryns und Van Den Berghe, 1979; Kunze und Klemm, 1980; Hall und Gilchrist, 1990; Belin et al., 1998; Shears et al., 1998; Clement-Jones et al., 2000; Schiller et al., 2000). Die hier durchgeführten *in situ* Hybridisierungs-Analysen in Hühnerembryonen zeigten, dass *SHOX* ein sehr spezifisches Expressionsmuster innerhalb neuronaler Gewebe des Huhns besitzt und auch in menschlichen Embryonen und Föten konnten *SHOX*-Transkripte mit Hilfe von RT-PCR in verschiedenen Bereichen des Gehirns detektiert werden (Durand, 2010). Diese Befunde lassen auf eine wichtige Rolle von *Shox/SHOX* während der Entwicklung des Nervensystems schließen. Bisher wurden bei Patienten mit LWD, Langer- oder Turner-Syndrom keine Anzeichen für Fehlentwicklungen neuronaler Strukturen im Zusammenhang mit einem *SHOX*-Verlust diagnostiziert. Es konnten zwar in Einzelfällen LWD- und Langer-Syndrom-Patienten mit mentaler Retardierung assoziiert werden, allerdings waren bei den Betroffenen größere Deletionen ursächlich, die nicht nur das *SHOX*-Gen beinhalteten. Kognitive Störungen dieser Patienten sind daher auf den Verlust von *SHOX*-angrenzenden Genen zurückzuführen (Shears et al., 1998; Spranger et al., 1999; Robertson et al., 2000). Das nahezu identische Expressionsmuster von *Shox* und *Shox2* im Gehirn von Hühnerembryonen könnte eine Erklärung für den fehlenden neuronalen Phänotyp liefern. Möglicherweise kann bei einem Verlust des *SHOX*-Gens *SHOX2* die Funktion in allen Strukturen des Nervensystems vollständig übernehmen (Abbildung 35). Unterstützt wird diese These auch dadurch, dass nicht nur *SHOX*, sondern auch *SHOX2* im Gehirn des Menschen exprimiert wird. Es wurden *SHOX2*-Transkripte im Gehirn menschlicher Embryonen sowie in humanem Post-Mortem-Gewebe des Thalamus detektiert (Clement-Jones et al., 2000; Kromkamp et al., 2003).

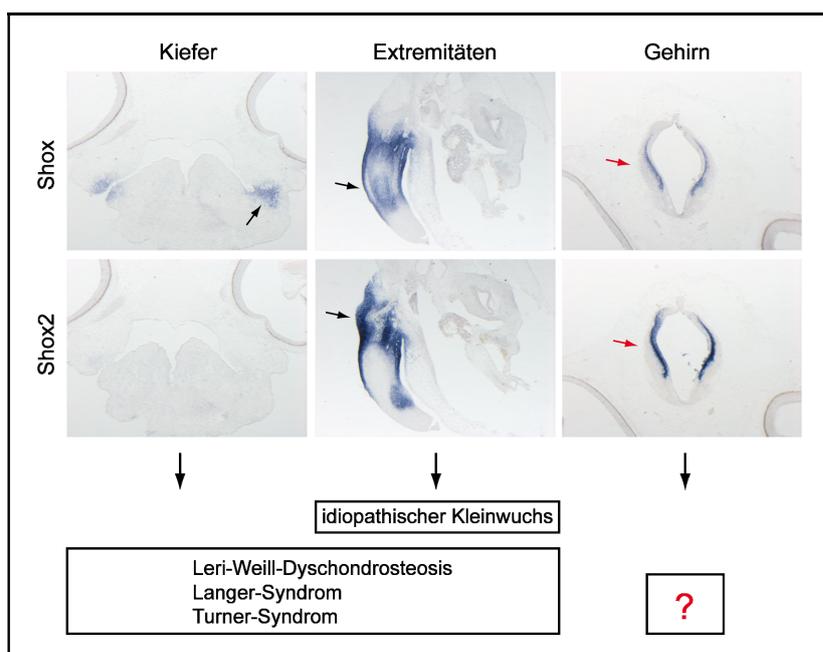


Abbildung 35: SHOX-assoziierte Phänotypen und die Redundanz von SHOX und SHOX2.

Aufgrund der Expressionsdaten in Hühnerembryonen kann spekuliert werden, dass der Verlust von SHOX in Strukturen mit unterschiedlichen SHOX- und SHOX2-Expressionsdomänen (Kiefer, Extremitäten, schwarze Pfeile) zu verschiedenen Skelettfehlbildungen des Menschen in diesen Bereichen führt. Das vollständig überlappende Expressionsmuster von *Shox* und *Shox2* im Gehirn von Hühnerembryonen (rote Pfeile) und der fehlende SHOX-assoziierte neuronale Phänotyp im Menschen sprechen für eine Funktionsübernahme von SHOX durch SHOX2 und weisen damit auf redundante Funktionen der beiden Gene hin.

Die ermittelte Expression von SHOX und SHOX2 im Nervensystem, Kiefer und den Extremitäten zusammen mit bereits beschriebenen menschlichen Expressionsdaten weisen auf redundante Funktionen beider Gene hin. In Bereichen mit unterschiedlicher Expression von SHOX und SHOX2, wie im Kiefer und den Gliedmaßen des Menschen führt ein Ausfall von SHOX zu verschiedenen Fehlbildungen, während im Nervensystem der SHOX-Verlust durch die breitere Expression von SHOX2 vermutlich vollständig abgedeckt und die Funktion übernommen werden kann.

Nachfolgend sind bereits bekannte Daten sowie in dieser Arbeit ermittelte Ergebnisse, welche auf eine Redundanz von SHOX und SHOX2 hinweisen, zusammengefasst (Abbildung 36).

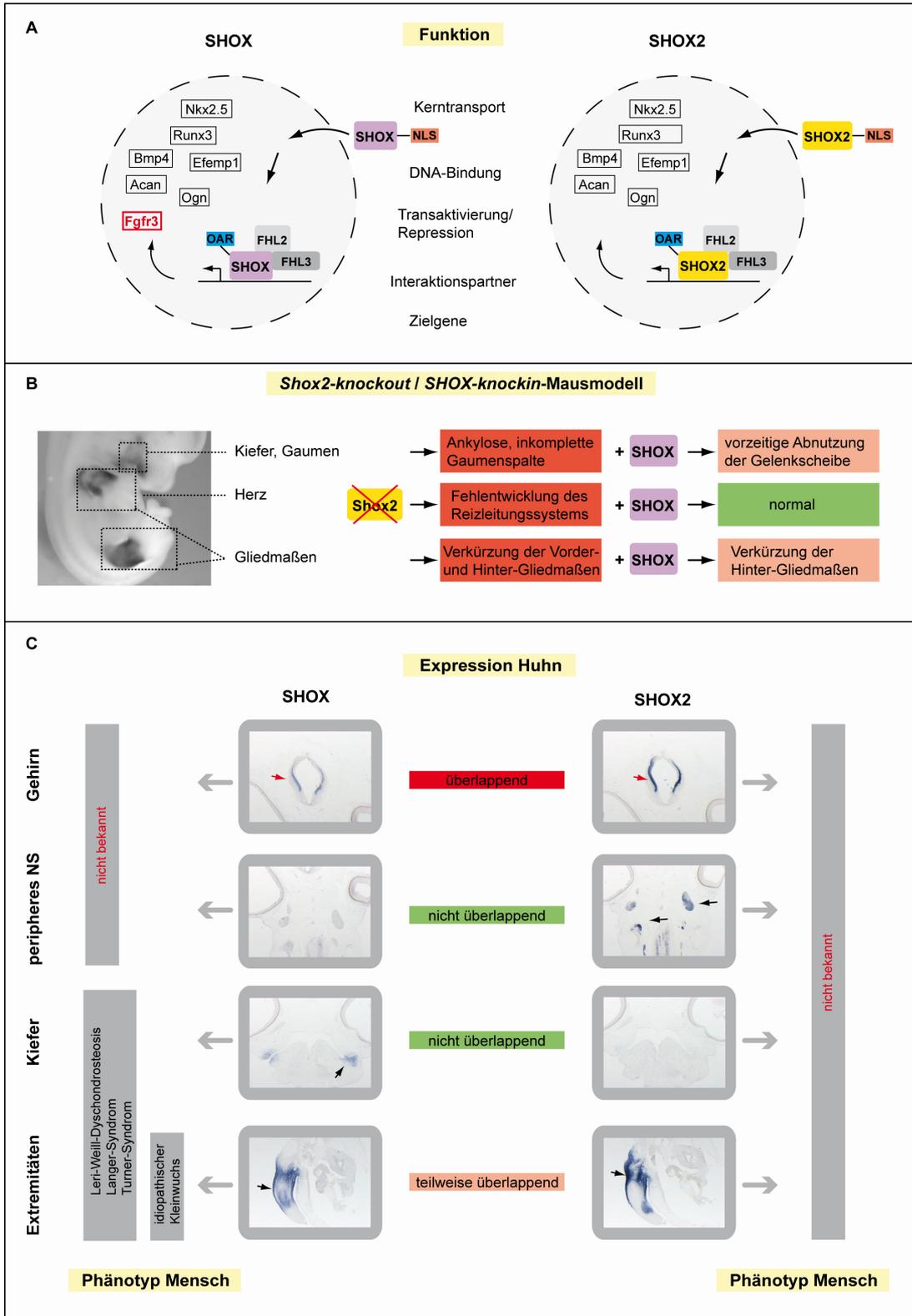


Abbildung 36: Die Redundanz von SHOX und SHOX2 – Zusammenfassung der Diskussion.

A: SHOX und SHOX2 besitzen identische Homöodomänen und zeigen Übereinstimmungen im Kerntransport, in der DNA-Bindung, in transaktivierenden bzw. reprimierenden Eigenschaften sowie in Interaktionspartnern und Zielgenen. Dennoch sind die Funktionen beider Gene nicht vollständig redundant. Beispielsweise führt eine Überexpression von SHOX zu einem Anstieg der *FGFR3*-Expression in Zellkultur, während SHOX2 keinen Einfluss auf *FGFR3* besitzt.

B: *SHOX* und *Shox2* zeigen gewebsspezifisch redundante Funktionen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde ein Mausmodell generiert, in welchem menschliches *SHOX* unter dem endogenen *Shox2*-Promotor

exprimiert wird und *Shox2* gleichzeitig ausgeschaltet ist. Die durch einen *Shox2*-Verlust verursachten Fehlbildungen des Herzens können durch *SHOX* vollständig, die Anomalien der Skelettelemente des Kiefers und der Extremitäten nur teilweise, aufgehoben werden (Liu et al., 2011).

C: Die Expression von *Shox* und *Shox2* im Hühnergehirn ist identisch, *Shox2* ist zusätzlich im peripheren Nervensystem exprimiert. Es finden sich keine bzw. nur teilweise Übereinstimmungen der Expressionsmuster von *Shox* und *Shox2* im Kiefer bzw. in den Extremitäten. Der Verlust von *SHOX* beim Menschen führt in diesen Geweben zu verschiedenen skelettalen Fehlbildungen. Die identische Expression von *Shox* und *Shox2* im Gehirn könnte einen fehlenden, mit *SHOX*-Defizienz assoziierten, neuronalen Phänotyp im Menschen erklären. Bei einem Funktionsverlust von *SHOX* im Gehirn, ist *SHOX2* möglicherweise in der Lage, die Funktion vollständig zu übernehmen. Für *SHOX2* ist bisher kein menschlicher Phänotyp bekannt.

4.2 Zielgene von *Shox2* in der Gliedmaßenentwicklung

Um Einblicke in *Shox2*-abhängige molekulare Signalwege der frühen Gliedmaßenentwicklung zu erlangen, wurden mit Hilfe von *microarray*-Analysen putative Zielgene von *Shox2* identifiziert. Aus einer Liste von signifikant regulierten Genen wurden 17 Kandidaten anhand ihrer Funktion und Expression in der Gliedmaßenentwicklung ausgewählt und zunächst quantitativ überprüft. Dadurch konnten 13 Gene (*Lmo1*, *Meox1*, *Ogn*, *Aspn*, *Acan*, *Efemp1*, *Irx3*, *Rspo1*, *Hoxd13*, *Tbx2*, *Tbx4*, *Tbx18* und *Pitx1*) als mögliche *Shox2*-Zielgene bestätigt werden. Im Folgenden soll kurz auf diese Gene eingegangen werden.

Lim domain only 1 (Lmo1) und *Mesenchyme homeobox 1 (Meox1)* wurden bereits in einem vorangegangenen *microarray* als putative *Shox2*-Zielgene identifiziert (Vickerman et al., 2011). Es wurden weiterhin vier Gene, *Ogn* (*Osteoglycin*), *Aspn* (*Asporin*), *Efemp1* (*EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1*) und *Acan* (*Aggrecan*), welche für extrazelluläre Matrix (EM)-Proteine kodieren, identifiziert. *Ogn* und *Aspn* gehören zur SLRP (*small leucine rich proteoglycan*)-Familie der sekretierten Proteoglykane. Mitglieder dieser Familie sind generell für die Kollagen-Fibrillogenese wichtig, z.B. haben sie Funktionen in der Aufrechterhaltung der kornealen Transparenz des Auges (Tasheva et al., 2004). *ASPN* ist ein negativer Regulator der Osteoblastendifferenzierung und -mineralisierung und Mutationen in diesem Gen wurden mit Osteoarthritis beim Menschen in Zusammenhang gebracht (Kizawa et al., 2005; Yamada et al., 2007). Interessanterweise sind *OGN/Ogn* und *ASPNI/Aspn* in einem gemeinsamen *cluster* im Genom lokalisiert und es wird angenommen, dass sie gemeinsam reguliert werden (Tasheva et al., 2004). Es ist möglich, dass *Shox2* auch die anderen Gene dieses *clusters*, *osteoaderin/osteomodulin (OMD/omd)* und *extracellular matrix protein 2 (ECM2)* reguliert, was in Zukunft überprüft werden sollte. Wie bereits beschrieben, ist *Acan* am Aufbau der extrazellulären Knorpelmatrix beteiligt und in die Aktivierung der Chondrogenese während der Gliedmaßenentwicklung involviert. *Efemp1*, ein weiteres extrazelluläres Matrixprotein konnte mit menschlichen Erkrankungen der

Netzhaut in Verbindung gebracht werden (Tarttelin et al., 2001). Die Regulation der verschiedenen EM-Protein-kodierenden Gene durch *Shox2* weist auf generelle Funktionen von *Shox2* in der Chondrogenese hin. Es wurde bereits gezeigt, dass *Shox2* in die Chondrozytendifferenzierung der Gliedmaßenentwicklung involviert ist (Cobb et al., 2006; Yu et al., 2007). Aufgrund der breiten Funktion der beschriebenen Gene könnte *Shox2* z.B. auch an der Entwicklung von Strukturen wie Sehnen, Haut und Auge beteiligt sein. Es wurden weiterhin ein Iroquois-Homödomänen-Transkriptionsfaktor kodierendes Gen (*Irx3*) sowie ein Mitglied des Hox-Gen-clusters (*Hoxd13*) als putative *Shox2*-Zielgene identifiziert. *Hoxd13* stellt einen interessanten Kandidaten dar, da es an der posterio-distalen Musterbildung der Gliedmaßenanlagen beteiligt ist (Wellik und Capecchi, 2003). Allerdings konnte in *Shox2*-defizienten Mäusen bereits gezeigt werden, dass andere Hox-Gene der posterio-distalen Musterbildung wie *Hoxa10*, *Hoxc10*, *Hoxd10* keine veränderte Expression aufweisen (Yu et al., 2007). Außerdem ist *Hoxd13* eher für die Entwicklung distaler Gliedmaßenbereiche wichtig, was eine Regulation durch hauptsächlich proximal exprimiertes *Shox2* unwahrscheinlich macht. Interessant ist auch *Rspo1*, ein Mitglied der R-Spondin-Familie sekretierter Proteine, welche als Aktivatoren des Wnt/ β -Catenin-Signalweges an der Regulation der Myogenese beteiligt sind (Han et al., 2011). Wie bereits erwähnt, ist *Shox2* ebenfalls wichtig für die Muskelentwicklung (Vickerman et al., 2011). Schließlich konnten drei T-Box-Transkriptionsfaktoren kodierende Gene (*Tbx2*, *Tbx4* und *Tbx18*), die in die Gliedmaßenentwicklung involviert sind sowie das *paired-type* Homödomänen-Transkriptionsfaktor kodierende Gen *Pitx1* als mögliche *Shox2*-Zielgene identifiziert werden.

Tbx4 als putatives *Shox2*-Zielgen war für diese Arbeit von besonderem Interesse. Wie auch *Shox2* kodiert es für einen Transkriptionspartner und ist zusammen dem nahe verwandten *Tbx5* maßgeblich an der Entwicklung von Hinter- bzw. Vorderbeinen beteiligt. Mutationen in beiden Genen sind mit skelettalen Fehlbildungen des menschlichen *Small patella*-Syndroms (*TBX4*) und des Holt-Oram-Syndroms (*TBX5*) assoziiert (Basson et al., 1997; Li et al., 1997; Bongers et al., 2004). Auf *Tbx4* und *Tbx5* und deren Funktionen innerhalb der Extremitätenentwicklung soll im Folgenden näher eingegangen werden.

4.2.1 Die Rolle von *Tbx4* und *Tbx5* in Initiation und Identitätsgebung während der Gliedmaßenentwicklung

Mitglieder der T-Box-Transkriptionsfaktoren sind in allen Metazoen vertreten und spielen eine entscheidende Rolle bei der Festlegung des Körperbauplans und innerhalb der Organogenese. Sie zeichnen sich durch den gemeinsamen Besitz der T-Box aus, welche eine charakteristische DNA-Bindedomäne darstellt. Insgesamt umfasst die Familie der T-

Box-Gene 19 Mitglieder, welche sich in fünf Subfamilien einordnen lassen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Mitglieder der *T*-Subfamilie (*T*), der *Tbx1*-Subfamilie (*Tbx15* und *Tbx18*) und der *Tbx2*-Subfamilie (*Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx4* und *Tbx5*) in Extremitäten exprimiert werden und in deren Entwicklung eine Rolle spielen (Naiche et al., 2005; King et al., 2006). In dieser Arbeit ist das nahe verwandte Genpaar *Tbx4* und *Tbx5*, welches für die Initiation und Identität in der Gliedmaßenentwicklung von Bedeutung ist, von besonderem Interesse. Tetrapoden besitzen zwei Paar Extremitäten, welche als Knospen vom lateralen Plattenmesoderm an festgelegten Positionen der rostro-caudalen Körperachse auswachsen. Zunächst sind diese Knospen morphologisch ununterscheidbar, differenzieren sich jedoch während des Auswachsens zu Knochen, Blutgefäßen, Bändern und Muskulatur, wobei jede einzelne der Strukturen eine charakteristische Morphologie aufweist, welche letztendlich Vorder- und Hintergliedmaßen definiert. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden T-Box-Transkriptionsfaktoren *Tbx4* und *Tbx5* sowie ein *paired*-verwandter Homöodomänen-Transkriptionsfaktor *Pitx1* wichtige Funktionen in diesen Prozessen haben (Duboc und Logan, 2011). Während *Tbx5* überwiegend in den Vordergliedmaßen exprimiert ist, sind *Tbx4*- und *Pitx1*-Transkripte vor allem in den Hintergliedmaßen detektierbar (Chapman et al., 1996; Lamonerie et al., 1996; Szeto et al., 1996; Gibson-Brown et al., 1998). Die drei Transkriptionsfaktoren stellen eindeutige Marker für den jeweiligen Extremitäten-Typ dar. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist für die Initiation der Gliedmaßenentwicklung zunächst eine spezifische rostro-caudale Expression von Genen des *HoxC-clusters* notwendig, um die gliedmaßenbildenden Bereiche festzulegen (Abbildung 8). Es wird angenommen, dass dieses *Hox*-Muster für die unterschiedliche Expression von *Tbx4* und *Tbx5* verantwortlich ist, obwohl es bisher dafür keinen direkten Beweis gibt (Minguillon et al., 2005). Der Funktionsverlust von *Tbx5* und *Tbx4* im Mausmodell demonstriert eindrucksvoll die Bedeutung beider Gene in der Initiation der Extremitätenentwicklung. Konditionale *Tbx5*^{-/-}-Embryonen bilden keine Vordergliedmaßen-Knospen aus, was einer fehlenden *Fgf10*-Expression zugrunde liegt. Dadurch kann der für die Initiation und das Auswachsen der Knospe entscheidende *Fgf-feedback loop* nicht etabliert werden (Agarwal et al., 2003; Rallis et al., 2003). *Fgf10* induziert im Mesenchym die Expression von *Fgf8* in der AER (*apical ectodermal ridge*). *Fgf8* wiederum reguliert *Fgf10*, wodurch ein stabiler *feedback loop* entsteht, welcher letztendlich die Initiation und das Auswachsen in proximo-ditaler Richtung steuert. Es konnte gezeigt werden, dass *Fgf10* ein direktes Zielgen von *Tbx5* darstellt (Ng et al., 2002; Agarwal et al., 2003).

Der Verlust von *Tbx4* in der Maus zeigt einen ganz ähnlichen Phänotyp. *Tbx4*^{-/-}-Embryonen bilden zwar zunächst eine Hintergliedmaßenknospe, allerdings wächst diese nicht weiter aus, was ebenfalls auf ungenügende Initiation und Aufrechterhaltung des *Fgf-feedback loops* zurückgeführt werden konnte (Naiche und Papaioannou, 2003).

Die Rolle von *Tbx5* und *Tbx4* in der Initiation der Gliedmaßenentwicklung konnte auch mit Skelettfehlbildungen menschlicher Syndrome in Verbindung gebracht werden. Haploinsuffizienz von *TBX5* führt zum Holt-Oram-Syndrom (HOS; MIM ID #142900). Patienten zeigen neben variablen Herzdefekten auch Fehlbildungen der oberen Extremitäten (dreigliedrige, überzählige oder fehlende Daumen sowie Verkürzungen bzw. Fehlen von Radius und Ulna), wobei nicht nur distale sondern auch proximale Bereiche der Arme verkürzt sein können (Basson et al., 1997; Li et al., 1997; McDermott et al., 2004). Haploinsuffizienz von *TBX4* führt zum *small patella*-Syndrom (SPS; MIM #147891), welches sich durch Fehlbildungen der unteren Extremitäten auszeichnet, wie Aplasie bzw. Hypoplasie der Patella sowie Anomalien der Hüfte und Füße (Bongers et al., 2004).

Aufgrund der fast exklusiven Expression in Vorder- und Hintergliedmaßen ist anzunehmen, dass *Tbx5* und *Tbx4* in die Festlegung der Morphologie der Gliedmaßentypen involviert sind. Tatsächlich konnte die ektopische Expression von *Tbx4* im Flügel von Hühnerembryonen teilweise morphologische Beinstrukturen sowie die Expression beinspezifischer Markergene induzieren (Takeuchi et al., 1999). Entsprechende Ergebnisse wurden umgekehrt auch für *Tbx5* gezeigt (Rodriguez-Esteban et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). Allerdings stehen diese Analysen im Gegensatz zu Experimenten in der Maus. Beispielsweise kann eine transgene Expression von *Tbx4* in Vordergliedmaßen von konditionalen *Tbx5*^{-/-}-Embryonen die *Tbx5*-Funktion übernehmen und den Phänotyp der fehlenden Vorderextremitäten retten (Minguillon et al., 2005). Diese Gliedmaßen zeigten weder morphologische Eigenschaften noch ektopisch exprimierte Markergene, welche charakteristisch für die Entwicklung der Hinterextremitäten sind. Dies deutet eher auf vergleichbare Funktionen von *Tbx5* und *Tbx4* hin und zeigt, dass diese Gene nicht für die Festlegung des jeweiligen Gliedmaßentyps verantwortlich sind. Ein anderer Transkriptionsfaktor, *Pitx1*, ist nach ektopischer Expression in murinen Vordergliedmaßen tatsächlich in der Lage, Hintergliedmaßen-charakteristische morphologische Eigenschaften zu induzieren (DeLaurier et al., 2006). Es wurde weiterhin mit Hilfe des *Pitx1*^{-/-}-Mausmodells gezeigt, dass *Pitx1* wichtig für das normale Wachstum der Hintergliedmaßen ist und, dass *Pitx1* die Expression von *Tbx4* aktiviert (Lanctot et al., 1999; Szeto et al., 1999; Marcil et al., 2003; DeLaurier et al., 2006). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde nachgewiesen, dass *Tbx4* eine spezifische Repressordomäne besitzt, welche im *Tbx5*-Protein nicht vorkommt. Es wird deshalb angenommen, dass *Tbx4* zusammen mit einem Hintergliedmaßen-spezifischen Korepressor die Morphologie der Hinterbeine festlegt (Ouimette et al., 2010).

Zusammengefasst sind *Tbx5* und *Tbx4* notwendig für die Etablierung und Aufrechterhaltung des *Fgf-feedback loops* und haben damit entscheidende Funktionen in der Initiation der Gliedmaßenentwicklung. Man kann davon ausgehen, dass sie ähnliche Funktionen in ihren unterschiedlichen Expressionsdomänen ausüben. Allerdings besitzt *Tbx4* Hintergliedmaßen-

spezifische Funktionen unabhängig von *Tbx5* und ist, zusammen mit *Pitx1*, für die Determination der verschiedenen Gliedmaßenmorphologien verantwortlich.

4.2.2 Die regulatorische Wechselwirkung von *Shox2* und *Tbx4*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von *microarray*-Analysen *Tbx4* als das interessanteste putative Zielgen von *Shox2* identifiziert. *Whole mount in situ* Hybridisierungen und quantitative Analysen von *Shox2*^{-/-}-Embryonen zeigten, dass *Shox2* in der frühen Gliedmaßenentwicklung zunächst einen schwach positiv-regulatorischen Effekt (E10.5), später einen deutlich reprimierenden Effekt auf die *Tbx4*-Expression ausübt (E11.5 bis E13.5). Diese Regulation beschränkt sich auf die Vordergliedmaßen-Knospen und findet in einer spezifisch abgegrenzten Region statt. Luziferase-Reporteranalysen in HEK293-Zellen konnten weder einen aktivierenden noch reprimierenden Effekt von SHOX2 auf verschiedene genomische Bereiche des *TBX4*-Gens zeigen. Möglicherweise handelt es sich bei dem Effekt von *Shox2* auf *Tbx4* um eine indirekte Regulation. Es könnten aber auch spezifische Kofaktoren für die Regulation notwendig sein, welche in HEK293-Zellen nicht vorkommen. Es wurde bereits beschrieben, dass *Shox2*, wie einige andere Transkriptionsfaktoren, abhängig vom Zelltyp sowohl als Aktivator als auch als Repressor auf den gleichen Reporter wirken kann (Yu et al., 2007). Dies würde auch den unterschiedlichen Effekt von *Shox2* auf *Tbx4* im Stadium E10.5 verglichen mit dem Stadium E11.5 bis E13.5 erklären. Man weiß heute, dass ein hoch dynamisches regulatorisches Netzwerk für den korrekten Ablauf der Gliedmaßenentwicklung notwendig ist (Zeller et al., 2009). Offensichtlich sind zeitlich transiente Unterschiede in der Zusammensetzung von Kofaktoren für die jeweilige Aktivator- bzw. Repressorfunktion von *Shox2* verantwortlich.

Es gibt Hinweise, welche einen regulativen Effekt von *Tbx4* auf *Shox2* wahrscheinlicher machen als umgekehrt. Beispielsweise ist *Tbx4* bereits vor dem Auswachsen der Hinterbeinknospe (E9.5) im lateralen Plattenmesoderm exprimiert, während die *Shox2*-Expression E9.5 gerade erst beginnt (siehe 3.2.4.1, Abbildung 25). *Tbx4* ist durch die Aktivierung von *Fgf10* für die Etablierung des *Fgf-feedback loops* und damit auch für die Expression von *Fgf8* verantwortlich (Naiche und Papaioannou, 2007). Für *Shox2* dagegen wurde gezeigt, dass es keinen Einfluss auf die *Fgf8*-Expression während der Gliedmaßenentwicklung hat (Yu et al., 2007). Tatsächlich konnten, in Zusammenarbeit mit Ripla Arora und Dr. Virginia Papaioannou (Columbia University, New York), *whole mount in situ* Hybridisierungen und quantitative Analysen von *Tbx4*^{-/-}-Embryonen zeigen, dass während des Auswachsens der Gliedmaßen *Tbx4* als positiver Regulator von *Shox2* in Vorder- und Hinterbeinknospen fungiert. Diese Regulation konnte mit Hilfe von siRNA-

vermittelten *knockdown*-Experimenten in primären embryonalen Gliedmaßenzellen bestätigt werden. Interessant hierbei war, dass entsprechende Analysen in NHDF-Zellen keine Veränderung der *Shox2*-Expression zeigten, was einmal mehr deutlich macht, wie wichtig Kofaktoren für eine spezifische Regulation sind. Luziferase- und EMSA-Experimente konnten außerdem zeigen, dass TBX4 den Promotorbereich von *SHOX2* durch eine direkte Bindung aktivieren kann. Dabei wurde eine bereits bekannte TBX5-Bindesequenz auch als Bindestelle für TBX4 nachgewiesen. Die paralogen Gene *Tbx4* und *Tbx5* sind durch Duplikation eines Vorläufers entstanden und besitzen nahezu identische T-Box-Domänen (Gibson-Brown et al., 1996). In einer kürzlich veröffentlichten Studie waren sowohl *Tbx5* als auch *Tbx4* in der Lage, eine transaktivierende Funktion auf *T-box binding elements* (TBE)-enthaltende Reporterstrukturen auszuüben (Ouimette et al., 2010). Hier konnte demnach erstmalig das TBX5-Bindemotiv (A/G)GGTGT(C/T/G)(A/G) auch als TBX4-Bindesequenz nachgewiesen werden.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann ein *feedback*-Mechanismus postuliert werden, in dem *Tbx4* einen positiven Regulator der *Shox2*-Expression innerhalb der frühen Entwicklung der Gliedmaßen darstellt und *Shox2* wiederum einen reprimierenden Effekt auf die *Tbx4*-Expression ausübt. Während die Regulation von *Shox2* durch *Tbx4* in beiden Gliedmaßen stattfindet, wurde der negative Einfluss von *Shox2* auf *Tbx4* nur in den Vordergliedmaßen beobachtet (Abbildung 37).

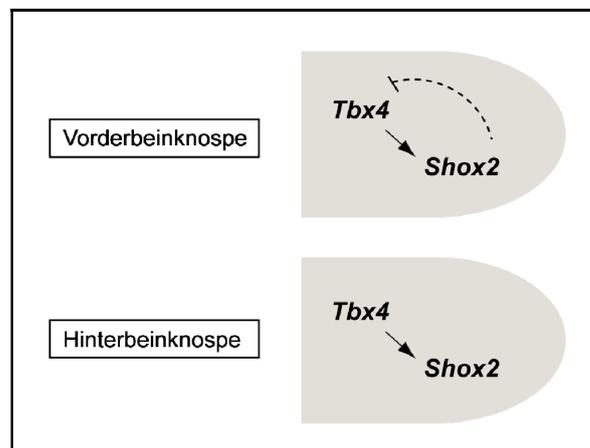


Abbildung 37: Die regulatorische Wechselwirkung von *Tbx4* und *Shox2* in der murinen Gliedmaßenentwicklung.

Tbx4 aktiviert die *Shox2*-Expression in Vorder- und Hintergliedmaßen von Mausembryonen. In den Vorderbeinen ist diese Regulation Bestandteil eines negativen feedback loops, in dem *Shox2* einen reprimierenden Effekt auf *Tbx4* ausübt.

Shox2 und *Tbx4* sind in sich entwickelnden Extremitäten koexprimiert, wobei *Shox2* gleichermaßen in Vorder- und Hinterbeinen vorkommt, während *Tbx4* hauptsächlich in den Hinterbeinen exprimiert ist. Dennoch besitzt *Tbx4* eine zeitlich transiente, aber sehr spezifische Expressionsdomäne in den Vordergliedmaßen, über deren Bedeutung bisher nichts bekannt ist. *Tbx4*-defiziente Mausembryonen zeigten weder morphologische noch molekulare Auffälligkeiten innerhalb der Vorderbeine (Naiche und Papaioannou, 2003, 2007). Die Regulation von *Shox2* durch *Tbx4* zeigt jedoch, dass *Tbx4* an der Regulation des transkriptionellen Netzwerks während der Entwicklung der Vorderbeine teilnimmt und damit auch eine Funktion in diesen Strukturen besitzt. Der auf die Vorderbeine beschränkte reprimierende Effekt von *Shox2* auf *Tbx4* könnte mit einem Vordergliedmaßen-spezifischen Korepressor von *Shox2* erklärt werden, welcher in den Hinterbeinen nicht exprimiert wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Regulation in beiden Extremitäten stattfindet, allerdings geringe Unterschiede in der Anzahl von *Tbx4*-Transkripten aufgrund der starken endogenen *Tbx4*-Expression in den Hinterbeinen quantitativ nicht detektierbar sind.

Feedback-Mechanismen haben eine zentrale Bedeutung innerhalb der Gliedmaßenentwicklung. Man weiß heute, dass sowohl die Musterbildung als auch das Auswachsen der Gliedmaßenknospen durch ein robustes selbstregulatorisches Signalsystem gesteuert wird, welches hauptsächlich aus miteinander vernetzten *feedback loops* besteht (Zeller et al., 2009). Beispielsweise ist der SHH/GREM1/FGF *e-m* (*epithelial-mesenchymal*) *feedback loop* für die Etablierung, Aufrechterhaltung und Termination der bereits beschriebenen Hauptsignalzentren ZPA (*zone of polarizing activity*) und AER (*apical ectodermal ridge*) notwendig (Zeller et al., 2009). Es ist also nicht überraschend, dass *Shox2* und *Tbx4* ebenfalls über einen *feedback*-Mechanismus in diese frühen Prozesse involviert sind.

4.2.3 Die biologische Bedeutung des *Tbx4-Shox2-feedback-Mechanismus*

Da der Verlust von *Tbx4* und *Shox2* jeweils in Mausmodellen untersucht wurde, stellt der Vergleich der Phänotypen eine Möglichkeit dar, die biologische Relevanz der Interaktion beider Gene zu analysieren. Sowohl *Tbx4* als auch *Shox2* sind maßgeblich an der Entwicklung skelettaler Gliedmaßelemente sowie der Skelettmuskulatur beteiligt. Konditionale *Tbx4-knockout* Mausembryonen bilden zunächst eine sichtbare Hintergliedmaßenknospe aus, welche allerdings ab dem Stadium E11.5 aufgrund der fehlenden *Fgf10*-Expression nicht weiter auswächst (Naiche und Papaioannou, 2007).

Neben dieser frühen Funktion in der Initiation der Gliedmaßenentwicklung konnte *Tbx4* auch mit der Entwicklung von Skelettelementen in Verbindung gebracht werden. Das Ausschalten

von *Tbx4* nach dem Auswachsen der Beinknospe führte zu einer Hypoplasie von Becken und Fibula und zu einem nahezu aplastischen Femur, der nicht mit dem Beckengürtel verbunden ist. Außerdem traten Fehlbildungen der anterioren Zehenstrukturen auf (Abbildung 38B, D). Die Vordergliedmaßen von *Tbx4*^{-/-}-Embryonen waren phänotypisch unauffällig (Naiche und Papaioannou, 2007).

Im Unterschied zu *Tbx4* zeigen *Shox2*-defiziente Embryonen zunächst ein normales Auswachsen der Gliedmaßenknospen. Ab dem Stadium E12.5 kommt es allerdings zu Verkürzungen der Vorder- und Hinterextremitäten im proximalen Bereich. In späteren Stadien zeigte sich, dass, ähnlich dem *Tbx4*-Phänotyp, Humerus und Femur drastisch verkürzt sind und ebenfalls Fehlentwicklungen des Beckengürtels aufweisen (Abbildung 38A, C). Die proximalen Elemente zeigen keine Verknöcherungen, was auf Störungen in der Chondrozytendifferenzierung zurückzuführen ist. Interessant im Hinblick auf die Regulation von *Shox2* durch *Tbx4* ist, dass der Phänotyp in den Hinterbeinen stärker ausgeprägt ist. Tibia und Fibula sind ebenfalls etwas verkürzt, wobei die Tibia gebogen ist und die Fibula ektopische Verknöcherungen aufweist (Cobb et al., 2006).

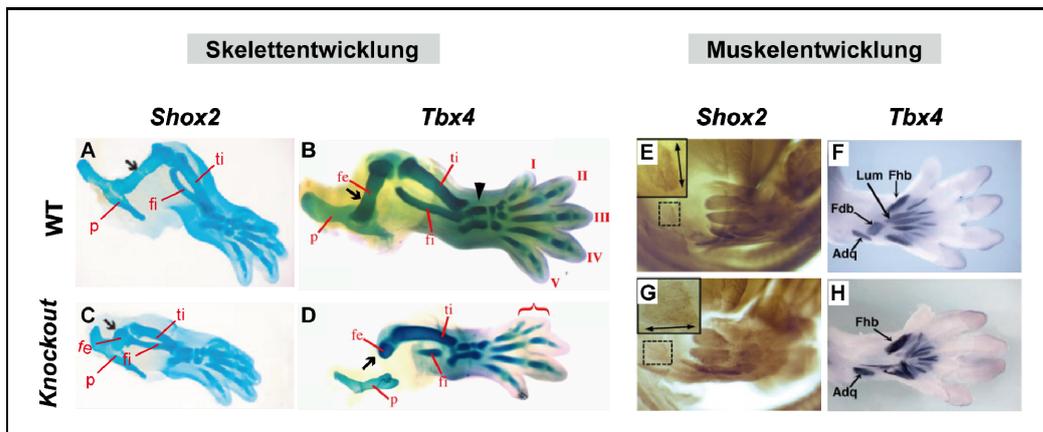


Abbildung 38: Vergleich der Skelett- und Muskelphänotypen von *Shox2*- und *Tbx4*-defizienten Mausembryonen.

Shox2- und *Tbx4*-defiziente Skelettelemente von E14.5 Embryonen zeigen eine drastische Verkürzung des Femurs (fe, A, B, schwarze Pfeile). Im *Shox2*-knockout sind außerdem leichte Abnormalitäten des Beckengürtels (p) sowie der Tibia (ti) und der Fibula (fi) zu beobachten (C). Im *Tbx4*-knockout sind Fibula (fi) und Beckengürtel (p) stark unterentwickelt (D). Die Muskelentwicklung ist sowohl bei *Shox2*^{-/-} - als auch bei *Tbx4*^{-/-}-Embryonen gestört. Die Muskulatur von *Shox2*- und *Tbx4*-defizienten Hintergliedmaßen zeigt Veränderungen in Form, Größe, Lage und Aufteilung der Muskelbündel (G, H) (Abb. verändert aus Cobb et al., 2006; Naiche und Papaioannou 2007; Vickermann et al., 2011; Hasson et al., 2010).

Neben Skelettfehlbildungen führt der konditionale Verlust von *Tbx5* und *Tbx4* außerdem zu Störungen in der Entwicklung von Sehnen und Muskulatur. Dabei ist die gesamte Extremitätenmuskulatur der Vorder- bzw. Hinterbeine betroffen und zeigt Veränderungen in

Form, Größe, Lage und Aufteilung der Muskelbündel. Die Autoren spekulierten eine Fehlorganisation des benachbarten Muskelbindegewebes als Ursache. *Tbx5* und *Tbx4* regulierten in diesem Gewebe die Expression von N-Cadherin und β -Catenin positiv, welche wichtig für dessen Organisation sind (Hasson et al., 2010). In konditionalen *Shox2-knockout*-Embryonen konnte ebenfalls eine fehlerhafte Entwicklung der Muskeln vom Stadium E11.5 an beobachtet werden (Vickerman et al., 2011). Im Unterschied zum *Tbx5/Tbx4*-assoziierten Phänotyp sind die Defekte weniger stark ausgeprägt und beschränken sich auf den proximalen Extremitätenbereich. Dennoch ist die Fehlorientierung des Triceps brachii lateralis von *Shox2*-defizienten Vordergliedmaßen vergleichbar mit der des entsprechenden Muskels von *Tbx5-knockout*-Embryonen. Es wird weiterhin spekuliert, dass *Shox2* ebenfalls in die Wnt/ β -Catenin Signalkaskade involviert sein könnte (Vickerman et al., 2011). Unterstützt wird diese Hypothese durch das in dieser Arbeit identifizierte putative *Shox2*-Zielgen *Rspo1*. Es gehört zur Familie der R-Spondine, welche als Aktivatoren des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in die Regulation der Myogenese involviert sind (Han et al., 2011).

Die beschriebenen Daten zeigen, dass *Tbx4* zusätzlich zur Initiation und Identitätsgebung in der Gliedmaßenentwicklung Funktionen in der Ausbildung von Skelettelementen und Muskulatur hat. Da sich der *Shox2*-Skelett- und Muskelphänotyp erst nach dem Auswachsen der Gliedmaßen herausbildet, ist anzunehmen, dass die Regulation von *Shox2* durch *Tbx4* eher für diese Prozesse relevant ist. Frühe Marker der posterio-distalen Musterbildung, wie *Hoxa10*, *Hoxc10*, *Hoxd10*, *Meis1*, *Meis2*, und *Fgf8* sind in *Shox2*-defizienten Embryonen unverändert, was eine Rolle in der Initiation der Extremitätenentwicklung, vor allem im Hinblick auf *Fgf8*, weniger wahrscheinlich macht. Dennoch ist es nicht ausgeschlossen, dass *Shox2* downstream von *Tbx4* an der Initiation oder sogar an der Festlegung des Gliedmaßentyps beteiligt ist. Die Expression von *Shox2* in Vorder- und Hintergliedmaßen spricht zwar nicht für eine Rolle in der Identitätsgebung, allerdings gibt es Hinweise auf unterschiedliche Funktionen von *SHOX/Shox2* in Vorder- und Hintergliedmaßen. Wie bereits beschrieben, konnte das Einbringen von menschlichem *SHOXa* in *Shox2*-defiziente Mäuse die Defekte in den Vordergliedmaßen vollständig aufheben, während die Fehlbildungen der Hintergliedmaßen bestehen blieben (Liu et al., 2011).

Schließlich bleibt noch die Frage nach der Rolle des *Tbx4-Shox2-feedback loops* in den Vorderbeinen. Der fehlende Phänotyp *Tbx4*-defizienter Vorderextremitäten spricht eher für eine untergeordnete Rolle der Regulation von *Shox2* durch *Tbx4* in diesem Bereich. *Tbx4* ist schwach und nur in einer spezifischen Region exprimiert, was den weniger starken Verlust der *Shox2*-Expression in *Tbx4*-defizienten Vorderbeinen verglichen mit den Hinterbeinen erklärt (siehe 3.2.5.1). Die noch vorhandenen *Shox2*-Transkripte reichen offensichtlich aus, um eine normale Entwicklung zu gewährleisten. Dennoch wäre es lohnenswert, die Vordergliedmaßen *Tbx4*-defizienter Embryonen hinsichtlich der Expression späterer

Markergene, wie z.B. Gene der Chondrozytendifferenzierung genauer zu untersuchen, um Einblicke in die bisher ungeklärte Funktion von *Tbx4* und die Rolle des *Shox2-Tbx4-feedback loops* innerhalb der Entwicklung der Vorderbeine zu erlangen. Man könnte spekulieren, dass *Tbx5* einen zu *Tbx4* vergleichbaren aktivierenden Effekt auf *Shox2* in den Vordergliedmaßen ausübt. Die Gemeinsamkeiten von *Tbx5* und *Tbx4* in Struktur, DNA-Bindung, Transaktivierung sowie die vergleichbaren Rollen in Initiation der Gliedmaßenentwicklung, in der Ausbildung von Skelettelementen, Sehnen und Muskulatur und vor allem die Tatsache, dass ektopisch exprimiertes *Tbx4* in Vordergliedmaßen von konditionalen *Tbx5*^{-/-}-Embryonen die *Tbx5*-Funktion vollständig übernehmen kann, machen diese Hypothese wahrscheinlich. In einer aktuellen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass *Tbx5* ein positiver Regulator der *Shox2*-Expression im Einflusstrakt des Herzens ist (Puskaric et al., 2010). Zusammenfassend könnte man für die Entwicklung der Hinterextremitäten ein Modell postulieren, in dem *Tbx4* seine frühe Rolle in der Initiation und Identitätsgebung unabhängig von *Shox2* ausübt, die späteren Funktionen in der Skelett- und Muskelentwicklung hingegen über die Aktivierung von *Shox2* zusammen mit anderen Faktoren erfolgen (Abbildung 39A).

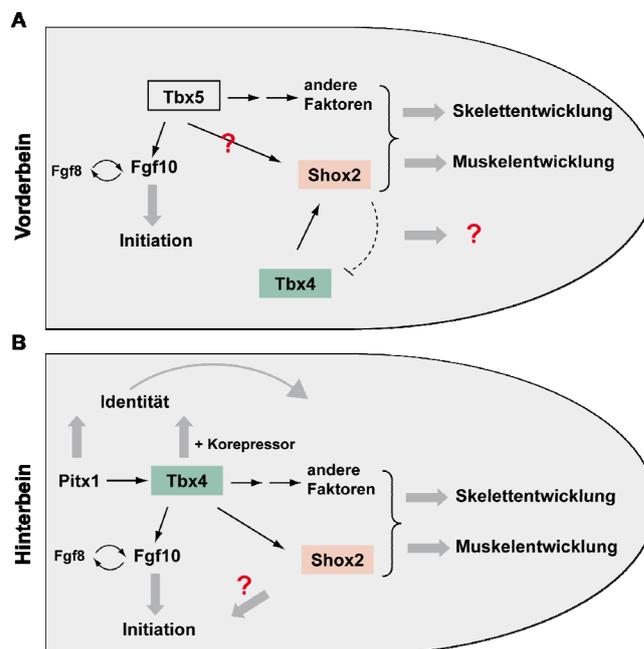


Abbildung 39: Modell für die Rolle der *Shox2-Tbx4*-Wechselwirkung innerhalb der Gliedmaßenentwicklung.

Detaillierte Erläuterungen zur Rolle der *Shox2-Tbx4*-Wechselwirkung in der Entwicklung von Vorder (A)- und Hintergliedmaßen (B) sind im Text zu finden.

Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass *Shox2* ebenfalls eine Rolle in der Initiation und Identität der Gliedmaßenentwicklung spielt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Funktion von *Shox2* in den Hintergliedmaßen aufgrund spezifischer *Tbx4*- und *Pitx1*-induzierter Faktoren von der Funktion in den Vordergliedmaßen abweicht. In den Vorderextremitäten könnte *Tbx5* der entsprechende Regulator von *Shox2* in der Ausbildung von Skelett- und Muskelementen sein. *Tbx4* hat auch hier einen aktivierenden Einfluss auf *Shox2*, was wiederum *Tbx4* in einem negativen *feedback loop* inhibiert. Die Funktion dieser Regulation bleibt jedoch ungeklärt (Abbildung 39B).

4.2.4 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte *Tbx4* als erster direkter Regulator von *Shox2* in der Gliedmaßenentwicklung identifiziert und damit über eine putative Rolle von *Shox2* in der Initiation und Identitätsgebung spekuliert werden. Weiterhin trägt die Regulation von *Shox2* durch *Tbx4* zur Aufklärung der *Tbx4*-involvierten Signalwege in Prozessen wie Muskel- und Skelettentwicklung bei und es konnte erstmalig die Beteiligung von *Shox2* an einem transkriptionellen *feedback*-Mechanismus gezeigt werden.

Die tatsächliche physiologische Relevanz der Regulation von *Shox2* durch *Tbx4* ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen und wird beispielsweise mit Hilfe des Zebrafischmodells überprüft werden. *tbx5* und *tbx4* sind im Zebrafisch entsprechend in der Brust- bzw. Beckenflosse exprimiert und ein *antisense*-Morpholino vermittelter *tbx5*-*knockdown* führte zum vollständigen Verlust dieser Strukturen (Tamura et al., 1999; Ruvinsky et al., 2000; Ahn et al., 2002). Hier wird man untersuchen, ob der Verlust von *tbx4* entsprechend zu einem Verlust oder einer Verkürzung der Beckenflossen führt, was ebenfalls unter der Verwendung von Morpholino-Oligonukleotiden durchgeführt werden kann. Zeigen diese Tiere einen Phänotyp, soll in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob der *tbx4*-bedingte Phänotyp durch *shox2* teilweise aufgehoben werden kann, was einen funktionellen Zusammenhang der Regulation bestätigen würde. Eine andere Möglichkeit wäre, präparierte Hintergliedmaßen von *Tbx4*-defizienten Mausembryonen zu kultivieren und in diesen *Shox2* ektopisch mittels implantierter *beads* zu exprimieren. Von Interesse ist hierbei, ob *Shox2* die Expression früher *Tbx4*-abhängiger Gene wieder herstellen kann, was für eine Funktion von *Shox2* in der Initiation der Extremitätenentwicklung sprechen würde.

Des Weiteren soll mit Hilfe eines *Tbx5*-*knockout*-Mausmodells untersucht werden, ob *Tbx5* nicht nur in der Herzentwicklung, sondern auch in der Entwicklung der Extremitäten als Regulator von *Shox2* fungiert.

Die in dieser Arbeit ermittelte transkriptionelle Regulation von *Shox2* durch *Tbx4* in den Gliedmaßen sowie die in einer vorangegangenen Studie beschriebene Aktivierung von *Shox2* durch *Tbx5* im Herzen (Puskaric et al., 2010), zusammen mit den bekannten Funktionen in Gliedmaßen- und Herzentwicklung, machen *Shox2* zu einem interessanten Kandidatengen für menschliche *TBX4/TBX5*-assoziierte Erkrankungen. Wie bereits beschrieben sind Mutationen des *TBX4*-Gens mit den Fehlbildungen der unteren Extremitäten des *small patella*-Syndroms (SPS) assoziiert (Bongers et al., 2004). Seit der Erstbeschreibung von Scott und Taor 1979 wurde bisher über 50 Betroffene aus 12 Familien sowie über acht sporadische Fälle berichtet (Scott und Taor, 1979; Bongers et al., 2005). Bislang konnte in sechs dieser Familien eine Haploinsuffizienz von *TBX4* als Ursache festgestellt werden (Bongers et al., 2004). Andere Gene, wie auch *SHOX2*, welche in die *TBX4*-Signalkaskade involviert sind, stellen Kandidatengene für SPS dar. Interessant im Hinblick auf *SHOX2* ist, dass neben Fehlbildungen der unteren Extremitäten auch verschiedene kraniofaziale Anomalien, wie ein hoher Gaumenbogen, Mikrognathie sowie nasale Deformitäten im Zusammenhang mit SPS auftraten (Bongers et al., 2004). Wie bereits in 1.2 beschrieben ist *Shox2* maßgeblich in die Entwicklung kraniofazialer Strukturen involviert. Betroffene mit Symptomen des *small patella*-Syndroms, welche keine Mutationen im *TBX4*-Gen aufweisen, könnten auf genetische Veränderungen des *SHOX2*-Gens hin untersucht werden und damit *SHOX2* möglicherweise mit einem menschlichen Phänotyp in Zusammenhang gebracht werden.

Bisher konnten Mutationen im *TBX5*-Gen bei ca. 70 % der Patienten, welche die typischen skelettalen Fehlbildungen und Herzanomalien des Holt-Oram-Syndroms (HOS) aufwiesen, gefunden werden (McDermott et al., 2004). Betroffene ohne Mutationen im *TBX5*-Gen werden daher auch auf Mutationen im *Sall4*-Gen hin untersucht. Defekte dieses Gens sind mit dem Okihiro-Syndrom assoziiert, welches dem HOS-Syndrom sehr ähnliche Fehlbildungen der oberen Extremitäten sowie des Herzens zeigt (Kohlhase et al., 2002). Eine weitere Erkrankung, das so genannte Townes-Brocks-Syndrom, ist durch ähnliche Anomalien der Extremitäten gekennzeichnet und konnte mit dem *Sall1*-Gen in Verbindung gebracht werden, weshalb auch dieses Gen in HOS-Patienten untersucht wird (Kohlhase et al., 1998; Kohlhase, 2000). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Vordergliedmaßen *Sall1*-defizienter Mäuse eine ektopische Expression von *Shox2* in distalen Bereichen aufweisen (Kiefer et al., 2008). *Shox2* könnte ein Kandidatengen für HOS-, TBS- und Okihiro-Syndrom-Patienten mit unbekannter Ursache darstellen und es wurden bereits solche Patienten in unserem Labor auf genetische Veränderungen im *SHOX2*-Gen hin untersucht. Es konnten bisher keine Mutationen gefunden werden, was jedoch *SHOX2* als Kandidatengen nicht ausschließt. Möglicherweise sind größere Patientenzahlen erforderlich bzw. müssen auch nichtkodierende Bereiche des Gens untersucht werden.

TBX4 und *TBX5* stellen ebenso wie *SHOX* und *SHOX2* ein paraloges Genpaar dar, welches durch Duplikation eines Vorläufergens entstanden ist (Agulnik et al., 1996). Es wird heute angenommen, dass die Genduplikation von *Tbx4* und *Tbx5* die Entwicklung paariger Extremitäten ermöglichte und, dass im Zuge dieses Ereignisses eher Veränderungen regulatorischer Elemente als der Erwerb neuer funktioneller Eigenschaften ausschlaggebend waren (Horton et al., 2008; Minguillon et al., 2009). Die Regulation der Genexpression in räumlicher und zeitlicher Art und Weise ist während der Entwicklung der Vertebraten essentiell. Solch eine komplexe transkriptionelle Regulation wird durch die koordinierte Bindung von Transkriptionsfaktoren an nicht-kodierende DNA-Sequenzen, so genannte cis-regulatorische Module, gewährleistet. Die Identifizierung solcher Elemente erfolgt meist über die Suche nach hoch konservierten nicht-kodierenden Elementen (*conserved noncoding elements, CNEs*), welche mit hoher Wahrscheinlichkeit cis-regulatorische Funktionen besitzen (Woolfe et al., 2005). Für die paraloge Gene *SHOX* und *SHOX2* wurden sowohl unterschiedliche als auch gemeinsame *CNEs* identifiziert, was eine Duplikation nicht nur kodierender Bereiche, sondern auch regulatorischer Elemente eines gemeinsamen Vorläufergens bedeutet (McEwen et al., 2006; Kenyon et al., 2011). Funktionelle Analysen im Zebrafisch-Modell zeigten beispielsweise, dass einer dieser *CNEs* die Expression u.a. in den Flossen und im Gehirn steuert. In diesen Geweben des Zebrafischs sind sowohl *shox* als auch *shox2* exprimiert (Kenyon et al., 2011). Gemeinsame und unterschiedliche regulatorische Elemente der beiden Gene könnten das in weiten Teilen überlappende, wenn auch nicht identische Expressionsmuster von *SHOX* und *SHOX2* erklären und stehen im Gegensatz zu der nahezu exklusiven Expression von *Tbx5* und *Tbx4* in Vorder- bzw. Hinterextremitäten. Die Genpaare *TBX5/TBX4* und *SHOX/SHOX2* besitzen beide weitreichend redundante Funktionen. Die Spezifität von *Tbx5* und *Tbx4* in ihren jeweiligen Expressionsdomänen wird vor allem durch unterschiedliche cis-regulatorische Module gewährleistet und sie können daher bei einem Funktionsausfall einander nicht ersetzen. *SHOX* und *SHOX2* hingegen weisen einige gemeinsame regulatorische Elemente auf und können so möglicherweise bei Verlust des einen Gens in bestimmten Geweben, wie z.B. dem Gehirn, die Funktion des anderen übernehmen.

5 Literaturverzeichnis

Agarwal, P., Wylie, J.N., Galceran, J., Arkhitko, O., Li, C., Deng, C., Grosschedl, R. und Bruneau, B.G. (2003). *Tbx5* is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development* *130*, 623-633.

Agulnik, S.I., Garvey, N., Hancock, S., Ruvinsky, I., Chapman, D.L., Agulnik, I., Bollag, R., Papaioannou, V. und Silver, L.M. (1996). Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion. *Genetics* *144*, 249-254.

Ahn, D.G., Kourakis, M.J., Rohde, L.A., Silver, L.M. und Ho, R.K. (2002). T-box gene *tbx5* is essential for formation of the pectoral limb bud. *Nature* *417*, 754-758.

Aza-Carmona, M., Shears, D.J., Yuste-Checa, P., Barca-Tierno, V., Hisado-Oliva, A., Belinchon, A., Benito-Sanz, S., Rodriguez, J.I., Argente, J., Campos-Barros, A., et al. (2011). SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet* *20*, 1547-1559.

Basson, C.T., Bachinsky, D.R., Lin, R.C., Levi, T., Elkins, J.A., Soultz, J., Grayzel, D., Kroumpouzou, E., Traill, T.A., Leblanc-Straceski, J., et al. (1997). Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet* *15*, 30-35.

Bautista, D. und Shulman, M.J. (1993). A hit-and-run system for introducing mutations into the Ig H chain locus of hybridoma cells by homologous recombination. *J Immunol* *151*, 1950-1958.

Belin, V., Cusin, V., Viot, G., Girlich, D., Toutain, A., Moncla, A., Vekemans, M., Le Merrer, M., Munnich, A. und Cormier-Daire, V. (1998). SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet* *19*, 67-69.

Berger, M.F., Badis, G., Gehrke, A.R., Talukder, S., Philippakis, A.A., Pena-Castillo, L., Alleyne, T.M., Mnaimneh, S., Botvinnik, O.B., Chan, E.T., et al. (2008). Variation in homeodomain DNA binding revealed by high-resolution analysis of sequence preferences. *Cell* *133*, 1266-1276.

Bhat, S.S., Rogers, R.C., Holden, K.R. und Srivastava, A.K. (2005). A novel in-frame deletion in ARX is associated with lissencephaly with absent corpus callosum and hypoplastic genitalia. *Am J Med Genet A* *138*, 70-72.

Blaschke, R.J. (2005). Molekulare und entwicklungsbiologische Analysen zur Funktion der Homöoboxgene *SHOX* und *SHOX2* (Universität Heidelberg).

Blaschke, R.J., Hahurij, N.D., Kuijper, S., Just, S., Wisse, L.J., Deissler, K., Maxelon, T., Anastassiadis, K., Spitzer, J., Hardt, S.E., et al. (2007). Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor *Shox2* in sinoatrial and pacemaker development. *Circulation* *115*, 1830-1838.

Blaschke, R.J., Monaghan, A.P., Schiller, S., Schechinger, B., Rao, E., Padilla-Nash, H., Ried, T. und Rappold, G.A. (1998). SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2406-2411.

Blaschke, R.J. und Rappold, G.A. (2000). SHOX: growth, Leri-Weill and Turner syndromes. *Trends Endocrinol Metab* *11*, 227-230.

Blaschke, R.J., Topfer, C., Marchini, A., Steinbeisser, H., Janssen, J.W. und Rappold, G.A. (2003). Transcriptional and translational regulation of the Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX. *J Biol Chem* *278*, 47820-47826.

Bongers, E.M., Duijf, P.H., van Beersum, S.E., Schoots, J., Van Kampen, A., Burckhardt, A., Hamel, B.C., Losan, F., Hoefslot, L.H., Yntema, H.G., et al. (2004). Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome. *Am J Hum Genet* *74*, 1239-1248.

- Bongers, E.M., van Kampen, A., van Bokhoven, H. und Knoers, N.V.** (2005). Human syndromes with congenital patellar anomalies and the underlying gene defects. *Clin Genet* *68*, 302-319.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H. und Robertson, E.** (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* *309*, 255-256.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M. und Ericson, J.** (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* *101*, 435-445.
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J. und Smith, A.** (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* *210*, 30-43.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. und Werner, T.** (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* *21*, 2933-2942.
- Chapman, D.L., Garvey, N., Hancock, S., Alexiou, M., Agulnik, S.I., Gibson-Brown, J.J., Cebra-Thomas, J., Bollag, R.J., Silver, L.M. und Papaioannou, V.E.** (1996). Expression of the T-box family genes, *Tbx1-Tbx5*, during early mouse development. *Dev Dyn* *206*, 379-390.
- Chen, J., Wildhardt, G., Zhong, Z., Roth, R., Weiss, B., Steinberger, D., Decker, J., Blum, W.F. und Rappold, G.** (2009). Enhancer deletions of the *SHOX* gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet* *46*, 834-839.
- Clement-Jones, M., Schiller, S., Rao, E., Blaschke, R.J., Zuniga, A., Zeller, R., Robson, S.C., Binder, G., Glass, I., Strachan, T., et al.** (2000). The short stature homeobox gene *SHOX* is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* *9*, 695-702.
- Cobb, J., Dierich, A., Huss-Garcia, Y. und Duboule, D.** (2006). A mouse model for human short-stature syndromes identifies *Shox2* as an upstream regulator of *Runx2* during long-bone development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 4511-4515.
- Cohen-Tannoudji, M. und Babinet, C.** (1998). Beyond 'knock-out' mice: new perspectives for the programmed modification of the mammalian genome. *Mol Hum Reprod* *4*, 929-938.
- Colombo, E., Collombat, P., Colasante, G., Bianchi, M., Long, J., Mansouri, A., Rubenstein, J.L. und Broccoli, V.** (2007). Inactivation of *Arx*, the murine ortholog of the X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia gene, leads to severe disorganization of the ventral telencephalon with impaired neuronal migration and differentiation. *J Neurosci* *27*, 4786-4798.
- Decker, E.** (2010). Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors *SHOX* in der Gliedmaßenentwicklung (Universität Heidelberg).
- Decker, E., Durand, C., Bender, S., Rodelsperger, C., Glaser, A., Hecht, J., Schneider, K.U. und Rappold, G.** (2011). *FGFR3* is a target of the homeobox transcription factor *SHOX* in limb development. *Hum Mol Genet* *20*, 1524-1535.
- DeLaurier, A., Schweitzer, R. und Logan, M.** (2006). *Pitx1* determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb. *Dev Biol* *299*, 22-34.
- Duboc, V. und Logan, M.P.** (2011). Regulation of limb bud initiation and limb-type morphology. *Dev Dyn* *240*, 1017-1027.
- Durand, C.** (2010). Identifizierung verschiedener Regulationsmechanismen des Homöoboxgens *SHOX* (Universität Heidelberg).
- Durand, C., Roeth, R., Dweep, H., Vlatkovic, I., Decker, E., Schneider, K.U. und Rappold, G.** (2011). Alternative splicing and nonsense-mediated RNA decay contribute to the regulation of *SHOX* expression. *PLoS One* *6*, e18115.

- Ellison, J.W., Wardak, Z., Young, M.F., Gehron Robey, P., Laig-Webster, M. und Chiong, W.** (1997). PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 6, 1341-1347.
- Espinoza-Lewis, R.A., Yu, L., He, F., Liu, H., Tang, R., Shi, J., Sun, X., Martin, J.F., Wang, D., Yang, J., et al.** (2009). Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. *Dev Biol* 327, 376-385.
- Espiritu, C., Chen, H. und Woolley, P.V., Jr.** (1975). Mesomelic dwarfism as the homozygous expression of dyschondrosteosis. *Am J Dis Child* 129, 375-377.
- Evans, M.J. und Kaufman, M.H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fell, H.P., Yarnold, S., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E. und Folger, K.R.** (1989). Homologous recombination in hybridoma cells: heavy chain chimeric antibody produced by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8507-8511.
- Frangioni, J.V. und Neel, B.G.** (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* 210, 179-187.
- Fryns, J.P. und Van Den Berghe, H.** (1979). Langer type of mesomelic dwarfism as the possible homozygous expression of dyschondrosteosis. *Hum Genet* 46, 21-27.
- Fulp, C.T., Cho, G., Marsh, E.D., Nasrallah, I.M., Labosky, P.A. und Golden, J.A.** (2008). Identification of Arx transcriptional targets in the developing basal forebrain. *Hum Mol Genet* 17, 3740-3760.
- Gehring, W.J., Affolter, M. und Burglin, T.** (1994). Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* 63, 487-526.
- Gianfrancesco, F., Sanges, R., Esposito, T., Tempesta, S., Rao, E., Rappold, G., Archidiacono, N., Graves, J.A., Forabosco, A. und D'Urso, M.** (2001). Differential divergence of three human pseudoautosomal genes and their mouse homologs: implications for sex chromosome evolution. *Genome Res* 11, 2095-2100.
- Gibson-Brown, J.J., Agulnik, S.I., Chapman, D.L., Alexiou, M., Garvey, N., Silver, L.M. und Papaioannou, V.E.** (1996). Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech Dev* 56, 93-101.
- Gibson-Brown, J.J., S, I.A., Silver, L.M. und Papaioannou, V.E.** (1998). Expression of T-box genes Tbx2-Tbx5 during chick organogenesis. *Mech Dev* 74, 165-169.
- Glaser, A.** (2006). Identifizierung von Interaktionspartnern des Homöodomänen-Transkriptionsfaktors SHOX2 (Universität Heidelberg).
- Gu, S., Wei, N., Yu, L., Fei, J. und Chen, Y.** (2008). Shox2-deficiency leads to dysplasia and ankylosis of the temporomandibular joint in mice. *Mech Dev* 125, 729-742.
- Hahn, A., Gross, C., Uyanik, G., Hehr, U., Hugens-Penzel, M., Alzen, G. und Neubauer, B.A.** (2004). X-linked lissencephaly with abnormal genitalia associated with renal phosphate wasting. *Neuropediatrics* 35, 202-205.
- Hall, B., Limaye, A. und Kulkarni, A.B.** (2009). Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 19*, Unit 19 12 19 12 11-17.
- Hall, J.G. und Gilchrist, D.M.** (1990). Turner syndrome and its variants. *Pediatr Clin North Am* 37, 1421-1440.

- Han, X.H., Jin, Y.R., Seto, M. und Yoon, J.K.** (2011). A WNT/beta-catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. *J Biol Chem* 286, 10649-10659.
- Hasson, P., DeLaurier, A., Bennett, M., Grigorieva, E., Naiche, L.A., Papaioannou, V.E., Mohun, T.J. und Logan, M.P.** (2010). Tbx4 and tbx5 acting in connective tissue are required for limb muscle and tendon patterning. *Dev Cell* 18, 148-156.
- Hasty, P., Rivera-Perez, J. und Bradley, A.** (1992). The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 12, 2464-2474.
- Hasty, P., Rivera-Perez, J., Chang, C. und Bradley, A.** (1991). Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11, 4509-4517.
- Hill, A.A. und Riley, P.R.** (2004). Differential regulation of Hand1 homodimer and Hand1-E12 heterodimer activity by the cofactor FHL2. *Mol Cell Biol* 24, 9835-9847.
- Hoey, T. und Levine, M.** (1988). Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* 332, 858-861.
- Horton, A.C., Mahadevan, N.R., Minguillon, C., Osoegawa, K., Rokhsar, D.S., Ruvinsky, I., de Jong, P.J., Logan, M.P. und Gibson-Brown, J.J.** (2008). Conservation of linkage and evolution of developmental function within the Tbx2/3/4/5 subfamily of T-box genes: implications for the origin of vertebrate limbs. *Dev Genes Evol* 218, 613-628.
- Hristov, G.L.** (2005) (Universität Heidelberg).
- Huber, C., Rosilio, M., Munnich, A. und Cormier-Daire, V.** (2006). High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet* 43, 735-739.
- Jasin, M. und Berg, P.** (1988). Homologous integration in mammalian cells without target gene selection. *Genes Dev* 2, 1353-1363.
- Jessell, T.M.** (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1, 20-29.
- Jorge, A.A., Souza, S.C., Nishi, M.Y., Billerbeck, A.E., Liborio, D.C., Kim, C.A., Arnhold, I.J. und Mendonca, B.B.** (2007). SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66, 130-135.
- Kato, M., Das, S., Petras, K., Kitamura, K., Morohashi, K., Abuelo, D.N., Barr, M., Bonneau, D., Brady, A.F., Carpenter, N.J., et al.** (2004). Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat* 23, 147-159.
- Kenyon, E.J., McEwen, G.K., Callaway, H. und Elgar, G.** (2011). Functional Analysis of Conserved Non-Coding Regions Around the Short Stature hox Gene (shox) in Whole Zebrafish Embryos. *PLoS One* 6, e21498.
- Kiefer, S.M., Robbins, L., Barina, A., Zhang, Z. und Rauchman, M.** (2008). SALL1 truncated protein expression in Townes-Brocks syndrome leads to ectopic expression of downstream genes. *Hum Mutat* 29, 1133-1140.
- King, M., Arnold, J.S., Shanske, A. und Morrow, B.E.** (2006). T-genes and limb bud development. *Am J Med Genet A* 140, 1407-1413.
- Kispert, A. und Hermann, B.G.** (1993). The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J* 12, 4898-4899.
- Kissinger, C.R., Liu, B.S., Martin-Blanco, E., Kornberg, T.B. und Pabo, C.O.** (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63, 579-590.

- Kitamura, K., Yanazawa, M., Sugiyama, N., Miura, H., Iizuka-Kogo, A., Kusaka, M., Omichi, K., Suzuki, R., Kato-Fukui, Y., Kamiirisa, K., et al.** (2002). Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet* 32, 359-369.
- Kizawa, H., Kou, I., Iida, A., Sudo, A., Miyamoto, Y., Fukuda, A., Mabuchi, A., Kotani, A., Kawakami, A., Yamamoto, S., et al.** (2005). An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 37, 138-144.
- Kohlhase, J.** (2000). SALL1 mutations in Townes-Brocks syndrome and related disorders. *Hum Mutat* 16, 460-466.
- Kohlhase, J., Heinrich, M., Schubert, L., Liebers, M., Kispert, A., Laccone, F., Turnpenny, P., Winter, R.M. und Reardon, W.** (2002). Okhiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Genet* 11, 2979-2987.
- Kohlhase, J., Wischermann, A., Reichenbach, H., Froster, U. und Engel, W.** (1998). Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat Genet* 18, 81-83.
- Kromkamp, M., Uylings, H.B., Smidt, M.P., Hellemons, A.J., Burbach, J.P. und Kahn, R.S.** (2003). Decreased thalamic expression of the homeobox gene DLX1 in psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 60, 869-874.
- Kronenberg, H.M.** (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332-336.
- Kunze, J. und Klemm, T.** (1980). Mesomelic dysplasia, type Langer--a homozygous state for dyschondrosteosis. *Eur J Pediatr* 134, 269-272.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamonerie, T., Tremblay, J.J., Lanctot, C., Therrien, M., Gauthier, Y. und Drouin, J.** (1996). Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev* 10, 1284-1295.
- Lanctot, C., Moreau, A., Chamberland, M., Tremblay, M.L. und Drouin, J.** (1999). Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* 126, 1805-1810.
- Langer, P.R., Waldrop, A.A. und Ward, D.C.** (1981). Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6633-6637.
- Lee, S.K. und Pfaff, S.L.** (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* 4 Suppl, 1183-1191.
- Lewis, E.B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.
- Li, Q. und Ding, J.** (2007). Gene expression analysis reveals that formation of the mouse anterior secondary palate involves recruitment of cells from the posterior side. *Int J Dev Biol* 51, 167-172.
- Li, Q.Y., Newbury-Ecob, R.A., Terrett, J.A., Wilson, D.I., Curtis, A.R., Yi, C.H., Gebuhr, T., Bullen, P.J., Robson, S.C., Strachan, T., et al.** (1997). Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* 15, 21-29.
- Liu, H., Chen, C.H., Espinoza-Lewis, R.A., Jiao, Z., Sheu, I., Hu, X., Lin, M., Zhang, Y. und Chen, Y.** (2011). Functional redundancy between human SHOX and mouse Shox2 genes in the regulation of sinoatrial node formation and pacemaking function. *J Biol Chem* 286, 17029-17038.

- Logan, M., Simon, H.G. und Tabin, C.** (1998). Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity. *Development* *125*, 2825-2835.
- Logan, M. und Tabin, C.J.** (1999). Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* *283*, 1736-1739.
- Marchini, A., Hacker, B., Marttila, T., Hesse, V., Emons, J., Weiss, B., Karperien, M. und Rappold, G.** (2007). BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet* *16*, 3081-3087.
- Marchini, A., Marttila, T., Winter, A., Caldeira, S., Malanchi, I., Blaschke, R.J., Hacker, B., Rao, E., Karperien, M., Wit, J.M., et al.** (2004). The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* *279*, 37103-37114.
- Marcil, A., Dumontier, E., Chamberland, M., Camper, S.A. und Drouin, J.** (2003). Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development* *130*, 45-55.
- Martin, B., Schneider, R., Janetzky, S., Waibler, Z., Pandur, P., Kuhl, M., Behrens, J., von der Mark, K., Starzinski-Powitz, A. und Wixler, V.** (2002). The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J Cell Biol* *159*, 113-122.
- Martin, G.R.** (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 7634-7638.
- Martin, G.R. und Evans, M.J.** (1974). The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell* *2*, 163-172.
- McDermott, D.A., Fong, J.C. und Basson, C.T.** (2004). Holt-Oram Syndrome. In *Gene Reviews*.
- McEwen, G.K., Woolfe, A., Goode, D., Vavouri, T., Callaway, H. und Elgar, G.** (2006). Ancient duplicated conserved noncoding elements in vertebrates: a genomic and functional analysis. *Genome Res* *16*, 451-465.
- McGinnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, A. und Gehring, W.J.** (1984). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* *308*, 428-433.
- Melton, D.W.** (2002). Gene-targeting strategies. *Methods Mol Biol* *180*, 151-173.
- Minguillon, C., Del Buono, J. und Logan, M.P.** (2005). Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Dev Cell* *8*, 75-84.
- Minguillon, C., Gibson-Brown, J.J. und Logan, M.P.** (2009). Tbx4/5 gene duplication and the origin of vertebrate paired appendages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 21726-21730.
- Munns, C.F., Glass, I.A., LaBrom, R., Hayes, M., Flanagan, S., Berry, M., Hyland, V.J., Batch, J.A., Philips, G.E. und Vickers, D.** (2001). Histopathological analysis of Leri-Weill dyschondrosteosis: disordered growth plate. *Hand Surg* *6*, 13-23.
- Munns, C.J., Haase, H.R., Crowther, L.M., Hayes, M.T., Blaschke, R., Rappold, G., Glass, I.A. und Batch, J.A.** (2004). Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab* *89*, 4130-4135.
- Naiche, L.A., Harrelson, Z., Kelly, R.G. und Papaioannou, V.E.** (2005). T-box genes in vertebrate development. *Annu Rev Genet* *39*, 219-239.
- Naiche, L.A. und Papaioannou, V.E.** (2003). Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. *Development* *130*, 2681-2693.

- Naiche, L.A. und Papaioannou, V.E.** (2007). Tbx4 is not required for hindlimb identity or post-bud hindlimb outgrowth. *Development* 134, 93-103.
- Ng, J.K., Kawakami, Y., Buscher, D., Raya, A., Itoh, T., Koth, C.M., Rodriguez Esteban, C., Rodriguez-Leon, J., Garrity, D.M., Fishman, M.C., et al.** (2002). The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10. *Development* 129, 5161-5170.
- Ng, P. und Baker, M.D.** (1999). The molecular basis of multiple vector insertion by gene targeting in mammalian cells. *Genetics* 151, 1143-1155.
- Olsen, B.R., Reginato, A.M. und Wang, W.** (2000). Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 191-220.
- Ouimette, J.F., Jolin, M.L., L'Honore, A., Gifuni, A. und Drouin, J.** (2010). Divergent transcriptional activities determine limb identity. *Nat Commun* 1, 35.
- Pearse, R.V., 2nd, Scherz, P.J., Campbell, J.K. und Tabin, C.J.** (2007). A cellular lineage analysis of the chick limb bud. *Dev Biol* 310, 388-400.
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Puskaric, S.** (2011). Identifizierung und Charakterisierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors SHOX2 in der Herzentwicklung (Universität Heidelberg).
- Puskaric, S., Schmitteckert, S., Mori, A.D., Glaser, A., Schneider, K.U., Bruneau, B.G., Blaschke, R.J., Steinbeisser, H. und Rappold, G.** (2010). Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart. *Hum Mol Genet* 19, 4625-4633.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. und Werner, T.** (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23, 4878-4884.
- Rallis, C., Bruneau, B.G., Del Buono, J., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Nissim, S., Tabin, C.J. und Logan, M.P.** (2003). Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. *Development* 130, 2741-2751.
- Rao, E., Blaschke, R.J., Marchini, A., Niesler, B., Burnett, M. und Rappold, G.A.** (2001). The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet* 10, 3083-3091.
- Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., Rump, A., Niesler, B., Mertz, A., Muroya, K., Binder, G., Kirsch, S., Winkelmann, M., et al.** (1997). Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 16, 54-63.
- Rappold, G., Blum, W.F., Shavrikova, E.P., Crowe, B.J., Roeth, R., Quigley, C.A., Ross, J.L. und Niesler, B.** (2007). Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet* 44, 306-313.
- Rappold, G.A., Fukami, M., Niesler, B., Schiller, S., Zumkeller, W., Bettendorf, M., Heinrich, U., Vlachopapadopoulou, E., Reinehr, T., Onigata, K., et al.** (2002). Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1402-1406.
- Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C. und Berg, P.** (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113, 237-251.

- Robertson, S.P., Shears, D.J., Oei, P., Winter, R.M., Scambler, P.J., Aftimos, S. und Savarirayan, R.** (2000). Homozygous deletion of SHOX in a mentally retarded male with Langer mesomelic dysplasia. *J Med Genet* 37, 959-964.
- Rodriguez-Esteban, C., Tsukui, T., Yonei, S., Magallon, J., Tamura, K. und Izpisua Belmonte, J.C.** (1999). The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature* 398, 814-818.
- Rovescalli, A.C., Asoh, S. und Nirenberg, M.** (1996). Cloning and characterization of four murine homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10691-10696.
- Ruvinsky, I., Oates, A.C., Silver, L.M. und Ho, R.K.** (2000). The evolution of paired appendages in vertebrates: T-box genes in the zebrafish. *Dev Genes Evol* 210, 82-91.
- Sabherwal, N., Schneider, K.U., Blaschke, R.J., Marchini, A. und Rappold, G.** (2004a). Impairment of SHOX nuclear localization as a cause for Leri-Weill syndrome. *J Cell Sci* 117, 3041-3048.
- Sabherwal, N., Schneider, K.U., Blaschke, R.J., Marchini, A. und Rappold, G.** (2004b). Impairment of SHOX nuclear localization as a cause for Léri-Weill syndrome. *J Cell Sci* 117, 3041-3048.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schiller, S., Spranger, S., Schechinger, B., Fukami, M., Merker, S., Drop, S.L., Troger, J., Knoblauch, H., Kunze, J., Seidel, J., et al.** (2000). Phenotypic variation and genetic heterogeneity in Leri-Weill syndrome. *Eur J Hum Genet* 8, 54-62.
- Schneider, K.U.** (2007). Functional characterisation of the short stature homeobox-containing transcription factor SHOX in vitro and generation of a SHOX-transgenic mouse model (Universität Heidelberg).
- Schneider, K.U., Glaser, A., Kleinschmidt, K., Scholl, I., Li, L., Gretz, N., Mechttersheimer, G., Richter, W., Marchini, A., Blaschke, R.J., et al.** (2011, in Vorbereitung). A transgenic mouse model for the characterization of the molecular pathways of the human SHOX gene during embryonic limb development (in Vorbereitung).
- Schwartzberg, P.L., Robertson, E.J. und Goff, S.P.** (1990). Targeted gene disruption of the endogenous c-abl locus by homologous recombination with DNA encoding a selectable fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3210-3214.
- Scott, A., Hasegawa, H., Sakurai, K., Yaron, A., Cobb, J. und Wang, F.** (2011). Transcription factor short stature homeobox 2 is required for proper development of tropomyosin-related kinase B-expressing mechanosensory neurons. *J Neurosci* 31, 6741-6749.
- Scott, J.E. und Taor, W.S.** (1979). The "small patella" syndrome. *J Bone Joint Surg Br* 61-B, 172-175.
- Scott, M.P., Tamkun, J.W. und Hartzell, G.W., 3rd** (1989). The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta* 989, 25-48.
- Semina, E.V., Reiter, R.S. und Murray, J.C.** (1998). A new human homeobox gene OGI2X is a member of the most conserved homeobox gene family and is expressed during heart development in mouse. *Hum Mol Genet* 7, 415-422.

Shears, D.J., Vassal, H.J., Goodman, F.R., Palmer, R.W., Reardon, W., Superti-Furga, A., Scambler, P.J. und Winter, R.M. (1998). Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* 19, 70-73.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.

Spitzer, J. (2006). Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors SHOX2 (Universität Heidelberg).

Spranger, S., Schiller, S., Jauch, A., Wolff, K., Rauterberg-Ruland, I., Hager, D., Tariverdian, G., Troger, J. und Rappold, G. (1999). Leri-Weill syndrome as part of a contiguous gene syndrome at Xp22.3. *Am J Med Genet* 83, 367-371.

Stattin, E.L., Wiklund, F., Lindblom, K., Onnerfjord, P., Jonsson, B.A., Tegner, Y., Sasaki, T., Struglics, A., Lohmander, S., Dahl, N., et al. (2010). A missense mutation in the aggrecan C-type lectin domain disrupts extracellular matrix interactions and causes dominant familial osteochondritis dissecans. *Am J Hum Genet* 86, 126-137.

Suzuki-Hirano, A., Ogawa, M., Kataoka, A., Yoshida, A.C., Itoh, D., Ueno, M., Blackshaw, S. und Shimogori, T. (2011). Dynamic spatiotemporal gene expression in embryonic mouse thalamus. *J Comp Neurol* 519, 528-543.

Svingen, T. und Tonissen, K.F. (2006). Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity* 97, 88-96.

Szeto, D.P., Rodriguez-Esteban, C., Ryan, A.K., O'Connell, S.M., Liu, F., Kioussi, C., Gleiberman, A.S., Izpisua-Belmonte, J.C. und Rosenfeld, M.G. (1999). Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev* 13, 484-494.

Szeto, D.P., Ryan, A.K., O'Connell, S.M. und Rosenfeld, M.G. (1996). P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7706-7710.

Tada, M. und Smith, J.C. (2001). T-targets: clues to understanding the functions of T-box proteins. *Dev Growth Differ* 43, 1-11.

Takeuchi, J.K., Koshiba-Takeuchi, K., Matsumoto, K., Vogel-Hopker, A., Naitoh-Matsuo, M., Ogura, K., Takahashi, N., Yasuda, K. und Ogura, T. (1999). Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* 398, 810-814.

Tamura, K., Yonei-Tamura, S. und Izpisua Belmonte, J.C. (1999). Differential expression of Tbx4 and Tbx5 in Zebrafish fin buds. *Mech Dev* 87, 181-184.

Tanabe, Y. und Jessell, T.M. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274, 1115-1123.

Tarttelin, E.E., Gregory-Evans, C.Y., Bird, A.C., Weleber, R.G., Klein, M.L., Blackburn, J. und Gregory-Evans, K. (2001). Molecular genetic heterogeneity in autosomal dominant drusen. *J Med Genet* 38, 381-384.

Tasheva, E.S., Klocke, B. und Conrad, G.W. (2004). Analysis of transcriptional regulation of the small leucine rich proteoglycans. *Mol Vis* 10, 758-772.

te Riele, H., Maandag, E.R. und Berns, A. (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5128-5132.

- Thompson, S., Clarke, A.R., Pow, A.M., Hooper, M.L. und Melton, D.W.** (1989). Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* **56**, 313-321.
- Tickle, C.** (2003). Patterning systems--from one end of the limb to the other. *Dev Cell* **4**, 449-458.
- Tiecke, E., Bangs, F., Blaschke, R., Farrell, E.R., Rappold, G. und Tickle, C.** (2006). Expression of the short stature homeobox gene *Shox* is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev Biol* **298**, 585-596.
- Turner, D.L. und Weintraub, H.** (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* **8**, 1434-1447.
- Uyanik, G., Aigner, L., Martin, P., Gross, C., Neumann, D., Marschner-Schafer, H., Hehr, U. und Winkler, J.** (2003). ARX mutations in X-linked lissencephaly with abnormal genitalia. *Neurology* **61**, 232-235.
- Vandesompele, J., De Paepe, A. und Speleman, F.** (2002). Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem* **303**, 95-98.
- Vasquez, K.M., Marburger, K., Intody, Z. und Wilson, J.H.** (2001). Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8403-8410.
- Vickerman, L., Neufeld, S. und Cobb, J.** (2011). *Shox2* function couples neural, muscular and skeletal development in the proximal forelimb. *Dev Biol* **350**, 323-336.
- Wellik, D.M. und Capecchi, M.R.** (2003). *Hox10* and *Hox11* genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* **301**, 363-367.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A. und Gough, N.M.** (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684-687.
- Woolfe, A., Goodson, M., Goode, D.K., Snell, P., McEwen, G.K., Vavouri, T., Smith, S.F., North, P., Callaway, H., Kelly, K., et al.** (2005). Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. *PLoS Biol* **3**, e7.
- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R.I., Ornitz, D.M., Leder, P. und Deng, C.** (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* **125**, 753-765.
- Yamada, S., Tomoeda, M., Ozawa, Y., Yoneda, S., Terashima, Y., Ikezawa, K., Ikegawa, S., Saito, M., Toyosawa, S. und Murakami, S.** (2007). PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem* **282**, 23070-23080.
- Yu, L., Gu, S., Alappat, S., Song, Y., Yan, M., Zhang, X., Zhang, G., Jiang, Y., Zhang, Z., Zhang, Y., et al.** (2005). *Shox2*-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate. *Development* **132**, 4397-4406.
- Yu, L., Liu, H., Yan, M., Yang, J., Long, F., Muneoka, K. und Chen, Y.** (2007). *Shox2* is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton. *Dev Biol* **306**, 549-559.
- Zeller, R., Lopez-Rios, J. und Zuniga, A.** (2009). Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat Rev Genet* **10**, 845-858.
- Zinn, A.R., Wei, F., Zhang, L., Elder, F.F., Scott, C.I., Jr., Marttila, P. und Ross, J.L.** (2002). Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet* **110**, 158-163.

6 Anhang

6.1 Microarray-Ergebnisse

Shox2-KO vs. WT

Signifikant positiv regulierte Gene ($\log_2 > 0,45$)

#	Gen	Gen-ID	Änderung (\log_2 [Änderung])	Signifikanz ($-\log_{10}$ [P-Wert])
1	<i>Stk25</i> <i>LOC100046044</i>	/// Mm.28761_at	1,20	4,15
2	<i>Nr2f1</i>	Mm.439653_at	0,95	5,80
3	<i>6720463M24Rik</i>	Mm.23503_at	0,83	2,64
4	<i>Nefm</i>	Mm.390700_at	0,79	3,58
5	<i>Tcf21</i>	Mm.16497_at	0,77	2,17
6	<i>C1qdc2</i>	Mm.29140_at	0,74	3,27
7	<i>Taf7</i>	Mm.236009_at	0,71	3,67
8	<i>Isl1</i>	Mm.42242_at	0,71	5,89
9	<i>Rarres1</i>	Mm.38002_at	0,70	3,82
10	<i>Slitrk1</i>	Mm.257268_at	0,70	2,60
11	<i>Lmo1</i>	Mm.360145_at	0,70	1,74
12	<i>Irx3</i>	Mm.238044_at	0,69	7,26
13	<i>Crh</i>	Mm.290689_at	0,69	2,41
14	<i>2410129H14Rik</i>	Mm.38912_at	0,69	1,44
15	<i>Cbln2</i>	Mm.70775_at	0,65	3,21
16	<i>2900073C17Rik</i>	Mm.463007_at	0,65	3,74
17	<i>Hoxd12</i>	Mm.57124_at	0,63	5,85
18	<i>Pcdh17</i>	Mm.153643_at	0,61	4,32
19	<i>Kcne3</i>	Mm.282386_at	0,60	4,08
20	<i>Gdf5</i>	Mm.4744_at	0,59	5,67
21	<i>Krt17</i>	Mm.14046_at	0,58	1,59
22	<i>Scnm1</i>	Mm.182944_at	0,58	3,24
23	<i>Zfp503</i>	Mm.292401_at	0,57	5,31
24	<i>Decr1</i>	Mm.393293_at	0,57	6,76
25	<i>Morn2</i>	Mm.45208_at	0,56	1,85
26	<i>Ctsk</i>	Mm.272085_at	0,56	2,72
27	<i>Efemp1</i>	Mm.44176_at	0,56	2,85
28	<i>Tbx2</i>	Mm.287052_at	0,55	3,52
29	<i>Tbx4</i>	Mm.275336_at	0,55	9,21
30	<i>Nefl</i>	Mm.1956_at	0,54	4,84
31	<i>2310047K21Rik</i>	Mm.285871_at	0,53	4,42
32	<i>Wars2</i>	Mm.316754_at	0,52	3,92
33	<i>Foxf2</i>	Mm.390554_at	0,52	1,89
34	<i>Shh</i>	Mm.57202_at	0,51	3,40
35	<i>Hoxd13</i>	Mm.57227_at	0,51	9,48
36	<i>Gria2</i>	Mm.220224_at	0,50	5,33
37	<i>Ndrg2</i>	Mm.26722_at	0,49	1,78
38	<i>Pgm2</i>	Mm.217764_at	0,49	3,43
39	<i>Hint2</i>	Mm.25285_at	0,47	2,73
40	<i>Gpatch4</i>	Mm.46029_at	0,46	3,00
41	<i>Msx1</i>	Mm.256509_at	0,46	6,16
42	<i>Pitx1</i>	Mm.135195_at	0,46	8,20
43	<i>Gfpt2</i>	Mm.24402_at	0,46	2,17
44	<i>Aldh1a2</i>	Mm.42016_at	0,46	3,81
45	<i>Pdk1</i>	Mm.34411_at	0,45	3,55

Shox2-KO vs. WT**Signifikant negativ regulierte Gene ($\log_2 < -0,45$)**

#	Gen	Gen-ID	Änderung (\log_2 [Änderung])	Signifikanz ($-\log_{10}$ [P-Wert])
1	<i>Shox2</i>	Mm.39093_at	-1,20	4,39
2	<i>2810417H13Rik</i>	Mm.351273_at	-1,17	4,46
3	<i>Cpa3</i>	Mm.1135_at	-1,08	2,62
4	<i>Gjb4</i>	Mm.56906_at	-1,01	3,73
5	<i>Ppbp</i>	Mm.293614_at	-0,92	3,67
6	<i>Rbm45</i>	Mm.33310_at	-0,92	2,33
7	<i>Srgn</i>	Mm.338790_at	-0,89	3,64
8	<i>Hist3h2ba</i>	Mm.28022_at	-0,82	2,69
9	<i>Aspn</i>	Mm.383216_at	-0,81	6,71
10	<i>Thbs4</i>	Mm.20865_at	-0,76	2,64
11	<i>Rspo1</i>	Mm.42202_at	-0,72	1,93
12	<i>Ogn</i>	Mm.4258_at	-0,71	10,96
13	<i>Pam</i>	Mm.5121_at	-0,69	1,50
14	<i>Meox1</i>	Mm.3404_at	-0,68	3,51
15	<i>Pf4</i>	Mm.332490_at	-0,68	3,15
16	<i>Tmem14c</i>	Mm.30005_at	-0,67	3,16
17	<i>Tnc</i>	Mm.454219_at	-0,67	5,93
18	<i>Adat2</i>	Mm.331841_at	-0,67	2,88
19	<i>Gjb5</i>	Mm.26859_at	-0,65	2,84
20	<i>Itgb3bp</i>	Mm.257094_at	-0,64	4,78
21	<i>Kcnj8</i>	Mm.1482_at	-0,58	2,11
22	<i>1700021C14Rik</i>	Mm.273330_at	-0,58	3,39
23	<i>Tmod4</i>	Mm.71935_at	-0,56	1,73
24	<i>Fgf7</i>	Mm.330557_at	-0,55	4,19
25	<i>Exosc9</i>	Mm.116711_at	-0,54	1,77
26	<i>A2m /// LOC677369</i>	Mm.30151_at	-0,53	2,87
27	<i>Gatm</i>	Mm.29975_at	-0,51	4,47
28	<i>3110079O15Rik</i>	Mm.7310_at	-0,51	2,11
29	<i>LOC100046207 /// Ly6h</i>	Mm.22154_at	-0,51	3,57
30	<i>Ephb1</i>	Mm.22897_at	-0,51	3,39
31	<i>Cited1</i>	Mm.2390_at	-0,50	4,81
32	<i>Tbx18</i>	Mm.158789_at	-0,50	4,68
33	<i>Strn4</i>	Mm.35474_at	-0,50	4,10
34	<i>Pcp4</i>	Mm.5023_at	-0,49	2,99
35	<i>Id4 /// LOC100045546</i>	Mm.458006_at	-0,48	7,40
36	<i>C1qc</i>	Mm.439732_at	-0,48	2,78
37	<i>Chodl</i>	Mm.77895_at	-0,47	3,41
38	<i>Csrp3</i>	Mm.17235_at	-0,47	2,14
39	<i>4930556A17Rik</i>	Mm.445939_at	-0,47	1,80
40	<i>Akap12</i>	Mm.27481_at	-0,46	3,68
41	<i>BC057893</i>	Mm.331588_at	-0,46	1,82
42	<i>Myot</i>	Mm.143804_at	-0,46	2,16
43	<i>Zcchc5</i>	Mm.85581_at	-0,46	5,32
44	<i>Acan</i>	Mm.358571_at	-0,46	2,17
45	<i>Car2</i>	Mm.1186_at	-0,46	2,93
46	<i>Thbs2</i>	Mm.26688_at	-0,46	3,92
47	<i>Epyc</i>	Mm.148886_at	-0,45	2,29
48	<i>Tyropb</i>	Mm.46301_at	-0,45	1,78
49	<i>Igf1</i>	Mm.268521_at	-0,45	11,26
50	<i>Col14a1</i>	Mm.297859_at	-0,45	4,66

Tabelle 16: Signifikant positiv und negativ regulierte Gene im *microarray*.

Die angegebene Regulation (\log_2 [Änderung]) bezieht sich auf die Expression der Gene in *Shox2-knockout*-Extremitäten im Vergleich zum WT und liegt bei einem Grenzwert von $\log_2 > 0,45$ bzw. $< 0,45$. Der Grenzwert für die Signifikanz $-\log_{10}$ [P-Wert] $\geq 1,3$ entspricht einem P-Wert von $\leq 0,05$.