

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. Guido Posern)

**Untersuchungen zur Expression und Funktion von Midline1 in der
Augenentwicklung von *Xenopus laevis***

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Swantje Ranft
geboren am 16.09.1985 in Pirna
Betreuer: Prof. Dr. Thomas Hollemann

Gutachter: Prof. T. Hollemann
Prof. C. Hoffmann (Wien)
Prof. Rupp (München)

08.10.2013
30.06.2014

Meinen Eltern

Referat und bibliographische Beschreibung

Das Opitz-G/BBB-Syndrom ist eine seltene Erkrankung, die aufgrund von Mutationen im Midline1-Gen entsteht. Bei betroffenen Patienten finden sich Pathologien der ventralen Mittellinie wie Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten, Hypospadie, gastrointestinale Anomalien, Hypertelorismus, laryngotracheale Anomalien und Herzdefekte. Die genauen Mechanismen, die diesem Krankheitsbild unterliegen, sind bis heute nicht vollständig geklärt. In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden anhand des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) Untersuchungen zur Expression und Funktion von Midline1 vorgenommen, um ein besseres Verständnis besonders im Hinblick auf die Midline1-Funktion für die Augenentwicklung zu erlangen.

In der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* konnte eine Midline1-Expression in allen Stadien nachgewiesen werden. Bei der gezielten Betrachtung der Expression im Verlauf der Augenentwicklung fiel ein spezifisches und dynamisches Expressionsmuster auf, das erst das gesamte Augenbläschen einnahm und in späteren Entwicklungsstadien eine Verlagerung auf ventrale Anteile der Retina wie den optischen Stiel erfuhr. Im Expressionsvergleich mit zwei wichtigen Augenmarkergenen, Pax6 und Pax2, wurde deutlich, dass Charakteristika beider Gene im Midline1-Expressionsmuster zu finden sind. In Lipofektionsexperimenten konnte erstmalig aufgedeckt werden, dass Midline1 bei der Differenzierung von retinalen Vorläuferzellen einen Einfluss auf das Zellschicksal hat. Überexpression von Midline1 in Retinoblasten führte zur vermehrten Differenzierung von Photorezeptoren zulasten der Zahl von Bipolarzellen. Um die entwicklungsbiologische Aufgabe von Midline1 genauer zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, die die Funktion von Midline1 supprimieren. Die entsprechend behandelten *Xenopus*-Embryonen entwickelten einen Augenphänotyp, der durch eine Vergrößerung und Ballonierung des Augenbläschens im NF-Stadium 28 gekennzeichnet war. In späteren Entwicklungsstadien (NF-Stadium 36) war eine Faltenbildung der Retina auffällig. Bei der anschließenden Analyse zeigte sich eine Verstärkung und ektopische Erweiterung der Expressionsdomäne von Pax6. Auf Proteinebene ließen sich vermehrt Pax6-positive Zellen innerhalb der Retina darstellen. Aus diesen Untersuchungsergebnissen wäre Pax6 als Substrat der Ubiquitin-Ligase Midline1 vorstellbar.

Ihle, Swantje: Untersuchungen zur Expression und Funktion von Midline1 in der Augenentwicklung von *Xenopus laevis*. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 <i>Xenopus laevis</i> als Modellsystem für entwicklungsbiologische Untersuchungen	1
1.2 Anatomischer Aufbau des Auges und der Retina	2
1.3 Augenentwicklung: Neurale Induktion und Musterbildung	3
1.4 Die komplexe Differenzierung retinaler Stammzellen	6
1.5 Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren Pax6 und Pax2 für die Augenentwicklung	7
1.6 Das Opitz-G/BBB-Syndrom	8
1.7 Midline1: Struktur und Funktion	9
1.8 Das Ubiquitin-System und die Bedeutung der E3-Ligase	11
1.9 Zielstellung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Tiermodell <i>Xenopus laevis</i>	13
2.1.2 Bakterien	13
2.1.3 Chemikalien	13
2.1.4 Puffer, Lösungen, Medien	15
2.1.5 Enzyme	18
2.1.6 Kits	18
2.1.7 Oligonukleotide, Vektoren und Plamide, Antikörper	19
2.1.8 Arbeitsgeräte	20
2.2 Methoden	22
2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Xenopus laevis</i> -Embryonen	22
2.2.2 RNA-Isolation aus adultem Froschgewebe	23
2.2.3 RT-PCR	24
2.2.4 Gelelektrophorese	25
2.2.5 Plasmidsequenzierung	26
2.2.6 Gewinnung von <i>Xenopus</i> -Embryonen und deren Behandlung	26
2.2.7 Mikroinjektion von Morpholino-Oligonukleotiden	27
2.2.8 β -Gal Färbung zur Darstellung der injizierten Seite nach Mikroinjektion	28

2.2.9	„Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung	28
2.2.10	Antikörperfärbung zur Darstellung Pax6-positiver retinaler Zellen	33
2.2.11	Plasmidpräparation zur Lipofektion	33
2.2.12	Lipofektion	34
2.2.13	Histologische Techniken	35
3.	Experimente und Ergebnisse	37
3.1	Isolierung der Midline1-cDNA von <i>Xenopus laevis</i>	37
3.2	Vergleich der Midline1-Sequenz in Vertebraten	38
3.3	Expressionsanalysen	39
3.3.1	Die embryonale Expression von Midline1 und Midline2	39
3.3.2	Die Expression von Midline1 in adulten Geweben von <i>Xenopus laevis</i> und <i>Homo sapiens</i>	42
3.3.3	Charakterisierung der Midline1-Expression im Verlauf der embryonalen Augenentwicklung im Vergleich zu Pax6 und Pax2	43
3.4	Funktionsverluststudien	46
3.4.1	Analyse des Midline1-Knockdown-Phänotyps anhand des Transkriptionsfaktors Pax6	46
3.4.2	Anstieg Pax6-positiver Zellen durch Midline1-Knockdown	49
3.4.3	Signifikante Vergrößerung des Augenbeckers durch Midline1-Knockdown	51
3.5	Untersuchung zur zellautonomen Funktion von Midline1 in der Retina	51
4.	Diskussion	53
4.1	Konservierung der Midline1-Sequenz in <i>Xenopus laevis</i> und <i>Homo sapiens</i> ..	53
4.2	Das Expressionsverhalten von Midline1 und Midline2 während der Embryonalentwicklung von <i>Xenopus laevis</i>	53
4.3	Die ubiquitäre und differenzierte Gewebeexpression von Midline1	55
4.4	Das dynamische Expressionsmuster und mögliche Funktionen von Midline1 im Verlauf der Augenentwicklung	56
4.5	Die Midline1-Expression im Auge im Vergleich zu anderen Vertebraten	59
4.6	Veränderungen in der Augenentwicklung durch Midline1-Knockdown	61
4.7	Auswirkungen der zellautonomen Funktion von Midline1 auf die Differenzierung retinaler Stammzellen und mögliche Ursachen	66
4.8	Perspektiven	68
5.	Zusammenfassung	69
6.	Literaturverzeichnis	70
7.	Thesen	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Lebenszyklus von <i>Xenopus laevis</i>	1
Abbildung 2	Der 10-schichtige Aufbau der Retina.....	2
Abbildung 3	Schematische Übersicht der Augenentwicklung im Vertebraten	5
Abbildung 4	(a) Eine Vorläuferzelle durchläuft die unterschiedlichen Kompetenzwellen, (b) Stammbaum einer multipotenten Progenitorzelle	6
Abbildung 5	(a) Schematische Darstellung des Midline1-vermittelten Ubiquitin-abhängigen Abbaus der Proteinphosphatase 2Ac (PP2Ac) und (b) seiner Störung beim Opitz-G/BBB-Syndrom	10
Abbildung 6	Schematische Übersicht der Ubiquitylierung von Proteinen.....	11
Abbildung 7	Vollständige Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäure- sequenz von <i>Xenopus laevis</i> -Midline1	37
Abbildung 8	Aminosäuresequenzvergleich von Midline1 in verschiedenen Spezies.....	39
Abbildung 9	Die zeitliche Expression von Midline1, Midline2 und ODC1 in <i>Xenopus laevis</i> während der Embryonalentwicklung.....	41
Abbildung 10	Darstellung der Midline1-Expression adulter Gewebe von (a) <i>Xenopus laevis</i> und (b) <i>Homo sapiens</i>	42
Abbildung 11	Räumliche und zeitliche Expression von Midline1, Pax6 und Pax2 .	45
Abbildung 12	Veränderungen von Morphologie und Pax6-Expression nach Midline1-Knockdown.....	48
Abbildung 13	(A-B') Veränderung der Anzahl Pax6-exprimierender Zellen der Augenregion nach Midline1-Knockdown (C und D) Balkendiagramme, relatives Verhältnis Pax6-positiver Zellen pro Fläche im Stadium 36 (C) und 42 (D) (E) Balkendiagramm, Mittelwerte Pax6-positiver Zellen pro Retina .	50
Abbildung 14	Balkendiagramm, Vergleich der Augenbecherlängsdurchmesser von nicht injizierter zu injizierter Seite einseitig Midline1-MO injizierter Embryonen im NF-Stadium 25 (n=9).....	51
Abbildung 15	Balkendiagramm, Darstellung des prozentualen Anteils der retinalen Zelltypen nach Lipofektion von <i>Homo sapiens</i> - Midline1, <i>Xenopus tropicalis</i> -Midline1 und GFP in die prospektive Augenregion von NF-Stadium 16-18 <i>Xenopus laevis</i> -Embryonen.	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Lösungen und Puffer zur Behandlung der <i>Xenopus</i> -Embryonen.....	15
Tabelle 2	Puffer für die Gelelektrophorese	16
Tabelle 3	Lösungen und Puffer für die „whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung...	16
Tabelle 4	Antikörperfärbung	17
Tabelle 5	Medien und Lösungen für Vibratomschnitte	18
Tabelle 6	Medien	18
Tabelle 7	Primer und Sequenzen	19
Tabelle 8	PCR-Bedingungen der unterschiedlichen Primer	25
Tabelle 9	Zu untersuchende Gene und die sie enthaltenen Vektoren. Restriktionsenzyme und RNA-Polymerasen zur Erstellung spezifischer RNA-Sonden.....	29
Tabelle 10	Methanolreihe zur Rehydrierung der Embryonen für die WMISH	30
Tabelle 11	Arbeitsschritte der WMISH Tag 1	31
Tabelle 12	Arbeitsschritte der WMISH Tag 2.....	32

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäuren
A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat,
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat
CMZ	Ciliary Marginal Zone (ziliare marginale Zone)
ZNS	Zentralnervensystem

DAPI	4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
°C	Grad Celsius
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
Dig	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFTFs	Eye Field Transcription Factors (Augenfeldtranskriptionsfaktoren)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether) N, N, N',N'-tetraacetat
et al.	et alii
g	Gramm
GCL	Ganglion Cell Layer (Ganglienzellschicht)
GFP	Green Fluorescent Protein (grün fluoreszierendes Protein)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hh	Hedgehog
hCG	humanes Choriongonadotropin
Hs	<i>Homo sapiens</i>
INL	Inner Nuclear Layer (innere nukleäre Schicht)
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	Milli
μ	Micro
M	Molar (mol/l)
MBS	Modifizierte Barth-Lösung
MEM	MOPS/EGTA/Magnesiumsulfat
MEMFA	MOPS/EGTA/Magnesiumsulfat/Formaldehyd
Mid1	Midline1
Mid1-MO	Midline1-Morpholino
Mid2	Midline2
Min.	Minute

mm	Milimeter
MO	Antisense-Morpholino-Oligonukleotide
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
n	Nano
NBT	Nitro Blue Tetrazolium Chloride (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)
NF	Nieuwkoop und Faber
NR	Neurale Retina
ONL	Outer Nuclear Layer (äußere nukleäre Schicht)
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
p	Piko
PP2A	Proteinphosphatase 2A
%	Prozent
RA	Retinoic Acid (Retinsäure)
RING	Really Interesting New Gene
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	retinales Pigmentepithel
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion)
Sek.	Sekunde
Shh	Sonic hedgehog
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
sog.	sogennant
St.	Stadium
Std.	Stunde
TRIM Protein	Tripartite Motif Family Protein
TUNEL	TdT-mediated dUTP digoxigenin nick end-labeling
U	Unit
u. a.	unter anderem
v/v	volume per volume ,Volumenprozent
w/v	weight per volume, Gewichtsprozent
WMISH	„Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung
XI	<i>Xenopus laevis</i>
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Das Auge ermöglicht uns die visuelle Wahrnehmung der Welt. Grundlage dieser Funktion ist das Vermögen spezialisierter Augenzellen, auf Licht zu reagieren und diese Information über den Sehnerv zum Gehirn zu übertragen. Die Erforschung der Augen kann uns Fragen zur Evolution, Entwicklung und somit auch zur Pathogenese von Krankheiten beantworten.

1.1 *Xenopus laevis* als Modellsystem für entwicklungsbiologische Untersuchungen

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist ein bevorzugtes Modellsystem zur Untersuchung der Wirbeltierentwicklung, da sich die Embryonen außerhalb des mütterlichen Organismus entwickeln. Ein Gelege umfasst ca. 500-1000 Eier, die zeitlich definiert befruchtet werden können. Da die Embryonen mit einem Durchmesser von 1,2 bis 1,4 mm relativ groß sind, eignen sie sich besonders gut für experimentelle Manipulationen. Die Entwicklung vom befruchteten Ei bis hin zur Kaulquappe vollzieht sich in wenigen Tagen und ermöglicht dabei eine unmittelbare Beobachtung des Embryos (siehe Abb. 1).

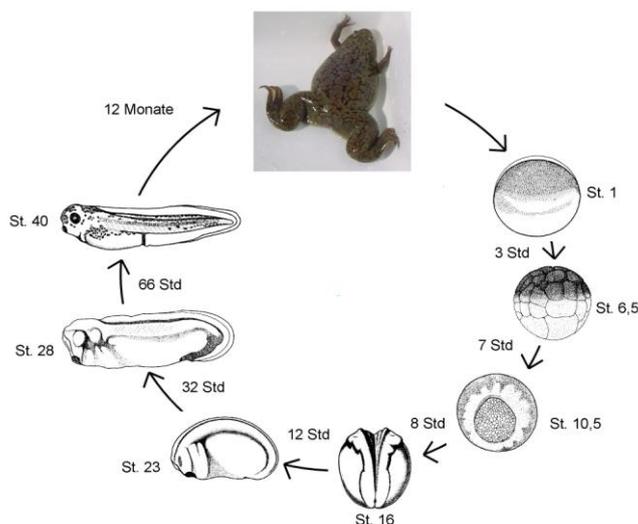


Abb. 1: Lebenszyklus von *Xenopus laevis*. Embryos skizziert und klassifiziert von Nieuwkoop und Faber [1]. Nach der Befruchtung (St. 1) entwickelt sich der Embryo durch aufeinanderfolgende Furchungsteilungen zur Blastula (St. 2-8). Die Gastrulation findet in den Stadien 10 bis 12,5 statt und führt zu einer dramatischen Umordnung der Zellen und der Entstehung der drei Keimblätter. Die Entwicklung des Nervensystems (Neurulation) vollzieht sich in den Stadien 13 bis 25. Frühes (St. 23) und spätes Schwanzknospenstadium (St. 28) mit Ausreifung und Entwicklung der angelegten Organe (Organogenese). Während der Metamorphose wandelt sich die Kaulquappe (St.40) zum adulten Frosch.

1.2 Anatomischer Aufbau des Auges und der Retina

Das Auge des *Xenopus laevis* gleicht in seinem Aufbau dem des Menschen. Zum Sehorgan zählt man den Augapfel und seinen Hilfsapparat. Der Bulbus oculi wird von drei Häuten umgeben. Die äußerste Schicht ist die Sklera, die sich vor der Linse als Cornea fortsetzt. Die mittlere Augenhaut besteht aus drei Anteilen: der Iris, die den Lichteinfall reguliert, der Choroidea (Aderhaut), die der Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff dient, und dem Ziliarkörper, über den die Linse aufgehängt ist und der so die Akkommodation ermöglicht. Weiterhin bilden die Epithelzellen des Ziliarkörpers das Kammerwasser, das den Augeninnendruck aufrechterhält und eine nutritive sowie immunoprotektive Funktion erfüllt. Die innere Augenhaut schließlich bildet die Retina und das ihr anliegende Pigmentepithel. Im Inneren des Auges befindet sich der Glaskörper, der das Auge in seiner Form erhält, und die Linse, die mit der Cornea die Lichtstrahlen bündelt und die Akkommodation ermöglicht.

Zur eigentlichen Retina wird das retinale Pigmentepithel und die neurale Retina mit ihrem 10-schichtigen Aufbau gezählt (siehe Abb. 2).

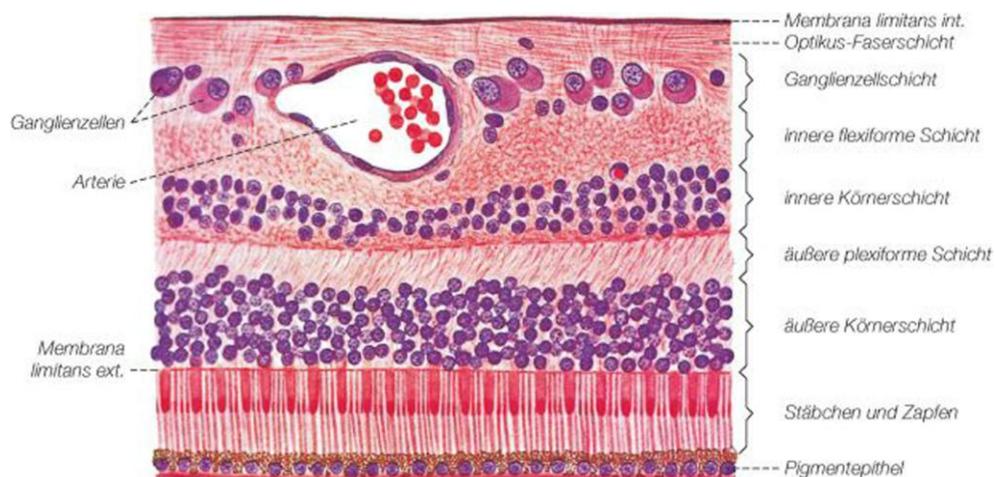


Abb. 2: Der 10-schichtige Aufbau der Retina [2].

Darunter findet man drei Schichten mit Zellkörpern: die innerste Schicht mit den Zellkörpern der Ganglienzellen (Ganglienzellschicht) und einiger amakriner Zellen, die innere Körnerschicht (innere nukleäre Schicht) mit Zellkörpern der Bipolar- und Horizontalzellen und dem Großteil amakriner Zellen sowie Müller-Gliazellen und die äußere Körnerschicht (äußere nukleäre Schicht) mit den Perikarya der Photorezeptoren [3]. In den dazwischenliegenden Schichten bilden sich Synapsen zwischen Axonen und Dendriten der einzelnen Neurone aus. Makroglia, in Form von Müller-Gliazellen, dienen der Nutrition und Stabilität. Mikroglia übernimmt wichtige

Funktionen bei der Abwehr von Mikroorganismen, der Immunregulation und der Gewebereparatur [4]. In Richtung des Glaskörpers wird die Retina durch die Membrana limitans interna abgegrenzt, eine Art Basalmembran. Auf der gegenüberliegenden Seite dient die Bruch-Membran als Grenzmembran zur Choroidea.

1.3 Augumentwicklung: Neurale Induktion und Musterbildung

Die Augumentwicklung im *Xenopus* vollzieht sich in ähnlicher Weise wie bei anderen Vertebraten und ist ein klassisches Beispiel für induktive Vorgänge. Darunter wird die Interaktion zweier Gewebe verstanden, die dazu führt, dass das Schicksal des responsiven Gewebes durch ein sendendes beeinflusst wird [5]. Im frühen Neurulastadium wird die Bildung des Augenfelds in der anterioren Neuralplatte induziert, wo nun eine Reihe von sogenannten Augenfeldtranskriptionsfaktoren (EFTFs) exprimiert werden. Zu dieser Gruppe gehören ET, Rx1, Pax6, Six3, Lhx2, tll und Optx2 (Six6), die alle eine Schlüsselrolle in der Augumentwicklung besitzen [6]. Im weiteren Verlauf der Retinogenese teilt sich das Augenfeld und die Expression der EFTFs beschränkt sich auf zwei klar getrennte Regionen lateral der vorderen Mittellinie. Für die Auftrennung des Augenfelds in zwei lateral gelegene Augenanlagen scheint das unterliegende prächordale Mesoderm eine entscheidende Rolle zu spielen [7]. Wurde diese Region experimentell entfernt, führte dies zum einen zur Entwicklung zyklischer Embryonen, zum anderen wurden Schlüsselgene der Retinogenese wie Pax6 und ET weiterhin in der Mittellinie exprimiert [7,8]. Auf molekularer Basis ist für die Spaltung des Augenfelds in Zebrafischen die Sekretion von Sonic hedgehog (Shh) sowie von Cyclops, einem TGF- β -Molekül (TGF, Transforming Growth Factor) notwendig [9]. Im NF-Stadium 18/19 in *Xenopus laevis*, wenn sich das Neuralrohr schließt, beginnen die Augenbläschen, sich von beiden Seiten des prospektiven Diencephalons auszubuchten, und kommen im NF-Stadium 19-21 in Kontakt mit dem darüberliegenden Kopfektoderm. Dieses wird später die Linse und das Corneaepithel bilden. Die Augenbläschen stehen die ganze Zeit über den Augenstiel mit dem Zwischenhirn in Verbindung. Nach der Auftrennung des Augenfelds werden die Entwicklungsgene wesentlich differenzierter in den Augenbläschen exprimiert.

Der ventrale Teil, der auch den zukünftigen Augenstiel umfasst, exprimiert Vax1, Vax2 und Pax2. In der mittleren Region, die die ventrale Retina repräsentiert, exprimieren die Zellen Vax2 und Pax6. Das dorsale Kompartiment, das sich zur dorsalen Retina

entwickeln wird, besitzt Pax6 und ET-exprimierende Zellen [10,11]. Diese dorsoventrale Musterbildung wird durch den graduellen Einfluss vorgeschalteter Signalmoleküle, wie Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4), Sonic hedgehog (Shh), Fibroblast Growth Factor (FGF) und Retinsäure (RA), auf die Expression von ET, Pax6, Vax2, Vax1 und Pax2 etabliert. Innerhalb des Augenbläschens entstehen drei morphologisch und funktionell unterschiedliche Kompartimente: die neurale Retina, das retinale Pigmentepithel und der Augenstiel [12]. Reziproke Vorgänge kontrollieren die weitere Entwicklung der Linse und des Augenbechers [13]. Unter physiologischen Bedingungen bewirken induktive Prozesse, dass sich das Oberflächenektoderm über dem Augenbläschen zur Linsenplakode verdickt und sich schließlich als Linsenbläschen vom Oberflächenektoderm abschnürt (siehe Abb. 3, B, C). Im Unterschied zu anderen Vertebraten wie Hühnchen, Maus und auch dem Menschen entwickelt sich die Linse im *Xenopus* nicht durch eine Invagination des gesamten Oberflächenektoderms oberhalb des Augenbläschens. Die Linsenplakode entsteht dagegen im *Xenopus* durch die Verdickung und Abrundung der inneren sensorischen Schicht des embryonalen Ektoderms, die sich abtrennt, wenn sich der Augenbecher ausbildet. Aus dem verbleibenden Ektoderm entwickeln sich die innere und äußere Schicht des Corneaepithels. Im NF-Stadium 27 beginnt das Augenbläschen, sich zum Augenbecher umzuformen. Dabei wird aus dem äußeren, der Linse zugewandten Blatt die neurale Retina, während das retinale Pigmentepithel (RPE) aus dem inneren Blatt hervorgeht (Abb. 3, C). Durch die Einstülpung des Augenbechers entsteht an dessen ventraler Seite eine als choroidale oder optische Fissur benannte Rille, die sich ausgehend von der ventralen Retina entlang des Augenstiels bis hin zum Neuralrohr zieht. Mesenchymale Zellen wandern durch diese Öffnung in den Augenbecher und bilden retinale Arterien [14]. Im weiteren Verlauf kommt es durch die Vergrößerung der Retina auf beiden Seiten der Fissur zur Verschmelzung der Kanten des Augenbechers um die Blutgefäße und aussprossenden Ganglienzellaxone herum. An dieser Stelle entsteht eine kreisförmige Struktur, die als optische Papille bezeichnet wird. Hier werden alle Axone der Ganglienzellen gebündelt und bilden den zukünftigen Sehnerv. Aufgrund der fehlenden Photorezeptoren ist dieser Bereich als blinder Fleck definiert. Das Mesenchym der optischen Fissur dringt in den Augenbecher ein und bildet den Glaskörper. Ein Großteil des Hohlraums zwischen der neuralen Retina und dem RPE verschwindet im NF-Stadium 32, da sich beide Blätter am Ende der Augenbecherbildung aneinanderlagern. Der Augenbecherspalt schließt sich durch

Bildung des Augennerven und hinterlässt nur eine kleine Öffnung, durch die der Augensiel zieht, der weiterhin in Verbindung mit dem Ventrikelsystem des Vorderhirns steht. Im weiteren Verlauf verdickt sich die neurale Retina, während das RPE als dünne Schicht abgeflachter Zellen bestehen bleibt. Innerhalb der pars optica retinae beginnt die Zelldifferenzierung im Stadium 35/36. Dabei werden die Zellkerne in separaten Schichten angeordnet, die später die Ganglienzellschicht sowie die äußere und innere Körnerschicht bilden werden. Eine definierte Schicht aus Mesenchym, Ektoderm und eingewanderten Neuralleistenzellen, die das Auge umgibt, entwickelt sich ab Stadium 39 zu Sklera, Choroidea und den Augenmuskeln [15].

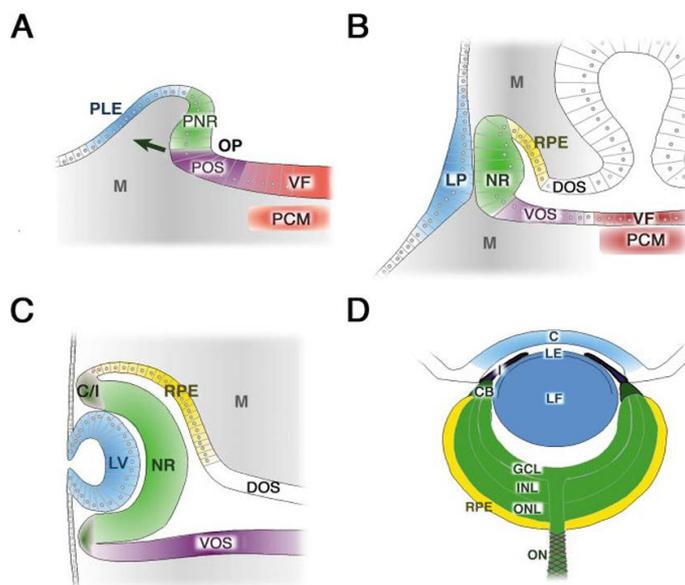


Abb. 3: A-D.Schematische Übersicht der Augenentwicklung im Vertebraten. (A) Die Ausstülpung des Augenbläschens (siehe Pfeil) aus dem Diencephalon führt zur Bildung der Augengrube (OP). (B) Unterteilung des Augenbläschens in die dorso-distale Region samt zukünftiger neuraler Retina (NR) und RPE sowie in die proximo-ventrale Region mit dem zukünftigen Augensiel (VOS). Das stetige Wachstum des Augenbläschens bedingt einen engen Kontakt zwischen Linsenplakode und zukünftiger neuraler Retina. Es werden wichtige induktive Signale zwischen beiden Seiten ausgetauscht. (C) Die Evagination des Augenbläschens setzt die Linsenbläschenbildung in Gang. Die Gesamtstruktur des Auges wird begründet. An dem Punkt, wo sich neurale Retina und RPE treffen, entstehen die Bestandteile von Ziliarkörper und Iris. (D) Vollständig entwickeltes Auge. Blau: Linse/Cornea, grün: neurale Retina, gelb: retinales Pigmentepithel (RPE), violett: Augensiel; rot: ventrales Vorderhirn/prächordales Mesenchym, grau: Mesenchym. (PNR) zukünftige neurale Retina, (POS) zukünftiger ventraler Anteil des Augensiels, (PLE) zukünftiges Linsenektoderm, (M) Mesenchym, (VF) ventrales Vorderhirn, (PCM) prächordales Mesoderm, (LP) Linsenplakode, (VOS) ventraler Augensiel, (DOS) dorsaler Augensiel, (LV) Linsenvesikel, (NR) neurale Retina, (C/I) Ziliarkörper/Iris, (C) Cornea, (LE) Linsenepithel, (LF) Linsenfasern, (I) Iris, (CB) Ziliarkörper, (GCL) Ganglienzellschicht, (INL) innere nukleäre Schicht, (ONL) äußere nukleäre Schicht, (ON) Nervus opticus [9].

1.4 Die komplexe Differenzierung retinaler Stammzellen

Die sieben großen Zellgruppen der Retina, sechs neuronale Zelltypen und die Müller-Gliazellen befinden sich in der neuralen Retina in einer geschichteten Anordnung (siehe Abschnitt 1.2). Es konnte gezeigt werden, dass alle neuronalen Zelltypen und die Müller-Gliazellen durch Differenzierung aus multipotenten Progenitorzellen entstehen [16]. Hierbei ist der Einfluss intrinsischer und extrinsischer Faktoren entscheidend. Die Differenzierung folgt dabei einer festen Reihenfolge, einem charakteristischen Zeitintervall sowie einem räumlich festgelegten Muster, wobei sich die Differenzierungswelle ausgehend vom zentralen Anteil des Augenbechers konzentrisch nach peripher ausbreitet (siehe Abb. 4) [17]. Die einzelnen Zelltypen der Retina entstehen in einer festgelegten, aber sich überlappenden, konservierten Reihenfolge. Zuerst differenzieren die Ganglienzellen. Anschließend folgen die Horizontalzellen, Zapfen, amakrine Zellen und Stäbchen. Zum Schluss entstehen die Bipolarzellen und Müller-Gliazellen [18]. Die retinalen Vorläuferzellen bilden dabei ein Mosaik aus multipotenten und schicksalsbeschränkten Progenitorzellen [19].

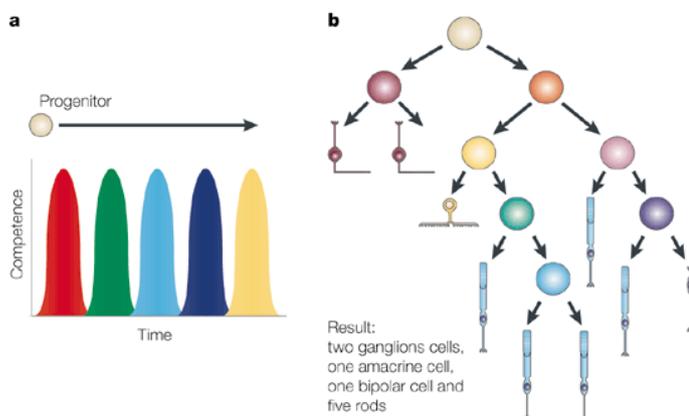


Abb. 4 (a) Eine Vorläuferzelle durchläuft die unterschiedlichen Kompetenzwellen (mit verschiedenen Farben gekennzeichnet). Die Vorläuferzelle kann nur eine Untergruppe an postmitotischen Zellen generieren. Der Schlüssel ist, dass Zellen die Kompetenz, unterschiedliche Zelltypen zu bilden, erwerben, aber auch wieder verlieren können. Dagegen besagt das Modell der progressiven Restriktion, dass zu Beginn der Entwicklung eine Differenzierung zu allen Zelltypen möglich ist, diese Fähigkeit im Verlauf aber schrittweise verloren geht.

4 (b) Stammbaum einer multipotenten Progenitorzelle. Die zwei Nachkommen nach jeder Zellteilung, können sowohl mitotisch als auch postmitotisch sein. Die unterschiedlichen Farben zeigen die verschiedenen Kompetenzstadien an. Mehr als ein Typ an Vorläuferzellen kann bei diesem Modell ein bestimmtes Zellschicksal hervorrufen, hier z. B. die Differenzierung zu einem Stäbchen (blau). *In vivo*-Abstammungsanalysen haben gezeigt, dass solche Multi-Zelltypen-Klone typisch für die vertebrierte Retina sind [17].

1.5 Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren Pax6 und Pax2 für die Augenentwicklung

Pax6 und Pax2 sind evolutionär hoch konservierte Transkriptionsfaktoren. Beide besitzen zwei kooperierende DNA-bindende Domänen: eine Homöobox-Domäne und eine Paired-Domäne. Untersuchungen zu Pax6 und seiner Funktion fanden bereits in den unterschiedlichsten Tiermodellen statt, z. B. in Mäusen [20] und *Drosophila melanogaster* [21] bis hin zu Kopffüßlern [22]. Mutationen in einem Pax6-Allel äußern sich beim Menschen durch vielfältige Augenerkrankungen wie Peters Anomalie [23], Kolobom des optischen Nerven, ektopische Pupillen, Aniridie oder Hypoplasie des optischen Nerven [24]. In *Drosophila* und auch in Vertebraten wie *Xenopus* führte die ektopische Expression von Pax6 zur Induktion ektopischer Augen [25,26]. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von Pax6 in der Determinierung von okulärem Gewebe hin, weshalb Pax6 zunächst als Masterregulator der Augenentwicklung bezeichnet wurde [27,28]. Mäuse mit einer heterozygoten Pax6-Mutation entwickelten einen Phänotyp mit sehr kleinen Augen, der sogenannten Small eye (sey)-Mutation. Mutationen in beiden Allelen führten sogar zur Anophthalmie [29]. Diese Analogien lassen erkennen, dass die genannten Pax6-Gene ortholog sind und gleiche Aufgaben erfüllen. Neben Untersuchungen zum Funktionsausfall von Pax6 führten Überexpressionsstudien in Mäusen zu ähnlichen Defekten wie ein Pax6-Funktionsverlust. Dazu gehörten Mikroophthalmie, retinale Dysplasie und eine gestörte axonale Leitung von Ganglienzellen [30,31]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch die Gendosis von Pax6 eine wichtige Rolle in der normalen Entwicklung und Pathogenese spielt. Die von Gehring et al. postulierte Rolle als „Masterkontrollgen“ der Augenentwicklung [27] würde implizieren, dass Pax6 die Hierarchie der Augen-determinierenden Gene anführt und alle Aspekte der Augenentwicklung kontrolliert. Die genaue Bedeutung von Pax6 für die Augenentwicklung ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, da z. B. in *Planariae* (Strudelwürmer) Augen auch ohne den Transkriptionsfaktor Pax6 gebildet werden können [32]. Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass in Pax6-defizienten Embryonen das proximo-distale Expressionsmuster einiger Transkriptionsfaktoren zumindest im zeitigen Augenbläschen nicht beeinträchtigt wird [33].

Pax6 und Pax2 sind an der Musterbildung im Augenbläschen und Augenbecher beteiligt. Auf die Musterbildung der dorso-ventralen und naso-temporalen Retina wirkt Pax6 ein [34,35]. Dagegen nimmt Pax2 auf die proximo-distale Musterbildung des

Augenbläschens und auf den Schluss der optischen Fissur Einfluss [36,37]. Pax6 wird in der Augenanlage und später in allen Zellen der zukünftigen Retina, dem Pigmentepithel und Linsenepithel exprimiert [20]. Die Pax2-Expression erstreckt sich anfangs auf die ventrale Hälfte des Augenbläschens [38] und ist später nach Bildung des Augenbechers auf die Gliazellen des optischen Stiels begrenzt, markiert also den zukünftigen Nervus opticus [36]. Pax6 und Pax2 werden zu Beginn der Augenentwicklung in bestimmten Regionen des Augenbläschens coexprimiert. Bei der Bildung der Vorläuferdomäne des retinalen Pigmentepithels im Augenbläschen scheinen Pax6 und Pax2 sogar redundante Funktionen auszuüben [33]. Später lässt sich der Augenbecher vom Augensiel durch die differenzierte Expression von Pax6 und Pax2 abgrenzen [33,38]. An der Grenze zwischen Augensiel und Augenbecher wird dabei durch negative reziproke Kontrolle das Expressionsniveau des jeweils anderen Transkriptionsfaktors festgelegt [39]. Dieses Modell der gegenseitigen Repression von Pax6 und Pax2 scheint besonders für spätere Aspekte der Augenentwicklung wie z. B. der Augenbecherbildung zu gelten [33].

1.6 Das Opitz-G/BBB-Syndrom

Mutationen im Midline1-Gen verursachen das Opitz-G/BBB-Syndrom, das durch Defekte der ventralen Mittellinie gekennzeichnet ist. Bei diesem kongenitalen Syndrom treten häufig eine Hypospadie, ein okulärer Hypertelorismus und laryngotracheoösophageale Spalten auf. Zusätzlich können die Patienten an Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, gastrointestinalen Defekten, kongenitalen Herzdefekten, Anomalien des ZNS (Agenesie des Corpus callosum, Agenesie bzw. Hypoplasie des Vermis) und imperforiertem Anus und Hymen leiden. Entwicklungsverzögerungen und mentale Retardierung werden ebenso beschrieben [40,41]. Es existiert sowohl eine X-chromosomal rezessive Form der Erkrankung, die auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms lokalisiert ist (Xp 22) und deren Ursache eine Mutation im Midline1-Gen ist, als auch eine autosomal-dominante Form, die auf dem Chromosom 22 (22q11.2) nachgewiesen werden konnte. Das Gen, das für diese Form der Erkrankung verantwortlich ist, konnte noch nicht identifiziert werden [42,43]. Die Ausprägung der Krankheit ist relativ heterogen. Man findet sowohl Patienten, die schwer betroffen sind, als auch Patienten, die einen milden Phänotyp aufweisen. Sogar innerhalb einer Familie kann sich die Krankheit unterschiedlich stark manifestieren. Die meisten

Mutationen, die das X-chromosomale Opitz-G/BBB-Syndrom verursachen und zu einem verkürzten Protein führen, finden sich am C-Terminus des Gens [43,44].

1.7 Midline1: Struktur und Funktion

Das Midline1-Gen, auch bekannt als FXY, RNF59 und TRIM18, verfügt über 300 kb und besteht aus 10 Exons, von denen 9 kodieren. Das humane Midline1 kodiert für ein 72 kDa großes Protein und besteht aus 667 Aminosäuren. Das Protein ist gekennzeichnet durch ein RBCC-Motiv, das eine spezifische Abfolge von RING-Finger (Really Interesting New Gene), zwei B-Boxen sowie einer coiled-coil-Domäne darstellt. Das Motiv wird aufgrund dieser Dreiteilung auch als TRIM (Tripartite Motif) bezeichnet. Proteine, die dieser Gruppe angehören, sind an einer Vielzahl von Prozessen während der Entwicklung und Zelldifferenzierung sowie an der Pathogenese von Krankheiten, wie dem Opitz-G/BBB-Syndrom beteiligt [43,45]. An die RBCC-Domäne schließt sich eine Fibronectin-Typ-III-Domäne und eine B-Box 30.2 im Midline1-Protein an [46]. Der coiled-coil-Domäne schreibt man eine Funktion bei der Bildung von Homodimeren zwischen Midline1-Proteinen und Heterodimeren zwischen Midline1- und Midline2-Proteinen zu [47].

Midline2 ist ein Protein, das eine hohe Strukturähnlichkeit mit Midline1 besitzt und auch Übereinstimmungen in der Gewebeexpression zeigt. In beiden Proteinen sind die funktionellen Domänen stark konserviert. Außerdem besitzt das Midline2-Protein wie Midline1 die Fähigkeit, mit Mikrotubuli zu assoziieren (siehe unten), und könnte eventuell einen Ausfall der Midline1-Funktion zumindest teilweise kompensieren und so die Heterogenität im Krankheitsbild der Patienten mit Opitz-G/BBB-Syndrom partiell erklären [47,48].

Auch wenn die genaue Funktion von Midline1 noch nicht ausreichend geklärt ist, haben Experimente gezeigt, dass Midline1 im Zytoplasma mit Mikrotubuli assoziiert und dort Teil eines großen Multiproteinkomplexes ist, der an Ubiquitylierungsreaktionen beteiligt ist (siehe Abb. 5, a) [49,50]. Für die Bindung an Mikrotubuli ist wahrscheinlich die B-Box 30.2 am C-Terminus des Midline1-Proteins verantwortlich, die allgemein für Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung ist [51]. Es wird weiter davon ausgegangen, dass es Aufgabe der B-Box 1 des Midline1-Proteins ist, das α 4-Protein zu binden. Letzteres ist eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A und assoziiert mit deren katalytischer Untereinheit (PP2Ac), die somit in die räumliche Nähe des Midline1-Proteins gebracht und deren Aktivität durch die Bindung reduziert

wird [52,53]. Weiterhin kann Midline1 über die Ring-Finger-Domäne eine Ubiquitin-Transferase binden, die nun Ubiquitin-Moleküle auf die Proteinphosphatase 2Ac übertragen kann, sodass eine Polyubiquitinkette entsteht. Die so markierte Proteinphosphatase 2Ac wird im Anschluss durch Proteasomen, die über spezifische Rezeptoren Poly-Ubiquitin markierte Proteine erkennen, abgebaut. Somit nimmt Midline1 die Rolle als E3-Enzym im Ubiquitin-System ein. Eine Mutation im Midline1-Gen führt zu einem Midline1-Protein, das nicht mehr mit Mikrotubuli assoziieren kann und im Zytoplasma der Zelle in Form von Proteinaggregaten akkumuliert [49]. Wahrscheinlich kann der enge Kontakt der E2-Ubiquitin-Transferase zur Proteinphosphatase 2Ac nicht mehr durch Midline1 vermittelt werden. Eine Ubiquitin-abhängige Degradation der PP2Ac wird somit verhindert und führt durch die Zunahme an Phosphatasemolekülen zu einer Hypophosphorylierung Mikrotubuli-assoziierter Proteine (siehe Abb. 5, b) [53].

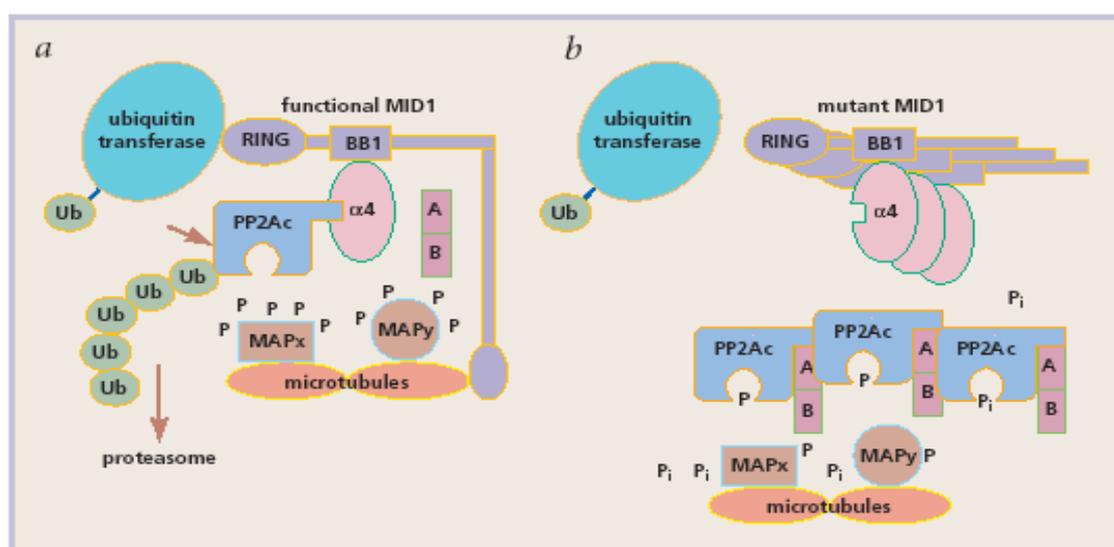


Abb. 5 (a) Schematische Darstellung des Midline1-vermittelten Ubiquitin-abhängigen Abbaus der Proteinphosphatase 2Ac (PP2Ac) und (b) seiner Störung beim Opitz-G/BBB-Syndrom. (a) Mittels der B-Box 1 bindet Midline1 das $\alpha 4$ -Protein, eine regulatorische Untereinheit der PP2Ac. Eine über die RING-Finger-Domäne gebundene Ubiquitin-Transferase vermittelt die Ubiquitinylierung des Zielproteins. Die Polyubiquitinkette wird vom Proteasom erkannt und die PP2Ac abgebaut. **(b)** Mutationen im Midline1-Gen führen zur Unfähigkeit des Proteins, mit Mikrotubuli zu assoziieren. Es bilden sich Proteinaggregate des veränderten Midline1 in der Zelle. Eine Hypophosphorylierung der Mikrotubuli-assozierten Proteine ist die Folge einer erhöhten PP2A-Konzentration in der Zelle. MAP, Mikrotubuli und verschiedene assoziierte phosphorylierte Proteine (x,y); P_i , anorganisches Phosphat; Ub, Ubiquitin; RING, RING-Finger-Domäne; BB1, B-Box 1; A und B, Untereinheiten der Proteinphosphatase 2A. Ubiquitin-Transferase, ein Proteinkomplex mit einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym und möglichen Hilfsproteinen [53].

1.8 Das Ubiquitin-System und die Bedeutung der E3-Ligase

Ubiquitin ist ein kleines, aus 76 Aminosäuren bestehendes Peptid, das evolutionär stark konserviert wurde, was nahe legt, dass auch seine biologischen Funktionen bewahrt wurden [54]. Das Ubiquitin-System dient im Wesentlichen der Markierung und Degradation von Substraten, die z. B. aufgrund einer Fehlfaltung eliminiert werden sollen. Außerdem nimmt es durch Änderung der Verfügbarkeit von Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusregulatoren Einfluss auf die Regulation von Zellprozessen wie z. B. die Signaltransduktion und den Zellzyklus [55]. Weiterhin dient die Ubiquitylierung von Proteinen auch der Modulation von Transkription, Replikation und DNA-Reparatur [56]. Es gibt E3-Ligasen wie skp2 und TRIM11, die an Entwicklungsprozessen wie der Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt sind [57,58].

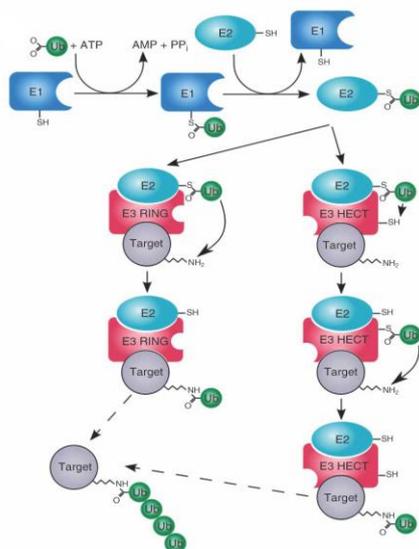


Abb. 6: Schematische Übersicht der Ubiquitylierung von Proteinen. Mehrere enzymatische Schritte sind nötig, um das Ubiquitin auf sein Zielprotein zu übertragen. Das E1-Enzym, ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym übernimmt den ersten Schritt der ATP-abhängigen Ubiquitin-Bindung. Von ihm erfolgt die Übertragung des Ubiquitins auf eine Ubiquitin-Transferase (E2). RING-Finger-E3s und U-Box-E3s (Ubiquitin-Ligasen) binden Zielprotein und E2. Die Übertragung des Ubiquitins erfolgt direkt vom E2 auf das Zielprotein. E3s mit einer HECT-Domäne dagegen übernehmen in einem Zwischenschritt selbst das Ubiquitin und verknüpfen es anschließend mit dem Zielprotein [59].

Die Konjugation eines Proteins mit Ubiquitin erfolgt in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten (siehe Abb. 6). Der initiale Schritt wird durch ein E1-Enzym, das Ubiquitin-aktivierende Enzym, katalysiert. Dabei wird der Carboxylrest des C-terminalen Glycins

eines Ubiquitins ATP-abhängig aktiviert und eine energiereiche Thioesterbindung zwischen Ubiquitin und einem Cysteinrest des E1-Enzyms gebildet [60]. Im zweiten Schritt wird das so aktivierte Ubiquitin auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 übertragen [61]. Im letzten Schritt erfolgt die Übertragung des Ubiquitins durch ein E3-Enzym, eine Ubiquitin-Ligase, direkt oder indirekt vom E2-Enzym (siehe Abb.6) auf sein Zielprotein. Für die Erkennung des Zielproteins ist meist das E3-Enzym verantwortlich. Die Interaktion zwischen dem E3-Enzym und dem Substrat wird oft durch kovalente Modifikation des Substrates reguliert. Bekannte Modifikationen sind: Phosphorylierung (besonders für die Zellzyklusregulation), Glykosylierung, Acetylierung und Hydroxylierung [62]. Die bisher bekannten E3-Enzyme gehören zu drei Protein-Familien: HECT-Familie (Homologous to E6AP Carboxy Terminus), UFD2-homologe (U-Box) Proteine und Ring-Proteine [54], zu denen auch Midline1 gehört.

1.9 Zielstellung

Die physiologische Funktion von Midline1 in der Zelle als Mikrotubuli-assoziierte E3-Ligase mit dem Zielprotein Proteinphosphatase 2A wurde bereits untersucht [52,53]. Diese Erkenntnis ist jedoch nicht ausreichend, die biologische Funktion von Midline1 vollständig zu verstehen, da zum einen die Proteinphosphatase 2A (PP2A) zahlreiche Zielproteine beeinflusst und an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt ist [63] und zum anderen die PP2A mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht das einzige Substrat der Ubiquitin-Ligase Midline1 ist. Die Expression von Midline1 wurde bislang nur in menschlichen Embryonen und in wenigen anderen Spezies wie Maus, Huhn und *Xenopus* untersucht [64,65,66,67]. Neben Defekten der Mittellinie wurden beim Opitz-G/BBB-Syndrom auch Augenfehlstellungen in Form eines Hypertelorismus beschrieben [40,41]. Inwieweit Midline1 eine Rolle für die Augenentwicklung spielt, wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. Ein Anliegen war daher eine detaillierte Beschreibung der Expression von Midline1 während der Augenentwicklung von *Xenopus laevis* vorzunehmen und im Vergleich zur Expression zweier fundamentaler Augenmarkergene, Pax2 und Pax6, zu analysieren. Expressionsanalysen im Rahmen von RT-PCRs sollten die Gewebeexpression und den zeitlichen Expressionsverlauf von Midline1 darstellen. Von besonderem Interesse war es, die Auswirkungen eines Midline1-Funktionsverlustes auf die normale Augenentwicklung zu untersuchen. Ziel war überdies in Überexpressionsstudien an retinalen Vorläuferzellen zu klären, ob Midline1 gegebenenfalls die Differenzierung retinaler Vorläuferzellen beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Tiermodell *Xenopus laevis*

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wurde über die Firma Nasco, USA bezogen und entsprechend den Bedingungen des Tierschutzes gehalten.

2.1.2 Bakterien

Kompetente Escherichia coli-Bakterien, Stamm: DH5alpha, Invitrogen

2.1.3 Chemikalien

Agarose, Roth

Albumin, Sigma

Ampicillin-Natriumsalz, AppliChem

Blocking Reagent, Roche

Borsäure, Roth

Bovines Serumalbumin (BSA, Rinderserumalbumin), Roth

Bromphenolblau, Merck

Calciumchlorid, AppliChem

CHAPS, Merck

Chloroform, Merck

4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Roth

Diethylpyrocarbonat (DEPC), Sigma

Digoxigenin-11-dUTP (10 mM), Roche

Digoxigenin-11-UTP (10 mM), Roche

Dimethylformamid (DMF), Roth

Dimethylsulfoxid (DMSO), Roth

DNA Ladder, O'GeneRuler™ (100 bp, 50 bp),

dNTP Mix (10 mM), Fermentas

DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N'-trimethylammonium-methylsulfat), Roche

Ethanol (≥ 99,8%), Roth

Ethidiumbromid, Q-Biogene

Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Sigma

Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether) N, N, N',N'-tetraacetat (EGTA), Sigma

FluorSave™ Reagent, Calbiochem

Formaldehyd, Roth
Formamid, Roth
Gelatine, Roth
Glutaraldehyd (25 %), Roth
Glycin, Sigma
Glyzerin, Roth
Heparin, Roth
HEPES, Roth
Humanes Choriongonadotropin (hCG), Sigma
Isopropanol, Roth
Kaliumchlorid, Roth
Kaliumdihydrogenphosphat, Roth
Kaliumhexacyanoferrat (II) Trihydrat ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$), Sigma
Kaliumhexacyanoferrat (III), ($K_3Fe(CN)_6$), Sigma
LB-Agar, Invitrogen
LB-Broth Base, Invitrogen
L-Cysteinhydrochlorid, Roth
Levamisol, Sigma
Lithiumchlorid, Roth
Magnesiumchlorid, Roth
Magnesiumsulfat, Sigma-Aldrich
Methanol, Roth
MOPS, Q-Biogene
Mowiol, Calbiochem
Natriumacetat, Roth
Natriumchlorid, Roth
Natriumcitrat, Fluka
Natriumdodecylsulfat (SDS), Roth
Natriumhydrogencarbonat, Sigma
Natriumhydrogenphosphat, Merck
NBT/BCIP, Roche
Nilblau-Chlorid, Fluka
NP40 100 %, Roche
PolyFreeze (Tissue Freezing Medium), Polyscience

Paraformaldehyd, Roth
 PCR-H₂O, Sigma
 Phenol, Roth
 Proteinase K, Merck
 Quick-Load® 50 bp DNA-Ladder, New England Biolabs
 Red-Gal (6-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid), Sigma
 RNase OUT™ Ribonukleaseinhibitor, Invitrogen
 Sucrose, Roth
 Torula RNA, Sigma
 Triethanolamin, Roth
 Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Roth
 Triton X-100, Ferak
 TRIzol ® Reagent, Invitrogene
 Tween-20, Roth
 Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %, Roth
 X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid), Q-Biogene
 Xylencyanol, Roth

2.1.4 Puffer, Lösungen, Medien

Tabelle 1 :Lösungen und Puffer zur Behandlung der *Xenopus*-Embryonen

Dents-Fix	80 % Methanol, 20 % DMSO
humanes Choriongonadotropin (hCG)	10,000 U/val hCG in 5 ml destilliertem H ₂ O (dH ₂ O) gelöst, anschließend aliquotiert und bei -20 °C gelagert
L-Cysteinhydrochlorid 2 %	10 g L-Cystein-Hydrochlorid mit dH ₂ O auf 500 ml aufgefüllt, pH 7,8-8,0
5x MBS-Lösung (Modifizierte Barth-Lösung)	440 mM NaCl, 12 mM NaHCO ₃ , 5 mM KCl, 4,1 mM MgSO ₄ , 50 mM Hepes, 2 mM CaCl ₂ in dH ₂ O, pH 7,4, sterilfiltriert
10x MEM	1 M MOPS, 20 mM EGTA, 10 mM MgSO ₄ in dH ₂ O, sterilfiltriert
MEMFA	3,7 % Formaldehyd in 1x MEM

Nilblau-Lösung	50 mM NaH ₂ PO ₄ auf 60 °C erwärmt, Zugabe von 0,01 % Nilblau-Chlorid über Nacht gerührt, anschließend filtriert
Red-Gal-Stammlösung	25 mg/ml Red-Gal (6-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid) in DMSO, Lagerung bei -20 °C und unter Lichtabschluss
X-Gal-Stammlösung	40 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) in DMSO, Lagerung bei -20 °C und unter Lichtabschluss
X-bzw. Red-Gal-Färbelösung	20 mM K ₃ Fe(CN) ₆ , 20 mM K ₄ Fe(CN) ₆ , 2 mM MgCl ₂ , 0,02 % NP40, Zugabe von 1 mg/ml X-bzw. Red-Gal in 1x PBS

Tabelle 2: Puffer für die Gelelektrophorese

10x TBE-Puffer (Tris/Borsäure/EDTA)	0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 20 mM EDTA in dH ₂ O
Glyzerin-Ladepuffer	10 mM EDTA, 30 % Glycerol (v/v), 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanol in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Tabelle 3: Lösungen und Puffer für die „whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche Diagnostics)	1/2000 verdünnt in TNX/2% BR
Bleichlösung	5 % Formamid, 0,5 % SSC, 10 % H ₂ O ₂
DEPC (Diethylpyrocarbonat) H ₂ O	0,1 % (v/v) DEPC in dH ₂ O, 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, autoklaviert
Glycinlösung	Glycin 2 mg/ml in PTw

Hybridisierungslösung	50 % Formamid, 1 % Blocking Reagent, 5x SSC unter Erwärmen auf 60 °C gelöst, Zugabe von: Torula-RNA, Endkonzentration: 1 mg/ml Heparin, Endkonzentration: 0,1 mg/ml Tween-20, Endkonzentration: 0,1 % EDTA, Endkonzentration: 5 mM CHAPS, Endkonzentration: 0,1 % auffüllen mit dH ₂ O, Lagerung bei -20 °C
Methanolreihe	100 %, 75 %, 50 %, 25 % in PTw
NBT/BCIP-Lösung	3,5 µl NBT/BCIP (nach Herstellerangaben gefertigt) pro ml NTMT/ 2mM Levamisol
NTMT/2 mM Levamisol	0,1 M Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 0,1 % Tween-20, 2 mM Levamisol
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 % PFA in 1x PBS, unter Erwärmung auf 60 °C und Rühren gelöst, pH 7,2, Lagerung bei -20 °C
10x PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	140 mM NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ in dH ₂ O, pH 7,2, autoklaviert
PTw	0,1 % Tween-20 in 1x PBS
20x SSC (Standard Saline Citrate Puffer)	3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat in dH ₂ O, pH 7,2-7,4
TNX	0,1 % Tris, 0,05 M NaCl, 0,1% Triton X-100
TNX/2% BR (Blocking Reagent)	2 % BR in TNX unter Erwärmung auf 60 °C gelöst, Lagerung bei -20 °C
Torula-RNA	10 mg/ml: 10 mg Torula-RNA in DEPC H ₂ O bei 37 °C über Nacht geschüttelt, Zentrifugation bei 6000 rpm für 10 Minuten, Überstand aliquotiert, Lagerung bei -20 °C

Tabelle 4: Antikörperfärbung

Permeabilisierungs-und Blocking Lösung	1 % Bovines Rinderalbumin (BSA), 0,05 % Triton X-100 in 1x PBS
--	--

Tabelle 5: Medien und Lösungen für Vibratomschnitte

Gelatine-Albumin-Einbettungsmedium	0,44 % (w/v) Gelatine, 13,5 % (w/v) Albumin, 18 % (w/v) Sucrose in 1x PBS unter Erwärmung auf 60 °C und unter Rühren gelöst, Zentrifugation bei 6000 rpm für 10 Minuten, Lagerung bei -20 °C
Mowiol	25 % (v/v) Mowiol in PBS gelöst, Zugabe von Glycerol (½ Volumen der PBS-Lösung), Lösung unter Rühren, Zentrifugation bei 6000 rpm für 10 Minuten, Überstand aliquotiert, Lagerung bei -20°C

Tabelle 6: Medien

Luria Bertani (LB)-Medium	20 g LB-Broth Base in 1 l dH ₂ O gelöst, autoklaviert, Lagerung bei 4 °C
LB-(Ampicillin)-Agar	32 g LB-Agar in 1 l dH ₂ O gelöst, autoklaviert, nach Abkühlung auf 50 °C Zugabe von Ampicillin-Natriumsalz mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml
LB-(Ampicillin)-Medium	Zugabe von Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml in LB-Medium

2.1.5 Enzyme

Restriktionsenzyme mit geliefertem Puffer:

Cla1 (5.000 U/ml), New England Biolabs (NEB)

EcoR1 (20.000 U/ml), New England Biolabs (NEB)

Hind III (20.000 U/ml), New England Biolabs (NEB)

Not I (10.000 U/ml), New England Biolabs (NEB)

DNase I (1 U/ml), Fermentas

Taq DNA-Polymerase (5 U/ml), Fermentas

T7-Polymerase (20 U/µl), Roche

T3-Polymerase (20 U/µl), Roche

Sp6-Polymerase (20 U/µl), Roche

2.1.6 Kits

Die Kits wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems

Dig RNA Labeling Kit, Roche

Gene Amp® RNA PCR Kit, Applied Biosystems

NucleoBond X-tra Midi plasmid purification Kit, Macherey-Nagel

NucleoSpin® Extract II Kit, Macherey-Nagel

Mini quick spin columns, Roche

RNeasy Mini Kit, Qiagen

2.1.7 Oligonukleotide, Vektoren und Plamide, Antikörper

Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei Sigma-Aldrich bestellt und nach Herstellerangaben in dH₂O gelöst, um 100 µM Stammlösungen zu erhalten.

Tabelle 7: Primer und Sequenzen

Primer	Sequenz (5'-3')
XI-Midline1-RT-F77	GCCCTATCTGTCTGGAGCTG
XI-Midline1-RT-R396	CTCGCTTGATGTCATGCTGT
XI-Midline2-RT-F300	TGGACAAGCCAACTTCATCA
XI-Midline2-RT-R560	TCCTTTTCCATCTGCATTCC
XI-ODC-RT-F	GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC
XI-ODC-RT-R	TTCGGGTGATTCCTTGCCAC
XI-Midline1-RT-1409-F	CTGGAAGTCGCAACAGTGAA
XI-Midline1-RT-1721-R	GCCGTGTTCTTTCCTATCCA
Hs-Midline1-RT-1825-F	AGCCTGGGAAGTTGAAGACA
Hs-Midline1-RT-2111-R	CTTCCCAATCCATTCATGCT
Beta-2-Mikroglobulin-RT-F	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT
Beta-2-Mikroglobulin-RT-R	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT
H4-RT-F	CGGGATAACATTCAGGGTATCACT
H4-RT-R	ATCCATGGCGGTAAGTGTCTTCCT
XI-Midline1-F-ATG_seq	ATGGAAACACTGGAGTCTGAACTG
T7-Primer	TCTACGTAATACGACTCACTATAG
T3-Primer	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
Sp6-Primer	TTTAGGTGACACTATAGAATAC

F-Primer=Vorwärtssequenz, R=Rückwärtssequenz, RT=Primer für Reverse Transkription, seq= Primer für Sequenzierung

Antisense-Morpholino-Oligonukleotide (MO)

Die Antisense-Morpholino-Oligonukleotide wurden über die Firma Gene Tool (USA) bezogen und entsprechend den Herstellerangaben in RNase (Ribonuklease) -freiem H₂O gelöst, um

1 mM Lösungen zu erhalten

Standard-Mo (Kontrolle): 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'

XI-Midline1-MO: 5'-TCAGTTCAGACTCCAGTGTTCAT-3'

Plasmide

Plasmide für Lipofektion:

Xt-Midline1 (*Xenopus tropicalis*) in einem pCMV-Sport6-Vektor (ehemaliges RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Zugangsnummer CF239162)

Hs-Midline1 (*Homo sapiens*) in einem pCMV-Sport6-Vektor (ImaGenes, Zugangsnummer BC053626)

GFP in einem pCS2plus-Vektor (Geschenk von *David Turner*)

Plasmide für „whole mount“ *in situ* Hybridisierung:

Midline1 in einem pB sk (-)-Vektor (XLO82d10, Zugangsnummer BJ087663)

Pax2 in einem pBluescript II SKplus-Vektor (Heller.N; 1997; Mech.dev)

Pax6 in einem pCS2-Vektor (Geschenk von *Nick Hirsch*)

Antikörper

Anti-Kaninchen-Pax6-Antikörper, Covance

Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Alexa 594), Invitrogen

2.1.8 Arbeitsgeräte

Mikroliterpipetten: P10, P20, P200, P1000, Gilson S.A.S, Frankreich

Reaktionsgefäße: Eppendorf Standard Reaktionsgefäße; Safe-Lock-Gefäße à 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml; PCR-Gefäße à 0,2 ml und 0,5 ml, eppendorf

Borosilikatkapillaren: World Precision Instruments, Inc. (WPI)

PCR-Thermocycler: Tpersonal Thermocycler, Biometra

Zentrifugen:

Biofuge pico, Heraeus

Sigma 2K15, Sigma Laborzentrifugen

Sprvall RC-5B, Thermos Scientific

Spectrophotometer:

NanoDrop® Spectrophotometer ND-100, peQlab Biotechnology

Bio Photometer, eppendorf

Abzugshaube: KS12, Thermo Scientific

Inkubatoren:

Incubator function line, Heraeus

Incubator shaker: Innova™ 4300, New Brunswick Scientific

Incubator shaker: Innova™ 4230, New Brunswick Scientific

Wasserbad DIN-40050-IP20, Memmert

Thermomixer: Thermomixer 5437, eppendorf

Thermomixer: HTMR-131, HLC-Haep Labor Consult

Mixer: Rocky 100, Labortechnik Fröbel; RM5V-30, CAT M. Zipperer

Histologische Arbeitsgeräte:

Vibratom Leica VT1000 S, Leica Microsystem

Microtom Leica RM 2066, Leica Microsystem

Microm HM500 Om, Microm

SuperFrost®plus Objektträger, Menzel-Gläser

Deckgläser, Menzel-Gläser

Elektrophorese:

Bio-Rad Gel Doc2000, Bio-Rad Laboratories USA

Power-Pack P25, Biometra

Elektrophoresis power supply E844, Consort, Belgien

Mikroinjektion:

Mikroinjektor: PV820 Pneumatic Picopump, Helmut Saur

PN-30 Pull-Pin-Gerät, Narishige, Japan

Mikroskop:

Zeiss Stemi 2000, Carl Zeiss

Olympus SZX12, Olympus Microscopy, Japan

Leica DMR, Leica Mikrosystem

Nikon Eclipse E600, Nikon, Japan

Kamera:

iNTAS MS 500, iNTAS

Vosskühler CCD-1300QLN, Vosskühler

Computer: Persönlicher Laptop, HP Pavilion Entertainment PC

Software:

Analyze 68K Mac Molly® Tetra V3.10

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), National Institute for Health, USA

Freehand 9/10 Macromedia Central Europe

Genetyx application, Software Development, Japan

Microsoft®Office Windows Vista, Microsoft, USA

Adobe Photoshop CS4

Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), Whitehead Institute for biomedical Research, USA

Qcapture Pro5.1, QImaging, USA

Translator (<http://www.fr33.net/translator.php>)

Nicht gennante, weitere Materialien werden im Methodenteil aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Xenopus laevis*-Embryonen

Das embryonale Gewebe wurde nach seiner Isolierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt, um Degradationsprozesse an der RNA zu verhindern. Ein Abbau der RNA wurde durch RNase-freies Arbeiten während der folgenden Arbeitsschritte vermieden. Zwei bis vier Embryonen der gewünschten Stadien wurden in ein 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Ein 2x Extraktionspuffer wurde frisch hergestellt aus: 400 µl 0,5 M EDTA, 2 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 1,2 ml 5 M NaCl, 2 ml 20 % SDS (Natriumdodecylsulfat). Der Ansatz wurde mit dH₂O auf 10 ml aufgefüllt. Es wurde anschließend ein 1x Extraktionspuffer durch Hinzufügen von destilliertem Wasser hergestellt und mit Proteinase K (Endkonzentration: 200 ng/ml) versetzt. Die Embryonen wurden mittels einer feinen Spritze lysiert und anschließend 60 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Darauffolgend wurden 400 µl Phenol hinzugegeben, der Ansatz gemischt und 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die obere wässrige RNA-haltige Phase wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurden 400 µl einer Mischung aus gleichen Teilen an Phenol und Chloroform erstellt, dem Ansatz hinzugefügt und gemischt. Die obere Phase wurde wieder in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Nach wiederholter Gewinnung der oberen Phase erfolgte die Zugabe von 400 µl Chloroform. Der Ansatz wurde gemischt und zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Dieser Vorgang wurde so lange

wiederholt, bis keine Präzipitate in Form einer Interphase mehr sichtbar war (ca. zwei- bis viermal). Dem Volumen an Reaktionsansatz wurde das gleiche Volumen an 4 M LiCl zugegeben und der Ansatz ein bis zwei Stunden bei -20 °C belassen. Der Ansatz wurde im Anschluss 30 Minuten bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das luftgetrocknete RNA-Pellet in 360 µl TE (Tris/EDTA-Puffer aus 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 1 mM EDTA) eine Minute bei 60 °C erwärmt und danach resuspendiert. 40 µl 3 M NaAc und 1 ml 100 % Ethanol wurden beigefügt. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde erneut mit 75 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert, der Überstand verworfen und das RNA-Pellet luftgetrocknet. Schließlich wurde das Sediment in 100 µl RNase-freiem Wasser durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst und die Konzentration mit dem NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 bestimmt. Zur Kontrolle wurde eine Gelelektrophorese auf 1 % Agarosegel mit TBE durchgeführt. Es erfolgte ein DNase-I-Verdau der isolierten RNA, um genomische DNA zu entfernen, indem 2 U DNase I hinzugefügt wurden und der Ansatz für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert wurde. Die Reaktion wurde mit 1 µl EDTA beendet und die RNA mithilfe des RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben gereinigt.

2.2.2 RNA-Isolation aus adultem Froschgewebe

Die präparierten Gewebeproben des *Xenopus* wurden nach ihrer Gewinnung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Es wurde ebenfalls auf RNase-freies Arbeiten geachtet. Vor Beginn des Experiments wurden die Mörtel und Stößel ebenfalls in flüssigem Stickstoff vorgekühlt, um ein Auftauen der Gewebe zu verhindern. Die Gewebeproben wurden mithilfe von Mörser und Stößel zerkleinert und 50-100 ng in 1 ml TRIzol®Regent homogenisiert. Dabei wurden Nadeln mit absteigendem Durchmesser zu Hilfe genommen, die auf eine sterile Spritze montiert waren. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz gemischt und drei Minuten bei Raumtemperatur belassen. Es erfolgte eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 rpm und 4 °C. Die RNA-haltige obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 0,5 ml Isopropanol wurden hinzugefügt und die RNA 30 Minuten bei -20 °C ausgefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 Minuten bei 10.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand

verworfen und das RNA-Sediment mit 70%igem Ethanol 5 Minuten bei 10.000 rpm und 4 °C gewaschen. Anschließend wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet und in 90 µl DEPC-Wasser (100 µl DEPC in 1 l H₂O, autoklaviert) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Zur Entfernung der genomischen DNA wurde ein DNase-I-Verdau durchgeführt und die RNA abschließend mit dem RNeasy Mini Kit nach den Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

2.2.3 RT-PCR

Die Reverse Transkriptase-PCR dient dazu, spezifische RNA-Sequenzen zu amplifizieren, und wird als 2-schrittiges Verfahren durchgeführt. Zunächst wurde mRNA durch reverse Transkription in sog. cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. In einem zweiten Schritt wurde eine Probe der cDNA zur Durchführung einer PCR verwendet. Dabei wurden die zu untersuchenden DNA-Sequenzen mittels spezifischer Primer amplifiziert. Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit der optimalen Einstellung der Reaktionsbedingungen auf die verschiedenen verwendeten Enzyme. Es wurden RT-PCRs mit RNA aus adulten Geweben von *Xenopus laevis* (Xl) (siehe Abschnitt 2.2.2), mit RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien der *Xenopus laevis* (Xl)-Embryonen (siehe Abschnitt 2.2.1) sowie mit humanen RNA-Geweben (Hs) durchgeführt (bezogen von Stratagene und BD Bioscience Clontech).

Die cDNA wurde mit dem Gene Amp® RNA PCR Kit mit der MuLV Reversen Transkriptase nach Herstellerangaben synthetisiert.

Ein Master-Mix wurde erstellt aus

- MgCl₂ (Endkonzentration: 5 mM),
- PCR Puffer II (Endkonzentration: 1x),
- RNase OUT (Endkonzentration: 1 U/µl),
- dGTP, dTTP, dCTP und dATP (Endkonzentration: jeweils 1 mM),
- Random Hexamer Primer (Endkonzentration 2,5 µM)
- MuLV Reverse Transkriptase (Endkonzentration: 2,5 U/µl)
- und RNase-freiem H₂O.

Zu 17 µl Master-Mix wurden 3 µl RNA (100 ng/µl) pipettiert. Es wurde vorsichtig gemixt. Anschließend wurde das Endvolumen von 20 µl im PCR-Thermocycler für 15 Minuten bei 42 °C zur reversen Transkription erhitzt, danach 5 Minuten bei 99 °C denaturiert und schließlich 5 Minuten auf 5 °C abgekühlt.

Für den zweiten Schritt der RT-PCR, der der Amplifikation spezifischer cDNA-Abschnitte diente, wurden zu 5 µl der synthetisierten cDNA 20 µl eines Master-Mix bestehend aus

- PCR-Puffer II (Endkonzentration: 1x),
- MgCl₂-Lösung (Endkonzentration: 2 mM),
- Taq-Polymerase (Endkonzentration: 2,5 U/100 µl),
- PCR-Primer-Mix (0,5 µl einer 15 µM-Verdünnung der entsprechenden Forward- und Reverse-Primer)
- und PCR-Wasser hinzugefügt.

Die Amplifikation erfolgte im PCR-Thermocycler mittels eines PCR-Programms, deren Parameter durch vorhergehende Untersuchungen optimiert wurden. In der Tabelle 8 finden sich die PCR-Bedingungen für die entsprechenden Primer. Die PCR-Produkte wurden in 1,5 % Agarosegel aufgetrennt und mit dem Bio-Rad Gel Doc 2000 abgebildet

Tabelle 8: PCR-Bedingungen der unterschiedlichen Primer

	XI Midline1 *1	XI Midline2 *1	ODC *1	XI Midline1 *2	H4 *2	Hs Midline1 *3	B2MG *3
Vordenaturierung	2 min 95°C						
Denaturierung	1 min 95°C	1 min 95°C	1 min 95°C	30 sek 95°C	30 sek 95°C	30 sek 95°C	30 sek 95°C
Annealing	45 sek 58°C	45 sek 58°C	30 sek 55°C	30 sek 60°C	30 sek 60°C	30 sek 60°C	30 sek 60°C
Elongation	90 sek 72°C	90 sek 72°C	30 sek 72°C	30 sek 72°C	30 sek 72°C	30 sek 68°C	30 sek 68°C
Abschluss-Elongation	10 min 72°C						
Zyklenanzahl	26	32	25	28	28	29	30

*1= PCR auf XI-Stadien, *2= PCR auf XI-Gewebe, *3= PCR auf Hs-Gewebe

2.2.4 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Agarosegele unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Für ein 1%iges Agarosegel wurde z.B. 0,7 g Agarose in 70 ml 1x TBE erhitzt und gelöst. Nach Abkühlung auf 70 °C wurden 1,5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in TBE-Puffer) hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Agarose in Gelapparaturen gegossen. Das gelierte Gel wurde mit 1x TBE überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt, in die Taschen

des Agarosegels aufgetragen und elektrophoretisch bei 70-100 Volt entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Gel mit einem UV-Transilluminator belichtet und mit einer Kamera fotografiert.

2.2.5 Plasmidsequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte nach der enzymatischen Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. [68]. Das Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet und beinhaltet u.a. die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxyribonukleotide (ddNTPs).

Ein Reaktionsansatz für die PCR enthielt:

- 200 ng der Plasmid-DNA
- 1 µl Primer (10 µM)
- 2 µl Sequenzierungsmix
- 2 µl Sequenzierungspuffer

Der Reaktionsansatz wird mit dH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurde das folgende Programm mit dem PCR-Thermocycler durchgeführt:

1. 96 °C für 2 Minuten
2. 96 °C für 30 Sekunden
3. 50 °C für 30 Sekunden
4. 60 °C für 4 Minuten, anschließend zu Schritt 2, 26 Zyklen

Die Proben wurden auf 12 °C abgekühlt und der Ansatz mit 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3 M Natriumacetat und 50 µl 100 % Ethanol aufgereinigt. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 14.000 U/min. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 70 % Ethanol 5 Minuten bei 14.000 U/min gewaschen. Der Überstand wurde anschließend vollständig entfernt und das Sediment luftgetrocknet. Die Sequenzierung erfolgte durch den Sequenzierungsservice des ZMG-Labors des Universitätsklinikums Halle. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems®), BioEdit und diversen Online-Tools (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

2.2.6 Gewinnung von *Xenopus*-Embryonen und deren Behandlung

Zur Anregung der Eiproduktion, wurden dem weiblichen Tier 50-100 U hCG subcutan in den dorsalen Dottersack injiziert. 10 Stunden vor der gewünschten Eiablage wurden erneut 500-1000 U hCG verabreicht. Ca. 500-1000 Eier konnten von einem Weibchen

gewonnen werden. Die Befruchtung erfolgte *in vitro* mit Spermien in 0,1x MBS-Lösung, die aus einem präparierten und mazeriertem *Xenopus*-Hoden gewonnen wurden. Die Embryonen wurden mit 2%iger L-Cysteinhydrochloridlösung behandelt, um die Gallerthülle zu entfernen. Die Cysteinhydrochloridlösung wurde durch mehrmaliges Waschen mit 0,1x MBS-Lösung entfernt. Albinoembryonen wurden anschließend mit Nilblau-Lösung gefärbt.

2.2.7 Mikroinjektion von Morpholino-Oligonukleotiden

Midline1-Antisense Morpholinos (Midline1-MOs) wurden in eine Blastomere eines 2-Zell-Stadiums von *Xenopus laevis*-Embryonen injiziert, um einen Funktionsausfall der Midline1-mRNA zu provozieren und um aus dem entstehenden sog. „Knockdown“-Phänotyp Rückschlüsse auf die physiologische Midline1-Funktion ziehen zu können. Als Kontrolle diente die nicht injizierte Seite des Embryos, da in *Xenopus* durch die erste Furchungsteilung die Links-Rechts-Achse festgelegt wird, die bei einseitiger Injektion der Morpholinos einen unilateralen Phänotyp zur Folge hat. Zur Kontrolle wurden sogenannte Standard-Morpholinos genutzt. Hierbei handelt es sich um Morpholino-Oligonukleotide mit einer Sequenzfolge, die kein *Xenopus*-Transkript binden kann. So kann ausgeschlossen werden, dass allein die Injektion von Morpholinos zu einer Veränderung des normalen Entwicklungsprogramms führt. Standard-Morpholinos und Midline1-MOs wurden jeweils in der gleichen Menge injiziert. Die Injektion erfolgte sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der experimentellen Gruppe zusammen mit 100 pg synthetischer mRNA für β -Galaktosidase, um im Anschluss anhand einer Farbreaktion das Schicksal der injizierten Seite nachvollziehen zu können (siehe Abschnitt 2.2.8).

Die Embryonen wurden für die Manipulation in 1x MBS-Lösung überführt und auf einer Glasscheibe mit dem animalen Pol nach oben ausgerichtet. Ca. 5 nl Morpholino-Oligonukleotide (2,5 pmol in destilliertem Wasser) wurden zusammen mit β -Gal RNA in eine dorsoanimale Blastomere eines 2- bis 4-Zell-Stadiums injiziert. Dafür wurde eine Injektionsnadel aus Glas (Borosilikatkapillaren) verwendet, die zuvor mithilfe eines Pull-Pin-Gerätes unter Hitze ausgezogen und mit der entsprechenden Flüssigkeit gefüllt wurde. Die Spitze der Glasnadel wurde mit einer Pinzette geöffnet, der Tropfendurchmesser unter einem Stereomikroskop eingestellt und die Flüssigkeit mittels eines pneumatischen PicoPump PV820 Mikroinjektors in die Zellen gebracht. Anschließend wurden die Embryonen noch eine Stunde in 1x MBS-Puffer belassen

und schließlich in 0,1x MBS-Puffer bis zum gewünschten Stadium kultiviert. Die Einteilung der Entwicklungsstadien richtete sich nach der Klassifikation von Nieuwkoop und Faber (NF-Stadien) [1]. Die Fixierung der injizierten Embryonen erfolgte in 1x MEMFA-Lösung für 30 Minuten bzw. in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung für 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurde die Färbung zur Darstellung der injizierten Seite durchgeführt (siehe folgender Abschnitt 2.2.8).

2.2.8 β -Gal Färbung zur Darstellung der injizierten Seite nach Mikroinjektion

Eine Unterscheidung von injizierter und nicht injizierter Seite der *Xenopus*-Embryonen ermöglichte die Koinjektion von LacZ-mRNA als Reporter in einer Konzentration von 20 pg/nl zusammen mit den Morpholino-Oligonukleotiden. Die Lokalisation der injizierten Seite wurde anschließend durch das Substrat X-Gal oder Red-Gal visualisiert. Diese Substrate wurden durch das Enzym β -Galaktosidase in ein blaues (X-Gal) bzw. rotes (Red-Gal) Präzipitat umgesetzt. Zunächst wurden die Embryonen in MEMFA-Lösung nach ihrer Gewinnung für 30 Minuten fixiert. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen in 1x PBS für 5 Minuten. Danach wurden die Embryonen erst zweimal 5 Minuten lang in 1x PBS und 2 mM $MgCl_2$ -Lösung gewaschen und darauffolgend dreimal 5 Minuten lang in einer 1x PBS-Lösung mit 2 mM $MgCl_2$ und 0,02 % NP40 belassen. Nun erfolgte die Äquilibrierung der Embryonen in Färbelösung ohne X-bzw. Red-Gal für 5 Minuten. Bei 37 °C und unter Lichtabschluss wurden die Embryonen schließlich in Färbelösung nach Zugabe von X-bzw. Red-Gal (je 1 mg/ml) bis zum Sichtbarwerden der Färbung inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit 1x PBS und 20 mM EDTA beendet. Es erfolgte eine erneute Fixation für eine Stunde in MEMFA-Lösung bzw. 4%igem PFA für 1,5 Stunden und eine Dehydrierung in einer schrittweise aufsteigenden Methanol- bzw. Ethanolreihe oder Überführung in Dents-Fix-Lösung. Die Embryonen konnten anschließend bei -20 °C gelagert werden.

2.2.9 „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Eine „whole mount“ *in situ* Hybridisierung ermöglicht den Nachweis und die Lokalisation spezifischer Transkripte in frühen Embryonen. Das Prinzip beruht auf der Paarung komplementärer Basen. Es werden RNA-Sonden hergestellt, die stabile RNA-RNA-Hybride mit dem zu untersuchenden RNA-Einzelstrang im Präparat bilden. Die Sonde ist ein Transkript des Antisense-Stranges der DNA und wird mit 11-UTP-Digoxigenin markiert. Dies ermöglicht anschließend die Bindung eines Fab-Fragments

(Antigen-bindendes Fragment des Antikörpers) an das Digoxigenin. An den Fab-Antikörper ist zusätzlich alkalische Phosphatase gekoppelt. Durch eine Farbreaktion kann schließlich die Aktivität der alkalischen Phosphatase und damit die Lokalisation der spezifischen mRNA sichtbar gemacht werden. Als Kontrolle dient eine Sense-Probe der mRNA, welche nicht hybridisieren darf.

Transkription einer Antisense-RNA-Sonde zur „whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Das Dig RNA Labeling Kit wurde zur Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden verwendet. Plasmide, die als Matrize dienten, wurden mit spezifischen Restriktionsenzymen linearisiert und anschließend durch RNA-Polymerasen in Sense- und Antisense-Proben transkribiert (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Zu untersuchende Gene und die sie enthaltenden Vektoren. Restriktionsenzyme und RNA-Polymerasen zur Erstellung spezifischer RNA-Sonden

Gen	Organismus	Vektor	Restriktionsenzym (sense)	Restriktionsenzym (α -sense)	RNA-Polymerase (sense)	RNA-Polymerase (α -sense)
Midline1	<i>X.laevis</i>	pCS2plus	Not I	Cla I	Sp6	T3
Pax2	<i>X. laevis</i>	pBluescript II SK+		EcoR I		T3
Pax6	<i>X. laevis</i>	pCS2		Hind III		T7

Es wurde ein Linearisierungsansatz erstellt aus:

- 5 μ l 10x NEBuffer für das entsprechende Enzym (NEB, New England Biolabs)
- 5 μ l 10x BSA (Bovines Serumalbumin)
- 6-8 μ g Plasmid
- 4 μ l Restriktionsenzym
- destilliertes Wasser für ein Gesamtvolumen von 50 μ l.

Der Reaktionsansatz wurde im Anschluss für zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Das linearisierte Plasmid wurde mithilfe des NucleoSpin® Extract II Kit entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend wurden 2 μ l der gereinigten DNA mit 2 μ l DNA-Ladepuffer gemischt und eine Gelelektrophorese zur Kontrolle durchgeführt.

Als Nächstes erfolgten die *in vitro*-Transkription des linearisierten Plasmids und die Markierung mit Digoxigenin mithilfe des Dig RNA Labeling Kit. Die verwendeten Vektoren besaßen auf beiden Seiten der Klonierungsstelle Bindungsstellen für RNA-Polymerasen. Zur Transkription wurden die in Tabelle 9 aufgeführten RNA-Polymerasen verwendet. Es wurde ein Transkriptionsansatz erstellt aus:

- 2 µl 10xTranskriptionspuffer
- 2 µl Dig RNA Labeling Mix
- 1 µg linearisiertes Plasmids
- 2 µl RNA-Polymerase (20 U/µl)

und destilliertem Wasser für ein Gesamtvolumen von 20 µl.

Bei 37 °C wurde der Reaktionsansatz für 2 Stunden im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 µl 0,2 % EDTA abgestoppt und 1 µl 2 % SDS hinzugefügt. Zum Abschluss erfolgte ein Aufreinigungsvorgang mithilfe von Mini quick spin columns nach Herstellerangaben. Dabei wurden nicht eingebaute Nukleotide entfernt. Zur Kontrolle wurde 1 µl DNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese in 1x TBE durchgeführt. Die gereinigten Proben wurden entsprechend ihrer Konzentration in Hybridisierungslösung verdünnt und bei -20 °C gelagert.

„Whole mount“ *in situ* Hybridisierung (WMISH)

Die WMISH basierte auf dem Protokoll von Wilkinson [69] mit kleineren Veränderungen, das sich über mehrere Tage erstreckte. 1. Tag: Die Vorbereitung der in 100 % Methanol gelagerten Wildtyp-Embryonen umfasste die Rehydrierung und Entfärbung. Die Rehydrierung erfolgte schrittweise in einer absteigenden Methanolreihe unter langsamer Bewegung auf einer Wippe (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Methanolreihe zur Rehydrierung der Embryonen für die WMISH

	Methanol	Puffer	Dauer	Wippe
1.	100 %		3 min	1 x
2.	75 %	25 % PTw	3 min	1 x
3.	50 %	50 % PTw	3 min	1 x
4.	25 %	75 % PtW	3 min	1 x
5.		100 % PTw	3 min	2 x

Das darauf folgende Bleichen der Wildtyp-Embryonen ermöglichte eine bessere Lokalisation der Färbung. Dafür wurde eine Bleichlösung aus 5 % Formamid, 0,5 % SSC und 10 % H₂O₂ in destilliertem Wasser hergestellt. Die Embryonen wurden entsprechend den Stadien über einen Zeitraum von 5 bis 30 Minuten gebleicht. Im Anschluss wurden die Embryonen dreimal 5 Minuten lang in PTw gewaschen.

Die nächsten Arbeitsschritte dienten der Vorbehandlung, Prähybridisierung und Hybridisierung der Embryonen. Zunächst wurden die Embryonen mit einer 10 µg/ml Proteinase K Lösung in PTw zur Proteolyse zwischen 2-25 min entsprechend den Stadien inkubiert, wobei die jüngeren Stadien eine kürzere Zeit behandelt wurden. Dieser Schritt führte zur Permeabilisierung und ermöglichte einen leichteren Zugang der Reagenzien in die Embryonen. Im Folgenden wurden die Embryonen in einer Glycinlösung gewaschen, um die Proteolyse zu stoppen, gefolgt von einem Waschen in PTw. Die anschließende kurze Postfixierung der Embryonen in einer 4%igen PFA-Lösung mit 0,2 % Glutaraldehyd diente dem Erhalt der Morphologie von Geweben und verhinderte die RNA-Denaturierung. Nach einem erneuten Waschen in PTw wurden die Embryonen in Hybridisierungslösung sukzessive äquilibriert. Zunächst erfolgte dabei die Hybridisierung bei Raumtemperatur und anschließend in einem 65 °C warmen Wasserbad. Daraufhin wurden die Embryonen in der Hybridisierungslösung mit dem entsprechenden Gehalt an Antisense-Sonde bzw. Sense-Sonde bei 63 °C über Nacht inkubiert (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Arbeitsschritte der WMISH Tag 1

	Lösung	Dauer	Anzahl	Temperatur
1.	Proteinase K (10 µg/ml)	2-25 min	1 x	RT, W
2.	Glycin (2 mg/ml)	5 min	2 x	RT, W
3.	PTw	5 min	2 x	RT, W
4.	PFA 4 % + Glutaraldehyd 0,2 %	20 min	1 x	RT, W
5.	PTw	5 min	3 x	RT, W
6.	Hybridisierungslösung	5 min	2 x	RT, W
7.	Hybridisierungslösung	4 Stdn	1 x	65 °C, WB
8.	Antisense-RNA-Sonde in Hybridisierungslösung (1-2 µg/ml)	Über Nacht	1 x	63 °C, WB

W= Wippe, WB = Wasserbad, RT = Raumtemperatur

2. Tag: Am 2. Tag wurde die Hybridisierungslösung mit der Sonde zurückgewonnen und bei -20 °C gelagert. Die Embryonen wurden für 15 Minuten in Hybridisierungslösung bei Raumtemperatur inkubiert und durch wiederholte Waschschriffe mit Standard-Saline-Citrat-Lösungen entsprechen der Tabelle 12 vom restlichen Hybridisierungsmix befreit. Die Behandlung mit TNX-Puffer und TNX/2% Blocking Reagent diente der Vorbereitung der Embryonen auf die Antikörperbindung des Anti-Digoxigenin-AK an die im Gewebe befindlichen Dig-markierten Sonden. Die Inkubation in der 1:2000 verdünnten Antikörperlösung betrug 2 Stunden bei Raumtemperatur. Fab-Fragmente, die nicht gebunden hatten, wurden durch Waschen mit TNX-Puffer und anschließender Inkubation bei 4 °C über Nacht eliminiert (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Arbeitsschritte der WMISH Tag 2

	Lösung	Dauer	Anzahl	Temperatur
1.	Hybridisierungslösung	15 Minuten	1 x	RT
2.	Hybridisierungslösung/2x SSC+Chaps 0,1 %	15 Minuten	1 x	RT
3.	2x SSC+ Chaps 0,1 %	40 Minuten	2 x	65 °C, WB
4.	0,2x SSC+ Chaps 0,1 %	40 Minuten	2 x	65 °C, WB
5.	TNX	15 Minuten	1 x	RT
6.	TNX/2% BR (Blocking Reagent)	2 Stunden	1 x	RT
7.	1/2000 Anti-Dig-AK in TNX/2% BR	2 Stunden	1 x	RT
8.	TNX	5 Minuten	3 x	RT
9.	TNX	Über Nacht	1 x	4 °C

RT= Raumtemperatur, WB= Wasserbad

3. Tag: Es erfolgte ein erneutes Waschen mit TNX-Puffer. Die Embryonen wurden in NTMT und 2 mM Levamisol, das endogene alkalische Phosphatasen inhibiert, zweimal für 10 Minuten inkubiert. Nun erfolgte die Färbung der Embryonen in NBT/BCIP-Lösung bei Verdunklung, bis eine ausreichende Färbung erreicht wurde. Die Färbung basierte auf blau-violetten Ablagerungen, die die alkalische Phosphatase-Aktivität mittels NBT/BCIP visualisierte. Die Reaktion wurde durch mehrmalige Inkubation mit 500 mM EDTA-Lösung in PTw angehalten. Die Embryonen wurden in

einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung mit 0,25%igen Glutaraldehyd für 30 Minuten fixiert und anschließend in Methanol überführt.

2.2.10 Antikörperfärbung zur Darstellung Pax6-positiver retinaler Zellen

Zum Nachweis Pax6-positiver Zellen auf Kryoschnitten der Augenregion von *Xenopus*-Embryonen wurden die Objektträger mit den Schnitten zunächst drei Stunden luftgetrocknet. Anschließend erfolgte eine Wässerung für dreimal 5 Minuten in 1x PBS in einem Färbekasten nach Hellendahl. Die Objektträger wurden in lichtdichte Kammern gelegt und die Zellen mit einer Block- und Permeabilisierungslösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der primäre polyklonale Kaninchen Pax6-Antikörper (Covance) aufgetragen, der in einer Antikörperpufferlösung 1:50 verdünnt wurde, die aus 1 % BSA (Rinderserumalbumin) und 0,05 % TritonX-100 in 1x PBS bestand. Die Schnitte wurden für drei Stunden bei Raumtemperatur in der Antikörperlösung inkubiert. Hieran schloss sich ein dreimaliges Waschen mit 1x PBS für jeweils 5 Minuten an. Der sekundäre anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Alexa 594) wurde ebenfalls in der gleichen Verdünnungslösung 1:1000 verdünnt und auf die Schnitte aufgetragen. Er wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss auf den Schnitten belassen und danach durch erneutes dreimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt. Zum Einbetten der Schnitte wurden 1 ml Mowiol mit 2 µl DAPI gemischt, das nötig ist, um die Zellkerne, genauer AT-reiche Regionen der DNA, sichtbar zu machen. Von dieser Lösung wurden 60 µl auf den Objektträger aufgetragen und anschließend mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Objektträger wurden in Dunkelheit bei -20 °C gelagert. Die Fluoreszenzbilder wurden über das Mikroskop Nikon Eclipse E600, das mit einer Kamera (Vosskühler CCD-1300QLN) verbunden war, aufgenommen.

2.2.11 Plasmidpräparation zur Lipofektion

Bakterielle Transformation

Es wurde eine Transformation mit kompetenten Bakterien durchgeführt, die in der Lage sind, freie DNA aufzunehmen. In diesem Fall handelte es sich um rekombinante DNA in Form von Plasmid-DNA. Die kompetenten Bakterien (Stamm:DH5alpha, Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut. 1 µl Plasmid-DNA wurden zu 50 µl Bakterienaliquot hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 Sekunden bei 37 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Es erfolgte eine erneute

Kühlung für zwei Minuten auf Eis. 50 µl der Suspension wurden auf einem ampicillinhaltigen Selektivnährboden (LB-(Ampicillin)-Agarplatte) unter sterilen Bedingungen ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht im Inkubationsschrank belassen. Nachdem Bakterienkolonien transformierter Zellklone gewachsen waren, wurde eine einzelne Kolonie mit einem sterilem Zahnstocher aufgenommen und in 2,5 ml flüssigem LB-(Ampicillin)-Medium (25 µl Ampicillin in 2,5 ml Medium) in einem Falconröhrchen bei 37 °C 8 Stunden unter Schütteln inkubiert. 100 µl dieser Suspension wurden anschließend entnommen und in einem mit 100 ml flüssigem LB-(Ampicillin)-Medium gefüllten Erlenmeierkolben über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Midi-Präparation zur DNA-Extraktion

Die Midi-Präparation diente der Gewinnung größerer Mengen qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA. Die Herstellung erfolgte mit dem NucleoBond X-tra Midi plasmid purification Kit nach den Angaben des Herstellers. Das Verfahren ermöglichte die Reinigung der Plasmid-DNA von anderen Zellbestandteilen mittels Anionenaustauschersäulen. Es erfolgte eine Gelelektrophorese auf 1%igem Agarosegel zur Kontrolle sowie eine spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung (NanoDrop).

2.2.12 Lipofektion

Zur Lipofektion retinaler Vorläuferzellen wurden *Xenopus laevis*-Embryonen der NF-Stadien 16-18 verwendet. Die Methode wurde nach dem Protokoll von Ohnuma et al. [70] mit geringen Veränderungen durchgeführt. Die zu injizierenden DNA-Proben wurden hergestellt, indem ein durch Midi-Präparation (siehe Abschnitt 2.2.11) gereinigtes Plasmid mit DOTAP, einem Lipofektionsreagenz, vorsichtig gemischt wurde. Das Mischungsverhältnis von DNA und DOTAP betrug 1:3. Für die Kontrollgruppe, die allein mit GFP (Green Fluorescent Protein) lipofektiert wurde, wurde auf diese Weise eine Mischung aus 3 µg GFP in einem pCS2plus-Vektor und 9 µg DOTAP erstellt. GFP wurde als Marker für lipofektierte Zellen verwendet und erhöht laut Ohnuma et al. durch die so entstehende gleichzeitige Lipofektion zweier Konstrukte (Colipofektion) in der experimentellen Gruppe die Effizienz [70]. Dementsprechend wurden in der experimentellen Gruppe 2 µg des gereinigten Plasmids, das das Gen von Interesse in einem pCMV-Sport6-Vektor enthielt, 1,5 µg

GFP in einem pCS2plus-Vektor und 10,5 µg DOTAP vorsichtig gemischt. DOTAP wurde bis kurz vor der Zugabe zu dem Plasmid auf Eis gekühlt. Die erstellte Mischung wurde in eine Glasnadel aufgenommen. Die zu lipofektierenden Embryonen wurden mit der anterioren Seite nach oben in einer Agaroseform mit kleinen Vertiefungen zur besseren Positionierung der Embryonen platziert. Die Agaroseform befand sich in einer Petrischale, die mit 0,1x MBS-Lösung gefüllt war, sodass die Embryonen mit Flüssigkeit bedeckt waren. Die Glasnadel wurde mit dem Lipofektionsmix gefüllt und die Spitze anschließend mit einer Pinzette eröffnet. 1-2 nl Flüssigkeit wurden anschließend bei jedem einzelnen Injektionsimpuls abgegeben. Die Menge der austretenden Flüssigkeit wurde durch vorherige Bestimmung des Tropfendurchmessers ($\approx 120 \mu\text{m}$) unter einem Stereomikroskop gemessen. Die Spitze der Nadel wurde im Bereich des Augenfeldes, wo sich die retinalen Vorläuferzellen befinden, kurz unterhalb der Epidermis eingeführt und 4-10 nl des Lipofektionsmix durch mehrmalige Impulse injiziert. Es wurde zu beiden Seiten der Mittellinie in das Augenfeld des Embryos injiziert. Nach der Injektion entwickelten sich die Embryonen in 0,1x MBS-Lösung bis zum NF-Stadium 41/42. Um die Determinierung des Zellschicksals zu analysieren, wurden die Embryonen in 4%iger Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur für zwei Stunden fixiert und schließlich für Kryostatschnitte eingebettet.

2.2.13 Histologische Techniken

Vibratomschnitte

Embryonen wurden nach der „whole mount“ *in situ* Hybridisierung in 1x PBS überführt und in einem Gelatine-Albumin-Einbettungsmedium für 20 Minuten äquilibriert. In der Zwischenzeit wurden 1,5 ml Einbettungsmedium mit 105 µl 25%igen Glutaraldehyd auf Eis gemischt und möglichst luftblasenfrei in ein Plastikförmchen (Polyscience) gegossen. Die getränkten Embryonen wurden auf dem gehärteten Sockel platziert und überstehendes flüssiges Einbettungsmedium wurde vorsichtig entfernt. Eine zweite Schicht aus 1,5 ml Einbettungsmedium und 105 µl 25%igen Glutaraldehyd wurde wie zuvor erstellt und die Embryonen damit überschichtet. Nach Verfestigung des Blockes wurde dieser aus dem Plastikförmchen gelöst und mithilfe eines Rasiermessers getrimmt. Sekundenkleber fixierte den Block in einer entsprechenden Ausrichtung auf einem metallenen Objektträger. Der Objekthalter samt Präparat wurde eingespannt und es wurden 30 µm dicke Schnitte mit dem Leica Vibratom (VT100S) angefertigt. Die

Schnitte wurden auf die Objektträger überführt und nach einer kurzen Trocknungsphase mit Mowiolösung bedeckt und unter einem Deckgläschen eingebettet. Es erfolgte die Anfertigung von Fotos (Olympus SZX12) und anschließende Auswertung mit dem Programm Adobe Photoshop CS4.

Kryostatschnitte

Die bei -20 °C in Dents-Fix bzw. 100%igem Ethanol gelagerten Embryonen wurden in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert und in 1x PBS überführt. Über Nacht erfolgte eine Lagerung in 30 % Sucrose/PBS bei 4 °C. Im Anschluss an diese Entwässerung der Embryonen wurden drei bis sechs Embryonen in Plastikförmchen gegeben und die überstehende Sucroselösung vorsichtig entfernt. Die Embryonen wurden mit PolyFreeze (Tissue Freezing Medium) bedeckt und anschließend so ausgerichtet, dass die dorsale Seite nach oben zeigte und die Köpfe auf gleicher Höhe angeordnet waren, sodass beim Schneiden mit dem Kryostat möglichst alle Augen auf einer Linie lagen. Nachfolgend wurde das Förmchen auf einen Trockeneisblock gestellt und die Embryonen im PolyFreeze-Medium für 15 Minuten gefestigt. Bei -80 °C konnten die eingebetteten Embryonen anschließend bis zum Schneiden gelagert oder direkt mit dem Kryostat geschnitten werden. Dafür wurden die eingebetteten Embryonen für 30 Minuten im Kryostat (Microm HM500 OM, Deutschland) äquilibriert. Anschließend wurden Transversalschnitte von 12 µm Dicke gefertigt, wobei das Kryostat eine Temperatur von -26 °C und die Blöcke eine Temperatur von -14 °C aufwiesen. Die Schnitte, die auf SuperFrostPlus-Objektträgern (Menzel) angeordnet waren, wurden über Nacht bei 4 °C getrocknet und konnten anschließend für immunhistochemische Untersuchungen weiterverwendet werden.

3. Experimente und Ergebnisse

3.1 Isolierung der Midline1-cDNA von *Xenopus laevis*

Das *Xenopus laevis*-Midline1-Gen wurde über eine EST-Suche mittels der bekannten Sequenz von *Homo sapiens* in der GenBank identifiziert und von NIBB (National Institute for Basic Biology, Japan) bezogen (Acc.-No: BJ087663). Es deckt den gesamten kodierenden Bereich des Midline1-Gens ab. Mit T3- bzw. T7-Primern wurde der Klon ansequenziert und somit die Identität von Midline1 bestätigt.

Xenopus laevis Midline1 ORF 2007 Nukleotide, 669 Aminosäuren

```

1   ATGGAACACTGGAG TCTGAAC TACCTGCTGGAG CTGTTTGAAGATCCA CTGTTGCTGCCTTGC
1   M E T L E S E L T C P I C L E L F E D P L L L P C
76  GCTCACAGCCTGTGT TTTAACTGTGCACAT CGTATCCTTGTCTCC CACTGTGCCAACAAAC GAATCCGTAGAATCT
26  A H S L C F N C A H R I L V S H C A N N E S V E S
151 ATTAACGCCTTCCAG TGCCCCACCTGCCGT TATGTCATCACACTC AGCAAGCGTGGCTTA GAGGGGCTAAAGAGG
51  I N A F Q C P T C R Y V I T L S K R G L E G L K R
226 AACGTGACTTTGCGAG AACATCATTGACAGA TTTCAAAAAGCCTCA GTGAGCGGGCCCAAT TCTCTAGTGAACG
76  N V T L Q N I I D R F Q K A S V S G P N S P S E T
301 CGTCGAGAAGCTGTGCT TACGATACCCTAAC AGCATGCATCAAGC GAGAAAAGTACTCTGC CAGTCTGTGATCAG
101 R R E R A Y D T T N S M T S S E K V L C Q F C D Q
376 GACCAGGCAAGGGAG GCTGTGAAAACGTGT GTGACCTGTGAAGTT TCATATTGTGAGGAC TGTTTAAAAGCTACT
126 D Q A R E A V K T C V T C E V S Y C E D C L K A T
451 CACCCAAACAAGAAA CCATTCACTGGTCAC CGTCTAATTGAGCCC ATCCAGATTCTCAC ATAAGAGGGTTAATG
151 H P N K K P F T G H R L I E P I P D S H I R G L M
526 TGCCTGGAACATGAG GATGAAAAGTTAAT ATGTAAGTGTGACAG GATGATCAGCTAATC TGTGCCTTGTGTA
176 C L E H E D E K V N M Y C V T D D Q L I C A L C K
601 TTGGTTGGGAGGCAT CGAGATCATCAAGTG GCTGCCTTGGTGAC AGATACGACAACTA AAGCAAAGCCTGGAG
201 L V G R H R D H Q V A A L G D R Y D K L K Q S L E
676 AGCAACCTAACCAAC CTCATCAAAAAGGAAC ACAGAAATGGAAATG CTGTTGTCTAAGCTC ATTCAGACCTGCCAG
226 S N L T N L I K R N T E M E M L L S K L I Q T C Q
751 AAGGTGGAGGTTAAT GCATCAGACAAGAA GCAAAATTAATGGAG GAGAGTGACCAACTG ATTGAAATATTCAA
251 K V E V N A S R Q E A K L M E E S D Q L I E I I Q
826 CAGAGAAGACAACATA ATTGGAACAAAAATA AAAGAAGGAAAGGTT GTGAGGTTAAGAAA CTGGCCAGCAGGTT
276 Q R V R Q L I G T K I K E G K V V R L R K L A Q Q V
901 GCGAAGTGTAAACAG TGCATTGAGCGCTCC ACATCCCTAATCTCA CAGGCAGAACAGTCT CTAAGGAAAATGAT
301 A N C K Q C I E R S T S L I S Q A E Q S L K E N D
976 CATGCTCGCTTCCTT CAGTCAGCCAAGAAT ATCAGAGAAAGAGTT TCAATGGCAACAGCA TCCTCTCAAGTGCTT
326 H A R F L Q S A K N I T E R V S M A T A S S Q V L
1051 ATTCTGAAATCAAC CTAATGACACATTT GACAGCTTTGCATTG GATTTTCAAGAGAG AAGAGATGTTAGAA
351 I P E I N L N D T F D T F A L D F S R E K K M L E
1126 TGTCTTGATTCTGTG ACAGCACCAAAATCCC CCTATAATTAGAGAG GAACTCTGCACTGCT TCCTACGACACCATT
376 C L D Y L T A P N P P I I R E E L C T A S Y D T I
1201 ACTGTGCATTGGACA TCTGACGATGAGTTT AGTGTGGTTTCCTAT GAGCTACAGTATACC ATCTTCACTGGACAA
401 T V H W T S D D E F S V V S Y E L Q Y T I F T G Q
1276 GCTAATGTTTGTAGT TTTGTAACCTCAGCC GACAGCTGGATGATT GTTCCCAATATCAAA CAGAACCATTATACA
426 A N V V S L C N S A D S W M I V P N I K Q N H Y T
1351 GTTCATGGCCTCCAG AGTGGCACCAAGTAC ATCTTCATTGTTAAG GCCATAAACCCAGGCT GGAAGTCGCAACAGT
451 V H G L Q S G T K Y I F I V K A I N Q A G S R N S
1426 GAACCTGGCAAGCTA AAAACCAACAGTCAA CCGTTTAAATTAGAT CCCAAGTCTGCTCAC AGGAAACTTAAGTA
476 E P G K L K T N S Q P F K L D P K S A H R K L K V
1501 TCACATGACAACCTG ACTGTAGAGAGGGAC GAAACCTCTTCAAAA AAGAGCCACACACCA GAGCGTTTTACAAGC
501 S H D N L T V E R D E T S S K K S H T P E R F T S
1576 CAAGGAAGTTATGGT GTTGCTGGCAACGTG TTCTTGTACAGTGGC CGGCATTATTGGGAA GTGGTTATAAGCGGA
526 Q G S Y G V A G N V F L D S G R H Y W E V V I S G
1651 AGCACCTGGTATGCC ATTGGCATTGCCTAC AAATCAGCACCCAAAG CATGAGTGGATAGGA AAGAACACGGCCTCT
551 S T W Y A I G I A Y K E S A P K H E W I G K N T A S
1726 TGGGTGTTTTGCCGT TGTAACAACAACCTGG GCTGTAAGACACAAC AGTAAAGAGATTCTCT ATAGGCCATCACCG
576 W V F C R C N N N W A V R H N S K E I P I E P S P
1801 CATCTCCGCCGCGTA GGGATCTGTGGGAC TACGACAATGGTTCA TTGTCTTTTATGAT GCTTTGAACTCCATT
601 H L R R V G I L L D Y D N G S L S F Y D A L N S I
1876 CACCTTACACTTTT GACATTGCTTTTGTCA CAACCTGTGTGCCCA ACCTCACCGTGTGG AATAAGTGTGTTGACA
626 H L Y T F D I A F A Q P V C P T L T V W N K C L T
1951 ATTTTAACAGTCTCT CCCATCCGGATCAC TTGGATGCCTAGAG CAGTAGCATATA
651 I L T G L P I P D H L D C L E Q L A *

```

Abb. 7 vollständige Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von *Xenopus laevis*-Midline1. M (grün) Start-Codon, * (rot) Stop-Codon

Die vollständige Sequenzierung des Klons ergab ein zusätzliches Insert von 103 bp Länge, was jedoch keine Auswirkungen auf das Primerdesign der RT-PCR sowie auf die Sondenerstellung der „whole mount“ *in situ* Hybridisierung hatte. Da das Insert aber zu einer Unterbrechung des Leserahmens führte, wurde zur Lipofektion der kodierende Bereich des *Xenopus tropicalis* Midline1-Gens in einem pCS2plus-Vektor verwendet. In Abbildung 7 sind die Nuklotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz von *Xenopus laevis*-Midline1 ohne das Insert dargestellt.

3.2 Vergleich der Midline1-Sequenz in Vertebraten

Der Vergleich der Midline1-Aminosäuresequenz von *Xenopus tropicalis* mit *Xenopus laevis* und anderen Vertebraten wie, *Homo sapiens*, *Bos primigenius taurus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* und *Gallus gallus domesticus* wurde erstellt, um eine Aussage über den Grad der Konservierung zwischen verschiedenen Spezies zu treffen (siehe Abb. 8). Eine hohe Übereinstimmung spricht auch für funktionell verwandte Proteine. NCBI BLAST ermöglichte es, den Anteil von identischen zu nicht identischen Aminosäuren zu bestimmen. Die cDNA von *Xenopus laevis* Midline1 kodiert für ein putativ 72 kDa großes Protein aus 669 Aminosäuren. Auf Ebene der Aminosäuresequenz liegt die Übereinstimmung von *Xenopus laevis*-Midline1 und *Xenopus tropicalis*-Midline1 bei 99 %. Beim Vergleich der *Xenopus laevis* mit der menschlichen Midline1-Aminosäuresequenz zeigte sich ebenfalls, dass nur sehr wenige Aminosäuren ausgetauscht wurden und die Sequenzen zu 93 % identisch sind. Die Betrachtung der Midline1-Aminosäuresequenz anderer Vertebraten ergab einen ähnlich hohen Anteil an Gemeinsamkeiten (≥ 90 %), sodass von einem evolutionär stark konservierten Protein ausgegangen werden kann. Innerhalb der Aminosäuresequenz wurde eine Suche nach speziellen Domänen durchgeführt, die charakteristisch für das Midline1-Gen sind. Das Midline1-Protein umfasst sechs Domänen, die in Abbildung 8 farblich unterlegt sind. Diese folgen dem RBCC-Motiv und gehören somit der RBCC-Untergruppe der RING-Finger-Proteine an. Dem N-Terminus folgt eine RING-Finger-Domäne (AS-Position 10-59), zwei B-Boxen (AS-Position 115-165 und 171-213) und eine Coiled-coil-Domäne (BBC-Domäne, AS-Position 220-346). Hieran schließt sich eine Fibronectin-Typ-III-Domäne (AS-Position 383-473) und eine PRY-SPRY-Domäne (AS-Position 484-528 und 539-659), auch bekannt als B-Box 30.2 am C-Terminus an. All diese Midline1-Domänen wurden in den untersuchten Vertebraten höchstkonserviert.

relativ gleich stark und unbeeinflusst von den meisten experimentellen Konditionen, Zellstadien und Zelltypen exprimiert werden. Für die RT-PCR wurden spezifische Midline1- bzw. Midline2-Primer verwendet (siehe Tabelle 7). Das Primer-Paar wurde so ausgewählt, dass ein Intronbereich überspannt wurde, der ausreichend groß war, um unter den gewählten PCR-Bedingungen nicht amplifiziert werden zu können. Diese Technik verhindert die Amplifikation genomischer DNA, die als Kontamination der cDNA auftreten könnte. Im Falle einer Kontamination wäre das PCR-Produkt länger als gewünscht oder würde vollständig fehlen. Es konnte so sichergestellt werden, dass nur cDNA amplifiziert wurde und keine genomischen Kopien des Gens. Die Primer wurden erstellt, indem zunächst die *Xenopus tropicalis*-Sequenz für Midline1 aus Xenbase.org in NCBI Blast übertragen wurde, um ein Exon-Intron-Muster zu erstellen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass aufgrund des hohen Konservierungsgrades zwischen *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* das entsprechende Gen und somit die Exon-Intron-Muster identisch sind. Die Primer wurden anschließend mit einer Größe von 20 Basenpaaren mithilfe des Programms Primer3 konstruiert und über die Firma Sigma bezogen. Die Primer lagerten sich bei einem Schmelzpunkt von ca 60 °C an und lieferten ein PCR-Produkt von 320 bp. Um optimale Amplifikationsbedingungen der entsprechenden Primer zu erreichen, wurde zunächst die geeignete Zyklenzahl für jedes Primer-Paar experimentell ermittelt. Generell verläuft die Vermehrung gesuchter DNA-Sequenzen während einer PCR zunächst nahezu exponentiell, bei hohen Amplifikationszyklen tritt dagegen eine Sättigungsphase durch Verbrauch der Reaktionskomponenten ein. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde daher die Zyklenzahl so angepasst, dass ein Bereich exponentieller Amplifikation erfasst wurde. Dabei ergab die Analyse der jeweiligen Amplifikationsprodukte, dass für Midline1 bei 26 Zyklen, für Midline2 bei 32 Zyklen und für ODC1 bei 25 Zyklen eine im Agarosegel gerade gut sichtbare Bande erzielt werden konnte, die noch in dem jeweils exponentiellen Bereich der Reaktion lag und daher eine semi-quantitative Aussage über die Transkriptmengen erzielt werden konnte. Der Vergleich der Bandenintensitäten im Agarosegel lieferte einen Hinweis für die relativen Mengen an Midline1- bzw. Midline2-cDNA und somit für die Transkriptmengen in der gesamten Probe des dazugehörigen Stadiums. Die Bandenintensität für ODC1 war für alle Stadien gleich stark, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass gleiche Ausgangsmengen von RNA eingesetzt wurden. In der Negativkontrolle, die statt RNA destilliertes H₂O enthielt, war keine Kontamination durch Fremd-DNA erkennbar.

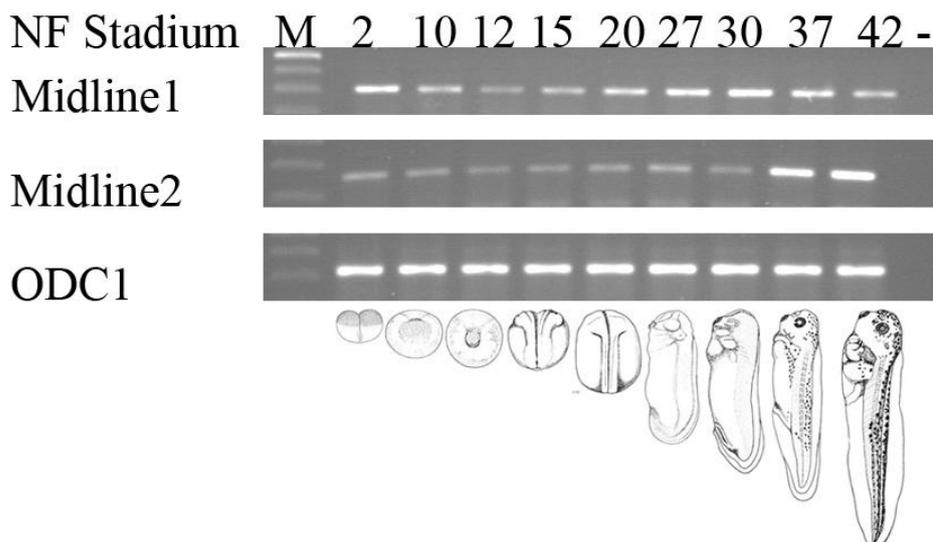


Abb. 9: Die zeitliche Expression von Midline1, Midline2 und ODC1 in *Xenopus laevis* während der Embryonalentwicklung. Untersuchung anhand einer semi-quantitativen RT-PCR auf Gesamt-RNA-Präparationen von *Xenopus laevis*-Embryonen mit anschließender Auftrennung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel. Die oben befindlichen Zahlen geben die Embryonalstadien nach Niewkoop und Faber [1] wieder. Ganz rechts mit (-) markiert befinden sich die Negativkontrollen ohne Anzeichen einer Kontamination durch Fremd-DNA. ODC1-mRNA, diente als RNA-Ladekontrolle und wies einheitliche Bandenintensitäten auf. Für die PCR von Midline1 wurde eine Zyklenzahl von 26, für Midline2 von 32 und für ODC1 von 25 verwendet. Folgende Oligonukleotide wurden eingesetzt: XI-Midline1-RT-F77, XI-Midline1-RT-R396, XI-Midline2-RT-F300, XI-Midline2-RT-R560, XI-ODC-RT-R, XI-ODC-RT-F. Produktgröße: 320 bp (Midline1), 260 bp (Midline2), 220 bp (ODC). Zur Bestimmung der Bandengröße des PCR-Produktes wurde ein 100 bp-Marker (O'GeneRuler™, Fermentas) verwendet (M).

Das Midline1-Gen konnte in allen untersuchten Entwicklungsstadien nachgewiesen werden mit Unterschieden in der Expression im Verlauf der Entwicklung (siehe Abb. 9). Die frühe Expression aller untersuchten Gene im NF-Stadium 2 weist auf eine maternale Expression hin, da eine rein von der Zygote selbst ausgehende Expression in *Xenopus*-Embryonen erst ab dem Blastulastadium (NF-Stadium 8) vorliegt. Vermutlich infolge des Abbaus maternalen Midline1-Transkripte kommt es in den folgenden untersuchten Stadien zu einem leichten Absinken des Expressionsniveaus. Am Ende der Gastrulation, im NF-Stadium 12, erreicht das Expressionsniveau seinen geringsten Stand. Ob es sich hierbei um eine komplette Degradation mit neu einsetzender Expression oder den unvollständigen Abbau noch vorhandener Transkripte handelt, kann nicht festgelegt werden. Im Zuge der Neurulation (NF-Stadium 15) kommt es zum Anstieg des Expressionsniveaus, der sich bis ins Kaulquappenstadium fortsetzt (NF-Stadium 42), wobei in diesem Stadium eine

geringfügige Minderung der Expression zu beobachten ist. Das dynamische Verhalten der Midline1-Expression während der Embryonalentwicklung lässt vermuten, dass das Midline1-Gen einer zeitlichen Expressionsregulation unterliegt. Midline2 wurde ebenfalls in der frühen Embryogenese exprimiert, wobei die Expression wesentlich schwächer ausfiel, denn die minimale Zyklenzahl zur Detektion im Agarosegel betrug hier 32 Zyklen im Vergleich zu 26 Zyklen bei Midline1. Erst zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung (NF-Stadium 37) war ein stärkerer Anstieg der Midline2-Transkriptmenge zu verzeichnen.

3.3.2 Die Expression von Midline1 in adulten Geweben von *Xenopus laevis* und *Homo sapiens*

Eine RT-PCR auf RNA-Präparationen adulter humaner und *Xenopus laevis*-Gewebe wurde mit einer optimierten Zyklenzahl von 28 (für XI-Gewebe) und 29 (für Hs-Gewebe) durchgeführt, um die Expression von Midline1 in unterschiedlichen Geweben in beiden Spezies zu belegen (siehe Abb. 10).

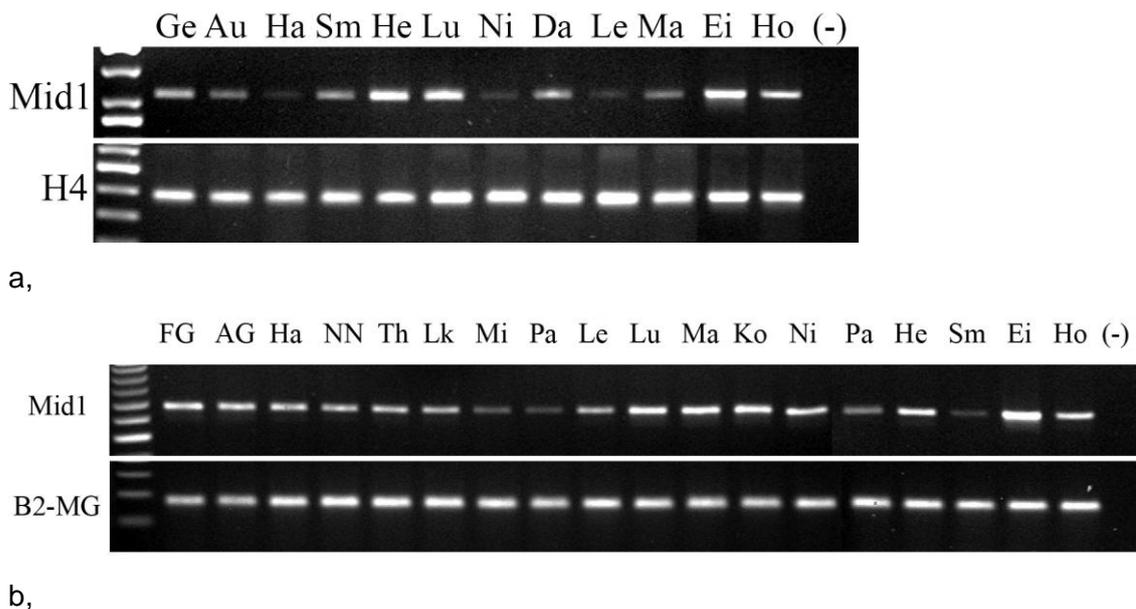


Abb. 10: Darstellung der Midline1-Expression adulter Gewebe von (a) *Xenopus laevis* und (b) *Homo sapiens* Als Kontrolle diente Histon H4 (a) bzw. β 2-Mikroglobulin (B2MG) (b). Die Negativkontrolle (H_2O), mit (-) gekennzeichnet, bestätigte, dass keine Kontamination durch Fremd-DNA auftrat. Eine Expression von Midline1 wurde in allen Geweben nachgewiesen. Für die RT-PCR von Midline1 wurde eine Zyklenzahl von 28 für *Xenopus laevis*-RNA und 29 für humane RNA gewählt. Für H4 wurde eine Zyklenzahl von 28, für B2MG von 30 verwendet. Folgende Oligonukleotide wurden eingesetzt: XI-Midline1-RT-1409-F, XI-Midline1-RT-1721-R, H4-RT-R, H4-RT-F, Hs-Midline1-RT-1825-F, Hs-Midline1-RT-2111-R, Beta-2-Mikroglobulin-RT-F, Beta-2-Mikroglobulin-RT-R, Produktgröße: 320 bp (Midline1), 90 bp B2MG, 200 bp H4. Zur

Analyse der PCR-Produktgröße wurde ein 50 bp-Marker (O'GeneRuler™, Fermentas) verwendet (links im Bild).

a, von links nach rechts Ge, Gehirn; Au, Auge; Ha, Haut; Sm, Skelettmuskel; He, Herz; Lu, Lunge; Ni, Niere; Da, Darm; Le, Leber; Ma, Magen; Ei, Eierstock; Ho, Hoden

b, von links nach rechts: FG, fetales Gehirn; AG, adultes Gehirn; Ha, Haut; NN, Nebenniere; Th, Thymus; Lk, Lymphknoten; Mi, Milz; Pa, Pankreas; Le, Leber; Lu, Lunge; Ma, Magen; Ko, Kolon; Ni, Niere; Pa, Parotis; He, Herz; Sm, Skelettmuskel; Ei, Eierstock; Ho, Hoden

Als Referenzgen diente zum einem Histon H4 bei der Analyse von *Xenopus laevis*-Gewebe zum anderen β 2-Mikroglobulin (B2MG) für humanes Gewebe. Die starke Expression von Midline1 im Ovar von *Xenopus laevis* bestätigt die maternale Komponente in der frühen Embryonalentwicklung. Insgesamt gibt das Expressionsprofil von Midline1 Hinweise auf eine ubiquitäre Expression dieses Gens sowohl in *Xenopus laevis*, als auch in menschlichen Geweben. Eine Expression ließ sich in allen untersuchten Geweben nachweisen, wobei die Menge an Transkripten des Midline1-Gens von einem Organ zum anderen variierte.

3.3.3 Charakterisierung der Midline1-Expression im Verlauf der embryonalen Augenentwicklung im Vergleich zu Pax6 und Pax2

Um die räumliche Expression von Midline1 in der frühen Embryogenese zu analysieren, wurden „whole-mount“ *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Diese Methode weist die Expression eines Gens in Bezug zum gesamten Embryo nach. Ein Vergleich mit der Expression zweier fundamentaler Augenmarkergene Pax6 und Pax2 (siehe Abschnitt 1.5) wurde durchgeführt, um die Expression von Midline1 im Zusammenhang dieser beiden Gene zu analysieren und so aufgrund gleicher Expressionsdomänen einen ersten Hinweis auf mögliche Interaktionen zu erhalten.

Schon am Ende der Neurulation, nach erfolgter Auftrennung des Augenfelds im NF-Stadium 20, war eine starke Expression von Midline1 in beiden lateralen Augenanlagen, ähnlich der Pax6-Expression, ersichtlich sowie eine Midline1-Expression in weiteren epithelialen Organen wie der Haftdrüse und den epithelialisierten Somiten (Abb. 11 A, F). Im Stadium 23 kommen die Augenbläschen, die zuvor beidseitig aus dem prospektiven Diencephalons evaginiert sind, mit dem Oberflächenektoderm in Kontakt. Im Gegensatz zu Pax2, dessen Expression auf die ventralen Anteile des Augenbläschens beschränkt blieb (Abb. 11 K, L), zeigten sowohl Midline1 als auch Pax6 eine starke Expression im gesamten Augenbläschen (Abb. 11 B, G). Eine schwache Expression von Midline1 war in der Ohranlage sichtbar.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung (NF-Stadium 28) beginnt sich das Augenbläschen durch induktive Vorgänge in den Augenbecher umzuwandeln und nimmt die Linse auf. Midline1-Expressionsdomänen waren in diesem Entwicklungsstadium in den Branchialbögen und im Augenbecher erkennbar (Abb. 11 C, Q). Die Pax6-Expression zeigte sich homogen im gesamten Augenbecher (Abb. 11 H, W). Pax2 wurde weiterhin im ventralen Anteil der Retina und im Augienstiel exprimiert (Abb. 11 M, U, schwarzer Pfeil). In den Ohrvesikeln wurden sowohl Midline1 als auch Pax2 exprimiert.

Im Stadium 33 ist die Linse gut von der Retina zu unterscheiden, deren beide Blätter - das retinale Pigmentepithel sowie die neurale Retina - sich komplett aneinander gelagert haben. Der zukünftige Sehnerv verläuft im Augenbecherstiel. In diesem Stadium wurde eine stärkere Midline1-Expression in den ventralen Anteilen der Retina und dem Augienstiel ähnlich der Pax2-Expression (Abb. 11 D, N, R, schwarzer Pfeil) beobachtet. Midline1-Transkripte fanden sich weiterhin in den Kiemenbögen, aber auch in Anteilen des Mittel- und Hinterhirns (Abb. 11 D). Anhand von Transversalschnitten im NF-Stadium 38 wurde die Pax6-Expression in der neuralen Retina und dem Linseneithel (Abb 11 X, schwarzer Pfeil) deutlich. Im Gegensatz dazu wurde Midline1 ebenso in der neuralen Retina, jedoch nicht im Linseneithel exprimiert. Eine starke Expression war dagegen in der optischen Papille sichtbar, die aus der Verschmelzung beider Augenbecherkanten als kreisförmige Struktur entstanden war (Abb. 11 S). Das nahezu vollständig entwickelte Auge im NF-Stadium 41 zeigt eine Retina, in der sich die einzelnen Schichten vollständig differenziert haben. Die ventrale Expression von Midline1 im Auge war zurückgegangen. Es fanden sich wenige Transkripte im Bereich der inneren Kernschicht der Retina, die besonders Zellkerne der amakrinen Zellen und Bipolarzellen enthält (Abb. 11 T). Bei Betrachtung des Transversalschnitts der Pax6-Expression (Abb. 11 Y) fiel eine stärkere Expression im gleichen Areal auf. Dagegen konzentrierte sich die Pax2-Expression hauptsächlich auf den optischen Nerv und die optische Papille (Abb. 11 O, V). Weitere Midline1-Expressionsdomänen ließen sich in Stomodeum, Gehirn, Ohr und Herz nachweisen (Abb. 11 E). Die vergleichende Analyse der Expression von Midline1, Pax6 und Pax2 zeigte, dass Midline1 bereits in frühen Stadien der Entwicklung exprimiert wurde und eine sehr dynamische Expression während der Augenentwicklung vollzog, die sowohl Charakteristika des Pax6- als auch des Pax2-Expressionsmodells vereinte. Eine Interaktion zwischen diesen Transkriptionsfaktoren und der Ubiquitin-Ligase erscheint daher möglich.

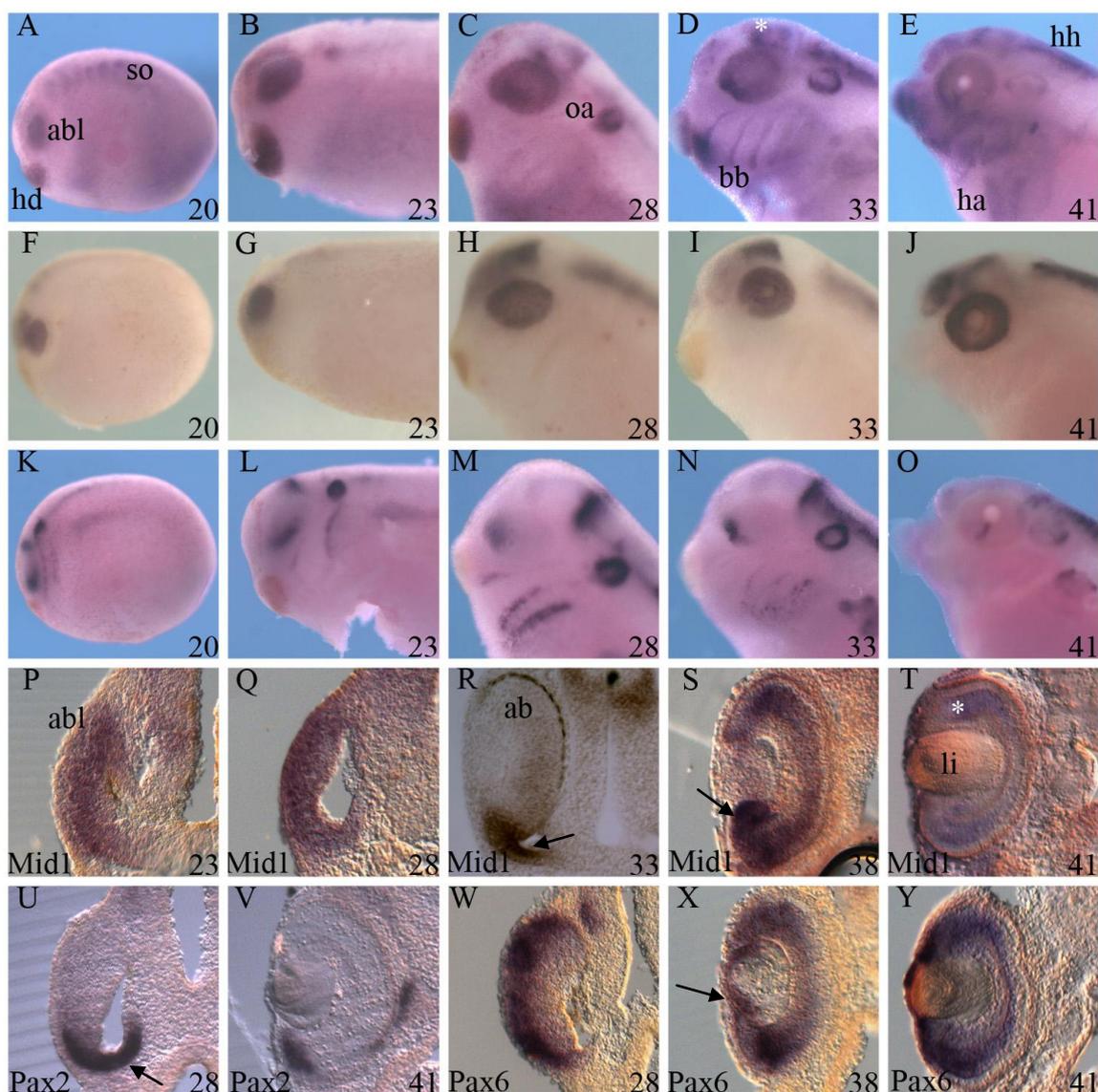


Abb. 11: Räumliche und zeitliche Expression von Midline1, Pax6 und Pax2.

WMISH auf *Xenopus laevis*-Embryonen in den angegebenen Entwicklungsstadien nach NF (Stadienangabe rechts unten in jedem Bild). Vergleichende Expression von Midline1 (A-E: Abl, Augenbläschen; bb Branchialbögen; ha, Herzanlage; hd, Haftdrüse; hh Hinterhirn; oa, Ohranlage; so, Somiten. Das * im Bild D kennzeichnet das Mittelhirn) mit Pax6 (F-J) und Pax2 (K-O) im Verlauf der Entwicklung. P-Y Transversalschnitte der Embryonen auf Höhe der Augenanlagen. P-T Transversalschnitte nach WMISH mit einer Sonde gegen Midline1 (Ab, Augenbecher; abl, Augenbläschen; li, Linse). Im Bild R sieht man eine deutliche Midline1-Expression im Augenstiel (schwarzer Pfeil). Im Bild S weist der Pfeil auf die Expression in der optischen Papille. Das * im Bild T markiert die Expression in der inneren nukleären Schicht der Retina. U und V zeigen die Expression von Pax2 auf Transversalschnitten. Der schwarze Pfeil in U weist auf die Expression von Pax2 im Augenstiel hin. W-Y Darstellung der Pax6-Expression auf Transversalschnitten. Pax6-Transkripte finden sich auch im Linsenepithel (schwarzer Pfeil in X).

3.4 Funktionsverluststudien

Eine Methode, um Funktionen eines Gens *in vivo* zu analysieren, bietet die Funktionsverluststudie. Zur Anwendung kommen dabei Morpholino-Antisense-Oligonukleotide (sog. Morpholinos), die sich durch ihre Morpholino-Gruppe von natürlichen Nukleotiden unterscheiden. Die Morpholinos werden als Nukleinsäure-Analoga komplementär zur Translationsinitiationsstelle gestaltet und bilden mit der entsprechenden mRNA des zu untersuchenden Gens ein kurzes Doppelstranghybrid, das einer Translation an den Ribosomen nicht mehr zugänglich ist. Die Proteinsynthese des betroffenen Transkripts wird somit verhindert. Die Morpholinos besitzen eine vergleichsweise hohe Stabilität und lange Halbwertszeit, weil sie keine Substrate von Nukleasen sind. So konnte in GFP-transgenen *Xenopus tropicalis*-Embryonen gezeigt werden, dass mithilfe weniger Nanogramm der entsprechenden Morpholinos eine vollständige Unterbindung der Proteinsynthese bis in späte Stadien (St. 40 nach NF) möglich ist [71]. Die Mikroinjektion erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.7 beschrieben.

3.4.1 Analyse des Midline1-Knockdown-Phänotyps anhand des Transkriptionsfaktors Pax6

Aufgrund der sich überlappenden Expressionsdomänen von Midline1 und Pax6 wurde ausgehend von der Arbeitshypothese, dass Pax6 von Midline1 zum Abbau markiert wird, die Pax6-Expression nach Midline1-Suppression untersucht. Eine Veränderung des Expressionsprofils von Pax6 könnte dabei auf eine mögliche Interaktion dieser Proteine hindeuten.

Die phänotypischen Veränderungen wurden mithilfe einer WMISH gegen Pax6 auf einseitig mit Midline1-MO injizierten *Xenopus laevis*-Embryonen mit anschließender Anfertigung histologischer Schnitte dargestellt. Embryonen im NF-Stadium 28 wiesen nach Midline1-Funktionsverlust ein morphologisch verändertes Augenbläschen auf, das stark vergrößert und nach außen gewölbt war (Abb. 12 A, A'). Auf dem Transversalschnitt der Augenregion auf Höhe des späteren Vorderhirns (Prosencephalon) war eine Verlängerung und Kaudalisierung des optischen Stiels auffällig. Das prospektive Vorderhirn auf der Seite des Midline1-Funktionsverlustes war deutlich verbreitert (Pfeil, Abb. 12 C). Im NF-Stadium 36 war die Vorwölbung des Auges weniger stark ausgeprägt (Abb. 12 B'), jedoch zeigte sich immer noch eine

Vergrößerung des Auges im Vergleich zur Kontrollseite (Klammern, Abb. 12 D, D'). Es fiel auf, dass die Retina im Vergleich zur normalen Seite verwaschen erschien (Abb. 12 B und B', Pfeil). Die histologischen Transversalschnitte von Embryonen im NF-Stadium 36 wiesen auf der Midline1-MO injizierten Seite ebenfalls eine Veränderung des morphologischen Aufbaus der Retina auf, die durch eine Faltenbildung im Augenbecher gekennzeichnet war (weißer Pfeil, Abb. 12 D). Auf der betroffenen Seite waren die äußere und innere Schicht der neuralen Retina nicht mehr voneinander abgrenzbar und die Pax6-Expression schloss beide Anteile ein. Ebenfalls auffällig war eine Verkleinerung der Linse (schwarzer Pfeil, Abb. 12 D). Die Kontrollseite war von diesen Veränderungen nicht betroffen.

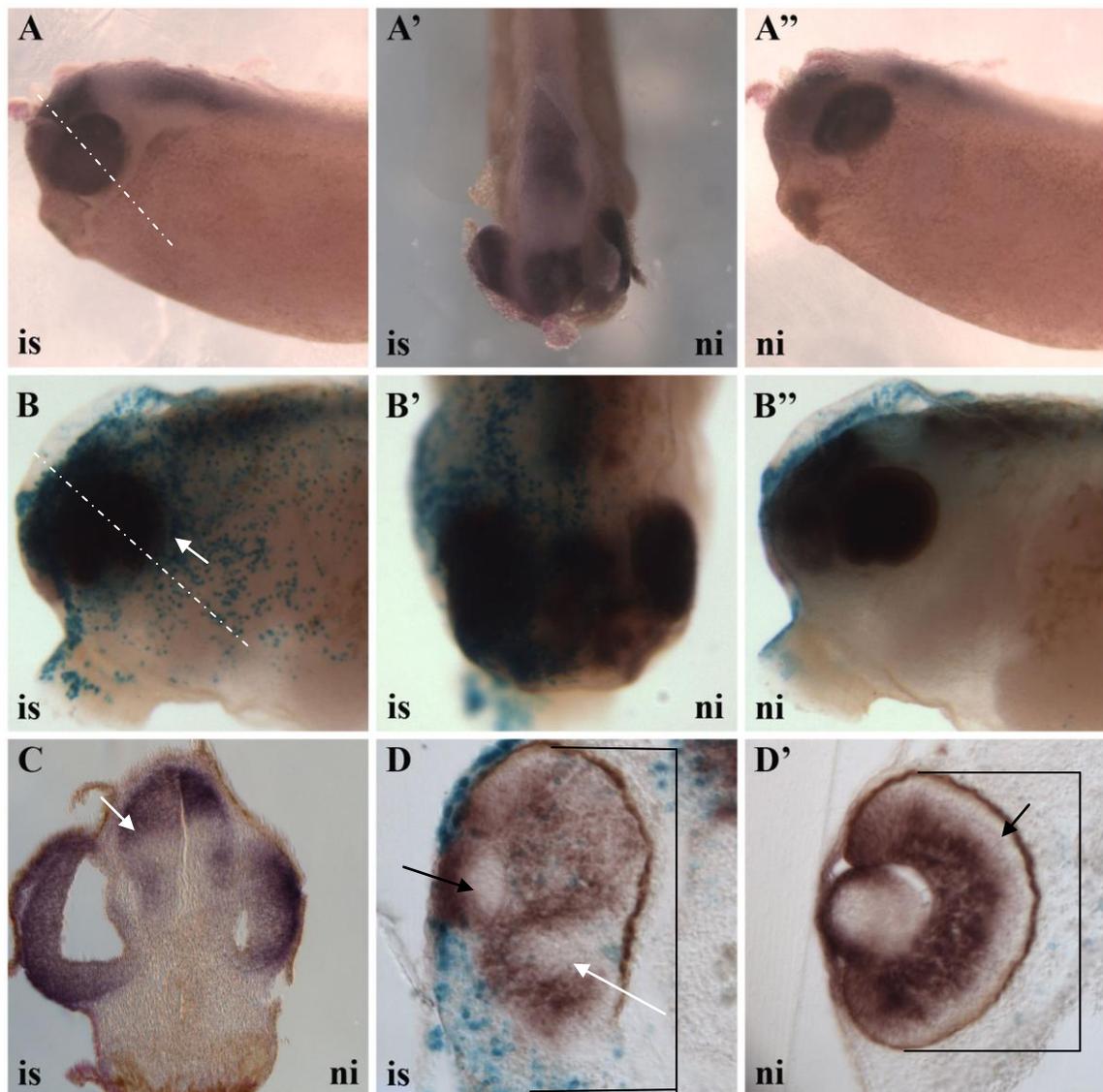


Abb. 12: Veränderungen von Morphologie und Pax6-Expression nach Midline1-Knockdown. Unilaterale Injektion von 2,5 pmol Midline1-MO in eine von zwei Blastomeren und anschließende WMISH mit einer Pax6-Sonde. (A, A', A'') *Xenopus laevis*-Embryo im NF-Stadium 28 nach Mikroinjektion. Laterale Ansicht (A, A'') und dorsale Ansicht (A'). Auf der injizierten Seite (is) zeigt sich ein vergrößertes, balloniertes Augenbläschen; ni, nicht injizierte Seite. (B, B', B'') *Xenopus laevis*-Embryo im NF-Stadium 36 nach Mikroinjektion. Laterale Ansicht (B, B'') und dorsale Ansicht (B'). Das Auge der betroffenen Seite ist vergrößert. Die Randbegrenzung der Pax6-Expression erscheint verwaschen. (C) Transversalschnitt auf Höhe der gestrichelten Linie von A (gleicher Embryo). Das Augenbläschen ist stark vergrößert und vermehrt nach außen gewölbt. Die Region des zukünftigen Vorderhirns ist ebenfalls vergrößert (Pfeil). (D und D') Transversalschnitt auf Höhe der gestrichelten Linie von B (gleicher Embryo). Das Auge der injizierten Seite (D) ist im Vergleich zur Kontrollseite (D') vergrößert (eckige Klammern), zeigt eine Faltenbildung der Retina (weißer Pfeil) sowie eine verkleinerte Linse (schwarzer Pfeil). Auf der Kontrollseite (D') ist der Aufbau einer normalen Retina mit abgrenzbaren Schichten zu sehen.

3.4.2 Anstieg Pax6-positiver Zellen durch Midline1-Knockdown

Zur Untersuchung einer möglichen Auswirkung der Midline1-MO-Injektion auf den Anteil retinaler Zellen, die Pax6-Protein enthalten, wurden immunhistologische Markierungen mit einem polyklonalen Pax6-Antikörper auf Kryoschnitten der entsprechenden Embryonen in den NF-Stadien 36 (Abb. 13 A, A') und 42 (Abb. 13 B, B') durchgeführt. In der Retina findet sich eine Pax6-Expression in der ziliaren marginalen Zone (CMZ) der Retina, wo sich undifferenzierte Vorläuferzellen befinden, die während der Embryonalentwicklung fortlaufend proliferieren und neue Neurone und Gliazellen hervorbringen [72]. Weiterhin wird Pax6 im inneren Anteil der inneren nukleären Schicht und in der Ganglienzellschicht exprimiert [73]. Die entsprechend markierten Zellen der inneren nukleären Schicht (INS) sowie der Ganglienzellschicht fanden sich sowohl in der Kontrollseite (Abb. 13 A, B) als auch in der experimentellen Seite (Abb. 13 A', B'). Nach dem Midline1-Knockdown war sowohl im NF-Stadium 36 als auch 42 eine Erweiterung der Pax6-Domäne über den inneren Anteil der INS hinaus auffällig (Abb. 13 B', weißer Pfeil). Die Anordnung der Pax6-exprimierenden Zellen wirkte im Vergleich zur Kontrollseite unregelmäßig und folgte der Faltenbildung. Im Verlauf der Entwicklung wurde beobachtet, dass die Anzahl Pax6-positiver Zellen in der Kontrollseite von durchschnittlich 43 Zellen pro Schnitt und Embryo im NF-Stadium 36 auf 67 Zellen im NF-Stadium 42 anstieg. Ein Funktionsausfall von Midline1 führte bereits im Stadium 36 zu einer deutlich erhöhten Anzahl Pax6-positiver Zellen, deren Anteil sich bis zum Stadium 42 mit durchschnittlich 130 Zellen pro Embryo sogar verdoppelte (Abb. 13 E). Aufgrund einer signifikanten Größenzunahme der Retina in der experimentellen Gruppe nach Midline1-Morpholinoinjektion (siehe auch Abschnitt 3.4.3) wurde das Verhältnis Pax6-positiver Zellen pro Fläche zur Kontrollseite des jeweiligen Stadiums normalisiert (Abb. 13 C und D), dabei ergab sich ebenfalls ein tendentieller Anstieg. Dies weist auf eine mögliche Zunahme Pax6-positiver Zellen unabhängig von einer Größen- und damit auch Zellzunahme in der Retina durch einen Midline1-Knockdown hin. Aufgrund der geringen Zahl an Beobachtungen und der daraus entstehenden geringen Aussagekraft von statistischen Tests wurde von einem T-Test in diesem Versuch abgesehen. Dennoch geben diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass ein Funktionsverlust von Midline1 zu einem Anstieg Pax6-positiver Zellen in der Retina führt.

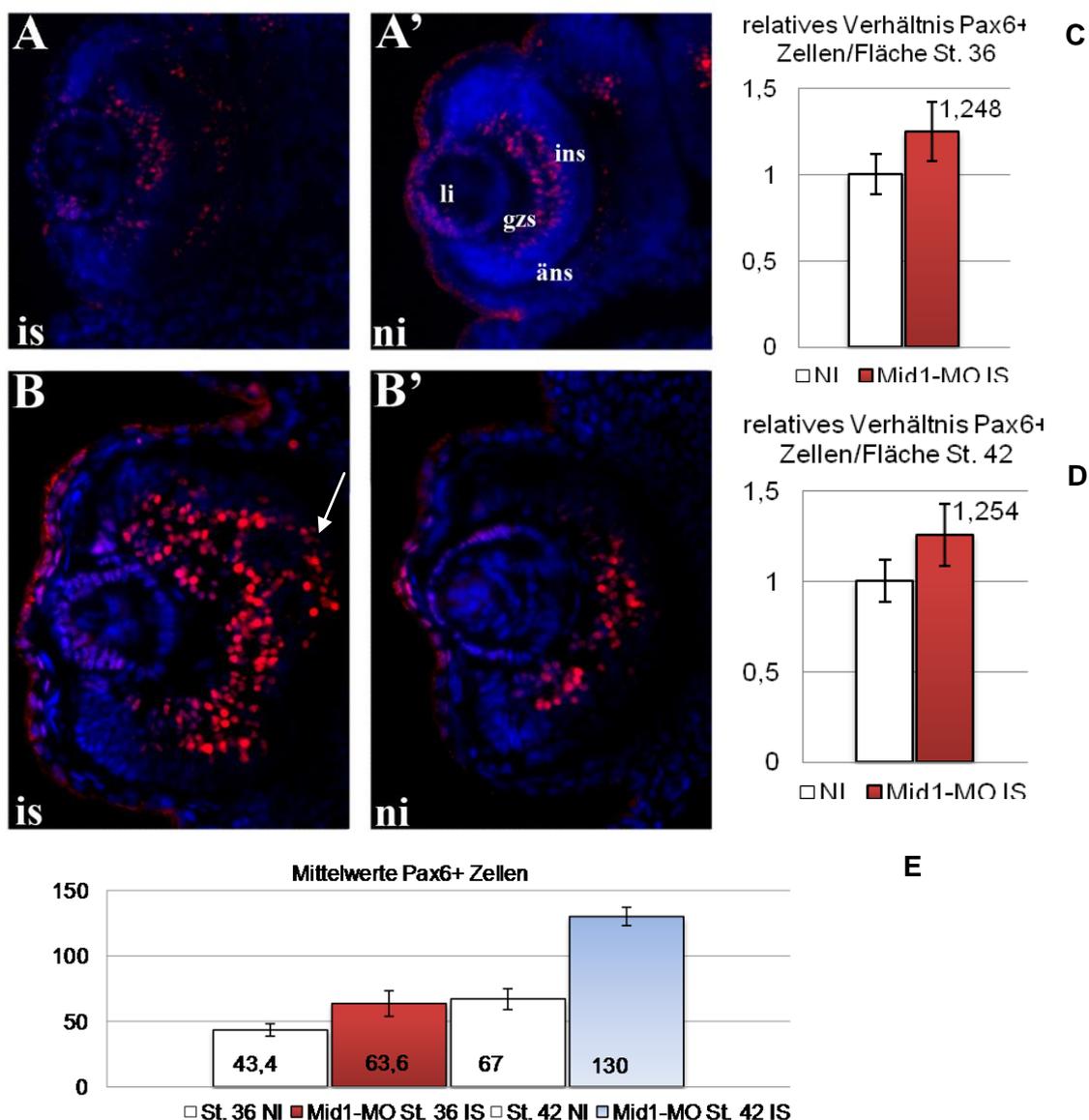


Abb. 13: (A-B') Veränderung der Anzahl Pax6-exprimierender Zellen der Augenregion nach Midline1-Knockdown. Transversalschnitte der Retinae nach Pax6-Immunfluoreszenzfärbung. Pax6-positive Zellen emittieren rotes Licht unter dem Fluoreszenzmikroskop. **(A und A')** NF-Stadium 36. (A') Midline1-MO injizierte Seite (is) mit erhöhter Anzahl Pax6-positiver Zellen. (A) nicht injizierte Kontrollseite (ni). **(B und B')** NF-Stadium 42. (B') Die typische räumliche Anordnung der Pax6-exprimierenden Zellen ist durch den Midline1-Knockdown aufgehoben. Es finden sich Pax6-positive Zellen außerhalb der INS (weißer Pfeil). (B) Kontrollseite mit normaler Stratifikation der Retina. Abkürzungen: äns, äußere nukleäre Schicht; ins, innere nukleäre Schicht; gzs, Ganglienzellschicht; li, Linse.

(C und D) Balkendiagramme, relatives Verhältnis Pax6-positiver Zellen pro Fläche von Midline1-Mo injizierter Seite (Mid1-MO IS) normalisiert zur nicht-injizierten (NI) Kontrollseite im Stadium 36 (C) und 42 (D) und **(E) Balkendiagramm, Mittelwerte Pax6-positiver Zellen pro Retina** von Midline1-MO injizierter Seite und nicht injizierter Kontrollseite von *Xenopus laevis*-Embryonen der NF-Stadien 36 (n=7) und 42 (n=2). Die Fehlerbalken geben die Streuung der Werte um die Mittelwerte an.

3.4.3 Signifikante Vergrößerung des Augenbeckers durch Midline1-Knockdown

Die Injektion von 2,5 pmol Midline1-MO in eine von zwei Blastomeren führte bereits makroskopisch zu einer morphologischen Veränderung des betroffenen Auges. Es zeigte sich eine deutliche Vergrößerung des betroffenen Augenbeckers (siehe auch Abb 12 A, A'). Die histologischen Schnitte der *Xenopus laevis*-Embryonen wurden hinsichtlich ihrer Augenbecherlängsdurchmesser ausgewertet. Die injizierte Seite entwickelte im Vergleich zur Kontrollseite stark hyperplastische Augenstrukturen, die am 1%-Level signifikant (T-Test, $p < 0,01$) gegenüber der nicht injizierten Seite vergrößert waren (siehe Abb. 14).

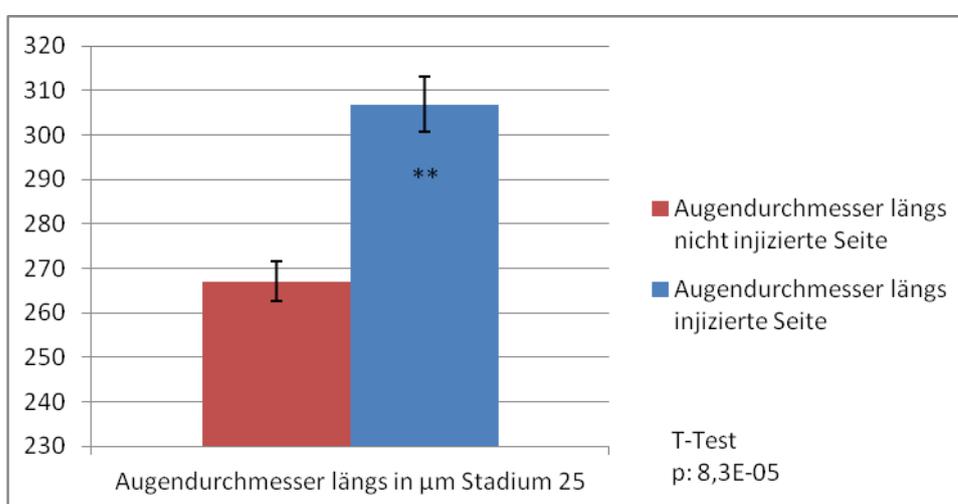


Abb. 14: Balkendiagramm, Vergleich der Augenbecherlängsdurchmesser von nicht injizierter zu injizierter Seite einseitig Midline1-MO injizierter Embryonen im NF-Stadium 25 (n=9). Die Fehlerbalken geben die Streuung der Werte um die Mittelwerte wieder. Der Größenunterschied ist am 1%-Level signifikant (**).

3.5 Untersuchung zur zellautonomen Funktion von Midline1 in der Retina

In diesem Experiment sollte untersucht werden, inwieweit Midline1 eine zellautonome Funktion bei der Differenzierung retinaler Vorläuferzellen ausübt. Dazu wurden *Xenopus tropicalis*-Midline1 und *Homo sapiens*-Midline1 mittels *in vivo* Lipofektion in der sich entwickelnden Retina überexprimiert. Die Analyse erfolgte anhand von Kryoschnitten im NF-Stadium 41, indem die GFP-positiven Zellen anhand ihrer Zellmorphologie den jeweiligem retinalen Zelltyp zugeordnet und in der Zentralretina ausgezählt wurden. Als Normalkontrolle dienten Embryonen, die allein mit GFP lipofektiert wurden.

Prozentualer Anteil der verschiedenen retinalen Zelltypen

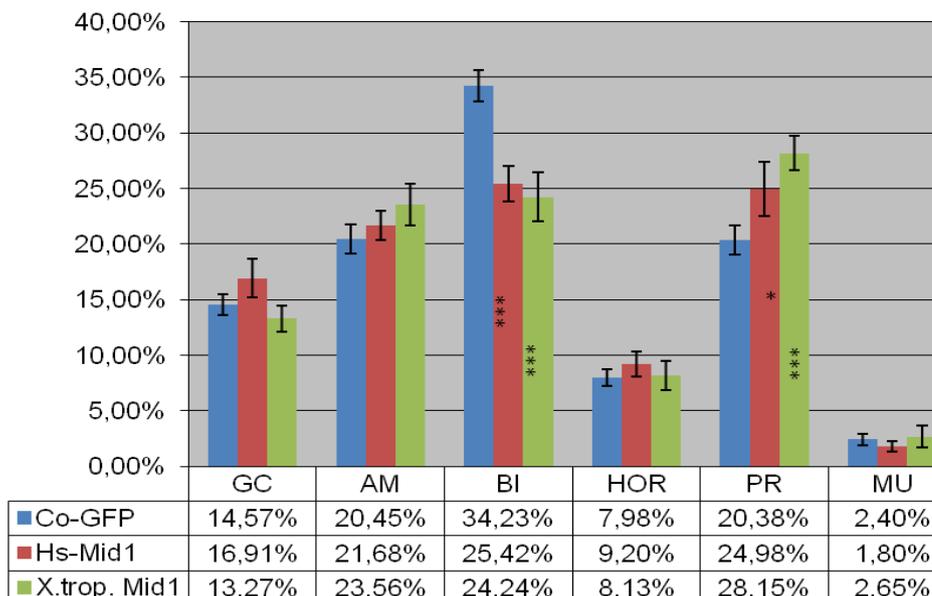


Abb. 15: Balkendiagramm, Darstellung des prozentualen Anteils der retinalen Zelltypen nach Lipofektion von *Homo sapiens*-Midline1 (N=24), *Xenopus tropicalis*-Midline1 (N=17) und GFP (N=40) in die prospektive Augenregion von NF-Stadium 16-18 *Xenopus laevis*-Embryonen. Die blauen Balken geben die prozentuale Verteilung der Zelltypen in der Kontrollgruppe wieder (Co-GFP). Den Einfluss einer Überexpression von Midline1 auf retinale Vorläuferzellen geben die roten (Hs-Mid1, *Homo sapiens*-Midline1) und grünen (X.trop. Mid1, *Xenopus tropicalis*-Midline1) Balken wieder. Signifikante Unterschiede finden sich bei dem Anteil der Bipolarzellen und Photorezeptoren. * kennzeichnen Signifikanzen im 10% Level, *** im 1% Level. Die Fehlerbalken geben die Streuung der Werte um die Mittelwerte an. Abk.: GC, Ganglienzellen; AM, amakrine Zellen; BI, Bipolarzellen; HOR, Horizontalzellen; PR, Photorezeptoren; MU, Müller-Gliazellen.

Im Vergleich zu Retinae, die allein mit GFP lipofektiert wurden, erniedrigte sich der Anteil der Bipolarzellen in beiden experimentellen Gruppen signifikant ($p < 0,01$). Zusätzlich erhöhte sich der Anteil der Photorezeptoren signifikant ($p < 0,1$ für *Homo sapiens*-Midline1 und $p < 0,01$ für *Xenopus tropicalis*-Midline1). Dagegen blieb der Anteil von Ganglienzellen, amakrinen Zellen, Horizontalzellen und Müller-Gliazellen unverändert (siehe Abb. 15). Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass eine gezielte Überexpression von *Xenopus tropicalis*-Midline1 sowie von *Homo sapiens*-Midline1 in Retinoblasten die Anzahl von Zellen mit einer Determinierung zu Photorezeptoren auf Kosten der Bipolarzellen erhöht.

4. Diskussion

4.1 Konservierung der Midline1-Sequenz in *Xenopus laevis* und *Homo sapiens*

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Xenopus laevis*-Midline1 und *Homo sapiens*-Midline1 ergab eine Identität von 93 % über das gesamte Protein. Die Sequenzen unterschieden sich nur durch den Austausch weniger Aminosäuren. 38 % dieser ausgetauschten Aminosäuren sind zudem nach George et al. konserviert (A/G, V/I/L/M, F/Y, D/E/N/Q, K/R, S/T) [74]. Wird davon ausgegangen, dass eine Identität von über 30 % in der Aminosäuresequenz zweier unterschiedlicher Arten ein Beweis für eine konservierte Struktur und Funktion ist [75], spricht dies für eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Funktionsidentität von Midline1 in beiden Spezies. Die Sequenzidentität im Bereich wichtiger funktioneller Domänen wie zu 96 % innerhalb der RING-Finger-Domäne, die die Bindung des E2-Enzyms realisiert, oder zu 92 % innerhalb der B-Box 1, die essenziell für die Substratbindung ist, unterstreichen die strukturelle und funktionelle Konservierung von Midline1 in beiden Spezies.

Die Analyse der Midline1-Aminosäuresequenz anderer Vertebraten, die ebenso eine hohe Sequenzidentität (≥ 90 %) ergab, lässt schlussfolgern, dass es sich hier um ein in Vertebraten evolutionär stark konserviertes Protein handelt.

4.2 Das Expressionsverhalten von Midline1 und Midline2 während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*

Untersuchungen zur Expression von Midline1 in aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien mittels RT-PCR lassen Funktionen für spezifische, zeitlich begrenzte, morphogenetische Vorgänge vermuten. Die im NF-Stadium 2 nachgewiesene starke Expression von Midline1 mittels RT-PCR repräsentiert maternale Transkripte, da zu diesem frühen Zeitpunkt noch keine endogene Transkription erfolgt. Das Vorliegen eines basalen Midline1-Expressionsniveaus in frühen Entwicklungsphasen (bis NF-Stadium 15) spricht dafür, dass eine geregelte Midline1-Expression für eine normale Entwicklung von Bedeutung ist. Im Verlauf der Gastrulation (NF-Stadium 10-12) nahm die Transkriptmenge von Midline1 ab, während diese mit Beginn der Neurulation (NF-Stadium 15) wieder zunahm und somit von einer endogenen Midline1-Produktion ausgegangen werden kann. Der Anstieg der mRNA-Transkriptrate ab dem NF-Stadium 20 inmitten der Neurulation (NF-Stadium 13-25) lässt sich auch mit einer Rolle von Midline1 in der Augenentwicklung vereinbaren, da

die Augenbläschen bei der Entwicklung des Gehirns als Ausstülpung des Diencephalons entstehen. Experimente, die den Einfluss von Midline1 auf die Entwicklung kranialer Ganglienzellen untersuchten, unterstützen die Vermutung, dass Midline1 an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt ist [76]. In späteren Entwicklungsstadien (27 bis 42 nach NF) war eine konstant hohe Expression von Midline1 zu verzeichnen. In einer von Suzuki et al. publizierten Darstellung des Expressionsmusters von Midline1 und Midline2 wurde dagegen ein gleichbleibend hohes Expressionsniveau von Midline1 und Midline2 vom NF-Stadium 0-30 beschrieben, das sich deutlich von den eigenen Ergebnissen unterscheidet [67]. Allerdings wurden hinsichtlich der verwendeten Zyklenzahlen in dieser Publikation keine Angaben gemacht. Ob – wie in der vorliegenden Arbeit geschehen – streng auf eine Zyklenzahl geachtet wurde, die im logarithmischen Bereich der Amplifikation lag, kann daher nicht nachvollzogen werden. Aus den veröffentlichten Daten von Suzuki et al. ist aus diesem Grund keine semi-quantitative Beurteilung möglich.

In den Untersuchungen zur zeitlichen Expression von Midline2 konnten Transkripte zwar ebenfalls während der frühen Entwicklungsphasen nachgewiesen werden, ein deutlicher Anstieg der Expression war jedoch erst ab dem NF-Stadium 37 zu verzeichnen. Im Vergleich zu Midline1 war zudem eine wesentlich höhere Zyklenzahl zur Detektion des Amplifikationsproduktes notwendig (32 statt 26 Zyklen), sodass von einer eher geringen früh-embryonalen Expression von Midline2 ausgegangen werden kann.

Untersuchungen anhand von Midline2-RNA *in situ* Hybridisierung an Mäusen zeigten am Ende der Neurulation (E10.5) ebenfalls nur eine sehr schwache Expression, die sich hauptsächlich auf das ZNS und das Herz beschränkte [48]. Erst in späteren Entwicklungsstadien (E14.5), als die Organogenese noch weiter vorangeschritten war, zeigten auch andere Organsysteme eine stärkere Midline2-Expression (u. a. Magen, Thymus, Schilddrüse, Niere). Weitere Untersuchungen zur embryonalen Midline2-Expression sind an Tiermodellen bisher rar. Neben den erwähnten Untersuchungen an Mäusen wurde die Expression im Primitivknoten des Huhns (Hensen's Node) beschrieben [77].

Zusammenfassend werden Midline1 und Midline2 während der gesamten embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* mit zunehmender Intensität exprimiert, wobei das Expressionsniveau von Midline2 niedriger ist. Der frühe Anstieg der Transkriptmenge

von Midline1 unterstützt die Annahme, dass dieses Gen entwicklungsbiologische Aufgaben erfüllt.

4.3 Die ubiquitäre und differenzierte Gewebeexpression von Midline1

Anhand der Expressionsanalyse von Midline1 in RNA-Präparationen adulter Gewebe von *Xenopus laevis* und *Homo sapiens* konnte gezeigt werden, dass die Midline1-Expression einer differenzierten Gewebeexpression unterliegt. Eine erhöhte Midline1-Transkriptmenge konnte besonders in Gehirn, Herz, Lunge sowie den männlichen und weiblichen Keimdrüsen in *Xenopus laevis* nachgewiesen werden. Es wurden humane Midline1-Transkripte ebenso in allen untersuchten Geweben nachgewiesen, was für eine ubiquitäre Expression spricht. Ein erhöhtes Expressionsniveau zeigte sich im fetalen und adulten Gehirn sowie in Haut, Niere und Nebenniere, Thymus, Lymphknoten, Lunge, Magen, Kolon, Herz sowie den Keimdrüsen. Im Vergleich beider Spezies zeigten sich somit neben einem evolutionär konservierten Expressionsmuster, z.B. in Keimdrüsen, Herz und Skelettmuskel auch Unterschiede in der Expression. Die Resultate anderer Untersuchungen unterstützen die Annahme einer ubiquitären Gewebeexpression von Midline1. So wurde in einer differenzierten Untersuchung von Landry und Mager 2002 anhand von real-time PCR in einer Vielzahl humaner Gewebe ebenfalls eine Midline1-Expression nachgewiesen. Real-time-RT-PCR-Analysen ermöglichen auch eine quantitative Aussage hinsichtlich der Transkriptmenge. In den analysierten humanen Geweben wurde eine hohe Expressionsrate von Midline1 in Niere, Lunge und Kolon nachgewiesen, was den eigenen Untersuchungsergebnissen entspricht. Andere Gewebe wie Skelettmuskel, Milz und fetale Gewebe lieferten dagegen – wie in der vorliegenden Arbeit – nur geringe Expressionsniveaus [78]. Quaderi et al. beschrieben bereits 1997 die gewebespezifische Expression von Midline1 anhand von Hybridisierungen der Midline1-cDNA mittels humaner fetaler und adulter Gewebe-Northernblots [43]. Es zeigte sich, dass Midline1 in allen untersuchten Geweben exprimiert wurde und das Expressionsniveau gleichfalls in den unterschiedlichen Geweben einer hohen Variationsbreite unterlag. Eine hohe Midline1-Expression wurde in fetaler Niere, Gehirn und Lunge beschrieben. In adulten Organen war ein hohes Expressionsniveau in Gehirn, Plazenta und Herz auffällig. Interessanterweise ergab sich in der RT-PCR der vorliegenden Arbeit ein eher niedriges Midline1-Expressionsniveau der adulten *Xenopus laevis*-Augen. Zum einen ließ sich auch in einem späten Entwicklungsstadium (NF-Stadium 41, Abb. 11 T)

anhand der WMISH im Vergleich zu frühen Entwicklungsstadien nur noch eine schwache Expression im Auge nachweisen, was für eine frühe Funktion des Gens in der Augenentwicklung spricht, zum anderen ergibt sich anhand des Expressionsniveaus nicht automatisch eine Aussage über die Genfunktion, da in den vorliegenden Expressionsstudien ausschließlich Transkripte nachgewiesen wurden. Eine verlässliche Aussage über die tatsächlich vorhandene Proteinmenge lässt sich daraus nicht ableiten. Eine Möglichkeit, den Midline1-Proteingehalt zu quantifizieren, würde z.B. das Verfahren des Western-Blots bieten.

Abschließend lässt sich für Midline1 eine ubiquitäre Expression in den vorgestellten und untersuchten Geweben verschiedener Vertebraten feststellen, die mehrfach bestätigt wurde und deren Niveau einer gewebespezifischen Regulation unterliegt.

4.4 Das dynamische Expressionsmuster und mögliche Funktionen von Midline1 im Verlauf der Augenentwicklung

Zur Visualisierung der räumlichen Midline1-Expression im Kopf- und besonders im Augenbereich von *Xenopus laevis* im Verlauf der Entwicklung wurden „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen vorgenommen. Diese Untersuchungen erlauben eine gleichzeitige Bestimmung von räumlicher und zeitlicher Expression, sind jedoch weniger sensitiv als die RT-PCR-Analysen. Expressionsdomänen von Midline1 im Kopfbereich von *Xenopus laevis* sind neben den Augenanlagen, die Ohranlagen, die Haftdrüse, die Branchialbögen, die Somiten und Teile der Anlage des Mittel- und Hinterhirns. Suzuki et al. zeigten ebenfalls in *Xenopus laevis* die Expression von Midline1 und Midline2. Midline1 wurde vor der Neurulation mittels „whole-mount“ *in situ* Hybridisierung in den Untersuchungen von Suzuki et al. nicht detektiert [67]. Dies könnte vermutlich an der Größe der einzelnen Zellen in diesen frühen Stadien liegen, sodass der logarithmische Schwellenwert zur Detektion der mRNA nicht erreicht werden konnte. Auch erschwerte die starke Hintergrundfärbung in den frühen Entwicklungsstadien eine genaue Aussage über eine mögliche Lokalisation der Expression. Während der frühen Neurulation im NF-Stadium 15 wurde Midline1 homogen im gesamten Embryo von Suzuki et al. nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsprofil von Midline1 ab dem NF-Stadium 20 anhand von WMISH untersucht. Im Stadium 20 wurden von Suzuki et al. Transkripte in epithelialen Organen, einschließlich dem Neuralrohr, den Augen- und Ohrbläschen, der Haftdrüse und den Somiten detektiert. In den Schwanzknospenstadien wurde eine Midline1-

Expression in Teilen des Gehirns (Mittel- und Hinterhirn), in den Kiementaschen, im Herzschauch und in verstreuten epidermalen Zellen beschrieben [67]. Das in dieser Arbeit vorgestellte Expressionsmuster von Midline1 in *Xenopus laevis* bestätigt somit im Wesentlichen die von Suzuki et al. publizierten Ergebnisse.

Ein weiterer Aspekt für nachfolgende Untersuchungen wäre auch, Midline1-Protein beispielsweise über eine Antikörper-Detektion embryonal darzustellen und den Proteingehalt zu quantifizieren, da bisher hauptsächlich Midline1-Transkript-Nachweise mittels *in situ* Hybridisierungen in unterschiedlichen Vertebraten-Embryonen erfolgt sind [43,67], die jedoch keine validen Aussagen über den tatsächlichen Proteingehalt erlauben.

Interessanterweise fällt im Vergleich der frühen Expression von Midline1 im gesamten Embryo zur Gewebeexpression adulter Organismen anhand von RT-PCRs auf, dass Gewebe, die im adulten Organismus nur ein niedriges Expressionsniveau aufweisen, während der embryonalen Entwicklung deutliche Färbungen zeigen. Dazu gehören beispielsweise Organe ektodermalen Ursprungs wie Auge und Ohr, aber auch mesodermalen Ursprungs wie Somiten oder Niere. Dies zeigt, dass sich die Aktivität von Midline1 in den verschiedenen Organen im Laufe der Entwicklung ändert. Möglich wäre, dass Midline1 für die Ausbildung bestimmter Organe, wie z. B. Niere und Auge, entwicklungspezifische Aufgaben wahrnimmt, die in den Organen des adulten Organismus nicht mehr von Bedeutung sind.

Neben Midline1 wurde zur vergleichenden Analyse die Expression von Pax6 und Pax2, zwei fundamentale Markergene der Augenentwicklung (siehe Abschnitt 1.5), dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass Midline1 sowohl Charakteristika des Pax6 als auch des Pax2-Expressionsmusters besitzt (siehe Abschnitt 3.3.3).

Das Expressionsmuster eines Gens ermöglicht Aussagen über seine Bedeutung für die Entwicklung in den entsprechenden Organen. Pax2, das beispielsweise spezifisch im Augentiel exprimiert wird (siehe Abb. 11 K-O), ist an der Entwicklung des Nervus opticus sowie der Musterbildung im Auge beteiligt. Es wurde gezeigt, dass Mutationen im menschlichen Pax2-Gen zu einem Kolobom des Nervus opticus führen [79]. Torres et al. zeigten anhand von Mäusen, die kein Pax2 exprimierten, dass der Nervus opticus nur zu den ipsilateralen Colliculi superiores projizierte und kontralaterale Projektionen fehlten. Phänotypisch zeigten die Mäuse einen vergrößerten Augenbecher sowie ein Kolobom mit fehlenden Gliazellen um den Nervus opticus [36]. Überexpressionsstudien von Pax2 im Huhn führten zu einer gestörten Kreuzung der Nervenbahnen der Axone

im Chiasma opticum [80]. Anzunehmen ist daher, dass Pax2 für die normale Entwicklung des optischen Stiels und die korrekte Leitung des Nervus opticus essenziell ist. In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass Pax2 besonders in Gliazellen des optischen Nerven exprimiert wird [81]. Müller-Gliazellen sind essenziell für die Entwicklung der Retina in Mäusen, da sie als Promotoren des retinalen Wachstums und der Histogenese dienen [82]. Weiterhin wurde ihnen eine Rolle als Wegweiser für sich entwickelnde retinale Axone in der Hühnerretina zugeschrieben [83]. Midline1 wurde ebenfalls präferenziell in den ventralen Anteilen der Retina exprimiert, besonders in den untersuchten NF-Stadien 33-38 (Abb. 11, N, R, S). Die starke Färbung von Midline1 im Bereich der optischen Papille, wo die Axone retinaler Ganglienzellen zusammentreffen und als Nervus opticus das Auge verlassen (Abb. 11 S) lässt vermuten, dass Midline1 ähnlich wie Pax2 einen Einfluss auf die Regionalisierung des Auges hat und zum anderen an der Bildung des optischen Nerven beteiligt ist. Ob es sich bei den exprimierenden Zellen ebenfalls um prospektive Gliazellen handelt, wie für Pax2 beschrieben, könnten zukünftige Experimente zeigen.

Der Transkriptionsfaktor Pax6 wird als einer der wichtigsten Regulatoren der Augenentwicklung angesehen [84]. Er wird in *Xenopus* bereits ab dem NF-Stadium 12,5 in der primären Augenanlage exprimiert [85]. Während der frühen Phase der Expression (NF-Stadien 12,5 bis 33/34) zeigte sich eine Expression in den Retinoblasten der sich entwickelnden Retina (Abb. 11 W) und in den Stadien des Augenbechers in allen Augenanteilen wie dem Linsenbläschen, der inneren und äußeren Schicht des Augenbechers sowie im optischen Stiel. Nach dem NF-Stadium 33/34 wird Pax6 in den noch nicht vollständig differenzierten Zellen des distalen Linsenanteils, der Kornea, der epithelialen Konjunktiva, der Iris sowie dem inneren Anteil der neuralen Retina exprimiert, jedoch nicht mehr in der äußeren Schicht der neuralen Retina, die hauptsächlich postmitotische Photorezeptoren enthält [20].

Das Midline1-Expressionsmuster wies neben Charakteristika der Pax2-Expression auch Überlappungen mit den Pax6-Expressionsdomänen im Auge auf, was besonders in den frühen NF-Stadien 20, 23 und 28 in Form der durchgehenden Expression im Augenbläschen ersichtlich war (siehe Abb. 11 A,B,C,F,G,H). Midline1 wird wie die sogenannten Augenfeldtranskriptionsfaktoren (EFTFs) nach Auftrennung des Augenfelds in beiden lateralen Augenanlagen exprimiert. Jeder einzelne dieser EFTFs besitzt eine Schlüsselrolle in der Augenentwicklung und nimmt als Transkriptionsfaktor auf die Genexpression entscheidenden Einfluss [6]. Zwar ist Midline1 kein

Transkriptionsfaktor, dennoch zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass Midline1 für die Augenentwicklung relevant ist. Vorstellbar wäre ein Einwirken von Midline1 auf EFTFs auf Proteinebene. Midline1 wurde bisher eine Rolle als E3-Ubiquitin-Ligase mit dem Zielprotein PP2Ac zugeschrieben [49,50]. Aufgrund der überlappenden Expressionsdomänen von Midline1, Pax6 und Pax2 sind Interaktionen dieser Proteine denkbar. Möglicherweise nimmt Midline1 als E3-Ubiquitin-Ligase auch Einfluss auf die Stabilität von Pax6 und Pax2 und kontrolliert deren Abbau.

4.5 Die Midline1-Expression im Auge im Vergleich zu anderen Vertebraten

In Untersuchungen der Midline1-Expression in menschlichen Embryonen wurden interessanterweise keine Midline1-Transkripte in der neuralen Retina eines 7 Wochen alten Embryos gefunden [64]. Die Augenentwicklung ist zu diesem Zeitpunkt im menschlichen Embryo bis zur Augenbecherbildung vorangeschritten und korreliert in etwa mit einem NF-Stadium 27 von *Xenopus*-Embryonen. Ähnlichkeiten im Midline1-Expressionsmuster zwischen Mensch und *Xenopus laevis* zeigten sich dagegen in Branchialbögen, Ohrbläschen, Herz und Anteilen des Gehirns [64]. Auch in anderen Vertebraten wurde die Expression von Midline1 untersucht. Quaderi et al. zeigten anhand von RNA *in situ* Hybridisierungen an Mäusen, dass Midline1 in einem frühen Entwicklungsstadium (E10.5) im gesamten Embryo exprimiert wurde. In einem späteren Entwicklungsstadium (E16.5) wurde ebenfalls eine Midline1-Expression in der neuralen Retina von Mäusen detektiert [43]. In diesem Stadium lassen sich einzelne Schichten der Mausretina unterscheiden. Eine besonders starke Expression fand sich in der äußeren nukleären Schicht der Retina, die proliferierende Neuroblasten enthält. In *Xenopus laevis* dagegen war eine schwache Midline1-Expression in der inneren nukleären Schicht der neuralen Retina zu finden. Hier befinden sich die Zellkörper der Bipolar- und Horizontalzellen und der Großteil der amakrinen Zellen. Weiterhin war eine markante Expression im vorderen Keimepithel der Linse in der Maus auffällig, wo ebenfalls proliferierende Zellen liegen. Dieser Bereich wies in *Xenopus laevis* dagegen keine Midline1-Transkripte auf.

Untersuchungen zu Midline1 im Huhn detektierten ebenso eine Expression in Auge, ZNS, Somiten, Herz und Branchialbögen [66]. Somit werden im hier dargestellten Vergleich der Expression von Midline1 in *Xenopus laevis* und anderen Vertebraten viele Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede gerade hinsichtlich der Expression im sich entwickelnden Auge deutlich. Es erscheint daher möglich, dass die Midline1-

Genexpression in verschiedenen Organismen trotz der konservierten Struktur unterschiedlich reguliert wird.

Die Variationsbreite des Expressionsprofils von Midline1 in den unterschiedlichen Geweben selbst innerhalb eines Organismus legt nahe, dass die Expression von Midline1 sorgfältig reguliert wird. Im Nachfolgenden werden Mechanismen dargestellt, die regulierend in die Expression von Midline1 eingreifen könnten. Northern Blot Analysen konnten drei verschiedene Midline1-Transkripte von unterschiedlicher Größe (7 kb, 4,5 kb und 3,5 kb) aufzeigen [43,86]. Dem liegt eine gewebespezifische Polyadenylierung an vier verschiedenen Polyadenylierungsstellen (PAS1-4) im Menschen zugrunde. Interessanterweise ist der Gebrauch der verschiedenen Polyadenylierungsstellen determiniert durch die Wahl alternativer Promotoren, die ihrerseits die Midline1-Expression sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Tier beeinflussen [78,87]. Möglicherweise bietet dieses Modell einen Erklärungsansatz für die unterschiedliche Expression von Midline1 sowohl in verschiedenen Organen innerhalb eines Organismus als auch während der Entwicklung.

Midline2, das funktionell dem Midline1-Protein ähnlich ist, kann in einigen Geweben anscheinend als Stellvertreter von Midline1 agieren. Gewebe mit geringer Midline2-Aktivität würden folglich mehr unter einem Midline1-Funktionsverlust leiden [47,48,77]. Bisher wurde das Expressionsprofil von Midline2 während der Augenentwicklung jedoch noch nicht untersucht. Inwieweit dieser Mechanismus innerhalb der Augenentwicklung daher von Relevanz ist, könnte Gegenstand weiterer Experimente sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen jedoch vermuten, dass der Einfluß von Midline2 in der frühen Entwicklung als gering einzustufen ist, da nur geringe Transkriptmengen nachweisbar waren (siehe Abb. 9, Abschnitt 3.3.1).

Eine Möglichkeit die Genexpression durch Translationskontrolle zu beeinflussen, ist die Funktion von Midline1 als Teil eines Ribonukleoprotein-(RNP)-Komplexes. Die Tatsache, dass der Midline1-Multiproteinkomplex mit Midline1-mRNA interagiert, weist auf einen möglichen regulatorischen Feedbackmechanismus hin, den Midline1 auf seine eigene Synthese ausübt [88]. 2011 veröffentlichten Aranda-Orgillés et al. weiterhin, dass der Midline1-Protein-Komplex mit mRNA über purinreiche Sequenzmotive, sogenannte MIDAS (Mid1 Association Sequence) verknüpft ist. Dies erhöht die Stabilität und translationale Effizienz dieser mRNAs [89].

Neben der posttranskriptionellen Regulation von Midline1 wird auch eine transkriptionelle Regulation der Expression diskutiert. 2012 zeigten Dierssen et al. [90], dass DREAM (Downstream regulatory element antagonist modulator), ein Ca^{2+} -bindendes Protein, das an DNA bindet und Ca^{2+} -abhängig die Transkription bestimmter Gene verhindert [91], regulierend in die Midline1-Expression eingreift. Zuvor wurde bereits eine Expression von DREAM in der Raten-Retina, besonders in den Müller-Gliazellen, nachgewiesen [92]. In den Untersuchungen von Dierssen et al. wurde an transgenen Mäusen, die einen Ca^{2+} -unsensitiven/CREB-unabhängigen dominant-aktiven DREAM-Mutant exprimierten (daDREAM), nachgewiesen, dass eine verminderte Midline1-Expression stattfand und Midline1 daher der transkriptionellen Kontrolle dieses Proteins unterliegen könnte [90]. Ob es sich hierbei um einen direkten oder indirekten Effekt der Genmutation auf die Midline1-Expression handelt, wurde nicht differenziert. Die Midline1-Expression und -Funktion werden somit durch vielfältige Mechanismen, die heute sicherlich noch nicht alle vollständig bekannt sind, reguliert.

4.6 Veränderungen in der Augenentwicklung durch Midline1-Knockdown

Die Unterbindung der Midline1-Genexpression durch den Einsatz von Midline1-Morpholinos verursachte eine statistisch signifikante Vergrößerung des Augenbechers. Die Vergrößerung und Ballonierung der Augenbläschen in der frühen Entwicklung führte in Folge zu einer fehlerhaften Ausbildung der Retina mit Faltenbildung. In späteren Entwicklungsstadien (NF-Stadium 36) wies die Retina eine deutlich veränderte Struktur auf. Midline1 scheint demzufolge ein früher Regulator der Augenentwicklung zu sein, der eine Funktion bei der Ausbildung der Retina, ihrer Größe und des optischen Stiels ausübt.

Wie von Zuber et al. berichtet wurde, verursachte eine alleinige Überexpression von Pax6 mittels mRNA-Injektion in *Xenopus*-Blastomere keine signifikante Augenvergrößerung [93]. Der Anstieg des Pax6-Levels, der durch den Funktionsausfall von Midline1 provoziert wurde (siehe Abschnitt 3.4.1), ist daher wahrscheinlich weniger bedeutend für die Größenzunahme des Augenbläschens.

Dagegen könnten andere Mechanismen der Größenzunahme des Augenbläschens zugrunde liegen. Möglich wäre, dass undifferenzierte Zellen des umliegenden Gewebes, die ursprünglich nicht dazu bestimmt waren, zu retinalen Zellen zu differenzieren, ihr Zellschicksal ändern und zu retinalen Zellen rekrutiert werden.

Andererseits könnte der Vergrößerung des Augenbechers auch eine verminderte Apoptoserate oder eine erhöhte Mitoseaktivität retinaler Zellen durch Suppression der Midline1-Funktion zugrunde liegen, sodass sich die Zellanzahl im Augenbecher erhöht. Um experimentell die Auswirkungen auf die Proliferationsrate in *Xenopus laevis* nach Midline1-MO-Injektion zu untersuchen, könnten BrdU-Markierung eingesetzt werden. Auf diesem Wege ließe sich die Anzahl mitotisch aktiver Zellen eruieren. Ob es sich dagegen um eine Hemmung der Apoptoserate handelt, könnte mittels TUNEL-Assay analysiert werden. Studien an Midline1-Nullmutanten-Mäusen zeigten interessanterweise keine Veränderung der Apoptose oder Proliferation. Allerdings wurden in diesen Tieren auch keine Augenfehlbildungen beschrieben. Zudem waren die Midline1-Nullmutanten-Mäuse von anderen Fehlbildungen, wie sie bei Opitz-G/BBB-Syndrom-Patienten gefunden wurden (Kardiale, urogenitale und tracheoösophageale Malformationen), ebenfalls nicht betroffen [94]. Die Diskrepanz zum Phänotyp in *Xenopus* nach Midline1-Knockdown könnte durch den Einfluss des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes oder durch evolutionäre Entwicklungsunterschiede zwischen den verschiedenen Spezies erklärt werden.

Im Folgenden wird die Veränderung der Pax6-Expressionsdomäne in den Midline1-Funktionsverluststudien im Auge diskutiert, die anhand von WMISH-Untersuchungen analysiert wurden (siehe Abschnitt 3.4.1). Die Verstärkung und ektopische Erweiterung der Pax6-Domäne spricht zunächst für einen erhöhten Pax6-mRNA-Gehalt. Ein Anstieg der Pax6-exprimierenden Zellen bestätigte sich auf Proteinebene mittels Pax6-Detektion über spezifische Antikörper (siehe Abschnitt 3.4.2). Zu bedenken ist jedoch, dass aufgrund der geringen Zahl an Beobachtungen in dem letztgenannten Experiment unspezifische ("off-target") Effekte, ohne Assoziation zur Unterbindung der Midline1-Expression, nicht ganz auszuschließen sind. Zur Validierung der Ergebnisse bedarf es daher weiterer Experimente. Dennoch zeigte sich in beiden unabhängigen Entwicklungsstadien eine tendentielle Zunahme Pax6-positiver Zellen, die nicht allein auf der Größenzunahme der Retina und damit einer generell höheren Zellzahl beruhte. Es ist daher anzunehmen, dass Midline1 in seiner Funktion als Ubiquitin-Ligase Einfluss auf die Konzentration bestimmter Transkriptionsfaktoren wie z. B. Pax6 auf Proteinebene nehmen kann. Für TRIM11, ein dem Midline1 eng verwandtes Protein aus der RBCC-Familie, konnte bereits gezeigt werden, dass es an der Degradation von überschüssigem Pax6 durch Ubiquitylierung beteiligt ist [58]; ähnlich könnte dies auch für Midline1 zutreffen. Zu einer zusätzlichen Erhöhung des Pax6-Levels könnte

die positive Autoregulation von Pax6-Protein auf seine eigene mRNA-Synthese beitragen, die auf Zellkulturebene nachgewiesen wurde [95].

Im Jahr 2008 veröffentlichte Aranda-Orgillés et al., dass mutierte Midline1-Produkte die Fähigkeit verlieren, EF-1 α (elongation factor 1 α) zu binden und daher wahrscheinlich eine fehlerhafte Regulation der Translation von assoziierten mRNAs verursachen [88]. Midline1 bekommt in dieser Publikation eine neue Funktion in der Zelle zugeschrieben. Es soll an der Bildung eines Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexes beteiligt sein. Diese Komplexe haben in der Zelle u. a. die Funktion, einen cytoplasmatischen RNA-Transport zu gewährleisten und somit durch lokal regulierte Translation die Bildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität zu ermöglichen. Es wurde gezeigt, dass Midline1 zusammen mit Alpha4, einer regulatorischen Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, und EF-1 α den Kern eines großen Multiproteinkomplexes bildet. Dieser assoziiert mit RNA und ist zusammen mit weiteren Faktoren am mRNA-Transport und an der Translationskontrolle beteiligt. Vorstellbar wäre, dass der durch Morpholinos herbeigeführte Funktionsverlust von Midline1 dazu führt, dass auch die Translationskontrolle der Pax6-mRNA entfällt, was eine verstärkte Translation und somit ein erhöhtes Pax6-Proteinlevel zur Folge hätte. Dies könnte neben der verminderten Pax6-Degradation durch die Ubiquitin-Ligase den verstärkten Nachweis von Pax6-mRNA nach Midline1-Knockdown erklären. Weiterhin könnte die Translation der mRNA von Proteinen, die für Wachstum und Zellmigration bedeutend sind, verändert sein und so an der phänotypischen Veränderung des Augenbläschens mitwirken.

Viele Signalwege koordinieren während der embryonalen Entwicklung die korrekte Musterbildung und die Morphogenese von ventralen Mittellinienstrukturen. Unter ihnen spielt Sonic hedgehog (Shh) eine entscheidene Rolle [96]. Mutationen im Shh-Gen verursachen eine Holoprosenzephalie (HPE), eine Fehlbildung, die durch eine fehlerhafte Teilung des Vorderhirns und des Augenfeldes aufgrund einer Störung der ventralen Mittellinie charakterisiert ist [97]. Die Ausschaltung des Shh-Gens in Mäusen resultierte u. a. in einer Zyklopie [98]. Diese Formen der Fehlbildungen sind gegensätzlich zu den Pathologien, die beim Opitz-G/BBB-Syndrom gefunden werden. Hinsichtlich der Augenentwicklung bewirkt Shh, neben der Aufspaltung des Augenfelds, die Regionalisierung der Augenanlage und reguliert die Proportionen von Retina versus Augenstiel durch Induktion von Vax2, Vax1 und Pax2 [99,100]. Die Überexpression von Shh in *Xenopus laevis* fördert die Ventralisierung der

Augenstrukturen, was auch durch eine Expansion entsprechender spezifischer Markergene des Augenstiels wie beispielsweise Pax2 oder Vax1 deutlich wird. Die Pax6-Expression wird dagegen unterdrückt [99,101]. Hedgehog-Signale wirken also entscheidend auf die proximodistale Musterbildung ein. Bei einer Überexpression von Shh durch Injektion von Shh-mRNA in eine Zelle eines Zwei-Zell-Embryos von *Xenopus laevis* konnte ein Anstieg der Midline1-Expression auf der injizierten Seite beobachtet werden (persönliche Mitteilung Prof. Dr. T. Hollemann). Midline1 scheint also ebenfalls zu den Faktoren zu gehören, die von Shh reguliert werden und an der Ausbildung der ventralen Augenstrukturen beteiligt sind. Diese Annahme wird durch seine spezifische Expression in den ventralen Augenanteilen, gerade in den NF-Stadien 33 und 38 (Abb. 11 R,S) unterstützt. Ein Knockdown von Midline1 fördert dagegen Faktoren wie Pax6, die auf die Ausbildung des Augenbläschens einwirken. Weiterhin wurde im Huhn beobachtet, dass Midline1 Shh im Hensen's Node, dem Primitivknoten, unterdrückt [102]. Demzufolge wäre eine gegensinnige Regulation auch in der Augenentwicklung zwischen Shh und Midline1 durchaus denkbar.

Durch die bekannte hohe Sequenzidentität von Midline1 und Midline2 [48] inhibierte der verwendete Midline1-Morpholino der vorliegenden Arbeit sowohl die Midline1- als auch die Midline2-mRNA-Funktion. Diese gleichzeitige Translationsinhibierung lag ebenso in den Untersuchungen von Suzuki et al. vor [67]. Experimente mit einem weiteren Midline1-Morpholino-Konstrukt, ohne Ähnlichkeiten zur Midline2-Sequenz, verursachten den gleichen Phänotyp wie in der vorliegenden Arbeit (persönlicher Kommentar Prof. Dr. T. Hollemann), sodass der hier beschriebene Phänotyp hauptsächlich auf den Midline1-Knockdown zurückzuführen ist. Anhand der Untersuchungsergebnisse kann der Einfluss von Midline2 auf die Augenentwicklung eher als gering eingestuft werden, da in den RT-PCR-Analysen der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass generell nur geringe Transkriptmengen von Midline2 während der Entwicklung in *Xenopus laevis* nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 9).

Zur weiteren Validierung des Phänotypes wäre in folgenden Experimenten die Verwendung eines weiteren Midline1-Morpholinos mit unabhängiger Sequenz zu den bereits verwendeten empfehlenswert.

Die Untersuchungen von Suzuki et al. zeigten weiterhin, dass nach Midline1-Knockdown eine gestörte Entwicklung des Neuralrohrs vorlag [67]. Es wurde ein Phänotyp vorgestellt, der einen Defekt des Neuralrohrs sowie eine deutliche Verzögerung beim Schluss des Neuralrohrs aufwies. Interessanterweise wurde dieser

Phänotyp in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Der einzige Unterschied zu der in dieser Arbeit verwendeten Midline1-Morpholino-Sequenz beruhte auf einen um eine Base späteren Sequenzbeginn.

In der Literatur wird bei den vom Opitz-G/BBB-Syndrom betroffenen Patienten an Augenfehlbildungen ausschließlich ein Hypertelorismus und/oder Telekanthus beschrieben [40,103,104]. Dagegen wurde in den dargestellten Knockdown-Experimenten in *Xenopus laevis* eine markante Augenfehlbildung deutlich. Ursache für diesen unterschiedlichen Phänotyp könnte der Mechanismus der Morpholino-Experimente sein. Die durchgeführten Knockdown-Experimente bewirkten eine Hemmung der Midline1-Translation und somit eine starke Midline1-Proteinreduktion. Das Opitz-G/BBB-Syndrom hingegen wird durch Mutationen im Midline1-Gen verursacht. Ein vollständiger Funktionsverlust bzw. ein vollständiges Fehlen des Midline1-Proteins aufgrund dieser Mutationen ist eher unwahrscheinlich. Es ist bekannt, dass sich die Mutationen beim Opitz-G/BBB-Syndrom über das gesamte Midline1-Gen erstrecken können. Die Art der Mutationen ist vielseitig. Es finden sich Nonsense- und Missense-Mutationen, Insertionen (oft als Duplikationen) und Deletionen, die auch eine Verschiebung des Leserasters verursachen können. Die unterschiedlichen Mutationen im Midline1-Gen sind möglicherweise auch für die variable Ausprägung des Phänotyps verantwortlich [44,46,64,86,104]. Hinsichtlich des Phänotyps wurde bei betroffenen heterozygoten Frauen in der Regel eine mildere Ausprägung beschrieben. Ob die rezessive X-chromosomale Vererbung und die zufällige X-Inaktivierung innerhalb des weiblichen Organismus darauf zurückzuführen sind, wurde bislang nicht untersucht. Der höchste Anteil an Mutationen wurde in der C-terminalen Region des Gens gefunden. Diese führen zu verkürzten Proteinformen, die sich als Proteinaggregate im Zellplasma anhäufen und ihrer biologischen Funktion, der Degradation der PP2Ac, nicht mehr nachkommen [53]. Die Höhe der verbleibenden Restaktivität des Proteins ist jedoch nicht bekannt. Vorstellbar wäre, dass das verkürzte Midline1-Protein auch neue Funktionen, im Sinne eines Gain-of-function übernimmt, da es nicht mehr an Mikrotubuli assoziiert vorliegt und somit an anderer Stelle der Zelle alternative Proteine ubiquitinylieren könnte. Die phänotypischen Veränderungen beim Opitz-G/BBB-Syndrom könnten überdies durch eine abweichende Midline1-Funktion in Form eines dominant negativen Effektes hervorgerufen werden, z. B. durch Komplexbildung des verkürzten Midline1-Proteins mit anderen Proteinen und durch Besetzen ihrer funktionellen Seite. Diese Möglichkeit

einer dominant negativen Auswirkung eines veränderten Midline1-Proteins wurde bisher noch nicht untersucht.

Für das Opitz-G/BBB-Syndrom besteht bekanntermaßen eine Lokusheterogenität, d. h., dass Mutationen an anderen Genorten, wie auf dem Autosom 22q11.2, ebenfalls dieses Syndrom provozieren können [42]. De Falco zeigte anhand genetischer Untersuchungen an Patienten mit Opitz-G/BBB-Syndrom, dass nur bei wenigen Betroffenen tatsächlich eine Midline1-Mutation vorlag. Das Vorliegen von Mutationen im Midline1-Gen an anderen Stellen, die nicht routinemäßig untersucht wurden, könnte eine Erklärung für dieses Phänomen liefern. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass Mutationen in weiteren Genen, z. B dem Alpha4-Gen, an der Ausprägung des Opitz-G/BBB-Syndroms beteiligt sind [105]. Generell erklären die spezifischen Mutationen im Midline1-Gen nämlich nicht die hohe klinische Variabilität bei Patienten mit Opitz-G/BBB-Syndrom. Sehr wahrscheinlich wirken weitere Faktoren, wie modifizierende Gene und Umweltbedingungen an der Ausprägung des Phänotypes mit [106]. Vorstellbar wäre auch, dass das Opitz-G/BBB-Syndrom in naher Zukunft eine exaktere Definition des klinischen Spektrums erfährt und womöglich weitere Kandidatengene, die an der phänotypischen Ausprägung beteiligt sind, gefunden werden.

4.7 Auswirkungen der zellautonomen Funktion von Midline1 auf die Differenzierung retinaler Stammzellen und mögliche Ursachen

Die neurale Retina von Vertebraten enthält eine limitierte Anzahl von Zelltypen in einer stereotypischen laminären Anordnung und ist daher eine beliebte ZNS-Struktur, um die molekulare Basis neuronaler Differenzierung näher zu untersuchen [107]. Die spezifische Abfolge der Entstehung bestimmter retinaler Zelltypen lässt darauf schließen, dass die Kontrolle der Zelldifferenzierung ein stark regulierter Prozess ist. So ist das Vorhandensein mehrerer Transkriptionsfaktoren zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung von der Vorläuferzelle bis zum differenzierten Zelltyp von essenzieller Bedeutung [108].

Die Funktion des Midline1-Gens im Hinblick auf die Differenzierung retinaler Progenitorzellen ist bisher nicht erforscht worden. Die Untersuchung der zellautonomen Funktion von Midline1 durch Lipofektion von Midline1-DNA in Retinoblasten von *Xenopus laevis*-Embryonen führte zur Reduktion des Anteils der Bipolarzellen innerhalb der Retina im NF-Stadium 41. Photorezeptoren waren dagegen in ihrer Anzahl erhöht. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Midline1 eine Rolle bei der

Förderung des Photorezeptorschicksals auf Kosten von Bipolarzellen in retinalen Vorläuferzellen spielt und damit an der Bestimmung des Zellschicksals in der Retina beteiligt sein dürfte. Zu berücksichtigen ist, dass in der vorliegenden Arbeit Zellen analysiert wurden, die sich GFP-positiv darstellten. Ein genauer Nachweis, dass diese Zellen auch das colipofizierte Midline1-Konstrukt enthielten, wurde nicht unternommen. Einer Studie zufolge konnte allerdings mit der gleichen Technik eine Colipofektionsrate von 90 % erreicht werden [109]. Eine hohe Colipofektionsrate ist daher annehmbar.

Im Folgenden soll der Einfluss von Pax6 auf die Determinierung retinaler Vorläuferzellen betrachtet werden, da möglicherweise ein erhöhtes Midline1-Proteinniveau direkt oder indirekt zu einem vermehrten Abbau oder einer verminderten Expression von Pax6 führt.

Ein spezifisches Pax6-Proteinniveau scheint in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien retinaler Progenitorzellen für die Differenzierung in die einzelnen Zelltypen von Bedeutung zu sein [110]. So übernimmt Pax6 zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung unterschiedliche Aufgaben. Beispielsweise bewirkte eine verminderte Pax6-Aktivität ab dem NF-Stadium 16 eine Zunahme der Zapfen und Ganglienzellen [73]. Auch in einer Studie von Hsieh und Yang führte eine Verminderung des Pax6-Levels zu einer Zunahme zumindest der Zapfen-Photorezeptoren [110]. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen kommt es durch einen möglichen Abbau von Pax6 durch Überexpression von Midline1 in retinalen Vorläuferzellen zu einer Zunahme der Photorezeptoren. Ob dabei Unterschiede in der Verteilung von Stäbchen und Zapfen vorliegen, könnten weitere Experimente zeigen. In den erwähnten Studien wurde jedoch keine Lipofektion unternommen, die den Vorteil hat, dass die Aufnahme eines Expressionsplasmids in einzelne Zellen einer bestimmten Region zu einem vorangeschrittenem Entwicklungszeitpunkt möglich ist, sodass anschließend die Veränderung des Schicksals der betroffenen Zellpopulation beurteilt werden kann. Daher ist auch zu beachten, dass der Effekt der Lipofektion abhängig von dessen Zeitpunkt und somit der Genexpression ist [70]. Interessanterweise zeigte sich, dass eine Pax6-Lipofektion in Retinoblasten keinen Effekt auf die Differenzierung der einzelnen Zelltypen hat [111]. Die weiteren Mechanismen, aufgrund derer Midline1 das Zellschicksal beeinflusst, bleiben daher noch zu erforschen. Es gibt es eine Vielzahl an Genen, die auf den Differenzierungsprozess Einfluss nehmen. Da mit hoher Wahrscheinlichkeit die Stabilität anderer Substrate wie auch weiterer Transkriptionsfaktoren durch Midline1

beeinflusst wird, könnte die Begünstigung des Photorezeptorschicksals auch auf eine Reduktion anderer Faktoren zurückzuführen sein. Zusammengefasst scheint Midline1 an der Determinierung des retinalen Zellschicksals beteiligt zu sein und multipotente Progenitorzellen zu befähigen, zu Photorezeptoren zu differenzieren.

4.8 Perspektiven

Midline1 hat Einfluss auf die Augenentwicklung, besonders auf die Größenstruktur des Augenbläschens und die Pax6-Protein-Halbwertszeit wie auch auf das Differenzierungspotenzial retinaler Vorläuferzellen.

Zukünftige Experimente könnten sich dem Einfluss von Midline1 auf Apoptose, Proliferation oder der Ausbildung der Augenanlage widmen, um Erklärungen der phänotypischen Midline1-Veränderungen zu liefern.

Weiterführende Untersuchungen, auch auf zellulärer Ebene, über die Interaktion von Midline1 und Pax6 wären für die Erklärung eines erhöhten Pax6-Levels nach Midline1-Knockdown interessant wie z. B. der Nachweis, dass Pax6-Protein ein Substrat der Midline1-Ubiquitin-Ligase ist und der Nachweis der Interaktion beider Proteine *in vitro* und *in vivo*, durch Immunopräzipitation bzw. ein Yeast Two-Hybrid-System. Mögliche Bindungsstellen des Pax6-Proteins an die Ubiquitin-Ligase Midline1 könnten über Midline1-Deletionskonstrukte mit HA(Hämagglutinin)-tag in HA-Pulldown-Experimenten ermittelt werden. Weitere mögliche Interaktionspartner von Midline1 zu entdecken, die bei Ausfall von Midline1 an der Ausbildung des Phänotypes beteiligt sind, könnte ebenso Anlass für zukünftige Untersuchungen sein. Auch wäre das Verhalten von anderen EFTFs nach Midline1-Funktionsverlust von Interesse. Experimente, die eine Überexpression von Midline1 verursachen, könnten weitere Erklärungen für die Funktion des Proteins *in vivo* liefern und zeigen, inwieweit das Pax6-Level beeinflusst wird. Lipofektionsexperimente, die einen zellautonomen Knockdown von Midline1 in retinalen Progenitorzellen bewirken, könnten aufdecken, ob Midline1 für die Differenzierung in die unterschiedlichen retinalen Zelltypen essenziell ist.

5. Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass Midline1 sowohl während der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* als auch in den unterschiedlichen adulten Organen von *Xenopus laevis* und *Homo sapiens* einer differenzierten Expression unterliegt. Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Midline1-Expression zwischen verschiedenen Vertebraten wurden aufgezeigt. Eine ubiquitäre Expression konnte anhand der untersuchten Gewebe bestätigt werden. Das Expressionsprofil von Midline2 wurde mit RT-PCRs während der Entwicklung in *Xenopus laevis* dargestellt. Im Vergleich zu Midline1 war eine wesentlich geringere Expression gerade in den frühen Entwicklungsstadien auffällig.

Anhand von WMISH konnte die dynamische Expression von Midline1 im Auge nachvollzogen und mit der Pax6- und Pax2-Expression verglichen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich Expressionseigenschaften beider Augenmarkergene in der Midline1-Expression wiederfinden. Besonders herausgestellt werden konnte die differenzierte Expression von Midline1 im Augenziel und der optischen Papille. Die Funktionsverlustanalysen brachten einen spezifischen Phänotyp hervor, der sich durch eine Vergrößerung des Augenbläschens in frühen Stadien und durch eine Veränderung der retinalen Strukturen in Form einer Faltenbildung der Retina in späteren Entwicklungsstadien auszeichnete. Die Vergrößerung der Augenbläschen wurde durch ihr Ausmessen und Vergleich zur nicht injizierten Seite auch statistisch bestätigt. Die Untersuchung der Pax6-Expression in den manipulierten Organismen zeigte eine deutliche Veränderung der Pax6-Expressionsdomäne, die sich in einer Verstärkung und einer ektopischen Erweiterung ausdrückte. Anhand eines Pax6-Proteinnachweises konnte ein erhöhter Anteil Pax6-exprimierender Zellen bestätigt werden. Der Einfluss von Midline1 auf die Differenzierung retinaler Progenitorzellen wurde erstmals untersucht und brachte hervor, dass Midline1 eine Förderung des Photorezeptorschicksals auf Kosten von Bipolarzellen begünstigt.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Nieuwkoop PD und Faber J: Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). A Systematic and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1956
- [2] Welsch U: Sobotta Lehrbuch Histologie. 2. Aufl., Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2005, S. 584-601
- [3] Marquardt T und Gruss P (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci*; 25: 32-38
- [4] Chen L, Yang P, Kijlstra A (2002) Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm*; 10: 27-39
- [5] Gurdon JB (1987) Embryonic induction--molecular prospects. *Development*; 99: 285-306
- [6] Zuber ME, Gestri G, Viczian AS, Barsacchi G, Harris WA (2003) Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development*; 130: 5155-5167
- [7] Li H, Tierney C, Wen L, Wu JY, Rao Y (1997) A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development*; 124: 603-615
- [8] Pera EM und Kessel M (1997) Patterning of the chick forebrain anlage by the prechordal plate. *Development*; 124: 4153-4162
- [9] Chow RL und Lang RA (2001) Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 17: 255-296
- [10] Liu Y, Lupo G, Marchitello A, Gestri G, He RQ, Banfi S, Barsacchi G (2001) Expression of the *Xvax2* gene demarcates presumptive ventral telencephalon and specific visual structures in *Xenopus laevis*. *Mech Dev*; 100: 115-118
- [11] Lupo G, Liu Y, Qiu R, Chandraratna RA, Barsacchi G, He RQ, Harris WA (2005) Dorsoventral patterning of the *Xenopus* eye: a collaboration of Retinoid, Hedgehog and FGF receptor signalling. *Development*; 132: 1737-1748
- [12] Perron M und Harris WA: Cellular Determination in Amphibian Retina. In: S. A. Moody (ed): *Cell Lineage and Fate Determination*, Academic Press, San Diego, 1999, pp. 353-368
- [13] Henry JJ und Grainger RM (1990) Early tissue interactions leading to embryonic lens formation in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*; 141: 149-163

- [14] Stuermer CA und Bastmeyer M (2000) The retinal axon's pathfinding to the optic disk. *Prog Neurobiol*; 62: 197-214
- [15] Gage PJ, Rhoades W, Prucka SK, Hjalt T (2005) Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 46: 4200-4208
- [16] Turner DL und Cepko CL (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature*; 328: 131-136
- [17] Livesey FJ und Cepko CL (2001) Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci*; 2: 109-118
- [18] Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol*; 474: 304-324
- [19] Zaghoul NA, Yan B, Moody SA (2005) Step-wise specification of retinal stem cells during normal embryogenesis. *Biol Cell*; 97: 321-337
- [20] Walther C und Gruss P (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*; 113: 1435-1449
- [21] Qiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ (1994) Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science*; 265: 785-789
- [22] Tomarev SI, Callaerts P, Kos L, Zinovieva R, Halder G, Gehring W, Piatigorsky J (1997) Squid Pax-6 and eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94: 2421-2426
- [23] Hanson IM, Fletcher JM, Jordan T, Brown A, Taylor D, Adams RJ, Punnett HH, van Heyningen V (1994) Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peters' anomaly. *Nat. Genet*; 6: 168-173
- [24] Hanson IM (2003) PAX6 and congenital eye malformations. *Pediatr Res*; 54: 791-796
- [25] Halder G, Callaerts P, Gehring WJ (1995) Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science*; 267: 1788-1792
- [26] Chow RL, Altmann CR, Lang RA, Hemmati-Brivanlou A (1999) Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development*; 126: 4213-4222
- [27] Gehring WJ und Ikeo K (1999) Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet*; 15: 371-377
- [28] Gehring WJ (2005) New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *J Hered*; 96: 171-184

- [29] Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature*; 354: 522-525
- [30] Schedl A, Ross A, Lee M, Engelkamp D, Rashbass P, van Heyningen V, Hastie ND (1996) Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell*; 86: 71-82
- [31] Manuel M, Pratt T, Liu M, Jeffery G, Price DJ (2008) Overexpression of Pax6 results in microphthalmia, retinal dysplasia and defective retinal ganglion cell axon guidance. *BMC Dev Biol*; 8: 59
- [32] Pineda D, Rossi L, Batistoni R, Salvetti A, Marsal M, Gremigni V, Falleni A, Gonzalez-Linares J, Deri P, Salo E (2002) The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax6 independent. *Development*; 129: 1423-1434
- [33] Bäumer N, Marquardt T, Stoykova A, Spieler D, Treichel D, Ashery-Padan R, Gruss P (2003) Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6. *Development*; 130: 2903-2915
- [34] Ziman M, Rodger J, Lukehurst S, Hancock D, Dunlop S, Beazley L (2003) A dorso-ventral gradient of Pax6 in the developing retina suggests a role in topographic map formation. *Brain Res Dev Brain Res*; 140: 299-302.
- [35] Bäumer N, Marquardt T, Stoykova A, Ashery-Padan R, Chowdhury K, Gruss P (2002) Pax6 is required for establishing naso-temporal and dorsal characteristics of the optic vesicle. *Development*; 129: 4535-4545
- [36] Torres M, Gomez-Pardo E, Gruss P (1996) Pax-2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development*; 122: 3381-3391
- [37] Morcillo J, Martínez-Morales JR, Trousse F, Fermin Y, Sowden JC, Bovolenta P (2006) Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development*; 133: 3179-3190
- [38] Nornes HO, Dressler GR, Knapik EW, Deutsch U, Gruss P (1990) Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development*; 109: 797-809
- [39] Schwarz M, Cecconi F, Bernier G, Andrejewski N, Kammandel B, Wagner M, Gruss P (2000) Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development*; 127: 4325-4334

- [40] Opitz JM (1987) G syndrome (hypertelorism with esophageal abnormality and hypospadias, or hypospadias-dysphagia, or "Opitz-Frias" or "Opitz-G" syndrome)--perspective in 1987 and bibliography. *Am J Med Genet*; 28: 275-285
- [41] Robin NH, Opitz JM, Muenke M (1996) Opitz G/BBB syndrome: clinical comparisons of families linked to Xp22 and 22q, and a review of the literature. *Am J Med Genet*; 62: 305-317
- [42] Robin NH, Feldman GJ, Aronson AL, Mitchell HF, Weksberg R, Leonard CO, Burton BK, Josephson KD, Laxová R, Aleck KA, Allanson JE, Guion-Almeida ML, Martin RA, Leichtman LG, Price RA, Opitz JM, Muenke M (1995) Opitz syndrome is genetically heterogeneous, with one locus on Xp22, and a second locus on 22q11.2. *Nat Genet*; 11: 459-461.
- [43] Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EI, Berger W, Feldman GJ, Volta M, Andolfi G, Gilgenkrantz S, Marion RW, Hennekam RC, Opitz JM, Muenke M, Ropers HH, Ballabio A (1997) Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet*; 17: 285-291
- [44] Gaudenz K, Roessler E, Quaderi N, Franco B, Feldman G, Gasser DL, Wittwer B, Horst J, Montini E, Opitz JM, Ballabio A, Muenke M (1998) Opitz G/BBB syndrome in Xp22: mutations in the MID1 gene cluster in the carboxy-terminal domain. *Am J Hum Genet*; 63: 703-710
- [45] Meroni G und Diez-Roux G (2005) TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays*; 27(11): 1147-1157
- [46] Cox TC, Allen LR, Cox LL, Hopwood B, Goodwin B, Haan E, Suthers GK (2000) New mutations in MID1 provide support for loss of function as the cause of X-linked Opitz syndrome. *Hum Mol Genet*; 9: 2553-62
- [47] Short KM, Hopwood B, Yi Z, Cox TC (2002) MID1 and MID2 homo- and heterodimerise to tether the rapamycin-sensitive PP2A regulatory subunit, alpha 4, to microtubules: implications for the clinical variability of X-linked Opitz GBBB syndrome and other developmental disorders. *BMC Cell Biol*; 3: 1
- [48] Buchner G, Montini E, Andolfi G, Quaderi N, Cainarca S, Messali S, Bassi MT, Ballabio A, Meroni G, Franco B (1999) MID2, a homologue of the Opitz syndrome gene MID1: similarities in subcellular localization and differences in expression during development. *Hum Mol Genet*; 8: 1397-1407

- [49] Schweiger S, Foerster J, Lehmann T, Suckow V, Muller YA, Walter G, Davies T, Porter H, van Bokhoven H, Lunt PW, Traub P, Ropers HH (1999) The Opitz syndrome gene product, MID1, associates with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96: 2794-2799.
- [50] Cainarca S, Messali S, Ballabio A, Meroni G (1999) Functional characterization of the Opitz syndrome gene product (midin): evidence for homodimerization and association with microtubules throughout the cell cycle. *Hum Mol Genet*; 8: 1387-1396
- [51] Schweiger S und Schneider R (2003) The MID1/PP2A complex: a key to the pathogenesis of Opitz BBB/G syndrome. *Bioessays*; 25: 356-366
- [52] Liu J, Prickett TD, Elliott E, Meroni G, Brautigan DL (2001) Phosphorylation and microtubule association of the Opitz syndrome protein mid-1 is regulated by protein phosphatase 2A via binding to the regulatory subunit alpha 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98: 6650-6655
- [53] Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, Winter J, Krauss S, Ropers HH, Schneider R, Schweiger S (2001) MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet*; 29: 287-94
- [54] Pickart CM und Eddins MJ (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*; 1695: 55-72
- [55] Naujokat C und Hoffmann S (2002) Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest*; 82: 965-980
- [56] Bach I und Ostendorff HP (2003) Orchestrating nuclear functions: ubiquitin sets the rhythm. *Trends Biochem Sci*; 28: 189-195
- [57] Boix-Perales H, Horan I, Wise H, Lin HR, Chuang LC, Yew PR, Philpott (2007) The E3 ubiquitin ligase skp2 regulates neural differentiation independent from the cell cycle. *A Neural Dev*; 2: 27
- [58] Tuoc TC und Stoykova A (2008) Trim11 modulates the function of neurogenic transcription factor Pax6 through ubiquitin-proteasome system. *Genes Dev*; 22: 1972-1986
- [59] Brooks SA (2010) Functional interactions between mRNA turnover and surveillance and the ubiquitin proteasome system. *Wiley Interdiscip Rev RNA*; 1: 240-252

- [60] Hershko A (1996) Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci*; 21: 445-449
- [61] Jentsch S (1992) The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet*; 26: 179-207
- [62] Laney JD und Hochstrasser M (1999) Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell*; 97: 427-430
- [63] Sontag E (2001) Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell Signal*; 13: 7-16
- [64] Pinson L, Augé J, Audollent S, Mattéi G, Etchevers H, Gigarel N, Razavi F, Lacombe D, Odent S, Le Merrer M, Amiel J, Munnich A, Meroni G, Lyonnet S, Vekemans M, Attié-Bitach T (2004) Embryonic expression of the human MID1 gene and its mutations in Opitz syndrome. *J Med Genet*; 41: 381-386
- [65] Dal Zotto L, Quaderi NA, Elliott R, Lingerfelter PA, Carrel L, Valsecchi V, Montini E, Yen CH, Chapman V, Kalcheva I, Arrigo G, Zuffardi O, Thomas S, Willard HF, Ballabio A, Disteche CM, Rugarli EI (1998) The mouse Mid1 gene: implications for the pathogenesis of Opitz syndrome and the evolution of the mammalian pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet*; 7: 489-499
- [66] Richman JM, Fu KK, Cox LL, Sibbons JP, Cox TC (2002) Isolation and characterisation of the chick orthologue of the Opitz syndrome gene, Mid1, supports a conserved role in vertebrate development. *Int J Dev Biol*; 46: 441-448
- [67] Suzuki M, Hara Y, Takagi C, Yamamoto TS, Ueno N (2010) MID1 and MID2 are required for *Xenopus* neural tube closure through the regulation of microtubule organization. *Development*; 137: 2329-2339
- [68] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 74: 5463-5467
- [69] Wilkinson, D.G: Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos. In: (D.G. Wilkinson, ed) *In situ hybridization: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1992, pp 75-83
- [70] Ohnuma S, Mann F, Boy S, Perron M, Harris WA (2002) Lipofection strategy for the study of *Xenopus* retinal development. *Methods*; 28: 411-419
- [71] Nutt SL, Bronchain OJ, Hartley KO, Amaya E (2001) Comparison of morpholino based translational inhibition during the development of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Genesis*; 30: 110-113

- [72] Perron M, Harris WA (2000) Retinal stem cells in vertebrates. *Bioessays*; 22(8): 685-688
- [73] Zaghoul NA, Moody SA (2007) Alterations of rx1 and pax6 levels at neural plate stages differentially affect the production of retinal cell types and maintenance of retinal stem cell qualities. *Dev Biol*; 306: 222-240
- [74] George DG, Barker WC, Hunt LT (1990) Mutation data matrix and its uses. *Methods Enzymol*; 183: 333-351
- [75] Sander C und Schneider R (1991) Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins*; 9: 56-68
- [76] Latta, E, Saffrey J, Golding J (2008) Midline1 and the development of the cranial peripheral nervous system. In: Joint meeting of the British and Spanish Developmental Biology Societies, Seville, Spain
- [77] Granata A, Savery D, Hazan J, Cheung BM, Lumsden A, Quaderi NA (2005) Evidence of functional redundancy between MID proteins: implications for the presentation of Opitz syndrome. *Dev Biol*; 277: 417-424
- [78] Landry JR und Mager DL (2002) Widely spaced alternative promoters, conserved between human and rodent, control expression of the Opitz syndrome gene MID1. *Genomics*; 80: 499-508
- [79] Sanyanusin P, McNoe LA, Sullivan MJ, Weaver RG, Eccles MR (1995) Mutation of PAX2 in two siblings with renal-coloboma syndrome. *Hum Mol Genet*; 4: 2183-2184
- [80] Thanos S, Püttmann S, Naskar R, Rose K, Langkamp-Flock M, Paulus W (2004) Potential role of Pax-2 in retinal axon navigation through the chick optic nerve stalk and optic chiasm. *J Neurobiol*; 59: 8-23
- [81] Stanke J, Moose HE, El-Hodiri HM, Fischer AJ (2010) Comparative study of Pax2 expression in glial cells in the retina and optic nerve of birds and mammals. *J Comp Neuro*; 518: 2316-2333
- [82] Bhattacharjee J und Sanyal S (1975) Developmental origin and early differentiation of retinal Müller cells in mice. *J Anat*; 120: 367-372
- [83] Meller K, Tetzlaff W (1976) Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. *Cell Tissue Res*; 170: 145-159
- [84] Ashery-Padan R und Gruss P (2001) Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr Opin Cell Biol*; 13: 706-714

- [85] Hirsch N und Harris WA (1997) *Xenopus Pax-6 and retinal development. J Neurobiol*; 32: 45-61
- [86] Winter J, Lehmann T, Suckow V, Kijas Z, Kulozik A, Kalscheuer V, Hamel B, Devriendt K, Opitz J, Lenzner S, Ropers HH, Schweiger S (2003) Duplication of the MID1 first exon in a patient with Opitz G/BBB syndrome. *Hum Genet*; 112: 249-254
- [87] Winter J, Kunath M, Roepcke S, Krause S, Schneider R, Schweiger S (2007) Alternative polyadenylation signals and promoters act in concert to control tissue-specific expression of the Opitz Syndrome gene MID1. *BMC Mol Biol*; 8: 105
- [88] Aranda-Orgillés B, Trockenbacher A, Winter J, Aigner J, Köhler A, Jastrzebska E, Stahl J, Müller EC, Otto A, Wanker EE, Schneider R, Schweiger S (2008) The Opitz syndrome gene product MID1 assembles a microtubule-associated ribonucleoprotein complex. *Hum Genet*; 123: 163-176
- [89] Aranda-Orgillés B, Rutschow D, Zeller R, Karagiannidis AI, Köhler A, Chen C, Wilson T, Krause S, Roepcke S, Lilley D, Schneider R, Schweiger S (2011) Protein phosphatase 2A (PP2A)-specific ubiquitin ligase MID1 is a sequence-dependent regulator of translation efficiency controlling 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK-1). *J Biol Chem*; 286: 39945-39957
- [90] Dierssen M, Fedrizzi L, Gomez-Villafuertes R, de Lagran MM, Gutierrez-Adan A, Sahún I, Pintado B, Oliveros JC, Dopazo XM, Gonzalez P, Brini M, Mellström B, Carafoli E, Naranjo JR (2012) Reduced Mid1 Expression and Delayed Neuromotor Development in daDREAM Transgenic Mice. *Front Mol Neurosci*; 5: 58
- [91] Carrión AM, Link WA, Ledo F, Mellström B, Naranjo JR (1999) DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature*; 398: 80-84
- [92] Chavira-Suárez E, Ramírez M, Lamas M (2008) D-Serine/N-methyl-D-aspartate receptor signaling decreases DNA-binding activity of the transcriptional repressor DREAM in Müller glia from the retina. *Neurosci Lett*; 432: 121-126
- [93] Zuber ME, Perron M, Philpott A, Bang A, Harris WA (1999) Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of XOptx2. *Cell*; 98: 341-352
- [94] Lancioni A, Pizzo M, Fontanella B, Ferrentino R, Napolitano LM, De Leonibus E, Meroni G (2010) Lack of Mid1, the mouse ortholog of the Opitz syndrome gene, causes abnormal development of the anterior cerebellar vermis. *J Neurosci*; 30: 2880-2887

- [95] Pinson J, Simpson TI, Mason JO, Price DJ (2006) Positive autoregulation of the transcription factor Pax6 in response to increased levels of either of its major isoforms, Pax6 or Pax6(5a), in cultured cells. *BMC Dev Biol*; 6: 25
- [96] McMahon AP (2000) More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell*; 100(2): 185-188
- [97] Roessler E, Muenke M (2003) How a Hedgehog might see holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*; 12 Spec No 1:R15-25.
- [98] Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*; 383: 407-413
- [99] Macdonald R, Barth KA, Xu Q, Holder N, Mikkola I, Wilson SW (1995) Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development*; 121: 3267-3278
- [100] Take-uchi M, Clarke JD, Wilson SW (2003) Hedgehog signalling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of Vax gene activity. *Development*; 130: 955-968
- [101] Hallonet M, Hollemann T, Pieler T, Gruss P (1999) Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes Dev*; 13: 3106-3114
- [102] Granata A und Quaderi NA (2003) The Opitz syndrome gene MID1 is essential for establishing asymmetric gene expression in Hensen's node. *Dev Biol*; 258: 397-405
- [103] Côté GB, Katsantoni A, Papadakou-Lagoyanni S, Costalos C, Timotheou T, Skordalakis A, Deligeorgis D, Pantelakis S (1981) The G syndrome of dysphagia, ocular hypertelorism and hypospadias. *Clin Genet*; 19: 473-478
- [104] So J, Suckow V, Kijas Z, Kalscheuer V, Moser B, Winter J, Baars M, Firth H, Lunt P, Hamel B, Meinecke P, Moraine C, Odent S, Schinzel A, van der Smagt JJ, Devriendt K, Albrecht B, Gillessen-Kaesbach G, van der Burgt I, Petrij F, Faivre L, McGaughran J, McKenzie F, Opitz JM, Cox T, Schweiger S (2005) Mild phenotypes in a series of patients with Opitz GBBB syndrome with MID1 mutations. *Am J Med Genet A*; 132A: 1-7
- [105] De Falco F, Cainarca S, Andolfi G, Ferrentino R, Berti C, Rodríguez Criado G, Rittinger O, Dennis N, Odent S, Rastogi A, Liebelt J, Chitayat D, Winter R, Jawanda H, Ballabio A, Franco B, Meroni G (2003) X-linked Opitz syndrome:

- novel mutations in the MID1 gene and redefinition of the clinical spectrum. *Am J Med Genet A*; 120A(2): 222-228
- [106] Fontanella B, Russolillo G, Meroni G (2008) MID1 mutations in patients with X-linked Opitz G/BBB syndrome. *Hum Mutat*; 29(5): 584-594
- [107] Altshuler DM, Turner DL, Cepko CL: Specification of cell type in the vertebrate retina. In: M.-K. Lam D und Shatz CJ: *Development of the Visual System*, The MIT Press, Cambridge, 1991, pp. 37-58
- [108] Ohsawa R, Kageyama R (2008) Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res*; 1192: 90-98
- [109] Ohnuma S, Hopper S, Wang KC, Philpott A, Harris WA (2002) Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development*; 129: 2435-2446
- [110] Hsieh YW und Yang XJ (2009) Dynamic Pax6 expression during the neurogenic cell cycle influences proliferation and cell fate choices of retinal progenitors. *Neural Dev*; 4: 32
- [111] Wang JC und Harris WA (2005) The role of combinatorial coding by homeodomain and bHLH transcription factors in retinal cell fate specification. *Dev Biol*; 285: 101-115

7. Thesen

1. Das Midline1-Protein ist evolutionär stark konserviert. Dies zeigt sich anhand der großen Identität von 93 % zwischen der menschlichen und der *Xenopus laevis*-Midline1-Aminosäuresequenz.
2. Midline1 wird von Beginn der Entwicklung an in *Xenopus laevis*-Embryonen exprimiert. Der Level der Gen-Expression steigt im Laufe der Entwicklung an.
3. Eine Gen-Expression in zeitlich ansteigenden *Xenopus laevis*-Stadien konnte auch für Midline2 gezeigt werden. Die früh-embryonale Expression fällt im Vergleich zu Midline1 dagegen wesentlich geringer aus.
4. Das Expressionsmuster von Midline1 wurde in verschiedenen Organen von *Xenopus laevis* analysiert. Es wurde in allen untersuchten Organen nachgewiesen, sodass von einer ubiquitären Expression ausgegangen werden kann. Eine ubiquitäre Expression wurde auch in anderen Vertebraten wie Mensch, Maus und Huhn beschrieben [64,65,66].
5. Midline1 hat ein spezifisches Expressionsmuster im Verlauf der Augenentwicklung. In frühen Entwicklungsstadien liegt eine Expression im gesamten Augenbläschen vor. Anschließend verlagert sich die Expression auf ventrale Augenanteile (NF Stadium 33-38).
6. Die Expression von Midline1 in den ventralen Augenstrukturen legt nahe, dass es einen Einfluss auf die Regionalisierung des Auges hat.
7. Das Expressionsmuster von Midline1 weist Charakteristika der Pax6- und Pax2-Expression auf.
8. Ein Midline1-Funktionsverlust verursacht eine signifikante Vergrößerung und Ballonierung des Augenbläschens (NF 28).
9. In späteren Entwicklungsstadien (NF 36) entsteht nach Midline1-Knockdown eine Faltenbildung der Retina.
10. Eine Interaktion von Pax6 und Midline1 ist annehmbar, da überlappende Expressionsdomänen vorliegen und eine Zunahme des Pax6-Levels auf mRNA- und Proteinebene nach Midline1-Knockdown gezeigt werden konnte.
11. Midline1 übt zellautonom Einfluss auf die Differenzierung retinaler Progenitorzellen aus. Es werden vermehrt Photorezeptoren gebildet. Die Bipolarzellen sind dagegen deutlich reduziert.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Swantje Ihle
Geburtsdatum	16.09.1985
Geburtsort	Pirna
Nationalität	deutsch
Adresse	Rintheimer Straße 45, 76131 Karlsruhe
Telefon	0176/23912071
E-Mail	swantje.ihle@web.de
Familienstand	ledig

Beruflicher Werdegang

11/2011-07/2012	Assistenzärztin für Innere Medizin Schwerpunkt Nephrologie Städtisches Klinikum Karlsruhe
08/2012-05/2013	Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe Vinzentius Krankenhaus Landau
Seit 06/2013	Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe Universitätsklinikum Mannheim

Ausbildung

Medizinstudium	
10/2004-05/2011	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Praktisches Jahr

10/2010-01/2011	Klinik für Allgemein-und Viszeralchirurgie, Universitätsklinikum Fort-de-France, Martinique
06-10/2010	Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik für Kinderkardiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

02-06/2010	Abteilung für Innere Medizin, Hopital Riviera, Vevey (Schweiz)
Famulaturen	
03/2009	Innere Medizin, Dr. med. Jens Papke, Neustadt/Sachsen
07/2008	Sportmedizin, Orthopädie-Ambulanz, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden
03/2008	Anästhesie, Clinique de la Sauvegarde, Lyon (Frankreich)
08/2007	Gynäkologie, Gemeinschaftspraxis Dr. med. Kersten Deutschmann und Kathrin von Ardenne, Dresden
03/2007	Innere Medizin, St. Theresien-Krankenhaus, Nürnberg
Abitur	
09/1996-06/2004	Kreuzgymnasium Dresden

Ort, Datum

Unterschrift

9. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, das ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, das ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 15 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Ort und Datum

Unterschrift

10. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass es keine früheren Promotionsversuche gegeben hat und die vorliegende Arbeit somit den ersten von mir unternommenen Promotionsversuch darstellt.

Ort und Datum

Unterschrift

11. Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. T. Hollemann danke ich für die fachliche Unterstützung während der Laborarbeiten in Halle und die Bereitstellung der benötigten Mittel. Die konstruktiven Gespräche während meines Auslandsaufenthaltes und bei der schriftlichen Anfertigung der Arbeit waren eine große Bereicherung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, da sie mir immer Zuversicht und Motivation für das Gelingen der Arbeit vermittelt haben und ohne deren Unterstützung das Medizinstudium und diese Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären.

Dem Laborteam aus der Hollystraße möchte ich für die vielen wertvollen Ratschläge und ihre Geduld danken.

Muriel Perron und ihr Team der Retinogenese in Paris haben mich die Technik der Lipofektion gelehrt, die meine Arbeit um einen interessanten Teil bereichert hat. Sie und ihr Team haben mir bei allen Fragen immer unterstützend zur Seite gestanden, deshalb gilt ein großer Dank auch ihnen. (Je remercie Muriel Perron et son équipe de Rétinogénèse à Paris. Muriel et son équipe ont toujours été à mes côtés pour m'aider et me soutenir durant les travaux laboratoires, ainsi que durant la période de réflexion sur les résultats. Ils m'ont appris la technique de la lipofection, qui a enrichi ma thèse. Ils m'ont permis d'élargir et d'ouvrir mon regard scientifique, ce qui m'a beaucoup aidé durant la préparation de cette thèse).

Schließlich möchte ich meinem Verlobten danken, der mir den Rücken frei gehalten und mich stets bestärkt hat, die Arbeit zu einem guten Ende zu bringen.