

Die Rolle des Notch- Signalweges im Prozess der Somitogenese

Von Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades:
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von
Diplombiochemikerin Juliane Hochschild
geboren am 3. Juni 1980 in Jena

2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01. 11. 2004 bis zum 18.08.2008 an der Medizinischen Hochschule im Institut für Molekularbiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Achim Gossler angefertigt.

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Achim Gossler

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller

Tag der Promotion: 05.11.2008

οίδα ουκ ειδός

Sokrates

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungen	VII
1. Zusammenfassung	1
2. Summary	2
3. Einleitung	3
3.1 Die Somitenbildung	4
3.1.1 Die Rekrutierung von Zellen ins paraxiale Mesoderm	4
3.1.2 Die Organisation dieser Zellen in Somitomere	7
3.1.3 Die Segmentierung der Somitomere in morphologisch abgrenzbare Metamere	10
3.1.4 Die Differenzierung der Somiten	11
3.2 Der Notch- Signalweg	15
3.3 Zyklische Genaktivität	18
3.4 Der Wnt- Signalweg	21
3.5 Der Fgf- Signalweg	22
3.6 Die Wechselwirkungen dem Notch-, Fgf- und Wnt- Signalweg	24
3.6.1 Die Regulation des bHLH Transkriptionsfaktors Hes7	25
3.6.2 Die Regulation des bHLH Transkriptionsfaktors Mesp2	26
3.7 Das aktuelle Modell der Regulation der Grenzenbildung	27
3.8 Funktionen des Notch- Signalweges im PSM	29
4. Materialien und Methoden	31
4.1 Allgemeine Lösungen	31
4.2 Embryologische Methoden	31
4.2.1 verwendete Mäuse	31
4.2.2 Genotypisierung der Mäuse	33
4.2.3 Isolation von Embryonen	34
4.2.4 DNA- Präparation aus Dottersäcken	35
4.2.5 Schwanzhälftenkulturen	35
4.3 Histologische Methoden	35
4.3.1 LacZ Färbung	35
4.3.2 Ganzobjekt Antikörperfärbung zur Detektion der Notch1 Aktivierung (Val1744)	36

4.3.3	Paraffineinbettung von Embryonen	37
4.3.4	Plastikeinbettung von Embryonen	38
4.3.5	Hämatoxylin/ Eosin Färbung von Plastikpräparaten	38
4.3.6	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	38
4.3.7	Skelettpräparation	39
4.4	RNA Methoden	40
4.4.1	Isolation von RNA aus Mausembryonen	40
4.4.2	Reverse Transkription von RNA in cDNA	40
4.4.3	Herstellung von RNA- Sonden für die in situ Hybridisierung	41
4.4.4	Die verwendete RNA- Sonden	41
4.4.5	Ganzpräparat in situ Hybridisierung	42
4.5	Bakterienmethoden	44
4.5.1	Bakteriennährmedien	44
4.5.2	Herstellung elektrisch kompetenter Bakterien	44
4.6	DNA Methoden	45
4.6.1	Präparation von Plasmid DNA	45
4.6.2	Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen	46
4.6.3	Agarose- Gelelektrophorese von DNA- Fragmenten	46
4.6.4	Isolierung von DNA- Fragmenten aus einem Agarosegel	46
4.6.5	Isolierung und Analyse von DNA- Fragmenten	47
4.6.6	Genotypisierung mittels Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)	49
4.6.7	Herstellung eigener Matrizen zur RNA Synthese für die Ganzpräparat in situ Hybridisierung	49
4.7	Protein Methoden	50
4.7.1	SDS- Gelelektrophorese	50
4.7.2	Western Blot Analyse	52
4.7.3	Strippen der Membran	53
5.	Ergebnisse	54
5.1	Die Charakterisierung der verwendeten Cre Mäuse	55
5.2	Die Expression von NICD in Tstreak::Cre, Rosa ^{NICD} Embryonen	57
5.3	Somitengrenzen in Embryonen mit gestörtem Notch- Signalweg	59
5.4	Die Expression von Mesp2 und zyklische Zielgene des Notch- Signalweges	61
5.5	Die Aktivierung von endogenem Notch1	65
5.6	Die Funktion von Lfng für den Notch- Signalweg	67

5.7	Die Auswirkungen von endogenem Notch1 auf die Somitenbildung in T-NICD Embryonen	68
5.8	Die Auswirkungen von endogenem Dll1 auf die Somitenbildung in T-NICD Embryonen	71
5.9	Die AP- Polarität in T-NICD und Rbp-Jk ^{-/-} Embryonen	74
5.10	Die Expression von NICD und Zielgenen des Notch- Signalweges in Msd::Cre; RosaNICD Embryonen	77
5.11	Die AP- Polarität in Msd-NICD Embryonen	79
5.12	Die Auswirkungen der AP- Defekte auf die Skelettentwicklung von Msd-NICD und Dll1 ^{-/-} Embryonen	82
5.13	Die Auswirkungen von Mutationen im Notch- Signalweg auf den Wnt- und den Fgf- Signalweg	84
6.	Diskussion	88
6.1	Die Rolle des Notch- Signalweges im PSM	88
6.2	Die Etablierung der AP- Polarität	90
6.3	Die AP- Polarität in Msd-NICD Embryonen	91
6.4	Die Rolle von Rbp-Jk in der Etablierung der AP- Polarität	93
6.5	Der Phänotyp von Rbp-Jk ^{-/-} Embryonen	95
6.6	Die Auswirkung der AP- Polarität auf die Skelettentwicklung	96
6.7	Die Musterung des PSMs in T-NICD Embryonen	97
6.8	Die Wirkung von exogenem NICD und Lfng auf die Aktivierung von endogenem Notch1	98
6.9	Die Wechselwirkungen zwischen dem Notch-, Wnt- und Fgf- Signalweg	100
6.10	Der Einfluss des Wnt-, Notch-, und Fgf- Signalweges auf die Bildung von Somitengrenzen	103
7.	Literatur	105
8.	Danksagung	122
9.	Erklärung	123
10.	Lebenslauf	124

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
AP	anterior- posterior
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
B	Base(n)
bidest.	bidestilliert
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c	centi-
cDNA	komplementäre DNA
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
DV	dorsoventral
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis- (β - aminoethylether) N, N, N', N'- tetraacetsäure
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GFP	green- fluorescent-protein
GTP	Guanosintriphosphat
i.g.R.	in gleicher Reihenfolge
IPTG	Isopropyl- β - D- thiogalaktosid
k	kilo-
l	Liter
<i>lacZ</i>	β - Galaktosidase
LB	Luria- Bertani- Medium
m	milli-
M	Mol pro Liter
μ	mikro-
min	Minuten
mRNA	Boten- RNA
Msd- LacZ	Msd::Cre, Rosa ^{LacZ}
Msd-NICD	Msd::Cre, Rosa ^{NICD}
n	nano-
n=	Anzahl der analysierten Embryonen
NICD	Notch1 intrazelluläre Domäne
OD	Optische Dichte

p	piko-
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Psen	Presinilin
PSM	präsomitisches Mesoderm
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase Inhibitor
RT	Raumtemperatur
SDS	Dodecylsulfatnatriumsalz
sec	Sekunden
ssDNA	Einzelstrang- DNA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethyldiamin
T-LacZ	T::Cre, Rosa ^{LacZ}
T-NICD	T::Cre, Rosa ^{NICD}
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
U	Units (Einheiten)
ü.N.	über Nacht
rpm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumenanteile
x	- fach
X- Gal	5- Bromo- 4- chloro- 3- indolyl- β- D- galaktosid
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1. Zusammenfassung

Durch den Prozess der Somitogenese wird das präsomitische Mesoderm (PSM) der Wirbeltiere in regelmäßige Segmente, die Somiten, unterteilt. Die Somitengrenzen, sowie die antero- posteriore (AP) Polarität innerhalb der Somiten, stellen die Grundlage für den metameren Aufbau des axialen Skeletts dar. Nach aktuellen Modellen soll der Notch-Signalweg, speziell die Konfrontation von Domänen mit und ohne aktives Notch1, in Mausembryonen die Grundlage für die Ausbildung von Somitengrenzen sein. Des Weiteren soll die AP- Polarität der Somiten im anterioren PSM etabliert und endgültig festgelegt werden. Auch an diesem Prozess ist der Notch- Signalweg maßgeblich beteiligt. Ferner soll die Bildung von Somitengrenzen an die AP- Polarität gekoppelt sein.

Um die Bedeutung des Notch- Signalweges für oben genannte Prozesse zu untersuchen, wurde eine aktive Form von Notch1 (NICD) im PSM und in den Somiten überexprimiert. Im Widerspruch zu den publizierten Modellen bildeten Embryonen mit ektopisch exprimiertem NICD bis zu 18 Somitengrenzen bevor sie, vermutlich infolge kardiovaskulärer Defekte, starben. Auch Embryonen, in denen Notch nicht mehr aktiviert wird, bildeten mehr als 15 Somitengrenzen. Hingegen wiesen alle analysierten mutanten Embryonen eine Störung der AP- Polarität innerhalb der Somiten auf. Demzufolge scheint der Notch- Signalweg in Mäusen nicht für die Ausbildung von Somitengrenzen benötigt zu werden, woraus folgt, dass die Konfrontation von Domänen mit und ohne Notch1 Aktivität nicht die Grundlage für die Bildung von Somitengrenzen darstellen kann. Auch kann die Etablierung der AP- Polarität der Somiten keine Voraussetzung für die Grenzenbildung sein. Ebenfalls konnte in dieser Arbeit durch die Überexpression von NICD im anterioren PSM gezeigt werden, dass die AP- Polarität in den neu gebildeten Somiten zwar im anterioren PSM etabliert wird, aber in neu gebildeten Somiten noch veränderlich ist.

Des Weiteren wurde der Einfluss des Notch- Signalweges auf den Fgf- und den Wnt- Signalweg, welche auch eine Rolle in der Somitogenese spielen, untersucht. Im Widerspruch zu Modellen, die eine übergeordnete Rolle des Fgf- Signalweges auf Notch sehen, wurde die Expression der Fgf Zielgene *Sprouty2* und *Snail1* durch den Notch- Signalweg beeinflusst. Die Expression der Wnt Zielgene *Axin2* und *Dact1* schien hingegen nicht beeinträchtigt zu sein. Folglich scheint der Notch- Signalweg in Mäusen den Fgf-, nicht aber den Wnt- Signalweg zu beeinflussen.

Stichwörter: Somitogenese, Notch, Maus

2. Summary

Through the process of somitogenesis the presomitic mesoderm (PSM) is subdivided into segments, called somites. Somite borders, as well as anterior- posterior (AP) polarity within the somites, are a prerequisite for the metameric organization of the axial skeleton. According to current models the Notch pathway, in particular the confrontation of domains with and without Notch activity, is essential of somite border formation. Further the intrasomitic AP polarity is established and determined in the anterior PSM and Notch pathway plays an essential role in this process as well. It is believed that the formation of somite borders is linked to the establishment of AP polarity.

To test the significance of the Notch pathway in the processes mentioned above, an active form of Notch (NICD) was expressed ectopically in the PSM and somites. In contrast to previous models, embryos ectopically expressing NICD formed up to 18 somite borders before dying, most likely due to cardiovascular defects. Also embryos without Notch1 activity formed more than 15 somites. However in all analysed mutant embryos AP polarity was disrupted. Thus the Notch pathway seems not to essential for the formation of somite borders in mouse embryos. Hence the confrontation for domains with and without Notch activity can not be prerequisite for somite border formation and the establishment of AP polarity is not required for somite border formation. Additionally overexpression of NICD in the anterior PSM showed that AP polarity is established in this region but can still be modified in newly formed somites.

Furthermore the influence of the Notch pathway on Fgf und Wnt, which play a role in somitogenesis as well, was analysed. In contrast to models proposing the Fgf pathway to act upstream of Notch, the expression of the Fgf targets *Sprouty2* and *Snail1* was altered by the Notch pathway. In contrast the expression of the Wnt targets *Axin2* and *Dact1* seemed not affected. Thus in mice the Notch pathway seems to influence the Fgf, but not the Wnt pathway.

Keywords: somitogenesis, Notch, mouse

3. Einleitung

Der segmentale Aufbau des Körpers ist ein Charakteristikum zahlreicher Tierspezies. So weisen sowohl Vertebraten, bei denen die Segmentierung durch die Struktur der Wirbelsäule leicht sichtbar ist, als auch Invertebraten einen metameren Aufbau auf. Bei Vertebraten ist diese Segmentierung der Körperachse auf die Bildung von Somiten während der Embryonalentwicklung zurückzuführen. Somiten sind epitheliale Strukturen, die paarweise auf beiden Seiten des Neuralrohrs angelegt werden. Sie sind die Vorläufer der Wirbelkörper, welche namensgebend für die Klasse der Wirbeltiere (Vertebraten) sind, der Rippen, der Neuralbögen und der gesamten quergestreiften Muskulatur der Extremitäten und des Rumpfes (Brand- Saberi et al. 1996). Weiterhin tragen Somiten zur Bildung von Endothelien der Blutgefäße und Angioblasten bei (Wilting et al. 1995) und bewirken durch ihre metamere Anordnung die segmentale Organisation des peripheren Nervensystem (Rickmann et al. 1985).

Im dem Prozess der Somitenbildung, der Somitogenese, spielt der Notch- Signalweg eine wesentliche Rolle. So weisen Mausembryonen mit gestörtem Notch- Signalweg Segmentierungsdefekte auf (Conlon et al. 1995; Oka et al. 1995; Hrabe de Angelis et al. 1997; Wong et al. 1997; Evrard et al. 1998; Kusumi et al. 1998; Zhang and Gridley 1998; Bessho et al. 2001b; Shi and Stanley 2003). Ebenso konnten auch menschliche Krankheiten wie beispielsweise die Spondylokostale Dysostosis auf Defekte im Notch- Signalweg zurückgeführt werden (Spranger and Superti- Furga 2007). Neben dem Notch-, sind auch der Wnt- und der Fgf- Signalweg für die Regulation der Somitogenese wichtig. Welche konkrete Rolle jeder dieser Signalwege im Prozess der Somitogenese spielt und wie sich diese Signalwege gegenseitig beeinflussen, ist aber umstritten.

Aus diesem Grund wurde die Rolle des Notch- Signalweges in der Somitogenese und der Einfluss von Notch auf den Wnt- und den Fgf- Signalweg in dieser Arbeit genauer analysiert. Dazu wird in den folgenden Kapiteln zunächst vorgestellt, welche Aspekte über den Prozess der Somitenbildung bereits bekannt sind. Anschließend werden der Notch-, Fgf- und Wnt- Signalweg vorgestellt. Abschließend wird das momentan gängige Modell der Regulation der Somitenbildung in Mäusen erläutert.

3.1 Die Somitenbildung

Der Prozess der Somitogenese kann in vier Abschnitte gegliedert werden (Gossler 2002).

- 1.) Die Rekrutierung von Zellen in das paraxiale Mesoderm.
- 2.) Die Organisation dieser Zellen in Somitomere (Meier 1979).
- 3.) Die Segmentierung der Somitomere in morphologisch abgrenzbare Metamere.
- 4.) Die Differenzierung der Somiten in verschiedene embryonale Strukturen.

3.1.1 Die Rekrutierung von Zellen ins paraxiale Mesoderm

Das paraxiale Mesoderm, aus dem die Somiten entstehen, wird während der Gastrulation gebildet. Diese beginnt bei der Maus 6,5 Tage nach der Befruchtung (post coitum, p.c., Embryonalstadium E6.5) und führt zur Ausbildung der drei Keimblätter, dem Ektoderm, dem Entoderm und dem Mesoderm. Während der Gastrulation wandern Zellen aus dem Inneren des Eizylinders, dem so genannten Epiblasten, durch einen Bereich, der als Primitivstreifen bezeichnet wird, und lagern sich zwischen dem Epiblasten und dem außen liegenden visceralen Entoderm ein (Abb. 1). Diese Zellen entwickeln sich im weiteren Verlauf zu Mesodermzellen. Außerdem wandern einige Epiblastzellen in das viscerele Entoderm ein und ersetzen dieses schrittweise. Aus diesen Zellen wird später das endgültige Entoderm. Die verbleibenden Epiblastzellen bilden das Ektoderm.

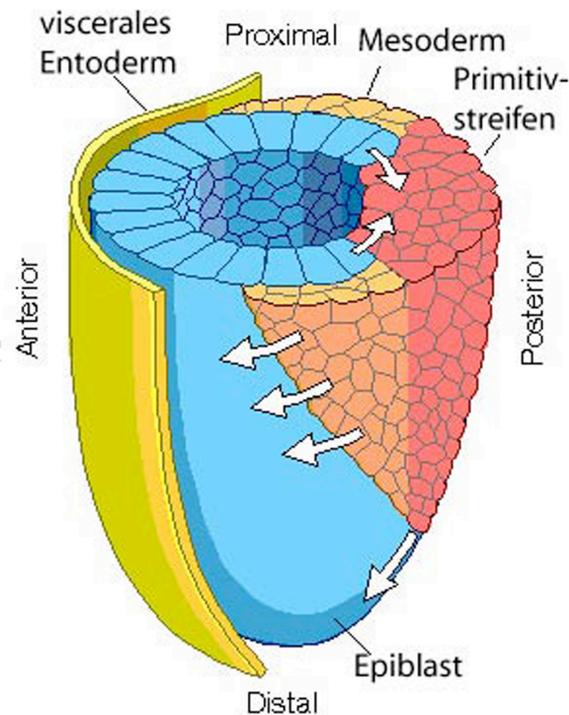


Abbildung 1: Die Bildung mesodermaler Zellen. Epiblastzellen (blau) wandern durch den Primitivstreifen (rot) aus und bilden das embryonale Mesoderm (orange) oder das embryonale Entoderm. Dargestellt ist ein Becherkeim etwa 6 1/2 Tage nach der Befruchtung Abbildung entnommen aus (Wolpert 1999) und verändert.

Das Mesoderm lässt sich in vier verschiedene Kompartimente unterteilen: axiales, paraxiales, intermediäres und Seitenplattenmesoderm (Christ and Ordahl 1995) (Abb. 2). Aus dem axialen Mesoderm bilden sich der Kopffortsatz und die Chorda dorsalis, welche auch als Notochord bezeichnet wird und namensgebend für die Chordatiere ist. Das intermediäre Mesoderm stellt das Zellmaterial für die Ausbildung der Urogenitalanlage zur Verfügung. Das Seitenplattenmesoderm entwickelt sich zu zahlreichen Geweben, wie zum Beispiel der glatten Muskulatur der Blutgefäße und des Verdauungstraktes, sowie zum Herzmuskelgewebe (Christ and Ordahl 1995). Nur das paraxiale Mesoderm hat das Potential, Somiten zu bilden. Es befindet sich auf beiden Seiten des Notochords und des Neuralrohres. Das paraxiale Mesoderm kann weiter in die bereits gebildeten Somiten und einen noch unsegmentierten Bereich unterteilt werden. Dieser Bereich, welcher einen mesenchymalen, lockeren Zellverband darstellt, wird als präsomitisches Mesoderm (PSM) bezeichnet.

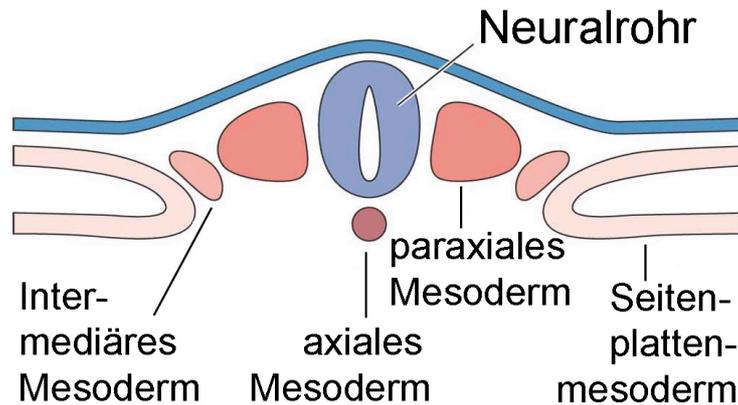


Abbildung 2: Die Unterteilung des Mesoderms. Dargestellt ist ein Querschnitt durch einen Embryo etwa 8,5 Tage nach der Befruchtung. Das in rot abgebildete Mesoderm lässt sich in paraxiales, axiales, intermediäres und Seitenplattenmesoderm unterteilen. Abbildung entnommen aus (Gilbert 2006). Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Eine Besonderheit einiger Nagetiere ist das so genannte embryonale "Turning" (engl. Drehung; Abbildung 3). Es beginnt in Embryonen mit 6- 8 Somiten (was etwa E8.25 entspricht) und ist in Embryonen mit 14- 16 Somiten (etwa E9.25) abgeschlossen. Das embryonale Turning führt dazu, dass die Inversion der Keimblätter aufgehoben wird. So liegen bei Nagerembryonen vor dem Turning die Ektodermzellen im Inneren des Eizylinders, während die Entodermzellen außen zu liegen kommen.

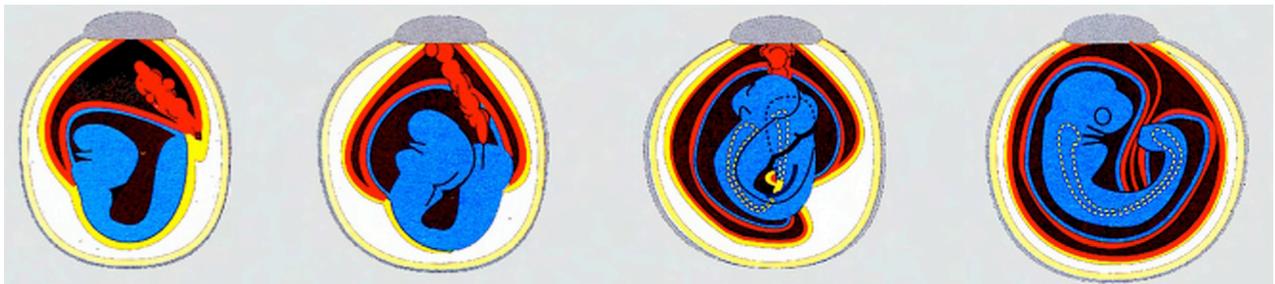


Abbildung 3: Das embryonale Turning. Zwischen dem 6 und dem 16 Somiten Stadium drehen sich die Embryonen. Dadurch wird die zuvor vorliegende Inversion der Keimblätter aufgehoben. Abbildung entnommen aus (Gilbert 2006).

Etwa am Tag 9.5 der Mausentwicklung ist die Gastrulation abgeschlossen und der Primitivstreifen wird zurück gebildet. Dann liefert eine mesenchymale Proliferationszone, die Schwanzknospe, das Zellmaterial für das PSM. Diese ist ein Rudiment des Primitivstreifens und bildet sich am posterioren Ende des Embryos. Auch sie besteht aus undifferenzierten mesenchymalen Zellen, welche die Fähigkeit besitzen, zu zahlreichen Geweben, unter anderem den Somiten, aber auch dem posterioren Anteil des Neuralrohrs zu differenzieren

(Griffith et al. 1992). Aus dieser Proliferationszone treten immer wieder neue Zellen in das PSM ein. Dadurch wird der Zellverlust, der durch die Somitenbildung am kranialen Ende des PSMs entsteht, ausgeglichen, so dass die Länge des PSMs über einen gewissen Zeitraum konstant gehalten werden kann (Tam 1981). Die experimentelle Entfernung der Schwanzknospe führt zu der Beendigung der Somitenbildung, sobald das vorhandene Zellmaterial des PSMs aufgebraucht ist (Tam 1986; Tam and Beddington 1987).

3.1.2 Die Organisation dieser Zellen in Somitomere

Bereits im anterioren PSM sind 6- 7 Somitomere aus losen mesenchymalen Zellen zu erkennen (Meier 1982). Man geht davon aus, dass schon im PSM der Ort der zukünftigen Somitengrenze festgelegt wird.

Die Anzahl der insgesamt gebildeten Somiten hängt vom Organismus ab und ist streng konserviert (Gossler 2002). Wird bei *Xenopus* Embryonen ein Teil der Zellmasse des Mesoderms im Blastula- Stadium entfernt, so entwickeln sich kleinere, aber normal proportionierte Embryonen mit einer normalen Anzahl an Somiten (Cooke 1975). Die Anzahl der Zellen pro Somit ist hingegen reduziert. Das heißt die Reduktion der Zellmasse bei *Xenopus* hat nur eine Auswirkung auf die Größe, nicht aber auf die Anzahl der gebildeten Somiten (Cooke 1975). Dass dieses Prinzip der Konservierung der Somitenzahl auch bei Mäusen zu finden ist, wurde anhand der Mausmutante *Amputated* gezeigt. Diese hat eine kürzere Körperachse, aber die gleiche Anzahl an Somiten wie Wildtyp Embryonen (Flint et al. 1978; Gossler 2002). Auch bei den *Amputated* Embryonen wird diese Konservierung der Somitenzahl durch eine Reduktion der Zellen pro Somit erreicht (Flint et al. 1978; Tam 1981). Folglich scheint es sowohl bei *Xenopus*, als auch bei Mäusen, Mechanismen zu geben die sicherstellen, dass die Anzahl der Somiten in verschiedenen Embryonen gleich ist. Wie allerdings reguliert wird, dass die Reduktion der Körpergröße schon zu Beginn der Entwicklung eine Reduktion der Zellzahl pro Somit bewirkt, ist bis heute unklar.

3.1.2.1 Das ‘clock and wavefront’ Modell

Ein Modell, das versucht diese strenge Regulation, sowie die strikte zeitliche Regelmäßigkeit der Somitenbildung zu erklären, wurde 1976 von Cooke und Zeeman aufgestellt und als ‘clock and wavefront’ (Uhr und Wellenfront) Modell bezeichnet. Dieses besagt, dass der Prozess der Segmentierung durch zwei Faktoren, nämlich einer intrinsischen Uhr (dem so

genannten molekularen Oszillator) und einer Wellenfront reguliert wird. Die Wellenfront durchläuft dabei den Embryo von kranial nach kaudal. Die Zellen, die von der Wellenfront durchlaufen werden, erhalten die Fähigkeit zur Somitenbildung. Die Uhr hingegen kontrolliert, ob die Zellen in einem refraktären oder permissiven Zustand vorliegen. Liegen sie, wenn sie von der Wellenfront durchlaufen werden, in einem permissiven Zustand vor, wird eine Somitengrenze gebildet. Der refraktäre Zustand hingegen verhindert die Bildung einer Grenze.

Ein erster experimenteller Hinweis zur Existenz eines solchen Mechanismus wurde in Hühnern gefunden. So konnte von Palmeirim gezeigt werden, dass die Transkripte von *c-Hairy* im PSM einem periodischen Verlauf folgen (Palmeirim et al. 1997). Die Expression breitete sich innerhalb von 90 min wellenförmig vom posterioren Ende des PSMs nach anterior aus. Das Zeitintervall, welches für solch eine Expressionswelle durch das PSM benötigt wird, entspricht genau der Zeitspanne für die Bildung einer Somitengrenze. Das heißt die periodische Expression von *c-Hairy* korrelierte genau mit der Periodizität der Somitenbildung im Hühnerembryo. In den neu gebildeten Somiten stabilisiert sich die Expression von *c-Hairy* dann und ist auf die posteriore Somitenhälfte begrenzt. Im Laufe der letzten Jahre wurden zahlreiche andere Gene mit solch einer zyklischen Expression gefunden. Welche Gene das sind und wie es zu solch einer zyklischen Genaktivität kommt, wird in Kapitel 3.3 genauer beschrieben.

3.1.2.2 Das Modell von Hans Meinhardt

Ein zweites Modell stammt von Hans Meinhardt (Meinhardt 1986). Es basiert auf der Idee eines Morphogengradienten von kaudal nach kranial innerhalb des PSMs. Dieser Gradient bewirkt eine Oszillation der Zellen des PSMs zwischen zwei Zuständen. Erst, wenn ein gewisser Schwellenwert des Morphogens unterschritten wird, nehmen die Zellen einen definierten Zustand an. Da die Zellen, die weiter kaudal lokalisiert sind, zu diesem Zeitpunkt noch einer höheren Konzentration des Morphogens unterliegen, wechseln sie ihren Zustand weiter hin und her. Dadurch kommt es zu der Konfrontation zweier Zustände, wodurch die Bildung einer Segmentgrenze ausgelöst wird (Meinhardt 1986). Durch dieses Modell kann erklärt werden, warum in kleineren Embryonen die Zahl der Somiten konstant bleibt. Hier fällt die Morphogenkonzentration schneller unter einen gewissen Schwellenwert und damit werden kleinere Somiten gebildet.

3.1.2.3 Gradientenförmig exprimierte Gene

Auch Kandidaten für die Morphogengradienten- Hypothese von Hans Meinhardt wurden gefunden. So wird Raldh2 (retinaldehyde dehydrogenase 2), ein Enzym welches an dem Aufbau des Retinsäure (RA) Gradienten beteiligt ist, gradientenförmig von kranial nach kaudal exprimiert (Moreno and Kintner 2004). Ein Gradient von Fgf8 (fibroblasten growth factor 8) verläuft in entgegengesetzter Richtung (Dubrulle and Pourquie 2004). Bei einer Erhöhung der Fgf8 Konzentration dehnt sich der posteriore Charakter des PSMs aus und es werden kleinere Somiten gebildet (Dubrulle et al. 2001). Dies liegt daran, dass hohe Fgf8 Konzentrationen die Differenzierung der mesenchymalen Zellen des PSMs verhindern (Dubrulle et al. 2001; Delfini et al. 2005). Erst wenn die Konzentration von Fgf8 einen gewissen Schwellenwert unterschreitet, kann eine Somitengrenze gebildet werden (Dubrulle et al. 2001). Dies konnte anhand von Mausembryonen gezeigt werden, in denen Sip1 (Smad-interacting protein 1) deletiert war (Maruhashi et al. 2005). In Sip^{-/-} Embryonen führt die Verlängerung des Fgf8 Gradienten nach kranial zu einer Verschiebung der Somitengrenzen nach kranial. Dadurch wurden weniger Zellen zu einem Somiten zusammengefasst und es werden kleinere Somiten gebildet (Abb. 4).

Ein weiterer Gradient, der eine Auswirkung auf den Ort der Grenzenbildung und somit auf die Größe der Somiten hat, wird durch Komponenten des Wnt- Signalweges gebildet (Aulehla et al. 2003). Dabei führt die Erhöhung der Wnt3a Konzentration zu kleineren Somiten, während die Überexpression von *Axin2*, welches inhibitorisch auf den Wnt- Signalweg wirkt, zu größeren Somiten führt (Aulehla et al. 2003).

Heutige Modelle beziehen sich zwar häufig auf das "clock and wavefront" Modell (wie z.B. (Dubrulle et al. 2001), meinen allerdings eher eine Mischung aus beiden Modellen. So wird davon ausgegangen, dass das Zusammenspiel zwischen dem Morphogengradienten, welcher von kaudal nach kranial verläuft und dem molekularen Oszillator (also der Uhr) für die korrekte Bildung einer Somitengrenze notwendig ist. Ein detailliertes Modell, welches im Rahmen dieser Dissertation genauer untersucht wurde, wird in Kapitel 3.7 vorgestellt.

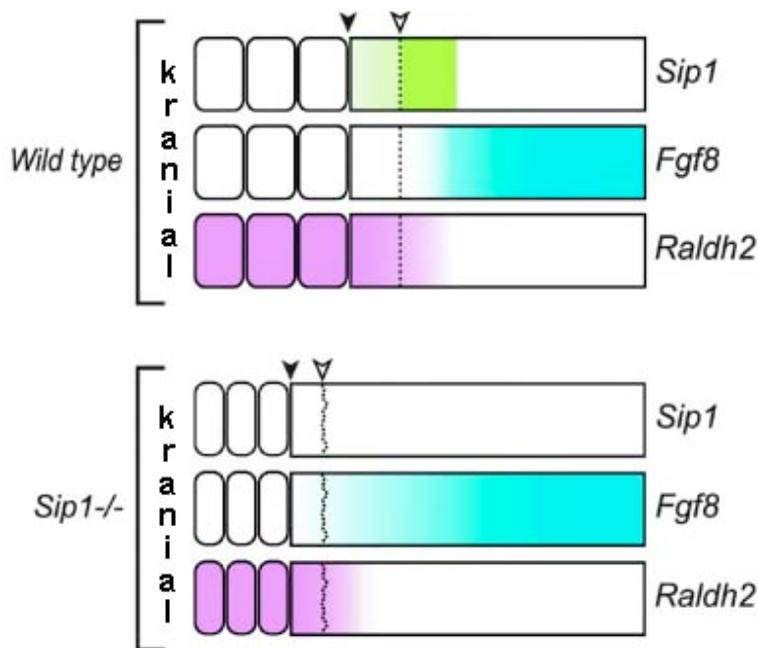


Abbildung 4: Die gradientenförmige Expression von *Raldh2* und *Fgf8*. *Raldh2* katalysiert den Aufbau eines Retinsäuregradienten von anterior nach posterior. Der Fgf Gradient verläuft entgegengesetzt. *Sip1* reguliert auf noch ungeklärte Art und Weise die Ausbreitung des *Fgf8* Gradienten nach kranial. Der Verlust von *Sip1* führt zu einer Ausweitung des *Fgf8* Gradienten nach kranial. Dadurch wird auch die Somitengrenze weiter kranial gebildet und es entstehen kleinere Somiten. Abbildung entnommen aus (Maruhashi et al. 2005).

3.1.3 Die Segmentierung der Somitomere in morphologisch abgrenzbare Metamere

An der anterioren Grenze des PSM bilden sich, synchron zu beiden Seiten des Notochord, Blöcke von kondensierten Zellen. Diese schnüren sich vom anterioren PSM ab und ändern dabei ihre adhesiven Eigenschaften durch einen Prozess, der als mesenchymal-epitheliale Transformation (MET) bezeichnet wird. Das lose Mesenchym des präsomitischen Mesoderms wird dabei in ein einschichtiges Epithel umgeformt. Im Inneren des Somiten bleibt ein Bereich mesenchymaler Zellen erhalten - das Somitocoel. Die Gesamtheit dieser Strukturen wird als Somiten bezeichnet. In Mausembryonen scheint an dem Prozess der MET ein Gen namens *Paraxis* (*Tcf15* für transcription factor 15) beteiligt zu sein. *Paraxis* ist ein basischer Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktor, welcher im anterioren PSM und in neu gebildeten Somiten exprimiert wird (Burgess et al. 1996; Susic et al. 1997). Der Verlust von *Paraxis* führt zum Verlust der Epithelialisierung des paraxialen Mesoderms (Burgess et al., 1996).

Der Prozess der Somitenbildung wiederholt sich periodisch und setzt sich nach kranial fort, bis etwa an Tag 13,25- 13,5 der Mausentwicklung alle 63- 65 Somiten gebildet sind. Man

findet in frühen Embryonen Somiten verschiedener Entwicklungsstadien. Während die reifen anterioren Somiten differenzieren, werden neue Somiten im posterioren Bereich nachgebildet. Um die Vergleichbarkeit der Somiten in verschiedenen axialen Positionen in Embryonen zu verschiedenen Entwicklungsstufen zu vereinfachen, wurde eine Nomenklatur für die Somiten erstellt (Pourquie and Tam 2001). Die beiden zuletzt abgeschnürten Somiten werden als S+1 bezeichnet, die weiter kranial liegenden, zuvor gebildete als S+2, S+3 und so weiter. Die zwei gerade zu bildenden Somiten werden als S0 und die Somitomere weiter kaudal im PSM als S-1, S-2 und so weiter bezeichnet (Abb. 5).

Aufgrund der Anzahl der Somiten ist es möglich Rückschlüsse auf das Alter des Embryos zu ziehen (Tam 1981; Vickers 1983). So haben Embryonen 9 Tage nach der Befruchtung zwischen 13- 20 Somiten.

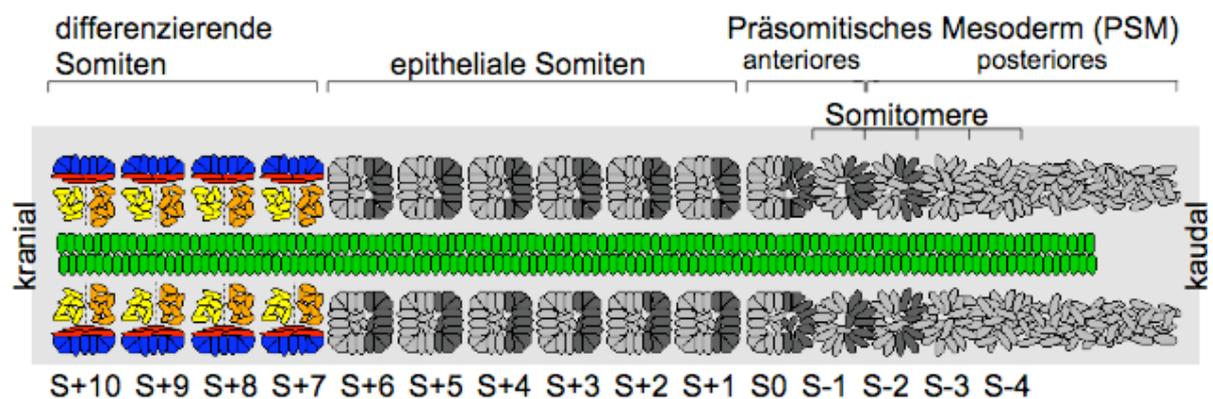


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Somitogenese. Im PSM liegen bereits morphologisch erkennbar Somitomere vor (S- 1 bis S- 4). Die zuletzt gebildeten Somiten werden als S+1 bezeichnet, ältere Somiten (weiter kranial) als S+2, S+3 usw. Die Somiten S+7 bis S+10 weisen schon eine erste Differenzierung auf. In grün: Notochord, blau: Dermamyotom, gelb: Sklerotom, rot: Myotom, orange: kondensierendes prävertebrales Mesenchym. Abbildung wurde verändert und ist entnommen aus (Gossler 2002).

3.1.4 Die Differenzierung der Somiten

Während neu gebildete Somiten eine symmetrische Zelldichte aufweisen, wird etwa ab dem Somiten S- 5 ein deutlicher Unterschied in der Zelldichte entlang der anterior- posterior (AP)-Achse sichtbar (Christ et al. 2000). Die Zellen der anterioren Hälfte weisen eine geringere Proliferation auf und haben somit ein weniger dichtes Zellgeflecht, während die Zellen der posterioren Somitenhälften deutlich kondensierter sind (Christ et al. 2000). Dadurch ist eine feine intrasomitische Grenze zwischen dem anterioren und posterioren Anteil sichtbar, die als „Ebner’s Spalte“, bezeichnet wird (von Ebner 1988). Auch unterscheiden sich die anterior und die posteriore Hälfte der Somiten in ihren repulsiven Eigenschaften. Dies hat eine

Konsequenz für die segmentale Entwicklung des Nervensystems, da Neuralleistenzellen nur durch die anterioren, nicht aber durch die posterioren Somitenhälften wandern.

Neben dieser AP- Polarität weisen Somiten auch eine dorso- ventrale (DV) Orientierung auf. Beide Prozesse werden unterschiedlich reguliert und haben verschiedene Auswirkungen auf den Embryo. Während die DV- Achse zur Aufteilung in Muskeln, Haut und Skelett führt, ist die AP- Polarität für den korrekten Aufbau des Skelettes notwendig.

3.1.4.1 Die DV- Polarität eines Somiten

Die dorso- ventrale Kompartimentalisierung der Somiten führt zu der Spezifizierung der Zellen in Dermamyotom und Sklerotom. Diese Differenzierung wird durch Signale aus umgebenden Geweben kontrolliert. So scheinen das dorsale Neuralrohr und das Oberflächenektoderm eine entscheidende Rolle in der Differenzierung zum Dermamyotom zu spielen, während das ventrale Neuralrohr und das Notochord die Bildung des Sklerotoms induzieren (Fan et al. 1997).

Die Sklerotomzellen, welche auf der ventralen Seite des Somiten liegen, lösen sich in Folge der Differenzierung von den restlichen Zellen ab und wandern in verschiedene Richtungen aus. Dazu müssen sie wieder mesenchymal werden, also eine epithelial- mesenchymale Transformation (EMT) durchlaufen. Die dorso- lateral gelegenen Dermamyotom- Zellen bleiben hingegen epithelial. Sie differenzieren weiter zum Dermatome und zum Myotome. Der Begriff Dermatome ist abgeleitet von dem griechischen Wort "derm", welches "Haut" bedeutet und bildet das Bindegewebe der Rückenhaut. Der Begriff Myotome stammt von dem griechischen Wort "myos" ab, was übersetzt "Muskel" bedeutet. Das Myotome bildet die Muskulatur der Körperwand und der Gliedmaßen.

Der Begriff Sklerotome ist von dem griechischen Wort "sklero", welches "hart" bedeutet, abgeleitet. Das Sklerotome kann es weiter in dorsal, ventral und lateral gelegene Sklerotomzellen unterteilt werden. Die dorsalen Zellen bilden den Dornfortsatz, an dem viele Muskelstränge der Rückenmuskulatur ansetzen. Die dorso- ventralen Zellen sind an der Bildung der Neuralbögen und die lateralen Zellen an der Entwicklung der Rippen beteiligt. Die ventralen Sklerotomzellen bilden den Wirbelkörper (siehe Abb. 6) (Christ et al. 2000). Außerdem bildet sich aus dorsolateralen Teilen des Sklerotoms das Syndetome (Dubrulle and Pourquie 2003). Syndetome ist von dem griechischen Wort "syndesis" abgeleitet und bedeutet "etwas verbinden". Aus dem Syndetome entstehen die Sehnen.

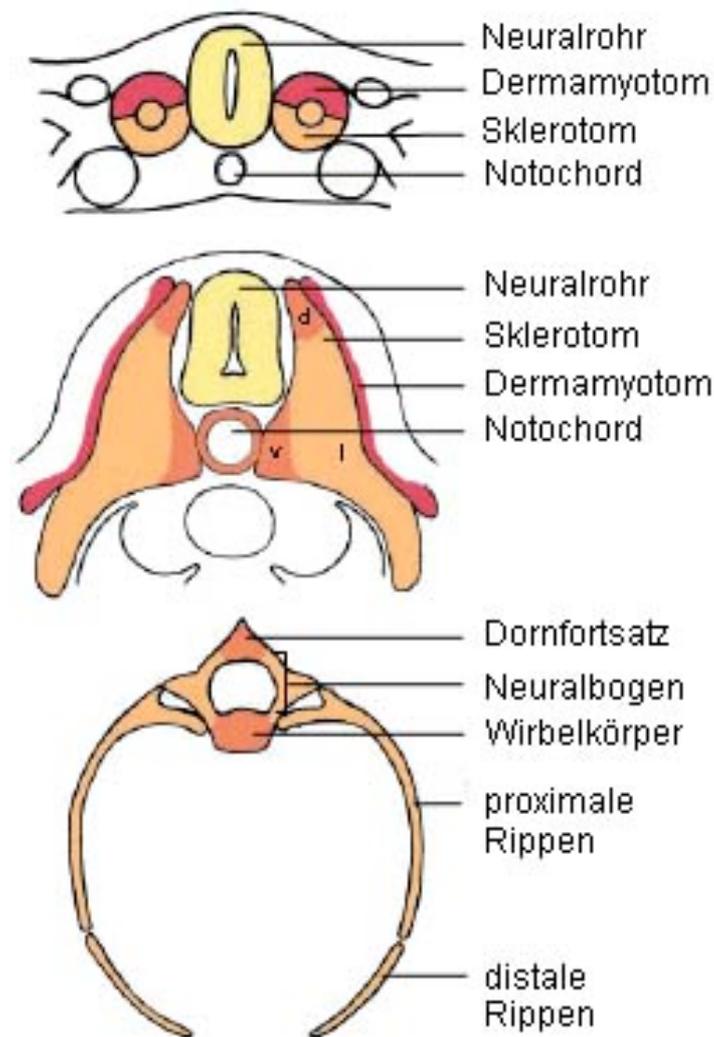


Abbildung 6: Die Entstehung der Wirbelsäule. Die Somiten werden entlang ihrer dorso-ventralen Achse in Dermamyotom und Sklerotom unterteilt. Die Zellen des Dermamyotoms bilden das Bindegewebe der Haut und Teile der Muskulatur. Die Zellen des Sklerotoms bilden Elemente des Skelettes. Dabei entsteht aus den dorsal (d) gelegenen Zellen der Dornfortsatz und Teile des Neuralbogens, während die ventralen (v) Zellen den Wirbelkörper bilden. Aus den lateral (l) gelegenen Zellen werden die Rippen. Abbildung mit leichten Änderungen entnommen aus (Christ et al. 2000).

3.1.4.2 Die AP- Polarität eines Somiten

Ein wichtiger Vorgang während der Segmentierung in Vertebraten ist die so genannte Neugliederung, welche von Remak beschrieben wurde (Remak 1850). Remak beobachtete, dass die Somitengrenzen nicht den endgültigen Wirbelkörpergrenzen entsprechen (Abb. 7, linke Seite). Im Zuge der Differenzierung der Somiten muss also eine Neugliederung stattgefunden haben. Aufgrund der Neugliederung wird aus der posterioren Hälfte eines Somiten, und dem anterioren Anteil des darauf folgenden Somiten ein Wirbelkörper gebildet

(Abb. 7 linke Seite) (Huang et al. 1996). Die AP- Polarität innerhalb der Somiten wird vermutlich schon im anterioren PSM determiniert (Tam et al. 2000). Während der Differenzierung der Somiten wird die AP- Polarität nur im Sklerotom, nicht aber im Myotom oder im Dermatome aufrechterhalten. Da die Muskeln aus dem Myotom gebildet werden, entstehen sie aus der anterioren und der posterioren Hälfte des gleichen Somiten und sind so einen halben Somiten gegenüber dem Wirbelkörper versetzt (Abb. 7, rechte Seite). Dadurch verbinden die Muskeln die Wirbelkörper miteinander.

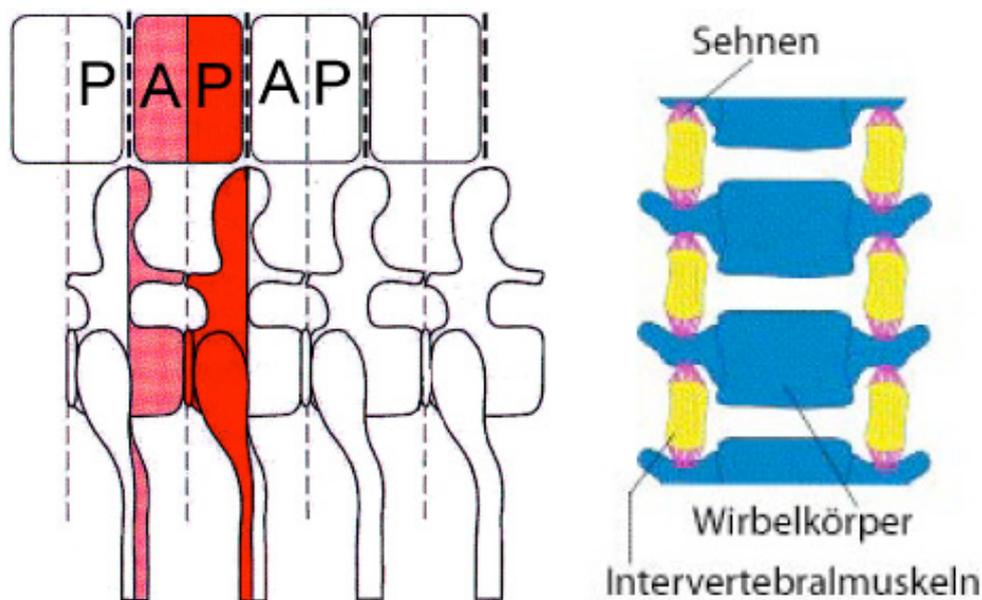


Abbildung 7: Die Auswirkung der AP- Polarität auf die Wirbelsäule und die Muskeln. Die Wirbelkörper werden aus dem anterioren, bzw. posterioren Anteil zweier Somiten gebildet (links). Die Intervertebralmuskeln verbinden die Wirbelkörper da sie aus dem gleichen Somiten gebildet werden. Linke Abbildung mit Änderungen entnommen als (Gossler 2002), rechte Abbildung mit Änderungen entnommen aus (Brent et al. 2003).

Diese AP- Polarität der Somiten kann man auch anhand von Genen erkennen, die spezifisch in einer Hälfte der Somiten exprimiert werden. Solche Gene sind z.B. *Uncx4.1*, welches nur in den posterioren (Mansouri et al. 1997; Neidhardt et al. 1997) und *Tbx18*, welches nur in den anterioren Teilen der Somiten exprimiert wird (Kraus et al. 2001).

In Embryonen, in denen *Uncx4.1* deletiert wurde (*Uncx4.1*^{-/-}), ist die Expression von *Tbx18* auf beide Somitenhälften ausgeweitet. Außerdem fehlen *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen die posterioren Elemente, also die proximalen Rippen und die Neuralbögen (Leimeister et al. 2000; Mansouri et al. 2000), was darauf zurück zu führen ist, dass die Ausweitung der *Tbx18* Expression auch im Sklerotom erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu ist in *Tbx18*^{-/-} Embryonen die Expression

von *Uncx4.1* auf beide Somitenhälften ausgeweitet und die posterioren Skelettelemente sind verstärkt, d.h. eine Verbreiterung der Neuralbögen und der proximalen Rippen ist zu erkennen (Bussen et al. 2004).

An der Etablierung der AP- Polarität und der Induktion der *Uncx4.1* Expression scheint der Notch Signalweg maßgeblich beteiligt zu sein (Hrabe de Angelis et al. 1997; Takahashi et al. 2003). Aus diesem Grund wird im folgenden Kapitel näher auf den Notch- Signalweg eingegangen.

3.2 Der Notch- Signalweg

Der Notch Signalweg spielt eine fundamentale Rolle während der Embryonalentwicklung von Wirbeltieren, sowie von wirbellosen Tierarten. Durch die Aktivierung von Notch können molekulare Unterschiede zwischen benachbarten Zellen etabliert und somit unterschiedliche Zelldifferenzierungen und Gewebegrenzen determiniert werden. Notch beeinflusst im komplexen Zusammenspiel mit zahlreichen weiteren Faktoren die zelluläre Differenzierung, Proliferation und Apoptose in allen Entwicklungsstadien und stellt somit einen zentralen Regulator der Entwicklungsbiologie dar. In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gibt es wohl kaum ein Gewebe, dessen Entwicklung nicht durch Notch beeinflusst wird (Hartenstein et al. 1992). So verwundert es auch nicht, dass Mutationen in Notch- Genen zu zahlreichen Fehlbildungen und Krankheiten in verschiedenen Spezies führen können.

Der erste Notch bezogene Phänotyp wurde 1917 von Thomas Hunt Morgan beschrieben (Mohr 1919). Er beobachtete, dass ein bestimmter Stamm der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* Kerben (engl. notches) in den Flügeln aufwies. Knapp 20 Jahre später wurde die Bedeutung des Notch- Signalweges in der Entwicklung der Sinnesorgane von *Drosophila* entdeckt. Homozygote Notch- Mutationen führen in *Drosophila* zu einem letalen "neurogenen" Phänotyp, bei dem sich neuroektodermale Zellen nicht wie gewöhnlich zu Epidermiszellen entwickeln, sondern überschüssiges Nervengewebe bilden (Poulson 1937).

Mittlerweile ist bekannt, dass Notch für Transmembranproteine kodiert, welche an der "Kommunikation" zwischen benachbarten Zellen beteiligt sind (Wharton et al. 1985; Vassin et al. 1987). In Vertebraten gibt es vier Notch Rezeptoren (Notch1- Notch4) und 4 Liganden welche Homologe der Delta (Delta- like1, Delta- like4) oder Homologe der Serrate (Jagged1, Jagged2) Genfamilie sind. Wobei oft auch noch Delta- like3 (Dll3) zu den Liganden gezählt wird. Da Dll3 den Notch Rezeptor hingegen nicht aktivieren kann (Geffers et al. 2007), ist es kein echter Ligand. Von den Liganden werden nur Delta- like1 (Dll1) und Jagged1 (Jag1) im

PSM exprimiert. Da für Jag1 gezeigt wurde, dass es keine Funktion in der Somitogenese hat (Xue et al. 1999), ist der einzige für die Somitenbildung entscheidende und im PSM exprimierte Ligand Dll1.

Der Notch Rezeptor wird im trans- Golgi- Netzwerk durch eine Furin- artige Konvertase geschnitten. Dies wird als S1 (für Spaltung 1) bezeichnet. Die zwei Untereinheiten bilden ein Heterodimer, welches an die Zelloberfläche transportiert wird. Dort kann der Notch Rezeptor von Liganden aktiviert werden. Diese Liganden binden an so genannte EGF- Wiederholung (epidermal growth factor- like repeats) in der extrazellulären Domäne von Notch. Dabei sind die EGF- Wiederholungen 11 und 12 wohl von besonderer Bedeutung für die Aktivierung des Rezeptors (Bray 2006). Außerdem scheint die Glykosylierung der Extrazellulären Domäne die Aktivierbarkeit des Rezeptors zu beeinflussen. So führt in *Drosophila* die Fucosylierung der EGF- Wiederholung 14 zu einer ektopischen Aktivierung von Notch (Li et al. 2003). Man unterscheidet grundsätzlich zwischen einer O- Glykosylierung (d.h. ein Zuckerrest wird an die Hydroxylgruppe angehängt), und einer N- Glykosylierung (d.h. der Zuckerrest wird an die Aminogruppe gebunden). Die O- Fucosylierung des Notch Rezeptors und eventuell auch der Dll Liganden wird von einem Enzym katalysiert, welches als Pofut1 (protein o- fucosyl transferase) bezeichnet wird. An diesen Fucose- Rest werden durch verschiedene Glykosyltransferasen weitere Zuckerreste angefügt (Lu and Stanley 2006).

Aktiviert ein Ligand den Notch Rezeptor, erfolgen zwei weitere proteolytische Spaltungen. Die erste (S2) erfolgt extrazellulär durch Metalloproteasen der ADAM- Familie (a disintegrin and metallopeptidase domain). Diese Spaltung löst eine weitere Spaltung intrazellulär aus, welche durch den γ - Sekretase Komplex ausgeführt und als S3 (für Spaltung 3) bezeichnet wird (Abb. 8). Dieser γ - Sekretase Komplex besteht aus den vier Untereinheiten Pen- 2 (presinilin enhancer 2), Aph- 1 (anterior pharynx defective 1), Nicastrin und Presinilin, wobei letztere die katalytische Untereinheit darstellt. Dabei wird der intrazelluläre Anteil des Notch Rezeptors (NICD für Notch intracellular domain) proteolytisch abgespalten und NICD (beginnend mit einem Valin an der Position 1744) kann in den Kern wandern (Abb. 8). NICD bindet im Kern an Rbp-J κ (recombination signal- binding protein J κ ; Abb. 8). Synonym wird Rbp-J κ auch als Cbfl (C- promoter binding factor) oder CSL (Cbfl/SuH/Lag1) bezeichnet. In Abwesenheit von NICD fungiert Rbp-J κ als transkriptioneller Inhibitor indem er einen Komplex mit den Co- Repressoren SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors, bzw. N- CoR für nuclear receptor corepressor) und SHARP (SMRT/HDAC- 1 associated repressor protein, bzw MINT oder auch SPEN) bildet, wobei letzteres außerdem noch CtBP (C- terminal binding protein) in den Komplex rekrutiert. Auch SKIP (Ski-

interacting protein), die Cofaktoren CIR (Cbf1- interacting corepressor) und SIN3A sind in diesen Komplex involviert. Durch diesen Corepressor Komplex werden verschiedene Histon Deacetylasen (z.B. HDAC1, HDAC3, HDAC4 und RPD3) rekrutiert (Bray 2006), welche die Lysinreste der Histone deacetylieren und somit zu einer dichteren Verpackung des Chromatins führen.

Bindet NICD an Rbp-Jκ, löst sich der Corepressor Komplex, bis auf SKIP, von der DNA und ein Coaktivator Komplex wird gebildet. Dieser umfasst einen trimeren Komplex aus Rbp-Jκ, NICD und Mam (Mastermind). Histon- Acetyl- Transferasen (z.B. P300) und Chromatin modulierende Faktoren (z.B. BRM, TRA1, DOM) werden in diesen Komplex rekrutiert (Bray 2006) und sorgen dafür, dass das Chromatin für die Polymerasen zugänglich wird. Dadurch können Zielgene des Notch- Signalweges transkribiert werden.

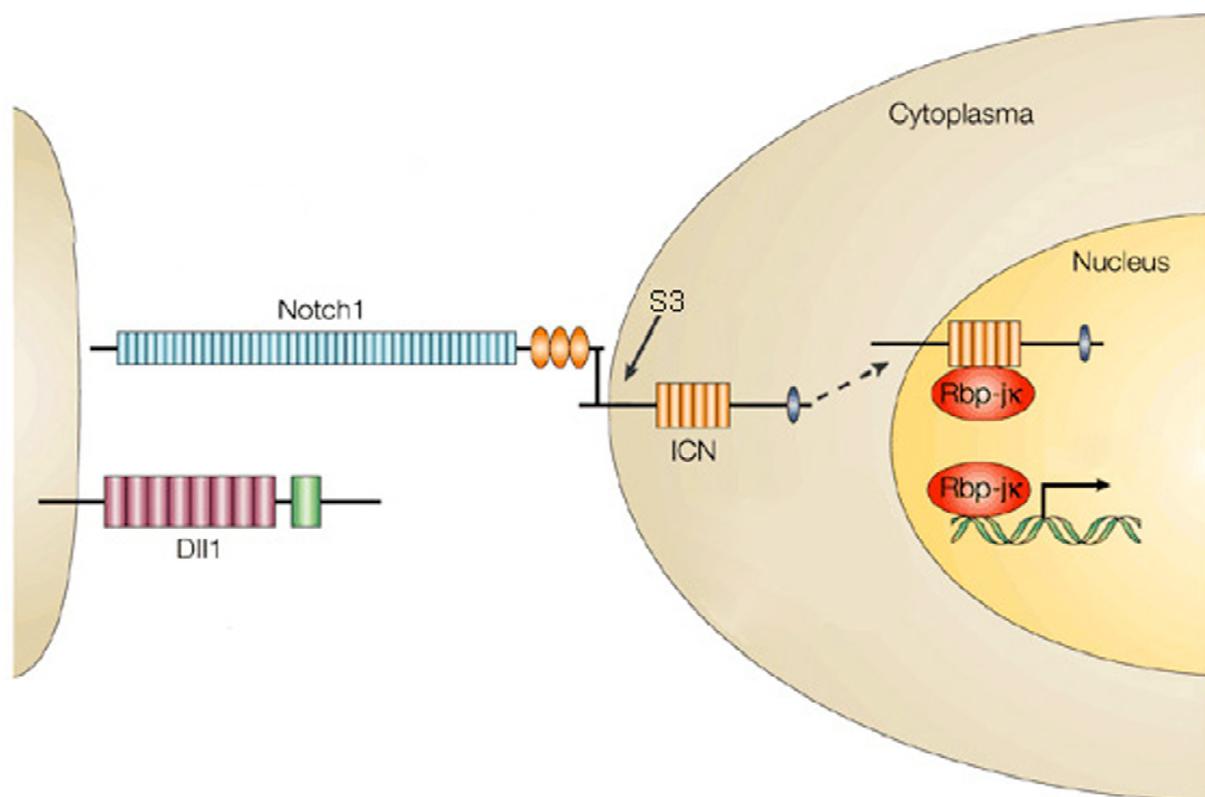


Abbildung 8: Der Notch Signalweg. Nach Aktivierung durch den Liganden Dll1 wird der Notch1 Rezeptor intrazellulär gespalten (S3). Die intrazelluläre Domäne von Notch1 (NICD) wandert in den Kern und bindet an Rbp-Jκ. Dadurch wird die Transkription von Zielgenen des Notch- Signalweges aktiviert. Bild mit Modifikationen übernommen aus (Saga and Takeda 2001).

Als Zielgene wurden in Invertebraten die Mitglieder der Familie der Hairy/Enhancer of Split bHLH Transkriptionsfaktoren gefunden (Jennings et al. 1994; Gridley 1997; Greenwald 1998). Ihre Homologen stellen in Vertebraten die Familie der *Hes*- Gene (*Hes1-7*) und die Familie der *Hey*- Gene (*Hey1, Hey2, HeyL*) dar (Kageyama and Nakanishi 1997; Steidl et al. 2000). Allerdings sind aber nicht alle Mitglieder dieser Familien, sondern nur *Hes1, Hes5, Hes7, Hey1, Hey2* und *HeyL* direkte Zielgene von Notch (Nishimura et al. 1998; Bessho et al. 2001a; Katoh and Katoh 2007). Ein weiteres Notch Zielgen, welches in *Drosophila melanogaster* gefunden wurde, ist *Fringe*. In Vertebraten sind drei Homologe von *Fringe* bekannt (*Manic, Radical* und *Lunatic fringe*) (Cohen et al. 1997). Von diesen drei Homologen wird nur *Lunatic fringe (Lfng)* im präsomitischen Mesoderm exprimiert (Johnston et al. 1997).

Sowohl *Lfng*, als auch *Hes1, Hes5, Hes7, Hey1* und *Hey2* weisen keine statische, sondern eine dynamische, beziehungsweise zyklische Expression im PSM auf (Forsberg et al. 1998; McGrew et al. 1998; Aulehla and Johnson 1999; Jouve et al. 2000; Leimeister et al. 2000; Dequeant et al. 2006). Wie es zu solch einer Expression kommt, wird im nächsten Kapitel erläutert.

3.3 Zyklische Genaktivität

Wie schon im vorangegangenen Kapitel erwähnt, werden einige Zielgene des Notch-Signalweges zyklisch im PSM exprimiert. Mit „zyklisch“ ist in diesem Zusammenhang gemeint, dass die Expression nicht statisch ist, sondern einen Kreislauf, beziehungsweise einen Zyklus konstruiert. Dieser Zyklus der Expression beginnt am posterioren Ende des PSMs, wandert wellenartig nach kranial und wird in einer spezifischen Domäne im anterioren PSM gestoppt.

Man teilt diese zyklische Expression in 3 Phasen ein (Abb. 9):

Phase I ist definiert als der Beginn der Transkription in der Schwanzknospe. In Phase II hat die Expressionswelle etwa die Hälfte des PSMs durchlaufen. In Phase III erreicht sie das anteriore PSM und wird in diesem Bereich gestoppt.

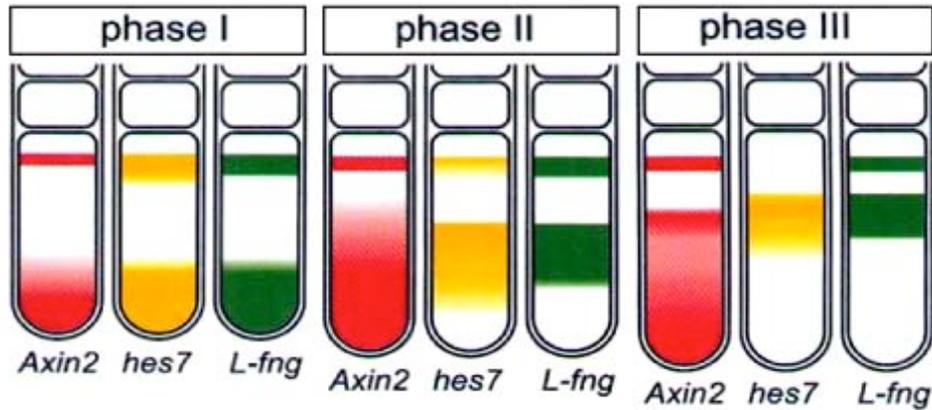


Abbildung 9: Die drei Phasen zyklischer Genaktivität. Es werden drei Phasen zyklischer Genexpression unterschieden. Phase I stellt den Beginn der Expression in der Schwanzknospe dar, Phase II beschreibt den Zeitpunkt, an dem die Expression etwa die Hälfte des PSMs durchlaufen hat und in Phase III erreicht die Expressionswelle das anteriore PSM und wird da gestoppt. Als Beispiele dienen die Expressionsphasen von *Axin2* (rot), einem Zielgen des Wnt- Signalweg, *Hes7* (gelb), welches durch den Notch und den Fgf Signalweg reguliert wird, und *Lfng* (grün), einem Zielgen des Notch- Signalweges. Abbildung entnommen aus (Ishikawa et al. 2004) und verändert

Ein zyklisch exprimiertes Gen namens c- Hairy wurde bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben. Das aus Hühnern stammende c- Hairy ist ein Homologes der Hes Gene bei Säugetieren, welche Zielgene des Notch- Signalweges darstellen. Wie schon im letzten Kapitel beschrieben, weisen noch weitere Notch Zielgene eine zyklische Expression auf. So wurden für *Lfng* und *Hes7* gezeigt, dass ihre Expression in der Schwanzknospe angeschaltet wird und sich nach anterior fortpflanzt (Forsberg et al. 1998; Bessho et al. 2001b). Die Zeit eines solchen Expressionszyklus korreliert, wie schon bei c- Hairy, mit der Zeit die für die Bildung eines Somiten benötigt wird.

Wie solch eine zyklische Expression zustande kommt, ist bis heute nicht vollständig verstanden. Man geht aber davon aus, dass negative Rückkopplungsmechanismen die Grundlage dafür bilden. So reguliert *Lfng*, ein Zielgen des Notch- Signalweges, durch negative Rückkopplung die Aktivierung des Notch- Rezeptors. *Lfng* ist eine Glykosyltransferase (Zhang and Gridley 1998; Aulehla and Johnson 1999) welche Zuckerreste an den Notch Rezeptor anfügt. Dadurch ändert sich vermutlich die Aktivierbarkeit von Notch durch seine Liganden (Panin et al. 1997; Hicks et al. 2000; Dale et al. 2003; Haines and Irvine 2003; Ladi et al. 2005; Yang et al. 2005). In Mausembryonen scheint diese Glykosylierung durch *Lfng* zu verhindern, dass der Ligand Dll1 den Notch Rezeptor aktivieren kann (Bessho et al. 2001b; Morimoto et al. 2005; Niwa et al. 2007).

Ein weiterer beschriebener Rückkopplungsmechanismus innerhalb des Notch- Signalweges umfasst *Hes7* und *Hes1* (Hirata et al. 2002). Die Transkription beider Gene wird durch das

Genprodukt, also das Protein, gehemmt (Hirata et al. 2002; Bessho et al. 2003). Für *Hes7* konnte gezeigt werden, dass es eine sehr kurze Halbwertszeit hat. Schon nach 22 min ist das Protein vollständig abgebaut (Hirata et al. 2004). Eine Erhöhung dieser Halbwertszeit auf 30 führt zu einer Hochregulation und dem Verlust der Dynamik der *Hes7* Expression schon nach wenigen Zyklen (Hirata et al. 2004). Da *Hes7* nicht nur seine eigene Expression reguliert, sondern auch an den *Lfng* Promoter bindet und die Transkription von *Lfng* hemmt (Bessho et al. 2001a; Bessho et al. 2003), reguliert *Hes7* auch die Aktivierung des Notch Signalweges.

Insgesamt kann man sich das Zusammenspiel (Abb. 10) wie folgt vorstellen:

Notch wird durch Dll1 aktiviert und aktiviert seinerseits die Expression von *Hes7* und *Lfng* (Abb. 10, A). *Lfng* glykosyliert den Notch Rezeptor und hemmt somit die Aktivierung von Notch durch Dll1. *Hes7* hemmt sowohl die Transkription von *Lfng*, als auch seine eigene (Abb. 10, B). Da sowohl die mRNA *Lfng*, als auch das Protein *Lfng* eine kurze Halbwertszeit haben, wird schon nach kurzer Zeit die Inhibition des Notch Rezeptors aufgehoben und der Kreislauf kann von neuem beginnen. Durch diesen Mechanismus wird sowohl die zyklische Expression von *Lfng*, als auch die zyklische Aktivierung des Notch Rezeptors reguliert. Dass der Notch Rezeptor in Mausembryonen tatsächlich zyklisch aktiviert wird, konnte zum ersten Mal 2005 nachgewiesen werden (Huppert et al. 2005; Morimoto et al. 2005) und bestärkt dieses Modell.

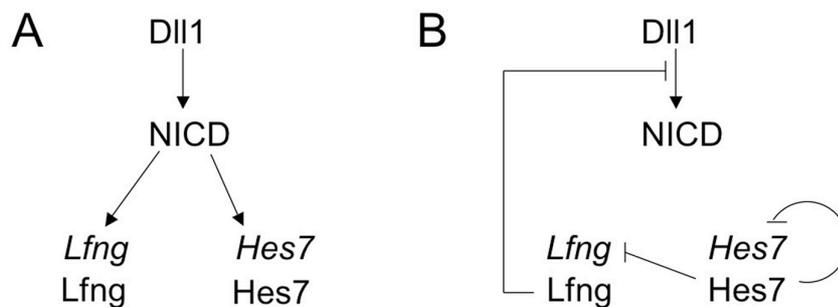


Abbildung 10 Rückkopplungsmechanismen innerhalb des Notch- Signalweges. (A) Dll1 aktiviert den Notch Rezeptor und somit die Transkription von Notch- Zielgenen wie *Lfng* und *Hes7*. (B) Der Transkriptionsfaktor *Hes7* inhibiert seine eigene Transkription und die Transkription von *Lfng*. Die Glykosyltransferase *Lfng* glykosyliert den Notch Rezeptor und verhindert so, dass dieser durch Dll1 aktiviert werden.

Es wird geschätzt, dass es insgesamt 50- 100 zyklische Gene gibt (Dequeant et al. 2006). Die bisher identifizierten zyklischen Gene gehören nicht nur zum Notch, sondern auch zum Wnt und zum Fgf Signalweg. Aus diesem Grund werden diese Signalwege in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben.

3.4 Der Wnt- Signalweg

Der Wnt- Signalweg ist ein evolutionär hoch konservierter Signalweg. Man findet ihn von einfachen Vielzellern, Fischen, Amphibien, Invertebraten bis hin zu Vertebraten. Ein primitiver Wnt- Signalweg ist sogar in Cnidaria (Nesseltieren), die vor 650 Millionen Jahren entstanden, vorhanden (Teo et al. 2006). In Säugern gibt es 19 verschiedene Wnt-Proteine (Logan and Nusse 2004; Clevers 2006; van Amerongen and Berns 2006), welche einen entscheidenden Einfluss auf viele essentielle biologische Prozesse haben. So sind Wnt-Proteine während der embryonalen Entwicklung an der Musterbildung beteiligt und regulieren wichtige Differenzierungsprozesse. Zum Beispiel zeigten Experimente mit *Xenopus* Embryonen, dass der Wnt- Signalweg für die Ausbildung der dorsoventralen Körperachse verantwortlich ist (Moon and Miller 1997). Wnt-Proteine kontrollieren auch die Selbsterneuerung einer Vielzahl adulter Gewebe durch Regulation der Stammzell-Erneuerung und Proliferation. Dazu gehören die adulten Stammzell- Systeme in der Haut und den Haar- Follikeln, dem Darmepithel, dem Gehirn und das hämatopoetische System (Radtke and Clevers 2005; Reya and Clevers 2005). Auch die Knochendichte wird durch den Wnt-Signalweg reguliert (Hartmann 2006). Mutationen in Komponenten des Wnt- Signalweges, führen zu verschiedenen Krankheiten wie zum Beispiel Osteoporose (Rawadi and Roman-Roman 2005), Krebs (Rubinfeld et al. 1993; Su et al. 1993) und Alzheimer (Moon et al. 2004)

Der canonische Wnt Signalweg reguliert die Stabilität von β - Catenin. In Abwesenheit von Wnt Signalen (Abb. 11, linke Seite) wird β - Catenin durch einen Degradationskomplex bestehend aus Axin, APC (adenomatous polyposis coli), CK1 α (casein kinase 1 alpha) und GSK3 β (glykogen synthase kinase 3 beta) an N- terminalen Aminosäureresten phosphoryliert (Price 2006). Durch diese Phosphorylierung wird β - Catenin von dem F- Box Protein TRPC (transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3), einer Komponente der SCF (Skp1- Cullin- F- box) E3 ubiquitin Ligase, erkannt. β - Catenin wird daraufhin ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut (Abb. 11 linke Seite). Die Transkription von Wnt Zielgenen wird durch die LEF/TCF (Lymphocyte enhancer factor/T-cell factor) Proteine verhindert (Price 2006). Diese binden unter Anderem an Groucho (Cavallo et al. 1998), welches dann Co- Repressoren wie zum Beispiel Histon Deacetylasen (HDAC) rekrutiert (Chen et al. 1999).

Wenn ein Wnt Ligand an die Rezeptoren Fz (Frizzled) und LRP (LDL receptor- related protein) bindet, wird Axin zur Zelloberfläche rekrutiert und von LRP und Dvl (Dishevelled)

gebunden (Abb. 11 rechte Seite). Dadurch wird der Komplex aus Axin, APC, CK1 α und GSK3 β aufgelöst. Dvl inhibiert außerdem die Aktivität von GSK3 β (Torres and Nelson 2000). Somit wird β -Catenin nicht länger abgebaut und bindet im Kern an LEF/TCF um Wnt Zielgene, wie *Axin2* zu aktivieren (Abb. 11, linke Seite). *Axin2* weist eine zyklische Expression im PSM auf und bildet eine negative Rückkopplung auf den Wnt- Signalweg indem es Dvl hemmt (Aulehla et al. 2003).

3.5 Der Fgf- Signalweg

Ein weiterer Signalweg, der eine Rolle in der Somitogenese spielt, ist der Fgf- Signalweg. Die Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren (Fgf für fibroblast growth factor) besteht aus etwa 23 Mitgliedern. Sie sind Zytokine und gehören zur Familie der Heparin- bindenden Polypeptide. Die Bindung von Liganden und Heparin an den FgfR (Fgf- Rezeptor) führt zur Dimerisierung (Ornitz et al. 1996) und damit zur Trans- Autophosphorylierung der Rezeptoren (Bottcher and Niehrs 2005). Dies wiederum induziert die Phosphorylierung von Adaptorproteine wie FRS2 (fibroblast growth factor receptor substrate 2) und Shp2 (auch PTP genannt für protein tyrosine phosphatase), welche daraufhin den Grb2/Sos (son of sevenless) Komplex rekrutieren. Grb2 (growth factor receptor bound protein 2) dient dabei als eine Art Brücke (Abb. 11, rechte Seite). Es bindet über seine SH2 Domäne an FRS2 und Shp2. Sos ist ein Guaninenukleotid freisetzendes Enzym und bindet an die SH3 Domäne von Grb2. Der Grb2/Sos Komplex katalysiert die Umwandlung von GDP zu GTP an Ras, welches für die Aktivierung von Raf benötigt wird. Raf ist eine Serin/Threonin Kinase und phosphoryliert MEK, welches auch als MAPKK oder MAP2K bezeichnet wird. MEK phosphoryliert dann die MAPK (ERK). Die phosphorylierte MAPK wandert in den Zellkern und aktiviert die Transkription von Fgf Zielgenen durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise einiger Mitglieder der Ets Familie (z.B. Elk1), c- myc und AP1 (Bottcher and Niehrs 2005).

Eines der dadurch aktivierten Zielgene ist das zyklisch exprimierte *Sprouty2* (Eblaghie et al. 2003; Dequeant et al. 2006). *Sprouty2* bindet an die SH2 Domäne von Grb2 und inhibiert dadurch die Rekrutierung des Grb2/Sos Komplexes zu Shp2 und den Fgf- Rezeptoren. Somit wird durch *Sprouty2* ein negativer Rückkopplungsmechanismus innerhalb des Fgf- Signalweges erzeugt. Auch *Dusp4* und *Dusp6* (dual specificity phosphatase) sind zyklisch exprimierte Fgf Zielgene. Sie dephosphorylieren Erk und hemmen so die Aktivierung von Fgf Zielgenen (Eblaghie et al. 2003).

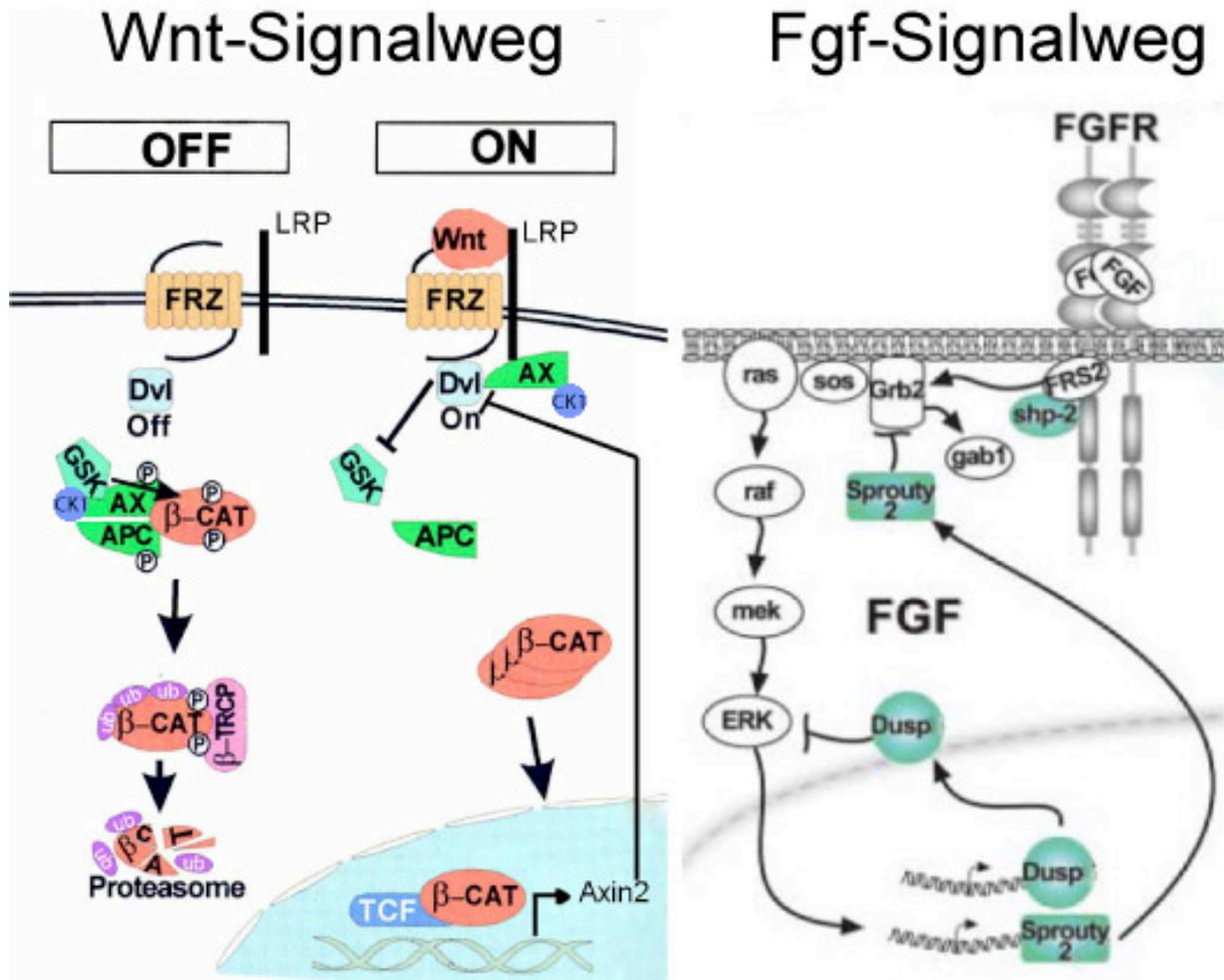


Abbildung 11 Der Wnt- und der Fgf- Signalweg.

(A) Schematische Darstellung des Wnt/ β -Catenin Signalweges. In Abwesenheit eines Wnt-Signals (OFF) wird β -Catenin durch CK1 α und GSK3 β phosphoryliert. Phosphoryliertes β -Catenin wird von dem F-Box-Protein β TrCP erkannt, und nach Ubiquitinierung dem Proteasom zugeführt. Durch die Bindung von Wnt-Proteinen an Frizzled-Rezeptoren und LRP-Corezeptoren wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt (ON), die dafür sorgt, dass der β -Catenin-Degradationskomplex aus Axin, APC, GSK3 β und CK1 α auseinanderfällt. β -Catenin wird nicht länger phosphoryliert, weshalb der Abbau gestoppt wird und β -Catenin in der Zelle akkumuliert. Durch die Bindung von β -Catenin an LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren wird im Zellkern die Transkription von Zielgenen, wie z.B. *Axin2*, aktiviert. Schema mit Änderungen entnommen aus (De Strooper and Annaert 2001).

(B) Schematische Darstellung des Fgf-Signalweges. Nach der Bindung von Heparin und Liganden dimerisieren die Fgf-Rezeptoren und phosphorylieren sich selbst. Adapterproteine wie Shp2 und FRS2 werden phosphoryliert und durch sie Grb2 und SOS rekrutiert. Dieser Komplex bindet wiederum Ras und aktiviert über Raf den MAPK-Signalweg. Schema entnommen aus (Dequeant et al. 2006).

Für nähere Erläuterungen siehe Text.

3.6 Die Wechselwirkungen dem Notch-, Fgf- und Wnt- Signalweg

Auch zwischen den drei Signalwegen Fgf, Wnt und Notch gibt es Rückkopplungsmechanismen, die vermutlich die Dynamik der einzelnen Wege miteinander koppeln. So wurde postuliert, dass der Wnt Signalweg den Notch und den Fgf Signalweg reguliert und für die zyklische Aktivierung von Notch Zielgenen mitverantwortlich ist (Aulehla et al. 2003).

Über Dvl soll nicht nur die Expression des Wnt Zielgenes *Axin2* aktiviert, sondern auch durch die Bindung von NICD an Dvl die Aktivität des Notch- Signalweges gehemmt werden (Aulehla 2003). Dabei wird zwischen zwei Zuständen gewechselt (Abb. 12). In Zustand 1 aktiviert Wnt über Dvl die Transkription von Wnt Zielgenen, wie z.B. *Axin2*. Außerdem bindet Dvl an NICD und hemmt die Transkription von Notch Zielgenen. In Zustand 2 bindet Axin2 an Dvl und hemmt den Wnt- Signalweg. Dadurch wird die Transkription von Wnt Zielgenen und damit auch von *Axin2* inhibiert. Außerdem wird durch die Bindung von Axin2 an Dvl die Freisetzung von NICD bewirkt. Sowohl die mRNA, als auch die *Axin2* Proteine werden aber stetig degradiert. Somit entsteht Zustand 2, bei dem die Inhibition von Dvl durch Axin2 aufgehoben wird. Dvl wird frei und kann wieder die Transkription von Zielgenen des Wnt- Signalweges, unter anderem auch *Axin2* aktivieren. Außerdem bindet Dvl an NICD und hemmt somit erneut den Notch Signalweg. Wenn genügend Axin2 in der Zelle akkumuliert ist, bindet dieses wieder an Dvl und der Kreislauf beginnt erneut mit Zustand 1.

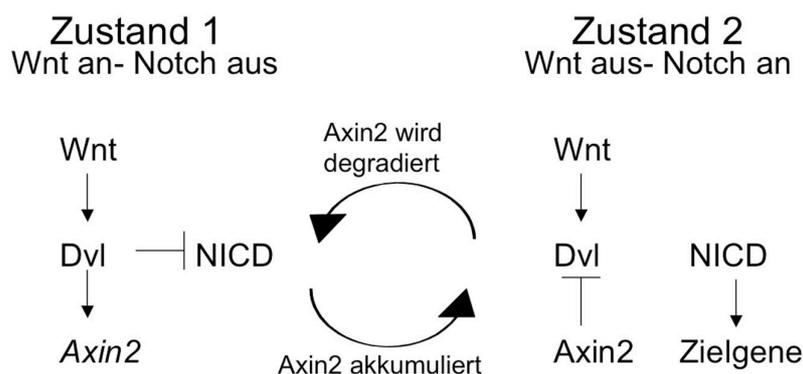


Abbildung 12 Die Regulation des Notch- Signalweges durch den Wnt- Signalweg. Für nähere Erläuterungen siehe Text; entnommen und überarbeitet aus (Aulehla et al., 2003).

Für diese Theorie sprechen auch Daten aus *Drosophila*, die in vivo zeigen, dass eine Interaktion zwischen Notch und Wingless (dem Wnt homologen) über Dvl vermittelt wird (Axelrod et al. 1996). Weiterhin wird dieses Modell dadurch unterstützt, dass die Expressionen von *Lfng* und *Axin2* Phasen- verschoben sind (Abb. 13) (Aulehla et al. 2003). Gegen dieses Modell spricht hingegen die Tatsache, dass in Mäusen, in denen β - Catenin konstitutiv im gesamten PSM aktiv ist, *Lfng* immer noch eine zyklische Expression aufweist (Abb. 13) (Aulehla et al. 2008).

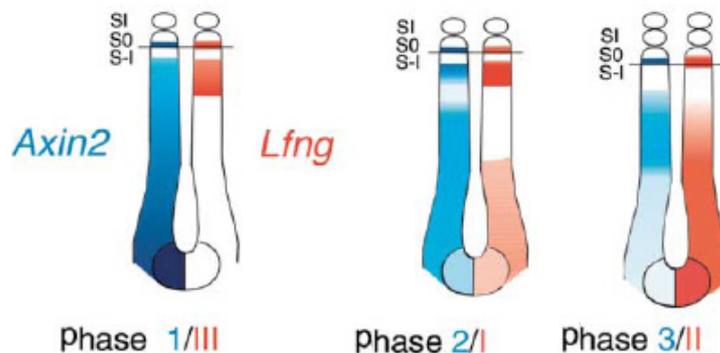


Abbildung 13: Gegenläufige Expressionszyklen von Notch- und Wnt-Zielgenen. Wenn *Axin2* in Phase 1 exprimiert ist, weist *Lfng* die Phase 3 auf (links). Ist *Axin2* dagegen in Phase 2 exprimiert, befindet sich *Lfng* in Phase 1 (Mitte). Wird *Axin2* in Phase 3 exprimiert, weist *Lfng* die Phase 2 auf (rechts). Für nähere Erläuterungen siehe Text; entnommen aus (Aulehla et al. 2003).

Ein weiteres Modell postuliert, dass der Fgf den Notch- und den Wnt- Signalweg reguliert (Wahl et al. 2007). Da *Fgf8* sowohl in Embryonen mit reduzierten Wnt Signalen runterreguliert (Aulehla et al. 2003), als auch in Embryonen mit konstitutiven Wnt Signalen hoch reguliert ist (Aulehla et al. 2008), ist es aber unwahrscheinlich, dass der Fgf Signalweg in der Hierarchie dem Wnt- Signalweg voran geht.

3.6.1 Die Regulation des bHLH Transkriptionsfaktors *Hes7*

Hes7 ist ein basischer Helix- Loop- Helix (bHLH) Transkriptionsfaktor der eine zyklische Expression im PSM von Mausembryonen aufweist. In Kapitel 1.2 wurde *Hes7* als ein Zielgen des Notch- Signalweges vorgestellt. Eine Veröffentlichung, die Ende 2007 erschien, zeigte hingegen, dass auch der Fgf Signalweg die *Hes7* Expression beeinflusst (Niwa et al. 2007). So scheint die *Hes7* Expression in der Schwanzknospe von Fgf aktiviert und im anterioren PSM von Notch verstärkt und aufrechterhalten zu werden. Übereinstimmend wurde in *Dll1*^{-/-}

und in *Rbp-Jκ^{-/-}* Embryonen eine variable Expression von *Hes7* ausschließlich in einem posterioren Teil des PSMs gefunden (Niwa et al. 2007).

Hes7 scheint somit eine Verbindung zwischen dem Notch- und dem Fgf- Signalweg zu schaffen. Es wird gemeinschaftlich durch beide Signalwege aktiviert und kann (wie in Abschnitt 3.3 beschrieben) durch die Inhibition der *Lfng* Expression (Bessho et al. 2001b; Bessho et al. 2003; Bessho and Kageyama 2003) die Aktivierung des Notch- Signalweges beeinflussen.

3.6.2 Die Regulation des bHLH Transkriptionsfaktors *Mesp2*

Mesp2 (mesoderm posterior 2) ist ein basischer Helix- Loop- Helix (bHLH) Transkriptionsfaktor und weist eine dynamische Expression im PSM auf (Takahashi et al. 2000). Die Expression von *Mesp2* beginnt in S- 2 mit einem Streifen, dessen Breite etwa der eines Somiten entspricht. Dieser Streifen engt sich immer mehr ein bis er im Bereich S- 1 auf die anteriore Hälfte eines zukünftigen Somiten beschränkt ist. Dann wird im Somiten S- 2 ein zweiter Streifen von *Mesp2* exprimiert, und die Expression im Somiten S- 1 verschwindet (Takahashi et al. 2000; Morimoto et al. 2005).

Die Expression von *Mesp2* wird durch mindestens 2 Signalwege gemeinschaftlich aktiviert (Abb. 14), nämlich durch den Wnt- und durch den Notch Signalweg (Yasuhiko et al. 2006). Der Wnt- Signalweg reguliert dabei die Expression von *Tbx6*, und *Tbx6* aktiviert synergistisch mit dem Notch- Signalweg die Aktivierung der *Mesp2* Expression (Yasuhiko et al. 2006). Weiterhin scheint auch der Fgf Signalweg an der Regulation der *Mesp2* Expression beteiligt zu sein, denn *Fgf8* inhibiert die Expression von *Mesp2* (Delfini et al. 2005; Yasuhiko et al. 2006). Folglich kontrollieren der Notch-, Wnt- und Fgf- Signalweg gemeinsam die Expression von *Mesp2*.

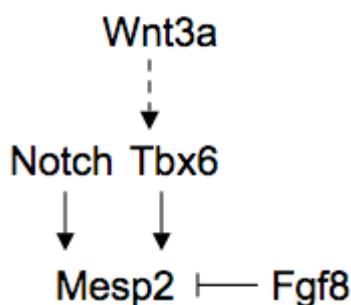


Abbildung 14: Modell der Regulation der *Mesp2* Expression. *Tbx6*, dessen Expression über den Wnt Signalweg reguliert wird, reguliert in Synergie mit dem Notch- Signalweg die Expression von *Mesp2*. Diese Aktivierung wird durch *Fgf8* inhibiert.

3.7 Das aktuelle Modell der Regulation der Grenzenbildung

Für den molekularen Mechanismus der Somitenbildung wurden zahlreiche Modelle postuliert. Zwei ältere Modelle wurden bereits in Kapitel 3.1.2 vorgestellt. Hier soll eines der aktuellen Modelle für Mausembryonen vorgestellt werden (Abb. 15).

Im posterioren PSM und im Somiten S0 wird der Rezeptor Notch1 durch den Liganden Dll1 aktiviert. In Folge dessen werden Zielgene des Notch- Signalweges aktiviert. Zu diesen Zielgenen gehören *Hes7* und *Lfng*. *Hes7* reguliert seine eigene Expression und zusätzlich die Expression von *Lfng*. *Lfng* glykosyliert den Notch Rezeptor und verhindert so die Aktivierung von Notch1 durch Dll1. Somit kommt es im posterioren PSM zu Oszillationen zwischen "aktivem" und "nicht aktivem" Notch Signalweg.

In der anterioren Hälfte des Somiten S- 1 hingegen werden diese Oszillationen durch *Mesp2* gestoppt. *Mesp2* aktiviert die Expression von *Lfng* und inhibiert die Expression von *Dll1*. Dadurch wird in der anterioren Hälfte des Somiten S- 1 der Notch Rezeptor von *Lfng* glykosyliert und kann nicht mehr aktiviert werden. Im Somiten S0 hingegen kann Notch aktiviert werden. Dadurch entsteht eine Region mit aktiviertem Notch- in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer Region ohne aktivierten Notch- Signalweg. In dem Bereich, in dem diese beiden Regionen aufeinander treffen, wird eine Somitengrenze gebildet (Morimoto et al. 2005).

An der Etablierung der AP- Polarität in den Somiten scheinen *Mesp2* und der Notch- Signalweg eine entscheidende Rolle zu spielen (Takahashi et al. 2003). Möglicherweise wird die AP- Polarität über den gleichen Mechanismus reguliert, wie die Bildung der Somitengrenzen. Außerdem scheint die Etablierung der AP- Polarität die Grundlage für die Bildung von Somitengrenzen zu sein (Durbin et al. 2000).

Somit werden *Mesp2* und der Notch- Signalweg benötigt, um eine AP- Polarität innerhalb eines Somiten, und Grenzen zwischen den Somiten zu etablieren.

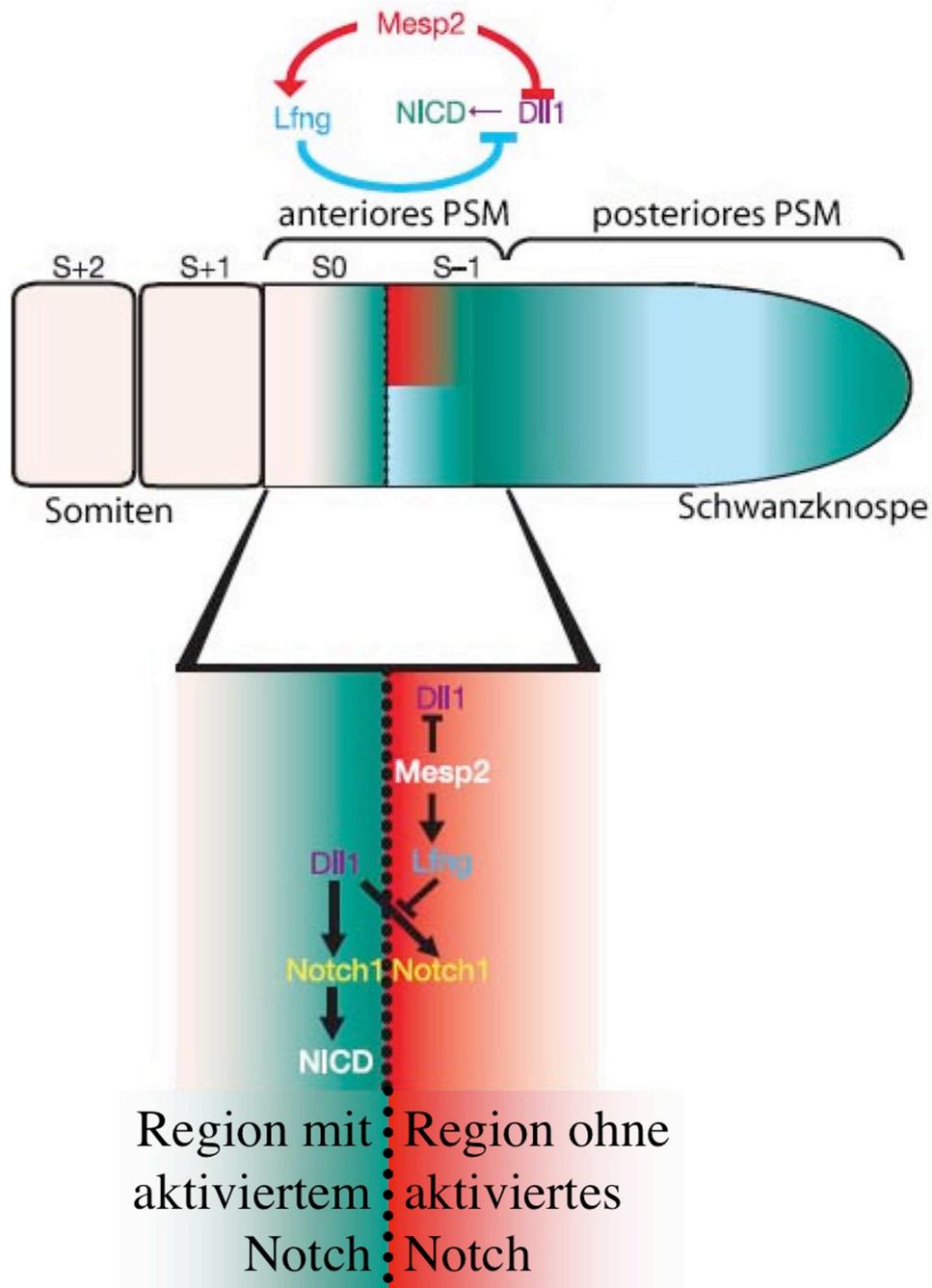


Abbildung 15: Modell zur Etablierung einer Somitengrenze. In der anterioren Hälfte des Somiten S-1 aktiviert *Mesp2* die Expression von *Lfng* und inhibiert die Expression von *Dll1*. Die Glykosylierung von Notch1 durch *Lfng* bewirkt, dass der Ligand *Dll1* den Notch1 Rezeptor nicht mehr aktivieren kann (roter Bereich). Im Somiten S0 wird *Mesp2* nicht exprimiert und *Dll1* kann Notch1 aktivieren (türkiser Bereich). Somit entsteht ein Bereich ohne (rot) neben einem Bereich mit aktivem Notch1 (türkis) und eine Somitengrenze wird zwischen diesen beiden Bereichen gebildet. Abb. mit leichter Modifikation entnommen aus (Morimoto et al. 2005)

3.8 Funktionen des Notch- Signalweges im PSM

Über die Funktion des Notch- Signalweges im Prozess der Somitogenese gibt es verschiedene Theorien. Grundsätzlich könnte der Notch- Signalweg drei Funktionen im PSM haben.

1) Notch könnte direkt an der Bildung der Somitengrenzen beteiligt sein.

Gemäß dem in Kapitel 3.7 vorgestellten Modell spielt der Notch Signalweg in Mausembryonen eine entscheidende Rolle in der Bildung der Somitengrenzen. Auch die Analyse zahlreicher Embryonen, in denen Komponenten des Notch- Signalweges deletiert wurden, legt dies nahe. So wurden für *Notch1*^{-/-} (Conlon et al. 1995) *Dll1*^{-/-} (Hrabe de Angelis et al. 1997), *Dll3*^{-/-} (Kusumi et al. 1998), *Lfng*^{-/-} (Evrard et al. 1998; Zhang and Gridley 1998), *Presenilin1* (Wong et al. 1997), *Rbp-Jk*^{-/-} (Oka et al. 1995), *Pofut1*^{-/-} (Shi and Stanley 2003) und *Hes7*^{-/-} (Bessho et al., 2001b) Embryonen Defekte in der Segmentierung beschrieben. Auch zeigten Ergebnisse aus Hühnerembryonen, dass die ektopische Überexpression des Notch Zielgenes *Lfng* zur Bildung einer Somitengrenze führt (Sato et al. 2002).

2) Notch könnte die Oszillation der zyklischen Gene im PSM generieren oder kontrollieren und dadurch die Bildung der Somitengrenzen beeinflussen.

Diese Funktion besagt, dass die zyklische Aktivierung von Notch und die zyklische Transkription einer Vielzahl der Notch Zielgenen die Grundlage des sogenannten Oszillators (der Uhr, siehe Kapitel 3.1.2.1) bildet und der Notch- Signalweg eine zentrale Komponente der molekularen Uhr ist (Palmeirim et al. 1997; Zhang and Gridley 1998; Saga and Takeda 2001; Henry et al. 2002; Holley et al. 2002; Morales et al. 2002; Oates and Ho 2002; Dale et al. 2003; Serth et al. 2003; Zhang et al. 2006).

3) Notch könnte die benachbarten Zellen synchronisieren.

Mutationen des Notch- Signalweges führen zu einem Verlust der Koordination zwischen benachbarten Zellen und das Gewebe erscheint als eine mosaikartige Mischung von Zellen die oszillierende Gene in unterschiedlichen Mengen exprimieren (Ozbudak and Pourquie 2008). Dies führte zu einer dritten Hypothese, welche Funktion der Notch- Signalweg im PSM erfüllen könnte. So könnte die Zell- Zell Kommunikation durch den Notch- Signalweg für die Synchronisierung der Oszillationen benachbarter Zellen sorgen. In Zebrafischen scheinen sich die Fakten für diese Hypothese zu erhärten (Jiang et al. 2000; Horikawa et al. 2006; Ozbudak and Pourquie 2008). Hingegen für Mausembryonen ist diese Theorie noch nicht eindeutig bestätigt werden.

Grundsätzlich ist es denkbar, dass Notch alle drei Funktionen erfüllt, da sie sich nicht gegenseitig ausschließen. Welche dieser Funktionen der Notch Signalweg aber speziell in der Somitogenese von Mäusen erfüllt, wurde in dieser Arbeit genauer analysiert.

4. Materialien und Methoden

4.1 Allgemeine Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
4% PFA/PBS	160g PFA (Paraformaldehyd, Sigma), 400ml PBS (10X), 2l ddH ₂ O, 1ml NaOH (10N) auf 60°C erhitzen bis PFA gelöst ist, abkühlen mit Indikatorpapier auf pH 6- 7 einstellen, mit ddH ₂ O auf 4l auffüllen
10x PBS	80g NaCl, 2g KCl, 6,1g Na ₂ HPO ₄ , 1,9g KH ₂ PO ₄ , pH 7,3, auf 1l mit ddH ₂ O
PBS	50ml 10xPBS, 450ml ddH ₂ O
10x TBS	80g NaCl, 2g KCl, 250ml Tris- HCl (1M), pH 7,5, auf 1l mit ddH ₂ O
Proteinase K Puffer	0,1M Tris- HCl pH 8,0, 5mM EDTA, 0,5% (v/v) SDS, 200µg/ml Proteinase K
DEPC- H ₂ O	100µl DEPC (4,12g/mol, Diethylpyrocarbonat, AppliChem) auf 1l ddH ₂ O, ü.N. bei RT stehen lassen, autoklavieren

Tabelle 1: Auflistung aller in mehreren Methoden verwendeten Lösungen

4.2 Embryologische Methoden

4.2.1 verwendete Mäuse

Die beiden Cre Konstrukte (Tstreak::Cre und Msd::Cre) wurden von André Schneider kloniert und von Karin Schuster- Gossler injiziert. Bei dem Tstreak Promoter handelt es sich um ein 650 bp langes Fragment (erhalten von Bernhard Herrmann) welches die regulatorischen Elemente des Brachyurygenes enthält (Clements et al. 1996).

Bei dem Msd Promoter handelt es sich um ein 1,5 kb Fragment aus dem *DIII* Promoter (Beckers et al. 2000).

Die Promotoren wurden gemeinsam mit einem Kern- lokalisierten *Cre* in den Vorkern befruchteter Eizellen injiziert und integrierten an einer nicht vorhersehbaren Stelle im Genom. Auf diese Art wurden zwei Mauslinien etabliert und deren Phänotypen verglichen, um sicher zu stellen, dass der Integrationsort keinen Einfluss auf diesen hat. Für die anschließenden Analysen wurde nur einer der beiden Mauslinien verwendet.

Die ROSA^{NICD} Mäuse wurden von Doug Melton zur Verfügung gestellt (Murtaugh et al. 2003). Bei diesem Stamm handelt es sich um einen knock- in (d.h. die Einfügung) einer bestimmten Sequenz in den *Rosa26* (reverse orientation splice acceptor 26) Genlokus. Dieser Genlokus wurde ursprünglich während einer Gene- Trap (Gen- Falle) Analyse entdeckt (Friedrich and Soriano 1991), bei der so genannte "Trap- Vektoren" entweder durch Retroviren, oder durch Elektroporation in embryonale Stammzellen (ES- Zellen) eingebracht wurden und dann an verschiedensten Stellen im Genom integrieren. Die Vektoren enthalten ein Reporter gen (meist β - Galaktosidase) welches allein nicht exprimiert wird. Erst durch die Integration in den endogenen Lokus eines Gens wird das Reporter gen transkribiert und spiegelt die Expression des Gens wieder (Gossler 1993). Der Rosa26 Promoter führte dabei zu einer ubiquitären Expression von β - Galaktosidase (Friedrich and Soriano 1991). Da der homozygote Verlust des Gens keinen erkennbaren Phänotyp aufweist (Zambrowicz et al. 1997), eignet sich dieser Lokus besonders gut für die Expression von Transgenen.

Die ROSA^{NICD} Mäuse enthalten die cDNA der intrazelluläre Domäne von *Notch1* (NICD), einer aktiven Form von Notch1, (Aminosäure 1749 - 2293) (Kopan et al. 1994; Mizutani et al. 2001) mit einer *Ires- GFP* Kasette. Da die Überexpression dieses exogenen NICDs embryonal letal ist, wurde eine *Neo/Stop* Kasette davor kloniert (siehe Abb. 16). Die *Pgk- Neo- Stop* Kasette besteht aus dem *Pgk* (phosphoglycerate kinase) - Promoter, welcher aus Hefen stammt und in eukaryotischen Zellen eine ubiquitäre Expression aufweist, und *Neo*, einem Neomycin Resistenz Gen. In Geweben, welche kein *Cre* exprimieren, wird nur die *Pgk- Neo* Kasette transkribiert, da die Transkription an dem drauf folgenden *Stopp* angehalten wird. Durch *Cre* werden die *Pgk- Neo- Stop* Kasette und die *Stopp* Sequenz an den *LoxP* Schnittstellen durch homologe Rekombination entfernt und dadurch die Expression von *NICD* und *GFP* aktiviert. Während die Expression durch den Rosa- Promoter ubiquitär ist, wird *Cre* nur unter einem gewebespezifischen Promoter exprimiert und somit auch nur in diesen Geweben die Expression von *NICD* und *GFP* aktiviert.

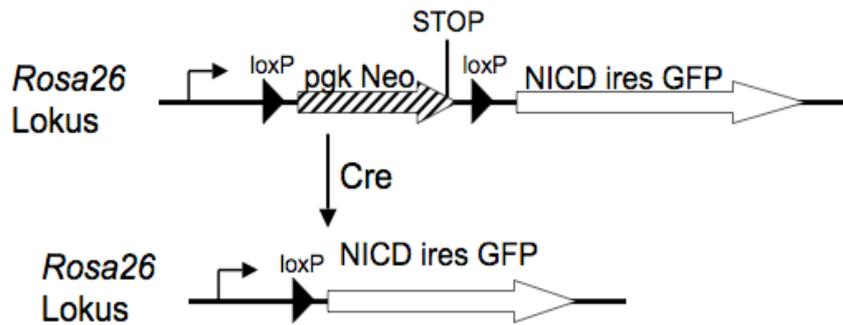


Abbildung 16: Schema des Rosa^{NICD} Locus.

Die Rosa^{LacZ} Mäuse, welche von Philippe Soriano (Soriano 1999) zur Verfügung gestellt wurden, sind genauso aufgebaut wie die ROSA^{NICD} Mäuse, nur dass sie statt der NICD- Ires- GFP Kasette das Enzym β - Galaktosidase enthalten. Die β - Galaktosidase ist ein unspezifisches Enzym. Sie setzt neben dem natürlichen Substrat Lactose (Milchzucker) verschiedene andere Substrate, wie zum Beispiel X- Gal (5- Brom- 4- Chlor- 3- Indoxyl- beta- D- Galactopyranosid) um. Dabei spaltet die β - Galaktosidase Aglycon (5- Brom- 4- Chlorindol) von dem Zucker (β - D- Galaktose) ab. Das Aglycon wird dann zu einem blauen Indigofarbstoff oxidiert.

Die Notch1^{LoxX} Mäuse, bei denen das erste Exon von LoxP Stellen flankiert wird, stammen von Freddy Radtke (Nicolas et al. 2003). Die Delta1^{LoxP} Mäusen (LoxP Schnittstellen vor Exon 3 und hinter 4) wurden von Julian Lewis und Katsuto Hozumi (Hozumi et al. 2004) zur Verfügung gestellt. Die Pofut1^{-/+} Mäuse, bei denen Exon2 deletiert wurde, stammen von Pamela Stanley (Shi and Stanley 2003).

4.2.2 Genotypisierung der Mäuse

Um die transgenen Mäuse typisieren zu können, wurden sie zunächst durch Löcher in den Ohren nummeriert, und dann ein kleines Stück des Schwanzes abgeschnitten. Diese Schwanzstücke wurde über Nacht bei 56°C in 500 μ l Proteinase K Puffer (0,1M Tris- HCl pH 8,0, 5mM EDTA, 0,5% (v/v) SDS, 200 μ g/ml Proteinase K) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die unlöslichen Bestandteile für 10 min bei 13200rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf- Gefäß überführt. Anschliessend wurde die genomische DNA durch die Zugabe von 500 μ l Isopropanol gefällt, abzentrifugiert und in 200 μ l TE- Puffer gelöst. Zuletzt wurden die DNAsen durch eine Inkubation bei 65°C für 20 min

denaturiert. Die so gewonnene DNA wurde mittels PCR analysiert (siehe Abschnitt 2.2.6). Dazu wurden die Primer- Kombinationen aus Tabelle 2 verwendet.

Maus- stamm		Forward- Primer	Reverse- Primer
Notch1 ^{LoxP}		GTAGACTGGAAGCTACTG	GCATGAAGTGGTCCAGGGTG
Rosa- NICD oder Rosa- LacZ	mut	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	GAAAGACCGCGAAGAGTTTG
	wt	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	TAAGCCTGCCCAGAAGACTC
Dll1 ^{2LoxP}		GCATTTCTCACACACCTC	GAGAGTACTTGATGGAGCAAG
Pofut1		AATGCCGTGCTGAGAGTAAAGG	ACCCACAGGCTGTGCAGTCTTTG
Tstreak Cre		AATCTTTGGGCTCCGCAGAG	ACG TTCACCGGCATCAACG
Msd Cre		ATCCCTGGGTCTTTGAAGAAG	ACG TTCACCGGCATCAACG
Rbp-JK ^{LoxP}		AAGCCCCTTTCTTTGTGCGTGC	ATGCTCCCCTGTTGTGAACTGG
Rbp-JK ^{KO}	mut	AAGCCCCTTTCTTTGTGCGTGC	GCTTGAGGCTTGATGTTCTGTATTGC
	wt	GCACTGTTCAATCGCCTTCG	GTCTGCCCGTAATGGATGTAGC
Dll1 ^{LacZ}	mut	ATCCCTGGGTCTTTGAAGAAG	CAAATTCAGACGGCAAAC
	wt	CTGCTGCGCGGTGGAGGGAGG	GGAGTCGACACCCAGCACTGGCG

Tabelle 2: Auflistung der zum Genotypisieren der Mäuse verwendeten Primer.

4.2.3 Isolation von Embryonen

Die Embryonen wurden mit Hilfe von feinen Pinzetten (Dymont Nr. 5) in kaltem PBS unter dem Stereomikroskop aus dem Uterus der Mutter frei präpariert (Hogan et al. 1994). Für die spätere Verwendung bei der Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung (Abschnitt 2.4.5) wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C in 4% PFA fixiert. Am darauf folgenden Tag wurden sie dreimal für 10 min in PBS gewaschen und in 25%, 50%, 75% und 100% Methanol/PBS schrittweise entwässert. Anschließend wurden sie in 100% Methanol bei -20°C gelagert.

4.2.4 DNA- Präparation aus Dottersäcken

Von den isolierten Embryonen (siehe Abschnitt 2.2.3) wurde vor der Fixierung der Dottersack entnommen und in gleicher Weise wie die Schwanz- DNA präpariert (Abschnitt 2.24). Nur wurde die Dottersack- DNA in 50µl statt in 200µl TE aufgenommen. Somit konnten die Embryonen durch verschiedene Primerkombinationen (siehe Tabelle 2) genotypisiert werden.

4.2.5 Schwanzhälftenkulturen

Um dynamische Prozesse während der Entwicklung beobachten zu können, wurden Schwanzhälftenkulturen angelegt. Dabei wurde der Schwanz eines Embryos mit Hilfe einer Insektennadel (Firma Finescience) in zwei Hälften geteilt und eine davon sofort mit 4%PFA fixiert. Die andere Hälfte wurde in Kulturmedium (DMEM mit 30% FCS (fetales Kälberserum), 2mM Glutamax und 10000 iU/ml Penizillin/Streptavidin) übertragen und in den Deckel einer Petrischale pipettiert. Die Petrischale wurde vorsichtig invertiert, so dass ein hängender Tropfen entstand. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurde auch diese Hälfte in 4%PFA fixiert und beide Schwanzhälften am darauf folgenden Tag dehydriert (siehe Abschnitt 2.2.3).

4.3 Histologische Methoden

4.3.1 LacZ Färbung

Die Embryonen wurden, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, präpariert und ihrem Alter entsprechend fixiert. Embryonen von E8.5 bis E9.5 wurde für etwa 5 min, ältere Embryonen bis einschließlich E12.5 wurden für 15 min in Fixierungslösung (siehe Tabelle 3) fixiert. Anschließend wurde drei mal für 15 Minuten in Waschlösung (siehe Tabelle 3) gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen in Färbelösung überführt und bei 37°C inkubiert. Die Färbung setzte nach 10- 30 Minuten ein und wurde nach etwa 4 Stunden durch die Zugabe von 4% PFA abgestoppt.

Es wurde darauf geachtet, dass von allen Lösungen mindestens das 10fache des Volumens der Embryonen verwendet wurde.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Phosphatpuffer (SPP)	77,4ml Na ₂ HPO ₄ (1 M), 22,6ml NaH ₂ PO ₄ (1 M), 10ml ddH ₂ O
Fixierlösung (immer frisch)	10ml SSP, 80µl Glutaraldehyd (50% in ddH ₂ O), 20µl Mg ₂ Cl (1M), 100µl EGTA (0,5M, pH 7,5)
Waschlösung	2ml Mg ₂ Cl (1M), 10ml Na- desoxycholat (10%), 2ml NP- 40 (10%), 986ml ddH ₂ O
Färbelösung	9,6ml Waschlösung, 100µl K ₃ FeCN ₆ (0,5M), 100µl K ₄ FeCN ₆ (0,5M), 200µl X- Gal (50mg/ml in Dimethylformamid, aufbewahrt bei - 20°C)

Tabelle 3: Auflistung der zur LacZ Färbung benötigten Reagenzien.

4.3.2 Ganzobjekt Antikörperfärbung zur Detektion der Notch1 Aktivierung (Val1744)

Die Embryonen wurden wie unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben präpariert und ihrem Alter entsprechend fixiert. Embryonen des Entwicklungsstadiums E8.5- E9.0 wurden für exakt eine Minute, Embryonen ab E9.5 für 5 min fixiert. Anschließend wurden sie drei mal für 5 min in NH₄Cl- PBS (siehe Tabelle 4) gewaschen und für eine ihrem Alter entsprechende Zeit in 15%igem H₂O₂ in NH₄Cl- PBS geblichen. Embryonen am Entwicklungstag 8.5 wurden für 15, ältere Embryonen für jeden 1/4 Entwicklungstag 5 min länger behandelt (d.h. E8.75 für 20 min, E9.0 für 25 min usw). Als nächstes wurden die Embryonen in TS- PSB (siehe Tabelle 4) überführt und das Wasserstoffperoxid gewaschen. Der anti- aktivierte Notch1 (Val1744) Antikörper (Firma Cell Signaling) wurde 1:100 in TS- PBS verwendet und über Nacht auf den Embryonen inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde 10 mal mit TS- PBS gewaschen. Da der Val1744 Antikörper aus Kaninchen stammt, wurde er durch einen biotinylierten anti-rabbit Antikörper (Firma Perkin Elmer), erkannt. Auch dieser zweite Antikörper wurde 1:100 in TS- PBS verdünnt und über Nacht inkubiert. Nach 10- maligem Waschen in TS- PBS wurde als drittes ein Streptavidin- HRP gekoppelter Antikörper verwendet (Firma Vector Lab). Das Streptavidin bindet an das Biotin des zweiten Antikörpers. HRP steht für "HorseRadish Peroxidase", da diese Peroxidase aus "Horseradish", also Meerrettich, isoliert wird. Auch dieser Antikörper wurde über Nacht in einer 1:100 Verdünnung in TS- PBS auf dem Embryo inkubiert. Am nächsten Tag wurde erneut 10 mal mit TS- PBS gewaschen um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurden die Embryonen für 10 min

in Lösung A überführt, anschließend drei mal für 15 min in Lösung B gespült und dann für 15 min in Lösung C inkubiert. Zuletzt erfolgte die Färbung in Lösung D. Nach abgeschlossener Färbung wurden die Embryonen in 2% PFA in 50% Ethanol- 50% PBS überführt und sofort fotografiert, da die Färbung schnell ausbleicht.

Alle ü.N. Inkubationsschritte wurden bei 4°C, die Übrigen bei RT durchgeführt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Fixierlösung	5ml Methanol (100%), 5ml Dimethylsulfoxid
NH ₄ Cl- PBS	5ml NH ₄ Cl (1M), 10ml PBS (10X), 85ml ddH ₂ O
TS- PBS	5ml Triton X- 100 (10%), 5ml FCS, 5ml 10X PBS, 35ml ddH ₂ O
Naphthol Stocklösung	10mg 4- Chloro- 1- Naphthol, 100µl Ethanol (100%) (bei - 20°C aufbewahrt)
Lösung A	1ml Tris (1M, pH 7,5), 100µl Triton X- 100 (10%), 8,9ml ddH ₂ O, 4µl Naphthol Stocklösung
Lösung B	1ml Tris (1M, pH 7,5), 8,9ml ddH ₂ O, 4 µl Naphthol Stocklösung
Lösung C	6ml ddH ₂ O, 50 µl Naphthol Stocklösung, 4ml Ethanol (100%)
Lösung D	7,5ml ddH ₂ O, 62,5µl Naphthol Stocklösung, 5ml Ethanol (100%), 2,5µl H ₂ O ₂ (30%)

Tabelle 4: Auflistung der für die Antikörperfärbung benötigten Lösungen.

4.3.3 Paraffineinbettung von Embryonen

Nach der abgeschlossenen LacZ- Färbung wurden die fixierten Embryonen dehydriert, mehrfach mit Isopropanol gespült und für 5 min auf 65°C erwärmt. Da die Färbung der Embryonen in reinem Isopropanol bei 65°C verloren geht, durfte die Inkubationszeit von 5 min nicht überschritten werden. Anschließend wurde flüssiges Paraffin (Roti[®]- Plast) zu einer Endkonzentration von mind. 50% zugegeben und 2 Stunden bei 65°C inkubiert. Danach wurden die Embryonen schrittweise in 100% Paraffin überführt und in Einweg- Plastikformen (Polysciences, Inc.) gegossen. Nach dem Ausrichten der Embryonen für die richtige Schnittebene, härteten die Blöcke bei RT aus und wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Mit dem Ultramikrotom (RM 2155, Leica) wurden 10µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger (SuperFrost[®]Plus, Menzel- Gläser) aufgezogen und ü.N. bei 42°C getrocknet.

4.3.4 Plastikeinbettung von Embryonen

Zur Visualisierung der Somiten wurden einige Embryonen in Plastik eingebettet und am Mikrotom geschnitten. Dazu wurden sie mit Ethanol dehydriert, mit Hilfe des „HISTOSERIN Embedding“ Kits (Leica) gemäß den Angaben des Hersteller in Plastik eingebettet und mit Technovit 3040 (Heraeus Kulzer) auf Halterungen aufgeblickt. Anschließend wurde 5µm dicke Schnitte mit dem Ultramikrotom (RM 2035, Leica) angefertigt, in ein Streckbad bei RT überführt und auf Objektträger (SuperFrost[®], Menzel- Gläser) aufgezogen. Nachdem die Schnitte ü.N. bei 60°C getrocknet waren, wurden sie mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und bei RT gelagert.

4.3.5 Hämatoxylin/ Eosin Färbung von Plastikpräparaten

Zunächst wurden die Schnitte kurz in 100% Roti[®]- Histol und anschließend in 100% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde sie 2 min in Hämalaun[®] (Merck) inkubiert und mehrfach mit Wasser gespült. Dann wurde mit Eosin G für 6 min gefärbt und erneut mehrfach mit Wasser gespült. Zum Schluss wurden die Objektträger in 100% Ethanol dehydriert, kurz in 100% Roti[®]- Histol getaucht und mit VectaMount[™] (Firma Vector) eingedeckelt. Der letzte Schritt musste sehr schnell erfolgen, da sich die Schnitte sonst wieder von den Objektträgern lösten.

4.3.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Um die Oberflächenstrukturen, speziell die Somiten, der Embryonen erkennen zu können, wurden diese im Rasterelektronenmikroskop angeschaut. Dazu wurden die Embryonen wie gewohnt in PBS präpariert (siehe Abschnitt 2.2.3) und anschließend ü.N. bei 4°C in Fixierlösung 1 (siehe Tabelle 5) fixiert. Diese Fixierung mit Glutaraldehyd vernetzt hauptsächlich Proteine. Am nächsten Tag wurden die Embryonen mehrfach in Na-CacodylaT-Puffer (siehe Tabelle 5) gewaschen und 90 min bei RT unter Ausschluss von Licht in Fixierlösung 2 (siehe Tabelle 5) inkubiert. Dies bewirkte die Vernetzung der Lipide. Anschließend wurden Embryonen in einer aufsteigenden Acetonreihe dehydriert und entfettet. Darauf folgte eine Kritisch- Punkt-Trocknung bei dem zuerst das Aceton durch flüssiges CO₂ ersetzt und anschließend das CO₂ durch die kritische Punkt-Trocknung entfernt wurde. Die getrockneten Embryo- Präparate wurden auf Präparathalter aus

Aluminium (Firma Planto, G301) geklebt und mit einem ca. 20 nm dicken Gold- Palladium Film überzogen und in einem Exsikkator trocken aufbewahrt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Na- CacodylaT-Puffer	(0,1M) Dimethylarsinsäure, pH7,3
Fixierlösung 1	3% Glutaraldehyd (Polyscience) in Na-CacodylaT-Puffer
Fixierlösung 2	2% OsO ₄ in Na- CacodylaT-Puffer

Tabelle 5: Auflistung der für die Antikörperfärbung benötigten Lösungen.

4.3.7 Skelettpräparation

Für die Skelettanalyse wurden die Skelette von Embryonen 15,5 Tage nach der Befruchtung präpariert. Dabei wurde ein Teil der Haut des Rückens vorsichtig mit feinen Pinzetten (Dymont Nr. 5 Standard) entfernt. Auch die inneren Organe des Brust- und Bauchraumes wurden teilweise entfernt und die Embryonen anschließend über Nacht in 100% Ethanol fixiert.

Danach wurden zuerst die knorpeligen Anteile 2 Tage mit Alcian blue Färbelösung (siehe Tabelle 6) gefärbt. Anschließend wurden die Embryonen 3 Tage in 100% Ethanol gewaschen, um überschüssiges Alcian blue zu entfernen. Danach wurden die knöchernen Anteile des Skelettes mit Alizarin red Färbelösung (siehe Tabelle 6) bei RT über Nacht gefärbt. Das überschüssige Alizarin red wurde dann durch mehrfaches Spülen mit Wasser entfernt und das Skelett mehrere Tage in anfangs 2%iger, später 0,5%iger KOH Lösung geklärt, bis die Haut weitestgehend entfernt und die Reste durchsichtig geworden waren. Nach abgeschlossener Klärung wurden die Skelette photographiert und in einer 50% Glycerin, 50% Ethanolösung gelagert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Alcian blue Stocklösung	0,3% Alcian Blue 8GX (Sigma #3157) in 80% Ethanol
Alcian blue Färbelösung	25ml Alcian Blue Stocklösung, 100ml konzentrierte Essigsäure, 375ml 100% Ethanol
Alizarin red Stocklösung	0,1% Alizarin Red S (Sigma#5533) in 50% Ethanol
Alizarin red Färbelösung	25ml Alizarin Red Stocklösung, 125ml 2% KOH, 350ml 5ml ddH ₂ O

Tabelle 6: Auflistung der für die Skelettfärbung benötigten Lösungen.

4.4 RNA Methoden

4.4.1 Isolation von RNA aus Mausembryonen

Um spezifische Exon- Sonden für *in situ* Hybridisierungen zu klonieren, wurde Gesamt-RNA aus Mausembryonen isoliert. Dazu wurde das TriTM Reagenz (Sigma) verwendet. E9,5 Embryonen wurden mit einem Stößel homogenisiert und pro Embryo mit 300µl TriTM Reagenz versetzt. Die Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 1/5 des Volumens Chloroform zugesetzt (d.h. 60µl auf 300µl TriTM Reagenz) und gründlich geschüttelt. Anschließend wurden durch Zentrifugieren drei verschiedenen Phasen getrennt. die rote, organische Phase enthielt die Proteine, die Interphase die DNA und die farblose, obere Phase die RNA. Letztere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäßen überführt und mit Isopropanol (150µl Isopropanol pro 300µl TriTM Reagenz) gefällt. Das RNA- Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 10µl DEPC-H₂O aufgenommen.

4.4.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Die RNA wurde mit Oligo- dT Primern in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde der SuperScriptTM Kit (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Auf dieser cDNA wurden anschließend genspezifische PCR`s durchgeführt (siehe Abschnitt 2.6.6) und die Produkte in Topo[®] Vektoren (Invitrogen) gemäß den Angaben im Kit kloniert.

4.4.3 Herstellung von RNA- Sonden für die *in situ* Hybridisierung

Als Matrize für die antisense RNA- Sonden wurden entweder linearisiert Plasmide oder PCR-Produkte verwendet. Diese wurden zunächst mit Phenol- Chloroform- Isoamylalkohol (siehe Abschnitt 2.6.4.1) ausgeschüttelt um eventuelle Verunreinigungen mit RNasen zu beseitigen. Anschließend wurden sie in 13µl ddH₂O aufgenommen. Die Transkription erfolgte mithilfe von RNA- Polymerase und dem Dig RNA labeling KitTM (Roche Applied Science). Dabei wurden zu den 13µl DNA- Matrize 2µl digoxigenin markierten dNTPs, 2µl Transkriptionspuffer, 1µl RNase- Hemmer und 2µl SP6-, T3-, oder T7- RNA- Polymerase gegeben und für 4h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die RNA gefällt und in 100µl 50% Formamid in DEPC- H₂O aufgenommen.

4.4.4 Die verwendete RNA- Sonden

Name	Vektor	Enzym	Polymerase	Ursprung	AGO #
<i>Lfng</i> - Intron	pBlueskript SK-	HindIII	T3	Morales	1059
<i>Lfng</i>	pGem- T	EcoRI	T7	DNA Stock	707
<i>Hes7</i> - Intron	pGem- T easy	SpeI	T7	Kageyama	391
<i>Hes7</i>	pGem- T easy	SpeI	T7	DNA Stock	977
<i>Axin2</i> - Intron	pSV- SPORT	EcoRI	T7	B. Hermann	1844
<i>Axin2</i>	pCRII- Topo	BamHI	T7	selber hergestellt	946
Dact1	pCRII- Topo	XhoI	SP6	selber hergestellt	2163
<i>Uncx4.1</i>	pSV- SPORT	Sall	T7	DNA Stock	734
<i>Tbx18</i>	pBlueskript KS+	HindIII	T7	Kispert	694
<i>Tbx18</i> - Intron	pCRII- Topo	EcoRV	SP6	selber hergestellt	2235
Dll1 ^{Ex3+4}	pGem- T easy	NotI	SP6	Natascha	392
N1 ^{Ex1}	pCRII- Topo	BamHI	T7	selber hergestellt	2173
Notch2 ^{Ex29/30}	pCRII- Topo	BamHI	T7	selber hergestellt	2250
<i>Sprouty2</i>	pBlueskript	NotI	T3	selber hergestellt	2236
<i>Snail1</i>	pGem7- zf+	ClaI	T7	Gridley	1611
<i>Hey1</i>	pCS2+	BglII	T7	Gessler	2142
Notch1 ^{Extrazellulär}	pCRII- Topo	EcoRV	SP6	selber hergestellt	2228
Dll1	pBlueskript	XhoI	T3	DNA Stock	585
Pax9	pBlueskript	BamHI	T3	DNA Stock	643

<i>GFP</i>	pSP73	BamHI	SP6	Karin	1593
<i>Fgf8</i>	pBlueskript	PstI	T7	DNA Stock	679
<i>Tbx6</i>	pBlueskript	HindIII	T3	DNA Stock	678
<i>Mesp2</i>	pBlueskript	BamHI	T7	DNA Stock	732
<i>Myf5</i>	pBlueskript	PvuII	T7	DNA Stock	667
PapC	pSHlox- 1	EcoRI	SP6	Yamamoto	1946
EphA4	pBlueskript	HindIII	T7	DNA Stock	253
FgfR1	pBlueskript	XbaI	T3	selbst hergestellt	2270
Myogenin	pBlueskript	NotI	T7	DNA Stock	666

Tabelle 7: Auflistung aller verwendeter RNA Sonden.

4.4.5 Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung

Die transkriptionelle Aktivität eines Genes wurde durch die *in situ* Hybridisierung auf ganzen Mausembryo nachgewiesen.

1. Tag :

Die Embryonen für die Hybridisierungen wurden wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben fixiert und dehydriert. Sie wurden in selbst angefertigte Siebchen überführt und in 24- well Zellkulturplatten weiterverarbeitet. Zunächst wurde 1 Stunde lang mit 6% H₂O₂ in 100% Methanol bei 4°C geblichen. Anschließend wurden sie rehydriert und 3 mal in PBST gewaschen. Danach wurden die Embryonen in 4% Paraformaldehyd/ 0,2% Glutaraldehyd in PBST für 20 min nachfixiert und erneut 3 mal für 5 min in PBT gewaschen. Anschliessen wurde für ca. 2 h bei 70°C in Hybe (siehe Tabelle 8) inkubiert. Nach 3 minütigem Aufheizen der in Hybe auf etwa 1µg/ml verdünnten RNA- Sonde bei 80°C wurde diese auf die Embryonen gegeben und ü.N. hybridisiert.

2. Tag :

Zunächst wurde 2 x 30 min bei 70°C in Hybe (siehe Tabelle 8) gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen in RNase Lösung überführt und 1 Stunde bei 37°C mit 100µg/ml RNase A inkubiert um nicht gebundene RNA- Sonden zu entfernen. Danach wurden die Embryonen 5 x 30 min bei 70°C in SSC/FA (siehe Tabelle 8) gespült. Das Formamid wurde dann durch dreifaches Waschen mit TBST bei RT entfernt und die Embryonen anschliessend in MABT (siehe Tabelle 8) equilibriert. Das darauf folgende einstündige inkubieren in Block-

Lösung (10x) sollte unspezifisches Binden des Antikörpers verhindern. Der Anti- DIG Alkaline Phosphatase- gekoppelte Antikörper wurde dann 1:2000 verdünnt in Block- Lösung (1x) ü.N. auf die Embryonen gegeben.

3. Tag :

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu eliminieren, wurde 8 mal für eine Stunde bei RT und ü.N. bei 4°C in TBST (siehe Tabelle 8) gewaschen.

4. Tag :

Die Embryonen wurden 4 mal mit NTMT (siehe Tabelle 8) gewaschen und bei 37°C in BM Purple (Roche) gefärbt. Nach abgeschlossener Färbung wurden die Embryonen in 4% PFA fixiert und gelagert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Hybe	5ml Formamid, 2,5ml SSC (20X, pH4.5), 5µl Heparin (1M), 1% SDS, 2,05ml DEPC- H ₂ O
RNase Lösung	1ml NaCl (5M), 100µl Tris (1M, pH7.5), 10µl Tween, 8,89ml ddH ₂ O
TBST (10X)	8g NaCl, 0,2g KCl, 25ml Tris (1M, pH7.5), 10ml Tween, auf 100ml mit ddH ₂ O
NTMT	1ml NaCl (5M), 2,5ml MgCl ₂ (1M), 5ml Tris (1M, pH9.5), 100µl Levamisol (1M), 50ml ddH ₂ O, 50µl Tween20
Heparin (1M)	100mg Heparin (Sigma) in 1ml DEPC- H ₂ O lösen
MAB	11,6g Maleinsäure,
Block- Lösung (10x)	10% Blocking (Firma Roche) in MAB
Block- Lösung (1x)	5ml Blocking (10x) in 45ml MABT
Levamisol (1M)	24g Tetramisole hydrochloride (Sigma) in 100ml ddH ₂ O lösen
SSC (20X)	17,53g NaCl, 8,82g Natriumcitrat, 50ml DEPC- H ₂ O mit HCl auf pH 4,5 einstellen, auf 100ml mit DEPC- H ₂ O

Tabelle 8: Auflistung der für die *in situ* Hybridisierung benötigten Lösungen.

4.5 Bakterienmethoden

4.5.1 Bakteriennährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB- Medium	für 500ml: 5g Bacto- Trypton, 2,5g Hefe- Extrakt, 2,5g NaCl, autoklavieren bei Bedarf Antibiotika zugegeben (100µg/ml Ampizillin, 25µg/ml Kanamycin, 5mg/ml Tetrazyklin)
LB- Platten	500ml LB- Medium, 1,5 % (w/v) Bacto- Agar bei Bedarf Antibiotika (nach dem Abkühlen der Lösung) zugegeben

Tabelle 9: Zusammensetzung der Nährmedien für Bakterien.

4.5.2 Herstellung elektrisch kompetenter Bakterien

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Bakterienstämme XL1- Blue und SCS110 (Stratagene) verwendet. Der Vorteil der SCS110 gegenüber den XL1- Blue Bakterien ist, dass ihnen sowohl die dam- als auch die dcm- Aktivität fehlt.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden zunächst die gewünschten Bakterien aus einem Glycerol- Stock auf eine LB- Platte mit Tetrazyklin (siehe Tabelle 9) ausgestrichen. Davon wurde eine 20ml Über- Nacht-Kultur in LB- Tetrazyklin Medium angeimpft. 5ml von dieser wurde am nächsten Morgen in 500ml LB- Medium gegeben und bei RT bis zu einer OD600 von 0,7- 0,9 wachsen gelassen.

Alle weiteren Schritte wurden in mit ddH₂O gewaschenen, autoklavierten und auf Eis vorgekühlten Zentrifugenbechern im Kühlraum (4°C) durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde 15 min auf Eis gekühlt und dabei mehrfach geschwenkt, um eine gleichmäßige Kühlung zu erreichen. Anschließend wurden die Bakterien auf zwei Zentrifugenbecher verteilt (250ml) und bei 4500 rpm für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und die Bakterien in 10ml eiskaltem Zellkulturwasser vorsichtig resuspendiert, je auf 400ml aufgefüllt, auf vier 200ml Zentrifugenröhrchen verteilt und erneut abzentrifugiert (4500 rpm, 15 min, 4°C). Danach wurden die Bakterien noch mal genauso resuspendiert, aufgefüllt und abzentrifugiert wie zuvor, um das Pellet zu waschen. Anschließend wurde jedes Pellet in 20ml 10% (v/v) sterilisiertem, eiskaltem Glycerin resuspendiert und in zwei 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dies wurde bei 4500 rpm für 15 min bei 4°C

zentrifugiert und die erhaltenen Bakterienpellets zuletzt in je 2ml 10% Glycerol resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde in 50µl Aliquots auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.5.2.1 Transformation elektrisch kompetenter Bakterien

Zur Transformation wurden die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Gleichzeitig wurden die Elektroporations- Kuvetten vorgekühlt. Die möglichst salzfreie DNA wurde zu den Bakterien gegeben und die Elektroporation mit der Einstellung Ecl2 (2,5 kV) in einer Apparatur von Biorad (*MicroPulser*) durchgeführt. Anschliessend wurden die Bakterien in 300µl LB-Medium aufgenommen und auf LB- Agarplatten (siehe Tabelle 9) ausplattiert.

4.6 DNA Methoden

4.6.1 Präparation von Plasmid DNA

Zur Präparation von Plasmiden im Mini- Ansatz wurden 3ml LB- Medium (mit 100µg/ml Ampizillin oder 25µg/ml Kanamycin) mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und in einem Reagenzglas über Nacht bei 37°C geschüttelt. 2ml dieser Übernachtskultur wurden bei 13200 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakterienpellet in 200µl P1- Puffer (siehe Tab.10) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200µl P2- Puffer (siehe Tab.10) für 1 min bei RT. Dazu wurde das Eppendorf- Reaktionsgefäß mehrfach vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde mit 350µl P3- Puffer neutralisiert und für 15 min bei 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch die Zugabe von 450µl Isopropanol gefällt. Anschließend wurde die DNA durch zentrifugieren (13200 rpm, 15 min) pelletiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Die so gereinigte DNA wurde in 100µl ddH₂O aufgenommen.

Hochreine Plasmid- DNA für DNA- Stocks wurde mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
P1	50mM Tris- HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A (Sigma) bei 4°C aufbewahren
P2	200mM NaOH, 1%SDS
P3	3M Kaliumacetat pH 5,5 (mit konz. Essigsäure einstellen)

Tabelle 10: Zusammensetzung der Lösungen für die Plasmidisolierung.

4.6.2 Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen

Die Plasmid- DNA wurde mit Enzymen der Firma NEB nach Angaben des Herstellers in den jeweils mitgelieferten Reaktionspuffern verdaut. Die Reaktion wurde bei der empfohlenen Temperatur für zwei Stunde durchgeführt. Gespaltene DNA- Fragmente wurden elektrophoretisch analysiert und gegebenenfalls aus dem Gel isoliert.

4.6.3 Agarose- Gelelektrophorese von DNA- Fragmenten

DNA- Fragmente wurden entsprechend ihrer Größe durch Gelelektrophorese in Agarosegelen voneinander trennen. Zur Herstellung der Agarosegele wurde die entsprechende Menge der Agarose in Laufpuffer (1x TAE s. Tabelle 5) unter Kochen in einer Mikrowelle gelöst, abgekühlt, mit Ethidiumbromid (1µg/ml Endkonzentration) versetzt und in eine Gelgießkammer gegossen. Die DNA- Proben wurden mit 6x DNA- Ladepuffer (50% Glycerin, 0,25% Orange G in 1x TAE) versetzt. Zur Größenbestimmung einzelner DNA- Fragmente wurde die 1 kb DNA- Leiter (Invitrogen) verwendet.

4.6.4 Isolierung von DNA- Fragmenten aus einem Agarosegel

Die Elution von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA- Fragmenten aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin[®] Extract II Kits (Macherey- Nagel) nach Angaben des Herstellers.

4.6.4.1 Phenol- Chloroform- Extraktion

Um Verunreinigungen zu entfernen, wurde die Nukleinsäurelösungen mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus Phenol- Chloroform- Isoamylalkohol (25:24:1(v/v)) ausgeschüttelt. Die gereinigte DNA befand sich dabei in der oberen Phase. Diese wurde in ein neues Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumenanteil Natriumacetat und 2,5 mal dem Volumen 100% Ethanol gefällt. Anschließend wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in dem jeweils benötigtem Volumen ddH₂O resuspendiert.

4.6.5 Isolierung und Analyse von DNA- Fragmenten

4.6.5.1 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Typ II) wurde zur Charakterisierung von rekombinanter Plasmid- DNA, zur Isolierung von DNA- Fragmenten oder zur Linearisierung von Plasmid- oder genomischer DNA verwendet.

Salz- und Temperaturbedingungen wurden dabei entsprechend den Herstellerangaben unter Verwendung der mitgelieferten 10x Reaktionspuffer eingestellt. Sofern gefordert wurde dem Ansatz BSA zugesetzt (100x BSA (NEB), entsprechend dem Endvolumen). Die Größe des Reaktionsansatzes und die Inkubationsdauer wurden dem Verwendungszweck angepasst. Für den analytischen Verdau rekombinanter Plasmid- DNA wurden 1 µg DNA unter Verwendung von 1 µl (5- 10 U) Enzym in einem 20 µl Ansatz für etwa 60 min verdaut. Für einen präparativen Verdau wurden entsprechend größere Mengen DNA (10 µg und mehr) in Ansätzen von 50- 100 µl unter Ausdehnung der Inkubationszeit verdaut.

Mehrfachverdaus, also das Schneiden mit mehreren Enzymen, erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers entweder gleichzeitig unter geeigneten Salzbedingungen, wobei u.U. die Inkubationszeiten zu verlängern war, oder sequentiell. Für den sequentiellen Verdau wurde die DNA zunächst mit einem Enzym inkubiert, dann nach einer Phenol/Chloroformextraktion und anschließenden Ethanol- Fällung im nächsten Reaktionspuffer resuspendiert und mit dem nächsten Enzym geschnitten. Die Reihenfolge der Enzyme wurde dabei stets so gewählt, dass das Enzym mit der niedrigeren benötigten Salzkonzentration zuerst verwendet wurde.

4.6.5.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen

Für die Herstellung von Agarose Gelen wurde die in 1xTAE- Puffer (4,84g Tris; 1,142ml Eisessig; 2ml EDTA (pH8; 0.5M); auf 1l mit ddH₂O) gelöste Agarose im Mikrowellenherd bis zur vollständigen Lösung erhitzt und nach einem Abkühlen auf ungefähr 50°C mit Ethidiumbromid versetzt (20 µl/l). Mit dieser Agaroselösung wurde dann in der abgedichteten und mit den entsprechenden Kämmen bestückten Gelkammer das Gel gegossen. Das erkaltete Gel wurde mit 1xTAE- Puffer überschichtet. Die Nukleinsäureproben wurden mit 1/5 Volumen 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wurde je nach Zweck der Auftrennung im Spannungsbereich von 10 bis 100 V durchgeführt, 12- 30 V bei präparativer und 50- 100 V bei analytischer Verwendung. Für das Auftrennen von PCR-Produkten im Rahmen einer Genotypisierung wurden in der Regel Spannungen größer 100V verwendet.

Als Referenz zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde bei jeder Auftrennung auch ein DNA- Molekulargewichtsmarker (5 µl 1kb Leiter) geladen der mit einem Farbmarker versetzt war (Bromphenolblau). Über den Farbmarker wurde der Fortschritt der Auftrennung beobachtet. Nach dem Stoppen der Elektrophorese wurden die Gele mithilfe einer Geldokumentationsanlage dokumentiert.

4.6.5.3 Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarose- Gelen

Für die Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.6.6 Genotypisierung mittels Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)

Für die Polymerase- Kettenreaktion (PCR) wurde eine eigens im Labor hergestellte Taq (*Thermus aquaticus*) DNA Polymerase verwendet. Standard PCR- Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

1µl	template- DNA (1- 50 ng)
1µl	Primer 1 (10pmol)
1µl	Primer 2 (10pmol)
5µl	PCR- Puffer (10x)
5µl	MgCl ₂ (15mM)
1µl	dNTPs (Desoxyribonukleotidlösung, 10mM)
1µl	Taq DNA Polymerase (ca. 5 Einheiten/µl)
32,5µl	ddH ₂ O

Die PCR- Reaktion erfolgte in einer Primus oder Primus 96 Maschine (MWG) nach für die Primer und die Länge des erwarteten PCR- Produktes angepassten Bedingungen.

	Denaturierung 94°C, 3 min
30x	Denaturierung 94°C, 30 sek
	Hybridisierung 50- 65°C, 30 sek
	DNA- Synthese 72°C, 30- 120 sek
	DNA- Synthese 72°C, 5 min

Als Hybridisierungstemperatur wurden 5°C unter der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur (also der Temperatur, bei der sich der Primer von der DNA löst) gewählt. Als Zeitspanne für die DNA- Synthese wurden etwa 30 sec pro 500bp zu erwartenden Produkt verwendet.

4.6.7 Herstellung eigener Matrizen zur RNA Synthese für die Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung

Zur Herstellung eigener, spezifischer Intron- oder Exonsonden wurden die Referenzsequenzen der jeweiligen Gene aus der Datenbank MGI (Mouse Genome

Informatics, <http://www.informatics.jax.org>) herunter geladen und etwa 20bp lange Primer, mit denen ein etwa 600bp langes Fragment mittels PCR amplifiziert werden kann, mit dem Programm MacVector[®] herausgesucht. Für Intronsonden wurden dafür gezielt Fragmente aus dem ersten Intron des Gens amplifiziert. Für Exonsonden wurden Sequenzabschnitte des ersten und zweiten Exons des Gens verwendet.

Als PCR- Template für Intron- Sonden wurde Wildtyp DNA aus Mausschwänzen (siehe Abschnitt 2.2.2) verwendet, als Template für Exonsonden diente cDNA (siehe Abschnitt 2.4.2). Das amplifizierte PCR- Produkt wurde in Topo[®] Vektoren (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers kloniert. Die verifizierten Plasmide wurden sequenziert und die Sequenz nochmals gegen das Maus Genom geblastet (NCBI, National Center for Biotechnology Information) um sicher zu gehen, dass sie spezifisch für das ausgewählte Gen sind.

4.7 Protein Methoden

4.7.1 SDS- Gelelektrophorese

Um die Expression verschiedener Proteine in Mausembryonen untersuchen zu können, wurden die Embryonen wie gewohnt präpariert (siehe Abschnitt 2.2.3). Anschließend wurden die benötigten Gewebe (zum Beispiel das PSM) vom restlichen Embryo mit Hilfe einer Insektennadel (Firma Finescience) abgetrennt und mit dem gleichem Volumen 2x PSB (Protein Sample Buffer) versetzt. Die Gewebe wurden entweder bei - 80°C weg gefroren oder direkt verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5min bei 95°C aufgekocht und dann auf das Sammelgel gegeben. Dieses akkumuliert die Proteine, bevor sie im Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Je nach Größe der zu trennenden Proteine wurden Trenngele einer Konzentration von 6% bis 12% Acrylamid verwendet (siehe Tabelle 11). Die Proteine wurden 30 min bei 200V aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in Gelkammern der Firma BIO RAD mit Laufpuffer (siehe Tabelle 11).

Stocklösung	Acrylamidkonzentration im Trenngel					
	6%	7%	8%	9%	10%	12%
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid (AppliChem)	3ml	3,5ml	4ml	4,5ml	5ml	6ml
4x Tris- SDS pH8,8	3,75ml	3,75ml	3,75ml	3,75ml	3,75ml	3,75ml
ddH ₂ O	8,25ml	7,75ml	7,25ml	6,75ml	6,25ml	5,25ml
TEMED	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl
10% APS	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl

Tabelle 11: Zusammensetzung des Trenngels.

Sammelgel

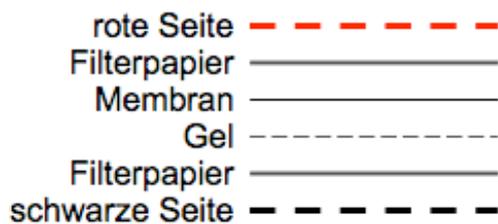
3,7ml ddH₂O, 675µl 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid, 675µl Tris- HCl pH 6,8 (1M), 25µl SDS (20%), 30µl TEMED (Fluka), 3,5µl APS (10%)

Bezeichnung	Zusammensetzung
4x Tris- SDS pH8,8	91g Tris base, pH8,8 mit HCl einstellen, auf 500ml mit ddH ₂ O, autoklavieren, 2g SDS bei 4°C einen Monat lagerbar, sonst Alliquots wegfrieren
4x Tris- SDS pH6,8	6,05g Tris base, pH6,8 mit HCl einstellen, auf 100ml mit ddH ₂ O, autoklavieren, 0,4g SDS bei 4°C einen Monat lagerbar
10% APS	10mg Ammonium Persulfat (Sigma) in 100ml ddH ₂ O lösen
2x PSB	25ml 4xTris- SDS (pH6,8), 20ml Glycerol, 4g SDS, 1mg Bromphenol Blau, mit ddH ₂ O auf 100ml auffüllen, 2ml β- Mercaptoethanol (immer frisch zugeben)
5x EB	720,7g Glycin, 151,4g Tris base, 5l ddH ₂ O pH sollte 8,7 sein, darf aber nicht eingestellt werden
Laufpuffer	200ml EB (5x), 5ml SDS (20%) auf 1l mit ddH ₂ O einstellen

Tabelle 12: Zusammensetzung der für die Acrylamid- Gelelektrophorese benötigten Lösungen.

4.7.2 Western Blot Analyse

Nachdem die Proteine auf dem Acrylamidgel aufgetrennt waren, wurden sie auf eine Nitrozellulose Membran (Millipore) geblottet. Dazu wurde die Membran zunächst 5min in 100% Methanol getränkt, mehrfach mit ddH₂O gewaschen und anschließend in Transferpuffer equilibriert. Die BloT-Kassette wurde wie folgt aufgebaut:



Die schwarze Seite der Kassette wurde dann in das BloT-Modul mit der schwarzen Seite zur schwarzen Wand eingehängt. Der Tank wurde mit Transferpuffer gefüllt, eine Kühleinheit eingehängt und für 1h bei 90V geblottet.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Transferpuffer	3,03g Tris base, 14,4g Glycin auf 1l mit ddH ₂ O
5% Milch	5g Magermilchpulver (AppliChem) in 100ml PBS

Tabelle 13: Zusammensetzung der für die Westernblotanalyse benötigten Lösungen.

Anschließend wurde die Membran mit 5% Milch geblockt und über Nacht mit dem ersten Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBST (siehe Tabelle 1) wurde der zweite Antikörper für 1h inkubiert und erneut in PBST gewaschen. Anschließend wurde mit den "ECLTM Western Blotting Detection Reagents" (Amersham) eine Lichtreaktion induziert, welche mithilfe von Filmen (ECLTM Hyperfilm, Amersham) detektiert wurde.

Antikörper	Verdünnung	Art
Anti- aktiviertes Notch1 (Val1744, Cell Signaling)	1:1000	Erstantikörper
Anti- β - Actin (ICN Biomedicals)	1:300	Erstantikörper
Anti- rabbiT-IgG (ECL TM , Amersham)	1:10000	Zweitantikörper
Anti- mouse- IgG (ECL TM , Amersham)	1:10000	Zweitantikörper

Tabelle 14: Auflistung der für die Westernblotanalyse verwendeten Lösungen.

4.7.3 Strippen der Membran

Um eine Membran nach erfolgter Westernblotanalyse noch mit anderen Antikörpern untersuchen zu können, wurde die Membran für 30 min bei 50°C in Stripping Puffer (62,5mM Tris pH6,7, 2% SDS, 257 μ l β - Mercaptoethanol pro 50ml Puffer) inkubiert um die Antikörper der vorangegangenen Analyse zu entfernen. Anschließend wurde erneut mit 5% Milch geblockt und die Membran mit dem gewünschten Antikörper behandelt (siehe Abschnitt 2.7.2).

5. Ergebnisse

Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse und Modelle, welche Rolle die zyklische Aktivierung von Notch1 in der Somitogenese spielt (siehe Einleitung), wurde im Rahmen dieser Dissertation der Einfluss des Notch- Signalweges auf diesen Prozess genauer analysiert. Dazu wurden Mausembryonen mit einem so genannten "loss- of- function" (Funktionsverlust) mit "gain- of function" (Funktionsgewinn) Mutanten verglichen. Als "loss- of- function" fungierten *Pofut1* und *Dll1* defiziente Embryonen. *Pofut1*^{-/-} Embryonen haben einen Funktionsverlust der O- Fukosyltransferase 1. Das ist ein Enzym welches die Notch Rezeptoren und eventuell auch seine Liganden fukosyliert (siehe Einleitung). Ohne diese Fukosylierung kann der Notch- Signalweg nicht aktiviert werden (Shi et al. 2007). *Dll1* steht für Delta- like 1 und ist der einzige für die Somitogenese entscheidende aktivierende Ligand, der im präsomitischen Mesoderm (PSM) exprimiert wird (siehe Einleitung). Somit führt auch der Verlust von *Dll1* zu einem Verlust der Aktivierung der Notch Rezeptoren. Als "gain- of function" dienten Embryonen, in denen eine aktive Form von Notch1 (NICD), in bestimmten Geweben konstitutiv exprimiert wird. Dazu wurden *Rosa*^{NICD} Mäuse (Murtaugh et al. 2003) mit zwei verschiedenen Cre Linien (*Tstreak::Cre* und *Msd::Cre*) gekreuzt. Bei den *Rosa*^{NICD} Mäusen handelt es sich um einen knock- in (engl. für Einfügung) einer *NICD Ires GFP* (Notch intracellular domain, internal ribosome entry site, green fluorescent protein) Kasette in den genetische Lokus von *Rosa26* (reverse orientation splice aceptor 26), einem Gen unbekannter Funktion (Soriano 1999). Das *Rosa26* Gen wird ubiquitär exprimiert und der homozygote Verlust weist keinen erkennbaren Phänotyp auf (Zambrowicz et al. 1997). Da zu erwarten war, dass die Überexpression von NICD embryonal letal ist, wurde das NICD konditionell exprimiert. Dazu wurde eine von zwei LoxP- Schnittstellen flankierte *Stop-* Kasette vor eine *NICD Ires GFP* Kasette kloniert. Durch das Enzym Cre werden die LoxP- Schnittstellen rekombiniert, die *Stop-* Kasette eliminiert und somit die Transkription der *NICD Ires GFP* Kasette aktiviert (Schema siehe Abb. 16 in Materialien und Methoden, Abschnitt 2.2.1). Da *Cre* nur unter einem gewebespezifischen Promoter exprimiert wurde, war auch die Expression von *NICD* und *GFP* auf diese Gewebe beschränkt. Mit Hilfe dieser Mauslinien wurde untersucht, welchen Einfluss der Notch- Signalweg auf den Prozess der Somitogenese und die Expression darin involvierter Gene hat.

5.1 Die Charakterisierung der verwendeten Cre Mäuse

Als Cre Linien wurden so genannte Tstreak::Cre oder Msd::Cre Mäuse verwendet. Bei den Tstreak::Cre Mäusen handelt es sich um transgene Mäuse die ein Fragment der regulatorischen Elemente des Genes *Brachyury* (Clements et al. 1996), dessen Gensymbol "T" ist, als Promoter für die Transkription von *Cre* enthalten. Dieser Promoter induziert die Expression im Primitivstreifen (englisch "primitiv streak") (Perantoni et al. 2005). Somit setzt sich der Name Tstreak aus T (von dem Gen *Brachyury*) und streak (von primitiv streak) zusammen.

Die Msd::Cre Mäusen enthalten ein Fragment des *Dll1* Promoters (Beckers et al., 2000). Dieses induziert die *Cre* Expression in mesodermalen Geweben und wurde deshalb als Msd für Mesoderm bezeichnet.

Zunächst wurde in beiden Mauslinien die gewebespezifische Cre Expression analysiert. Dazu wurden sie mit Rosa^{LacZ} Reportertermäusen verpaart. Die Rosa^{LacZ} Mäuse entsprechen den Rosa^{NICD} Mäusen mit der Ausnahme, dass sie die Sequenz für das Enzym β -Galaktosidase, anstelle der *NICD-Ires-GFP* Kasette enthalten (siehe Materialien und Methoden). β -Galaktosidase hydrolysiert das Substrat X-Gal, welches anschließend durch Luftoxidation weiter zu einem schwer löslichen Indigofarbstoff umgesetzt wird und die Zellen, in denen er gebildet wird, blau färbt. Dies wird auch als LacZ-Färbung bezeichnet.

Die Reportertermäuse wurden mit je einer der Cre Linien verpaart und mit den isolierten Embryonen wurde eine LacZ Färbung durchgeführt. Da der Prozess der Somitogenese etwa am Tag 8 der Embryonalentwicklung beginnt, wurden Embryonen am Entwicklungstag 7,5 untersucht. Weiterhin wurde die Expression an den Tagen E8.5 und E9.5 verifiziert.

In allen drei untersuchten Stadien wiesen die Embryonen aus der Kreuzung von Tstreak::Cre mit den Rosa^{LacZ} Reportertermäusen (T-LacZ) eine starke Färbung in den mesodermalen Geweben (paraxiales-, intermediäres und Seitenplattenmesoderm; Abb. 17, A- D) und eine schwache, mosaikartige Färbung im Neuralrohr (Abb. 17 D, weitere Daten nicht gezeigt) und im Herzen (Abb. 17 B, weitere Daten nicht gezeigt) auf. In ektodermalen Geweben war *LacZ* nicht exprimiert (Abb. 17 D)

Bei der Kreuzung von Msd::Cre mit den Rosa^{LacZ} Mäusen (Msd- LacZ) wurde ebenfalls eine starke Färbung in mesodermalen Geweben gefunden (Abb. 17, E- H). Ebenfalls wies auch hier das Ektoderm keine Expression auf (Abb. 17, H). Im Unterschied zu den T-LacZ Embryonen war hingegen in Msd- LacZ Embryonen keine β -Galaktosidase Aktivität im Neuralrohr vorhanden (vergleiche rote Pfeilköpfe in Abb. 17 B, C mit 17 F, G) und auch ein Teil des posterioren PSMs wies keine LacZ Färbung auf (vergleiche weiße Pfeilköpfe in Abb. 17 A, B, C mit 17 E, F, G).

Die Expression von Transgenen wird durch die Tstreak::Cre Mäuse im gesamten PSM, durch die Msd::Cre Mäusen nur in anterioren Bereichen des PSM aktiviert. Jedoch führen beide Linien zu einer Expression in den Somiten. Somit kann mithilfe der Tstreak::Cre Mäuse die Expression von Transgenen im gesamten PSM aktiviert werden, während durch die Msd::Cre Mäusen die Expression von Transgenen spezifisch im anterioren PSM aktiviert werden kann. So kann untersucht werden, welche Prozesse im posterioren, und welche Prozesse im anterioren PSM reguliert werden.

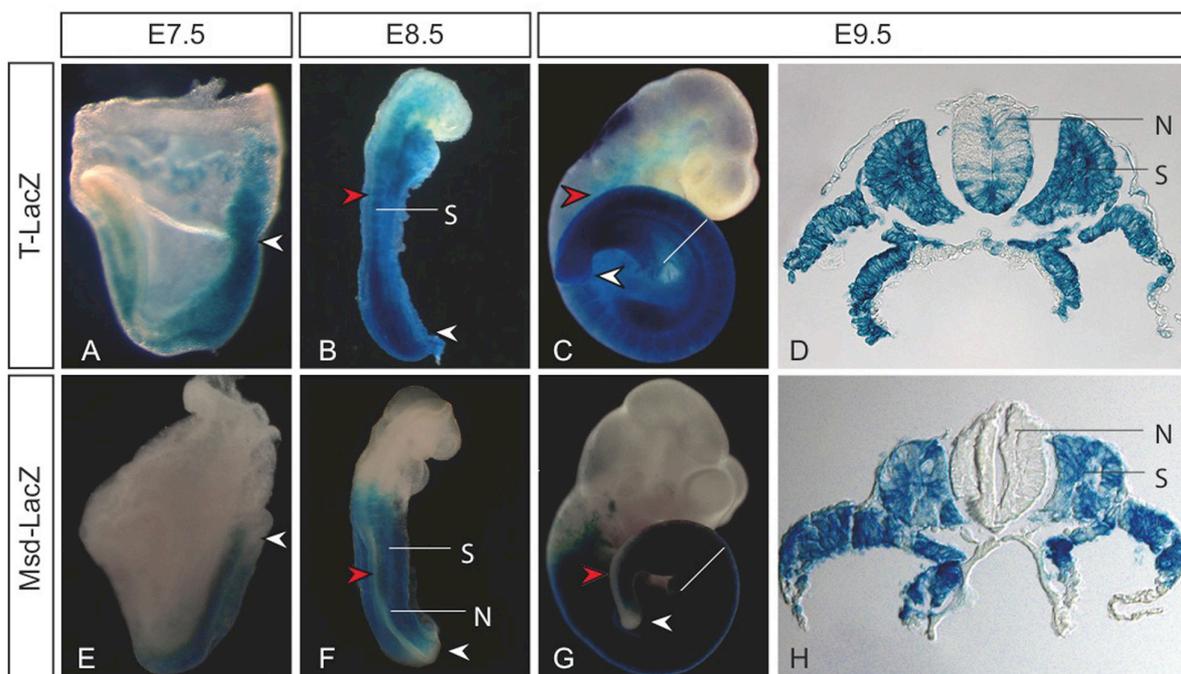


Abbildung 17: Die LacZ Expression als Reporter für die Cre Aktivität. T-LacZ Embryonen (A- D) exprimierten β - Galaktosidase in mesodermalen Geweben. Im Neuralrohr war die Expression mosaikartig (D). Msd- LacZ Embryonen (E- H) wiesen auch eine LacZ Färbung im Mesoderm auf. Im posterioren PSM (weiße Pfeilspitze in E- G) und im Neuralrohr (rote Pfeilspitze in F und G; Markierung in H) wurde keine β - Galaktosidase exprimiert. Die weißen Linien in (C, G) zeigen die Schnittebenen von (D, H; i.g.R.); Alter der Embryonen: E7.5 (A, E), E8.5 (B, F), E9.5 (C, D, G, H); Abkürzungen: N für Neuralrohr, S für Somiten. Die roten Pfeilköpfe markieren das Neuralrohr, die weißen Pfeilköpfe die Schwanzknospe.

5.2 Die Expression von NICD in Tstreak::Cre, Rosa^{NICD} Embryonen

Nachdem sicher gestellt war, dass die Tstreak::Cre Mäuse Cre gewebespezifisch exprimieren, wurden sie mit Rosa^{NICD} Mäusen (siehe Materialien und Methoden) verpaart. Somit wurde die *NICD-Ires-GFP* Kasette in den mesodermalen Geweben konstitutiv exprimiert. Diese Embryonen, sie werden von jetzt an als T-NICD bezeichnet, sterben etwa am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung vermutlich in Folge kardiovaskulärer Fehlbildungen und weisen Defekte im embryonalen Turning auf (siehe Einleitung).

Zunächst sollte analysiert werden, ob diese Embryonen NICD gewebespezifisch überexprimieren. Da kein Antikörper existiert, mit dem spezifisch das exogene (transgene), nicht aber das endogene Notch nachgewiesen werden kann, wurden die Lokalisation von *GFP* Transkripten und die GFP Fluoreszenz repräsentativ für die Expression von *NICD* analysiert. Dazu wurden die *GFP* Transkripte spezifisch mittels Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung detektiert. Die Fluoreszenz des GFP Proteins wurde am lebenden Objekt unter dem Stereomikroskop analysiert und photographiert.

Wie schon zuvor die LacZ Färbung, wurden auch die Expression von *GFP* und die Fluoreszenzsignale des GFP- Proteins im PSM und den Somiten detektiert (Abb. 18, A- E). Im Neuralrohr und im Kopf lag keine Expression vor.

Um sicher zu gehen, dass funktionelles, exogenes NICD exprimiert wird, wurde außerdem die Expression von *Hey1*, einem direkten Notch Zielgen (Katoh and Katoh 2007), mittels Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung untersucht. Während *Hey1* in Wildtyp Embryonen als Streifen im PSM und ab dem Somiten S0 in der anterioren Hälfte der Somiten exprimiert wurde (Abb. 18 I- K), war die Expression in T-NICD Embryonen auf das gesamte PSM und beide Somitenhälften ausgeweitet (Abb. 18 F- H). Auch *Hey1* wurde, genau wie *GFP*, nicht im Kopf (Abb. 18 F) und ebenfalls nicht im Neuralrohr (Sternchen in Abb. 18 H) von T-NICD Embryonen detektiert.

Somit wurde gezeigt, dass in T-NICD Embryonen exogenes NICD in mesodermalen Geweben exprimiert wird und funktionell ist.

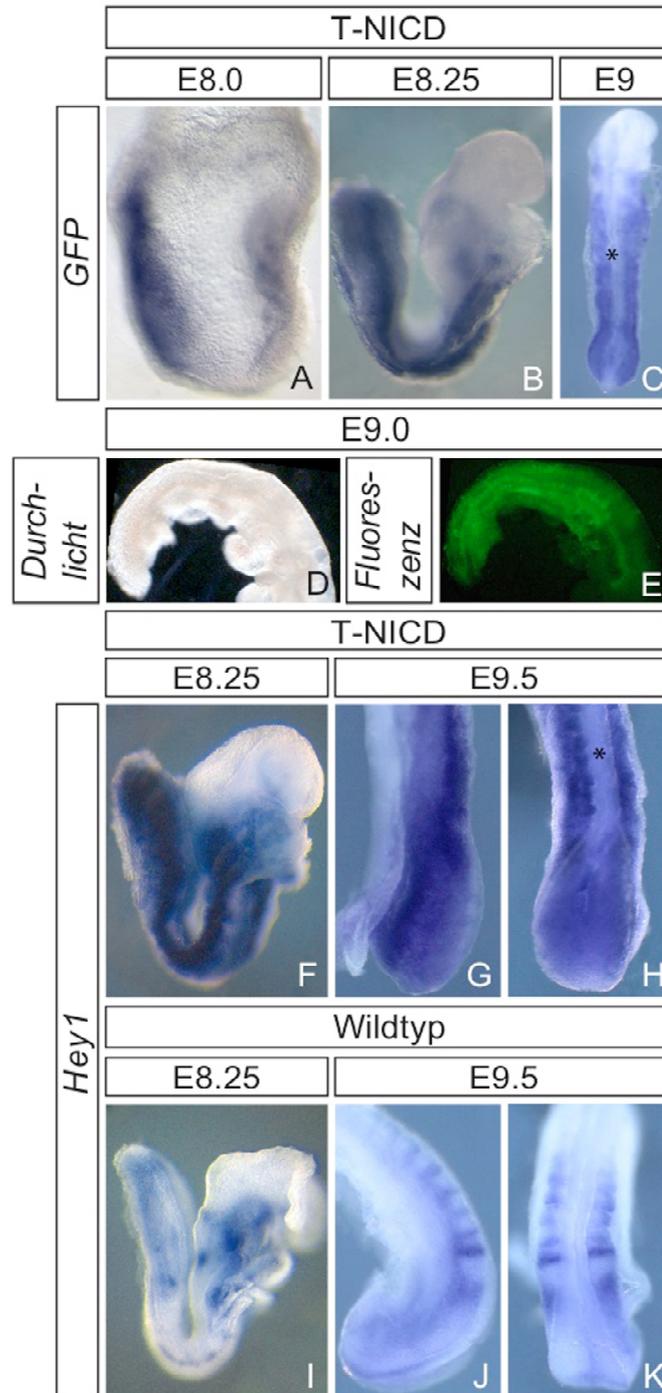


Abbildung 18: Die Expression von *GFP* und *Hey1* in transgenen Embryonen. Die Transkripte von *GFP*, sowie die Fluoreszenz von GFP wurden repräsentativ für die Expression von NICD in transgenen Embryonen untersucht. *GFP* wurde im PSM und in den Somiten von T-NICD Embryonen exprimiert (A, B, C). Im Neuralrohr lag keine Expression von *GFP* vor (Sternchen in C). Auch GFP Fluoreszenzsignale wurden im PSM und in den Somiten von T-NICD Embryonen detektiert (E). In der Durchlichtaufnahme (D) des Embryos von Bild (E) sieht man, dass sich der Kopf des Embryos im Bild rechts, das posteriore Ende des Embryos im Bild links befindet. Das direkte Notch Zielgen *Hey1* wurde in Wildtyp Embryonen als Streifen im PSM (I- K) und in den posterioren Somitenhälften (J, K) exprimiert. In T-NICD Embryonen wurde *Hey1* im gesamten PSM und in den Somiten exprimiert (F-H). Im Neuralrohr von T-NICD Embryonen war *Hey1* nicht exprimiert (Sternchen in H).

5.3 Somitengrenzen in Embryonen mit gestörtem Notch- Signalweg

Zahlreiche Veröffentlichungen beschreiben, dass Embryonen mit gestörtem Notch-Signalweg Defekte in der Segmentierung aufweisen (Conlon et al. 1995; Oka et al. 1995; Hrabe de Angelis et al. 1997; Wong et al. 1997; Evrard et al. 1998; Kusumi et al. 1998; Zhang and Gridley 1998; Bessho et al. 2001b; Shi and Stanley 2003). Daraus wurde geschlossen, dass der Notch- Signalweg essentiell für die Bildung von Somitengrenzen ist (Takahashi et al. 2000; Hirata et al. 2004; Morimoto et al. 2005; Saga 2007; Takahashi et al. 2007a).

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Dissertation erwartet, dass T-NICD Embryonen aufgrund der Überexpression von aktivem Notch1 im gesamten PSM keine Somitengrenzen bilden. Hingegen wurden am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung 9- 18 Somiten in T-NICD Embryonen detektiert (n=22, Abb. 19 D- H). Diese Somiten waren klar voneinander getrennt (Abb. 19 E). Folglich verhindert die Überexpression von NICD nicht die Ausbildung von Somitengrenzen.

Auch *Pofut1^{-/-}* Embryonen, in denen der Notch- Signalweg nicht mehr aktiviert werden kann (siehe Abschnitt 3 Seite 52) (Shi and Stanley 2003), wurden auf die Existenz von Somitengrenzen untersucht. Es ist veröffentlicht, dass *Pofut1^{-/-}* Embryonen 5- 6 Somiten aufweisen (Shi and Stanley 2003). Hingegen wurden in dieser Dissertation in E9,5 Tage alten Embryonen zwischen 9 und 16 deutlich voneinander getrennte Somiten detektiert (n=8, Abb. 19 I, J). Ob diese Embryonen weitere Somiten bilden können, konnte nicht untersucht werden, da sie etwa am Tag 10 ihrer Entwicklung starben (Shi and Stanley 2003).

Grundsätzlich zeigen diese Daten, dass weder die Überexpression von NICD, noch der Verlust von aktiviertem Notch die Ausbildung von Somitengrenzen verhindern.

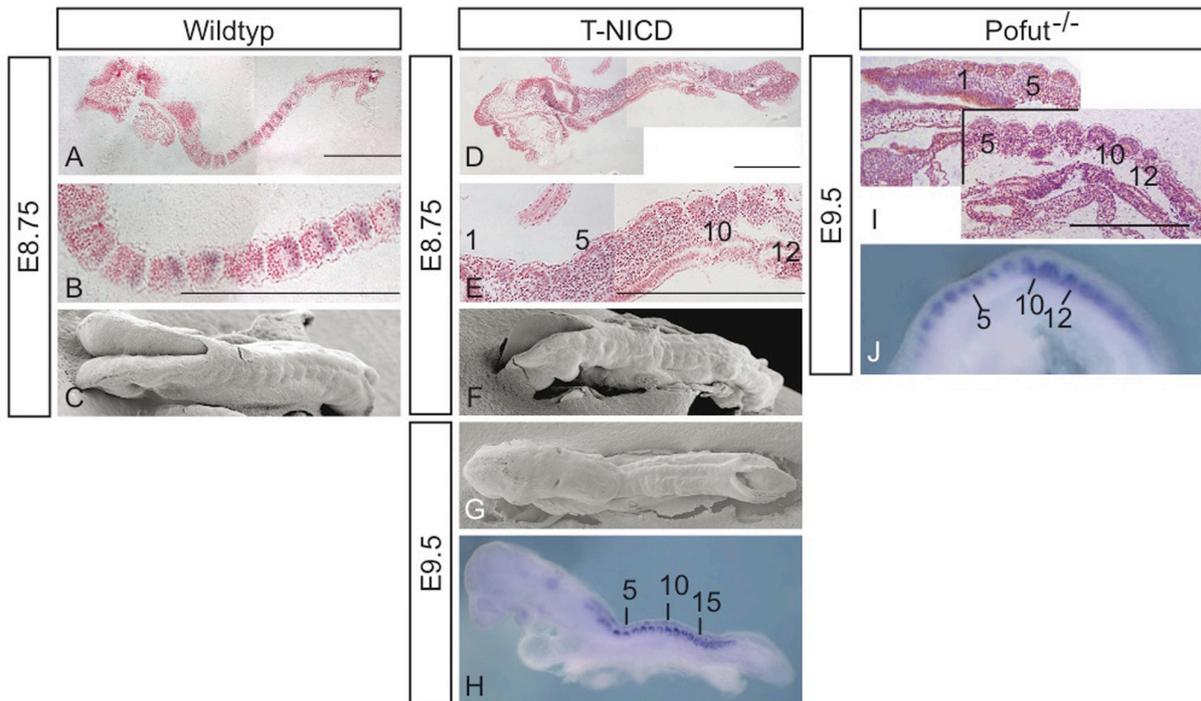


Abbildung 19: Somiten in Embryonen mit gestörtem Notch- Signalweg. Sowohl in Wildtyp (A, B), als auch in T-NICD (D, E) und *Pofut1*^{-/-} (I) Embryonen waren in Hämalaun/ Eosin gefärbten Plastikschnitten Somitengrenzen zu erkennen. Auch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen ganzer Embryonen zeigten, dass nicht nur Wildtyp (C), sondern auch T-NICD Embryonen (F, G) Somitengrenzen aufweisen. Diese Somiten konnten durch eine Ganzobjekt *in situ* Hybridisierung mit der Sonde *Myf5* in T-NICD (H) und *Pofut1*^{-/-} (J) Embryonen visualisiert werden. Das Alter der Embryonen ist in den linken Kästchen angegeben. Die Abbildungen (B, E) sind Detailaufnahmen von (A, D; i.g.R.). Die Abbildungen in (I) zeigen zwei 50µm entfernte Schnitte des gleichen Embryos. Die Balken in (A, B, D, E, I) entsprechen 500µm.

Die durchschnittliche Größe der Somiten von T-NICD Embryonen entsprach etwa der von Wildtyp Embryonen des gleichen Alters (70µm; 70,35µm; i.g.R.). Allerdings schwankte die individuelle Größe der jeweiligen Somiten bei T-NICD Embryonen stärker als in Wildtyp Embryonen. So waren Somiten von 38µm bis 111µm in T-NICD Embryonen zu finden (n=60). In Wildtyp Embryonen (n=60) hingegen variierte die Somitengröße nur zwischen 65µm und 94µm (siehe Abb. 20).

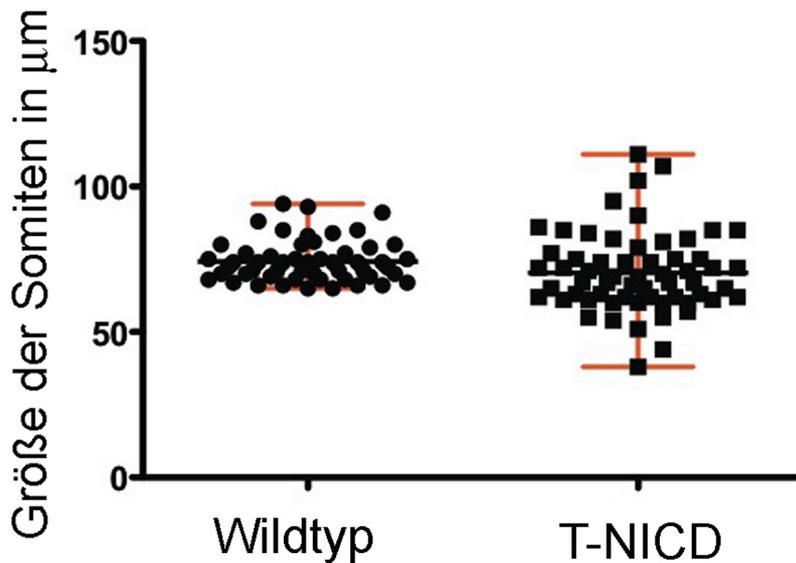


Abbildung 20: Streudiagramm der Somitengröße in Wildtyp und T-NICD Embryonen. Die gemessenen Werte zeigen eine starke Variabilität der Somitengröße in T-NICD Embryonen. Jeder Punkt stellt einen Messwert dar. Die schwarze, horizontale Linie zeigt den Mittelwert der jeweiligen Datenreihe, die roten, horizontalen Linien markieren jeweils den maximalen und minimalen Wert der Datenreihe.

5.4 Die Expression von *Mesp2* und zyklische Zielgene des Notch-Signalweges

Der Transkriptionsfaktor *Mesp2* ist nach aktuellen Modellen maßgeblich an der Bildung der Somitengrenzen und der Determinierung der AP- Polarität innerhalb eines Somiten beteiligt (siehe Einleitung). An der Regulation der *Mesp2* Expression sind unter anderem *Tbx6* und Notch beteiligt. Beide binden kooperativ an den *Mesp2* Promoter und aktivierten die Expression (Yasuhiko et al. 2006). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass auch *Fgf8* die Expression von *Mesp2* reguliert. Sowohl in Hühnchen, als auch in Mäusen scheint *Fgf8* dabei als Inhibitor zu wirken (Delfini et al. 2005; Yasuhiko et al. 2006). Außerdem ist *Fgf8* vermutlich ein Zielgen von *Tbx6* (Li et al. 2006). Somit spielen *Mesp2*, *Fgf8* und *Tbx6* für die Ausbildung von Somitengrenzen eine wichtige Rolle. Da T-NICD Embryonen, im Widerspruch zu aktuellen Modellen, Somitengrenzen ausbilden, sollte in diesen Embryonen die Expression von *Fgf8*, *Tbx6*, und *Mesp2* untersucht werden.

Sowohl *Fgf8*, als auch *Tbx6* wiesen in Wildtyp Embryonen eine gradientenförmige Expression vom posterioren zum anterioren PSM auf (Abb. 21 A, C). Dieses Muster war auch in T-NICD Embryonen nicht verändert (Abb. 21 B, D). Auch die Stärke der Expression in T-NICD Embryonen war vergleichbar mit der in Wildtyp Embryonen. Dies ist für *Tbx6*

verwunderlich, da gezeigt wurde, dass *Tbx6* durch Notch reguliert wird (White et al. 2005). Auch in *Dll1*^{-/-} Embryonen wurde eine gradientenförmige Expression von *Tbx6* gefunden (Abb. 21 E). Ebenfalls war die Expressionsstärke von *Tbx6* in *Dll1*^{-/-} Embryonen vergleichbar mit der in Wildtyp Embryonen.

Somit scheint der Notch- Signalweg alleine keinen Einfluss auf die Expression von *Fgf8* und *Tbx6* zu haben.

Für *Mesp2* ist beschrieben, dass es spezifisch im anterioren PSM in ein oder zwei Streifen exprimiert wird. Dieses variable Expressionsmuster wurde auch im Rahmen dieser Dissertation in Wildtyp Embryonen gefunden. So wiesen fünf von 16 analysierten Wildtyp Embryonen zwei (Abb. 21 F), die anderen 11 Embryonen nur einen (Abb. 21 G) Expressionsstreifen auf. In T-NICD wurde hingegen in 18 analysierten Embryonen stets nur ein Expressionsstreifen gefunden (Abb. 21 I), wobei die Expressionsintensität vergleichbar mit der in Wildtyp Embryonen gefundenen war (vergleiche in Abb. 21 I und G). Auch von acht analysierten *Pofut1*^{-/-} Embryonen wies nur einer einen zweiten Expressionsstreifen von *Mesp2* auf. Allerdings war in *Pofut1*^{-/-} Embryonen die Expression von *Mesp2* deutlich schwächer als die in heterozygoten Embryonen des gleichen Wurfs (vergleiche in Abb. 21 F mit H). Da der Notch- Signalweg an der Aktivierung der *Mesp2* Expression beteiligt ist, ist diese Reduktion der *Mesp2* Expression in *Pofut1*^{-/-} Embryonen allerdings nicht weiter verwunderlich.

Die Funktion von *Mesp2* im Prozess der Somitogenese wird darin vermutet, dass es die Expression von *Lfng* im anterioren PSM aktiviert und somit eine Region ohne aktiviertes Notch1 benachbart zu einer Region mit aktiviertem Notch1 generiert (Bessho et al. 2001b; Morimoto et al. 2005; Niwa et al. 2007) und durch dieses Konfrontation die Bildung einer Somitengrenze induziert (siehe Abschnitt 1.7). Diese Regulation der *Lfng* Expression durch *Mesp2* scheint auch in T-NICD Embryonen vorhanden zu sein. So war die Expression von *Lfng* im anterioren PSM von T-NICD Embryonen stärker als im posterioren PSM (Abb. 21 J'). Der Expressionsstreifen von *Lfng* im anterioren PSM von T-NICD Embryonen überlappte teilweise mit der Expression von *Mesp2* (Abb. 21 J, J'). Wenn man die Verzögerung der *Mesp2* Expression durch den Prozess der Translation mit einbezieht, könnte diese anteriore Expressionsdomäne von *Lfng* tatsächlich durch *Mesp2* aktiviert wurden sein.

Da *Lfng* ein direktes Zielgen des Notch- Signalweges ist (Cole et al. 2002; Morales et al. 2002), ist eine Hochregulierung von *Lfng* im gesamten PSM von T-NICD Embryonen zu erwarten. Während in Wildtyp Embryonen verschieden Phasen zyklischer *Lfng* Expression zu finden waren (Abb. 21 K- M), wiesen T-NICD Embryonen, neben der starken

Expressionsdomäne im anterioren PSM (Abb. 21 N), eine schwächere, uniforme Expression im gesamten PSM auf (Abb. 21 O). Diese schwache Expression von *Lfng* kann entweder bedeuten, dass das exogene NICD nur zu einer schwachen Aktivierung des *Lfng* Promoters führt, oder dass die Expression von *Lfng* im posterioren PSM durch einen anderen Faktor gehemmt wird. Ein Transkriptionsfaktor, der für letzteres in Frage kommt, da er an den *Lfng* Promoter binden kann und die Expression von *Lfng* hemmt, ist *Hes7* (Bessho et al. 2001b; Bessho and Kageyama 2003). Auch *Hes7* ist ein Zielgen des Notch- Signalweges (Bessho et al. 2001a; Hirata et al. 2004). Neben Notch reguliert im posterioren PSM auch der Fgf- Signalweg die Expression von *Hes7* (Niwa et al. 2007).

Während in Wildtyp Embryonen verschiedene Phasen von *Hes7* Expression detektiert wurden (Abb. 21 Q- S), war die Expression von *Hes7* in T-NICD Embryonen im gesamten PSM hochreguliert (Abb. 21 T). Im anterioren PSM von T-NICD Embryonen, etwa im Bereich der *Mesp2* Expression, nahm diese Expression von *Hes7* gradientenförmig nach kranial ab (Abb. 21 T). Folglich könnte *Hes7* der Faktor sein, der zu der geringeren Expression von *Lfng* im posterioren PSM von T-NICD Embryonen führt.

Für *Pofut1*^{-/-} Embryonen wurde bereits in (Shi et al. 2007) veröffentlicht, dass sie kein *Lfng* exprimieren. Dies wurde auch im Rahmen dieser Dissertation gefunden (Abb. 21 P). Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da *Lfng* ein direktes Zielgen des Notch- Signalweges ist.

Des Weiteren wurde in *Pofut1*^{-/-} Embryonen aufgrund des Mangels an Aktivierung durch den Notch- Signalweg eine Runterregulation von *Hes7* erwartet. Hingegen wurde eine starke Expression im posterioren PSM gefunden. Diese nahm gradientenförmig ab, so dass im anterioren PSM *Hes7* nur sehr schwach exprimiert war (Abb. 21 U). Da in (Niwa et al. 2007) beschrieben wurde, dass der Fgf- Signalweg die Expression von *Hes7* im posterioren PSM aktiviert und der Notch- Signalweg diese Expression im anterioren PSM aufrecht erhält und verstärkt, könnte die starke *Hes7* Expression im posterioren PSM durch den Fgf- Signalweg generiert werden. Um sicher zu stellen, dass in *Pofut1*^{-/-} Embryonen nicht eine verbleibende Aktivierung von Notch für die *Hes7* Expression verantwortlich ist, wurden diese Embryonen, sowie alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Embryonen, mit gestörtem Notch- Signalweg auf die Aktivierung von endogenem Notch1 im folgenden Kapitel analysiert.

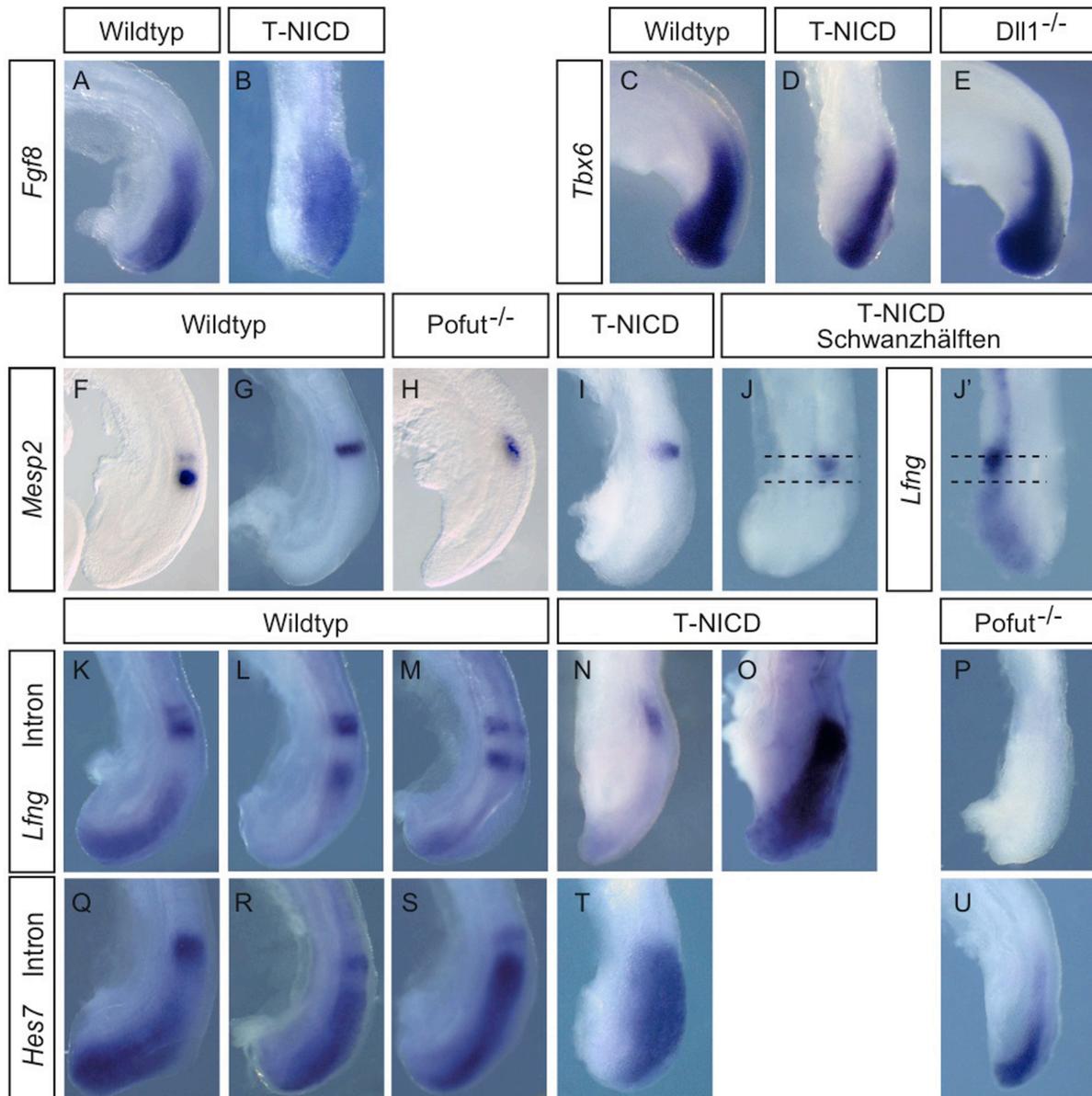


Abbildung 21: Die Expression einiger für die Somitogenese relevanter Gene. Die Expression von *Fgf8* in T-NICD (B) Embryonen war in Stärke und Ausdehnung vergleichbar mit der in Wildtyp Embryonen (A). Auch die Expression von *Tbx6* war in T-NICD (D) und *Dll1*^{-/-} (E) Embryonen im Vergleich zu Wildtyp Embryonen (C) nicht verändert. *Mesp2* wies in Wildtyp (F, G) ein (F) oder zwei (G) Expressionsdomänen auf. In T-NICD Embryonen war nur eine Expressionsdomäne von *Mesp2* zu finden (I). In *Pofut1*^{-/-} Embryonen war die Expression von *Mesp2* runterreguliert und wies vorwiegend eine Expressionsdomäne auf (H). Die Gegenüberstellung der zwei Hälften eines embryonalen Schwanzes hybridisiert mit *Mesp2* (J), bzw. *Lfng* (J') zeigte die Überlappung der Expressionsdomänen im anterioren PSM von T-NICD Embryonen. In Wildtyp Embryonen waren verschiedene Expressionsphasen von *Lfng* (K- M) und *Hes7* (Q- S) zu finden. T-NICD Embryonen wiesen einen starken Expressionsstreifen im anterioren PSM (N) und eine schwächere, erst nach längerem Färben zu detektierende (O) Expression von *Lfng* im gesamten PSM auf. In *Pofut1*^{-/-} Embryonen war keine Expression von *Lfng* zu detektieren (P). *Hes7* wurde in T-NICD Embryonen im gesamten PSM exprimiert (T). In *Pofut1*^{-/-} Embryonen wurde *Hes7* im posterioren PSM stark, im anterioren PSM nur schwach exprimiert (U).

5.5 Die Aktivierung von endogenem Notch1

Um zu untersuchen, wie sich die Deletion von *Dll1* oder *Pofut1*, beziehungsweise die Überexpression von exogenem NICD auf die Aktivierung von endogenem Notch1 auswirkt, wurde eine Färbung mit dem Antikörper Val1744 durchgeführt. Dieser Antikörper erkennt die aktivierte Form von Notch1 (NICD) welche erst durch die S3 Spaltung (siehe Einleitung) zugänglich wird. Dieses NICD beginnt mit einem Valin, welches die 1744ste Aminosäure des Notch1 Proteins ist. Da das exogene (transgene) NICD mit der Aminosäure 1749 beginnt und somit dieses Valin nicht enthält, wird es von diesem Antikörper nicht erkannt.

Zunächst wurden die Funktionalität und die Spezifität des Antikörpers mittels Ganzobjekt Antikörperfärbung untersucht. In Wildtyp Embryonen wurden alle 3 Phasen von aktiviertem Notch1 gefunden. Da es in Mäusen vier Notch Rezeptoren gibt und Notch1 und Notch2 in der anterioren Domäne des PSM überlappend exprimiert sind und auch die intrazelluläre Domäne von Notch2 mit einem Valin beginnt, wurde zunächst getestet, ob der Antikörper auch spezifisch für Notch1 ist. In *Notch1*^{-/-} Embryonen war keine Färbung vorhanden, was bewies, dass der Val1744 Antikörper spezifisch Notch1 erkennt und nicht mit der intrazellulären Domäne von Notch2 kreuz- reagiert (Abb. 22 D). Wie erwartet, wiesen auch *Dll1*^{-/-} und *Pofut1*^{-/-} Embryonen keine Aktivierung von endogenem Notch1 auf (Abb. 22, E, F; i.g.R.). In T-NICD Embryonen wurden hingegen eine oder zwei Domänen von Notch1 Aktivität im anterioren PSM detektiert. Im posterioren PSM war die Expression hingegen stark runterreguliert (Pfeile in Abb. 22 G, H).

Dass im posterioren PSM von T-NICD Embryonen kein endogenes NICD mehr detektiert werden konnte, könnte daran liegen, dass in T-NICD Embryonen *Lfng* im gesamten PSM exprimiert wird und *Lfng* die Aktivierung von Notch hemmt (Morimoto et al. 2005). Damit könnte die Dosis an endogenem NICD in den T-NICD Embryonen reduziert sein. Da sowohl die Expression von *Dll1* (Abb. 22 K, L), als auch die Expression von *Notch1* (Abb. 22 I, J) im anterioren PSM stärker ist als im posterioren PSM und folglich im anterioren PSM mehr Notch aktiviert wird, könnte die Menge an aktiviertem Notch1 im posterioren PSM zu gering sein, um es detektieren zu können.

Eine andere Möglichkeit ist, dass *Lfng* kein Inhibitor der Notch Aktivierung ist, sondern, wie in *Drosophila melanogaster* (Panin et al. 1997; Haines and Irvine 2003) und in Zellkulturversuchen (Panin et al. 1997; Hicks et al. 2000; Dale et al. 2003; Haines and Irvine 2003; Ladi et al. 2005; Yang et al. 2005) gezeigt, ein Aktivator des Notch- Signalweges ist. Das würde erklären, warum gerade im anterioren PSM, in dem massiv *Lfng* exprimiert wird, endogenes Notch aktiviert wird, während im posterioren PSM, in dem relativ wenig *Lfng*

exprimiert wird, kein NICD zu detektieren ist. Diese Möglichkeit wird im nächsten Kapitel genauer untersucht.

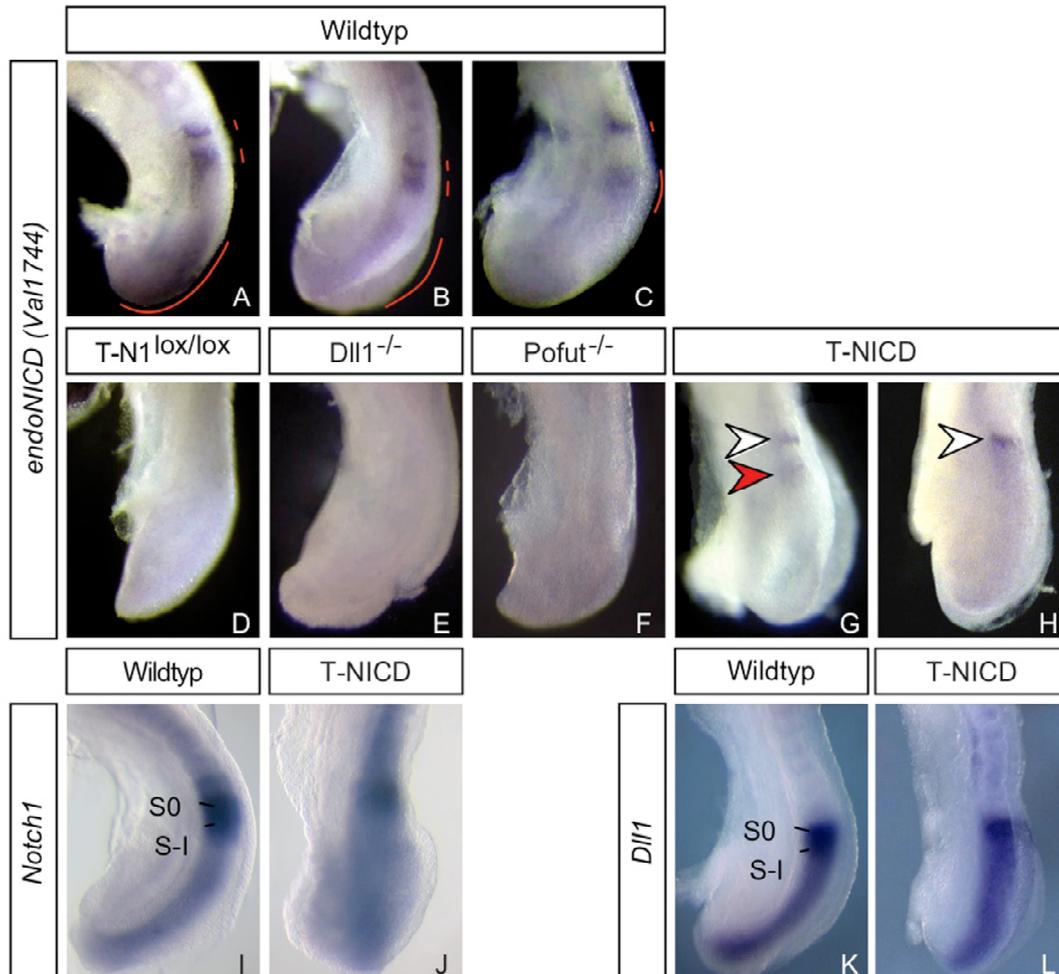


Abbildung 22: Die Aktivierung von endogenem Notch1 (endoNICD) in Embryonen mit gestörtem Notch- Signalweg. Die Aktivierung von endogenem Notch1 (endoNICD) wurde mittels Ganzobjekt Antikörperfärbung mit dem Antikörper Val1744 detektiert. In Wildtyp Embryonen waren verschiedene Phasen von endoNICD zu finden (verdeutlicht durch die roten Striche in A- C). In Embryonen, die kein funktionelles Notch1 im Primitivstreifen exprimieren (T-N1^{LoxP/LoxP}) war keine Aktivierung von Notch1 zu detektieren (D). Der Verlust von Dll1 (E) oder Pofut1 (F) führte zu dem Verlust der Notch1 Aktivierung. In T-NICD Embryonen war stets ein Streifen von endoNICD im anterioren PSM zu detektieren (weiße Pfeilspitzen in G, H). Ein zweiter, weiter posterior gelegener Streifen von endoNICD wurde nur in 13 von 34 Embryonen beobachtet (rote Pfeilspitze in G). Im posterioren PSM war die Expression von endoNICD hingegen stark runterreguliert. *Notch1* und *Dll1* wiesen eine starke Expression im anterioren PSM, eine schwächere im posterioren PSM von Wildtyp (I, K; i.g.R.) und T-NICD (J, L; i.g.R.) Embryonen auf.

5.6 Die Funktion von *Lfng* für den Notch- Signalweg

Um zu untersuchen ob *Lfng* die Aktivierung von Notch1 durch *Dll1* potenziert oder inhibiert, wurden *Lfng*^{-/-} Embryonen untersucht. In der Literatur wurde beschrieben, dass in *Lfng*^{-/-} Embryonen Notch1 im gesamten PSM aktiviert wird (Morimoto et al. 2005). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde im Rahmen dieser Dissertation eine Ganzobjekt Antikörperfärbung zu Detektion der Notch1 Aktivierung auf *Lfng*^{-/-} Embryonen durchgeführt. In Übereinstimmung mit dem publizierten Modell (Morimoto et al. 2005), war eine deutlich verbreiterte Expression von endogenem NICD im PSM von *Lfng*^{-/-} Embryonen zu beobachten. Die NICD Expression nahm gradientenförmig von anterior nach posterior ab (Abb. 23 D, E). Die verschiedenen Phasen von aktiviertem Notch1, welche in Wildtyp Embryonen zu finden waren (Abb. 23 A- C), wurden in *Lfng*^{-/-} nicht beobachtet. Um zu untersuchen, ob generell mehr endogenes Notch1 in *Lfng*^{-/-} Embryonen aktiviert wurde, wurden Lysate von je 2 PSMs von Wildtyp und *Lfng*^{-/-} Embryonen im Westernblot verglichen (Abb. 23 F). Dabei wurde gleichzeitig die Menge an β - Actin verglichen, um sicher zu stellen, dass vergleichbare Mengen Protein geladen wurden. Trotz der beobachteten Verbreiterung der NICD Expressionsdomäne in der Ganzobjekt Antikörperfärbung und im Widerspruch zu den publizierten Ergebnissen, wurde im Westernblot keine Erhöhung der Gesamtmenge an NICD detektiert. Das heißt der Verlust von *Lfng* führte zwar zum Verlust der zyklischen Aktivierung von Notch1, aber nicht zu einer Erhöhung der NICD Menge im PSM.

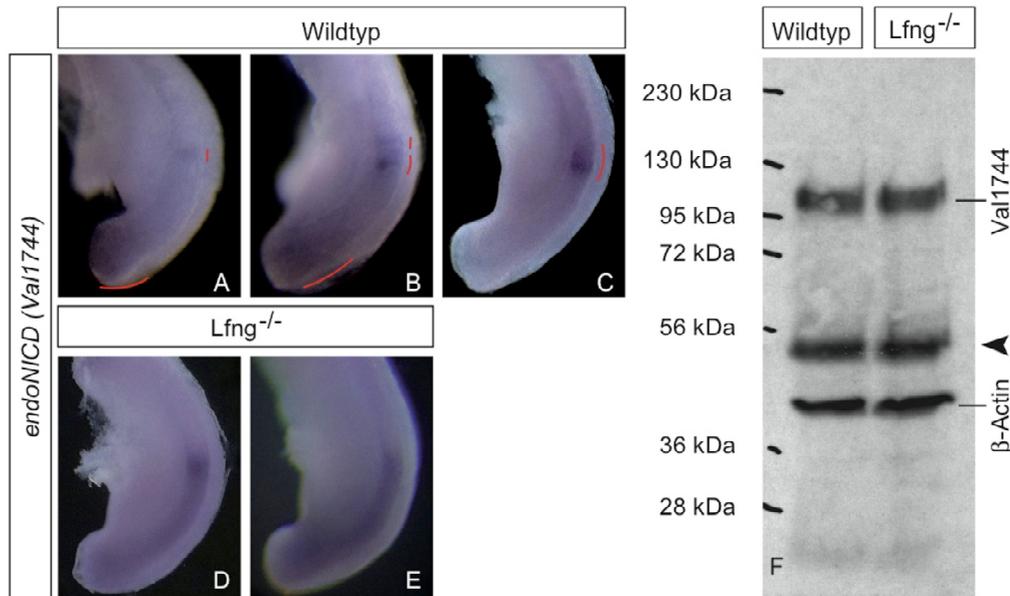


Abbildung 23: Die Aktivierung von Notch1 in *Lfng*^{-/-} Embryonen. In Wildtyp Embryonen wurden verschiedene Phasen von aktiviertem Notch1 (endoNICD) mittels Ganzobjekt Antikörperfärbung mit dem Antikörper Val1744 detektiert (verdeutlicht durch rote Striche in A- C). In *Lfng*^{-/-} Embryonen war endoNICD hingegen gradientenförmig von posterior nach anterior mit einer etwa stärkeren Domäne im anterioren PSM exprimiert (D, E). Mittels Westernblot Analyse wurde keine Veränderung der endoNICD Konzentration in *Lfng*^{-/-} (obere Banden der rechten Spalte in F) im Vergleich zu der in Wildtyp Embryonen (obere Banden der linken Spalte in F) beobachtet. Zur Normalisierung der Gesamtproteinmenge wurde gleichzeitig die Expression von β - Actin detektiert (untere Banden in F). Die kDa Angaben in (F) geben die Größe der Proteine an. Der Pfeilkopf markiert eine unspezifische Bande.

5.7 Die Auswirkungen von endogenem Notch1 auf die Somitenbildung in T-NICD Embryonen

Um sicher zu stellen, dass diese verleibende Aktivität von endogenem Notch1 nicht der Grund ist, warum T-NICD Embryonen Somitengrenzen bilden, sollten Embryonen, in denen endogenes Notch1 eliminiert und gleichzeitig NICD statisch exprimiert wurde (T-N1-NICD), untersucht werden. Dazu wurden Mäuse verwendet, in denen das erste Exon von Notch1 von LoxP Stellen flankiert ist und durch die Cre Rekombinase spezifisch entfernt wird. Dieses erste Exon enthält die Sequenz für einen Teil des *Notch1* Promoters, das Signalpeptid und einem Teil der ersten EGF- Wiederholung von Notch1. Der Verlust dieses ersten Exons führt zu einem inaktiven Notch1 Protein (Radtko et al. 1999).

Zunächst sollte kontrolliert werden, ob in T-Notch1^{LoxP/LoxP} Embryonen das erste Exon von Notch1 vollständig entfernt wird. Dazu wurde mittels RT-PCR spezifisch ein Teil des ersten Exons amplifiziert, in einen Vektor kloniert und eine Sonde daraus generiert (siehe

Materialien und Methoden). Diese Sonde (NI^{Ex1}) spiegelte in heterozygoten Kontrollembryonen spezifisch das bereits zuvor gefundene Expressionsmuster von *Notch1* wider (vergleiche Abb. 24 A mit Abb. 22 I). In Embryonen, in denen Exon 1 von *Notch1* spezifisch im Primitivstreifen deletiert wurde (T-N1^{LoxP/LoxP}), war hingegen kein Signal mit der NI^{Ex1} Sonde detektierbar (Abb. 24 B), was auf eine vollständige Deletion des ersten Exons deutet.

Anschließend wurde analysiert, ob T-N1-NICD Embryonen Somitengrenzen aufweisen. In der Tat wurden 15 klar definierbare Somiten detektiert (Abb. 24 C). Auch sonst waren die Embryonen phänotypisch nicht von T-NICD Embryonen zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde untersucht, ob der Verlust von *Notch1* einen Effekt auf die Expression von *Notch* Zielgenen hat. Die Expression von *Hes7* und *Lfng* in T-N1-NICD Embryonen wies keine erkennbaren Unterschiede zu der Expression in T-NICD Embryonen auf (vergleiche Abb. 24 D, E mit Abb. 21 N, T).

Folglich ist die verbleibende Aktivierung von endogenem *Notch1* in T-NICD Embryonen nicht die Ursache für die Ausbildung von Somitengrenzen.

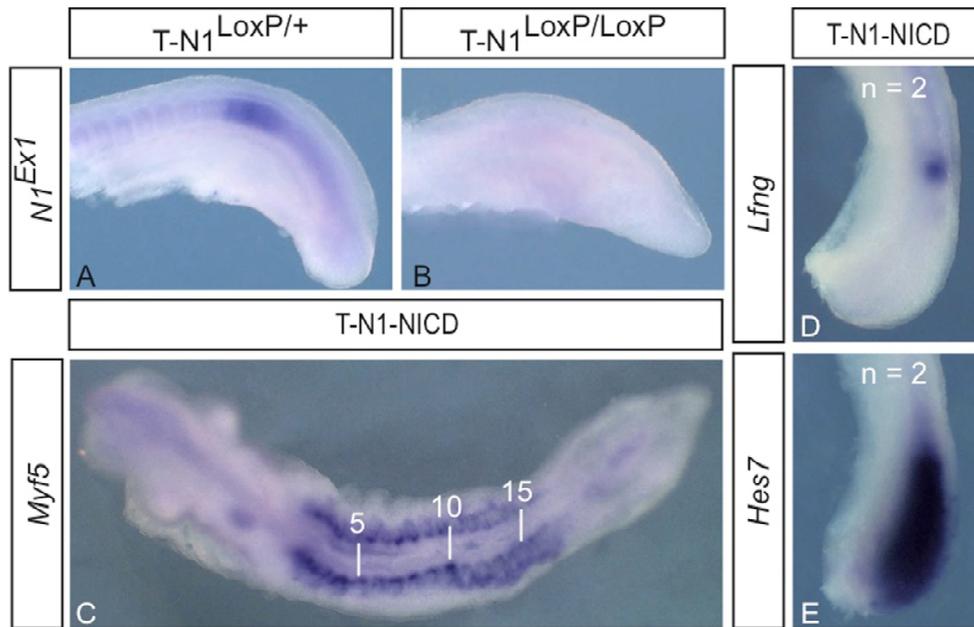


Abbildung 24: Somiten in T-N1-NICD Embryonen. Während in heterozygoten Embryonen (T-N1^{LoxP/+}) funktionelle Transkripte von *Notch1* mit der Sonde *NI^{Ex1}* detektiert wurden (A), war in Embryonen, in denen das erste Exon von *Notch1* homozygot deletiert wurde (T-N1^{LoxP/LoxP}), keine Expression zu erkennen (B). Trotzdem bildeten T-N1-NICD Embryonen mehr als 15 Somiten (C). *Lfng* wies in T-N1-NICD Embryonen eine starke Expression im anterioren PSM auf (D), *Hes7* war im gesamten PSM von T-N1-NICD Embryonen exprimiert (E).

5.8 Die Auswirkungen von endogenem Dll1 auf die Somitenbildung in T-NICD Embryonen

Im vorangegangenen Kapitel konnte ausgeschlossen werden, dass die verbleibende Aktivierung von endogenem Notch1 in T-NICD Embryonen die Ursache für die Bildung von Somitengrenzen ist. Da die intrazellulären Domänen von Notch1 und Notch2 funktionell äquivalent sind (Kraman and McCright 2005) und die Doppelmutante von Notch1 und Notch2 einen stärkeren Phänotyp aufweist als die Mutation der einzelnen Rezeptoren (Huppert et al. 2005), besteht allerdings die Möglichkeit, dass der Verlust von Notch1 durch Notch2 kompensiert wird und es dadurch zur Bildung von Somitengrenzen in T-NICD Embryonen kommen kann. Außerdem wurde im Rahmen dieser Dissertation die Expression der Notch Zielgene *Lfng* und *Hes7* in T-N1^{LoxP/LoxP} und Dll1^{-/-} Embryonen untersucht und festgestellt, dass die Expression von *Hes7* in Embryonen der beiden Genotypen vergleichbar mit der in *Pofut1*^{-/-} Embryonen gefundenen, gradientenförmigen Expression im gesamten PSM war (vergleiche Abb. 25 D, E mit Abb. 21 U), hingegen die Expression von *Lfng* in Notch1 defizienten Embryonen nur im posterioren PSM runterreguliert war, während im anterioren PSM von T-N1^{LoxP/LoxP} Embryonen eine deutliche Expression von *Lfng* zu erkennen war (Abb. 25 I). Im Gegensatz dazu war die Expression von *Lfng* in Dll1^{-/-} Embryonen im gesamten PSM runterreguliert (Abb. 25 J). Die Ursache für die verbleibende Expression von *Lfng* in T-N1^{LoxP/LoxP} Embryonen könnte die Aktivierung der *Lfng* Expression durch Notch2 sein, da Notch2 und Notch1 in dieser Domäne ko-exprimiert werden (siehe Abb. 25 K, L).

Um auszuschließen, dass die Somitenbildung in T-N1-NICD Embryonen durch die Kompensation des Verlustes von Notch1 durch Notch2 ermöglicht wird, wurde Dll1 in Embryonen eliminiert und gleichzeitig NICD überexprimiert (T-Dll1-NICD). Dazu wurden Dll1^{LoxP} Mäuse verwendet. Bei den Dll1^{LoxP} Mäusen sind die Exons 3 und 4 von LoxP Stellen flankiert. Exon 4 kodiert für die DSL Domäne von Dll1, welche essentiell für die Interaktion von Dll1 mit Notch ist (Tax et al. 1994; Shimizu et al. 1999).

Zunächst sollte analysiert werden, ob die Exons 3 und 4 in T-Dll1-NICD Embryonen vollständig eliminiert wurden. Dazu wurde eine spezifische Sonde (*Dll1*^{Ex3+4}) generiert. Diese Sonde spiegelte in heterozygoten Kontrollembryonen die zuvor gefundene Expression von *Dll1* wider (vergleiche Abb. 25 O mit Abb. 22 K). In T-Dll1-NICD Embryonen war mit der *Dll1*^{Ex3+4} Sonde keine Expression zu erkennen (Abb. 25 P). Folglich wurden die Exons 3 und 4 von *Dll1* in T-Dll1-NICD Embryonen vollständig deletiert. Auch die T-Dll1-NICD

Embryonen wiesen um die 14 Somiten auf (Abb. 25 Q) und waren phänotypisch mit den T-NICD Embryonen identisch (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde auch in diesen Embryonen die Expression der Notch Zielgene *Lfng* und *Hes7* untersucht. Wie schon zuvor in T-N1-NICD Embryonen, wies auch in T-Dll1-NICD Embryonen die Expression beider Zielgene keine erkennbaren Unterschiede zu der Expression in T-NICD Embryonen auf (vergleiche Abb. 25 M, N mit Abb. 21 T, N).

Dieses Ergebnis zeigt, dass weder die verbleibende endogene Aktivität von Notch1, noch die potentielle Kompensierung durch Notch2 der Grund für die Bildung von Somitengrenzen in T-NICD Embryonen sind, sondern dass trotz konstitutiver Aktivität von Notch im gesamten PSM Somitengrenzen gebildet werden. D.h. zyklische Notch Aktivität kann nicht die entscheidende Grundlage für die Bildung von Somitengrenzen sein, wie in (Morimoto et al. 2005) postuliert wurde. Da auch in *Pofut1*^{-/-} Embryonen, in denen der Notch- Signalweg nicht aktiviert werden kann (Shi and Stanley 2003) Somiten zu erkennen waren, scheint generell keine Notch Aktivität für die Ausbildung von Somitengrenzen notwendig zu sein. Folglich kann auch die Konfrontation von Domänen mit aktivem Notch neben Regionen ohne aktivem Notch nicht die Grundlage für die Bildung einer Somitengrenze sein, wie in der Veröffentlichung (Morimoto et al. 2005) postuliert wurde.

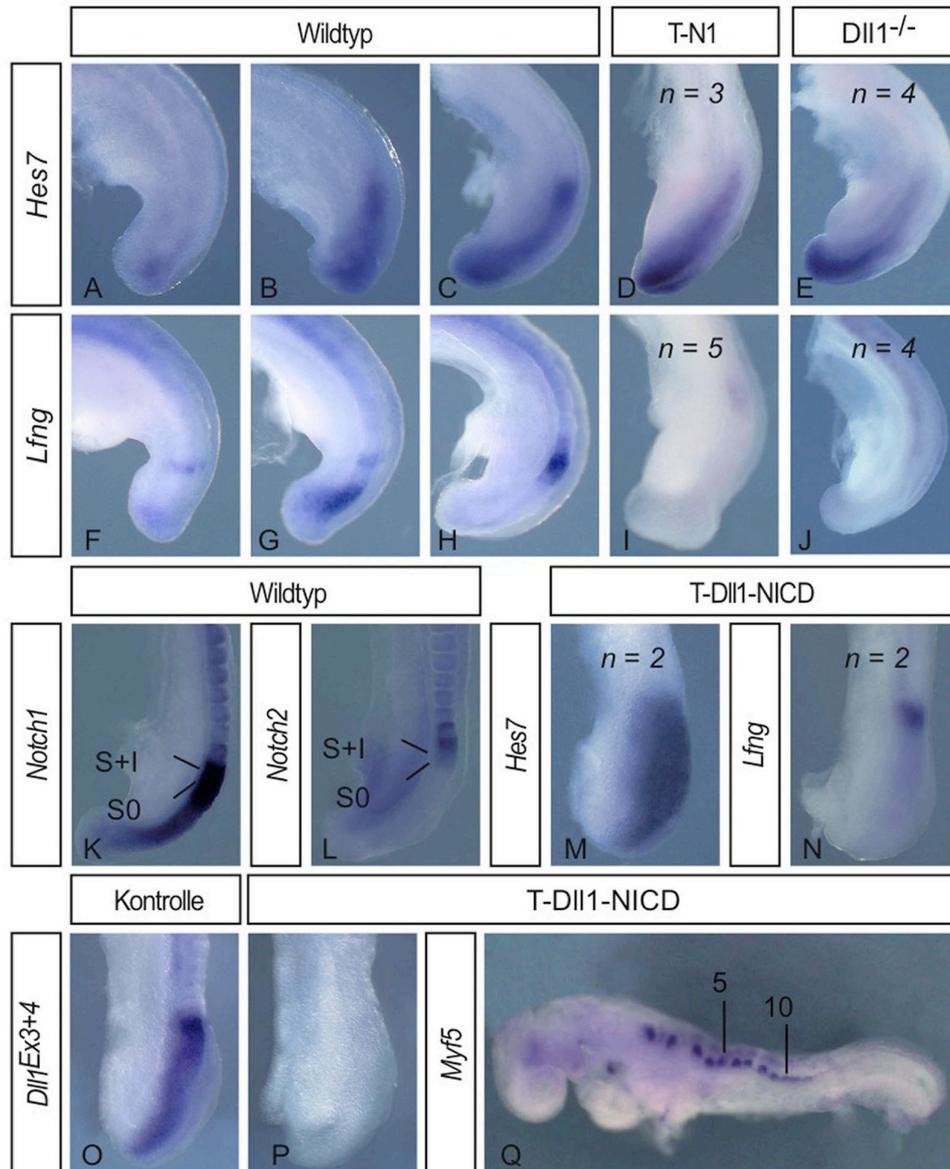


Abbildung 25: Somiten in T-Dll1-NICD Embryonen. Während *Hes7* in Wildtyp Embryonen in verschiedenen Phasen exprimiert wurde (A- C), lag in T-N1^{LoxP/LoxP} (T-N1) Embryonen (D) und *Dll1*^{-/-} (E) Embryonen eine auf das gesamte PSM ausgeweitete, nach anterior gradientenförmig abnehmende Expression vor. Auch *Lfng* war in Wildtyp Embryonen zyklisch exprimiert (F- H), während die Expression in T-N1 Embryonen auf ein Band im anterioren PSM (I) beschränkt war. In *Dll1*^{-/-} Embryonen war keine Expression von *Lfng* zu detektieren (J). Die Expressionsdomänen von *Notch1* (K) und *Notch2* (L) überlappen im anterioren PSM von Wildtyp Embryonen. *Hes7* wurde im gesamten PSM von T-Dll1-NICD Embryonen exprimiert (M). *Lfng* wies einen starken Expressionsstreifen im anterioren PSM und eine schwächere Expression im posterioren PSM von T-Dll1-NICD Embryonen auf (N). Während in T-NICD Embryonen (Kontrolle) mit der Sonde *Dll1*^{Ex3+4} eine gradientenförmige Expression zu detektieren war (O), war in T-Dll1-NICD Embryonen, bei denen beide Allele von *Dll1* mutiert waren, keine Expression zu erkennen (P). T-Dll1-NICD Embryonen bildeten mehr als 10 Somiten (Q).

5.9 Die AP- Polarität in T-NICD und Rbp-Jκ^{-/-} Embryonen

Um zu analysieren, ob zyklische Aktivität von Notch für die Etablierung der AP- Polarität innerhalb der Somiten notwendig ist, wurden *Uncx4.1* als Marker für die posteriore und *Tbx18* für die anteriore Somitenhälfte verwendet.

Wie in Wildtyp Embryonen (Abb. 26 A, B), wurden in T-N1^{LoxP/LoxP} Embryonen *Uncx4.1* in den posterioren (Abb. 26 C) und *Tbx18* in den anterioren (Abb. 26 D) Somitenhälften exprimiert. Der Verlust von Notch1 hatte somit keinen Einfluss auf die Somitenpolarität. Dies könnte an der Kompensation durch Notch2 liegen (siehe Kapitel 5.8). In *Pofut1^{-/-}*, wie auch in *Dll1^{-/-}* Embryonen war die AP- Polarität hingegen gestört (Abb. 26 E- H). *Tbx18* war in den gesamten Somiten exprimiert, während keine Transkripte von *Uncx4.1* detektiert wurden. D.h. die gesamten Somiten wiesen eine rostralisierte Somitenidentität auf.

In T-NICD Embryonen wurde genau der gegenteilige Effekt beobachtet. *Uncx4.1* war in den gesamten Somiten exprimiert, während die *Tbx18* Expression nur im Herz, aber nicht mehr in den Somiten zu finden war (Abb. 26 I, J). D.h. die Somiten wiesen eine kaudalisierte Somitenidentität auf. Der Verlust von Dll1 konnte hingegen durch eine statische Expression von NICD kompensiert werden (Abb. 26 K, L).

Folglich ist sowohl in T-NICD, als auch in *Dll1^{-/-}* und *Pofut1^{-/-}* Embryonen die AP- Polarität innerhalb der Somiten gestört. Trotzdem werden in allen drei Mutanten mehr als 10 Somitengrenzen gebildet. Demnach scheinen beide Prozesse, im Gegensatz zu bisherigen Theorien (Durbin et al., 2000), unabhängig voneinander zu sein.

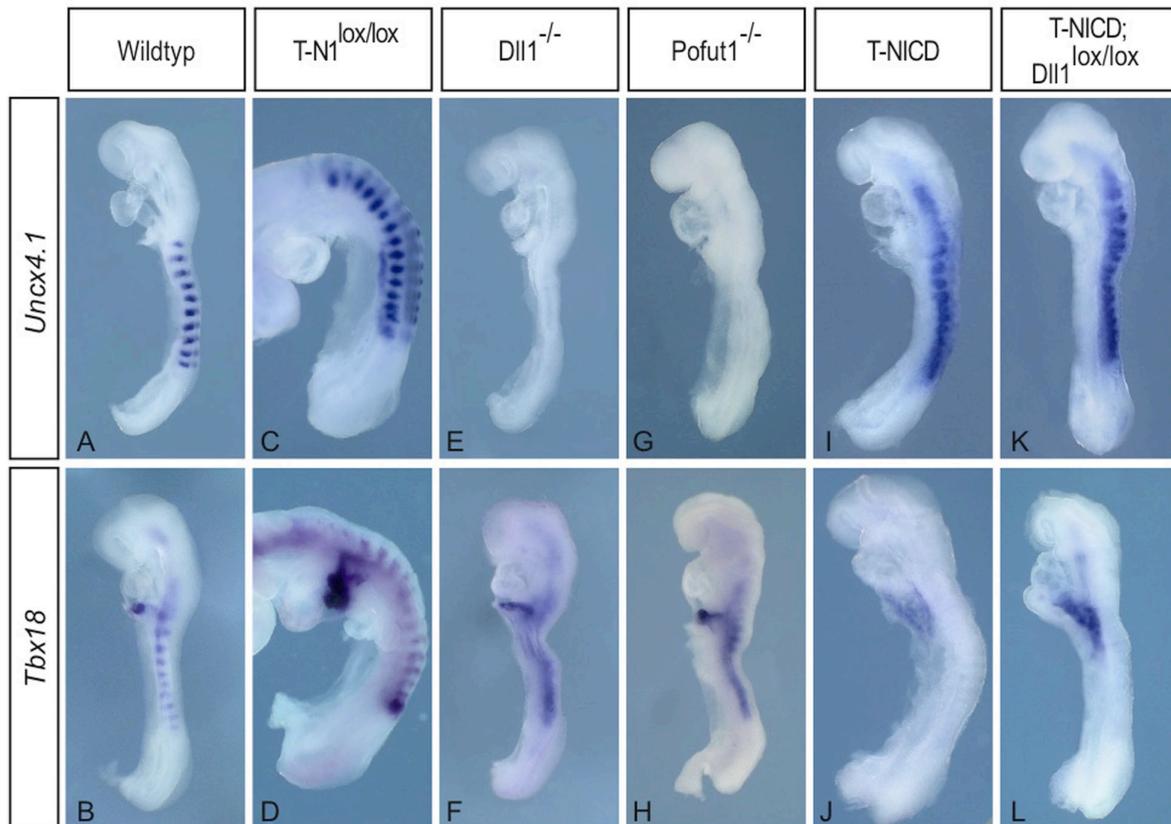


Abbildung 26: Die AP- Polarität der Somiten in Embryonen mit gestörtem Notch- Signalweg. In Wildtyp (A, B) und in T-N1^{LoxP/LoxP} (C, D) Embryonen wurde *Uncx4.1* in der posterioren Somitenhälfte (A, C), *Tbx18* in der anterioren Somitenhälfte (B, D) exprimiert. In *Dll1*^{-/-} (E, F) und *Pofut1*^{-/-} (G, H) Embryonen war *Uncx4.1* stark runterreguliert (E, G), die *Tbx18* Expression dafür auf die gesamten Somiten ausgeweitet (F, H). In T-NICD (I, J) und T-Dll1-NICD (K, L) Embryonen war die *Uncx4.1* Expression auf die gesamten Somiten ausgebreitet. Die Expression von *Tbx18* war in T-NICD (J) und T-Dll1-NICD (L) Embryonen in den Somiten stark runterreguliert und lediglich in der äußeren Schicht der Herzwand zu erkennen.

Weiterhin weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Notch indirekt oder direkt an der Aktivierung der *Uncx4.1* Expression beteiligt ist. Da *Pofut1*^{-/-} und *Dll1*^{-/-} Embryonen keine *Uncx4.1* Expression aufwiesen, wurde erwartet, dass in *Rbp-Jk*^{-/-} Embryonen *Uncx4.1* auch nicht exprimiert wird. Hingegen wurde *Uncx4.1* immer noch in den posterioren Somitenhälften von *Rbp-Jk*^{-/-} Embryonen exprimiert (Abb. 27 B; n= 1). Die Domäne war im Vergleich zu der Expression in Wildtyp Embryonen allerdings stark reduziert. Das gleiche Ergebnis wurde in Embryonen gefunden, in denen *Rbp-Jk* nur in mesodermalen Geweben eliminiert wurde (Abb. 27 C; n= 2). Dies weist darauf hin, dass die Aktivierung der *Uncx4.1* Expression in den posterioren Somitenhälften zum Teil unabhängig von *Rbp-Jk* ist.

Um den Einfluss von *Rbp-Jk* auf die *Uncx4.1* Expression genauer zu analysieren, wurden T-*Rbp*-NICD Embryonen, in denen *Rbp-Jk* eliminiert und gleichzeitig NICD statisch exprimiert

wird, untersucht. Sollte die Expression von *Uncx4.1* unabhängig von Rbp-Jk sein, würde man auf Grund der Tatsache, dass in T-NICD Embryonen *Uncx4.1* in den gesamten Somiten exprimiert wurde (siehe Abb. 26 I), auch in T-Rbp-NICD Embryonen eine *Uncx4.1* Expression in den ganzen Somiten erwarten. Ist hingegen die Expression von *Uncx4.1* von Rbp-Jk abhängig, würde man keine Expression von *Uncx4.1* erwarten.

In T-Rbp-NICD Embryonen wurde *Uncx4.1* in den posterioren Somitenhälften exprimiert. Hingegen in den anterioren Somitenhälften war keine *Uncx4.1* Expression detektierbar (Abb. 27 D; n= 3). Dies weist darauf hin, dass die *Uncx4.1* Expression in der posterioren Somitenhälfte unabhängig von Rbp-Jk ist, in der anterioren Somitenhälfte hingegen Rbp-Jk für die Expression von *Uncx4.1* benötigt wird. Folglich scheint die *Uncx4.1* Expression in der anterioren Somitenhälfte anders reguliert zu werden als in der posterioren Somitenhälfte.

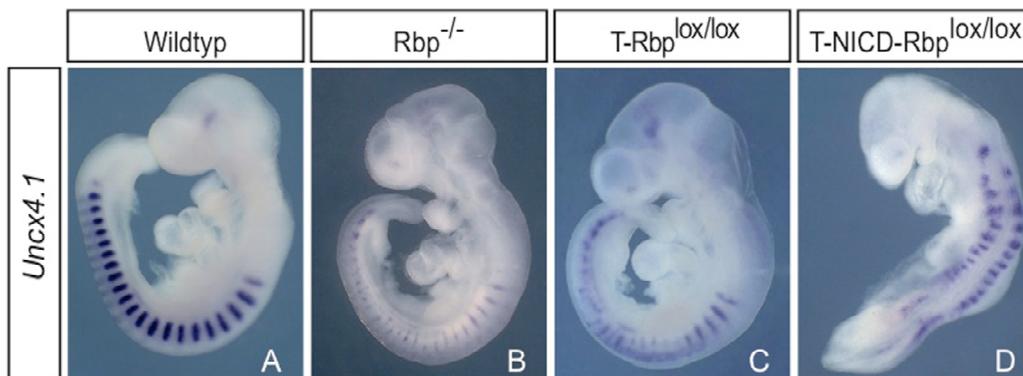


Abbildung 27: Die Expression von *Uncx4.1* in Rbp-Jk defizienten Embryonen. In Wildtyp Embryonen war *Uncx4.1* in den posterioren Hälften der Somiten exprimiert (A). Auch in Rbp-Jk^{-/-} Embryonen (B) wurde *Uncx4.1* in den posterioren Somitenhälften exprimiert, allerdings war die Expression schwächer als in den Wildtyp Embryonen. Auch in Embryonen, in denen Rbp-Jk nur im PSM und den Somiten deletiert wurde (T-Rbp^{LoxP/LoxP}) war sowohl die Expressionsdomäne, als auch die Expressionsstärke von *Uncx4.1* reduziert (C). In T-Rbp-NICD Embryonen war die Expression von *Uncx4.1* auf die posteriore Somitenhälfte beschränkt (D).

Damit kann festgehalten werden, dass die Aktivierung des Dll- Notch- Signalweges zu einer Aktivierung der *Uncx4.1* Expression bzw. einer Verbreiterung der posterioren Somitenidentität führt, während der Verlust von Notch zu einer Verbreiterung der *Tbx18* Expression, bzw. der anterioren Somitenidentität führt. Die *Uncx4.1* Expression scheint in der anterioren Somitenhälften über einen anderen Mechanismus aktiviert zu werden als in den posterioren Somitenhälften.

5.10 Die Expression von NICD und Zielgenen des Notch- Signalweges in Msd::Cre; RosaNICD Embryonen

Als nächstes sollte genauer untersucht werden, ob die gestörte AP- Polarität, welche in *Pofut1*^{-/-}, *Dll1*^{-/-} und T-NICD Embryonen gefunden wurde, durch den Mangel an zyklischer Notch Aktivität im posterioren PSM, oder durch das Fehlen einer Domäne mit aktivem Notch benachbart zu einer Region ohne aktivem Notch im anterioren PSM hervorgerufen ist. In Kapitel 5.1 wurde beschrieben, dass in Embryonen der Kreuzung von Msd::Cre Mäusen mit Rosa^{LacZ} Mäusen keine Aktivierung des Transgenes in der Schwanzknospe und im posterioren PSM beobachtet wurde. Folglich könnte man mit Hilfe dieser Mäuse NICD spezifisch im anterioren PSM überexprimieren ohne die zyklische Aktivierung von endogenem Notch im posterioren PSM zu beeinflussen.

Zunächst wurde in Embryonen aus der Kreuzung von Msd::Cre mit den Rosa^{NICD} Mäusen (im Folgenden als Msd-NICD bezeichnet) die Expression von *GFP* und *Hey1* analysiert. Die Fluoreszenz von GFP Proteinen konnte nicht untersucht werden, da das Signal zu schwach war. *GFP* Transkripte wurde im anterioren PSM etwa in der Region S0 nachgewiesen (Abb. 28 A). Die Expression von *Hey1* als Notch Zielgen wurde hingegen erst in dem ersten Somiten (S+1) detektiert (Abb. 28 C), so dass man davon ausgehen kann, dass in dem Bereich S0 bis S+1 funktionelles exogenes NICD exprimiert wurde.

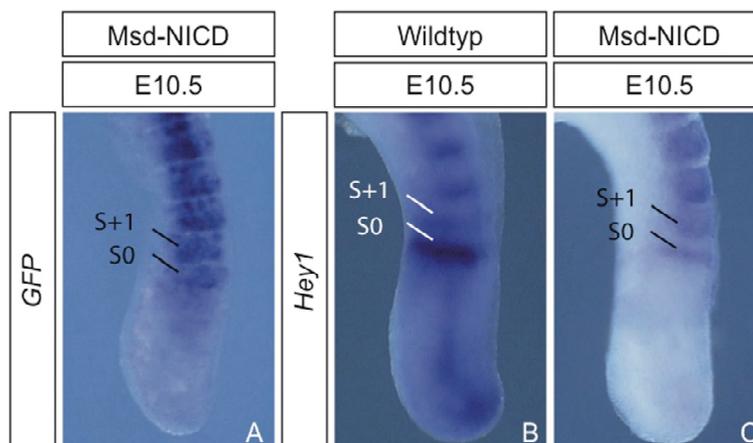


Abbildung 28: Die Expression von *GFP* und *Hey1* in Msd-NICD Embryonen. Die Expression von *GFP* wurde ab dem Somiten S0 in Msd-NICD Embryonen detektiert (A). Im Vergleich zu Wildtyp Embryonen, in denen *Hey1* nur in der posterioren Somitenhälfte exprimiert wurde (B), war die Expression in Msd-NICD Embryonen ab dem Somiten S+1 auf beide Somitenhälften ausgeweitet (C).

Da keine Expression von NICD im posterioren PSM von Msd-NICD Embryonen vorlag wurde vermutet, dass die Aktivierung von endogenem Notch in diesem Bereich zyklisch ist. Dies wurde mit Hilfe des Antikörpers Val1744 (Kapitel 5.5) bestätigt (Abb. 29, P- R). Auch die zyklischen Gene *Lfng* und *Hes7* wiesen in Msd-NICD Embryonen verschiedene Expressionsphasen im posterioren PSM auf (Abb. 29 D- F, J- L; i.g.R.). Zusätzlich angefertigte Schwanzhälften- Kulturen (siehe Materialien und Methoden) bewiesen diese zyklische Expression von *Lfng* in Msd-NICD Embryonen nochmals (Abb. 29 S- T, U- V). Damit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Aktivierung von endogenem Notch1, als auch die Expression von Notch Zielgenen im posterioren PSM von Msd-NICD Embryonen dynamisch war.

Der Transkriptionsfaktor *Mesp2* wird im anterioren PSM von Wildtyp Embryonen (im Bereich S0 bis S- 1) exprimiert, und wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 5.4), unter anderem durch Notch reguliert. Die beschriebene Dynamik von ein bis zwei Expressionsstreifen von *Mesp2* in Wildtyp Embryonen wurde auch in Msd-NICD Embryonen gefunden (Abb. 29 W, X). Somit war nicht nur im posterioren, sondern auch im anterioren PSM eine normale Dynamik vorhanden.

Das bedeutet, wenn die Somitenpolarität im posterioren PSM durch die zyklische Aktivität von Notch festgelegt wird, sollte in den Msd-NICD Embryonen keine Störung der AP-Polarität gefunden werden. Auch wenn im anterioren PSM die Somitenpolarität determiniert wird, sollten keine Defekte auftreten, da das exogene NICD erst ab dem Somiten S+1 die Expression von Zielgenen aktiviert.

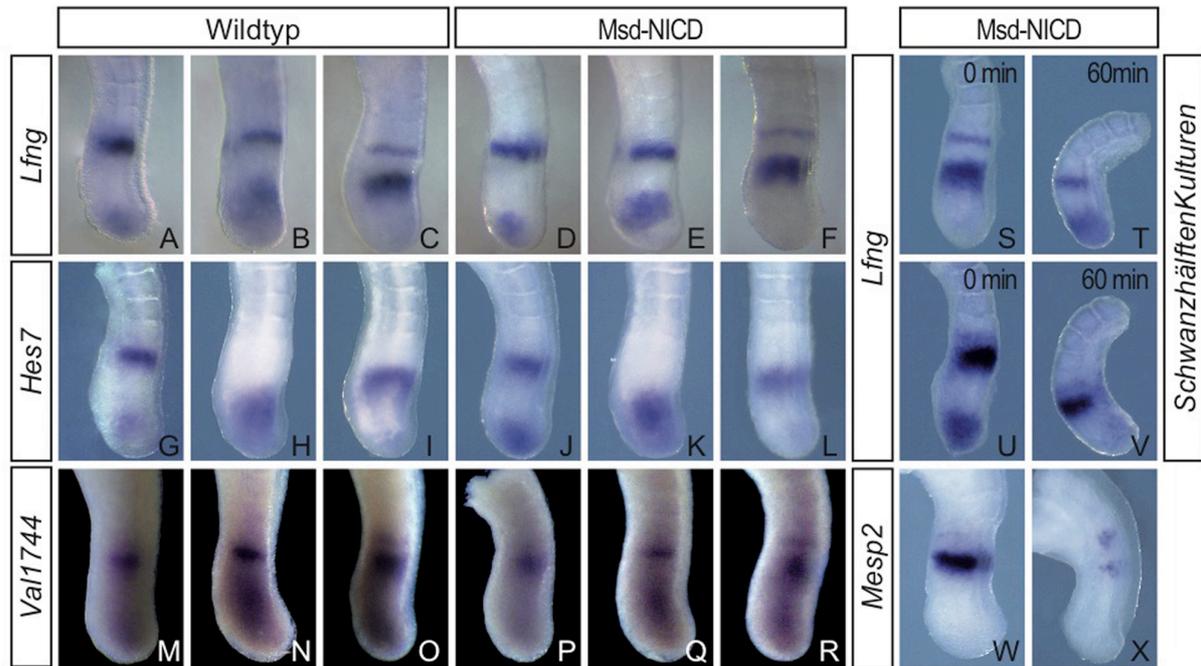


Abbildung 29: Dynamische Expression in Msd-NICD Embryonen. Sowohl in Wildtyp (A- C), als auch in Msd-NICD (D- F) Embryonen wies *Lfng* eine zyklische Expression auf. Auch mit Hilfe von Schwanzhälftenkulturen konnte diese zyklische Expression von *Lfng* in Msd-NICD Embryonen nochmals bestätigt werden (S- V). Ebenso wies *Hes7* sowohl in Wildtyp (G- I) als auch in Msd-NICD (J- L) Embryonen verschiedene Expressionsphasen auf. Auch die Aktivierung von endogenem Notch1 war sowohl in Wildtyp (M- O) als auch in Msd-NICD (P - R) Embryonen zyklisch. Für Msd-NICD wurden sowohl Embryonen mit einem (W) als auch Embryonen mit zwei (X) Expressionsstreifen von *Mesp2* gefunden. Die Zeitangaben in (S- V) geben die Dauer der Kultivierung der jeweiligen Schwanzhälfte an.

5.11 Die AP- Polarität in Msd-NICD Embryonen

Tatsächlich wurde in den Somiten S- 1 bis S+2 eine normale Somitenpolarität gefunden. In weiter kranialen Somiten hingegen war die Expression von *Uncx4.1* auf beide Somitenhälften ausgeweitet. So wurde in Embryonen des Alters E9.5 *Uncx4.1* etwa ab dem Somiten S+3 im ganzen Somiten exprimiert (n= 3; Abb. 30 O, P). In 10.5 Tage alten Embryonen wurde diese Expansion der *Uncx4.1* Expression hingegen erst etwa ab dem Somiten S+6 beobachtet (n= 3; Abb. 30 F, G). Ähnlich verhielt es sich mit der *Tbx18* Expression. Diese war am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung schon ab dem Somiten S+3 stark reduziert (n= 2, Abb. 30 Q, R), während in E10.5 Embryonen eine Reduktion der *Tbx18* Expression erst etwa ab dem Somiten S+7 beobachtet wurde (n= 2, Abb. 30 H, I). In den kranialen Somiten (in Abb. 30 markiert durch eine rote Linie), in denen die Expression von *GFP* und damit auch von NICD nur mosaikartig vorhanden war, war auch die Expression von *Uncx4.1* und *Tbx18* mosaikartig (vergleiche Abb. 30 E mit F und H; N mit O und Q).

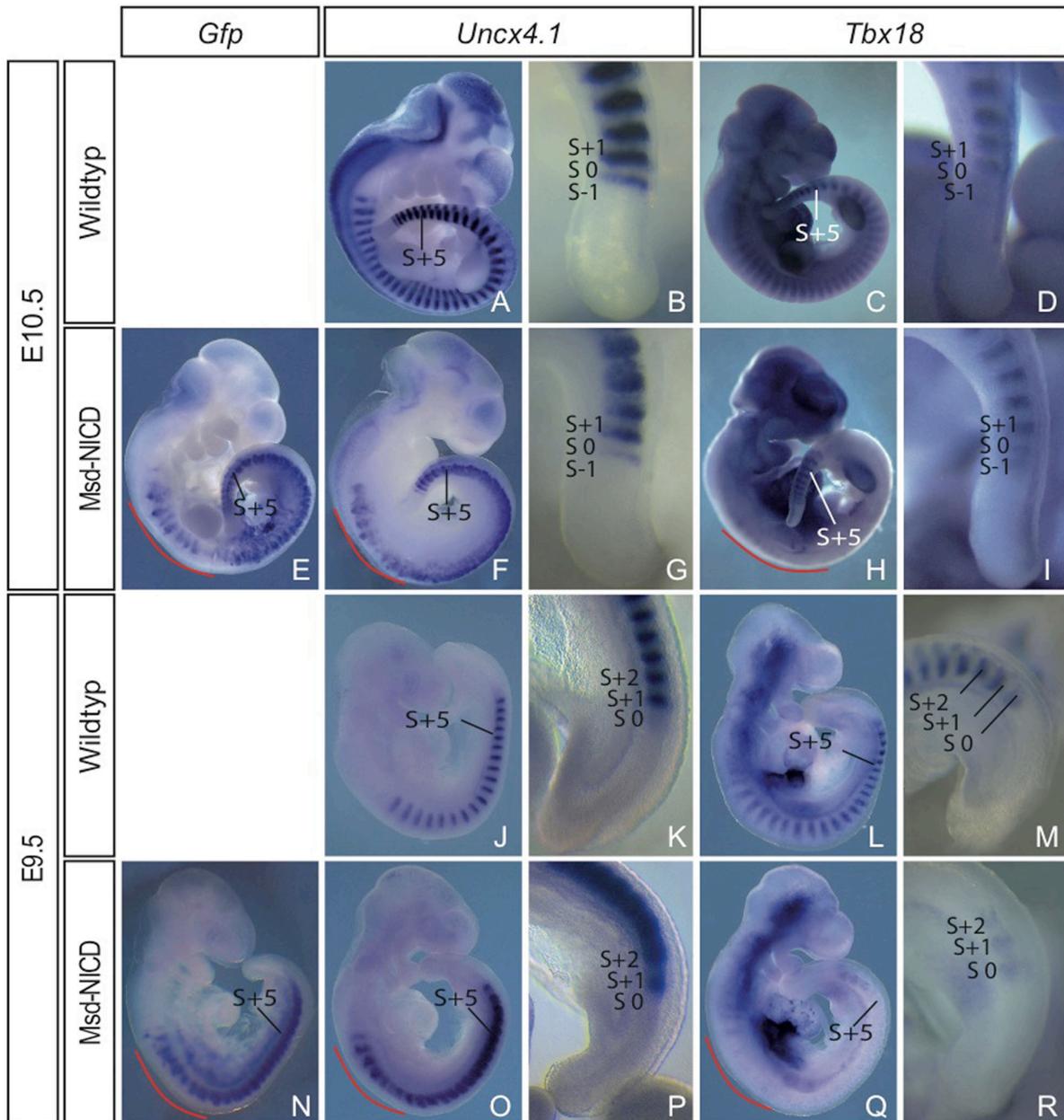


Abbildung 30: Die AP- Polarität der Somiten von Msd-NICD Embryonen. Während die Expression von *Uncx4.1* in Wildtyp Embryonen auf die anteriore Somitenhälfte beschränkt ist (A, B, J, K), war in Msd-NICD Embryonen des Alters E10.5 eine Verbreiterung der *Uncx4.1* Expression auf beide Somitenhälften ab dem Somiten S+6 (F, G), im Alter E9.5 ab dem Somiten S+3 (O, P) zu beobachten. *Tbx18* wird in Wildtyp Embryonen in der anterioren Somitenhälfte exprimiert (C, D, L, M). In Msd-NICD Embryonen war die *Tbx18* Expression im Alter E10.5 ab dem Somiten S+6 (H, I), im Alter E9.5 ab dem Somiten S+3 (Q, R) runterreguliert. In den anterioren Somiten von Msd-NICD Embryonen, in denen die Expression von *GFP* mosaikartig war (rote Linie in E, N), war auch die Expression von *Uncx4.1* (rote Linie in F, O) und *Tbx18* (rote Linie in H, Q) mosaikartig. Die Abbildungen (B, G, K, P, D, I, M, R) sind Vergrößerungen der Abbildungen (A, F, J, O, C, H, L, Q; i.g.R.).

Auch war zu beobachten, dass die Expression von *Tbx18* und *Uncx4.1* genau gegenläufig war. D.h. ab dem Somiten, ab dem eine Zunahme der *Uncx4.1* Expression zu beobachten war, nahm die *Tbx18* Expression ab (Abb. 31).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Somitenpolarität zwar wie beschrieben im anterioren PSM angelegt wird (Stern et al. 1988; Saga et al. 1997), aber nicht absolut determiniert ist, sondern zumindest in neu gebildeten Somiten noch geändert werden kann.

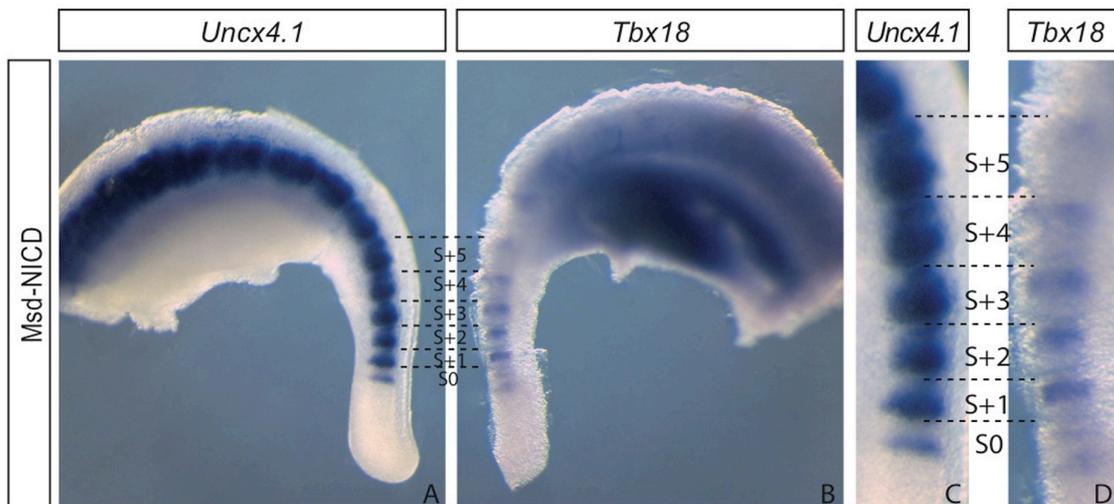


Abbildung 31: Die Expression von *Tbx18* und *Uncx4.1* in Msd-NICD Embryonen. In Msd-NICD Embryonen war in den Somiten S+1 und S+2 die Expression von *Uncx4.1* auf die posteriore (A, C) und die Expression von *Tbx18* auf die anteriore (B, D) Somitenhälfte beschränkt. In den Somiten S+3 bis S+5 verbreiterte sich die Expression von *Uncx4.1* graduell, die Expression von *Tbx18* wurde graduell runterreguliert. Ab dem Somiten S+6 wurde *Uncx4.1* in beiden Somitenhälften exprimiert, während keine Expression von *Tbx18* zu erkennen war. Die Abbildungen (C, D) sind Vergrößerungen von (A, B; i.g.R.).

5.12 Die Auswirkungen der AP- Defekte auf die Skelettentwicklung von Msd-NICD und Dll1^{-/-} Embryonen

Defekte in der Etablierung der AP- Polarität innerhalb der Somiten haben eine fehlerhafte Entwicklung des axialen Skelettes zur Folge. So wurde in Embryonen, die kein funktionelles *Uncx4.1* mehr exprimieren, eine Reduktion bzw. ein Fehlen von Elementen, welche von Zellen der posterioren Somitenhälften gebildet werden, gefunden (Leitges et al. 2000). Dazu gehören die Pedikel mit den seitlichen Fortsätzen, welche Teile der Neuralbögen darstellen, und die proximalen Anteile der Rippen (siehe Einleitung). Das Fehlen von *Uncx4.1* führte außerdem zu einer Ausweitung der *Tbx18* Expression und zu der Verbreiterung der anterioren Somitenidentität (Leitges et al. 2000). In Embryonen die kein funktionelles *Tbx18* mehr exprimieren, wurde der gegenteilige Effekt beobachtet (Bussen et al. 2004). Hier waren die posterioren Anteile der Somiten ausgeweitet und es kam zu einer Verbreiterung der *Uncx4.1* Expression. Im axialen Skelett dieser Embryonen war einer Ausweitung der Pedikel und der seitlichen Fortsätze, sowie der proximalen Rippen zu finden (Bussen et al. 2004).

Da Msd-NICD Embryonen durch die Überexpression von exogenem NICD Defekte in der AP- Polarität der Somiten aufweisen, sollte die Skelettentwicklung dieser Embryonen untersucht werden. Zunächst fiel auf, dass die Körperachse von Msd-NICD Embryonen verkürzt war (vergleiche Abb. 32, B, E, I mit A, C, G; i.g.R.). Der Schädel und die Gliedmaßen wiesen hingegen keine erkennbaren Defekte auf. Somit war in den Msd-NICD Embryonen der Skelettphänotyp auf das axiale Skelett beschränkt.

Da in Msd-NICD Embryonen die Expression von *Uncx4.1* ausgeweitet war (Kapitel 5.11), wurde eine Verbreiterung der proximalen Rippen und Pedikel erwartet.

Tatsächlich waren die proximalen Rippen verbreitert und wiesen zahlreiche Fusionen auf. Allerdings waren die Rippen nicht mehr mit der Wirbelsäule verbunden (was meist als frei "schwebende" Rippen bezeichnet wird). Des Weiteren fehlten in Msd-NICD Embryonen die Ossifikationszentren der Wirbelkörper (vergleiche weiße Pfeilspitze in Abb. 32 D mit F). Die Zwischenwirbelscheiben und die Wirbelkörper waren stark deformiert und wiesen keine erkennbare Segmentierung auf. Die Neuralbögen (zu denen unter anderem die Pedikel gehören), waren teilweise verbreitert und besonders im Bereich der Lendenwirbel miteinander verschmolzen (Abb. 32).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Ausweitung der *Uncx4.1* Expression in Msd-NICD Embryonen zu einer Verstärkung von Skelettelementen führt, die aus den posterioren

Somitenhälften entstehen. Dies entspricht den Ergebnisse aus $Tbx18^{-/-}$ Embryonen. Außerdem führte die gestörte AP- Polarität in Msd-NICD Embryonen zu einer fehlenden Segmentierung der Wirbelsäule.

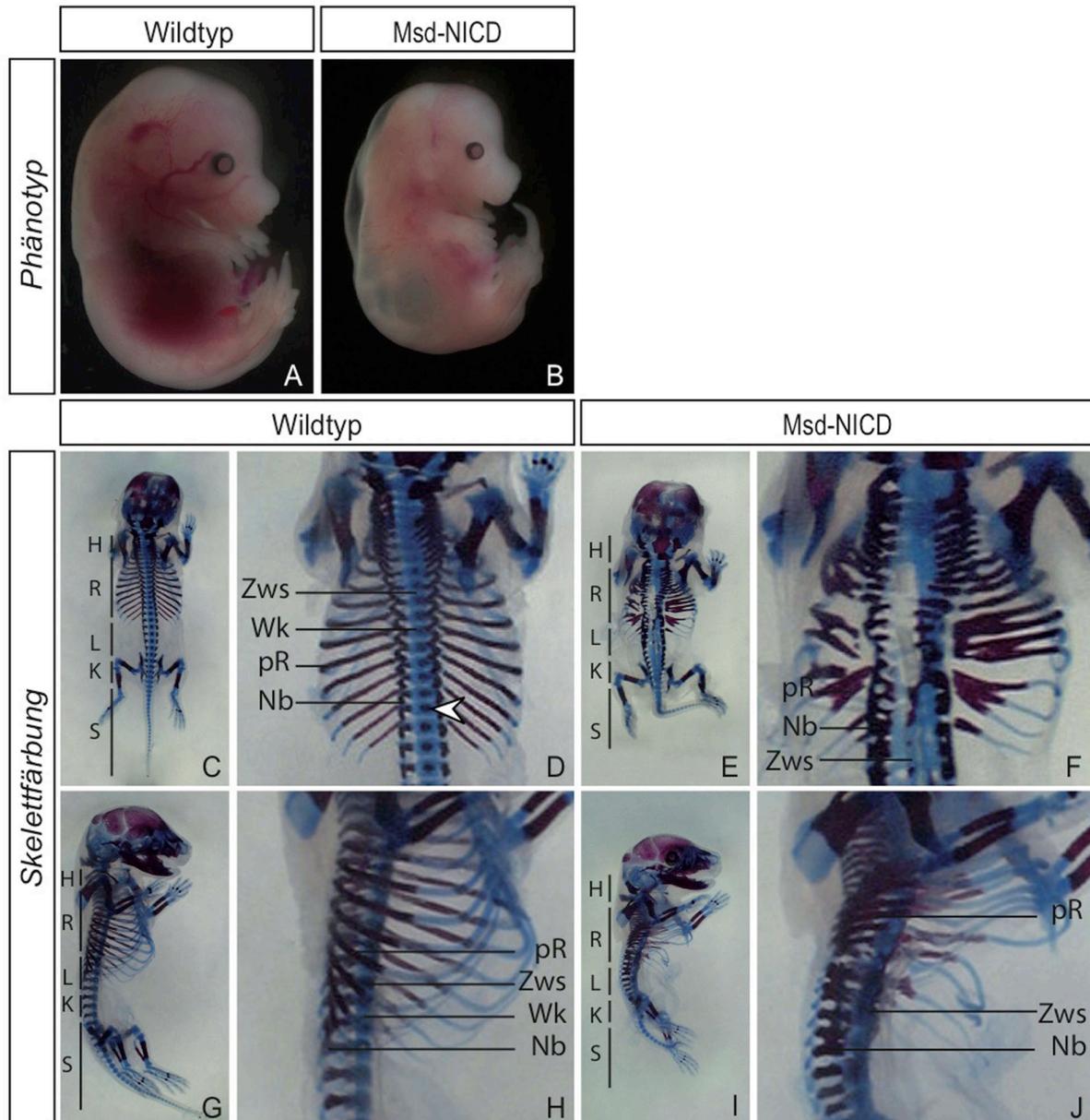


Abbildung 32: Skelettdefekte in Msd-NICD Embryonen. Der Phänotyp von E15.0 alten Wildtyp (A) und Msd-NICD (B) Embryonen. Skelettpräparation eines Wildtyp (C, D, G, H) und eines Msd-NICD (E, F, I, J) Embryos. Die Abbildungen (D, H, F, J) sind Vergrößerungen aus (C, G, E, I; i.g.R.). Abkürzungen: Zws: Zwischenwirbelscheibe, Wk: Wirbelkörper, pR: proximale Rippen, Nb: Neuralbögen, H: Halswirbel, R: Rückenwirbel, L: Lendenwirbel, K: Kreuzbeinwirbel, S: Schwanzwirbel; Die weiße Pfeilspitze in (D) markieren ein Ossifikationszentrum.

5.13 Die Auswirkungen von Mutationen im Notch- Signalweg auf den Wnt- und den Fgf- Signalweg

Über die Wechselwirkungen zwischen den drei Signalwegen Wnt, Fgf und Notch gibt es sehr widersprüchliche Veröffentlichungen. So wurde 2003 gezeigt, dass in *Wnt3a* hypomorphen Mäusen die Expression von *Fgf8* stark runterreguliert ist und *Lfng* nicht mehr zyklisch exprimiert wird. In *Dll1*^{-/-} Embryonen hingegen weist die Expression von *Axin2* ein dynamisches Muster auf (Aulehla et al. 2003). Deshalb wurde postuliert, dass der Wnt-Signalweg sowohl den Fgf-, als auch den Notch- Signalweg reguliert.

Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde argumentiert, dass Zielgene sowohl des Notch-, als auch des Wnt- Signalweges in Embryonen, in denen der *FgfR1* im Primitivstreifen deletiert wurde, keine dynamische Expression mehr zeigen und damit der Fgf- Signalweg den Notch- und den Wnt- Signalweg reguliert (Wahl et al. 2007).

Um mehr über die Wechselwirkungen zwischen dem Notch-, Fgf- und Wnt- Signalweg zu erfahren, wurde im Rahmen dieser Dissertation die Wirkung von Notch auf die beiden anderen Signalwege untersucht. Zunächst wurde analysiert, wie sich die statische Expression von NICD auf den Wnt- Signalweg auswirkt. Dazu wurde die Expression von *Axin2* und *Dact1* analysiert. Beide sind Zielgene des Wnt- Signalweges (Aulehla et al. 2003; Suriben et al. 2006; i.g.R.) und weisen eine zyklische Expression in Wildtyp Embryonen auf (Abb. 33, A- C, G- I; i.g.R.). Auch in T-NICD Embryonen wurden verschiedene Expressionsphasen sowohl von *Axin2* (Abb. 33, J- L) als auch von *Dact1* (Abb. 33, D- F) detektiert. Somit scheint die statische Expression von NICD die Dynamik des Wnt- Signalweges nicht zu beeinflussen. Zusammen mit dem oben erwähnten Ergebnis, dass auch in *Dll1*^{-/-} Embryonen eine zyklische Expression von *Axin2* beobachtet wurde (Aulehla et al. 2003) kann geschlossen werden, dass die dynamische Expression von Zielgenen des Wnt-Signalweges unabhängig von zyklischer Notch Aktivität zu sein scheint.

Weiterhin sollte auch der Einfluss von Notch auf den Fgf- Signalweg untersucht werden. Dazu wurde die Expression des Fgf Zielgenes *Sprouty2* untersucht. *Sprouty2* weist in Wildtyp Embryonen eine zyklische Expression im PSM auf (Abb. 33, M - O). In T-NICD Embryonen hingegen war die Expression im posterioren PSM stark runterreguliert. Im anterioren PSM war hingegen ein starker Expressionsstreifen von *Sprouty2* zu verzeichnen. Da der Fgf-

Rezeptor1 (FgfR1) auch im anterioren PSM eine starke Expression aufweist, wurde vermutet, dass dieser für den Expressionsstreifen von *Sprouty2* verantwortlich ist. Deshalb wurde der Schwanz eines T-NICD Embryos in zwei Hälften geteilt und eine Hälfte mit einer Probe gegen *FgfR1*, die andere Hälfte mit einer Probe gegen *Sprouty2* hybridisiert. Die Expressionsdomänen beider Gene wiesen aber keine Überlappung auf (Abb. 33 S, S').

Als nächstes wurden auf die gleiche Art und Weise getestet, ob *Mesp2* und *Sprouty2* in T-NICD Embryonen in überlappenden Domänen exprimiert wurden. Dies konnte bestätigt werden (Abb. 33 T, T'). Weiterhin wurde festgestellt, dass in dem Bereich, in dem die Expression von *Sprouty2* und *Mesp2* in T-NICD Embryonen überlappte, die Expression von *Hes7* gradientenförmig abnahm (Abb. 33 U, U').

Somit scheint die Überexpression von exogenem NICD zu einer Hemmung der *Sprouty2* Expression im posterioren PSM zu führen. Um zu untersuchen, wie sich der Verlust der Notch Aktivität auf den Fgf Signalweg auswirkt, wurde die Expression von *Sprouty2* in *Pofut1*^{-/-} und *Dll1*^{-/-} Embryonen untersucht.

Sowohl in *Pofut1*^{-/-} als auch in *Dll1*^{-/-} Embryonen wurde eine Hochregulation der *Sprouty2* Expression (Abb. 33 Y- ZA, ZG- ZI; i.g.R.) im Vergleich zu der in Wildtyp Embryonen gefundenen Expression (Abb. 33 V- X, ZD- ZF; i.g.R.) beobachtet.

Während die *Sprouty2* Expression im anterioren PSM von *Pofut1*^{-/-} und *Dll1*^{-/-} Embryonen statisch zu sein schien, war im posterioren PSM ein variables Muster zu erkennen.

Um einen möglichen Einfluss von *Hes7* auf die *Sprouty2* Expression zu untersuchen, wurde die Expression von *Hes7* mit der Expression von *Sprouty2* verglichen. Dazu wurden Embryoschwänze vergleichbaren Alters und nach vergleichbar langer Färbezeit gegenüber gestellt. Dabei war zu erkennen, dass in dem Bereich im posterioren PSM, in welchem *Hes7* exprimiert wurde, *Sprouty2* nur schwach exprimiert war (vergleiche Abb. 33 ZB mit ZC, und ZJ mit ZK).

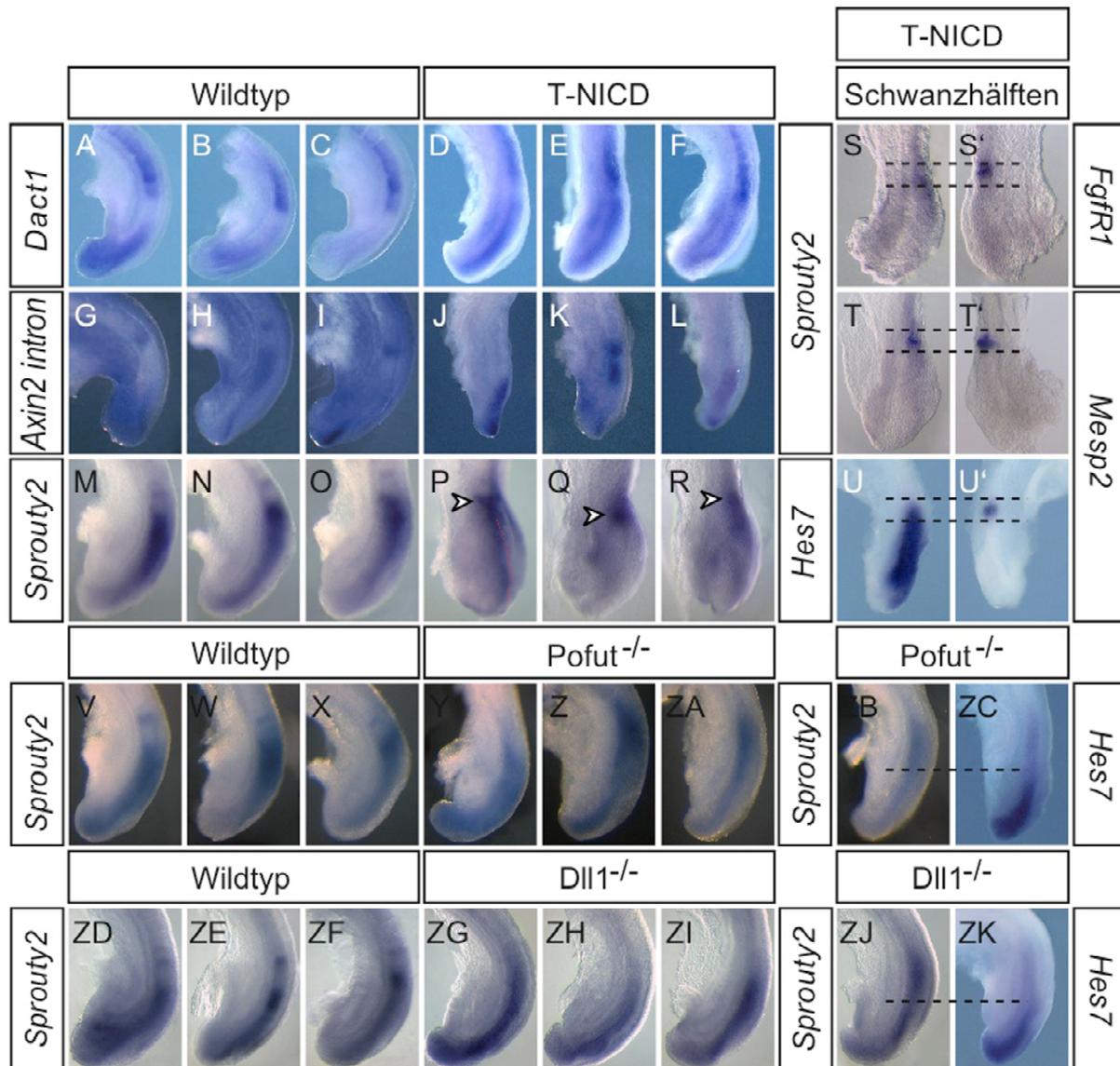


Abbildung 33: Die Expression von Zielgenen des Wnt- und des Fgf- Signalweges in Embryonen mit gestörtem Notch- Signalweg. In Wildtyp Embryonen weisen die Wnt- Zielgene *Dact1* (A- C) und *Axin2* (G- I) eine zyklische Expression auf. Auch in T-NICD Embryonen wurden verschiedene Phasen der *Dact1* (D- F) und *Axin2* (J- L) Expression detektiert. Während das Fgf- Zielgen *Sprouty2* in Wildtyp Embryonen eine zyklische Expression aufwies (M- O, V- X, ZD- ZF), war in T-NICD Embryonen nur eine Expressionsdomäne im anterioren PSM detektierbar (Pfeilkopf in P- R). Im posterioren PSM von T-NICD Embryonen war die Expression stark runterreguliert (P- R). Um die Expressionsdomänen vergleichen zu können, wurden die Schwänze von T-NICD Embryonen geteilt und mit *Sprouty2* (S, T), *Hes7* (U), *FgfR1* (S'), und *Mesp2* (T', U') hybridisiert, wobei (S und S', T und T', U und U') jeweils Hälften eines Schwanzes darstellen. In *Pofut1*^{-/-} und *Dll1*^{-/-} Embryonen war die Expression von *Sprouty2* im PSM verbreitert und wies lediglich im posterioren PSM ein variables Expressionsmuster auf (Y- ZA, ZG- ZI; i.g.R.). Die Expression von *Hes7* und *Sprouty2* in *Pofut1*^{-/-} und *Dll1*^{-/-} Embryonen war gegenläufig (ZB und ZC, ZJ und ZK; i.g.R.). *Sprouty2* wurde stark im anterioren PSM von *Pofut1*^{-/-} und *Dll1*^{-/-} Embryonen exprimiert (ZB, ZJ; i.g.R.), während *Hes7* stärker im posterioren PSM exprimiert wurde (ZC, ZK). Die gestrichelte Linien in (S, S', T, T', U, U') markieren dabei die überlappenden Expressionsbereiche. Die gestrichelten Linien in (ZB, ZC, ZJ, ZK) verdeutlichen sich ausschließende Expressionsdomänen. Die rote Linie in (P) markiert die Expression im Neuralrohr.

Da *Sprouty2* ein Inhibitor des Fgf- Signalweges ist (siehe Einleitung) könnte die fehlende Expression von *Sprouty2* im posterioren PSM von T-NICD Embryonen zu einer Aktivierung des Fgf- Signalweges führen. Ebenfalls könnte das exogene NICD aber auch zu einer generellen Inhibition des Fgf- Signalweges führen. Um zu untersuchen, wie sich die Überexpression von exogenem NICD auf andere Zielgene des Fgf- Signalweges auswirkt, wurde die Expression des zyklisch exprimierten Zielgens *Snail1* untersucht.

In Wildtyp Embryonen wurden verschiedene Phasen der *Snail1* Expression detektiert (Abb. 34 A- C). Hingegen in T-NICD Embryonen war *Snail1* im gesamten PSM exprimiert, wobei die Expressionsstärke gradientenförmig von posterior nach anterior abnahm (Abb. 34 D, E).

Somit scheint die Überexpression von exogenem NICD keine grundsätzliche Inhibition des Fgf- Signalweges zu bewirken.

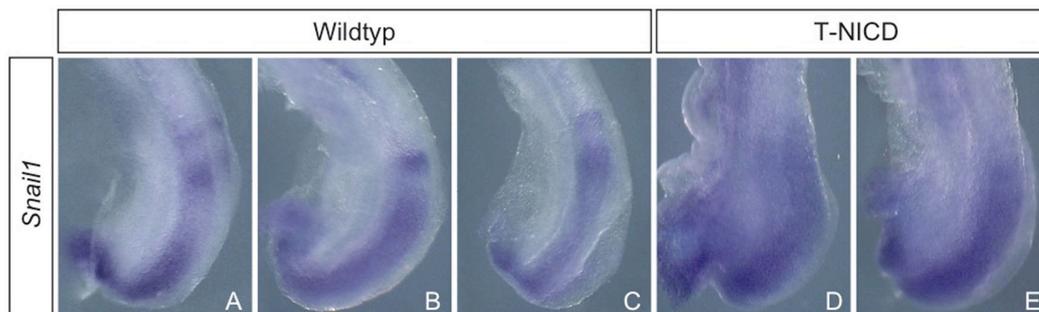


Abbildung 34: Die Expression von *Snail1* in T-NICD Embryonen. Während in Wildtyp Embryonen verschiedene Phasen der *Snail1* Expression detektiert wurden (A- C), war *Snail1* in T-NICD Embryonen im gesamten PSM hochreguliert (D, E).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Notch- Signalweg keinen Einfluss auf die zyklische Expression der Wnt Zielgene *Axin2* und *Dact1* hatte. Hingegen die Expression der Zielgene des Fgf- Signalweges, *Sprouty2* und *Snail1*, wurde durch den Notch- Signalweg beeinflusst.

6. Diskussion

6.1 Die Rolle des Notch- Signalweges im PSM

In Kapitel 3.8 wurden drei Funktionen, die der Notch- Signalweg im PSM erfüllen könnte, vorgestellt. Notch könnte 1) direkt an der Bildung von Somitengrenzen beteiligt sein, 2) der Schrittmacher der Segmentierungsuhr sein und 3) benachbarte Zellen synchronisieren. Im Folgenden sollen alle drei Funktionen diskutiert werden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde festgestellt, dass T-NICD Embryonen, trotz der konstitutiven Aktivierung von NICD im gesamten PSM, durchschnittlich bis zu 18 Somitengrenzen bilden (Abschnitt 5.3). Auch konnte ausgeschlossen werden, dass die verbleibende endogene Aktivität des Notch- Signalweges die Ursache dafür bildet, da auch in T-N1-NICD und in T-Dll1-NICD Embryonen 14- 15 Somiten gebildet wurden. Dies zeigte, dass keine zyklische Aktivität von Notch für die Ausbildung von Somitengrenzen notwendig ist. Auch die Konfrontation von Domänen mit, benachbart zu Domänen ohne Notch Aktivität kann nicht die Grundlage für die Bildung von Somitengrenzen sein, wie in (Morimoto et al. 2005) postuliert wurde. Weiterhin wurden *Pofut1^{-/-}* und *Dll1^{-/-}* Embryonen untersucht um festzustellen, ob grundsätzlich Notch Aktivität notwendig ist, um Somitengrenzen zu bilden. Da sowohl *Pofut1^{-/-}*, als auch *Dll1^{-/-}* Embryonen mehr als 15 Somitengrenzen bildeten, kann geschlussfolgert werden, dass in Mausembryonen keine Notch Aktivität für die Ausbildung von Somitengrenzen benötigt wird und demnach der Notch- Signalweg die Funktion 1) nicht zu erfüllen scheint.

Die zweite Funktion beschreibt, dass der Notch- Signalweg den Schrittmacher der so genannten Segmentierungsuhr darstellt und für die rhythmische Transkription der Segmentierungsgene sorgt. Da aber Komponenten des Wnt- Signalweges eine zyklische Expression im PSM von T-NICD Embryonen aufzuweisen, ist es unwahrscheinlich, dass der Notch- Signalweg diese Funktion in Mausembryonen erfüllt.

Die dritte Funktion, die der Notch- Signalweges im PSM haben könnte ist es die Oszillation benachbarter Zellen zu synchronisieren. Diese Funktion scheint der Notch- Signalweg in Zebrafisch Embryonen zu haben (Ozbudak and Pourquie 2008). Doch auch für Maus- und

Hühnerembryonen gibt es Hinweise darauf, dass der Notch- Signalweg an der Synchronisierung benachbarter Zellen im PSM beteiligt ist. In Mausembryonen wurde beobachtet, dass die Expression von *Hes1* in kleinen PSM- Stücken geregelte Oszillationen aufweist. Zwar waren auch in isolierten PSM Zellen Oszillationen zu beobachten, aber diese waren nicht mehr synchron (Masamizu et al. 2006). Das Selbe wurde auch für die *Hes1*- Homologen *c- hairy1* und *c- hairy2* in Hühnerembryonen gefunden (Maroto and Pourquie 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit können hingegen eine Funktion des Notch- Signalweges in der Synchronisierung benachbarter Zellen im PSM weder belegen, noch ausschließen. So wurde in (Hirata et al. 2004) gezeigt, dass durch die Inhibition der Expression von *Hes7* durch das *Hes7* Protein ein Rückkopplungsmechanismus entsteht, der nur von der Stabilität des *Hes7* Proteins und der Halbwertszeit der *Hes7* mRNA abhängt. Demnach würde man Notch nicht für die zyklische Expression von *Hes7* benötigen. Da in T-NICD Embryonen keine unterschiedlichen Phasen der *Hes7* Expression zu erkennen waren, muss der Notch- Signalweg aber eine Auswirkung auf die zyklische Expression von *Hes7* haben. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression von *Hes7* innerhalb der Zellen noch dynamisch war. So könnte der Notch- Signalweg notwendig sein, um die Zyklen der *Hes7* Expression im PSM zu synchronisieren. In T-NICD Embryonen würde die fehlende Synchronisation zu einer zufälligen Verteilung *Hes7* exprimierender und *Hes7* nicht-exprimierender Zellen im PSM führen. Somit sollte eine mosaikartige Expression von *Hes7* in T-NICD Embryonen zu erkennen sein. Eine solche Expression wurde zwar nicht detektiert, aber die in dieser Arbeit verwendete Auflösung reicht nicht aus, um generell Oszillationen von *Hes7* auf zellulärer Ebene auszuschließen.

Damit scheint der Notch Signalweg in Mausembryonen nicht an der Bildung von Somitengrenzen beteiligt zu sein (postulierte Funktion 1) und stellt nicht den Schrittmacher der Segmentierungsuhr dar (postulierte Funktion 2). Hingegen könnte Notch an der Synchronisation benachbarter Zellen beteiligt sein (postulierte Funktion 3).

Eine weitere Funktion, die der Notch- Signalweg im PSM hat, ist die Etablierung der AP- Polarität.

6.2 Die Etablierung der AP- Polarität

Somiten sind entlang der anterior- posterioren Achse polarisiert, d.h. sie besitzen eine anteriore und eine posteriore Hälfte. An der Etablierung dieser AP- Polarität ist der Notch-Signalweg maßgeblich beteiligt. So wurde in der vorliegenden Dissertation gezeigt, dass in T-NICD Embryonen *Uncx4.1*, ein Marker für posteriore Somitenidentität, in den gesamten Somiten exprimiert wurde, während in *Pofut1^{-/-}* Embryonen keine *Uncx4.1* Expression in den Somiten zu verzeichnen war. D.h. die Überexpression von NICD führte zu einer kaudalisierten Somitenidentität, der Verlust von Notch zu einer rostralisierten Somitenidentität.

In (Christ et al. 1974) konnte gezeigt werden, dass die Inversion eines Teils des PSM in anterior- posteriorer Richtung zu Somiten führt, die ebenfalls in umgekehrter Richtung, also von posterior nach anterior polarisiert sind. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die AP-Polarität der Somiten schon im anterioren PSM irreversibel festgelegt wird.

In dieser Dissertation wurde hingegen gezeigt, dass dies in Mausembryonen nicht zutrifft. In *Msd-NICD* Embryonen wies das PSM eine normale Musterung auf. Im posterioren PSM wurde *Notch1* zyklisch aktiviert und auch die Zielgene des Notch- Signalweges wiesen eine zyklische Expression auf. Ebenso wies das anteriore PSM ein dynamisches Muster von *Mesp2* auf. Dadurch wurde die AP- Polarität im anterioren PSM normal etabliert, was anhand der Expression von *Tbx18* und *Uncx4.1* gezeigt werden konnte. So wurde *Uncx4.1* in der posterioren Hälfte des Somiten S+1 exprimiert, während *Tbx18* in den Somiten S- 1 bis S+1 in der anterioren Hälfte exprimiert wurde. Ab dem Somiten S0 wurde exogenes NICD in den Somiten überexprimiert. Dieses exogene NICD führte zu einer Änderung der AP- Polarität. So wurde eine Ausbreitung der *Uncx4.1* Expression auf beide Somitenhälften beobachtet, während die Expression von *Tbx18* runterreguliert wurde. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die AP- Polarität innerhalb der Somiten zwar wie beschrieben (Keynes and Stern 1988) im anterioren PSM etabliert wird, aber nicht irreversibel festgelegt ist, sondern zumindest in neu gebildeten Somiten noch geändert werden kann.

6.3 Die AP- Polarität in Msd-NICD Embryonen

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt wurde, spielt der Notch- Signalweg eine entscheidende Rolle in der Etablierung der AP- Polarität und die Überexpression von NICD führt zu einer Verbreiterung der posterioren Somitenidentität und damit zu einer Ausweitung der *Uncx4.1* Expression. Auch in Msd-NICD Embryonen wurde eine Ausbreitung der Expressionsdomäne von *Uncx4.1* gefunden. Obwohl exogenes NICD ab dem Somiten S0 überexprimiert wurde, war die Expression von *Uncx4.1* erst ab dem Somiten S+3 in E9.5 Tagen alten Embryonen, bzw. ab dem Somiten S+6 in E10.5 Tage alten Embryonen auf beide Somitenhälften ausgeweitet. In den weiter kaudal gelegenen Somiten war die *Uncx4.1* Expression zunächst auf die posteriore Somitenhälfte beschränkt und breitete sich nur allmählich aus. D.h. die Ausbreitung der *Uncx4.1* Expression trat erst nach einer zeitlichen Verzögerung von 3 bzw. 6 Somiten auf.

Eine ähnliche zeitliche Verzögerung wurde auch schon für *Tbx18* defiziente Embryonen (*Tbx18*^{GFP/GFP}) beschrieben. Auch in diesen *Tbx18*^{GFP/GFP} Embryonen wurde die *Uncx4.1* Expression innerhalb der ersten 5- 6 Somiten normal angelegt, breitete sich dann aber weiter nach anterior aus. In gleicher Weise wie sich die Expression von *Uncx4.1* ausbreitete, ging die Expression von *GFP* repräsentativ für *Tbx18* zurück (Bussen et al. 2004).

Diese Beobachtungen könnten als eine inhibitorische Wirkung von *Tbx18* auf *Uncx4.1* interpretiert werden. Da die inhibitorische Wirkung aber erst nach einer gewissen Verzögerung auftrat, muss von einem indirekten Mechanismus ausgegangen werden. Tatsächlich wurde in (Farin et al. 2007) gefunden, dass der *Dll1* Promoter *Tbx18* Bindestellen enthält und *Tbx18* die Expression von *Dll1* in Zellkulturversuchen hemmt. Folglich könnte *Tbx18* auch in den Somiten die Expression von *Dll1* hemmen. Da der *Dll*-Notch- Signalweg, indirekt oder direkt, die Expression von *Uncx4.1* aktiviert (Barrantes et al. 1999), führt die Inhibition der *Dll1* Expression durch *Tbx18* indirekt zu einer Inhibition der *Uncx4.1* Expression. Auch wurde in (Bussen et al. 2004) postuliert, dass *Uncx4.1* direkt oder indirekt die Expression von *Tbx18* reguliert, da in *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen die Expression von *Tbx18* auch ausgeweitet ist.

Wie zuvor bereits beschrieben, war die Expression von *Uncx4.1* in Msd-NICD Embryonen erst nach einer Verzögerung ausgebreitet. Wenn der *Dll*-Notch- Signalweg die *Uncx4.1* Expression direkt aktiviert, ist solch eine Verzögerung nicht zu erwarten, da in den Msd-NICD Embryonen die Expression von *Hey1* schon ab dem Somiten S+1 auf beide Somitenhälften ausgeweitet war. Zwei verschiedene Modelle könnten dies Ergebnis erklären.

Zum einen könnte in Msd-NICD Embryonen die Aktivierung der *Uncx4.1* Expression in den anterioren Hälften neu gebildeter Somiten gehemmt werden. Zum anderen könnte es zu Zellbewegung kommen, welche die Ausweitung der posterioren Somitenidentität zur Folge haben.

Zunächst soll auf die Inhibitor Theorie eingegangen werden.

Ein möglicher Kandidat, der die Aktivierung der *Uncx4.1* Expression spezifisch in der anterioren Somitenhälfte inhibieren könnte, ist Tbx22. Tbx22 ist eng verwandt mit Tbx18 (Naiche et al. 2005) und wird in der anterioren Hälfte der Somiten S- 1 bis S+3 exprimiert. In den darauf folgenden Somiten ist die Expression stark runter reguliert und nimmt erst in weiter anterioren Somiten wieder zu (Bush et al. 2002). Damit könnte Tbx22 spezifisch zu einer Inhibition der *Uncx4.1* Expression in den Somiten S- 1 bis S+3 führen. Da die Region Stromaufwärts der transkriptionellen Startsequenz von *Uncx4.1* keine T-Box Bindestellen enthält, ist es unwahrscheinlich, dass Tbx22 die Expression von *Uncx4.1* direkt reguliert. Potentiell könnte Tbx22 an den *Dll1* Promoter binden und über den Notch- Signalweg die Expression von *Uncx4.1* positiv beeinflussen. Da in Msd-NICD Embryonen eine aktive Form von Notch überexprimiert wird und damit keine Aktivierung durch Dll1 notwendig ist, ist es hingegen unwahrscheinlich, dass Tbx22 der Faktor ist, der in Msd-NICD Embryonen die Expression von *Uncx4.1* in den anterioren Hälften der neu gebildeten Somiten inhibiert.

Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass der Notch- Signalweg für die Regulation von Faktoren verantwortlich ist, welche eine Vermischung von Zellen der anterioren und posterioren Hälften beeinflusst. Bringt man experimentell zwei anteriore Somitenhälften in Kontakt, so mischen sich die Zellen beider Hälften. Bei der Konfrontation einer posterioren mit einer anterioren Hälfte mischen sich die Zellen beider Hälften hingegen nicht (Stern and Keynes 1987). Die konstitutive Expression von NICD in Msd-NICD Embryonen könnte dazu führen, dass die Zellen der posterioren Somitenhälften ihre örtliche Beschränkung verlieren und in die anteriore Somitenhälfte einwandern. Dadurch würde es zu einer langsamen Ausweitung der posterioren Somitenidentität und damit zu einer kontinuierlichen Verbreiterung der *Uncx4.1* Expression kommen.

6.4 Die Rolle von Rbp-Jk in der Etablierung der AP- Polarität

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, hat der Notch- Signalweg einen Einfluss auf die Expression von *Uncx4.1*. Da *Dll1*^{-/-} Embryonen keine Expression von *Uncx4.1* aufweisen, wurde auch ein Verlust der *Uncx4.1* Expression in *Rbp-Jk*^{-/-} Embryonen erwartet. Hingegen wurde *Uncx4.1* sowohl *Rbp-Jk*^{-/-}, als auch *T-Rbp*^{-/-} Embryonen in der posterioren Somitenhälfte exprimiert. Die *Uncx4.1* Expression war zwar deutlich schwächer als in Wildtyp Embryonen, aber nicht vollständig runterreguliert wie in *Dll1*^{-/-} Embryonen (vergleiche Abb. 26 und 27). Dies weist darauf hin, dass die Regulation der *Uncx4.1* Expression durch den Notch- Signalweg in der posterioren Somitenhälfte unabhängig von *Rbp-Jk* ist.

Während in T-NICD Embryonen die *Uncx4.1* Expression auf beide Somitenhälften ausgeweitet war, wurde in T-Rbp-NICD Embryonen trotz des exogenen NICDs *Uncx4.1* nur in den posterioren Somitenhälften exprimiert. Dass keine *Uncx4.1* Expression in den anterioren Somitenhälften induziert wurde, weist darauf hin, dass die Aktivierung der *Uncx4.1* Expression in der anterioren Domäne abhängig von *Rbp-Jk* ist.

Folglich kann der Notch- Signalweg in mutanten Embryonen zu einer Aktivierung der *Uncx4.1* Expression in den gesamten Somiten führen. Im Gegensatz dazu scheint *Rbp-Jk* nur die Regulation der *Uncx4.1* Expression in den anterioren Somitenhälften beeinflussen zu können.

Die Tatsache, dass *Rbp-Jk* hingegen in der posterioren Hälfte abkömmlich zu sein scheint, kann mit zwei verschiedenen Modellen erklärt werden (Abb. 35):

1a) Zum einen könnte die Expression von *Uncx4.1* nicht direkt durch die intrazelluläre Domäne von Notch aktiviert werden, sondern durch einen γ - Sekretase unabhängigen Notch- Signalweg. Die γ - Sekretase führt zur S3 Spaltung des Notch Rezeptors und somit zur Freisetzung der NICD. Die katalytische Einheit der γ - Sekretase ist Presenilin. In Säugern gibt es zwei Presenilin (Psen) homologe, *Psen1* und *Psen2*. γ - Sekretase unabhängige Funktionen des Notch- Signalweges sind bereits beschrieben worden. So wurde in (Berechid et al. 2002) gezeigt, dass in *Psen1*^{-/-}, *Psen2*^{-/-} Zellen die Expression von *Hes1*, einem Zielgen des Notch- Signalweges, aktiviert wird. Somit konnte gezeigt werden, dass in diesen Zellen ein Notch- Signalweg existiert, welchen unabhängig von Psen zu sein scheint. Auch die Tatsache, dass der Somitenphänotyp von *Psen1*^{-/-}, *Psen2*^{-/-} Embryonen verstärkt wird, wenn zusätzlich *Notch1* deletiert wird, unterstützt die Hypothese eines Psen unabhängigen Notch- Signalweges (Huppert et al. 2005). Es wurde auch bereit postuliert, dass die anteriore Hälfte

innerhalb eines Somiten durch einen Psen unabhängigen Notch- Signalweg definiert wird, während die Festlegung der posterioren Hälfte Psen abhängig erfolgt (Takahashi et al. 2000; Takahashi et al. 2003; Bussen et al. 2004). Folglich könnte auch die *Uncx4.1* Expression in den posterioren Somitenhälften von mutanten Embryonen durch einen Psen unabhängigen Notch- Signalweg aktiviert werden (Abb. 37, 1a).

1b) Die zweite Möglichkeit (Abb. 35, 1b) besteht darin, dass Dll1 den Notch Rezeptor aktiviert, NICD in den Kern translokalisiert und dort aber statt an Rbp-Jκ an einen anderen transkriptionellen Regulator bindet. Sowohl in *Drosophila melanogaster*, als auch in verschiedenen humanen Zellen gibt es Hinweise, dass solch ein Rbp-Jκ unabhängiger Signalweg existiert (Shawber et al. 1996; Arias 2002; Brennan and Gardner 2002; Liao et al. 2007). Allerdings ist bisher nicht bekannt, wie dieser Rbp-Jκ unabhängige Signalweg im Detail funktioniert. Möglicher Weise spielt Deltex, eine E3- ubiquitin Ligase, dabei eine Rolle (Matsuno et al. 1997; Hori et al. 2004). Der erste Hinweis darauf, dass dieser nicht-kanonische Notch- Signalweg auch in Mäusen eine Rolle spielt, wurde in (Yasuhiko et al. 2006) beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass Notch den *Mesp2* Promoter immer noch aktivieren kann, wenn die Rbp-Jκ Bindungsstellen deletiert sind, während ein Rbp-Jκ- VP16 Fusionsprotein diesen modifizierten Promoter nicht mehr aktivierte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in Embryonen mit gestörtem Notch- Signalweg die *Uncx4.1* Expression in den anterioren Somitenhälften offenbar anders reguliert wird als in den posterioren Somitenhälften. In den anterioren Somitenhälften mutanter Embryonen scheint der Notch- Signalweg zu einer Aktivierung der *Uncx4.1* Expression in einem Rbp-Jκ abhängigen Mechanismus zu führen. Im Gegensatz dazu wird in den posterioren Somitenhälften die *Uncx4.1* Expression anscheinend Notch abhängig, aber Rbp-Jκ unabhängig reguliert.

Ein weiterer Unterschied zwischen den publizierten Ergebnissen und den hier verwendeten *Rbp-Jκ^{-/-}* Embryonen ist in der Expression von *Uncx4.1* zu finden. In der Veröffentlichung: (Barrantes et al. 1999) wurde gezeigt, dass *Rbp-Jκ^{-/-}* Embryonen kein *Uncx4.1* exprimieren. Im Rahmen dieser Dissertation wurde aber eine Expression von *Uncx4.1* in den posterioren Somitenhälften detektiert. Es ist unwahrscheinlich, dass die Diskrepanz dieser Daten auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Embryonen zurückzuführen ist. Vielmehr könnte dies durch einen Unterschied in den Allelstrukturen begründet sein. So enthielten die in der Veröffentlichung: (Barrantes et al. 1999) verwendeten Mäuse eine Neomycin (neo) Kassetten im *Rbp-Jκ* Genlokus. Neo ist dafür bekannt, dass es die Transkription umliegender Gene reduziert (Rucker et al. 2000). Da die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse hingegen keine Neo Kassetten enthielten, könnte dies die Ursache für die Unterschiede in der *Uncx4.1* Expression sein.

6.6 Die Auswirkung der AP- Polarität auf die Skelettentwicklung

Da die AP- Polarität innerhalb eines Somiten eine Auswirkung auf die Bildung des Skeletts hat, sollte untersucht werden, wie sich die gestörte AP- Polarität in Embryonen mit gestörtem Notch- Signalweg auf die Skelettentwicklung dieser Embryonen auswirkt.

Da sowohl *Msd-NICD* Embryonen, als auch *Tbx18^{-/-}* Embryonen eine Ausweitung der *Uncx4.1* Expression aufweisen, wurde ein vergleichbarer Phänotyp erwartet. Der Verlust von *Tbx18* führt zu einer Verbreiterung der Neuralbögen und Fusionen der proximalen Rippen (Bussen et al. 2004). Dieser Phänotyp war grundsätzlich auch bei *Msd-NICD* Embryonen zu finden. Während die proximalen Rippen in *Tbx18^{-/-}* Embryonen hingegen ein kontinuierliches Knochenband aufwiesen (Bussen et al. 2004), waren dies in *Msd-NICD* Embryonen deutlich schwächer. Auch wiesen *Msd-NICD* Embryonen Defekte in der Wirbelsäule auf, welche in *Tbx18^{-/-}* Embryonen nicht beobachtet wurden. So wies die Wirbelsäule von *Msd-NICD* Embryonen keine Segmentierung auf und die Ossifikation war gestört. Auch die Überexpression von *Dll1* mithilfe des *Msd*- Promoters führt zu defekten in der Wirbelsäule (Teppner et al. 2007). In den *Msd-Dll1* Embryonen fehlten die Zwischenwirbelscheiben und die Wirbelkörper wiesen Defekte auf (Teppner et al. 2007). Für Hühnerembryonen wurde gezeigt, dass die Entfernung der Zellen des Somitocoels zum Verlust der Intervertebralscheiben führt und es zu einer Fusion der Vertebraalkörper kommt (Mittapalli et al. 2005). Diese Defekte entsprechen den in *Msd-Dll1* (Teppner et al. 2007) gefundenen. Weiterhin wurde in Hühnchen durch Fluoreszenzfärbung von Zellen beobachtet, dass die

mesenchymalen Somitocoelzellen im Inneren des Somiten dort verharren, während die epithelialen äußeren Zellen teilweise in das Somitocoel einwandern (Wong et al. 1993). Es ist möglich, dass Dll1 die Migration der epithelialen (äußeren) Zellen in das Somitocoel behindert (Teppner et al. 2007). Somit könnte auch die Überexpression von NICD zu einer Reduktion der Zellen des Somitocoels führen. Da aus den Somitocoelzellen Teile der proximalen Rippen, der Intervertebralkörper und der Zwischenwirbelgelenke gebildet werden (Huang et al. 1994; Huang et al. 1996), könnten diese Elemente in Msd-NICD Embryonen reduziert sein. Dies könnte die abweichenden beobachteten Phänotypen zwischen den Msd-NICD und den *Tbx18*^{-/-} Embryonen erklären.

6.7 Die Musterung des PSMs in T-NICD Embryonen

Um zu untersuchen, wie die Überexpression die Musterung des PSMs beeinflusst, wurden die Expression von *Fgf8* und *Tbx6* analysiert. Wie bereits in Kapitel 1.1.2.3 erläutert, wird *Fgf8* als Gradient im PSM exprimiert. Auch das sezernierte Protein *Fgf8* bildet einen Gradienten vom posterioren zum anterioren Ende des PSMs (Dubrulle and Pourquie 2004). Erst wenn die Konzentration von *Fgf8* einen gewissen Schwellenwert unterschreitet, kann eine Somitengrenze gebildet werden (Dubrulle et al. 2001), da hohe *Fgf8* Konzentrationen die Differenzierung der mesenchymalen Zellen des PSMs verhindern (Dubrulle et al. 2001; Delfini et al. 2005). Auch *Tbx6* spielt eine Rolle in der Somitogenese. *Tbx6* reguliert in Kooperation mit Notch die Expression von *Mesp2* (Yasuhiko et al. 2006), einem für die Bildung von Somitengrenzen notwendigen Transkriptionsfaktor (Saga et al. 1997; Nomura-Kitabayashi et al. 2002; Morimoto et al. 2005; Saga 2007; Takahashi et al. 2007b).

Die Expression von *Fgf8* war in T-NICD Embryonen nicht verändert. Wie auch in Wildtyp Embryonen, wurde *Fgf8* gradientenförmig im PSM von T-NICD Embryonen exprimiert (siehe Abb. 21). Folglich scheint der Notch- Signalweg keinen Einfluss auf die Expression von *Fgf8* zu haben.

Laut (White et al. 2005) wird die Expression von *Tbx6* durch den Notch- Signalweg reguliert. Im Rahmen dieser Dissertation wurde hingegen keine Hochregulation der *Tbx6* Expression in T-NICD Embryonen gefunden. Da die publizierten Ergebnisse auch aus Mausembryonen stammen, kann diese Diskrepanz nicht in unterschiedlichen Modellsystemen begründet liegen. Auch in *Dll1*^{-/-} Embryonen war keine Reduktion der *Tbx6* Expression zu erkennen. Dieses Phänomen wurde in (White et al. 2005) damit erklärt, dass *Dll1* und *Dll3* in überlappenden Domänen im PSM exprimiert werden und damit *Dll3* den Verlust von *Dll1*

kompensieren könnte. Diese Erklärung ist allerdings sehr unwahrscheinlich. Da Dll3 den Notch Rezeptor nicht aktiviert (Geffers et al. 2007), kann es auch nicht den Verlust von Dll1 kompensieren. Da in (White et al. 2005) nur gezeigt wurde, dass die Expression von *Tbx6* durch Mutationen der Rbp-Jk Bindestellen verhindert werden kann, könnte es sich um einen Notch- abhängigen Mechanismus handeln. Es ist möglich, dass *Tbx6* zwar durch den Transkriptionsregulator Rbp-Jk, nicht aber durch Notch reguliert wird. Dabei könnte Rbp-Jk mit einem anderen Protein interagieren. Zum Beispiel wurde eine Interaktion von Rbp-Jk mit PTF1 (pancreas specific transcription factor 1a) gefunden, welche einen Notch unabhängigen, Rbp-Jk involvierenden Signalweg darstellt (Beres et al. 2006; Hori et al. 2008). Auch für *Drosophila melanogaster* wurden weitere Notch- unabhängige Funktionen von Rbp-Jk beschrieben (Barolo et al. 2000; Koelzer and Klein 2003). Dennoch bleibt es spekulativ, ob solch ein Mechanismus im PSM eine Rolle spielt.

6.8 Die Wirkung von exogenem NICD und Lfng auf die Aktivierung von endogenem Notch1

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss der Überexpression von exogenem NICD auf die Aktivierung von endogenem Notch1 untersucht (Kapitel 5.5). Dabei wurde im anterioren PSM eine dynamische Expression von endogenem NICD (endoNICD) gefunden. Hingegen war die Expression von endoNICD im posterioren PSM stark runterreguliert. Als mögliche Ursache wurde der Einfluss von Lfng in Erwägung gezogen (Kapitel 5.6). Für Mausembryonen wurde eine inhibitorische Wirkung von Lfng auf den Dll1-Notch- Signalweg beschrieben. Wie bereits in Kapitel 3.3 und Kapitel 1.8 beschrieben, soll Lfng zu einer Glykosylierung von Notch1 führen, die verhindert, dass Dll1 den Rezeptor Notch1 aktivieren kann (Morimoto et al. 2005). Im Gegensatz dazu wurde für *Drosophila melanogaster* (Panin et al., 1997; Haines and Irvine, 2003) und für verschiedene Zellen (Panin et al. 1997; Hicks et al. 2000; Dale et al. 2003; Haines and Irvine 2003; Ladi et al. 2005; Yang et al. 2005) eine aktivierende Wirkung von Lfng auf den Dll1-Notch- Signalweg beschrieben. Sowohl in *Drosophila*, als auch in Zellkultur führte die Glykosylierung des Notch Rezeptors durch Lfng zu einer höheren Affinität von Notch1 zu Dll1. Sowohl die Möglichkeit einer Aktivierung, als auch die Möglichkeit einer Inhibierung des Dll1-Notch- Signalweges durch Lfng sollen anhand der Daten dieser Dissertation hier diskutiert werden.

Da in T-NICD Embryonen *Lfng* im gesamten PSM exprimiert wird, könnte es die Aktivierung von Notch1 im gesamten PSM inhibieren. Das würde erklären, warum im posterioren PSM kein endoNICD detektiert wurde. Widersprüchlich daran ist aber, dass die Expression von *Lfng* im anterioren PSM von T-NICD Embryonen deutlich stärker ist als im posterioren PSM, und trotzdem im anterioren PSM endoNICD zu detektieren ist. Auch würde man in *Lfng*^{-/-} Embryonen eine Hochregulation von NICD erwarten. Da die Menge an NICD in *Lfng*^{-/-} Embryonen aber vergleichbar mit der in Wildtyp Embryonen detektierten war (Kapitel 5.6, Abb. 23 F), scheint *Lfng* keine inhibitorische Wirkung auf die Notch1 Aktivierung zu haben. Da sowohl die Expression von endoNICD, als auch die von *Lfng* im anterioren PSM am stärksten ist, ist es naheliegender, dass *Lfng* die Aktivierung von endogenem Notch1 im anterioren PSM verstärkt. Sollte *Lfng* die Aktivierbarkeit von Notch1 durch Dll1 verstärken, würde in *Lfng*^{-/-} Embryonen weniger Notch1 aktiviert werden. Hingegen wurde im Rahmen dieser Dissertation mittels Westernblot Analyse gefunden, dass in *Lfng*^{-/-} Embryonen nicht erkennbar weniger Notch1 aktiviert wird (Abb. 23 F). Da in der Ganzobjekt Antikörperfärbung eine Ausbreitung der endoNICD Expressionsdomäne in *Lfng*^{-/-} Embryonen gefunden wurde (Abb. 23 D, E), ist davon auszugehen, dass *Lfng* nicht zu einer Verstärkung der Notch1 Aktivierung führt und somit nicht der Grund für die stärkere Expression von endoNICD im anterioren PSM ist.

Folglich kann keines der beiden Modelle erklären, warum in T-NICD Embryonen endogenes Notch1 nur im anterioren PSM von T-NICD Embryonen aktiviert wird. So führte der Verlust von *Lfng* in *Lfng*^{-/-} Embryonen zwar zu einer Ausbreitung der NICD Expression, aber nicht zu einer Erhöhung der Gesamtmenge an NICD im PSM. Dies könnte an einer Missverteilung von NICD im PSM liegen. Falls in *Lfng*^{-/-} Embryonen beispielsweise mehr NICD im anterioren, und weniger NICD im posterioren PSM exprimiert wird als in Wildtyp Embryonen, könnte die Gesamtmenge an NICD trotzdem in beiden gleich sein. Um sehen zu können, ob *Lfng* im posterioren PSM als Inhibitor oder als Aktivator fungiert, müsste eine Westernblot Analyse mit Gewebe aus posterioren PSMs durchgeführt werden.

6.9 Die Wechselwirkungen zwischen dem Notch-, Wnt- und Fgf-Signalweg

Aufgrund der zahlreichen widersprüchlichen Daten in Bezug auf die Wechselwirkungen der drei Signalwege Notch, Wnt und Fgf (siehe Kapitel 3.6) wurde in dieser Dissertation der Einfluss der Überexpression von NICD auf Zielgene des Wnt- und des Fgf- Signalweges untersucht.

Für *Axin2* und *Dact1*, zwei Zielgenen des Wnt- Signalweges, welche in Wildtyp Embryonen eine zyklische Expression aufweisen, wurden auch in T-NICD Embryonen verschiedene Expressionsphasen im PSM gefunden (Kapitel 5.13; Abb. 33). Auch in *Dll1*^{-/-} Embryonen ist die Expression von *Axin2* dynamisch (Aulehla et al. 2003). Somit scheint der Notch-Signalweg keinen Einfluss auf die zyklische Expression von Wnt Zielgenen zu haben. Ergebnisse aus (Aulehla et al. 2008) zeigen, dass der Notch- Signalweg noch zyklisch ist, wenn Wnt konstitutiv im PSM aktiviert wird. Hingegen wurde in *vestigial tail* Mutanten, welche ein hypomorphes Allel von *Wnt3a* darstellen, keine zyklische Expression von *Lfng* gefunden (Aulehla et al. 2003).

Zusammenfassend kann argumentiert werden, dass der Notch- Signalweg keinen Einfluss auf den Wnt- Signalweg hat, da die zyklische Expression von Wnt Zielgenen in Embryonen mit gestörtem Notch- Signalweg nicht beeinträchtigt ist. Im Gegensatz dazu scheint der Notch-Signalweg nicht vollkommen unabhängig vom Wnt- Signalweg zu sein.

Um den Einfluss der Überexpression von NICD auf Zielgene des Fgf- Signalweges zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Expression der Fgf Zielgene *Sprouty2* und *Snail1* analysiert. Während *Sprouty2* in Wildtyp Embryonen eine zyklische Expression aufwies, war die Expression von *Sprouty2* in T-NICD Embryonen deutlich dereguliert. *Sprouty2* wurde nur in einer schmalen Domäne im anterioren PSM von T-NICD Embryonen exprimiert, während im posterioren PSM die Expression stark runterreguliert war (Kapitel 3.13, Abb. 33). Wie *Sprouty2*, weist auch *Snail1* eine zyklische Expression im PSM von Wildtyp Embryonen auf. In T-NICD Embryonen hingegen war *Snail1* im gesamten PSM hochreguliert (Kapitel 3.13, Abbildung 35).

Somit scheint der Notch- Signalweg einen Einfluss auf die zyklische Expression von Fgf Zielgenen zu haben. Eine mögliche Verbindung zwischen dem Notch und dem Fgf-Signalweg könnte *Hes7* darstellen. Die Expression von *Hes7* wird im posterioren PSM durch den Fgf- Signalweg, im anterioren PSM durch den Notch- Signalweg reguliert (Niwa et al. 2007). Dies könnte die Funktion haben, die beiden Signalwege zu synchronisieren. So wurde

beschrieben, dass die zyklische Expression der Fgf und der Notch Zielgene in Phase ist, während der Wnt- Signalweg anti- zyklisch exprimiert wird (Dequeant et al. 2006). Diese Synchronisation des Notch- und des Fgf- Signalweges könnte durch Hes7 reguliert werden. Hes7 inhibiert die Expression von *Lfng* und beeinflusst damit die Aktivierung des Notch- Signalweges (Bessho et al. 2001b; Morimoto et al. 2005; Niwa et al. 2007). Außerdem reguliert Hes7 über die Expression von *Dusp4* (Niwa et al., 2007) die Aktivität des Fgf- Signalweges (siehe Kapitel 3.6).

In T-NICD Embryonen überlappte die Expressionsdomäne von *Sprouty2* im anterioren PSM mit dem Bereich, in dem die Expression von *Hes7* zurückgeht (Kapitel 5.13, Abb. 33). Folglich könnte die Hemmung der *Sprouty2* Expression in T-NICD Embryonen mit der Überexpression von *Hes7* zusammenhängen. Auch in *Pofut1*^{-/-} und *Dll1*^{-/-} Embryonen wurden Hinweise auf eine Kopplung der *Sprouty2* und *Hes7* Expression gefunden. So zeigte der Vergleich der Expressionsdomänen, dass sowohl in *Pofut1*^{-/-}, als auch in *Dll1*^{-/-} Embryonen in dem Bereich im posterioren PSM, in welchem *Hes7* stark exprimiert wurde, *Sprouty2* nur schwach exprimiert war (Vergleiche Abb. 33 ZB mit ZC, und ZJ mit ZK; i.g.R.). Im anterioren PSM hingegen war die Expression von *Hes7* schwach, die Expression von *Sprouty2* aber stark.

D.h. die Expressionsdomänen von *Hes7* und *Sprouty2* schienen sich sowohl in T-NICD Embryonen, also auch in *Pofut1*^{-/-} und *Dll1*^{-/-} Embryonen gegenseitig auszuschließen. Zudem ist die Expression von *Hes7* im posterioren PSM von *Dll1*^{-/-} Embryonen dynamisch (Niwa et al. 2007). Auch die Expression von *Sprouty2* wies im posterioren PSM verschiedene Muster auf. Somit könnte die dynamische Expression von *Sprouty2* im posterioren PSM von *Dll1*^{-/-} Embryonen durch eine dynamische Inhibition durch Hes7 reguliert werden. Wie könnte dies aber auf zellulärer Ebene funktionieren?

Es ist bekannt, dass Hes7 die Expression von *Dusp4* hemmt (Niwa et al. 2007). *Dusp4* ist eine Phosphatase und hemmt den Fgf- Signalweg, indem sie die MAPK (ERK) dephosphoryliert (Eblaghie et al., 2003, siehe Einleitung). Damit sollte in T-NICD Embryonen, in denen die *Hes7* Expression im gesamten PSM hochreguliert ist, die *Dusp4* Expression gehemmt werden und somit die Expression von Fgf Zielgenen aktiviert werden. Da hingegen die Expression von *Sprouty2* stark runterreguliert war, scheint Hes7 zu einer Inhibition der *Sprouty2* Expression zu führen. Auch die Daten aus *Pofut1*^{-/-} und *Dll1*^{-/-} Embryonen deuten auf eine inhibitorische Wirkung von Hes7 auf *Sprouty2*. Möglicher Weise bindet Hes7 direkt an den *Sprouty2* Promoter. Wenn dies der Fall ist, müsste man N- Box Sequenzen im *Sprouty2* Promoter finden (Bessho et al. 2001a)

Anhand der Daten kann keine Aussage darüber getroffen werden, in welcher Art und Weise der Notch- Signalweg die Expression von *Sprouty2* reguliert. Dazu müssten unter anderem Promoteranalysen durchgeführt werden. Allerdings deuten die Ergebnisse darauf hin, dass zwischen der Expression von *Sprouty2* und der Expression von *Hes7* eine Verbindung besteht. Weiterhin kann anhand dieser Daten nicht eindeutig festgestellt werden, ob der Notch- Signalweg inhibierend oder aktivierend auf den Fgf- Signalweg wirkt. Da die Expression von *Sprouty2* im anterioren PSM stark runter reguliert ist, könnte der Notch- Signalweg eine inhibitorische Wirkung auf den Fgf- Signalweg haben. Da *Sprouty2* ein Inhibitor des Fgf- Signalweges ist (siehe Kapitel 3.5) könnte die fehlende Expression von *Sprouty2* im posterioren PSM von T-NICD Embryonen zu einer fehlenden Inhibierung des Fgf- Signalweges und dadurch auch zu der Hochregulierung der *Snail1* Expression führen. Damit würde die Überexpression von NICD zu einer Verstärkung der Fgf Signale führen.

Unabhängig davon, ob der Notch- Signalweg eine aktivierende oder eine inhibierende Wirkung auf den Fgf- Signalweg hat, kann festgehalten werden, dass der Fgf- Signalweg durch die konstitutive Expression von aktivem Notch maßgeblich beeinflusst wurde. Da auch der Fgf- Signalweg einen Einfluss auf den Notch- Signalweg hat (Wahl et al. 2007), scheinen diese beiden Signalwege sich gegenseitig zu beeinflussen.

Damit kann zusammengefasst werden, dass gemäß der Daten dieser Arbeit der Wnt- Signalweg unabhängig vom Notch- Signalweg zu sein scheint, während entsprechen der Veröffentlichung (Aulehla et al. 2003) die zyklische Expression von Zielgenen des Notch- Signalweges abhängig vom Wnt- Signalweg ist. Weiterhin zeigte die vorliegende Arbeit, dass der Notch- den Fgf- Signalweg beeinflusst. Da entsprechend der Veröffentlichung (Niwa et al. 2007) ebenfalls der Fgf- den Notch- Signalweg beeinflusst, scheinen diese beiden Signalwege abhängig voneinander zu sein.

6.10 Der Einfluss des Wnt-, Notch-, und Fgf- Signalweges auf die Bildung von Somitengrenzen

Aktuelle Theorien beschreiben eine essentielle Rolle des Notch- Signalweges für die Bildung von Somitengrenzen (Morimoto et al. 2005). In Hühnerembryonen, in denen die Expression einer aktiven Form von Notch zur Bildung einer ektopischen Somitengrenze führt (Sato et al. 2002), scheint dies auch der Fall zu sein. Hingegen in der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass in Mäusen keine Notch Aktivität für die Bildung von Somitengrenzen nötig ist. Ebenso zeigten die Ergebnisse dieser Dissertation auch, dass die Konfrontation von Domänen mit aktivem Notch1 benachbart zu Domänen ohne aktives Notch1 nicht die Grundlage für die Bildung von Somitengrenzen ist. Folglich kann ausgeschlossen werden, dass in Mausembryonen der Notch- Signalweg alleine für die Bildung der Somitengrenzen verantwortlich ist. Damit bleibt die Frage offen, über welche Signalwege dies reguliert wird.

Als Komponenten des Wnt- Signalweges wurden Wnt3a und β - Catenin untersucht. Wnt3a^{-/-} Embryonen bilden 7- 9 Somiten (Takada et al. 1994). Für Embryonen, die eine konstitutiv aktive Form von β - Catenin im Primitivstreifen überexprimieren, wurde in (Aulehla et al. 2008) beschrieben, dass sie keine Somiten mehr bilden. Hingegen konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass zumindest 5 unvollständig epithelialisierte Somiten gebildet werden (Dunty et al., 2008).

Die Rolle des Fgf- Signalweges auf die Bildung von Somitengrenzen wurden in FgfR1^{-/-} und in Fgf8^{-/-} Embryonen analysiert. Embryonen, in denen der FgfR1 im Primitivstreifen deletiert wurde, bildeten mehr als 15 Somiten (Wahl et al., 2007) und auch die Deletion von Fgf8 im Primitivstreifen führte zu keinem Segmentierungsphänotyp (Perantoni et al. 2005).

Auch für die Doppelmutante von Presinilin 1 und 2 wurde beschrieben, dass sie zwar keine richtigen Somiten bildet, dennoch aber periodische Kondensationen aufweist (Huppert et al. 2005). Trotzdem ist dies der bisher stärkste beschriebene Phänotyp. Der Grund dafür könnte sein, dass Presinilin nicht nur den Notch, sondern alle drei Signalwege (Notch, Fgf und Wnt) beeinflusst. Der kanonische Notch- Signalweg wird über die Wirkung von Presinilin als katalytische Untereinheit der γ - Sekretase beeinflusst, da Presinilin die S3 Spaltung des Notch Rezeptors bewirkt.

Aber auch der Wnt- Signalweg wird durch Presinilin beeinflusst. Presinilin soll als Gerüstprotein für die Phosphorylierung von β - Catenin durch Gsk- 3 dienen (Kang et al. 1999). Durch diese Phosphorylierung wird β - Catenin von dem F- Box Protein TrCP, einer Komponente der SCF- E3 ubiquitin ligase, erkannt. β - Catenin wird daraufhin ubiquitiniert

und vom Proteasom abgebaut. Weiterhin enthält Presenilin eine Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch Gsk- 3 (Kirschenbaum et al. 2001). Somit kann Gsk- 3 durch eine negative Rückkopplung die Presenilin Aktivität regulieren. Dadurch reguliert Presinilin den Wnt- Signalweg und schafft eine Verbindung zwischen dem Notch und dem Wnt- Signalweg. Weiterhin kann Presenilin die PI3K (Phosphatidylinositol 3- kinase) aktivieren. Diese gehört zum Fgf- Signalweg (siehe Einleitung) und wird über Gab1 (Grb2- associated binder 1) an Grb2, und so an Shp2 und den FgfR gebunden. Gab1 kann Shp2 aktivieren (Cunnick et al. 2001) und somit auch eine Aktivierung des MAPK Signalweges hervorrufen. Die PI3K kann dann wiederum die GSK- 3 inhibieren und damit eine Rückkopplung auf den Wnt- Signalweg erzeugen.

Folglich kann der Wnt- den Notch- und den Fgf- Signalweg regulieren und der Fgf- Signalweg über eine Rückkopplung den Wnt- Signalweg und somit auch den Notch- Signalweg beeinflussen. Presinilin könnte also alle drei Signalwege beeinflussen und weiterhin eine Brücke zwischen ihnen bilden. Somit würde erklärt werden, warum der Somitenphänotyp in Presinilin 1 und 2 mutanten Embryonen stärker ist, als in Mutanten der einzelnen Signalwege. Allerdings wurden all diese Interaktionen in unterschiedlichen zellulären Hintergründen beobachtet und es ist nicht klar, ob solch ein Netzwerk in ein und demselben Zellkontext stattfinden kann. Und auch ob derartige Regulationen im PSM stattfinden, ist bis jetzt nicht untersucht.

7. Literatur

- Arias, A.M. 2002. New alleles of Notch draw a blueprint for multifunctionality. *Trends Genet* **18**(4): 168- 170.
- Aulehla, A. and Johnson, R.L. 1999. Dynamic expression of lunatic fringe suggests a link between notch signaling and an autonomous cellular oscillator driving somite segmentation. *Developmental biology* **207**(1): 49- 61.
- Aulehla, A., Wehrle, C., Brand- Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B., and Herrmann, B.G. 2003. Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Developmental cell* **4**(3): 395- 406.
- Aulehla, A., Wiegraebe, W., Baubet, V., Wahl, M.B., Deng, C., Taketo, M., Lewandoski, M., and Pourquie, O. 2008. A beta- catenin gradient links the clock and wavefront systems in mouse embryo segmentation. *Nature cell biology* **10**(2): 186- 193.
- Axelrod, J.D., Matsuno, K., Artavanis- Tsakonas, S., and Perrimon, N. 1996. Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. *Science (New York, NY)* **271**(5257): 1826- 1832.
- Barolo, S., Walker, R.G., Polyanovsky, A.D., Freschi, G., Keil, T., and Posakony, J.W. 2000. A notch- independent activity of suppressor of hairless is required for normal mechanoreceptor physiology. *Cell* **103**(6): 957- 969.
- Barrantes, I.B., Elia, A.J., Wunsch, K., Hrabe de Angelis, M.H., Mak, T.W., Rossant, J., Conlon, R.A., Gossler, A., and de la Pompa, J.L. 1999. Interaction between Notch signalling and Lunatic fringe during somite boundary formation in the mouse. *Curr Biol* **9**(9): 470- 480.
- Beckers, J., Caron, A., Hrabe de Angelis, M., Hans, S., Campos- Ortega, J.A., and Gossler, A. 2000. Distinct regulatory elements direct delta1 expression in the nervous system and paraxial mesoderm of transgenic mice. *Mechanisms of development* **95**(1- 2): 23- 34.
- Berechid, B.E., Kitzmann, M., Foltz, D.R., Roach, A.H., Seiffert, D., Thompson, L.A., Olson, R.E., Bernstein, A., Donoviel, D.B., and Nye, J.S. 2002. Identification and characterization of presenilin- independent Notch signaling. *The Journal of biological chemistry* **277**(10): 8154- 8165.
- Beres, T.M., Masui, T., Swift, G.H., Shi, L., Henke, R.M., and MacDonald, R.J. 2006. PTF1 is an organ- specific and Notch- independent basic helix- loop- helix complex

- containing the mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or its paralogue, RBP- L. *Molecular and cellular biology* **26**(1): 117- 130.
- Bessho, Y., Hirata, H., Masamizu, Y., and Kageyama, R. 2003. Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. *Genes & development* **17**(12): 1451- 1456.
- Bessho, Y. and Kageyama, R. 2003. Oscillations, clocks and segmentation. *Current opinion in genetics & development* **13**(4): 379- 384.
- Bessho, Y., Miyoshi, G., Sakata, R., and Kageyama, R. 2001a. Hes7: a bHLH- type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes Cells* **6**(2): 175- 185.
- Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S., and Kageyama, R. 2001b. Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes & development* **15**(20): 2642- 2647.
- Botcher, R.T. and Niehrs, C. 2005. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine reviews* **26**(1): 63- 77.
- Brand- Saberi, B., Wilting, J., Ebensperger, C., and Christ, B. 1996. The formation of somite compartments in the avian embryo. *The International journal of developmental biology* **40**(1): 411- 420.
- Bray, S.J. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(9): 678- 689.
- Brennan, K. and Gardner, P. 2002. Notching up another pathway. *Bioessays* **24**(5): 405- 410.
- Brent, A.E., Schweitzer, R., and Tabin, C.J. 2003. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* **113**(2): 235- 248.
- Burgess, R., Rawls, A., Brown, D., Bradley, A., and Olson, E.N. 1996. Requirement of the paraxis gene for somite formation and musculoskeletal patterning. *Nature* **384**(6609): 570- 573.
- Bush, J.O., Lan, Y., Maltby, K.M., and Jiang, R. 2002. Isolation and developmental expression analysis of Tbx22, the mouse homolog of the human X- linked cleft palate gene. *Dev Dyn* **225**(3): 322- 326.
- Bussen, M., Petry, M., Schuster- Gossler, K., Leitges, M., Gossler, A., and Kispert, A. 2004. The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes & development* **18**(10): 1209- 1221.

- Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., and Bejsovec, A. 1998. *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**(6702): 604- 608.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S., and Courey, A.J. 1999. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes & development* **13**(17): 2218- 2230.
- Christ, B., Huang, R., and Wilting, J. 2000. The development of the avian vertebral column. *Anatomy and embryology* **202**(3): 179- 194.
- Christ, B., Jacob, H.J., and Jacob, M. 1974. [Somitogenesis in the chick embryo. Determination of the segmentation direction]. *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft* **68**: 573- 579.
- Christ, B. and Ordahl, C.P. 1995. Early stages of chick somite development. *Anatomy and embryology* **191**(5): 381- 396.
- Clements, D., Taylor, H.C., Herrmann, B.G., and Stott, D. 1996. Distinct regulatory control of the Brachyury gene in axial and non- axial mesoderm suggests separation of mesoderm lineages early in mouse gastrulation. *Mechanisms of development* **56**(1- 2): 139- 149.
- Clevers, H. 2006. Wnt/beta- catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**(3): 469- 480.
- Cohen, B., Bashirullah, A., Dagnino, L., Campbell, C., Fisher, W.W., Leow, C.C., Whiting, E., Ryan, D., Zinyk, D., Boulianne, G., Hui, C.C., Gallie, B., Phillips, R.A., Lipshitz, H.D., and Egan, S.E. 1997. Fringe boundaries coincide with Notch- dependent patterning centres in mammals and alter Notch- dependent development in *Drosophila*. *Nature genetics* **16**(3): 283- 288.
- Cole, S.E., Levorse, J.M., Tilghman, S.M., and Vogt, T.F. 2002. Clock regulatory elements control cyclic expression of Lunatic fringe during somitogenesis. *Developmental cell* **3**(1): 75- 84.
- Conlon, R.A., Reaume, A.G., and Rossant, J. 1995. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development (Cambridge, England)* **121**(5): 1533- 1545.
- Cooke, J. 1975. Control of somite number during morphogenesis of a vertebrate, *Xenopus laevis*. *Nature* **254**(5497): 196- 199.
- Cunnick, J.M., Mei, L., Doupnik, C.A., and Wu, J. 2001. Phosphotyrosines 627 and 659 of Gab1 constitute a bisphosphoryl tyrosine- based activation motif (BTAM) conferring

- binding and activation of Shp2. *The Journal of biological chemistry* **276**(26): 24380-24387.
- Dale, J.K., Malapert, P., Chal, J., Vilhais- Neto, G., Maroto, M., Johnson, T., Jayasinghe, S., Trainor, P., Herrmann, B., and Pourquie, O. 2006. Oscillations of the snail genes in the presomitic mesoderm coordinate segmental patterning and morphogenesis in vertebrate somitogenesis. *Developmental cell* **10**(3): 355- 366.
- Dale, J.K., Maroto, M., Dequeant, M.L., Malapert, P., McGrew, M., and Pourquie, O. 2003. Periodic notch inhibition by lunatic fringe underlies the chick segmentation clock. *Nature* **421**(6920): 275- 278.
- De Strooper, B. and Annaert, W. 2001. Where Notch and Wnt signaling meet. The presenilin hub. *The Journal of cell biology* **152**(4): F17- 20.
- Delfini, M.C., Dubrulle, J., Malapert, P., Chal, J., and Pourquie, O. 2005. Control of the segmentation process by graded MAPK/ERK activation in the chick embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(32): 11343- 11348.
- Dequeant, M.L., Glynn, E., Gaudenz, K., Wahl, M., Chen, J., Mushegian, A., and Pourquie, O. 2006. A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. *Science (New York, NY)* **314**(5805): 1595- 1598.
- Dubrulle, J., McGrew, M.J., and Pourquie, O. 2001. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* **106**(2): 219- 232.
- Dubrulle, J. and Pourquie, O. 2003. Welcome to syndetome: a new somitic compartment. *Developmental cell* **4**(5): 611- 612.
- . 2004. fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature* **427**(6973): 419- 422.
- Durbin, L., Sordino, P., Barrios, A., Gering, M., Thisse, C., Thisse, B., Brennan, C., Green, A., Wilson, S., and Holder, N. 2000. Anteroposterior patterning is required within segments for somite boundary formation in developing zebrafish. *Development (Cambridge, England)* **127**(8): 1703- 1713.
- Eblaghie, M.C., Lunn, J.S., Dickinson, R.J., Munsterberg, A.E., Sanz- Ezquerro, J.J., Farrell, E.R., Mathers, J., Keyse, S.M., Storey, K., and Tickle, C. 2003. Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. *Curr Biol* **13**(12): 1009- 1018.

- Evrard, Y.A., Lun, Y., Aulehla, A., Gan, L., and Johnson, R.L. 1998. Lunatic fringe is an essential mediator of somite segmentation and patterning. *Nature* **394**(6691): 377-381.
- Fan, C.M., Lee, C.S., and Tessier-Lavigne, M. 1997. A role for Wnt proteins in induction of dermomyotome. *Developmental biology* **191**(1): 160-165.
- Farin, H.F., Bussen, M., Schmidt, M.K., Singh, M.K., Schuster-Gossler, K., and Kispert, A. 2007. Transcriptional repression by the T-box proteins Tbx18 and Tbx15 depends on Groucho corepressors. *The Journal of biological chemistry* **282**(35): 25748-25759.
- Flint, O.P., Ede, D.A., Wilby, O.K., and Proctor, J. 1978. Control of somite number in normal and amputated mutant mouse embryos: an experimental and a theoretical analysis. *Journal of embryology and experimental morphology* **45**: 189-202.
- Forsberg, H., Crozet, F., and Brown, N.A. 1998. Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four-hour cycles at two-hour intervals, precede somite boundary formation. *Curr Biol* **8**(18): 1027-1030.
- Friedrich, G. and Soriano, P. 1991. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes & development* **5**(9): 1513-1523.
- Geffers, I., Serth, K., Chapman, G., Jaekel, R., Schuster-Gossler, K., Cordes, R., Sparrow, D.B., Kremmer, E., Dunwoodie, S.L., Klein, T., and Gossler, A. 2007. Divergent functions and distinct localization of the Notch ligands DLL1 and DLL3 in vivo. *The Journal of cell biology* **178**(3): 465-476.
- Gilbert, S.F. 2006. *Developmental Biology*. **5th edition**.
- Gossler, A. 2002. Somitogenesis: Segmentation of the Paraxial Mesoderm and the delineation of Tissue Compartments in Mouse Development.
- Gossler, A.Z., J. 1993. Gene Targeting: A Practical Approach. *Oxford Univ Press, New York*: 181-227.
- Greenwald, I. 1998. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes & development* **12**(12): 1751-1762.
- Gridley, T. 1997. Notch signaling in vertebrate development and disease. *Molecular and cellular neurosciences* **9**(2): 103-108.
- Griffith, C.M., Wiley, M.J., and Sanders, E.J. 1992. The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue. *Anatomy and embryology* **185**(2): 101-113.
- Haines, N. and Irvine, K.D. 2003. Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(10): 786-797.

- Hartenstein, A.Y., Rugendorff, A., Tepass, U., and Hartenstein, V. 1992. The function of the neurogenic genes during epithelial development in the *Drosophila* embryo. *Development (Cambridge, England)* **116**(4): 1203- 1220.
- Hartmann, C. 2006. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends in cell biology* **16**(3): 151- 158.
- Henry, C.A., Urban, M.K., Dill, K.K., Merlie, J.P., Page, M.F., Kimmel, C.B., and Amacher, S.L. 2002. Two linked hairy/Enhancer of split-related zebrafish genes, *her1* and *her7*, function together to refine alternating somite boundaries. *Development (Cambridge, England)* **129**(15): 3693- 3704.
- Hicks, C., Johnston, S.H., diSibio, G., Collazo, A., Vogt, T.F., and Weinmaster, G. 2000. Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nature cell biology* **2**(8): 515- 520.
- Hirata, H., Bessho, Y., Kokubu, H., Masamizu, Y., Yamada, S., Lewis, J., and Kageyama, R. 2004. Instability of Hes7 protein is crucial for the somite segmentation clock. *Nature genetics* **36**(7): 750- 754.
- Hirata, H., Yoshiura, S., Ohtsuka, T., Bessho, Y., Harada, T., Yoshikawa, K., and Kageyama, R. 2002. Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. *Science (New York, NY)* **298**(5594): 840- 843.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., and Lacy, E. 1994. *Manipulating the mouse embryo - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Holley, S.A., Julich, D., Rauch, G.J., Geisler, R., and Nusslein- Volhard, C. 2002. *her1* and the notch pathway function within the oscillator mechanism that regulates zebrafish somitogenesis. *Development (Cambridge, England)* **129**(5): 1175- 1183.
- Hori, K., Cholewa- Waclaw, J., Nakada, Y., Glasgow, S.M., Masui, T., Henke, R.M., Wildner, H., Martarelli, B., Beres, T.M., Epstein, J.A., Magnuson, M.A., Macdonald, R.J., Birchmeier, C., and Johnson, J.E. 2008. A nonclassical bHLH Rbpj transcription factor complex is required for specification of GABAergic neurons independent of Notch signaling. *Genes & development* **22**(2): 166- 178.
- Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T.J., Go, M.J., Okano, H., Baron, M., and Matsuno, K. 2004. *Drosophila* *deltex* mediates suppressor of Hairless- independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development (Cambridge, England)* **131**(22): 5527- 5537.

- Horikawa, K., Ishimatsu, K., Yoshimoto, E., Kondo, S., and Takeda, H. 2006. Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature* **441**(7094): 719- 723.
- Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowicz, D., Habu, S., and Owen, M.J. 2004. Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol* **5**(6): 638-644.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd, and Gossler, A. 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* **386**(6626): 717- 721.
- Huang, R., Zhi, Q., Neubuser, A., Muller, T.S., Brand-Saberi, B., Christ, B., and Wilting, J. 1996. Function of somite and somitocoel cells in the formation of the vertebral motion segment in avian embryos. *Acta anatomica* **155**(4): 231- 241.
- Huang, R., Zhi, Q., Wilting, J., and Christ, B. 1994. The fate of somitocoel cells in avian embryos. *Anatomy and embryology* **190**(3): 243- 250.
- Huppert, S.S., Ilagan, M.X., De Strooper, B., and Kopan, R. 2005. Analysis of Notch function in presomitic mesoderm suggests a gamma-secretase-independent role for presenilins in somite differentiation. *Developmental cell* **8**(5): 677- 688.
- Ishikawa, A., Kitajima, S., Takahashi, Y., Kokubo, H., Kanno, J., Inoue, T., and Saga, Y. 2004. Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mechanisms of development* **121**(12): 1443-1453.
- Jennings, B., Preiss, A., Delidakis, C., and Bray, S. 1994. The Notch signalling pathway is required for Enhancer of split bHLH protein expression during neurogenesis in the Drosophila embryo. *Development (Cambridge, England)* **120**(12): 3537- 3548.
- Jiang, Y.J., Aerne, B.L., Smithers, L., Haddon, C., Ish-Horowicz, D., and Lewis, J. 2000. Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature* **408**(6811): 475- 479.
- Johnston, S.H., Rauskolb, C., Wilson, R., Prabhakaran, B., Irvine, K.D., and Vogt, T.F. 1997. A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway. *Development (Cambridge, England)* **124**(11): 2245- 2254.
- Jouve, C., Palmeirim, I., Henrique, D., Beckers, J., Gossler, A., Ish-Horowicz, D., and Pourquie, O. 2000. Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development (Cambridge, England)* **127**(7): 1421- 1429.

- Kageyama, R. and Nakanishi, S. 1997. Helix- loop- helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Current opinion in genetics & development* **7**(5): 659- 665.
- Kang, D.E., Soriano, S., Frosch, M.P., Collins, T., Naruse, S., Sisodia, S.S., Leibowitz, G., Levine, F., and Koo, E.H. 1999. Presenilin 1 facilitates the constitutive turnover of beta- catenin: differential activity of Alzheimer's disease- linked PS1 mutants in the beta- catenin- signaling pathway. *J Neurosci* **19**(11): 4229- 4237.
- Katoh, M. and Katoh, M. 2007. Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. *International journal of oncology* **31**(2): 461- 466.
- Keynes, R.J. and Stern, C.D. 1988. Mechanisms of vertebrate segmentation. *Development (Cambridge, England)* **103**(3): 413- 429.
- Kirschenbaum, F., Hsu, S.C., Cordell, B., and McCarthy, J.V. 2001. Substitution of a glycogen synthase kinase- 3beta phosphorylation site in presenilin 1 separates presenilin function from beta- catenin signaling. *The Journal of biological chemistry* **276**(10): 7366- 7375.
- Koelzer, S. and Klein, T. 2003. A Notch- independent function of Suppressor of Hairless during the development of the bristle sensory organ precursor cell of Drosophila. *Development (Cambridge, England)* **130**(9): 1973- 1988.
- Kopan, R., Nye, J.S., and Weintraub, H. 1994. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix- loop- helix region of MyoD. *Development (Cambridge, England)* **120**(9): 2385- 2396.
- Kraman, M. and McCright, B. 2005. Functional conservation of Notch1 and Notch2 intracellular domains. *Faseb J* **19**(10): 1311- 1313.
- Kraus, F., Haenig, B., and Kispert, A. 2001. Cloning and expression analysis of the mouse T- box gene Tbx18. *Mechanisms of development* **100**(1): 83- 86.
- Kusumi, K., Sun, E.S., Kerrebrock, A.W., Bronson, R.T., Chi, D.C., Bulotsky, M.S., Spencer, J.B., Birren, B.W., Frankel, W.N., and Lander, E.S. 1998. The mouse pudgy mutation disrupts Delta homologue Dll3 and initiation of early somite boundaries. *Nature genetics* **19**(3): 274- 278.
- Ladi, E., Nichols, J.T., Ge, W., Miyamoto, A., Yao, C., Yang, L.T., Boulter, J., Sun, Y.E., Kintner, C., and Weinmaster, G. 2005. The divergent DSL ligand Dll3 does not

- activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *The Journal of cell biology* **170**(6): 983- 992.
- Leimeister, C., Dale, K., Fischer, A., Klamt, B., Hrabe de Angelis, M., Radtke, F., McGrew, M.J., Pourquie, O., and Gessler, M. 2000. Oscillating expression of c- Hey2 in the presomitic mesoderm suggests that the segmentation clock may use combinatorial signaling through multiple interacting bHLH factors. *Developmental biology* **227**(1): 91- 103.
- Leitges, M., Neidhardt, L., Haenig, B., Herrmann, B.G., and Kispert, A. 2000. The paired homeobox gene *Uncx4.1* specifies pedicles, transverse processes and proximal ribs of the vertebral column. *Development (Cambridge, England)* **127**(11): 2259- 2267.
- Li, H.Y., Bourdelas, A., Carron, C., Gomez, C., Boucaut, J.C., and Shi, D.L. 2006. FGF8, Wnt8 and *Myf5* are target genes of Tbx6 during anteroposterior specification in *Xenopus* embryo. *Developmental biology* **290**(2): 470- 481.
- Li, Y., Lei, L., Irvine, K.D., and Baker, N.E. 2003. Notch activity in neural cells triggered by a mutant allele with altered glycosylation. *Development (Cambridge, England)* **130**(13): 2829- 2840.
- Liao, W.R., Hsieh, R.H., Hsu, K.W., Wu, M.Z., Tseng, M.J., Mai, R.T., Wu Lee, Y.H., and Yeh, T.S. 2007. The CBF1- independent Notch1 signal pathway activates human c- myc expression partially via transcription factor YY1. *Carcinogenesis* **28**(9): 1867- 1876.
- Logan, C.Y. and Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* **20**: 781- 810.
- Lu, L. and Stanley, P. 2006. Roles of O- fucose glycans in notch signaling revealed by mutant mice. *Methods in enzymology* **417**: 127- 136.
- Mansouri, A., Voss, A.K., Thomas, T., Yokota, Y., and Gruss, P. 2000. *Uncx4.1* is required for the formation of the pedicles and proximal ribs and acts upstream of Pax9. *Development (Cambridge, England)* **127**(11): 2251- 2258.
- Mansouri, A., Yokota, Y., Wehr, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Gruss, P. 1997. Paired- related murine homeobox gene expressed in the developing sclerotome, kidney, and nervous system. *Dev Dyn* **210**(1): 53- 65.
- Maroto, M. and Pourquie, O. 2001. A molecular clock involved in somite segmentation. *Current topics in developmental biology* **51**: 221- 248.

- Maruhashi, M., Van De Putte, T., Huylebroeck, D., Kondoh, H., and Higashi, Y. 2005. Involvement of SIP1 in positioning of somite boundaries in the mouse embryo. *Dev Dyn* **234**(2): 332- 338.
- Masamizu, Y., Ohtsuka, T., Takashima, Y., Nagahara, H., Takenaka, Y., Yoshikawa, K., Okamura, H., and Kageyama, R. 2006. Real- time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(5): 1313- 1318.
- Matsuno, K., Go, M.J., Sun, X., Eastman, D.S., and Artavanis- Tsakonas, S. 1997. Suppressor of Hairless- independent events in Notch signaling imply novel pathway elements. *Development (Cambridge, England)* **124**(21): 4265- 4273.
- McGrew, M.J., Dale, J.K., Fraboulet, S., and Pourquie, O. 1998. The lunatic fringe gene is a target of the molecular clock linked to somite segmentation in avian embryos. *Curr Biol* **8**(17): 979- 982.
- McMahon, A.P. and Moon, R.T. 1989. Ectopic expression of the proto- oncogene inT-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* **58**(6): 1075- 1084.
- Meier, S. 1979. Development of the chick embryo mesoblast. Formation of the embryonic axis and establishment of the metameric pattern. *Developmental biology* **73**(1): 24- 45.
- Meier, S.P. 1982. The development of segmentation in the cranial region of vertebrate embryos. *Scanning electron microscopy*(Pt 3): 1269- 1282.
- Meinhardt, H. 1986. Hierarchical inductions of cell states: a model for segmentation in *Drosophila*. *Journal of cell science* **4**: 357- 381.
- Mittapalli, V.R., Huang, R., Patel, K., Christ, B., and Scaal, M. 2005. Arthrotome: a specific joint forming compartment in the avian somite. *Dev Dyn* **234**(1): 48- 53.
- Mizutani, T., Taniguchi, Y., Aoki, T., Hashimoto, N., and Honjo, T. 2001. Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(16): 9026- 9031.
- Mohr, O.L. 1919. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics* **4**(3): 275- 282.
- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A. 2004. Wnt and beta- catenin signalling: diseases and therapies. *Nature reviews* **5**(9): 691- 701.
- Moon, R.T. and Miller, J.R. 1997. The APC tumor suppressor protein in development and cancer. *Trends Genet* **13**(7): 256- 258.

- Morales, A.V., Yasuda, Y., and Ish-Horowicz, D. 2002. Periodic Lunatic fringe expression is controlled during segmentation by a cyclic transcriptional enhancer responsive to notch signaling. *Developmental cell* **3**(1): 63- 74.
- Moreno, T.A. and Kintner, C. 2004. Regulation of segmental patterning by retinoic acid signaling during *Xenopus* somitogenesis. *Developmental cell* **6**(2): 205- 218.
- Morimoto, M., Takahashi, Y., Endo, M., and Saga, Y. 2005. The Mesp2 transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity. *Nature* **435**(7040): 354- 359.
- Murtaugh, L.C., Stanger, B.Z., Kwan, K.M., and Melton, D.A. 2003. Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 14920- 14925.
- Naiche, L.A., Harrelson, Z., Kelly, R.G., and Papaioannou, V.E. 2005. T-box genes in vertebrate development. *Annual review of genetics* **39**: 219- 239.
- Neidhardt, L., Kispert, A., and Hermann, B.G. 1997. A mouse gene of the paired- related homeobox class expressed in the caudal somite compartment and in the developing vertebral column, kidney and nervous system. *Dev Genes Evol* **207**: 330- 339.
- Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J.A., Mill, P., van Noort, M., Hui, C.C., Clevers, H., Dotto, G.P., and Radtke, F. 2003. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* **33**(3): 416- 421.
- Nishimura, M., Isaka, F., Ishibashi, M., Tomita, K., Tsuda, H., Nakanishi, S., and Kageyama, R. 1998. Structure, chromosomal locus, and promoter of mouse Hes2 gene, a homologue of *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genomics* **49**(1): 69- 75.
- Niwa, Y., Masamizu, Y., Liu, T., Nakayama, R., Deng, C.X., and Kageyama, R. 2007. The initiation and propagation of Hes7 oscillation are cooperatively regulated by Fgf and notch signaling in the somite segmentation clock. *Developmental cell* **13**(2): 298- 304.
- Nomura-Kitabayashi, A., Takahashi, Y., Kitajima, S., Inoue, T., Takeda, H., and Saga, Y. 2002. Hypomorphic Mesp allele distinguishes establishment of rostrocaudal polarity and segment border formation in somitogenesis. *Development (Cambridge, England)* **129**(10): 2473- 2481.
- Oates, A.C. and Ho, R.K. 2002. Hairy/E(spl)- related (Her) genes are central components of the segmentation oscillator and display redundancy with the Delta/Notch signaling pathway in the formation of anterior segmental boundaries in the zebrafish. *Development (Cambridge, England)* **129**(12): 2929- 2946.

- Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T.W., and Honjo, T. 1995. Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development (Cambridge, England)* **121**(10): 3291- 3301.
- Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., and Goldfarb, M. 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *The Journal of biological chemistry* **271**(25): 15292- 15297.
- Ozбудak, E.M. and Pourquie, O. 2008. The vertebrate segmentation clock: the tip of the iceberg. *Current opinion in genetics & development*.
- Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquie, O. 1997. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* **91**(5): 639- 648.
- Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K.D. 1997. Fringe modulates Notch- ligand interactions. *Nature* **387**(6636): 908- 912.
- Perantoni, A.O., Timofeeva, O., Naillat, F., Richman, C., Pajni- Underwood, S., Wilson, C., Vainio, S., Dove, L.F., and Lewandoski, M. 2005. Inactivation of FGF8 in early mesoderm reveals an essential role in kidney development. *Development (Cambridge, England)* **132**(17): 3859- 3871.
- Poulson, D.F. 1937. Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **23**(3): 133- 137.
- Pourquie, O. and Tam, P.P. 2001. A nomenclature for prospective somites and phases of cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Developmental cell* **1**(5): 619- 620.
- Price, M.A. 2006. CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes & development* **20**(4): 399- 410.
- Radtke, F. and Clevers, H. 2005. Self- renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science (New York, NY)* **307**(5717): 1904- 1909.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**(5): 547- 558.
- Rawadi, G. and Roman- Roman, S. 2005. Wnt signalling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis. *Expert opinion on therapeutic targets* **9**(5): 1063- 1077.

- Remak, R. 1850. Untersuchungen über die Entwicklung der Wirbeltiere. Erste Lieferung über die Entwicklung des Hühnchens im Ei. *Reimer*(Berlin).
- Reya, T. and Clevers, H. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**(7035): 843- 850.
- Rickmann, M., Fawcett, J.W., and Keynes, R.J. 1985. The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *Journal of embryology and experimental morphology* **90**: 437- 455.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S.H., Masiarz, F.R., Munemitsu, S., and Polakis, P. 1993. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science (New York, NY)* **262**(5140): 1731- 1734.
- Rucker, E.B., 3rd, Dierisseau, P., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw- Boris, A., Flaws, J.A., and Hennighausen, L. 2000. Bcl- x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **14**(7): 1038- 1052.
- Saga, Y. 2007. Segmental border is defined by the key transcription factor Mesp2, by means of the suppression of Notch activity. *Dev Dyn* **236**(6): 1450- 1455.
- Saga, Y., Hata, N., Koseki, H., and Taketo, M.M. 1997. Mesp2: a novel mouse gene expressed in the presegmented mesoderm and essential for segmentation initiation. *Genes & development* **11**(14): 1827- 1839.
- Saga, Y. and Takeda, H. 2001. The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. *Nature reviews* **2**(11): 835- 845.
- Sato, Y., Yasuda, K., and Takahashi, Y. 2002. Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic fringe and Notch during somitic segmentation. *Development (Cambridge, England)* **129**(15): 3633- 3644.
- Serth, K., Schuster- Gossler, K., Cordes, R., and Gossler, A. 2003. Transcriptional oscillation of lunatic fringe is essential for somitogenesis. *Genes & development* **17**(7): 912- 925.
- Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J.J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D., and Weinmaster, G. 1996. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1- independent pathway. *Development (Cambridge, England)* **122**(12): 3765- 3773.
- Shi, S., Ge, C., Luo, Y., Hou, X., Haltiwanger, R.S., and Stanley, P. 2007. The threonine that carries fucose, but not fucose, is required for Cripto to facilitate Nodal signaling. *The Journal of biological chemistry* **282**(28): 20133- 20141.

- Shi, S. and Stanley, P. 2003. Protein O- fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5234- 5239.
- Shimizu, K., Chiba, S., Kumano, K., Hosoya, N., Takahashi, T., Kanda, Y., Hamada, Y., Yazaki, Y., and Hirai, H. 1999. Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. *The Journal of biological chemistry* **274**(46): 32961- 32969.
- Soriano, P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics* **21**(1): 70- 71.
- Sosic, D., Brand- Saberi, B., Schmidt, C., Christ, B., and Olson, E.N. 1997. Regulation of paraxis expression and somite formation by ectoderm- and neural tube- derived signals. *Developmental biology* **185**(2): 229- 243.
- Spranger, J. and Superti- Furga, A. 2007. Angeborene Entwicklungsstörungen des Skeletts. *Pädiatrie* **3. überarbeitete Auflage**.
- Steidl, C., Leimeister, C., Klamt, B., Maier, M., Nanda, I., Dixon, M., Clarke, R., Schmid, M., and Gessler, M. 2000. Characterization of the human and mouse HEY1, HEY2, and HEYL genes: cloning, mapping, and mutation screening of a new bHLH gene family. *Genomics* **66**(2): 195- 203.
- Stern, C.D., Fraser, S.E., Keynes, R.J., and Primmitt, D.R. 1988. A cell lineage analysis of segmentation in the chick embryo. *Development (Cambridge, England)* **104 Suppl**: 231- 244.
- Stern, C.D. and Keynes, R.J. 1987. Interactions between somite cells: the formation and maintenance of segment boundaries in the chick embryo. *Development (Cambridge, England)* **99**(2): 261- 272.
- Su, L.K., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. 1993. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science (New York, NY)* **262**(5140): 1734- 1737.
- Suriben, R., Fisher, D.A., and Cheyette, B.N. 2006. Dact1 presomitic mesoderm expression oscillates in phase with Axin2 in the somitogenesis clock of mice. *Dev Dyn* **235**(11): 3177- 3183.
- Takada, S., Stark, K.L., Shea, M.J., Vassileva, G., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. 1994. Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes & development* **8**(2): 174- 189.
- Takahashi, Y., Inoue, T., Gossler, A., and Saga, Y. 2003. Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and Mesp2, and differential involvement of Psen1 are essential for rostrocaudal patterning of somites. *Development (Cambridge, England)* **130**(18): 4259- 4268.

- Takahashi, Y., Koizumi, K., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Koseki, H., and Saga, Y. 2000. Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway. *Nature genetics* **25**(4): 390- 396.
- Takahashi, Y., Takagi, A., Hiraoka, S., Koseki, H., Kanno, J., Rawls, A., and Saga, Y. 2007a. Transcription factors Mesp2 and Paraxis have critical roles in axial musculoskeletal formation. *Dev Dyn* **236**(6): 1484- 1494.
- Takahashi, Y., Yasuhiko, Y., Kitajima, S., Kanno, J., and Saga, Y. 2007b. Appropriate suppression of Notch signaling by Mesp factors is essential for stripe pattern formation leading to segment boundary formation. *Developmental biology* **304**(2): 593- 603.
- Tam, P.P. 1981. The control of somitogenesis in mouse embryos. *Journal of embryology and experimental morphology* **65 Suppl**: 103- 128.
- . 1986. A study of the pattern of prospective somites in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *Journal of embryology and experimental morphology* **92**: 269- 285.
- Tam, P.P. and Beddington, R.S. 1987. The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis. *Development (Cambridge, England)* **99**(1): 109- 126.
- Tam, P.P., Goldman, D., Camus, A., and Schoenwolf, G.C. 2000. Early events of somitogenesis in higher vertebrates: allocation of precursor cells during gastrulation and the organization of a meristic pattern in the paraxial mesoderm. *Current topics in developmental biology* **47**: 1- 32.
- Tax, F.E., Yeagers, J.J., and Thomas, J.H. 1994. Sequence of *C. elegans* lag- 2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*. *Nature* **368**(6467): 150- 154.
- Teo, R., Mohrlen, F., Plickert, G., Muller, W.A., and Frank, U. 2006. An evolutionary conserved role of Wnt signaling in stem cell fate decision. *Developmental biology* **289**(1): 91- 99.
- Teppner, I., Becker, S., de Angelis, M.H., Gossler, A., and Beckers, J. 2007. Compartmentalised expression of Delta- like 1 in epithelial somites is required for the formation of intervertebral joints. *BMC developmental biology* **7**: 68.
- Torres, M.A. and Nelson, W.J. 2000. Colocalization and redistribution of dishevelled and actin during Wnt-induced mesenchymal morphogenesis. *The Journal of cell biology* **149**(7): 1433- 1442.

- van Amerongen, R. and Berns, A. 2006. Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends Genet* **22**(12): 678- 689.
- Vassin, H., Bremer, K.A., Knust, E., and Campos- Ortega, J.A. 1987. The neurogenic gene Delta of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurogenic territories and encodes a putative transmembrane protein with EGF- like repeats. *The EMBO journal* **6**(11): 3431- 3440.
- Vickers, T.H. 1983. The chronology of somites in rat embryos. *Teratology* **28**(3): 457- 460.
- von Ebner, V. 1988. Urwirbel und Neugliederung der Wirbelsäule. *Sitzungsber Akad Wiss Wien III* **97**: 194- 206.
- Wahl, M.B., Deng, C., Lewandoski, M., and Pourquie, O. 2007. FGF signaling acts upstream of the NOTCH and Wnt signaling pathways to control segmentation clock oscillations in mouse somitogenesis. *Development (Cambridge, England)* **134**(22): 4033- 4041.
- Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T., and Artavanis- Tsakonas, S. 1985. Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF- like repeats. *Cell* **43**(3 Pt 2): 567- 581.
- White, P.H., Farkas, D.R., and Chapman, D.L. 2005. Regulation of Tbx6 expression by Notch signaling. *Genesis* **42**(2): 61- 70.
- Wilting, J., Brand- Saberi, B., Huang, R., Zhi, Q., Kontges, G., Ordahl, C.P., and Christ, B. 1995. Angiogenic potential of the avian somite. *Dev Dyn* **202**(2): 165- 171.
- Wolpert, L. 1999. Entwicklungsbiologie. *Spektrum Verlag*.
- Wong, G.K., Bagnall, K.M., and Berdan, R.C. 1993. The immediate fate of cells in the epithelial somite of the chick embryo. *Anatomy and embryology* **188**(5): 441- 447.
- Wong, P.C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M.W., Sirinathsinghji, D.J., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., Price, D.L., Van der Ploeg, L.H., and Sisodia, S.S. 1997. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* **387**(6630): 288- 292.
- Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C.E., Norton, C.R., Chang, B., Hicks, C., Gendron- Maguire, M., Rand, E.B., Weinmaster, G., and Gridley, T. 1999. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Human molecular genetics* **8**(5): 723- 730.
- Yang, L.T., Nichols, J.T., Yao, C., Manilay, J.O., Robey, E.A., and Weinmaster, G. 2005. Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1. *Molecular biology of the cell* **16**(2): 927- 942.

- Yasuhiko, Y., Haraguchi, S., Kitajima, S., Takahashi, Y., Kanno, J., and Saga, Y. 2006. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(10): 3651-3656.
- Zambrowicz, B.P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L.A., Kerr, W.G., and Soriano, P. 1997. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(8): 3789-3794.
- Zecca, M., Basler, K., and Struhl, G. 1996. Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**(5): 833-844.
- Zhang, L., Gao, X., Wen, J., Ning, Y., and Chen, Y.G. 2006. Dapper 1 antagonizes Wnt signaling by promoting dishevelled degradation. *The Journal of biological chemistry* **281**(13): 8607-8612.
- Zhang, N. and Gridley, T. 1998. Defects in somite formation in lunatic fringe-deficient mice. *Nature* **394**(6691): 374-377.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Gossler für das interessante Projekt und die unglaublich gute Betreuung während meiner Arbeit, sowie für zahlreiche Denkanstöße, die mich immer wieder ein Stück vorwärts gebracht haben. Ganz besonders möchte ich ihm aber dafür danken, dass er nie die Geduld mit mir verlor. Und noch mehr danken möchte ich ihm für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge und die super schnelle Korrektur dieser Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Müller für seine spontane Bereitschaft, das Zweitgutachten anzufertigen und für seine unglaublich freundliche und hilfsbereite Art, die es mir so leicht machte, ihn um diese Hilfe zu bitten.

Ich möchte mich auch bei Frau Dr. Karin Schuster- Gossler bedanken, die sich während meiner Arbeit als guter Freund erwiesen hat und mich mit so manchen Fragen und Anregungen immer wieder voran gebracht und zum Nachdenken angeregt hat. Auch möchte ich ihr und Herrn Anatoli Heiser für die Einarbeitung in, sowie die Hilfe bei der Mausearbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. André Schneider bedanken, ohne den dieses Projekt gar nicht entstanden wäre und der zusammen mit Dr. Karin Schuster- Gossler die in dieser Arbeit verwendeten Cre Mäuse etabliert hat.

Außerdem danke ich Martina Schmidt und Tanja Matkovic für ihre Hilfe bei der Skelettanalyse und zahlreiche Diskussionen über die Regulationen von Tbx18 und Uncx4.1.

Ich danke allen Mitarbeitern des IfM für die gute Zusammenarbeit und Michaela Mai, Gundula Streubel, Susann Zirzow und Britta Marohn für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Weiterhin danke ich Mark- Olliver Trowe und Anja Beckers für Ihre Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit. Auch danke ich Aravind Sekhar und Michaela Mai, die mir während der Zeit des Zusammenschreibens zahlreiche Veröffentlichungen zusendeten.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Familie, die mich immer unterstützt und stets an mich geglaubt haben. Des Weiteren danke ich meinem Mann für seine Hilfe bei den Formatierungen.

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

.....

(Ort, Datum)

.....

(Unterschrift)

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Juliane Hochschild, neé Feller
Straße	Roncallihof 10
Wohnort	30459 Hannover
E- Mail	Juliane.Hochschild@gmx.de
Geburtsdatum	03.06.1980
Geburtsort	Jena
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Studium

2004- 2008	Doktorarbeit, Medizinische Hochschule Hannover, IfM, Arbeitsgruppe Prof. Gossler
2003 - 2004	Diplomarbeit, Dept. of Animal Biology, University of Pennsylvania, USA, Prof. Luca
2001 - 2003	Hauptstudium Biochemie, FS- Universität Jena
1999 - 2001	Grundstudium Biochemie, Universität Hannover

Schulbildung

1987 - 1991	POS Erich Weinert, Jena
1991 - 1999	Gymnasium am Anger, Jena

Veröffentlichungen:

Feller, J., Schneider, A., Schuster- Gossler, K., and Gossler, A. 2008. Non- cyclic Notch activity in the presomitic mesoderm demonstrates uncoupling of somite compartmentalization and boundary formation *Genes & development*¹ in Druck

¹ Diese Publikation enthält Daten dieser Dissertation.

