

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen

Abteilung: Zelluläre Neurobiologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-J. Wagner

**Funktionelle Analyse von Pax7 im dorsalen Mittelhirn des
Hühnerembryos und dessen Auswirkungen auf die
Zellzyklusgene der G1/S- Phase**

**Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kira Li Sophie Wolff

aus

Tübingen

2014

Dekan:
1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Professor Dr. I. B. Autenrieth
Professor Dr. H.-J. Wagner
Professor Dr. R. Feil

In Liebe meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Entwicklung des zentralen Nervensystems	1
1.1.1. Allgemein	1
1.1.2. Musterbildung und Regionalisierung im sich entwickelnden ZNS	3
1.1.3. Dorsoventrale Musterbildung im Mesencephalon	6
1.2. Die Pax-Gene: Eine Familie von Transkriptionsfaktoren	7
1.2.1. Allgemein	7
1.2.2. Pax3 und Pax7 und deren Rolle in der Entwicklung von Organstrukturen	9
1.3. Die Funktion des Zellzyklus in der Entwicklung des ZNS	11
1.3.1 Allgemein	11
1.3.2. Die Protagonisten der G1/S-Phase	13
1.3.2.1 Zykline.....	13
1.3.2.2. CDKIs	14
1.3.2.3 Transkriptionsfaktoren.....	14
1.4 Fragestellung	16
2. Material und Geräte	17
2.1. Tierisches Verbrauchsmaterial	17
2.2. Chemikalien und Lösungen:	17
2.2.1. Elektroporation und Arbeiten am Hühnerembryo	17
2.2.2. Arbeiten mit RNA	18
2.2.3. Arbeiten mit DNA	19
2.3. Geräte und Zubehör	20
2.3.1. Arbeiten am Hühnerembryo	20
2.3.2. Arbeiten mit RNA und DNA	20
2.4. Plasmide und Expressionsvektoren	20
2.5 . Primerdesign und Primerliste	22
2.6. Programme, Software, Webseiten	22
3. Methoden	23
3.1. Allgemein	23
3.2. Manipulationen am Hühnerembryo	23
3.2.1 Inkubation und Präparation	23
3.2.2 In-ovo Elektroporation	24
3.2.2.1. Allgemein	24
3.2.2.2 Versuchsbeschreibungen	25
3.2.3 Kontrolle der Elektroporation und Präparation der Embryonen	26

3.3. mRNA- Manipulation	27
3.3.1. mRNA-Isolierung.....	27
3.3.2. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration	27
3.3.3. cDNA-Synthese.....	28
3.4. cDNA- Analyse	29
3.4.1. PCR	29
3.4.1.1. Allgemein	29
3.4.1.2. Versuchsaufbau und Standardprotokolle.....	29
3.4.1.2.1. Bestandteile einer PCR	29
3.4.1.2.2. Versuchsablauf.....	30
3.4.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	31
3.4.3. Quantitative PCR aus cDNA.....	32
3.4.3.1. Allgemein	32
3.4.3.2. Versuchsaufbau	33
3.4.3.2.1. Bestandteile.....	33
3.4.3.2.2. Versuchsablauf.....	33
3.5. Datenanalyse, Bildbearbeitung und Statistik	34
3.5.1. Arbeiten am Hühnerembryo.....	34
3.5.2. Arbeiten mit RNA	34
3.5.3. Arbeiten mit cDNA	34
3.5.3.1. Auswertung der Gel- Elektrophorese	34
3.5.3.2. Auswertung der qRT-PCR.....	34
3.5.3.2.1. Statistische Auswertung.....	35
3.5.3.2.1.1. Die komparative C _T - Methode ($\Delta\Delta C_T$ - Methode).....	35
3.5.3.2.1.2. Schmelzkurvenanalyse	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Elektroporation	37
4.2. Gewinnung der mRNA	38
4.2.1 Präparationen für die qualitative PCR- Analyse	38
4.2.2. Präparationen für die qRT-PCR- Analysen.....	39
4.3. PCR	40
4.3.1 Allgemein und Übersicht	40
4.3.2. Qualitative PCR- Ergebnisse der einzelnen Elektroporationen	42
4.3.3 Pax7- Spleißvarianten im dorsalen Mesencephalon.....	46
4.4. qRT-PCR	48
4.4.1 Schmelzkurvenanalyse	48
4.4.2. Erste qRT-PCR-Analyse und Berechnung nach der komparativen C _T - Methode August 2010 (03.08.2010)	51
4.4.2.1. EGFP	51

4.4.2.2.Pax-Gene (Pax7 und Pax3).....	52
4.4.2.2.1 Pax7.....	52
4.4.2.2.2 Pax3.....	53
4.4.2.3.Zellzyklusgene.....	54
4.4.2.3.1 Cyclin D1.....	54
4.4.2.3.2. Cyclin D2.....	55
4.4.2.3.3. p27 ^{kip}	56
4.4.3. Zweite qRT-PCR- Analyse und Berechnung nach der komparativen C _T - Methode Februar 2011 (21.02.2011).....	57
4.4.3.1 EGFP.....	57
4.4.3.2. Pax-Gene.....	58
4.4.3.2.1 Pax7.....	58
4.4.3.2.2. Pax3.....	59
4.4.3.2 Zellzyklusgene.....	60
4.4.3.2.1. Cyclin D1.....	60
4.4.3.2.2. Cyclin D2.....	61
4.4.3.2.3. p27 ^{kip}	62
4.5. Zusammenfassung.....	63
4.5.1. Ergebnisse der qualitativen und semi- quantitativen PCR- Analyse.....	63
4.5.2. Ergebnisse der qRT-PCR- Analysen aus dem dorsalen Mittelhirn.....	64
5. Diskussion.....	66
5.1. Überlegenheit der qRT-PCR-Analyse vor der PCR- Analyse.....	66
5.2 Konzentrationsunterschiede von Pax7 und Pax3 zeigen keinen eindeutigen Einfluss auf Zellzyklusgene und Transkriptionsfaktoren im ventralen Mesencephalon des Hühnerembryos.....	67
5.3. Konzentrationsunterschiede von Pax7 haben einen Einfluss auf Pax3 als auch auf Pax7 selbst im dorsalen Mittelhirn des Hühnerembryos	68
5.3.1 Konzentrationsabhängige Redundanz von Pax7 und Pax3 im dorsalen Mittelhirn.....	68
5.3.2. Negative Autoregulation von Pax7	71
5.3.3. Die Spleißvariante und deren Auswirkung auf das dorsale Mittelhirn	74
5.4. Konzentrationsunterschiede von Pax7 und Pax3 haben einen Einfluss auf Zellzyklusgene und bestimmte Transkriptionsfaktoren im dorsalen Mesencephalon des Hühnerembryos.....	75
5.4.1. Die Zykline der G1/S- Phase.....	75
5.4.1.1.Cyclin D1.....	75
5.4.1.2.Cyclin D2.....	77
5.4.1.3. Cyclin E.....	78
5.4.2. Die Transkriptionsfaktoren E2f1 und p53.....	78
5.4.3 Der CDK- Inhibitor p27 ^{kip}	79

5.5. Fazit.....	81
6. Zusammenfassung	82
7. Literaturverzeichnis	83
8. Anhang.....	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der einzelnen Schritte der Neurulation.....	2
Abbildung 2: Primär- und Sekundärbläschenstadium während der Entwicklung des ZNS.....	3
Abbildung 3: Anterior-posteriore Begrenzung des Mittelhirns.	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung der dorsoventralen Musterbildung im Rückenmark.....	5
Abbildung 5: Dorsoventrale Einteilung des Mittelhirns im Querschnitt	7
Abbildung 6: Domänenstruktur der Pax- Gene am Beispiel von Pax7.....	8
Abbildung 7: Übersicht der Zellzyklusphasen mit Fokus auf den G1/S-Übergang.....	12
Abbildung 8: Interaktionen der Cyclin D und E- Komplexe mit Rb und der E2f- Transkriptionsfaktoren am G1/S- Restriktionspunkt.....	13
Abbildung 9: Einteilung der Entwicklungsstadien eines Hühnerembryos anhand der Anzahl der Somiten nach Hamburger und Hamilton	24
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Elektroporation am Hühnerembryo.....	26
Abbildung 11: Darstellung des Cycle-Thresholds C_T	33
Abbildung 12: Elektroporationen am Beispiel von siPax7 (A-C) und Pax3HA (D-F).....	37
Abbildung 13: Qualitative PCR- Ergebnisse von elektroporiertem (EP) ventralen und dorsalen Mittelhirn	41
Abbildung 14: PCR- Ergebnisse für die Proben aus dem dorsalen (A) und ventralen (B) Mittelhirn im elektroporierten (EP) und nicht elektroporierten Gewebe (Ctrl) für die Haushaltsgene Beta- Actin und GAPDH sowie für EGFP als Kontrolle der Effizienz der Elektroporation.	42
Abbildung 15: Pax7- und Pax3- PCR aus dem dorsalen und ventralen Mittelhirn.....	43
Abbildung 16: PCR- Ergebnis von Cyclin D1, D2 und E aus dem dorsalen und ventralen Mittelhirn	44
Abbildung 17: PCR- Ergebnis des CDK-Inhibitors p27 ^{kip} und der Transkriptionsfaktoren E2f1 und p53 aus dem dorsalen und ventralen Mittelhirn	45
Abbildung 18: Gelelektrophorese einer PCR aus transfiziertem (EP) und Wildtyp (Ctrl)- Mittelhirngewebe mit dem Primerpaar Pax7 fo2/rev2	47
Abbildung 19: Schema des Pax7- Gens und die Positionen der beiden Primerpaare Pax7 fwd/rev und cPax7 fo2/rev2.	47
Abbildung 20: Schmelzkurvenanalyse von Beta-Actin (blau), Cyclin D1 (gelb), Cyclin D2 (lila) und Pax7 (grün).....	49
Abbildung 21: Schmelzkurvenanalyse von EGFP (grau), Cyclin E (grün), p27 ^{kip} (lila) und Pax3 (blau).....	50
Abbildung 22: 1. qRT-PCR zur Messung von EGFP im dorsalen Mittelhirn	51
Abbildung 23: 1. qRT-PCR zur Messung von Pax7-cDNA dorsal.....	52
Abbildung 24: 1. qRT-PCR zur Messung von Pax3-cDNA dorsal.....	53
Abbildung 25: 1. qRT-PCR zur Messung von Cyclin D1-cDNA dorsal	54
Abbildung 26: 1. qRT-PCR zur Messung von Cyclin D2- cDNA dorsal.....	55

Abbildung 27: 1. qRT-PCR zur Messung von p27 ^{kip} - cDNA dorsal.	56
Abbildung 28: 2.qRT-PCR zur Messung von EGFP im dorsalen Mittelhirn	57
Abbildung 29: 2.qRT-PCR zur Messung von Pax7-cDNA dorsal.....	58
Abbildung 30: 2.qRT-PCR zur Messung von Pax3-cDNA dorsal.....	59
Abbildung 31: 2. qRT-PCR zur Messung von Cyclin D1-cDNA dorsal.	60
Abbildung 32: 2.qRT-PCR zur Messung von Cyclin D2-cDNA dorsal.	61
Abbildung 33: 2.qRT-PCR zur Messung von p27 ^{kip} -cDNA dorsal	62
Abbildung 34: Vergleich der Transfektionsstärke der beiden qRT-PCR-Analysen anhand der EGFP- Expression.....	64
Abbildung 35: Proteinstruktur und Domänen der Pax- Genfamilie.....	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien: Elektroporation und Arbeiten am Hühnerembryo	17
Tabelle 2: Materialien: Arbeiten mit RNA	18
Tabelle 3: Materialien: Arbeiten mit DNA.....	19
Tabelle 4: Geräte und Zubehör: Arbeiten am Hühnerembryo	20
Tabelle 5: Geräte und Zubehör: Arbeiten mit RNA und DNA	20
Tabelle 6: Entwicklungsstadien nach Hamburger und Hamilton.....	23
Tabelle 7: Ablauf einer RT-PCR zur cDNA- Synthese; Ansatz für 20 µl cDNA	28
Tabelle 8: Bestandteile eines PCR-Ansatzes für ein Gesamtvolumen von 25µl.....	29
Tabelle 9: Protokoll einer Standard-PCR.	31
Tabelle 10: Ansatz für eine qRT-PCR Reaktion bei 20 µl/well Gesamtvolumen.....	34
Tabelle 11: Konzentrationsbestimmung der aus dem Mittelhirn isolierten mRNA für PCR-Analysen	38
Tabelle 12: Konzentrationsbestimmung der aus dem Mittelhirn isolierten mRNA für die erste qRT-PCR- Analyse.	39
Tabelle 13: Konzentrationsbestimmung der aus dem Mittelhirn isolierten mRNA für die zweite qRT-PCR- Analyse	39
Tabelle 14: Fold Change und Standardabweichungen der EGFP- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta-Actin.	51
Tabelle 15: Fold Change und Standardabweichungen der Pax7- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta-Actin.	52
Tabelle 16: Fold Change und Standardabweichungen der Pax3- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta-Actin.	53
Tabelle 17: Fold Change und Standardabweichungen der Cyclin D1- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.	54
Tabelle 18: Fold Change und Standardabweichungen der Cyclin D2- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.	55
Tabelle 19: Fold Change und Standardabweichungen der p27 ^{kip} - Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.	56
Tabelle 20: Fold Change und Standardabweichungen der EGFP- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.	57
Tabelle 21: Fold Change und Standardabweichungen der Pax7- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta-Actin.	58
Tabelle 22: Fold Change und Standardabweichungen der Pax3- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp(Kontrolle) normiert auf Beta-Actin.	59
Tabelle 23: Fold Change und Standardabweichungen der Cyclin D1- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.	60
Tabelle 24: Fold Change und Standardabweichungen der Cyclin D2- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.	61
Tabelle 25: Fold Change und Standardabweichungen der p27 ^{kip} - Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.	62

Abkürzungsverzeichnis

AP	Flügelplatte (engl. alar plate)
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BP	Grundplatte (engl. basal plate)
BMP	engl. bone morphogenic protein
C	Carboxy- Terminus
Cb	Cerebellum
CC	Canalis centralis
CDK	Zyclin- abhängige Kinasen (engl.cyclin- dependent kinases)
CDKI	CDK- Inhibitor
cDNA	(engl.) copy DNA
CMV	Cytomegalovirus
C _T	Schwellenwertzyklus (engl. Cycle-Threshold)
Ctrl	Kontrolle
D	dorsal
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
D-CDK	CyclinD -CDK-Komplex
DEPC	Diethylpyrocarbonat
di	Diencephalon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E2	Embryonaltag 2= Embryonen, zwei Tage nach der Befruchtung
E2f1	E2F Transkriptionsfaktor 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	engl. enhanced green fluorescent protein
EnR	Engrailed
EtOH	Ethanol
EP	Elektroporation, elektroporiert
FC	engl. Fold Change
Fgf	(engl. fibroblast growth factor)
FKHR	engl. Forkhead (Drosophila) homolog 1 (rhabdomyosarcoma)
FP	Bodenplatte (engl. floor plate)
fwd	engl. forward
G1/G2- Phase	engl. Gap- Phasen (Ruhephasen)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
GFP	(engl.) green fluorescent protein
HA- Tag	Hämagglutinin-Tag (HA-Tag)
HD	Homöodomäne (engl. homeodomain)
HH	Einteilung der Entwicklungsstadien der Hühnerembryonen nach Hamburger und Hamilton
HKG	Haushaltsgene (engl. housekeeping genes)
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle (engl. internal ribosomal entry site)

K	Kontrollseite
M-Phase	Zellteilungsphase
MHB	Isthmus (engl. mid- hindbrain boundary)
MPF	M-Phase- Förderfaktor
mRNA	Boten- RNA (engl. messenger RNA)
Ms/Mes	Mesencephalon
Mt/Met	Metencephalon
MZ	Mantelzone
N	Amino- Terminus
n, nc	Chorda dorsalis (engl. notochord)
OD	optische Dichte, Extinktion (engl. optical density)
Oligo DT	Oligonukleotide
OP	Oktapeptid- Motiv (engl. octapeptide motif)
Pax3 HA	Plasmidkonstrukt zur Überexpression von Pax3
Pax7 EnR	Plasmidkonstrukt, fungiert als Transkriptionsrepressor von Pax7
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
pCAX	Kontrollvektor
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. polymerase chain reaction)
PD	engl. paired domain
PFA	Paraformaldehyd
pMES.	Vektor zur Herstellung des Pax7- Plasmids, aus pCAX generiert
pMIW	Vektor zur Herstellung von Pax3HA und Pax7 EnR
qRT-PCR	quantitative Echtzeit- PCR (engl. quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)
r	Rhombomere
Rb	Retinoblastom- Protein
rev	engl. reverse
rh	Rhombencephalon
RLT-Puffer	Puffer zur Zelllyse der Firma Qiagen (engl. guanidium thiocyanate lysis buffer)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RP	Deckplatte (engl. roof plate)
RT	Reverse Transkription, Reaktion zur Herstellung von cDNA
S-Phase	DNA- Synthese-Phase
Shh	Sonic hedgehog
siPax7	siRNA gegen Pax7
siRNA	engl. small interfering RNA
TBE	TRIS- Borat- EDTA-Puffer
TD/TA	Transaktivierungsdomäne (engl. transactivation domain)
Tec	Tektum
Teg	Tegmentum
tel	Telencephalon
TGF- β	engl. Transforming Growth Factor- β
TierSchG	Tierschutzgesetz
T _m	Schmelztemperatur
U	Units (beim jeweiligen Enzym erläutert)
V	ventral
VZ	Ventrikulärzone

Wt
ZNS

Wildtyp, Kontrollprobe
zentrales Nervensystem

In dieser Dissertation wurden die gebräuchlichen englischen Fachausdrücke und die Abkürzungen der SI-Basiseinheiten verwendet.

1. Einleitung

1.1. Die Entwicklung des zentralen Nervensystems

1.1.1. Allgemein

Nur präzise konstruierte neuronale Netzwerke garantieren später eine adäquate Funktion des Nervensystems. Die Entwicklung dieses hochkomplexen Netzwerkes findet bei allen Vertebraten während der Embryogenese statt; einer Phase, die mit der Gastrulation beginnt und mit der Bildung der Organanlagen- der Organogenese- endet.

Die Gastrulation ist der Zeitpunkt, an dem sich die Körperanlagen aller höheren Organismen ausbilden und an dem durch gezielte Interaktion von Proliferation, Differenzierung und Migration die Funktionen der unterschiedlichen Zelltypen festgelegt werden. Aus dem Epiblasten der Blastula entspringen drei übereinander liegende Keimblätter: Das Mesoderm als Ursprung des Knochengewebes, des Bindegewebes und der Muskulatur sowie das Entoderm, aus dem sich später der Verdauungstrakt sowie die inneren Organe differenzieren. Aus dem letzten Keimblatt, dem Ektoderm, wird das Zellmaterial für die Epidermis, Hautanhangsgebilde und Zähne sowie für die Neuralplatte, aus dem das spätere zentrale Nervensystem hervorgeht, geliefert (Gilbert 2000).

Der fundamentale Prozess der Neurulation bei Vögeln ist dem der Amphibien, Reptilien und Säugetieren vergleichbar (Gallera 1971). Dabei trägt der Hensen Knoten, der sich in der späten Gastrulation als induktiver Zellhaufen am vorderen Ende des Primitivstreifens ausbildet und beim Menschen Primitivknoten genannt wird, eine Schlüsselfunktion und agiert während der Neurulation mit anderen induktiven Signalen von der Chorda dorsalis und des paraxialen Mesoderms ausgehend als Organisator der Zellbewegungen (Alvarez and Schoenwolf 1991; Schoenwolf 1991; Lumsden and Krumlauf 1996; Greene and Copp 2009; Vasiev, Balter et al. 2010). Die Neurulation beginnt mit der Verdickung des Ektoderms zur Neuralplatte, danach erfolgt die Krümmung und Faltung der zwei Enden der Neuralplatte entlang der anterior-posterioren Achse zu zwei Neuralfalten. Anschließend wölbt und vertieft sich die Neuralplatte zu einer Neuralgrube (siehe Abbildung 1). Durch Verschmelzung der beiden Neuralfalten schnürt sich die Neuralplatte letztendlich in ein Neuralrohr ab. Dabei bildet sich aus dem kranialen Anteil das Gehirn und aus dem kaudal gelegenen Anteil das Rückenmark aus. Der Hohlraum des Neuralrohrs liefert den Ursprung für das

Ventrikelsystem des zentralen Nervensystems. An der Übergangzone der Neuralplatte zum angrenzenden Oberflächenektoderm, aus dem sich unter anderem die Epidermis der Haut bilden wird, entwickelt sich die Neuralleiste. Aus diesen wanderungsfähigen Zellen differenzieren sich neben peripheren Nerven- und Gliazellen auch weitere Zelltypen wie die Melanozyten, die Calcitonin bildenden C-Zellen der Schilddrüse, die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, die Odontoblasten des Zahngewebes und Komponenten des Skelett- und Bindegewebes des Schädels (Kulesa, Ellies et al. 2004; Marti E 2006).

Nach Beendigung der Neurulation bilden sich aus der kranialen Anlage des Neuralrohrs drei primäre Hirnbläschen: das Prosencephalon (Vorderhirn), das Mesencephalon (Mittelhirn) und das Rhombencephalon (Rautenhirn), die sich nochmals in fünf Sekundärbläschen differenzieren. Aus dem Vorderhirn entwickelt sich anterior das Telencephalon mit den Großhirnhemisphären sowie kaudal das Diencephalon. Aus Ausstülpungen des Vorderhirns formieren sich die Augenbläschen, die die spätere Anlage des Nervus opticus und der Netzhaut zur Folge haben (Fuhrmann 2010). Das Mittelhirn differenziert sich in das dorsale Tektum als Reflexzentrum der Seh- und Hörbahnen sowie in das ventrale Tegmentum zur Verarbeitung motorischer Reize und Reflexe. Aus dem Rautenhirn entwickelt sich das Metencephalon (Nachhirn, dieses unterteilt sich in das dorsale Kleinhirn (Cerebellum)

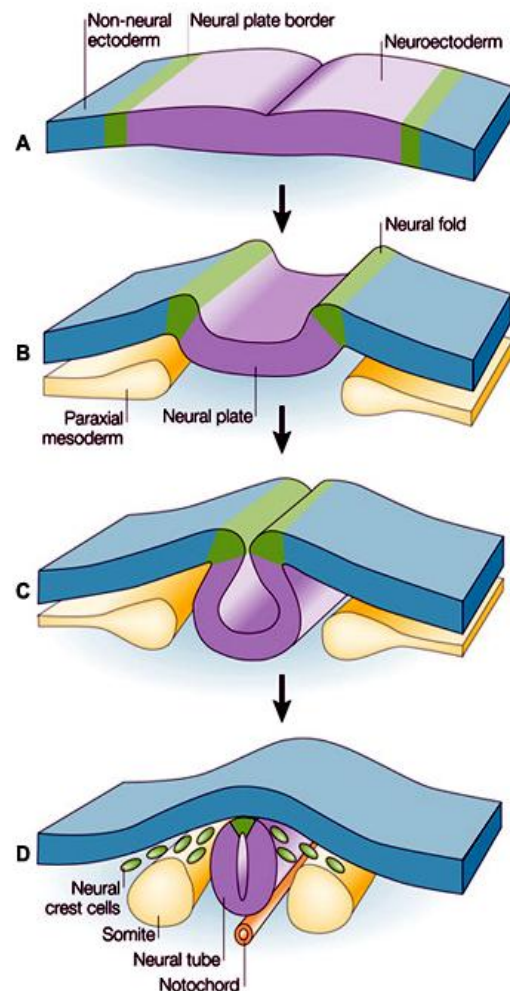
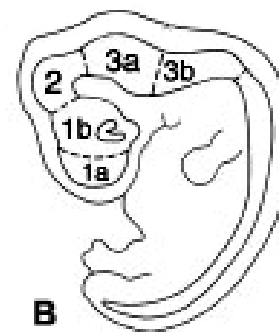
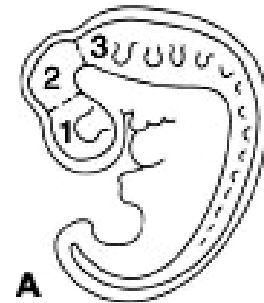


Abbildung 1: Schema der einzelnen Schritte der Neurulation. A. Formation der Neuralplatte, die an den Seiten durch eine ektodermale Übergangzone und dem Oberflächenektoderm beschränkt ist. B. Bildung der Neuralfalten, C und D: Annäherung der beiden Neuralfalten und Schluss des Neuralrohrs. Es sind nun abgegrenzt das Neuroektoderm (lila), die an der Übergangzone befindlichen Neuralleistenzellen (grün) und das Ektoderm (blau) zu erkennen. Aus dem paraxialen Mesoderm (gelb), entwickeln sich unter anderem die Somiten (modifiziert nach Gammill and Bronner-Fraser 2003).

und in die ventrale Brücke (Pons)) und das Myelencephalon (Medulla oblongata), die die Koordination der Körperbewegungen sowie der essentiellen Vitalfunktionen bewerkstelligen.

1.1.2. Musterbildung und Regionalisierung im sich entwickelnden ZNS

Durch ein subtiles Zusammenspiel von Regulationsmechanismen wie Induktion, Proliferation, interzelluläre Kommunikation, Migration, Zelldifferenzierung und Apoptose sowie durch ortsspezifische Expression von Transkriptionsfaktoren, die über eine bestimmte räumlich-zeitliche Sequenz exprimiert werden und deren Expressionsmuster spezifisch für ein bestimmtes embryonales Entwicklungsstadium ist, ist es möglich, dass sich auf makroskopischer und zellulärer Ebene neuronale Zellpopulationen formen und funktionale Regionen ausbilden können. Voraussetzung dafür ist die Musterbildung geordneter funktioneller Zellstrukturen entlang drei embryonaler Achsen: Die links-rechts- Achse, die anterior- posteriore und die dorsoventrale- Achse. Je nach Lokalisation, die einer neuroepithelialen Zelle durch



Determinierung dieser drei Achsen zugeschrieben wird, erfährt sie durch Sekretion unterschiedlicher Signale und Wachstumsfaktoren eine Differenzierung in einen bestimmten Nervenzelltyp. Dies findet innerhalb morphologisch sichtbarer Grenzen statt, die funktionelle Domänen markieren und die mit der Expression einzelner Transkriptionsfaktoren korrelieren. Die rechts-links-Achse, die die asymmetrische Organogenese einleitet, entsteht während der Gastrulation durch ein kompliziertes

Abbildung 2: Primär- und Sekundärbläschenstadium während der Entwicklung des ZNS.

A: Primärbläschen-Stadium mit 1: Prosencephalon, 2: Mesencephalon und 3: Rhombencephalon.

B: Spätere Aufteilung in 5 Sekundärbläschen: 1a+b: Telencephalon, Diencephalon, 2 Mesencephalon, 3a+b: Metencephalon, Myelencephalon

Interaktions- und Expressionsmuster von Genen wie Shh und Fgf8 unter der Regie des Hensen- Knotens (Gros, Feistel et al. 2009). Die Unterteilung des sich entwickelnden ZNS in Vorder-, Mittel- und Rautenhirn gelingt durch die Bildung lokaler Organisationszentren entlang der anterior-posterioren Achse. Signale wie Fgf8 und

Wnt1 aus dem Isthmus an der Grenze von Mittelhirn zu Rautenhirn (MHB, mid-hindbrain- boundary) beeinflussen die Struktur des Mittelhirns und des vorderen Rhombencephalons und grenzen deren Zellstrukturen durch Expression unterschiedlicher Marker- und Differenzierungsgene voneinander ab (Abbildung 3, Wurst and Bally-Cuif 2001; Nakamura and Watanabe 2005; Kiecker and Lumsden 2012).

Die wichtigsten Erkenntnisse der dorsoventralen Musterbildung konnten aus Experimenten am Rückenmark gezogen werden, dessen Modell sich schematisch auf die weiter anterior gelegenen Strukturen des ZNS wie die des Mittelhirns übertragen lässt. Ab der Bildung des Neuralrohrs kann eine Gliederung des Rückenmarks in eine ventral gelegene Grundplatte für somatomotorische Strukturen und eine dorsal gelegene Flügelplatte für somatosensible Strukturen identifiziert werden, deren Regionalisierung durch Induktion neuronaler Vorläuferzellen entlang der dorsoventralen Achse entstanden ist. Chorda dorsalis, Somiten, Boden- und Deckplatte sowie das umgebende Meso- und Ektoderm exprimieren dabei dorsalisierende und ventralisierende Signalmolekülgruppen (Yamada, Pfaff et al. 1993; Liem, Tremml et al. 1997; Altmann and Brivanlou 2001; Wilson and Maden 2005). Durch die Distribution dieser Moleküle entlang eines dorso-ventralen Konzentrationsgefälles und durch gegenseitige inhibitorische Interaktion wird die Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Dies führt zu einer streifenförmigen Anordnung der verschiedenen Vorläuferzelltypen im Rückenmark, die sich anschließend in ventrale

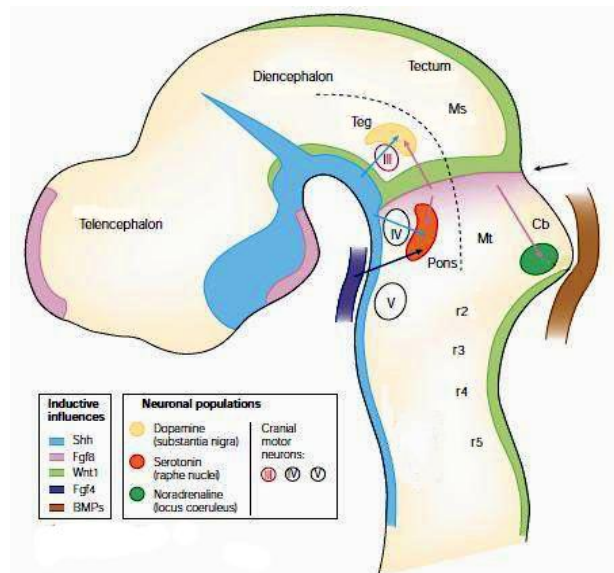


Abbildung 3: Anterior-posteriore Begrenzung des Mittelhirns. Vom Vorderhirn ausgehend hat Shh (blau) einen begrenzenden Einfluss, von der MHB ausgehend werden vor allem Wnt1 (grün) und Fgf8(rosa) exprimiert. Mesodermales Fgf4 (lila) und ektodermale BMP-Mitglieder (braun) sind zusätzlich an der Festlegung der anterior-posterioren Achse beteiligt. Der rechte Pfeil zeigt die Lage des Isthmus (MHB) an. Teg- Tegmentum, Ms- Mesencephalon, Mt- Metencephalon, Cb- Cerebellum, r- Rhombomere, BMP- bone morphogenic protein, fgf- fibroblast growth factor (modifiziert nach Wurst and Bally-Cuif 2001).

Yamada, Pfaff et al. 1993; Liem, Tremml et al. 1997; Altmann and Brivanlou 2001; Wilson and Maden 2005). Durch die Distribution dieser Moleküle entlang eines dorso-ventralen Konzentrationsgefälles und durch gegenseitige inhibitorische Interaktion wird die Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Dies führt zu einer streifenförmigen Anordnung der verschiedenen Vorläuferzelltypen im Rückenmark, die sich anschließend in ventrale

(v1-3 und Motoneurone MN) und dorsale (dl1-6) Neuronentypen differenzieren (Abbildung 4, Briscoe, Pierani et al. 2000; Ulloa and Briscoe 2007).

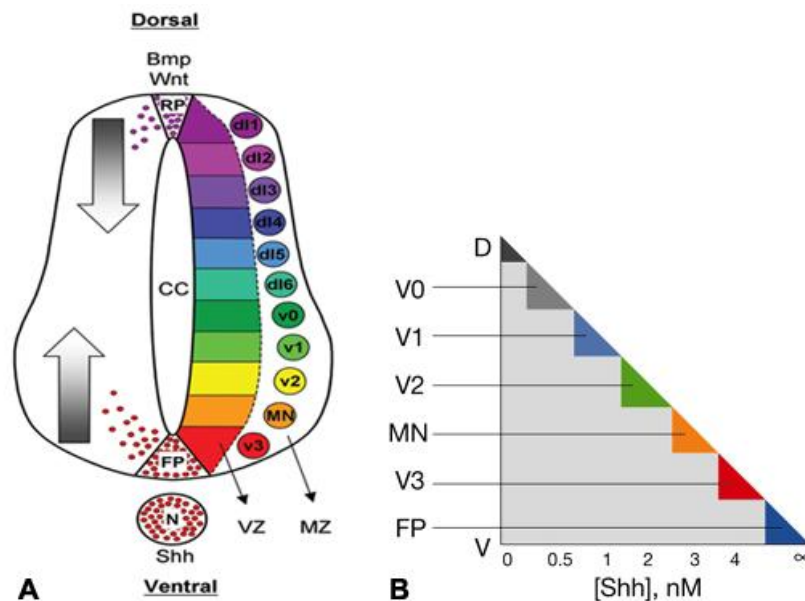


Abbildung 4: Schematische Darstellung der dorsoventralen Musterbildung im Rückenmark. A: Durch Sekretion verschiedener Morphogene aus Boden- und Grundplatte als auch aus dem umgebenden Gewebe werden entlang eines Konzentrationsgefälles verschiedene dorsale und ventrale Neuronentypen aus den Vorläuferzellen der Ventrikulärzone geschaffen (modifiziert nach Ulloa and Briscoe 2007). **B:** Durch die graduelle Expression von Shh und die damit verbundene unterschiedliche Inhibition und Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren entstehen im Rückenmark unterschiedliche ventrale Nervenzelltypen. (modifiziert nach Jacob and Briscoe 2003) Abkürzungen: V- ventral, D- dorsal, RP- roof plate, AP-alar plate, BP- basal plate, FP- floor plate, VZ- Ventrikulärzone, MZ- Mantelzellzone, N- Notochord/Chorda dorsalis, CC- Canalis centralis. V0- FP: Ventrale Nervenzelltypen bestehend aus ventralen Interneuronen V0-3, MN Motoneuronen, und FP floor plate.

Als hauptverantwortliches Molekül für die Induktion ventraler Nervenzelltypen wie den Motoneuronen gilt das Morphogen Sonic hedgehog (Shh), das von der Chorda dorsalis und der Bodenplatte exprimiert wird (Echelard, Epstein et al. 1993; Poh, Karunaratne et al. 2002; Dessaud, McMahon et al. 2008). Weitere induktive Signale für die dorsoventrale Musterbildung des Rückenmarks resultieren aus dem Zusammenspiel von Mitgliedern der FGF- Familie und Retinolsäure aus dem paraxialen Mesoderm (Diez del Corral, Olivera-Martinez et al. 2003; Wilson, Gale et al. 2004; Ulloa and Briscoe 2007). Die Induktion der dorsalen Zelltypen beruht auf einer Kaskade von Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie- vor allem von BMPs mit Dorsalin und Activin- sowie der Wnt- Familie, die von der Deckplatte und dem darüber liegenden Ektoderm exprimiert werden (Basler, Edlund et al. 1993; Liem, Tremml et al. 1995; Lee and Jessell 1999; Muroyama, Fujihara et al. 2002; Wilson and Maden 2005). Diese sind mitverantwortlich für die Expression dorsalisierender Gene wie Pax3 und Pax7 sowie

Rab23 und Gli3 (Liem, Tremml et al. 1995; Timmer, Wang et al. 2002; Meyer and Roelink 2003; Li, Volff et al. 2007).

1.1.3. Dorsoventrale Musterbildung im Mesencephalon

Auch die anatomischen Strukturen des Mesencephalons entwickeln sich entlang der dorsoventralen Achse aus der Grund- und Flügelplatte, jedoch können die Erkenntnisse der dorsoventralen Entwicklung des Rückenmarks nur teilweise auf die mesencephalen Strukturen übertragen werden.

Aus den Grundplatten des Mesencephalons entwickelt sich das ventrale Tegmentum, das aus somatomotorischen und viszeromotorischen Nuclei besteht und wichtige Kerngebiete wie die Substantia nigra und den Nucleus ruber enthält (Abbildung 5). Mitglieder der Nkx-Familie sowie Shh sind nur ventral exprimiert (Cai, St Amand et al. 1999; Moreno-Bravo, Martinez-Lopez et al. 2012) und scheinen für die Ausbildung des ventralen Tegmentums eine Rolle zu spielen. Von Shh ist bekannt, dass es ventrale Mittelhirnzellen induziert und dabei die Expression dorsaler Gene wie Pax7 unterdrückt (Watanabe and Nakamura 2000; Agarwala, Sanders et al. 2001). Die dorsale Identität des Mesencephalons wird hingegen durch die Expression der Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7 geschaffen (Matsunaga, Araki et al. 2001; Thomas, Lazic et al. 2004). Aus den dorsalen Flügelplatten entsteht somit das in Nervenzellschichten organisierte dorsale Mittelhirndach, das Tectum mesencephali. Das Tektum besteht aus der sogenannten Vierhügelplatte (Lamina quadrigemina), die zur Verarbeitung visueller und auditiver Signale notwendig ist. Die Hirnkerne der anterior gelegenen Colliculi superiores dienen beim Menschen zur Umsetzung visueller Impulse in optische Reflexe wie reflektorische Augen- und Kopfbewegungen. Die Colliculi inferiores sind eine wichtige Umschaltstelle der Hörbahn zur Weiterleitung von Informationen aus dem Hör- und Gleichgewichtsorgan über das Corpus geniculatum mediale des Thalamus zur primären Hörrinde in den Temporallappen. Im Vergleich zu Säugetieren existieren bei Vögeln nur die als Tectum opticum angelegten prominent entwickelten Colliculi superiores als Ort des primären Sehzentrums (Mey and Thanos 2000). Die Colliculi inferiores existieren bei Vögeln als Kerngebiet in Form des Nucleus mesencephalicus lateralis pars dorsalis (MLd, Niederleitner and Luksch 2012).

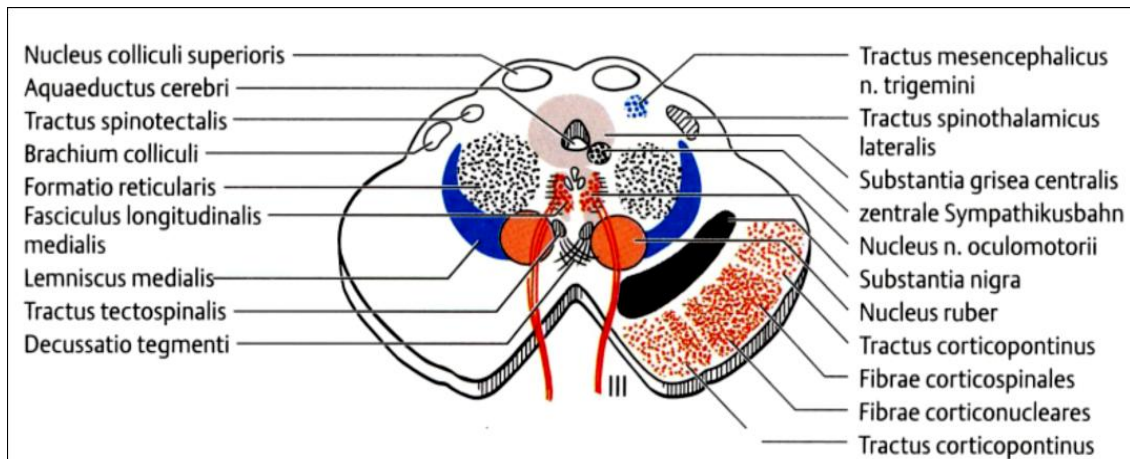


Abbildung 5: Dorsoventrale Einteilung des Mittelhirns im Querschnitt. Aus Flügelplatte und Grundplatte entwickeln sich die verschiedenen Strukturen des Mittelhirns. Tektum: streifenförmige Anordnung der Colliculi superiores et inferiores. Tegmentum: Somatomotorische Kerne sind die Okulomotorius- und Trochleariskerne zur Versorgung der Augenmuskulatur. Nucleus ruber und Substantia nigra sind wichtige Schaltstellen des extrapyramidalmotorischen Systems. Durch die ehemaligen Grundplatten hindurch verlaufen die Crura cerebri, die unter anderem die Fasern der kortikospinalen, kortikobulbären und kortikopontinen Bahnen enthalten (aus: Duus, 2003)

1.2. Die Pax-Gene: Eine Familie von Transkriptionsfaktoren

1.2.1. Allgemein

Die Pax-Gene sind eine homogene Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die eine Schlüsselrolle in der Formierung von Gewebe- und Organstrukturen während der Embryonalentwicklung spielen, indem sie Zellproliferation und Selbsterneuerung, Migration und Differenzierung von embryologischen Vorläuferzellen regulieren (Lang, Powell et al. 2007). Sie halten spezielle Untergruppen in einen antiapoptotischen Vorläuferzell-Status und verhindern somit eine endgültige Ausdifferenzierung von Zellgruppen (Thompson and Ziman 2011). Die Expression der Pax-Proteine ist nicht nur auf die Embryogenese beschränkt, im postnatalen Gewebe wird ihre Expression zwar zur endgültigen Differenzierung meistens unterdrückt (Dahl, Koseki et al. 1997), jedoch bleiben die Pax Gene in einigen ausdifferenzierten Geweben bestehen oder deren Expression wird bei organspezifischen regenerativen Vorgängen modifiziert, um Proliferation oder Differenzierung zu induzieren (Olguin and Pisconti 2012). Die Hauptfunktionen der Pax-Gene- Proliferation, Selbsterneuerung von Stammzellen, sowie Apoptoseresistenz und Zellmigration- sind zum einen Eigenschaften, die malignes Wachstum charakterisieren (Hanahan and Weinberg 2011), aber zum anderen auch Eigenschaften, die zur Neuroregeneration bei neurodegenerativen Prozessen genutzt werden könnten (Thompson and Ziman 2011). Die malignen Charakteristika

bestätigen sich dadurch, dass dysregulierte Pax-Gene in Neoplasien des gleichen Gewebes exprimiert werden, in dem sie während der Embryonalentwicklung zur adäquaten Strukturbildung relevant waren (Muratovska, Zhou et al. 2003; Robson, He et al. 2006 sowie Abbildung 35 in Anhang A).

Pax-Proteine fungieren mit ihren diversen DNA- bindenden Domänen als Transkriptionsfaktoren und können mit ihrer sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne die Transkription bestimmter DNA- Sequenzen verstärken und die transkriptionale Aktivität von nachgeschalteten Genen modifizieren als auch mit Bindungsdomänen anderer Faktoren interagieren (Underhill and Gros 1997). Aufgrund unterschiedlicher Strukturbestandteile, Sequenzähnlichkeiten und überlappenden Funktionen können die Pax-Gene in vier Untergruppen eingeteilt werden (siehe Abbildung 35 in Anhang A). Dabei tragen die Mitglieder aus Gruppe II, III und IV (vor allem Pax6) zur Entwicklung des ZNS bei. Allen Pax- Proteinen gemeinsam ist das charakteristische Vorkommen einer hochkonservierten 138-Aminosäuren langen paired domain, die ursprünglich im drosophila- paired (prd) Protein entdeckt wurde (Bopp, Burri et al. 1986; Dahl, Koseki et al. 1997). Sie beinhaltet eine DNA- bindende Domäne mit zwei strukturellen Subdomänen: einer N-terminalen PAI- und einer C-terminalen RED-Domäne und besitzt ein konserviertes Helix-Turn-Helix-Motiv als Sekundärstruktur. Alle Pax-Proteine bis auf Pax1 und 9 enthalten eine zusätzliche DNA-Bindungsstelle, eine so genannte Homöodomäne, die an sequenzspezifische DNA-Motive bindet, die das palindromische Element TAAT enthalten: TAAT(N)₂₋₃ATTA (Wilson, Sheng et al. 1993). Alle Pax-Gene bis auf Pax4 und Pax6 besitzen zwischen der paired-Domäne und der Homöodomäne ein zusätzliches 8 AS- langes Oktapeptid mit transkriptionshemmender Aktivität (Eberhard, Jimenez et al. 2000; Chi and Epstein 2002). Für einige Pax-Gene- auch von Pax3 und Pax7- sind zusätzliche Isoformen in Form alternativer Spleißvarianten bekannt

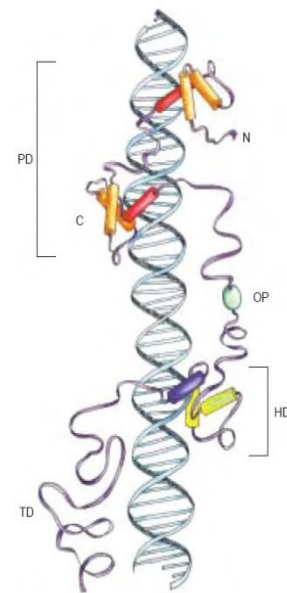


Abbildung 6:
Domänenstruktur der Pax- Gene am Beispiel von Pax7. Pax7 besteht aus einer Paired- und einer Homöodomäne, die unabhängig voneinander an DNA binden. PD paired domain, N Amino-Terminus, C Carboxy-Terminus, OP octapeptide motif, HD homeodomain, TD transactivation domain (Chi and Epstein 2002)

(Kozmik, Kurzbauer et al. 1993; Ziman, Fletcher et al. 1997; Lamey, Koenders et al. 2004; Wang, Kumar et al. 2006; Holland and Short 2010; Underhill 2012). Bisher sind zwei Spleißvarianten von Pax7 im ZNS bekannt, wobei nur eine für die neuronale Differenzierung bedeutend zu sein scheint (Ziman, Thomas et al. 2001).

1.2.2. Pax3 und Pax7 und deren Rolle in der Entwicklung von Organstrukturen

Die präzise Expression von Pax3 und Pax7 spielt eine entscheidende Rolle in der Regionalisierung sowie in der adäquaten Migration und Spezifizierung bestimmter neuronaler und muskulärer Vorläuferzellen. Fehlregulierte Expression führt im sich entwickelnden als auch im ausdifferenzierten Gewebe zu tiefgreifenden Entwicklungsstörungen und Missbildungen. Pax7 hat eine Schlüsselfunktion in der frühen dorsoventralen Musterbildung des sich entwickelnden Nervensystems und definiert zusammen mit Pax3, mit dem es sich eine überlappende Expressionsdomäne im Nervensystem und in der Somitenregion teilt, dorsales Zellschicksal sowie die Regionalisierung proliferierender neuronaler Vorläuferzellen (Jostes, Walther et al. 1990; Goulding, Chalepakis et al. 1991; Thompson and Ziman 2011).

Die Expression von Pax7 wird schon im Frühstadium der neuronalen Entwicklung zur Zeit der Neuralrohrformation beobachtet (Jostes, Walther et al. 1990) und bleibt in differenzierten neuronalen Subtypen im Bereich des optischen Tektums, des Prätektums sowie in bestimmten Nuclei der Medulla oblongata und des Thalamus als auch in den Bergmannschen Gliazellen des Kleinhirns bestehen (Shin, Lee et al. 2003; Thomas, Barker et al. 2007). Im Mittelhirn determiniert Pax7 zusammen mit Pax3 die Zytoarchitektur des dorsalen Tektums (Nomura, Kawakami et al. 1998; Matsunaga, Araki et al. 2001), besonders die der Colliculi superiores des Tectum mesencephali (Thompson, Zembrzycki et al. 2008). Pax3 und Pax7 sind zusätzlich in den Neuralleistenzellen exprimiert und steuern deren Migration, Proliferation und Differenzierung (Lacosta, Muniesa et al. 2005; Bronner and LeDouarin 2012; Murdoch, DelConte et al. 2012).

Diverse Tierversuchsmodelle veranschaulichen, dass sich Pax7 und Pax3 im Nerven- und Muskelgewebe gegenseitig kontrollieren und ihre Expression auf ein bestimmtes Niveau ausbalancieren können. Ein Doppelknockout von Pax7 und Pax3 in der Maus führt zu Exencephalie und Neuralrohrdefekten (Mansouri 1998; Lee and Jessell 1999)

als auch zu komplexen Fehlbildungen der Skelettmuskulatur (Relaix, Rocancourt et al. 2005). Mildere Defekte treten bei den Einzelmutationen auf, die sich durch die geteilte Expressionsdomäne als auch durch die funktionelle Redundanz von Pax7 und Pax3 im zentralen Nervensystem und im Muskelgewebe erklären lassen. So führt die Inaktivierung von Pax7 zu neonataler Letalität, craniofacialen Missbildungen und Reduktion myogener Satellitenzellen mit verminderter Muskelregeneration, jedoch nicht zu Defekten im zentralen Nervensystem (Mansouri, Stoykova et al. 1996; Seale, Sabourin et al. 2000). Die Pax3-fehlerhafte *plotch*-Mutation der Maus bewirkt eine ausbleibende Migration von Neuralleisten- und Muskelvorläuferzellen aus dem dorsalen Neuralrohr, was einen Symptomkomplex aus Hypopigmentation, Innenohrschwerhörigkeit, Gesichtsdysmorphien sowie Defekte der Rumpfmuskulatur und des Neuralrohrs auslöst, die beim Menschen als Waardenburg Syndrom Typ I/III bekannt ist und einer heterozygoten Pax3-Mutation zugrunde liegt (Epstein, Vekemans et al. 1991; Tassabehji, Newton et al. 1994). Im *plotch*-Modell der Maus wird Pax7 in bestimmten Regionen des Neuralrohrs und der Somiten, wo physiologisch nur Pax3 vorkommen sollte, hochreguliert und kann den Mangel an Pax3 teilweise ausgleichen (Borycki, Li et al. 1999; Zhou, Wang et al. 2008). Somit scheint die funktionelle Redundanz dieser Gene im ZNS den Zellstatus von Selbsterneuerung von Vorläuferzellen und dessen Eintritt in die Differenzierung noch genauer zu balancieren. Auch im ausdifferenzierten Gewebe zeigt sich eine physiologische Expression von Pax7 und Pax3, die spezielle Zellgruppen in einen antiapoptotischen Vorläuferzellstatus hält und deren endgültige Ausdifferenzierung verhindert. Dies ist meistens mit der Erforderlichkeit zur Selbsterneuerung bestimmter Gewebebestandteile assoziiert. In der Skelettmuskulatur ist Pax7 in den Satellitenzellen exprimiert und unterdrückt dort differenzierungsfördernde Gene (Lepper, Partridge et al. 2011). Durch lokale regenerationsfördernde Signale wird die Expression von Pax7 nach Verletzungen unterdrückt und die Satellitenzellen können sich in funktionsfähige Muskelzellen ausdifferenzieren (Olguin and Olwin 2004). Pax3 ist im adulten Gewebe in den Melanoblasten der Haarfollikel exprimiert und ist dort mit ähnlichem Mechanismus an regenerativen Prozessen beteiligt (Lang, Lu et al. 2005). Diese antiapoptotischen Eigenschaften zeigen sich auch durch die Beteiligung von Pax3 und Pax7 an der Pathogenese verschiedener Tumoren. Im alveolaren und embryonalen

Rhabdomyosarkom, im squamösen Lungenkarzinom sowie beim Ewing-Sarkom als auch beim Melanom und Neuroblastom zeigt sich eine tumorassoziierte Pax3- oder Pax7- Überexpression – beispielsweise in Form eines durch chromosomale Translokation bedingten Fusionsgens (Schulte, Toretsky et al. 1997; Racz, Brass et al. 2000; Sorensen, Lynch et al. 2002; Blake and Ziman 2003; Robson, He et al. 2006; Medic, Rizos et al. 2011).

1.3. Die Funktion des Zellzyklus in der Entwicklung des ZNS

1.3.1 Allgemein

Im Verlauf der Hirnentwicklung muss die Balance von Proliferation und Differenzierung verschiedener zellulärer Subtypen koordiniert werden, damit regionalisierte Gewebestrukturen mit unterschiedlicher Funktion entstehen können. Der Zellzyklus ist dabei ein präzises Instrument, das während der Zellteilung die Übertragung von genetischem Erbmateriale auf beide Tochterzellen garantiert und durch Regulation exogener und zellautonomer Signale das Schicksal einer Zelle festlegt, indem es durch Bestimmung von Ruhe- oder Teilungsphasen über das Ausmaß an Proliferation und Differenzierung bestimmt oder indem es Reparaturmechanismen oder Apoptose bei Schädigung einleitet. Eine Fehlregulation dieses Zusammenspiels kann auf der einen Seite zu unkontrolliertem malignen Wachstum beitragen und auf der anderen Seite zu mangelnder Entwicklung notwendiger Zellstrukturen führen. Der Zellzyklus kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden. Es existieren die zwei Ruhephasen G1 und G2, die durch die DNA-Synthese (S-)-Phase zwischen G1 und G2 und durch die Zellteilungsphase (M-Phase) zwischen G2 und G1 voneinander getrennt sind. Eine Einleitung der fünften Phase- der G0-Phase- erfolgt, wenn Zellen den Zellzyklus entweder aufgrund von ungünstigen Wachstumsbedingungen oder dem Überwiegen antiproliferativer Signale verlassen, ohne dabei die Möglichkeit für die Wiederaufnahme in den Zellzyklus zu verlieren (McClellan and Slack 2006). Eine andere Möglichkeit neben dieser transienten Ruhephase stellt der irreversible Weg in Richtung terminaler Differenzierung dar.

Der Zellzyklus wird dabei in jeder Phase durch ein Zusammenspiel spezifischer Moleküle reguliert. Eine Schlüsselrolle haben dabei die Zykline (engl. Cyclins), die in Kombination mit zyklinabhängigen Kinasen (engl. cyclin dependent kinases, CDK)

aktivierte Kinasen bilden und konzentrationsabhängig die verschiedenen Phasen des Zellzyklus initiieren. Kontrolle erhalten diese Zellzykluskoordinatoren durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen wie durch Transkriptionsfaktoren oder durch inhibitorische Phosphorylierungen der CDK-Untereinheiten durch CDK- Inhibitoren (siehe Abbildung 7). Der Zellzyklus enthält verschiedene Kontrollpunkte, die die Prozesse jeder Zellzyklusphase kontrollieren und nach deren erfolgreichem Abschluss die Zelle durch Aktivierung typischer Cyclin-CDK-Komplexe in die nächste Phase geführt werden kann. Bekannt sind bisher drei Kontrollpunkte: Der G₂- Kontrollpunkt vor Beginn der M- Phase, der Spindel-Kontrollpunkt in der mitotischen Metaphase und der G₁/S- Kontrollpunkt am Ende der G₁-Phase, der auch Restriktionspunkt genannt wird (Zetterberg, Larsson et al. 1995). Neben der Kontrolle auf DNA-Schäden ist der am Ende der G₁-Phase gelegene Kontrollpunkt für das weitere Schicksal einer Zelle von großer Bedeutung. Parallel entscheidet sich, ob sich eine Zelle in Richtung Replikation, Ruhezustand oder terminale Differenzierung entwickeln wird. Vermittelt wird diese Entscheidung durch die Koordination von aktivierenden und inhibitorischen Signalen, die am Restriktionspunkt verarbeitet werden und dadurch den Grad an Proliferation und Differenzierung innerhalb eines spezifizierten Zellgewebes wie dem zentralen Nervensystem festlegen.

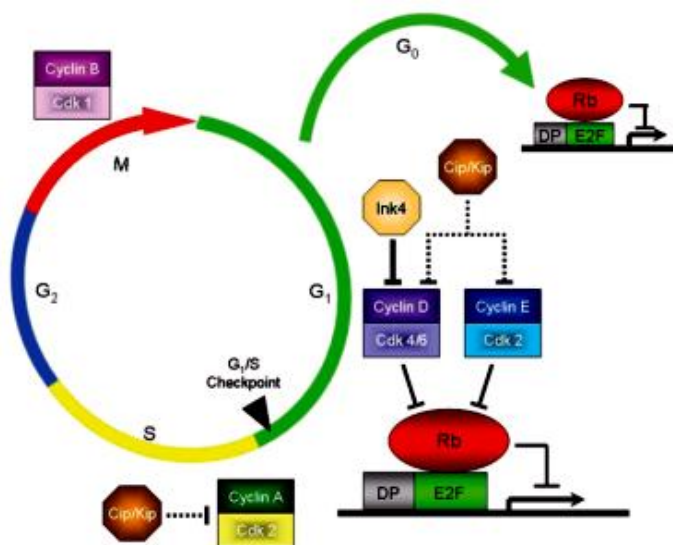


Abbildung 7: Übersicht der Zellzyklusphasen mit Fokus auf den G₁/S-Übergang (McClellan and Slack 2006). Cyclin D ist als D-CDK4/6 Komplex während G₁/S-Phase exprimiert; der Cyclin E-CDK2-Komplex zur Initiierung der S-Phase und der Cyclin A-CDK2-Komplex zu Austritt aus der S-Phase und zur Einleitung der G₂-Phase. Auftreten des Cyclin B-CDK1- Komplexes als M-Phase-Förderfaktor (MPF) und des CyclinA-CDK1-Komplexes lösen die Initiierung der M-Phase aus.

durch den D-CDK4/6- Komplex stattgefunden hat (Lundberg and Weinberg 1998). Zusätzlich werden zellzyklusunabhängige Funktionen der D-Zykline beschrieben, die zu veränderter Expression von Transkriptionsfaktoren führen und die Entwicklung bestimmter neuronaler Subtypen fördern (Coqueret 2002). Mangel an Cyclin D1 führt bei Mäusen zu einem kleineren Phänotyp sowie zu einer verminderten Anzahl retinaler Vorläuferzellen und mangelnder Ausbildung der Brustdrüsen (Fantl, Stamp et al. 1995; Sicinski, Donaher et al. 1995; Das, Choi et al. 2009). Cyclin D2-defiziente Mäuse haben eine verminderte Anzahl von Körnerzellen und Sternzellen im Kleinhirn und führen zu einem Verlust von kortikalen Vorläuferzellen (Huard, Forster et al. 1999; Glickstein, Monaghan et al. 2009). Bei adulten Mäusen führt ein Mangel an Cyclin D2 zu einer Reduktion der Vorläuferzellen im Gyrus dentatus des Hippocampus (Kowalczyk, Filipkowski et al. 2004) Wie auch bei Cyclin D-defizienten Mäusen führt eine pharmakologische Inhibierung des CyclinE-CDK2-Komplexes zur Verlängerung der G1-Phase und zur Induktion der Neurogenese (Salomoni and Calegari 2010).

1.3.2.2. CDKIs

Durch Inhibition aktiver CDKs in der G1/S-Phase können CDK-Inhibitoren die Länge von G1 und somit auch den Differenzierungsgrad eines Gewebes kontrollieren (Sherr and Roberts 1999; Calegari and Huttner 2003). Dabei spielt vor allem $p27^{kip}$ durch Hemmung des E-CDK2-Komplexes eine Rolle, durch dessen antiproliferative Eigenschaft die Menge an Stammzellen reduziert und deren Differenzierung eingeleitet wird. Mangel an $p27^{kip}$ führt in der Embryonalentwicklung zu einer erhöhten Proliferationsrate von Vorläuferzellen und zur Suppression von Markern der neuronalen Differenzierung sowie zu einer verringerten Migration von Neuroblasten (Carruthers, Mason et al. 2003), wohingegen eine Erhöhung von $p27^{kip}$ zu einer verstärkten Aktivität von Genen führt, die eine Rolle in der Regulation neuronaler Migration spielen (Itoh, Masuyama et al. 2007).

1.3.2.3 Transkriptionsfaktoren

Eine weitere Regulation der Zellzyklusproteine während des Restriktionspunktes erhält der Zellzyklus durch die Expression von Transkriptionsfaktoren. Ein wichtiger Protagonist ist dabei p53. Akkumulation dieses Tumorsuppressor- Proteins bei DNA-Schäden führt zur Induktion des CDK-Inhibitors p21, der wiederum durch Hemmung

des Cyclin D-CDK4/6-Komplexes als auch des Cyclin E-CDK2-Komplexes zu einem Zellzyklusarrest führt und dadurch verschiedene Gene aktiviert, die DNA-Reparatur-Mechanismen, Apoptose, oder auch den Weg Richtung G1 oder G0-Phase induzieren (Vousden and Prives 2009). Mangel an p53 führt während der neuronalen Entwicklung zu einer Modifizierung des Differenzierungsprozesses, in dem es durch eine Steigerung der Proliferationsrate die Anzahl neuronaler Vorläuferzellen erhöht. (Armesilla-Diaz, Bragado et al. 2009). Überexpression von p53 führte bei der Maus zu einem Proliferationsrückgang mit verminderter Fähigkeit zur Selbsterneuerung neuronaler Vorläuferzellen (Meletis, Wirta et al. 2006; Medrano, Burns-Cusato et al. 2009).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der G1-/S-Phase beteiligt ist, ist E2f1. Wenn Rb abhängig vom D-CDK4/6- Komplex phosphoryliert wird, ist das ungebundene E2f1 als positiver Proliferationsregulator während der G1- Phase aktiviert und führt zum Eintritt der Zelle in die S-Phase (Inoshita, Terada et al. 1999; McClellan and Slack 2006). Mangel an E2f1 führt bei ausgewachsenen Mäusen zu einem Abfall neuronaler Vorläuferzellen (Cooper-Kuhn, Vroemen et al. 2002).

Homöobox-Gene haben ihre Hauptrolle in der Wirkung als Transkriptionsfaktoren und regulieren dadurch Morphogenese und Zelldifferenzierung verschiedener Gewebe (Mark, Rijli et al. 1997). Durch die transkriptionale Regulation des Zellzyklus sind sie an der neuronalen Differenzierung beteiligt und kontrollieren die Expression verschiedener Mitglieder aus der Familie der Sox- und Fox-Transkriptionsfaktoren als auch der Zellzyklusproteine selbst (Del Bene and Wittbrodt 2005; Hindley and Philpott 2012). Die Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7 weisen beide eine Homöobox auf und sind an der Entwicklung des Mittelhirns nachweislich beteiligt. Versuche haben gezeigt, dass die Pax-Gene Pax2, 5 und 8 fähig sind p53 negativ zu beeinflussen (Stuart, Haffner et al. 1995). Von Pax6 ist bekannt, dass es während der Augenentwicklung Zellzyklusproteine wie p21, p27^{kip} und p57 unterdrückt, um die weitere Proliferation des Auges zu forcieren (Duparc, Abdouh et al. 2007). Pax3 inaktiviert p53 und führt dadurch zum Schluss des Neuralrohrs (Wang, Morgan et al. 2011). Von Pax7, das an der Aufrechterhaltung und Proliferation von undifferenzierten zellulären Phänotypen beteiligt ist, gibt es bisher keine exakten Kenntnisse inwieweit dieser Transkriptionsfaktor die Proteine des Zellzyklus während der Embryonalentwicklung steuern könnte.

1.4 Fragestellung

Die Initiierung der neuronalen Differenzierung setzt voraus, dass neuronale Vorläuferzellen den Zellzyklus am Restriktionspunkt verlassen und ihre spezifische Identität entlang ihrer anterior-posterioren und dorsoventralen Achse aufbauen (Ulloa and Briscoe 2007). Die Transkriptionsfaktoren Pax7 und Pax3 spielen als Homöoboxgene eine entscheidende Rolle in der Entwicklung spezifizierter Zellregionen im dorsalen Mittelhirn und führen durch die Balance von Proliferation und Differenzierung zu geordneten Zellstrukturen. Um dies bewerkstelligen zu können, müssten sie die Fähigkeiten besitzen, die Transkription wichtiger Zellzyklusgene am Restriktionspunkt positiv als auch negativ zu beeinflussen.

In meiner Dissertation ging ich der Frage nach, welche Auswirkung eine veränderte Expression von Pax7 am Restriktionspunkt auf die aktiven Zellzyklus-Proteine ausübt. Zusätzlich beschäftigte mich die Frage, ob sich dabei die Redundanz von Pax3 und Pax7 nachweisen lässt. Grundlegende entwicklungsbiologische Prozesse in der Embryonalentwicklung des Huhnes (*Gallus gallus domesticus*) lassen sich auf die der Säugetiere übertragen, sodass ich für die vorliegende Dissertation als Modellorganismus Hühnerembryonen verwendete.

Mittels der in-ovo- Elektroporation lassen sich am Hühnerembryo gezielt genetische Manipulationen vornehmen, die in einem bestimmten Entwicklungsstadium untersucht werden können. Durch die Elektroporation verschiedener Plasmidkonstrukte in das Mittelhirn, die entweder Pax7 überexprimierten oder unterdrückten, konnte ich unterschiedliche Proteinkonzentrationen von Pax7 im Mittelhirn erzielen. Zusätzlich interessierte mich die Auswirkung einer Pax3-Überexpression im Mittelhirn. Durch qualitative und quantitative Analyse mittels der PCR- und der qRT-PCR- Technik verglich ich nach Überexpression von Pax7 und Pax3 als auch nach Reduktion von Pax7 die Expression von Pax7 und Pax3 als auch deren Auswirkungen auf diverse Zellzyklusgene im dorsalen und ventralen Mittelhirn des Hühnerembryos mit dem Ziel, eine Aussage über das Konzentrationsverhältnis und somit die gegenseitige Regulation von Pax7 und Pax3 im Mittelhirn treffen zu können.

2. Material und Geräte

2.1. Tierisches Verbrauchsmaterial

Laut dem deutschen Tierschutzgesetz in der Neufassung vom 18. Mai 2006 fallen Eingriffe oder Behandlungen an Embryonen, Feten oder bebrüteten Eiern gemäß §§ 1,4,17 TierSchG nicht unter den Begriff eines Tierversuches und unterliegen weder einer Anzeige- noch Genehmigungspflicht. Demnach zählen die verwendeten Hühnerembryonen nicht zu Versuchstieren und werden als Verbrauchsmaterialien aufgeführt. Trotz der bestehenden rechtlichen Grundlage wurden die Hühnerembryonen mit dem nötigen Respekt behandelt.

Hisex Bruteier: Firma Weiss, Kirchberg/Iller

2.2. Chemikalien und Lösungen:

Alle Chemikalien zur Herstellung der Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen SIGMA, Steinheim; Merck, München oder Roth, Karlsruhe bezogen. Alle Lösungen wurden steril hergestellt oder gekauft und waren von großer Reinheit. Reagenzien zur Manipulation von DNA und RNA, die nicht käuflich erworben wurden, wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt, um RNasen und andere Enzyme zu inaktivieren. DEPC wurde in einer 1:1000- Verdünnung zu den Lösungen gegeben, über Nacht inkubiert und autoklaviert.

2.2.1. Elektroporation und Arbeiten am Hühnerembryo

Tabelle 1: Materialien: Elektroporation und Arbeiten am Hühnerembryo

Material	Inhaltsstoffe/ Zusammensetzung	Hersteller
Ethanol (EtOH 70%)		
PBS	10fach konzentrierte Stammlösung 1,37 M NaCl 27 mM KCl 15 mM KH ₂ PO ₄ 117 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4	
Fast Green	10 mg Fast Green in 1 ml H ₂ O	Sigma, Steinheim
Penicillin/ Streptomycin- Mischung	10.000 U/ml Penicillin 10 g/l Streptomycin in 0,9% NaCl-Lösung	PAA, Pasching
Tinte	Font India, No 221143 4 ml PBS 5 µl Pen/Strep-Mischung	Pelikan, Hannover
PFA	40 g PFA in 1l 1xPBS	

	pH 7,4 (mit NaOH)	
Mowiol/DABCO Mischung	2,4 g Mowiol 6 g Glycerol 6 ml H ₂ O 25 mg/ml DABCO 12 ml Tris- HCl (pH 8,5)	Callbiochem, Kanada Merck, München
PBS- Glycerol (Lagerungslösung)	5 ml PBS 45 ml Glycerol 0,001% Thiomersal (Spatelspitze DABCO für fluoreszierende Proben)	
Enzyme	DNase Dispase 6 U/ml	Boehringer, Mannheim Roche, Mannheim

2.2.2. Arbeiten mit RNA

Die Lösungen, die bei der Arbeit mit RNA verwendet wurden, waren stets von großer Reinheit oder DEPC- behandelt, um RNasen zu inaktivieren und wurden ausschließlich für Arbeiten mit RNA verwendet. Die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte durch eine Fällungsreaktion (PeqGold). Die Bestandteile der im Kit enthaltenen Puffer und Lösungen können der Anleitung entnommen werden. Der RLT- Puffer des RNeasy Mini Kits wurde zusätzlich zur Lagerung von präpariertem Hirngewebe verwendet.

Tabelle 2: Materialien: Arbeiten mit RNA

Material	Inhaltsstoffe/ Zusammensetzung	Hersteller
PeqGold RNS Pure	siehe Hersteller	PeqLab, Erlangen
RNeasy Mini Kit	RLT-Puffer enthält Guanidiniumisothiocyanat und 2-Merkaptoethanol	Qiagen, Hilden
RT-PCR	RNaseOUT™ OligoDT dNTPs DTT Puffer: 5x First Strand-Buffer (beinhaltet 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)	Invitrogen, Karlsruhe
Enzyme	SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe

2.2.3. Arbeiten mit DNA

Tabelle 3: Materialien: Arbeiten mit DNA

Material	Inhaltsstoffe/Zusammensetzung	Hersteller/ Firma
PCR- Zusätze	50 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂) Dimethylsulfoxid (DMSO) 10x PCR- Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500mM KCl; inklusive 50mM MgCl ₂) PCR- Puffer ohne MgCl ₂ dNTP mix 10mM	
TBE	10-fach konzentrierte Stammlösung 108g (890 mM) Tris Base 55g (890 mM) Borsäure 40g EDTA- Lösung (0,5 M, pH 8,0) auf 1l mit H ₂ O	
6x Ladepuffer	4 g Sucrose 0,025 g Bromphenolblau (Na-Salz) in 10 ml H ₂ O	
Ethidiumbromidbad	50 µl Ethidiumbromid (10 g/l Stammlösung) auf 250 ml H ₂ O	
Agarose		Invitrogen, Karlsruhe
DNA- Größenstandards (Ladder)	Mischung: 1µl Standard, 1µl 6x Ladepuffer, 4µl H ₂ O Fermentas GeneRuler: 0,5 µg/µl NEB LMW Ladder: 0,5 µg/µl. (0,5 µg/lane) Invitrogen 1 kb Plus DNA Ladder: 1µg/µl (0,9µg/lane)	
qRT- PCR	2x SYBR® Green PCR MasterMix beinhaltet SYBR® Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, Passivreferenz und optimierte Pufferkomponenten Primer fwd/rev (siehe Primerliste im Anhang)	Applied Biosystems, USA
Enzyme	AmpliTaq® DNA Polymerase	Applied Biosystems, USA

2.3. Geräte und Zubehör

2.3.1. Arbeiten am Hühnerembryo

Tabelle 4: Geräte und Zubehör: Arbeiten am Hühnerembryo

Material	Name	Hersteller, Firma
Glaskapillaren für Mikroinjektionen		World Precision Instruments, Japan
Silikonmasse (Baysilone-Paste)		GE Bayer Silicones, Leverkusen
Inkubatoren		Ehret, Emmendingen
Puller zur Herstellung von Glaskapillaren	PUL-1	World Precision Instruments, Berlin
Elektroporator:	Intracel TSS10	Intracel, UK
Binokular:	Stemi 2000-C Leica DM II Fluorescence	Zeiss, Göttingen Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop:	Axiovert 200	Zeiss, Göttingen
Schüttler:	IKA-VIBRAX-VXR	Janke & Kunkel, Staufen

2.3.2. Arbeiten mit RNA und DNA

Tabelle 5: Geräte und Zubehör: Arbeiten mit RNA und DNA

Gerät	Name	Firma
PCR-Geräte:	Primus 96 plus	MWG Biotech, Ebersberg
	MyCycler	Biorad, München
(Spektral)Photometer	Gene Quant	Pharmacia, Freiburg
Geldokumentation	Image Master VDS	GE Healthcare, Uppsala
Transilluminator:	MacroVue UV-25	Hoefer, USA
qRT-PCR- Gerät	7500 Fast & 7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, USA
Zentrifugen für Mikroreaktionsgefäße	Centrifuge 5415D MiniSpin Biofuge fresco	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau

2.4. Plasmide und Expressionsvektoren

Alle Vektoren wurden zur Elektroporation am Hühnerembryo verwendet. Sofern nicht anders vorgegeben wurden die verwendeten Plasmide aus pCAGGS generiert (Miyazaki, Takaki et al. 1989). Alle Expressionsvektoren haben einen CMV- Enhancer und einen Hühnchen β -Actin-Promotor. Eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES, engl. internal ribosomal entry site) zur Vermittlung der mRNA- Bindung an die Ribosomen wurde für die Co-Expression des Reportergens zur Kontrolle der Transfektionseffizienz eingesetzt. Zur Vermehrung wurden die Vektoren auf kompetente *E.coli*- Zellen transformiert und mittels kommerziell erhältlichen Kits

isoliert. Nach Dephosphorylierung und Ligation konnten die Vektoren für die weiteren Analysen verwendet werden. Bei Durchführung der Experimente lagen die Plasmide bereits gebrauchsfertig vor und konnten ohne weitere Aufbereitung für die Elektroporation verwendet werden. Nachfolgend ist eine Beschreibung der verwendeten Plasmide dargestellt, die jeweiligen Karten von pCAGGS und der anderen Vektoren befinden sich im Anhang (Anhang B- D).

EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein): EGFP ist das grünfluoreszierende Reportergen der unten angegebenen Kontrollvektoren pCAX und pMES. Da die Expression von EGFP proportional zu der Expression des elektroporierten Zielgens ist, kann somit eine Aussage über das Transfektionsausmaß in der gewünschten Zielregion getroffen werden.

pCAX- und pMES- Kontrollvektor: Der pCAX-EGFP- Vektor wurde mit pSilencerTM als Kontrollvektor in die gewünschte Zielregion injiziert. Separate Injektion von pCAX erfolgte als Kontrollelektroporation. Der pMES- Vektor, der aus dem pCAX- Vektor generiert wurde, wurde bei der Konstruktion des Pax7- Expressionsvektors verwendet.

Pax7 pMES: Zur Überexpression von Pax7 wurde die Pax7- Sequenz in den pMES- Vektor mit EGFP subkloniert. Das entstandene Plasmidkonstrukt führt zu einer regionalen Pax7- Überexpression und lässt zum anderen durch die GFP- Fluoreszenz eine Aussage über das Transfektionsausmaß zu.

pSilencerTM 1.0 siRNA Expressionsvektor (siPax7): Das Rückgrat des pSilencerTM- Vektors wurde käuflich erworben (Ambion, Darmstadt). Dabei wurden ausgewählte DNA- Fragmente spezifisch für Hühnchen-Pax7 zu siRNA transkribiert und in den pCAX-Vektor geklont. Die kurzen siRNA- Stücke interferieren nach Elektroporation mit der komplementären Pax7- Sequenz und führen zu einer Verminderung von Pax7- mRNA.

Pax7 EnR: Engrailed (EnR) ist ein Transkriptionsfaktor, der bei der Fruchtfliege die Polarität der Körpersegmente festlegt (Jaynes and O'Farrell 1991). Wird EnR auf den Expressionsvektor pMIW mit der Pax7- Gensequenz übertragen, so fungiert dieses Konstrukt als Transkriptionsrepressor von Pax7. Die Gensequenz von Pax7 ist zwar

vorhanden, jedoch werden alle sonst von Pax7 aktivierten „downstream“-gelegenen Gene nun gehemmt.

Pax3 HA: Der kodierende Abschnitt des Pax3-Polypeptides wurde an ein c-terminal lokalisiertes Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) generiert und in den Hühnchen Expressionsvektor pMIW subkloniert (siehe Agoston, Li et al. 2012). Dieses Plasmidkonstrukt wurde zur Überexpression von Pax3 verwendet.

2.5 . Primerdesign und Primerliste

Die verwendeten Primer wurden für vorherige Arbeiten mit dem Programm DNA Star, Lasergene erstellt oder aus der Literatur entnommen (Zeeb 2008, Primer für p53, E2f1: aus Kim, You et al. 2001). Gekauft wurden die Primer von eurofins MWG, Ebersberg. Alle Primer wurden vor Anwendung auf 10µmol/l verdünnt. Eine Zusammenstellung aller Informationen zu den Primern findet sich in der Primerliste (Anhang E).

2.6. Programme, Software, Webseiten

Microsoft Office™- Programme: Word™, Excel™, PowerPoint™

Grafikdesign- Anwendungen: Adobe Illustrator™, PhotoShop™, Adobe Acrobat™

EndNote X5

qRT-PCR –Software: System Applied Biosystems' HRM Software, Version 2.0.1 für 7500 Fast Real-Time PCR

Lasergene DNA-Star

Zeiss Axio Vision

Internet websites:

PubMed: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Tutorial von Applied Biosystems: “Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR”

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf

3. Methoden

3.1. Allgemein

Bei allen Arbeitsschritten wurde höchsten Wert auf steriles Arbeiten gelegt. Das in den Experimenten verwendete Material war steril verpackt oder wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Die Arbeitstische wurden vor jeder Tätigkeit mit EtOH (70%) behandelt. Die Instrumente zur mikrochirurgischen Manipulation am Hühnerembryo waren steril und wurden direkt vor ihrer Verwendung mit dem Gasbrenner abgeflammt. Für alle Arbeiten mit mRNA und cDNA wurden stets frische Pipettenspitzen und speziell für mRNA-Arbeiten gesonderte Pipetten verwendet sowie ausschließlich mit Einmal-Handschuhen gearbeitet.

3.2. Manipulationen am Hühnerembryo

3.2.1 Inkubation und Präparation

Die Lagerung der Bruteier erfolgte bei 18°C, die Inkubation bei 37°C mit einer Luftfeuchtigkeit von 65%. Vor der Inkubation wurden die Eier zur Lokalisation des Embryos an der Oberseite markiert und danach nicht mehr gedreht. Um eine Aussage über das Entwicklungsstadium treffen zu können, wurde die Einteilung von Hamburger und Hamilton zu Rate gezogen, wonach sich anhand der Anzahl der Somiten das gewünschte Entwicklungsstadium des Embryos bestimmen lässt (siehe Hamburger and Hamilton 1992, Abbildung 9, sowie Tabelle 6).

Tabelle 6: Entwicklungsstadien nach Hamburger und Hamilton (Hamburger and Hamilton 1992).

Entwicklungsstadium	Darstellungen	Inkubationszeit (h)
HH 7	1 Somit	23- 26
HH 8	3-4 Somiten	26- 29
HH 9	7 Somiten	29- 33
HH 10	10 Somiten	33- 38
HH 11	13 Somiten	40- 45
HH 12	16 Somiten	45- 49
HH 13	19 Somiten	48- 52
HH 14	22 Somiten	50- 53
HH 15	Anlage der Extremitäten	50- 55
HH 16	Schwanzknospe sichtbar	51- 56

Um auf die frühe Etablierung der dorsoventralen Region Einfluss nehmen zu können, wurden zur Elektroporation Embryonen der Stadien 8-11 verwendet (Li, Hornbruch et al. 2005), fixiert und analysiert wurden Hühnerembryonen der Stadien 14-16. Vor

Beginn der Präparation wurden die Eier aus dem Inkubator entnommen, mit 70 % EtOH desinfiziert und auf eine selbst entwickelte Vorrichtung platziert. Zur Ablösung des Embryos von der Schale wurde mittels einer Kanüle eine Perforation an der stumpfen Seite des Eis gesetzt und mit einer Spritze 2 ml Eiweiß abgesaugt. Danach wurde die Eischale an der oben liegenden Seite mit einer kleinen Präparationsschere 2 cm oval aufgeschnitten, sodass im Zentrum der Embryo zum Vorschein kam. Zur optischen Darstellung des Embryos wurde unter dem Stereomikroskop mittels einer Kapillare vom Rande der Area opaca ausgehend durch die Vitellinmembran 1 ml Tinte direkt unter den Embryo in die Subgerminalhöhle injiziert. Der Embryo war nun von dorsal für weitere Manipulationen zugänglich und konnte für die in-ovo-Elektroporation verwendet werden.



Abbildung 9: Einteilung der Entwicklungsstadien eines Hühnerembryos anhand der Anzahl der Somiten nach Hamburger und Hamilton. Zu sehen sind die Stadien 3 bis 17. © Prof. Judy Cebra Thomas, Swarthmore College: Chick Embryonic Development.

3.2.2 In-ovo Elektroporation

3.2.2.1. Allgemein

Die Elektroporation ist eine verbreitete Technik zur DNA-Transfektion, bei der es durch das gezielte Setzen von elektrischen Impulsen zu einer kurzfristigen Durchlässigkeit der Zellmembran kommt und negativ geladene DNA entlang des elektrischen Feldes in

Zellen geschleust werden kann (De Vry, Martinez-Martinez et al. 2010). Diese Technik wurde zuerst in-vitro zur Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien und 1991 das erste Mal in-vivo zur Elektroporation von Plasmid-DNA in Hautzellen neugeborener Mäuse angewendet (Titomirov, Sukharev et al. 1991). Die erstmalige Anwendung im ZNS in Form der in-ovo- Elektroporation erfolgte 1997 (Muramatsu, Mizutani et al. 1997) und ist seitdem eine etablierte Methode in der neurobiologischen Forschung. Aktuell kann die Elektroporation in-/ex-utero, in-/ex-ovo bei Embryonen als auch postnatal bei verschiedenen Tierarten angewendet werden und ist unterschiedlichen Organstrukturen wie dem ZNS, dem Muskelgewebe oder Tumoren verschiedener Gewebetypen zugänglich geworden (Prud'homme, Glinka et al. 2006; Barnabe-Heider, Meletis et al. 2008; De Vry, Martinez-Martinez et al. 2010). Weitere Experimente veranschaulichen eine elektroporationsbedingte Transfervverstärkung von Impfstoffen oder Chemotherapeutika im Rahmen von Tumorthapien (Kaptein, Jungscheleger-Russell et al. 2008; Agerholm-Larsen, Iversen et al. 2011; Chiarella, Fazio et al. 2012). Dies könnte in Zukunft zur Elektrochemotherapie von Hirntumoren, zur Behandlung von degenerativen ZNS-Erkrankungen wie M. Alzheimer und M. Parkinson oder auch zur Behandlung von psychiatrischen Erkrankungen wie Depression angewendet werden (Prud'homme, Glinka et al. 2006; Mir 2008; Zupanic, Kos et al. 2012).

3.2.2.2 Versuchsbeschreibungen

Nach Entfernung der restlichen Vitellinmembran mit einer feinen Präparationspinzette wurden unter dem Stereomikroskop einige Tropfen einer PBS-Penicillin/Streptomycin-Mischung auf den Embryo gegeben. Die zu elektroporierende DNA-Lösung bestand aus dem gewünschten Vektor (Konzentration 1-2 µg/ml) und FastGreen in einem 1:20-Verhältnis. Diese wurde mittels einer Mikrokapillare in das Lumen des Neuralrohrs auf Höhe des Mesencephalons im Bereich der MHB (mid-hindbrain boundary) injiziert. Anschließend wurden zwei Platinelektroden links und rechts parallel zum Mittelhirn platziert und drei bis fünf Gleichstrompulse aus dem Pulssimulator gegeben. Aufgrund ihrer negativen Ladung wanderte die DNA im elektrischen Feld durch die kurzzeitig poröse Zellwand Richtung Anode. Folglich war das Gewebe auf der Seite der Kathode unbehandelt und diente als interne Kontrollseite. Die verwendeten Einstellungen des Elektroporators waren: Frequenz: 500Hz, Delay: 50ms, Width: 5ms, Voltage: 15V.

Danach wurden die Eier mit Gewebeband verschlossen und bis zum gewünschten Entwicklungsstadium für die weiteren Analysen inkubiert.

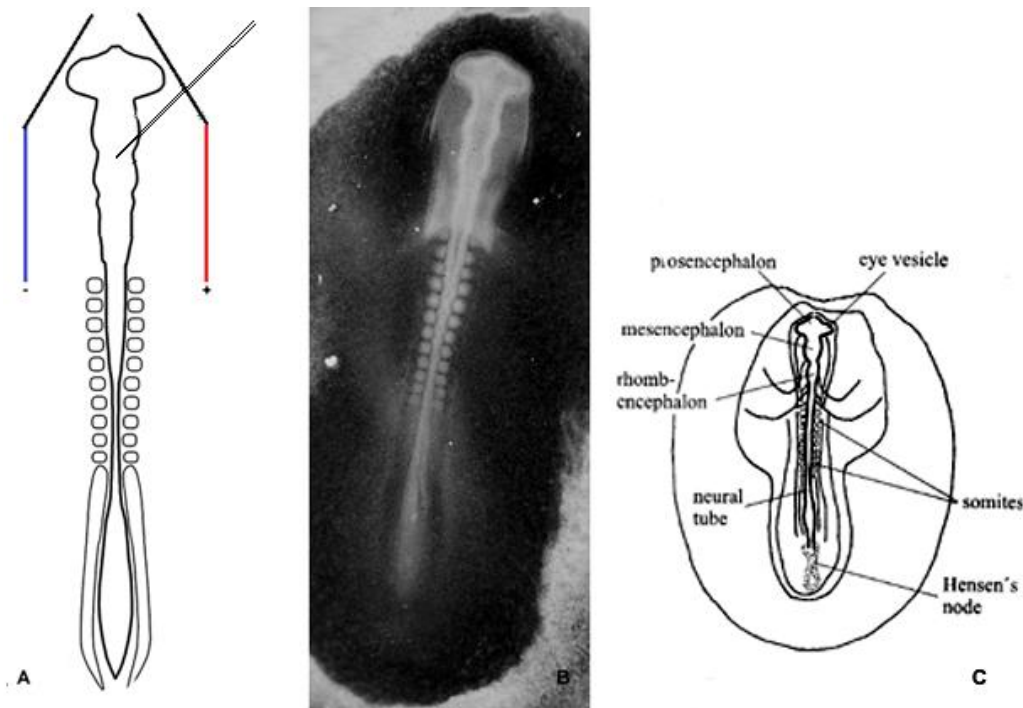


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Elektroporation am Hühnerembryo. **A:** Schema der Elektroporation am Hühnerembryo (rot: Kathode, blau: Anode, die Spitze zeigt auf die Injektionsstelle im Bereich der MHB). **B:** In-ovo- Photographie eines Stadium 10- Embryos von dorsal. Durch Injektion von Tinte in die Subgerminalhöhle wurden die embryonalen Strukturen sichtbar. **C:** Schematische Darstellung und Beschriftung (modifiziert nach Mey and Thanos 2000).

3.2.3 Kontrolle der Elektroporation und Präparation der Embryonen

24 Stunden nach der Elektroporation konnten die Embryonen zur weiteren Verarbeitung aus dem Ei entnommen werden. Die Embryonen wurden mitsamt der Vitellinmembran aus dem Ei geschnitten und in eine mit PBS-Lösung gefüllte Petrischale überführt. Unter dem Stereomikroskop wurde der Embryo bei kleiner Vergrößerung mit zwei Pinzetten vor allem im Bereich der umliegenden mesencephalen Region von den Membranen befreit. Danach wurden die freipräparierten Mittelhirne auf ihre Fluoreszenz überprüft. Zeigte sich unter dem Fluoreszenzbinokular eine ausreichende Transfektion in Form einer starken Grünfärbung, so wurden diese für die Analysen mittels PCR und qRT-PCR verwendet.

Zur optimalen Visualisierung wurde an den Mittelhirnen eine so genannte „open book preparation“ oder „flat mounts“ vorgenommen. Dabei wurden die mikrochirurgisch entnommenen Mittelhirne dorsal aufgeschnitten und aufgeklappt auf ein Glasplättchen

gelegt. Zur erleichterten Präparation des umgebenden Mesenchyms wurden die Mittelhirne 15 Minuten in Dispase inkubiert und dann in eine Petrischale mit PBS und DNase transferiert. Das Mesenchym wurde vom Neuralrohr entfernt und das freigelegte Mittelhirn mit einer Mikroschere dorsal aufgeschnitten. Weiterführend wurden die nun flachen Mittelhirne unter dem Fluoreszenzmikroskop für die mRNA- Isolation in vier Bereiche separiert: Ein ventraler und ein dorsaler Teil der elektroporierten Seite sowie ein ventraler und dorsaler Teil der Kontroll-Seite. Nicht GFP- exprimiertes mesencephales Gewebe wurde bei der Präparation der beiden elektroporierten Seiten so gut wie möglich entfernt. Die einzelnen Hirnteile wurden anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführt, gewogen und in RLT-Puffer bei -20°C gelagert.

3.3. mRNA- Manipulation

3.3.1. mRNA-Isolierung

Die Gewinnung und Aufreinigung von Gesamt- RNA aus den präparierten Gewebestücken erfolgte mit dem peqGOLD RNAPure™- Kit auf Phenol-Chloroform-Fällungs-Basis (Anleitung siehe Anhang F). Zum Aufschluss der Zellen und zur Inaktivierung von Proteinen wie den RNasen wurden die präparierten Mittelhirn-Gewebeteile in einem denaturierenden RLT- Puffer aus dem RNeasy Mini Kit durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Das Lysat wurde mit Chloroform extrahiert, die RNA mit Isopropanol gefällt und mit Ethanol nachgewaschen. Die einzelnen Schritte setzten sich wie folgt zusammen: Zunächst wurden $200\mu\text{l}$ Chloroform zum Homogenat gegeben und kräftig geschüttelt. Nach kurzer Inkubation und Zentrifugation trennte sich das Gemisch in drei Phasen, wobei die RNA als obere wässrige Phase abgenommen wurde. Nach Zugabe von $500\mu\text{l}$ Isopropanol erfolgte eine weitere Inkubation und Zentrifugation. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet zweimal mit 75% Ethanol gewaschen. Danach wurde das Pellet getrocknet und in $50\mu\text{l}$ H_2O aufgenommen. Reinheit und Konzentration der präparierten RNA wurde am Spektralphotometer überprüft und für die nachfolgende cDNA-Synthese notiert.

3.3.2. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren nach Isolierung aus dem Hirngewebe wurden $2\mu\text{l}$ Nukleinsäure auf $100\mu\text{l}$ H_2O verdünnt und bei 260 und 280nm spektralphotometrisch gemessen. Das Verhältnis von $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ zeigt die Reinheit

der Probe an, da die maximale Absorptionsrate von DNA und RNA bei 260nm liegt. Für DNA sollten die Werte >1,5 und für RNA die Werte >1,8 betragen. Durch den Extinktionswert bei 260nm lässt sich auch die Nukleinsäurenkonzentration jeder Probe (in ng/µl) berechnen, die dann für die folgende cDNA-Synthese verwendet wurde. Ein Absorptionswert von 1 entspricht dabei 50 µg/ml DNA und 40 µg/ml RNA.

3.3.3. cDNA-Synthese

Aus der in 3.1. extrahierten RNA erfolgte mittels der Reverse Transcriptase (RT)- PCR die cDNA-Synthese. Das dabei verwendete Enzym SuperScript™ II Reverse Transcriptase ist eine gentechnisch veränderte RNA- abhängige DNA-Polymerase mit erhöhter Hitzestabilität, das aus einzelsträngiger RNA komplementäre DNA -genannt cDNA- synthetisiert wird. Ein Ansatz beinhaltete ein Reaktionsvolumen von 20µl. Es wurde auf einen gleichmäßigen RNA-Gehalt der einzelnen Proben geachtet, der sich meist auf 100ng pro Ansatz belief. Die einzelnen Reaktionskomponenten (Tabelle 7, Schritt 1) wurden für 5 Minuten bei 65°C erhitzt, danach zentrifugiert und auf Eis gelegt.

Tabelle 7: Ablauf einer RT-PCR zur cDNA- Synthese; Ansatz für 20 µl cDNA

Versuchsschritte	
Schritt 1	1ng – 5µg RNA (gleichmäßig mit den anderen Proben, meist 100 ng)
	1 µl Oligo dT (500 µg/ml)
	1µl dNTP Mix (10 mM)
	auf 12µl mit H ₂ O auffüllen
<i>5 min, 65°C</i>	
Schritt 2	4 µl 5x First Strand-Buffer (beinhaltet 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)
	2 µl DTT (0,1 M)
	1 µl RNase Out
<i>2 min, 42°C</i>	
Schritt 3	1 µl Superscript II RT (200U)
<i>60 min, 42°C</i>	
<i>15 min, 70°C</i>	

Nach Zugabe des Puffers, des DTT und des RNase-Inhibitors wurde der Ansatz bei 42°C für 2 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 1µl SuperScript II RT erfolgte eine weitere Inkubation von 50 Minuten bei 42°C. Nach anschließender Inkubation von 15 Minuten bei 70°C wurde die Reaktion unterbrochen und die cDNA konnte nun als

Matrize für weitere Amplifikationen herangezogen werden. Die cDNA-Proben wurden im Labor bei -20°C im Gefrierschrank gelagert und ohne weitere Aufreinigung für die PCR- und qRT-PCR-Analysen verwendet.

3.4. cDNA- Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurde die cDNA der verschiedenen Proteine qualitativ als auch quantitativ untersucht. Die qualitative Untersuchung erfolgte durch die Methodik der Polymerase-Kettenreaktion und die quantitative durch die Methodik der qRT-PCR (quantitative Echtzeit- Polymerase- Kettenreaktion).

3.4.1. PCR

3.4.1.1. Allgemein

Die zu Beginn der 1980ern entwickelte Polymerase- Kettenreaktion (Mullis, Faloona et al. 1986) wurde in der vorliegenden Arbeit zur Effizienzprüfung und zum ersten quantitativen Vergleich der ventralen und dorsalen Genexpression nach Elektroporation verwendet.

3.4.1.2. Versuchsaufbau und Standardprotokolle

3.4.1.2.1. Bestandteile einer PCR

Folgende Bestandteile sind essentiell für eine korrekte Amplifikation von Zielsequenzen mittels der PCR (Mengenangaben siehe Tabelle 8):

Tabelle 8: Bestandteile eines PCR-Ansatzes für ein Gesamtvolumen von 25 μl (ohne Zusätze).

Bestandteile:
1 μl Ausgangs- cDNA
0,25 μl <i>Taq</i> -Polymerase (10 U/ μl)
1 μl dNTP- Mix
1 μl Primer fwd (10 μM)
1 μl Primer rev (10 μM)
2,5 μl 10x PCR-Puffer
18,25 μl H ₂ O (destilliert, autoklaviert)
<i>25 μl Gesamtvolumen</i>

Als Matrize für die vorliegenden PCR-Analysen dienten die zuvor synthetisierten cDNA-Proben. Diese wurden vor Anwendung aus dem Kühlschrank entnommen und bis zur Anwendung auf Eis gelagert. Es wurde für die PCR-Analysen cDNA aus Elektroporationen mit folgender Plasmid-DNA verwendet: Pax7, siPax7, Pax7EnR,

Pax3HA und GFP Wildtyp als Kontrollelektroporation. Durch den Einbau der vier komplementären Nukleotide (dNTPs- Deoxyribonukleotidtriphosphate) wird die vorliegende einzelsträngige Matrize ausgehend von den Primern zu einem Doppelstrang synthetisiert. Zum Einsatz müssen dabei thermostabile Polymerasen kommen, da ansonsten nach jedem Denaturierungsschritt neue DNA-Polymerase zugegeben werden müsste. Eine häufig verwendete thermostabile gentechnisch hergestellte DNA-Polymerase ist die *Taq*- Polymerase.

Als essentieller Bestandteil einer PCR dienen die synthetisch hergestellten, einzelsträngigen Oligonukleotide als Startpunkt der DNA-Polymerase. Sie sind ca. 15-20 Nukleotide lang, jeweils komplementär zum 5'-bzw. 3'-Ende der Matrize und begrenzen die zu amplifizierende Region. Zur optimalen Reaktion muss für das jeweilige Primer-Template-Paar eine individuelle Schmelztemperatur (T_m) für die Annealingphase berechnet werden (Primerliste im Anhang E, Roux 2009). Eine optimale PCR- Reaktion wird auch durch das Verhältnis von Reaktionspuffer, Magnesium und von weiteren Zusätzen garantiert. Das Aktivitätsmaximum der Polymerasen befindet sich bei einem $pH > 8$, die verwendeten Reaktionspuffer haben deshalb meist einen pH -Wert von 8,3 bis 9 (Lorenz 2012). Der in der PCR-Reaktion verwendete kommerziell erhältliche Standardpuffer beinhaltet 500 mM Kaliumchlorid, sowie 200 mM Tris- HCL und 50mM $MgCl_2$ bei einem pH von 8,4.

Mg^{2+} wird in Form von Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) eingesetzt und spielt eine wichtige Rolle als Kofaktor der thermostabilen DNA-Polymerase (Roux 2009; Lorenz 2012). Kleine Veränderungen der freien Magnesiumkonzentration können den Ausgang einer PCR stark verändern, sodass im Verlauf die optimale Mg^{2+} - Konzentration für die eingesetzten Matrizen cDNA und die Primer ausgetestet wurde. Bei den vorliegenden Experimenten wurde bei GC-reichen Sequenzen >60% auf die Verwendung des Zusatzes Dimethylsulfoxid (DMSO) zurückgegriffen. Die Zufuhr von DMSO destabilisiert die Doppelhelix und hilft eine cDNA-Matrix mit sehr hohem GC-Anteil schneller aufzuschmelzen (Hube, Reverdiau et al. 2005).

3.4.1.2.2. Versuchsablauf

Für jede PCR wurde ein so genannter Mastermix erstellt, der alle notwendigen Reaktionsprodukte bis auf die jeweils zu amplifizierende cDNA enthielt. Das Reaktionsgemisch wurde nach kurzer Zentrifugation auf die jeweiligen Eppendorf-

Reaktionsgefäße verteilt, auf Eis gelegt und jeweils 1µl cDNA dazu pipettiert. Zusätzlich wurde für jeden Reaktionsablauf eine Negativkontrolle erstellt (enthielt 25µl destilliertes H₂O), um eventuelle Kontaminationen aufzudecken. PCR-Ansätze, die eine positive Negativkontrolle enthielten, wurden verworfen. Die für die Amplifikation notwendigen Bedingungen wie Hybridisierungstemperatur, Salzkonzentration im Puffer und eventuelle Zusätze wie DMSO wurden für noch unbekannte Primer- und Template-Kombinationen ausgetestet und dementsprechend modifiziert. Das Protokoll einer Standard-PCR ist der Tabelle 9 zu entnehmen. Nach abgelaufener Reaktion wurden die Eppendorf- Reaktionsgefäße aus dem Cyclor entnommen, kurz zentrifugiert und bei 4°C im Kühlschrank kurzfristig bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Tabelle 9: Protokoll einer Standard-PCR. Die Schritte 2. bis 4. wurden in der Regel 25-30-mal wiederholt.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95°C	5min
2. Denaturierung	95°C	45s
3. Annealing	55°C bis 65°C abhängig von den verwendeten Primern (siehe Primerliste im Anhang)	50s
4. Synthese	72°C	45s
5. Endsynthese	72°C	5 min
6. Ruhe/Reaktionsstopp	20°C	∞

3.4.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Amplifikation der PCR-Produkte wurde mittels der Agarose- Gelelektrophorese nachgewiesen. Diese Methode gab zusätzlich einen qualitativen Überblick und konnte durch Messung der Dicke und Intensität der Banden semi-quantitativ bewertet werden. Zusätzlich konnten die Primer durch das Auftreten von Nebenbanden und Schmierlinien im Agarosegel auf ihre Spezifität überprüft werden. Für DNS-Fragmente von 200 bis 1000bp wurden 1%ige Gele verwendet, für größere Fragmente 2%ige Gele. Zu diesem Zweck wurde die Agarose abgewogen, mit entsprechenden Volumenanteilen TBE-Puffer gemischt und in einem Mikrowellenherd erhitzt, bis die Agarose sich vollständig in Lösung befand. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde das flüssige Gel ohne Luftbläschen in eine vorbereitete Gelhalterung mit Kamm gegossen. Nach vollständiger Erstarrung der Agarose wurde der Kamm entfernt und die mit Ladepuffer versetzten Zielsequenzen (25µl Probe und 5 µl Bromphenolblau) in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurden 12-14 µl eines DNA-Längenstandards in eine Tasche pipettiert, um

die Größe der amplifizierten Sequenzen anhand ihrer Basenpaare abschätzen zu können. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte innerhalb von 45-70 Minuten bei einer Spannung von 100V und max. 400 mA. Das Gel wurde anschließend für 15 Minuten in ein Ethidiumbromid-Färbepad gelegt. Das bei UV-Licht fluoreszierende Ethidiumbromid interkaliert zwischen die CG-Basenpaare der DNA-Doppelhelix und macht diese durch Anwendung von UV-Lampen sichtbar. Zur Protokollierung wurden die Gele mit einem Bildverarbeitungssystem erfasst, gespeichert und ausgedruckt.

3.4.3. Quantitative PCR aus cDNA

3.4.3.1. Allgemein

Eine zuverlässige Methode zur quantitativen Analyse spezifischer cDNA ist die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR). Im Vergleich zur konventionellen Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die qRT-PCR nicht nur die qualitative Darstellung eines amplifizierten Gens sondern veranschaulicht auch in welchem Ausmaß dieses exprimiert wird. Zusätzlich erhält man durch die gleichzeitige Amplifikation und Detektion der zellulären DNA-Menge ein sofortiges Expressionsergebnis während der PCR. Die qRT-PCR gilt als effiziente Methode in der Grundlagenforschung zur Quantifizierung von Genexpressionsmustern während Zelldifferenzierung und –entwicklung (Holzapfel and Wickert 2007), als auch in der Veterinär- und Humandiagnostik zur Bestimmung der Viruslast (Mackay, Arden et al. 2002) oder in der klinischen Pharmakologie zur Effektivitätsprüfung neuer Wirkstoffe (Guo Dx Fau - Li, Li Hp Fau - Li et al.).

Zur Detektion der akkumulierenden Produkte wurde der Farbstoff SYBR Green® verwendet. Im ungebundenen Zustand weist dieser Farbstoff nur eine sehr geringe Fluoreszenz auf. Interkaliert dieser Farbstoff jedoch im Verlauf der qRT-PCR sequenzunspezifisch an doppelsträngige DNA, kommt es nach Anregung mit ultraviolettem Licht zu einer Fluoreszenzemission (Zipper H Fau - Brunner, Brunner H Fau - Bernhagen et al.), die von der zugehörigen Software erfasst und in Echtzeit als Funktion des PCR- Zyklus dargestellt wird. Die Fluoreszenzintensität wird dabei am Ende eines jeden Elongationsschrittes gemessen und ist proportional zur Konzentration des Amplifikationsproduktes. Im Verlauf der qRT-PCR gibt es zu Beginn der exponentiellen Reaktionsphase einen Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenzstärke erstmals

signifikant die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Diesen Zyklus bezeichnet man als Schwellenwert-Zyklus (engl. Cycle-Threshold C_T), der den niedrigsten messbaren positiven Wert jeder Probe im Verlauf der qRT-PCR angibt. Dieser ermöglicht einen Vergleich aller Proben im gleichen Reaktionsstadium und hat eine inverse Beziehung zur Menge des Amplikons der jeweiligen Reaktion. Das heißt: Je geringer der C_T -Wert einer Probe, desto höher ist die zu Anfang eingesetzte DNS-Menge (Schmittgen and Livak 2008).

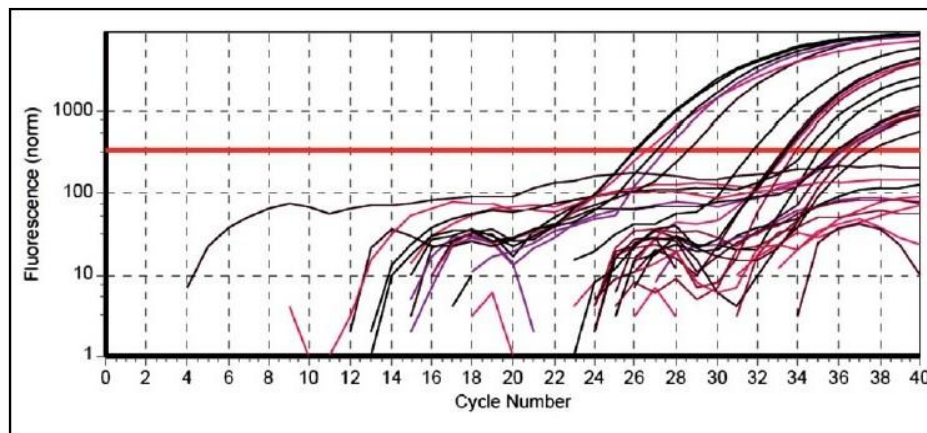


Abbildung 11: Darstellung des Cycle-Thresholds C_T : X-Achse Anzahl der Zellzyklus-Wiederholungen, y- Achse: Menge der Fluoreszenz. Ab einem bestimmten Punkt tritt die eigentlich Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz hinaus (roter Strich). Die Anzahl der Zellzyklen, bei der eine Probe dieses Stadium erreicht, wird Schwellenwert-Zyklus (engl. Cycle-Threshold C_T) genannt und wird für die weitere Analyse der Proben verwendet (George, Sriram et al. 2010).

3.4.3.2. Versuchsaufbau

3.4.3.2.1. Bestandteile

In der vorliegenden Arbeit wurde die qRT-PCR mit den gleichen Primern wie bei den vorhergehenden PCRs durchgeführt. Primer, die dabei kein aussagekräftiges Ergebnis hervorgebracht haben, wurden nicht für die aufwendige qRT-PCR verwendet. Als Zielsequenz wurden für die qRT-PCR nur cDNAs aus den Elektroporationen des dorsalen Mesencephalons eingesetzt.

3.4.3.2.2. Versuchsablauf

Der Ansatz einer Probe zur qRT-PCR lässt sich der Tabelle 10 entnehmen. Reaktionsansätze wurden, wie in Tabelle 10 angegeben, angefertigt und in ein Eppendorf- Reaktionsgefäß auf der 96- Mikrotiterplatte in den vorbereiteten Cyclyer gegeben. Um mehrere Primer gleichzeitig verarbeiten zu können, wurden die

Hybridisierungstemperaturen etwas vom Optimum entfernt (40 Zyklen, Hybridisierungstemperatur 60°C).

Tabelle 10: Ansatz für eine qRT-PCR Reaktion bei 20 µl/well Gesamtvolumen

Menge/Reaktion	Material/Reaktion
10µl	SYBR Green® Mix
5µl	cDNA (unverdünnt)
0,2µl	fwd Primer-Mix
0,2µl	rev Primer-Mix
4,6µl	H ₂ O
<i>insg. 20 µl/well Gesamtvolumen</i>	

3.5. Datenanalyse, Bildbearbeitung und Statistik

3.5.1. Arbeiten am Hühnerembryo

Die Embryonen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop auf grüne Fluoreszenz überprüft. Es wurde nur der Teil des Mesencephalons verwendet, der eine deutliche grüne Fluoreszenz gezeigt hat, sodass eine erfolgreiche Transfektion angenommen werden konnte. Aus diesen Gewebeanteilen wurde RNA und cDNA für die weiteren Analysen wie PCR und qRT-PCR hergestellt.

3.5.2. Arbeiten mit RNA

Nach der Gewinnung der Gesamt-RNA aus den elektroporierten Hirnteilen wurde die RNA- Konzentration jeder einzelnen Probe berechnet und notiert (siehe Tabellen 11,12 und 13, Kapitel Ergebnisse).

3.5.3. Arbeiten mit cDNA

3.5.3.1. Auswertung der Gel- Elektrophorese

Alle Kontrollen und Fotos der Gel- Elektrophorese wurden an dem oben aufgelisteten Fluoreszenz- Binokular durchgeführt. Mittels Bildbearbeitungsprogrammen wurde eine Übersicht der PCRs erstellt und hinsichtlich Qualität und Quantität der Banden miteinander verglichen.

3.5.3.2. Auswertung der qRT-PCR

Die Datenerhebung, Auswertung der Rohdaten und die Schmelzpunktanalyse erfolgten mit dem 7500 Fast Real- Time PCR System der Firma Applied Biosystems und der zugehörigen Software (Applied Biosystems' HRM Software, Version 2.0.1). Die

Diagramme der Schmelzpunktanalyse (Abbildungen 20 und 21) wurden daraus entnommen. Graphische Ausarbeitung als auch Berechnung der Standardabweichung erfolgte mit Microsoft Excel.

3.5.3.2.1. Statistische Auswertung

3.5.3.2.1.1. Die komparative C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)

Zur Analyse von qRT-PCR-Daten existieren grundsätzlich zwei Quantifizierungsmethoden: die absolute und die relative Quantifizierung (Yuan, Reed et al. 2006). Bei der absoluten Quantifizierung werden mittels einer Kalibrierungskurve exakte Mengen des Zielgens aus den unbekanntenen Proben berechnet. Verwendet wird diese Methode, wenn absolute Konzentrationsangaben des Amplikons vonnöten sind, wie zum Beispiel zur Angabe der Viruslast in der Infektiologie. Möchte man im Rahmen von Genexpressionsanalysen die Unterschiede von Expressionsmustern verschiedener Proben detektieren, so eignet sich dafür die relative Quantifizierungsmethode (Schmittgen and Livak 2008). Benötigt wird dabei als endogene Kontrolle ein Referenzgen, auf das sich die Daten des behandelten Gens beziehen lassen. Dieses sollte ubiquitär in konstanter Menge in den verwendeten Zellen vorkommen und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen konstant exprimiert sein. Dafür eignen sich so genannte Haushaltsgene (engl. housekeeping genes HKG), wie Beta-Actin, GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase), Beta-2-Mikroglobulin oder 18s-rRNA (Holzapfel and Wickert 2007). In den folgenden Experimenten wurde als Referenzgen das Haushaltsgen Beta-Actin gewählt, das als stabiles Haushaltsgen gilt (Li, Bang et al. 2005; Nygard, Jorgensen et al. 2007; McCulloch, Ashwell et al. 2012).

Eine Berechnungsart der relativen Quantifizierung, die für die Auswertung der folgenden Experimente verwendet wurde, ist die komparative C_T -Methode (Livak and Schmittgen 2001; Holzapfel and Wickert 2007), auch $\Delta\Delta C_T$ -Methode genannt. Sie zeigt den relativen Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, an. Sie ist besonders nützlich, wenn eine Vielzahl von Proben mit verschiedenen Zielgenen verglichen werden muss. Als erster Schritt erfolgte dabei die Normierung der C_T -Werte der experimentell behandelten Proben auf ein Referenzgen (in dieser Arbeit Beta-Actin), um Variationen in der Ausgangsmenge der cDNA-Proben oder geringe

Effektivitätsunterschiede während der PCR auszugleichen. Man erhält somit den ΔC_T -Wert einer Probe. Als zweiter Schritt wurde von den ΔC_T -Werten der experimentell behandelten Proben der jeweilige ΔC_T -Wert der internen Kontrolle abgezogen. Als interne Kontrolle dienten die Proben des Wildtyps. Daraus ergibt sich der so genannte $\Delta\Delta C_T$ -Wert. Als nächster Schritt wurde der so genannte Fold Change (FC) berechnet. Dieser gibt an, um welchen Faktor sich die experimentell veränderten Proben im Vergleich zum Kontrollgen verändert haben.

3.5.3.2.1.2. Schmelzkurvenanalyse

Wie schon in 3.4.2.1. beschrieben, wurden in den vorliegenden qRT-PCR-Versuchen der fluoreszierende Marker SYBR Green® verwendet, der aufgrund seiner unspezifischen Interkalation mit doppelsträngiger DNA neben der gewünschten Zielsequenz auch Primer-Dimere oder PCR-Nebenprodukte markieren kann. Mittels der Schmelzkurvenanalyse am Ende der qRT-PCR-Reaktion wird die Spezifität der PCR-Produkte überprüft. Dabei werden die Proben ausgehend von 50°C jeweils 1°C aufsteigend bis 95°C erhitzt. Bei einer reinen Probe mit hoher Spezifität kommt es zur Denaturierung des Doppelstrangs mit Abfall der Fluoreszenz bei einer bestimmten Temperatur, PCR-Produkte unterschiedlicher Größen weisen durch verschiedene Denaturierungstemperaturen mehrere Peaks auf und sind unspezifisch.

4. Ergebnisse

4.1. Elektroporation

Die Lokalisation der transfektierten Zellen im Mittelhirn wurde durch die Expression von GFP und der damit verbundenen Fluoreszenz des Gewebes unter dem Fluoreszenzbinokular angezeigt; in Abbildung 12 sind Beispiele verschiedener Elektroporationsergebnisse zu sehen.

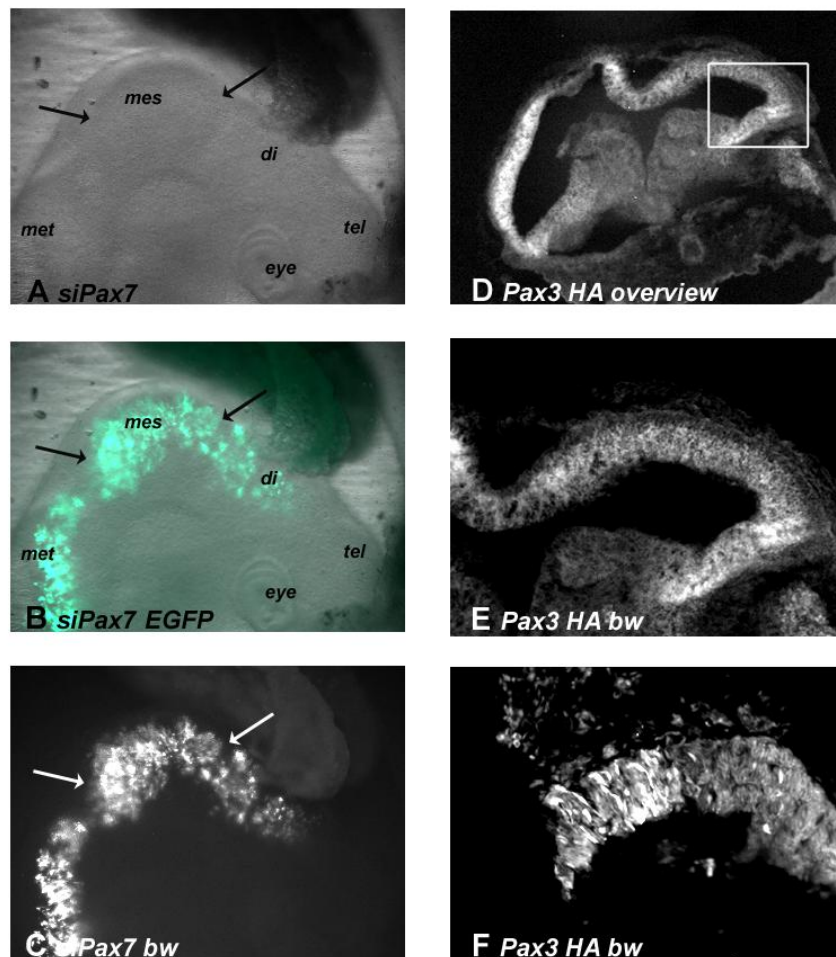


Abbildung 12: Elektroporationen am Beispiel von siPax7 (A-C) und Pax3HA (D-F). **A:** Laterale Ansicht des Gehirns eines Stadium E2-Hühnerembryos, deutlich zu erkennen ist die Mittelhirnblase (mes) und andere Hirnstrukturen wie die Augenanlage (eye) als auch das Diencephalon (di), das Telencephalon (tel) und das Metencephalon (met). Die schwarzen Pfeile geben die Grenzen der Mittelhirnblase an. **B** zeigt durch die grüne Fluoreszenz das Ausmaß der Transfektion im Di-, Mes- und Metencephalon an. Die schwarzen Pfeile geben die Grenzen der Mittelhirnblase an. Durch die starke GFP- Fluoreszenz des Mesencephalons kann von einer hohen Transfektionsrate des Plasmids (hier siPax7) ausgegangen werden. **C.** veranschaulicht dies in schwarz-weiß- Kontrastierung. Danach erfolgte die Präparation zu flat mounts (D-F, Stadium E4). **D** zeigt eine Übersicht des Mittelhirngewebes im Querschnitt an, **E** in stärkerer Vergrößerung (siehe weißes Rechteck in Abbildung D). **F.** Die dorsalen und ventralen Mittelhirnzellen mit starker Fluoreszenz wurden in einer höheren Vergrößerung für die weiteren Analysen aus dem Gewebe präpariert. Abkürzungen: mes- Mesencephalon, di- Diencephalon, tel- Telencephalon, met- Metencephalon, eye- Augenanlage.

Für die Analysen mittels PCR und qRT-PCR wurde mesencephales Gewebe verwendet, das zuvor mit GFP, Pax7, siPax7, Pax7 EnR oder Pax3 transfiziert wurde.

Die Elektroporation von Pax7 und Pax3 resultiert in einer Überexpression der beiden Gene; siPax7 sollte zu einer Verminderung von Pax7 mRNA führen, Pax7 EnR wandelt den Transkriptionsaktivator Pax7 in einen Transkriptionsrepressor um und führt dadurch zu einer Hemmung aller von Pax7 geförderten Gene. Das mit GFP transfizierte Gewebe wurde als Kontrollgewebe (nachfolgend Wildtyp oder Kontrollprobe genannt) verwendet, um Elektroporationseffekte ausschließen zu können. Da die vollständige Transfektion einer Mittelhirnhälfte nicht immer gewährleistet werden konnte, wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzbinokulars das transfizierte Gewebe identifiziert und nur dieses isoliert und für die weiteren Analysen verwendet. Die nicht transfizierte Mittelhirnhälfte wurde dabei immer als interne Kontrolle mit isoliert.

4.2. Gewinnung der mRNA

Die Konzentration und Reinheit der aus dem Mittelhirn extrahierten mRNA wurden nach der Aufreinigung photometrisch bestimmt (insgesamt Dreifachbestimmungen; Tabellen 11, 12 und 13 zeigen die Mittelwerte an). Für die RT-Reaktion wurden 100ng mRNA pro 20 µl Probe eingesetzt. Nachfolgend sind nur die Proben aufgelistet, die entweder für die in den Abbildungen gezeigten PCRs oder für die jeweiligen qRT-PCRs verwendet wurden.

4.2.1 Präparationen für die qualitative PCR- Analyse

Tabelle 11: Konzentrationsbestimmung der aus dem Mittelhirn isolierten mRNA für PCR-Analysen. Angabe des Entwicklungsstadiums der gepoolten Mittelhirne nach Hamburger und Hamilton und Datum der Präparation. Abkürzungen: EP- elektroporiert, K- Kontrollseite.

mRNA aus Datum der Präparation HH- Stadium	Probe	Messung (OD) Mittelwert	Konz. ng/µl
Wildtyp (Wt) 27.-28.06.10 HH 10-11	K dorsal	0,016	32
	EP dorsal	0,015	30
	K ventral	0,021	42
	EP ventral	0,021	42
Pax7 pMES 22-23.06.10 HH 9-11	K dorsal	0,008	16
	EP dorsal	0,020	40
	K ventral	0,012	24
	EP ventral	0,011	22
siPax7 27.-28.06.10 HH 9-11	K dorsal	0,021	42
	EP dorsal	0,016	32

	K ventral	0,051	102
	EP ventral	0,020	40
Pax7 EnR 22-23.06.10 HH 9-11	K dorsal	0,031	62
	EP dorsal	0,013	26
	K ventral	0,030	60
	EP ventral	0,012	24
Pax3 HA 22-23.06.10 HH 9-11	K dorsal	0,022	44
	EP dorsal	0,015	30
	K ventral	0,017	34
	EP ventral	0,016	32

4.2.2. Präparationen für die qRT-PCR- Analysen

Tabelle 12: Konzentrationsbestimmung der aus dem Mittelhirn isolierten mRNA für die erste qRT-PCR-Analyse. Für die qRT-PCR-Analysen wurden nur dorsale Elektroporationen verwendet. Angabe des Entwicklungsstadiums der gepoolten Mittelhirne nach Hamburger und Hamilton und Datum der Präparation. Abkürzungen: EP- elektroporiert.

dorsale mRNA aus	Alter/Datum HH Stadium	Messung (OD) Mittelwert	Konz. ng/µl
pCAX GFP dorsal (Wt)	12.05.09 HH 8-10	0,016	32
Pax7 pMES GFP dorsal	12.05.09 HH 8-10	0,012	24
siPax7 GFP dorsal	29.03.10 HH 9-10	0,029	58
Pax7 EnR EP dorsal	09.07.09 HH 8-10	0,021	42
Pax3 HA GFP dorsal	09.07.09 HH 8-10	0,031	62

Tabelle 13: Konzentrationsbestimmung der aus dem Mittelhirn isolierten mRNA für die zweite qRT-PCR- Analyse. Für die qRT-PCR-Analysen wurden nur dorsale Elektroporationen verwendet. Angabe des Entwicklungsstadiums der gepoolten Mittelhirne nach Hamburger und Hamilton und Datum der Präparation. Abkürzungen: EP- elektroporiert.

dorsale mRNA aus	Datum der Präparation Alter/Stadium HH	Messung (OD) Mittelwert	Konz. ng/µl
pCAX GFP dorsal (Wt)	27.-28.06.10 HH 10-11	0,015	30
Pax7 pMES GFP dorsal	22-23.06.10 HH 9-11	0,020	40
siPax7 GFP dorsal	12.-13.03.09 HH 8-10	0,022	44
Pax7 EnR EP dorsal	17.03.10 HH 9-10	0,018	36
Pax3 HA GFP dorsal	23.03.10 HH 9-10	0,024	48

4.3. PCR

4.3.1 Allgemein und Übersicht

Die cDNAs der in 4.2.1 angegebenen mRNAs wurden für die nachfolgenden PCR-Analysen verwendet. Um zu kontrollieren, ob aus jeder Gewebeprobe ähnliche Konzentrationen gewonnen werden konnten, erfolgte zuerst die PCR-Messung mit den Primern für die Haushaltsgene Beta-Actin und GAPDH, die ubiquitär in jeder Zelle vertreten sind. Gleichförmige Expression dieser Haushaltsgene spricht für eine gelungene Präparation und Vorbereitung der mRNA und cDNA mit ähnlichen Konzentrationsverhältnissen und lässt Vergleiche zwischen den einzelnen Proben zu. Eine gleichmäßige Expression der Haushaltsgene schließt zudem eine unspezifische Reaktion einzelner Proben auf Gewebeschädigungen im Verlauf der Elektroporation aus.

Zur Kontrolle der Elektroporationseffektivität wurde die Expression von EGFP für die PCR-Analysen herangezogen. Nur die Mittelhirnhälfte, die mit dem Zielgen als auch mit GFP elektroporiert wurde, sollte eine EGFP-Expression aufweisen, die Kontrollseite sollte demzufolge nur eine schwache oder bestenfalls keine GFP- Aktivität aufweisen.

Es erfolgten PCR-Analysen für Pax7 und Pax3 als auch für die einzelnen Komponenten des Zellzyklus. In der nachfolgenden Abbildung ist ein Vergleich der PCRs der ventralen und dorsalen Seite zu sehen (Abbildung 13). Die Proben wurden im Agarosegel ohne eine spezifische Reihenfolge aufgetragen und erst später in der gewünschten Reihenfolge zusammengestellt.

Im Agarosegel konnte neben einer qualitativen Aussage über die Ausgangsmenge an cDNA zusätzlich durch die Bestimmung der Dicke und der Intensität der Banden eine semi-quantitative Aussage getroffen werden.

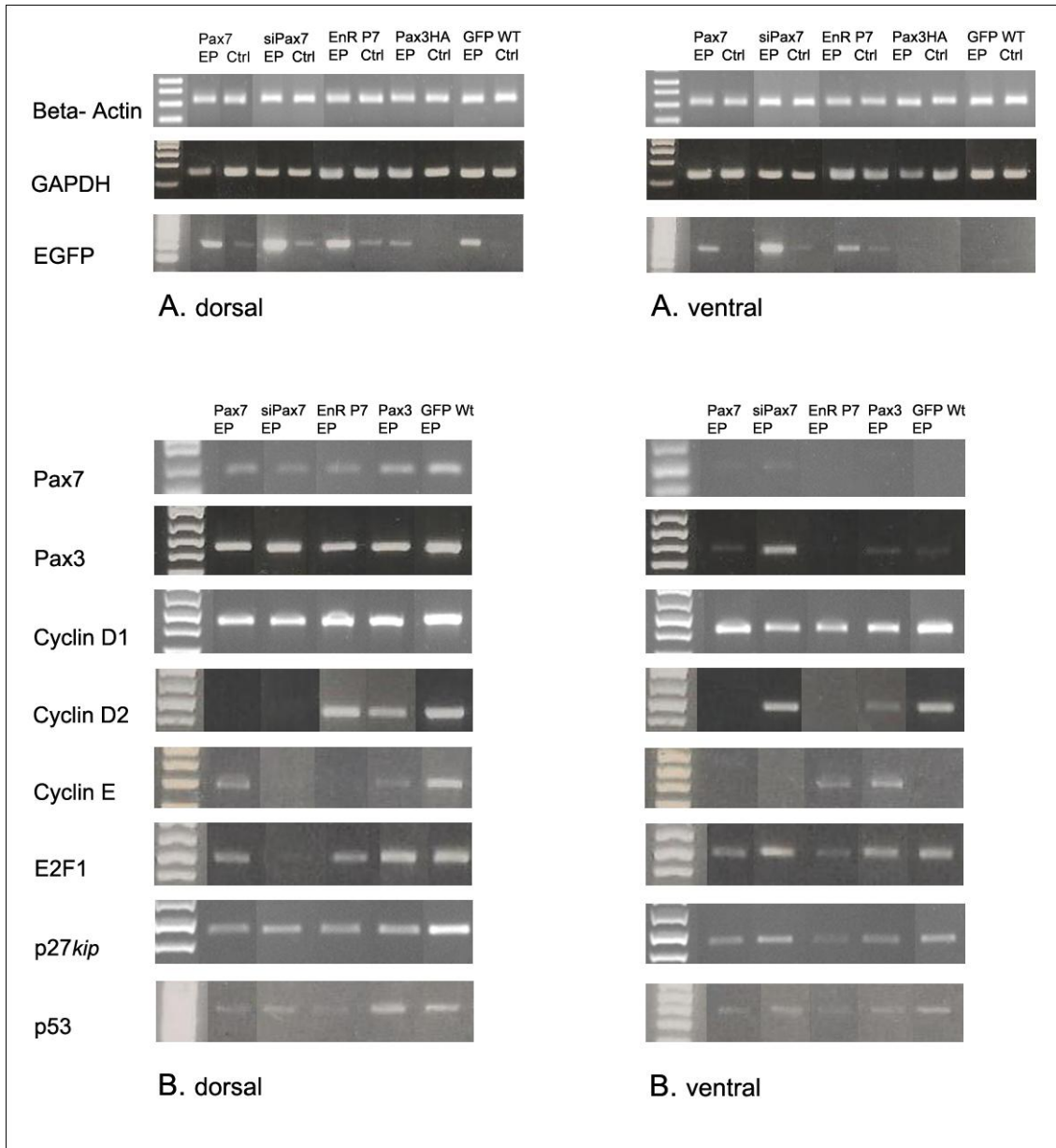


Abbildung 13: Qualitative PCR- Ergebnisse von elektroporiertem (EP) ventralen und dorsalem Mittelhirn. Die verschiedenen Transfektionen des Mittelhirngewebes sind über den Gelbanden angezeigt, die Gene, an denen eine PCR- Analyse vorgenommen wurde, sind auf der linken Seite angezeigt. **A** zeigt die PCR Ergebnisse der Haushaltsgene Beta-Actin und GAPDH aus dem dorsalen und ventralen Mittelhirn an, danach die Ergebnisse der Elektroporation mittels EGFP. Beta-Actin und GAPDH dienen als Haushaltsgene, die Stärke der EGFP-Bande gibt die Stärke der Transfektion an. Nachfolgend ist auch das PCR-Ergebnis jeder internen Kontrolle (Ctrl) dargestellt, das bei Beta- Actin und GAPDH veranschaulicht, dass eine unspezifische Reaktion einzelner Proben auf Gewebeschädigungen im Verlauf der Elektroporation ausgeschlossen werden konnte und das bei der Detektion von EGFP die gelungene Transfektion der einzelnen Proben im Vergleich zur internen Kontrolle präsentiert. **B**: PCR-Analysen der Pax-Gene und der Zellzyklusgene aus dem dorsalen und ventralen Mittelhirn.

4.3.2. Qualitative PCR- Ergebnisse der einzelnen Elektroporationen

Die PCR- Analysen der Haushaltsgene Beta- Actin und GAPDH zeigten eine fast gleichmäßige Expression bei den elektroporierten Proben als auch bei den Kontrollproben der ventralen und dorsalen Seite (Abbildung 14). Vor allem eine gleichmäßige Expression der beiden Proben des GFP Wildtyps ließ darauf schließen, dass bei den vorliegenden Proben von keinen ausgeprägten unerwünschten Elektroporationseffekten, wie zum Beispiel der Apoptose von neuronalen Zellen, auszugehen ist und es möglich ist die Proben untereinander zu vergleichen. Im Vergleich zu GAPDH wiesen die Proben von Beta- Actin eine noch gleichmäßigere Expression auf. Deswegen wurde Beta-Actin bei den nachfolgenden qRT-PCR- Analysen als Referenzgen zur internen Kontrolle verwendet.

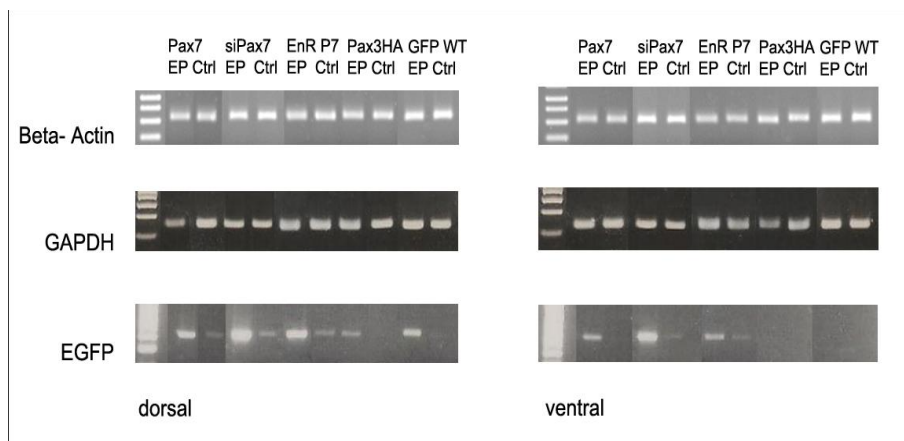


Abbildung 14: PCR- Ergebnisse für die Proben aus dem dorsalen (A) und ventralen (B) Mittelhirn im elektroporierten (EP) und nicht elektroporierten Gewebe (Ctrl) für die Haushaltsgene Beta-Actin und GAPDH sowie für EGFP als Kontrolle der Effizienz der Elektroporation.

Alle dorsal elektroporierten cDNA-Proben zeigten eine Bande für EGFP, wobei die EGFP- Expression bei der Transfektion mit Pax3 sehr schwach war und demzufolge im Vergleich zu anderen Proben weniger Zellen mit Pax3 transfiziert wurden.

Bei den Proben des ventralen Mittelhirns zeigte sich eine starke Bande bei siPax7 und eine etwas schwächere für Pax7 EnR- und Pax7- elektroporierte Mittelhirne. Die ventralen Proben von Pax3 und von GFP Wt zeigten keine Expression von EGFP. Das bedeutet, dass die vorliegenden ventralen Mittelhirnproben weder mit Pax3 oder GFP eindeutig transfiziert wurden und das Gewebe damit als ventrales unbehandeltes Gewebe angesehen werden musste.

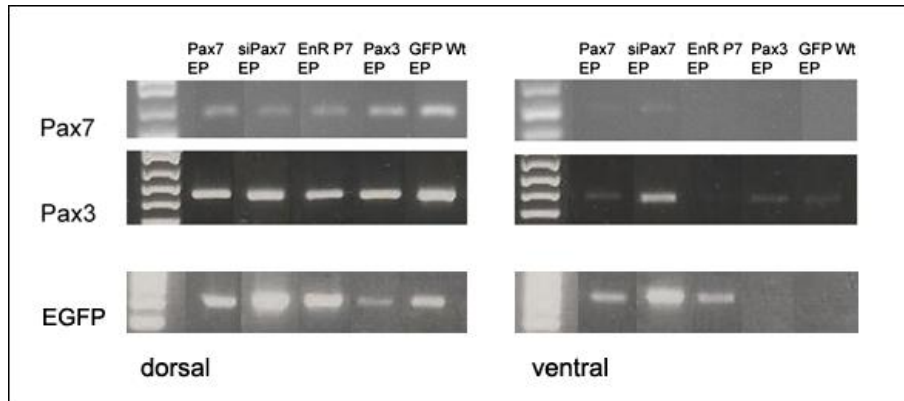


Abbildung 15: Pax7- und Pax3- PCR aus dem dorsalen und ventralen Mittelhirn. Die EGFP-PCR der elektroporierten Proben diente zur Angabe der Transfektionsstärke.

Alle dorsalen transfizierten Mittelhirnproben zeigten deutliche Expressionen von Pax7 und Pax3. Die Expressionen der ventralen transfizierten Mittelhirnproben präsentierten jedoch bei beiden Genen ein nicht einfach zu interpretierendes Muster.

Eine Überexpression von Pax7 in dorsalem Mittelhirn führte zu keiner stärkeren Aktivität von Pax7 im Vergleich zum Wildtyp, während beide Reprimierungen von Pax7 mittels siPax7 und Pax7 EnR in einer verminderten Expression von Pax7 resultierten. Die Überexpression von Pax3 führte eher zu einer kleinen Verminderung der Expression von Pax7 im Vergleich zum Wildtyp. Überexpression als auch Reprimierung von Pax7 sowie eine Überexpression von Pax3 führten in der vorliegenden PCR- Analyse zu keinem eindeutigen Expressionsunterschied von Pax3.

Interessanterweise führte die Expression von siPax7 im ventralen Mittelhirn zu einer leichten Expression von Pax7, die Transfektion mit dem Pax7 Gen führte zu keiner ektopischen Expression von Pax7 im ventralen Mittelhirn. Da die siPax7 Transfektion eigentlich zu keiner Pax7 Expression führen sollte, könnte eine leichte Kontaminierung mit dorsalem Gewebe der Grund sein. Transfektion mit Pax7 EnR hingegen führte zu keiner ektopischen ventralen Expression von Pax7. Da bei der Elektroporation mit Pax3HA nur eine sehr schwache Transfektion stattgefunden hat, musste diese als unbehandelte Probe, als so genannter „Wildtyp“ aufgefasst werden. Dasselbe traf für die Kontrolltransfektion mit GFP zu, bei der ventral keine Pax7- Expression festzustellen war

Interessanterweise zeigten sich im ventralen mit siPax7- transfizierten Gewebe eine starke Expression von Pax3 und eine schwache Expression von Pax3 im ventralen mit Pax7- transfizierten Gewebe. Wie oben erwähnt, stellen die Elektroporationen mit

Pax3HA und GFP aufgrund der schwachen Transfektionsrate unbehandelte Proben dar und konnten nicht in die Auswertung mit einbezogen werden.

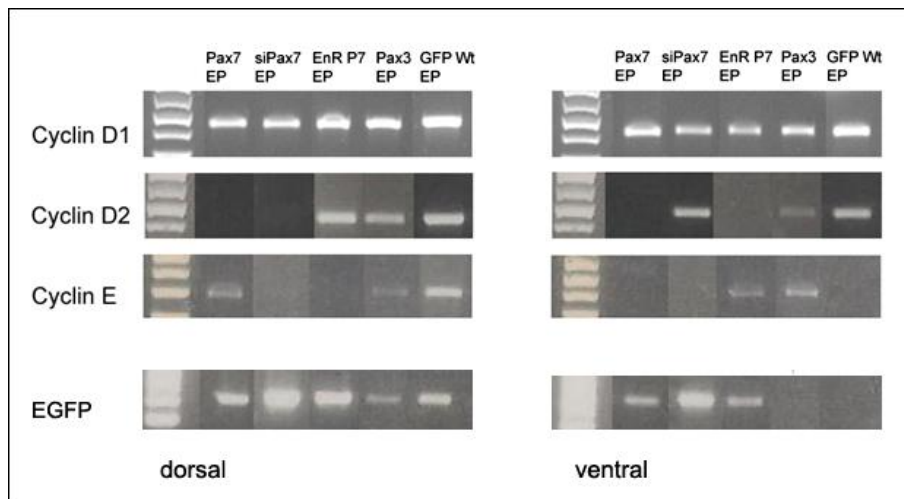


Abbildung 16: PCR- Ergebnis von Cyclin D1, D2 und E aus dem dorsalen und ventralen Mittelhirn. Die EGFP-PCR der elektroporierten Proben diente zur Angabe der Transfektionsstärke.

Die Cyclin D1- Expression änderte sich im dorsalen und im ventralen Mittelhirn durch die unterschiedlichen Transfektionen im Vergleich zur Kontrolltransfektion mit GFP nur geringfügig. Bei Cyclin D2 und bei Cyclin E hingegen zeigten sich in den einzelnen dorsalen und ventralen Transfektionen deutliche Expressionsunterschiede (Abbildung 16). Beide waren dorsal im Kontrollgewebe exprimiert, ventral war jedoch nur Cyclin D2 in der als untransfiziert geltenden GFP- Kontrolle zu finden. Interessanterweise war Cyclin E auch ventral in dem als weiter als Kontrolle zu wertenden Pax3HA-transfiziertem Gewebe zu finden. Dies könnte durch eine leichte Kontamination mit dorsalem Gewebe zustande gekommen sein, müsste dann aber auch in ventralem GFP transfiziertem Gewebe zu finden sein, was nicht der Fall war. Eine andere Erklärungsmöglichkeit bietet sich im Zusammenhang mit der variierenden Expression in den restlichen transfizierten Geweben. Da Cyclin D und E an unterschiedlichen Zeitpunkten im Zellzyklus auftreten, könnte es sein, dass die hier dargestellten Expressionsmuster eine Änderung der Länge der G1- Phase widerspiegeln, sodass durch diese PCR- Analyse keine exakte Aussage über die Wirkung von den Pax- Genen auf Cyclin D2 und Cyclin E getroffen werden konnte.

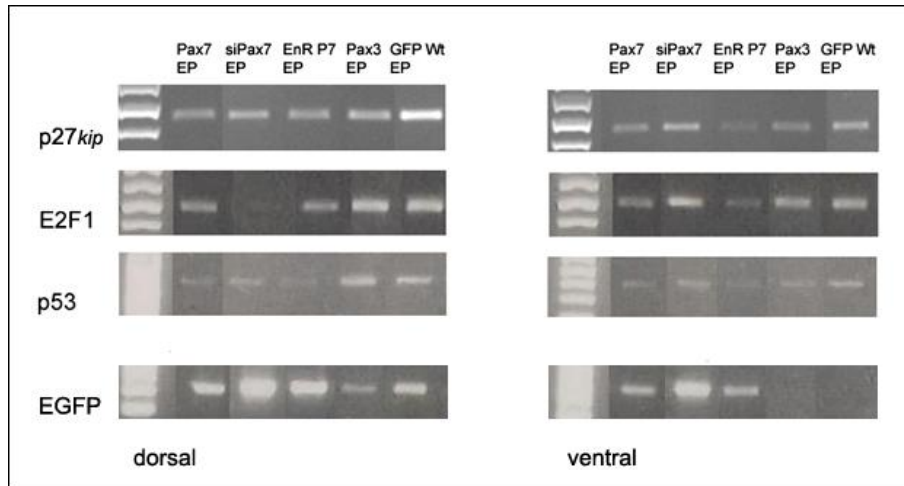


Abbildung 17: PCR- Ergebnis des CDK-Inhibitors $p27^{kip}$ und der Transkriptionsfaktoren E2f1 und p53 aus dem dorsalen und ventralen Mittelhirn. Die EGFP-PCR der elektroporierten Proben diente zur Angabe der Transfektionsstärke.

$p27^{kip}$, das den E-CDK2-Komplexes hemmt und dadurch eine antiproliferative Wirkung hat, war in allen dorsalen Transfektionen geringer exprimiert als im Wildtyp (GFP). Ventrales Mittelhirngewebe zeigte eine sehr geringe Expression von $p27^{kip}$ in mit Pax7 EnR- transfektiertem Gewebe. Die Transfektionen im dorsalen Mittelhirn ergaben keine eindeutige Interpretationsmöglichkeit. Überexpression von Pax7, siPax7, Pax7 EnR und Überexpression von Pax3 führten zu einer geringeren Expression von $p27^{kip}$ im Vergleich zum Wildtyp (GFP). Daraus lässt sich lediglich schließen, dass inhibitorische Signale des Zellzyklus durch Überexpression von Pax7 und Pax3 negativ beeinflusst werden könnten. Die beiden ventralen Kontrolltransfektionen (GFP und Pax3HA) zeigten eine geringere Expressionsstärke als das dorsale Kontrollgewebe, wobei das mit Pax3HA- transfizierte Kontrollgewebe eine geringere Expression aufwies als das mit GFP transfizierte ventrale Mittelhirngewebe. Dies könnte bedeuten, dass auch im unbehandelten Gewebe, abhängig vom Zeitpunkt der Gewebefixierung die $p27^{kip}$ -Konzentration starken Expressionsunterschieden unterworfen ist. Aus diesem Grund lassen sich aus der Expressionsstärke der restlichen ventralen Transfektionen keine eindeutigen Schlüsse ziehen.

E2f1, das Cyclin E aktiviert, schien durch die verschiedenen Transfektionen im dorsalen Mittelhirn reduziert zu werden, außer bei der Überexpression von Pax3, wo es im Vergleich zur Kontrollprobe eine gleichbleibende oder sogar leicht erhöhte Expression aufwies. Ventral führte eine Elektroporation mit siPax7 zu einer Zunahme der E2f1-Konzentration, bei Elektroporation mit Pax7 EnR war eine leichte Abnahme der E2f1-

Expression zu erkennen. Elektroporation mittels Pax7 und Pax3 führten zu einer geringeren Expression, wobei die Expression von Pax3 wieder der Expression einer unbehandelten Probe zuzuordnen war.

p53 hemmt den Zellzyklus, indem es hemmend auf die Zykline D und E wirkt und so die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2f1 verhindert. Eine Expression von p53 war im dorsalen und ventralen Mittelhirn im Wildtyp zu finden. Die Expression von p53 im dorsalen Mittelhirn änderte sich nicht wesentlich durch Pax3HA- Transfektion, nahm aber bei Pax7- Überexpression als auch bei Reprimierung von Pax7 ab.

Im ventralen Mittelhirn änderte sich die Expression von p53 außer einer starken Abnahme bei Pax7 EnR- Transfektion nach den unterschiedlichen Transfektionen nur unwesentlich. Da p53 hemmend auf die Aktivität von D und E-Zyklinen wirkt, könnte dies bedeuten, dass die Pax7- Überexpression zu einer Aktivierung der Proliferation führt, Überexpression von Pax3 hingegen nicht. Dem widerspricht jedoch, dass auch bei der Herunterregulation von Pax7 mittels siPax7 und durch die Repression von Pax7 aktivierten Genen mittels Pax7 EnR die Expression von p53 abnahm.

4.3.3 Pax7- Spleißvarianten im dorsalen Mesencephalon

Im Verlauf der PCR- Analyse wurde eine Transaktivierungsdomänen- Spleißvariante von Pax7 im dorsalen Mittelhirn entdeckt. Ein spezifisches Primer- Paar zur Detektion der 5'- Hälfte des Pax7- Gens (cPax7 fo2/rev2) führte zu zwei Banden im Agarosegel- eine bei 331bp und eine bei 266bp (bp= Basenpaare, siehe Abbildung 18). PCR- Analysen mit einem Pax7- Primerpaar, das einen Teil des Pax7- Gens mehr zum 3'- Ende des Gens vervielfältigt als cPax7 fo2/rev2 (Pax7 fwd/rev), resultierte nur in einer Pax7- Bande (siehe Abbildung 15 unter 4.3.2). Diese Primerpaar wurde auch für die nachfolgenden qRT- PCR- Analysen verwendet. Dies bedeutet, dass die Spleißvarianten von Pax7 am 3'- Ende wieder übereinstimmen. Die beiden Banden, die durch das Primerpaar cPax7 fo2/rev2 nahe des 5'- Endes erzeugt wurden, sind unterschiedlich in ihrer Intensität. Die 65bp- längere Bande war bei der Wildtyp- Probe deutlich geringer als die kürzere Bande. Beide Sequenzen nahmen bei Überexpression von Pax7 und auch von GFP leicht zu (siehe im Vergleich von EP (1) und (2) mit nicht- elektroporierter Kontrollseite Ctrl (1) und (2) in Abbildung 18). Weshalb auch GFP einen Einfluss auf die Expression der Pax7 Spleißvarianten aufweist, ist bisher unbekannt und erfordert

eine Wiederholung. Dass dies jedoch kein negativer Elektroporationseffekt gewesen sein könnte, zeigt sich durch eine effektive Repression von Pax7 (3). Eine Repression mittels siPax7 reduzierte beide Banden beträchtlich, wobei die längere Bande gänzlich verschwunden zu sein scheint. Letzteres Ergebnis zeigte auch, dass unser siPax7 Elektroporationsvektor effektiv zur Abnahme der Pax7- mRNA führte.

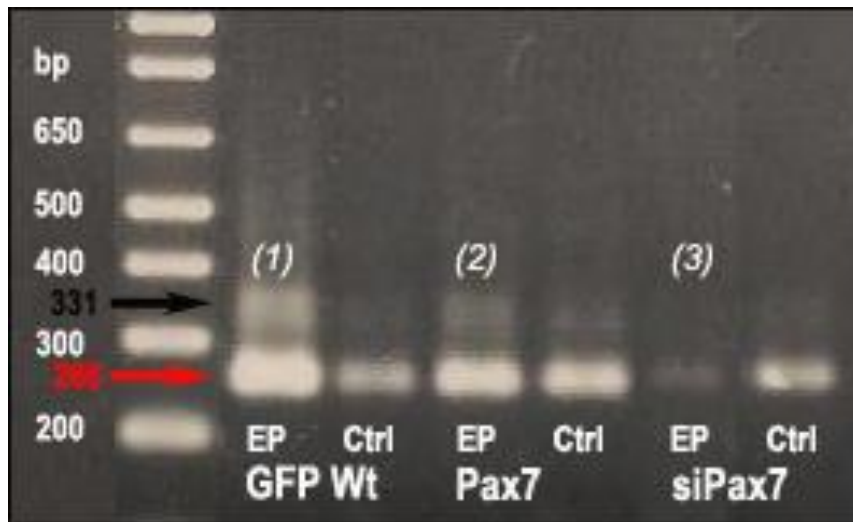


Abbildung 18: Gelelektrophorese einer PCR aus transfiziertem (EP) und Wildtyp (Ctrl)-Mittelhirngewebe mit dem Primerpaar Pax7 fo2/rev2. Gezeigt wird immer zuerst die Probe der Elektroporationsseite (EP), danach die Probe der nicht elektroporierten Kontrollseite (Ctrl). Beide Spleißvarianten sind im Wildtyp exprimiert (1), bei Elektroporation mit dem Pax7- Plasmid zeigte sich eine leichte Steigerung der längeren Pax7- Sequenz im Vergleich zur Kontrollrobe (2). Wurde siPax7 elektroporiert, so kam es zu einer Reduktion beider Pax7- Sequenzen (3).

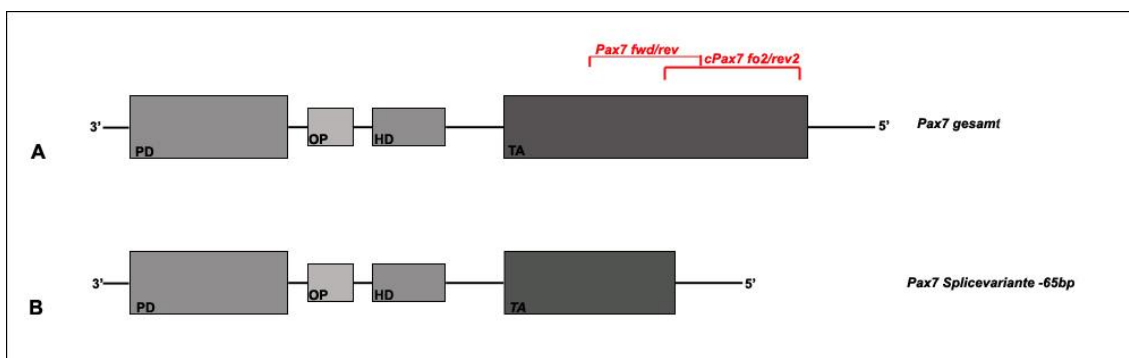


Abbildung 19: Schema des Pax7- Genes und die Positionen der beiden Primerpaare Pax7 fwd/rev und cPax7 fo2/rev2. **A.** zeigt schematisch den Aufbau des Pax7- Genes an, mit PD= paired domain, OP= Oktapeptid, HD= homeodomain und TA= transaktivierungsdomäne. **B.** Darstellung der kürzeren Variante, die mit den Primern cPax7 fo2/rev2 nahe des 5'- Endes des Pax7- Genes detektiert wurde. Die fehlenden 65 Basenpaare liegen in der TA= Transaktivierungsdomäne (engl. transactivation domain).

4.4. qRT-PCR

Da in der qualitativen PCR geringe Unterschiede in der Expression von Genen schwierig zu ermessen waren, wurde eine qRT-PCR mit neu transfiziertem Gewebe aus dem dorsalen Mittelhirn durchgeführt.

Die Berechnung und die Auswertung der qRT-PCR- Daten erfolgten mit der komparativen C_T -Methode, zusätzlich wurde die Standardabweichung berechnet. Nachfolgend ist tabellarisch die Auswertung für die jeweiligen Zielgene zu sehen. Als Referenzgen wurde β -Actin verwendet. Die Probe „Wildtyp GFP“ fungierte zur Kalibration der einzelnen Proben untereinander, wodurch unerwünschte Effekte der Elektroporation zwischen den einzelnen Proben ausgeglichen werden konnten.

Die EGFP- Werte der Präparation vom 03.08.2010 wurden aus Platzmangel in einem separaten qRT-PCR Lauf zusammen mit Beta- Actin ermittelt (20.07.2010). Da trotz der gleichen Proben und Primer sich jeder qRT-PCR Lauf leicht unterscheidet, wurden die EGFP- Werte einer Normalisierung mit den Beta-Actin-Werten der qRT-PCR vom Juli 2010 (siehe Tabelle 14). unterworfen und dienten als Transfektionskontrolle für die anschließenden Proben der qRT-PCR vom 03.08.2010 (Tabellen 15- 19). Bei der weiteren qRT- PCR Analyse wurden alle Proben im gleichen qRT-PCR- Lauf detektiert. Deren Ergebnisse sind in den unten aufgelisteten Tabellen zu sehen (Tabellen 20- 25).

4.4.1 Schmelzkurvenanalyse

Zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten Primer wurde nach Ablauf der eigentlichen qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse vorgenommen. Eine ausreichende Spezifität zeigt sich durch gleichförmige Schmelzkurven mit einem Maximum des zu detektierenden Primers bei seiner spezifischen Schmelztemperatur. Zusätzliche Peaks verweisen auf eine niedrige Spezifität und auf Detektion unspezifischer Produkte. Abbildungen 20 und 21 zeigen exemplarisch die Schmelzkurvenanalysen der ersten qRT-PCR-Analyse. Für den zweiten Versuch wurden die gleichen Primer verwendet, sodass auf die Darstellung der gleichen Schmelzkurvenanalyse verzichtet wurde.

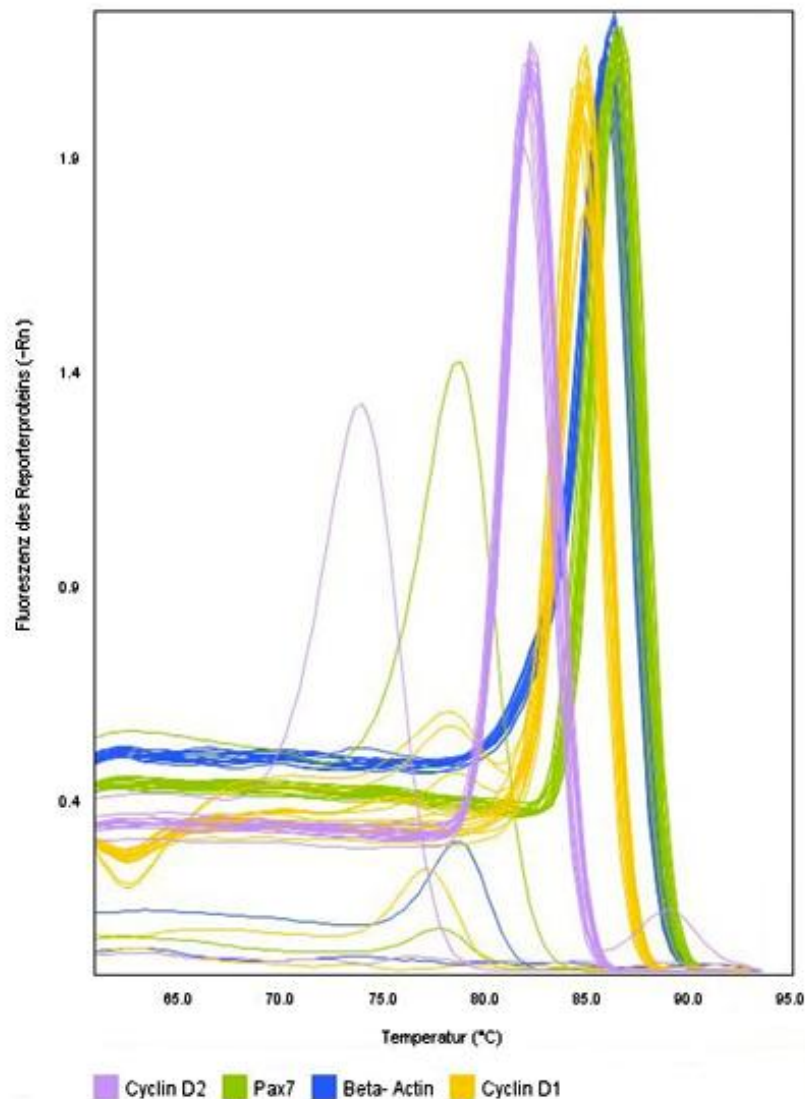


Abbildung 20: Schmelzkurvenanalyse von Beta-Actin (blau), Cyclin D1 (gelb), Cyclin D2 (lila) und Pax7 (grün). An der Abszisse (x-Achse) wurde die Temperatur aufgetragen; die Ordinate (y-Achse) gibt die Fluoreszenz des Reportergens (-Rn) an. Nach der eigentlichen PCR wird das Produkt von 50 °C an in 1 °C- Temperaturschritten für jeweils 30 Sekunden bis zu einer Endtemperatur von 95 °C erhitzt. Bis auf kleine Schwankungen bei Cyclin D1 zwischen 75-80 °C und Cyclin D2 zwischen 70-80 °C zeigte sich jeweils ein einzelner Peak für die jeweiligen Primer ohne die Detektion von Primerdimeren oder Nebenprodukten, sodass von einer hohen Spezifität der Primer ausgegangen werden konnte.

Es zeigte sich bei allen Primern, bis auf die der Zykline, eine gleichförmige Schmelzkurve. Bis auf kleine zu vernachlässigende Schwankungen bei Cyclin D1 zwischen 75-80 °C und Cyclin D2 zwischen 70-80 °C zeigt sich jeweils ein einzelner Peak für die jeweiligen Primer ohne die Detektion von Primerdimeren oder von Nebenprodukten, sodass von einer hohen Spezifität der Primer ausgegangen werden kann. Zusätzlich wurden bei Cyclin E neben den sehr inhomogen verteilten Peaks in der

Schmelzkurve (siehe Abbildung 21) hohe Standardabweichungen innerhalb der Triplets detektiert, sodass Cyclin E aus der Bewertung ausgeschlossen werden musste.

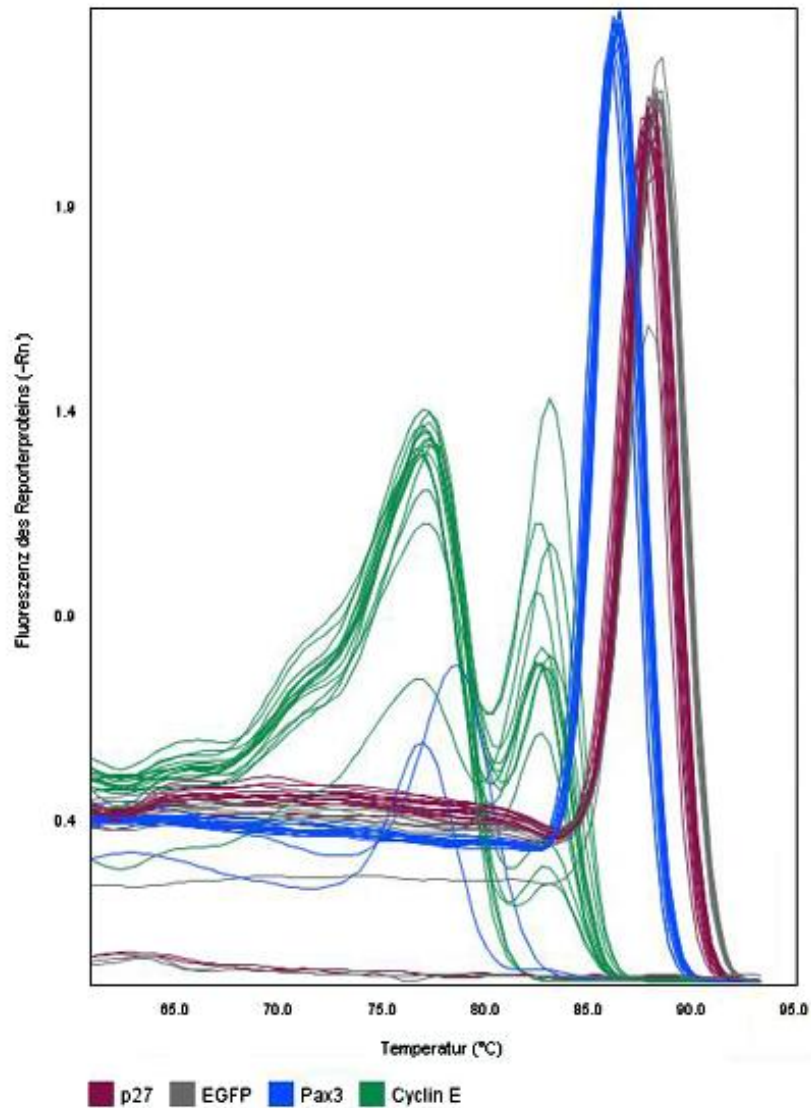


Abbildung 21: Schmelzkurvenanalyse von EGFP (grau), Cyclin E (grün), p27^{kip} (lila) und Pax3 (blau). Es zeigt sich bei allen Primern bis auf Cyclin E ein einzelner Peak. qRT-PCR-Produkte mit unterschiedlicher Länge schmelzen bei unterschiedlichen Temperaturen und ergeben mehrere Peaks während der Analyse. Bei Cyclin E war eine heterogene Peakverteilung mit Detektion unspezifischer Nebenprodukte zu erkennen, wodurch von keiner hohen Spezifität der Primer ausgegangen werden konnte. Aus diesem Grund wurde Cyclin E nicht in die nachfolgenden Analysen mit einbezogen.

4.4.2. Erste qRT-PCR-Analyse und Berechnung nach der komparativen C_T -Methode

August 2010 (03.08.2010)

4.4.2.1. EGFP

Probe	EGFP C_T Mittelwert	β -Actin C_T Mittelwert	ΔC_T EGFP- β -Actin	$\Delta\Delta C_T$ ΔC_T behandelt- ΔC_T unbehandelt	FC Fold Change
Wildtyp	28,75 \pm 0,08	20,78 \pm 0,13	7,98 \pm 0,15	0,00 \pm 0,15	1 (0,85-1,15)
Pax7	30,52 \pm 0,19	22,95 \pm 0,05	7,57 \pm 0,19	-0,41 \pm 0,19	1,33 (1,16-1,52)
siPax7	27,71 \pm 0,26	22,82 \pm 0,02	4,89 \pm 0,27	-3,08 \pm 0,27	8,48 (7,06-10,20)
Pax7 EnR	28,08 \pm 0,04	21,81 \pm 0,12	6,27 \pm 0,13	-1,71 \pm 0,13	3,27 (2,98-3,58)
Pax3	36,21 \pm 0,20	22,83 \pm 0,07	13,38 \pm 0,21	5,40 \pm 0,21	0,02 (0,02-0,03)

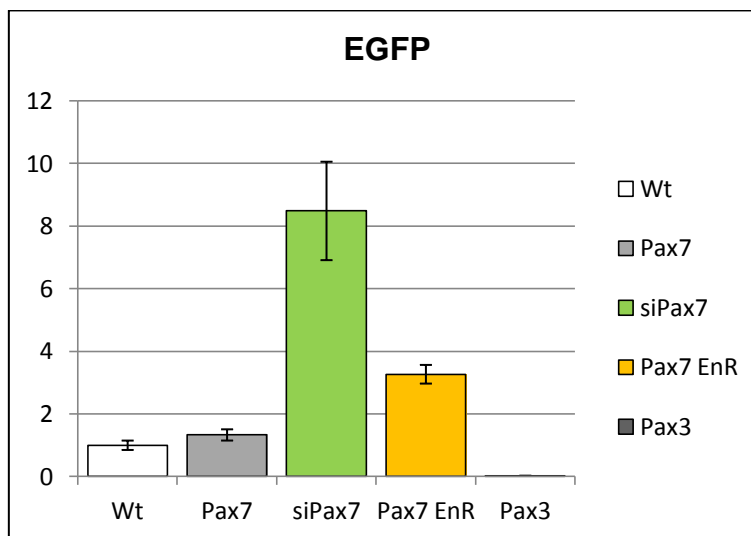


Tabelle 14: Fold Change und Standardabweichungen der EGFP-Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta-Actin.

Abbildung 22: 1. qRT-PCR zur Messung von EGFP im dorsalen Mittelhirn. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben.

Durch die Detektion von EGFP wurde der Erfolg der Transfektion in den dorsalen Zellen des Mittelhirns bemessen. Die einzelnen Transfektionen zeigten eine ungleichmäßige Expression von EGFP, was darauf hindeutet, dass entweder zu wenig transfizierte Zellen im Gewebe vorlagen, oder die Konzentration und die Effektivität der Plasmide unterschiedlich waren. Diese ungleichmäßigen Transfektionsraten wurden in die Auswertung der nachfolgenden Ergebnisse mit einbezogen.

Höchste Expressionswerte und somit erfolgreichste Transfektion wurden bei der Elektroporation von siPax7 erzielt, fast keine Transfektion bei der Elektroporation mit Pax3HA, die zusätzlich noch geringer war als bei der mit GFP elektroporierten Kontrollprobe (Wt).

Dies bedeutet, dass das mit Pax3 transfektierte Mittelhirngewebe nicht eindeutig als Pax3-infiziert betrachtet werden kann oder beziehungsweise nur mit einer geringen Beeinflussung der einzelnen Proben durch eine Überexpression von Pax3 gerechnet werden kann. Auch die Pax7 Transfektion zeigte im Vergleich zu siPax7 und Pax7EnR nur eine leichte erhöhte Transfektionsrate um das 1,33-fache im Vergleich zur Kontrolle an.

4.4.2.2. Pax-Gene (Pax7 und Pax3)

4.4.2.2.1 Pax7

Probe	Pax 7 C_T Mittelwert	β -Actin C_T Mittelwert	ΔC_T Pax7- β -Actin	$\Delta \Delta C_T$ ΔC_T behandelt- ΔC_T unbehandelt	FC Fold Change
Wildtyp	27,81±0,07	18,51±0,13	9,30±0,14	0,00±0,14	1 (0,86-1,14)
Pax7	28,98±0,18	19,66±0,03	9,32±0,18	0,02±0,18	0,99 (0,87-1,12)
siPax7	27,83±0,14	18,51±0,05	9,32±0,15	0,02±0,15	0,99 (0,89-1,10)
Pax7 EnR	28,33±0,09	19,15±0,15	9,18±0,18	-0,12±0,18	1,09 (0,96-1,23)
Pax3	27,65±0,13	18,56±0,14	9,09±0,19	-0,21±0,19	1,16 (1,02-1,32)

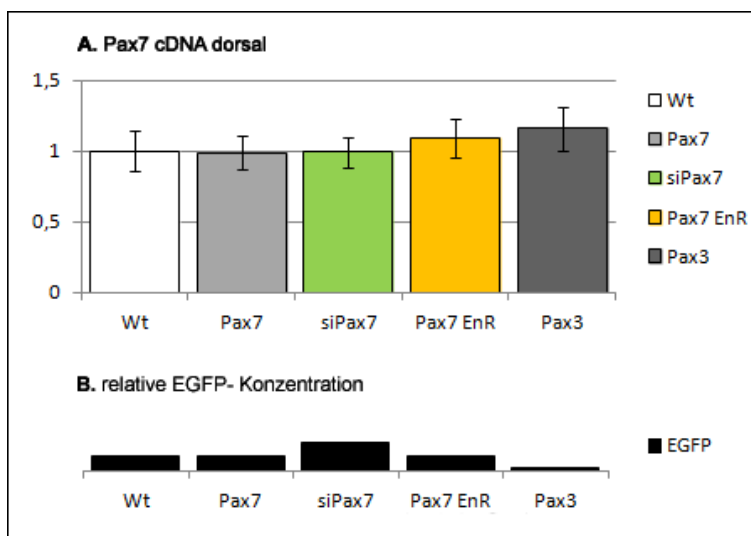


Tabelle 15: Fold Change und Standardabweichungen der Pax7- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta-Actin.

Abbildung 23: A. 1. qRT-PCR zur Messung von Pax7- cDNA dorsal. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben.

B. Relatives Ausmaß der EGFP- Transfektion im dorsalen Mittelhirn.

Unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichung kam es bei der Analyse von Pax7 bei keiner Probe zu einer deutlichen Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (Wildtyp). Insgesamt betrachtet, hatten weder eine Überexpression noch eine Reprimierung von Pax7 mittels siPax7 eine starke Auswirkung auf die dorsale Pax7-

Konzentration im Mittelhirn. Es zeigte sich sogar eine leicht erhöhte Pax7-Konzentration, wenn diese mittels Pax7 EnR reprimiert wurde. Die höchste Pax7-Konzentration zeigte sich unerwarteterweise bei Elektroporation mit Pax3HA, wo nur eine sehr geringe Transfektionsrate mit EGFP zu sehen war.

4.4.2.2.2 Pax3

Probe	Pax3 C_T Mittelwert	β -Actin C_T Mittelwert	ΔC_T Pax3- β -Actin	$\Delta\Delta C_T$ ΔC_T behandelt- ΔC_T unbehandelt	FC Fold Change
Wildtyp	23,38 \pm 0,08	18,51 \pm 0,13	4,86 \pm 0,15	0,00 \pm 0,15	1 (0,85-1,15)
Pax7	24,50 \pm 0,02	19,66 \pm 0,03	4,84 \pm 0,04	-0,02 \pm 0,04	1,02 (0,99-1,04)
siPax7	22,63 \pm 0,06	18,51 \pm 0,05	4,12 \pm 0,08	-0,74 \pm 0,08	1,67 (1,59-1,76)
Pax7EnR	23,38 \pm 0,08	19,15 \pm 0,15	4,24 \pm 0,16	-0,62 \pm 0,16	1,54 (1,38-1,72)
Pax3	23,18 \pm 0,05	18,56 \pm 0,14	4,61 \pm 0,15	-0,25 \pm 0,15	1,19 (1,08-1,32)

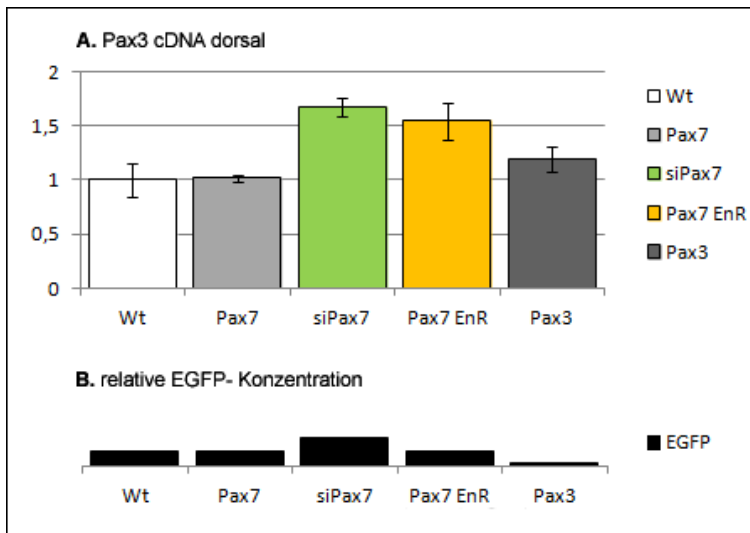


Tabelle 16: Fold Change und Standardabweichungen der Pax3- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta-Actin.

Abbildung 24: A. 1. qRT-PCR zur Messung von Pax3-cDNA dorsal. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben.

B. Relatives Ausmaß der EGFP- Transfektion im dorsalen Mittelhirn.

Eine Überexpression von Pax7 führte zu keiner starken Konzentrationsänderung von Pax3 im dorsalen Mittelhirn. Dies könnte auf das geringe Transfektionsausmaß zurückzuführen sein. Reprimierung von Pax7 (siPax7) oder dessen „downstream“-gelegenen Gene (Pax7 EnR) zeigten jedoch eine höhere Konzentration von Pax3 im Vergleich zur Kontrollprobe (Wildtyp) mit einem maximalen Fold Change um das 1,67-fache bei Reprimierung mit siPax7. Durch die Reduktion von Pax7 erhöhte sich demnach die Pax3- Konzentration im dorsalen Mittelhirn. Dieses Ergebnis lässt die

Schlussfolgerung zu, dass Pax3 und Pax7 in einem sich gegenseitig regulierenden Verhältnis stehen. Interessanterweise führte schon die sehr geringe Überexprimierung von Pax3 zu einer leichten Zunahme der Konzentration von Pax3, sodass von einer sensiblen Reaktion des Gewebes schon bei sehr geringen Konzentrationsänderungen von Pax3 auszugehen ist.

4.4.2.3. Zellzyklusgene

4.4.2.3.1 Cyclin D1

Probe	Cyclin D1 C_T Mittelwert	β -Actin C_T Mittelwert	ΔC_T Cyclin D1- β -Actin	$\Delta\Delta C_T$ ΔC_T behandelt- ΔC_T unbehandelt	FC Fold Change
Wildtyp	27,37 \pm 0,15	18,51 \pm 0,13	8,86 \pm 0,20	0,00 \pm 0,20	1 (0,80-1,20)
Pax7	28,31 \pm 1,08	19,66 \pm 0,03	8,65 \pm 1,08	-0,21 \pm 1,08	1,15 (0,55-2,43)
siPax7	24,68 \pm 0,63	18,51 \pm 0,05	6,17 \pm 0,63	-2,69 \pm 0,63	6,44 (4,15-10,0)
Pax7 EnR	25,58 \pm 0,32	19,15 \pm 0,15	6,42 \pm 0,36	-2,43 \pm 0,36	5,40 (4,22-6,91)
Pax3	25,56 \pm 0,00	18,56 \pm 0,14	8,00 \pm 0,14	-0,86 \pm 0,14	1,81 (1,65-2,00)

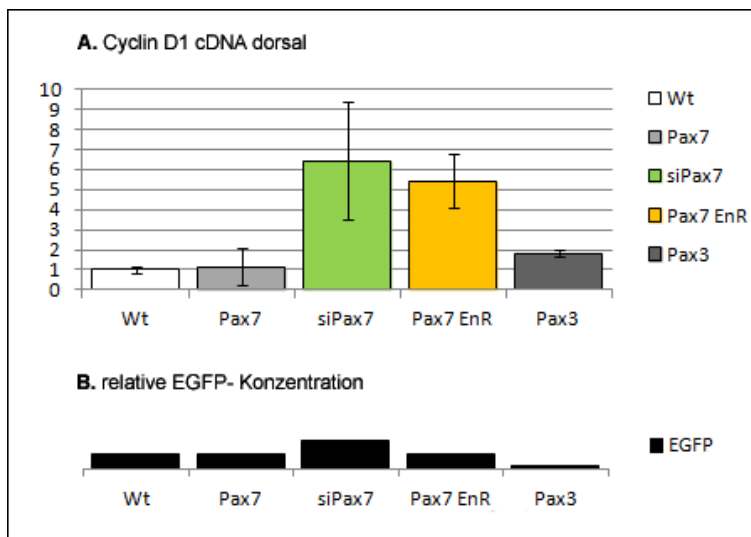


Tabelle 17: Fold Change und Standardabweichungen der Cyclin D1- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.

Abbildung 25: A. 1.qRT-PCR zur Messung von Cyclin D1-cDNA dorsal. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben.

B. Relatives Ausmaß der EGFP- Transfektion im dorsalen Mittelhirn.

Überexprimierung von Pax7 führte aufgrund der hohen Standardabweichung zu keinem aussagekräftigen Fold Change bei Cyclin D1. Reprimierung von Pax7 führte im Falle von siPax7 und Pax7EnR trotz einer hohen Standardabweichung bei siPax7 zu einer Konzentrationserhöhung von Cyclin D1 im dorsalen Mittelhirn. Pax3 schien trotz sehr geringer Expression die Aktivität von Cyclin D1 zu beeinflussen und führte bei

Überexpression zu einer leichten Konzentrationserhöhung von Cyclin D1 im dorsalen Mittelhirn. Im Vergleich zur qualitativen PCR zeigten sich hier deutliche Expressionsunterschiede bei den einzelnen transfektierten Proben.

4.4.2.3.2. Cyclin D2

Probe	Cyclin D2 C_T Mittelwert	β -Actin C_T Mittelwert	ΔC_T Cyclin D2- β -Actin	$\Delta\Delta C_T$ ΔC_T behandelt- ΔC_T unbehandelt	FC Fold Change
Wildtyp	25,43±0,23	18,51±0,13	6,92±0,26	0,00±0,26	1 (0,74-1,26)
Pax7	26,85±0,05	19,66±0,03	7,19±0,06	0,27±0,06	0,83 (0,80-0,87)
siPax7	25,39±0,07	18,51±0,05	6,88±0,09	-0,04±0,09	1,03 (0,97-1,09)
Pax7 EnR	25,85±0,06	19,15±0,15	6,70±0,17	-0,22±0,17	1,17 (1,04-1,31)
Pax3	25,71±0,04	18,56±0,14	7,15±0,14	0,22±0,14	0,86 (0,78-0,95)

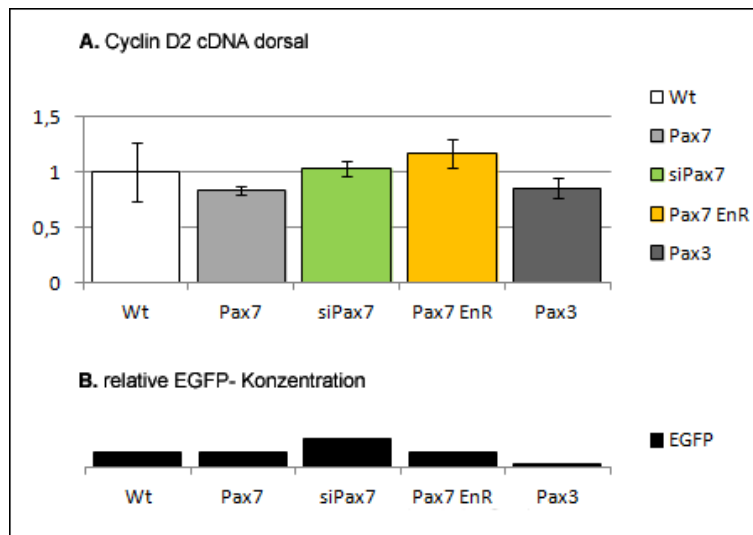


Tabelle 18: Fold Change und Standardabweichungen der Cyclin D2- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.

Abbildung 26: A. 1. qRT-PCR zur Messung von Cyclin D2- cDNA dorsal. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben.

B. Relatives Ausmaß der EGFP- Transfektion im dorsalen Mittelhirn.

Überexpression mit Pax7 oder mit Pax3 führte zu einer leicht reduzierten Expression von Cyclin D2, die aber im Vergleich zur Kontrolle (Wildtyp) aufgrund der hohen Standardabweichung der Kontrollprobe nicht aussagekräftig war.

Leicht erhöhter bis erhöhter Fold Change von Cyclin D2 zeigte sich bei Reprimierung von Pax7 mittels siPax7 als auch mittels Pax7 EnR, die jedoch auch aufgrund der hohen Standardabweichung der Kontrolle keine Aussagekraft aufwiesen. Im Vergleich zur qualitativen PCR zeigte sich Cyclin D2 deutlich in allen Behandlungen und variierte nicht stark, auch nicht bei den starken Transfektionen von siPax7 und Pax7 EnR.

4.4.2.3.3. p27^{kip}

Probe	p27 ^{kip} C _T Mittelwert	β-Actin C _T Mittelwert	ΔC _T p27 ^{kip} - β-Actin	ΔΔ C _T ΔC _T behandelt- ΔC _T unbehandelt	FC Fold Change
Wildtyp	37,76±0,16	18,51±0,13	19,24±0,21	0,00±0,21	1 (0,79-1,21)
Pax7	38,91±0,38	19,66±0,03	19,25±0,38	0,01±0,38	1,00 (0,77-1,29)
siPax7	37,17±0,18	18,51±0,05	18,66±0,19	-0,58±0,19	1,50 (1,32-1,70)
Pax7 EnR	37,83±0,21	19,15±0,15	18,68±0,26	-0,56±0,26	1,48 (1,23-1,77)
Pax3	37,72±0,15	18,56±0,14	19,15±0,20	-0,09±0,20	1,07 (0,93-1,23)

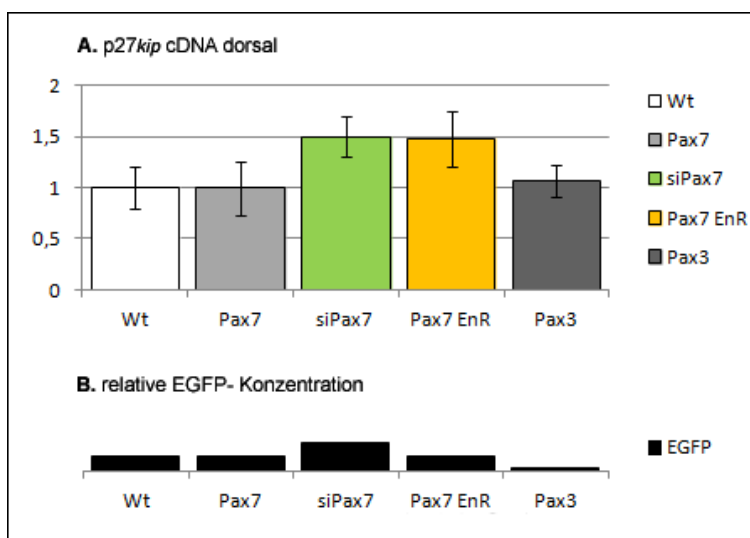


Tabelle 19: Fold Change und Standardabweichungen der p27^{kip} - Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.

Abbildung 27: A. 1. qRT-PCR zur Messung von p27^{kip}- cDNA dorsal. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben.

B. Relatives Ausmaß der EGFP- Transfektion im dorsalen Mittelhirn.

Überexpression von Pax7 oder von Pax3 führte zu keiner erheblichen Expressionsveränderung von p27^{kip} im dorsalen Mittelhirn. Erhöhte Konzentrationen von p27^{kip} waren bei den Elektroporationen mit siPax7 und Pax7 EnR festzustellen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Pax7 einen inhibitorischen Einfluss auf die p27^{kip} -Konzentration hat und die Konzentration von p27^{kip} auf ein bestimmtes Niveau balanciert wird. Bei Überexprimierung blieb die p27^{kip}- Konzentration jedoch ausgeglichen und verringerte sich nicht.

4.4.3. Zweite qRT-PCR- Analyse und Berechnung nach der komparativen C_T-Methode Februar 2011 (21.02.2011)

4.4.3.1 EGFP

Probe	EGFP <i>C_T Mittelwert</i>	β -Actin <i>C_T Mittelwert</i>	ΔC_T <i>EGFP-β-Actin</i>	$\Delta \Delta C_T$ <i>ΔC_T behandelt- ΔC_T unbehandelt</i>	FC <i>Fold Change</i>
Wildtyp	30,14±0,07	22,87±0,05	7,27±0,09	0,00±0,09	1 (0,91-1,09)
Pax7	28,97±0,10	24,49±0,05	4,48±0,11	-2,79±0,11	6,93 (6,42-7,49)
siPax7	28,57±0,11	24,80±0,10	3,77±0,15	-3,50±0,15	11,35 (10,24-12,57)
Pax7 EnR	29,49±0,11	27,43±0,03	2,06±0,12	-5,22±0,12	37,15 (34,29-40,25)
Pax3	23,30±0,06	24,71±0,05	-1,41±0,08	-0,69±0,08	411,63 (389,06- 435,52)

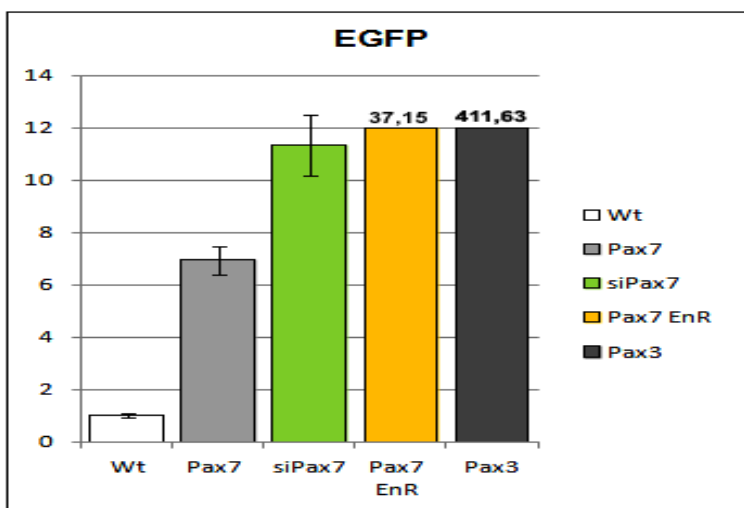


Tabelle 20: Fold Change und Standardabweichungen der EGFP- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta-Actin.

Abbildung 28: 2.qRT-PCR zur Messung von EGFP im dorsalen Mittelhirn. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben.

In meinem zweiten qRT-PCR Experiment zeigte sich eine deutliche Expression von EGFP in allen Behandlungen. Im Vergleich zum ersten qRT-PCR Experiment wies die EGFP- Expression bei Transfektion des Pax7- Plasmids eine um über 5- fach höhere Expressionsrate als im ersten Experiment auf und war im zweiten Experiment um das 6,93- fache höher als in der elektroporierten Kontrollprobe. Die EGFP- Expression nach siPax7-, Pax7 EnR- und Pax3-Transfektion waren noch um mindestens viermal stärker als Pax7 und um jeweils mindestens 3-fach, 30-fach und 400-fach stärker als im Vergleich zu den jeweiligen Proben im ersten Experiment.

4.4.3.2. Pax-Gene

4.4.3.2.1 Pax7

Probe	Pax 7 C_T Mittelwert	β -Actin C_T Mittelwert	ΔC_T Pax7- β -Actin	$\Delta\Delta C_T$ ΔC_T behandelt- ΔC_T unbehandelt	FC Fold Change
Wildtyp	23,59±0,05	22,87±0,05	0,72 ±0,07	0,00±0,07	1 (0,93-1,07)
Pax7	25,24±0,14	24,49±0,05	0,75±0,14	0,03±0,14	0,91 (0,89-1,08)
siPax7	24,88±0,03	24,80±0,10	0,09±0,10	-0,64±0,10	1,56 (1,45-1,67)
Pax7 EnR	28,21±0,23	27,43±0,03	0,78±0,23	0,06±0,23	0,96 (0,82-1,13)
Pax3	25,95±0,09	24,71±0,05	1,24±0,11	0,52±0,11	0,70 (0,65-0,75)

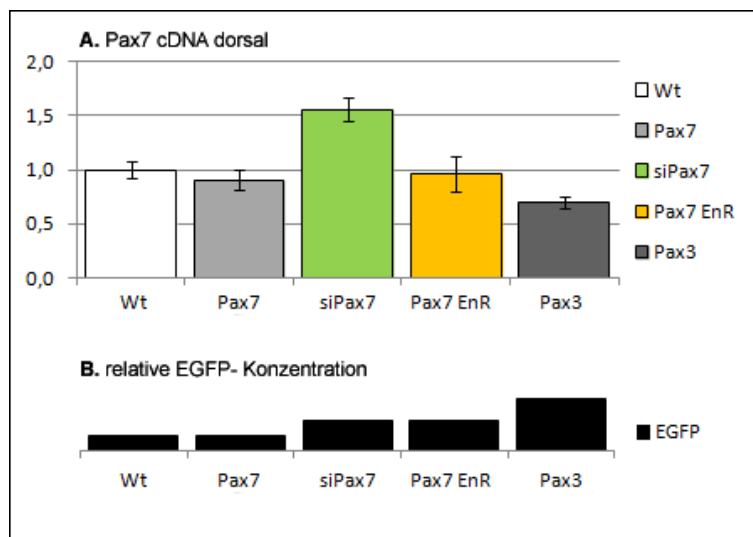


Tabelle 21: Fold Change und Standardabweichungen der Pax7- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta-Actin.

Abbildung 29: A. 2.qRT-PCR zur Messung von Pax7-cDNA dorsal. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben.

B. Relatives Ausmaß der EGFP- Transfektion im dorsalen Mittelhirn.

Trotz starker Transfektion zeigte sich auch in der zweiten qRT-PCR nach einer Transfektion mit Pax7 und Pax7 EnR unter Berücksichtigung der Standardabweichung und im Vergleich zur Kontrollprobe (Wildtyp) keine starke Änderung der Pax7-Konzentration nach Überexprimierung von Pax7. Transfektion mit siPax7 führte zu einer 1,5- fache Zunahme der Pax7- Konzentration im dorsalen Mittelhirn. Die Elektroporation mit Pax3 führte - wie erwartet- zu einer Expressionsreduktion von Pax7 im dorsalen Mittelhirn.

4.4.3.2.2. Pax3

Probe	Pax3 C_T Mittelwert	β -Actin C_T Mittelwert	ΔC_T Pax3- β -Actin	$\Delta\Delta C_T$ ΔC_T behandelt- ΔC_T unbehandelt	FC Fold Change
Wildtyp	24,56±0,03	22,87±0,05	1,69±0,06	0,00±0,06	1 (0,94-1,06)
Pax7	26,37±0,06	24,49±0,05	1,89±0,08	0,20±0,08	0,87 (0,83-0,92)
siPax7	26,45±0,14	24,80±0,10	1,65±0,17	-0,03±0,17	1,02 (0,91-1,15)
Pax7 EnR	28,73±0,14	27,43±0,03	1,29±0,14	-0,39±0,14	1,31 (1,19-1,45)
Pax3	25,15±0,06	24,71±0,05	0,44±0,08	-1,25±0,08	2,38 (2,25-2,52)

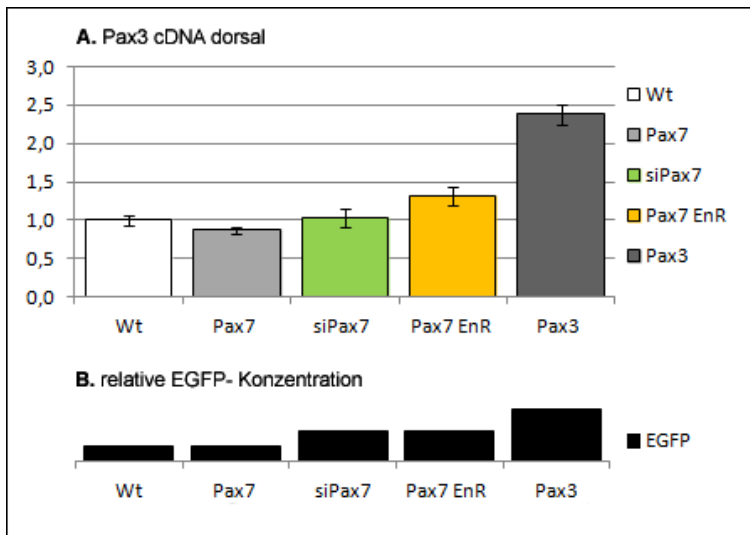


Tabelle 22: Fold Change und Standardabweichungen der Pax3- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp(Kontrolle) normiert auf Beta-Actin.

Abbildung 30: A. 2.qRT-PCR zur Messung von Pax3-cDNA dorsal. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben. **B.** Relatives Ausmaß der EGFP- Transfektion im dorsalen Mittelhirn.

In dieser qRT-PCR mit höherer Transfektionsrate von Pax7, führte die Pax7-Überexpression zu einer Konzentrationsreduktion von Pax3, die bei einer gegenseitigen Regulation von Pax3 und Pax7 erwartet werden konnte. Im Vergleich mit dem ersten qRT-PCR- Experiment zeigte sich, dass die Transfektion mit Pax3HA auch im zweiten Experiment zu einer erhöhten Pax3- Konzentration im dorsalen Mittelhirn führte. Da in der ersten qRT-PCR bei schwächerer Transfektionsstärke von Pax7 die Expression von Pax3 gleichbleibend war und in der zweiten Analyse bei stärkerer Transfektion von Pax7 sich die Expression von Pax3 verringert hatte, könnte von einer konzentrationsabhängigen Regulierung der zwei Pax-Gene ausgegangen werden, was im Verlauf der Diskussion weiter dargestellt wird. Transfektion mit dem sipax7- Plasmid resultierte in einer leichten Konzentrationserhöhung von Pax3 im Vergleich zum Wildtyp, wohingegen sich die Konzentrationsänderung von Pax3 nach Pax7 EnR-

Transfektion noch deutlicher präsentierte. Interessanterweise hatte die geringere Expression von siPax7 und Pax7EnR im vorigen Experiment zu einer höheren Konzentration von Pax3 geführt.

4.4.3.2 Zellzyklusgene

4.4.3.2.1. Cyclin D1

Probe	Cyclin D1 C_T Mittelwert	β -Actin C_T Mittelwert	ΔC_T Cyclin D1- β -Actin	$\Delta\Delta C_T$ ΔC_T behandelt- ΔC_T unbehandelt	FC Fold Change
Wildtyp	30,82±0,22	22,87±0,05	7,95±0,22	0,00±0,22	1 (0,78-1,22)
Pax7	31,76±0,20	24,49±0,05	7,27±0,21	-0,68±0,21	1,60 (1,39-1,85)
siPax7	30,24±0,40	24,80±0,10	5,44±0,41	-2,51±0,41	5,71 (4,29-7,61)
Pax7 EnR	34,79±0,18	27,43±0,03	7,36±0,18	-0,59±0,18	1,51 (1,33-1,71)
Pax3	32,25±0,45	24,71±0,05	7,54±0,45	-0,41±0,45	1,33 (0,97-1,81)

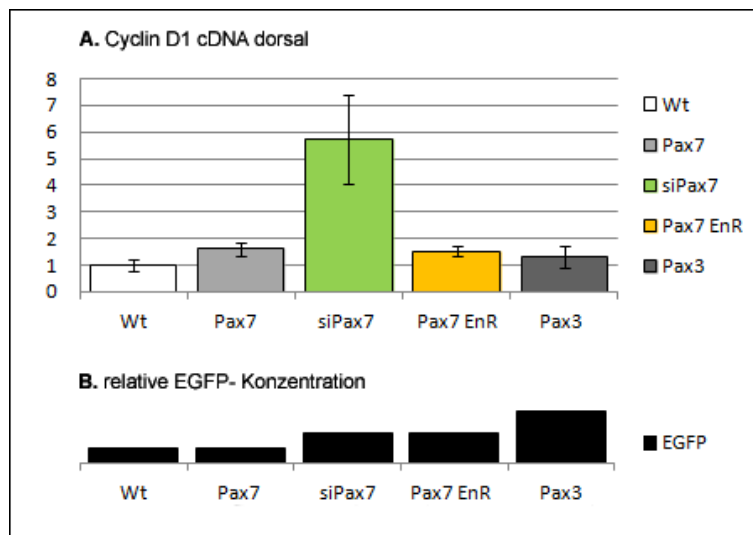


Tabelle 23: Fold Change und Standardabweichungen der Cyclin D1- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.

Abbildung 31: A. 2. qRT-PCR zur Messung von Cyclin D1-cDNA dorsal. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben.

B. Relatives Ausmaß der EGFP- Transfektion im dorsalen Mittelhirn.

Wie auch im ersten qRT- PCR- Experiment zeigte sich ein Anstieg der Cyclin D1- Konzentration durch siPax7-, Pax7 EnR- und Pax3- Transfektion im dorsalen Mittelhirn, wobei der Anstieg bei der Pax7 EnR- Transfektion geringer war als im ersten Experiment. In diesem Experiment führte auch die erhöhte Pax7- Transfektion zu einem Anstieg der Cyclin D1- Expression. Der stärkste Anstieg zeigte sich bei einer Transfektion mit siPax7. Trotz der vergleichsweise hohen Standardabweichung im Falle der Transfektion mit siPax7 unterschied sich die Expressionserhöhung von Cyclin D1

deutlich von den anderen Transfektionen. Interessanterweise schien die höhere Transfektion von Pax7 EnR im Vergleich zum ersten qRT-PCR Experiment einen geringeren Anstieg der Cyclin D1- Expression zu bewirken. Die hohe Transfektion mit Pax3 zeigte kaum einen Einfluss auf die Cyclin D1-Konzentration.

4.4.3.2.2. Cyclin D2

Probe	Cyclin D2 C_T Mittelwert	β -Actin C_T Mittelwert	ΔC_T Cyclin D2- β -Actin	$\Delta\Delta C_T$ ΔC_T behandelt- ΔC_T unbehandelt	FC Fold Change
Wildtyp	25,69 \pm 0,01	22,87 \pm 0,05	2,82 \pm 0,06	0,00 \pm 0,06	1 (0,94-1,06)
Pax7	27,20 \pm 0,05	24,49 \pm 0,05	2,71 \pm 0,07	-0,12 \pm 0,07	1,08 (1,03-1,14)
siPax7	27,03 \pm 0,03	24,80 \pm 0,10	2,23 \pm 0,10	-0,59 \pm 0,10	1,51 (1,40-1,62)
Pax7 EnR	30,01 \pm 0,04	27,43 \pm 0,03	2,58 \pm 0,05	-0,24 \pm 0,05	1,18 (1,14-1,23)
Pax3	27,68 \pm 0,19	24,71 \pm 0,05	2,97 \pm 0,19	0,14 \pm 0,19	0,91 (0,79-1,04)

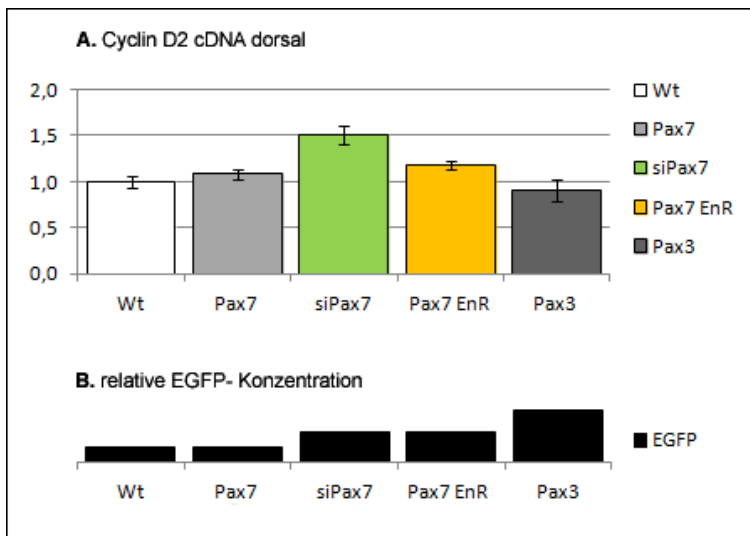


Tabelle 24: Fold Change und Standardabweichungen der Cyclin D2- Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.

Abbildung 32: A. 2.qRT-PCR zur Messung von Cyclin D2-cDNA dorsal. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben.

B. Relatives Ausmaß der EGFP- Transfektion im dorsalen Mittelhirn.

Diese Ergebnisse konnten im Vergleich zur ersten qRT-PCR ausgewertet werden, da die Kontrollprobe eine geringe Standardabweichung aufwies. Wie auch bei der ersten qRT- PCR zeigte sich eine Zunahme der Cyclin D2- Konzentration im dorsalen Mittelhirn, wenn Pax7 oder die von Pax7 „downstream“- gelegenen Gene mittels der beiden elektroporierten Plasmiden siPax7 und Pax7 EnR inhibiert wurden. Die Überexpression von Pax7 führte nur zu einer leichten Konzentrationserhöhung von

Cyclin D2. Ein leichter Konzentrationsabfall von Cyclin D2 konnte bei dorsaler Überexpression von Pax3 detektiert werden.

4.4.3.2.3. p27^{kip}

Probe	p27 ^{kip} C _T Mittelwert	β-Actin C _T Mittelwert	ΔC _T p27 ^{kip} - β-Actin	ΔΔ C _T ΔC _T behandelt- ΔC _T unbehandelt	FC Fold Change
Wildtyp	30,48±0,16	22,87±0,05	7,62±0,17	0,00±0,17	1 (0,83-1,17)
Pax7	32,19±0,31	24,49±0,05	7,71±0,31	0,09±0,31	0,94 (0,76-1,17)
siPax7	30,83±0,16	24,80±0,10	6,03±0,19	-1,59±0,19	3,00 (2,64-3,42)
Pax7 EnR	36,29±0,57	27,43±0,03	8,85±0,58	1,24±0,58	0,42 (0,28-0,63)
Pax3	32,25±0,27	24,71±0,05	7,54±0,28	-0,08±0,28	1,06 (0,87-1,28)

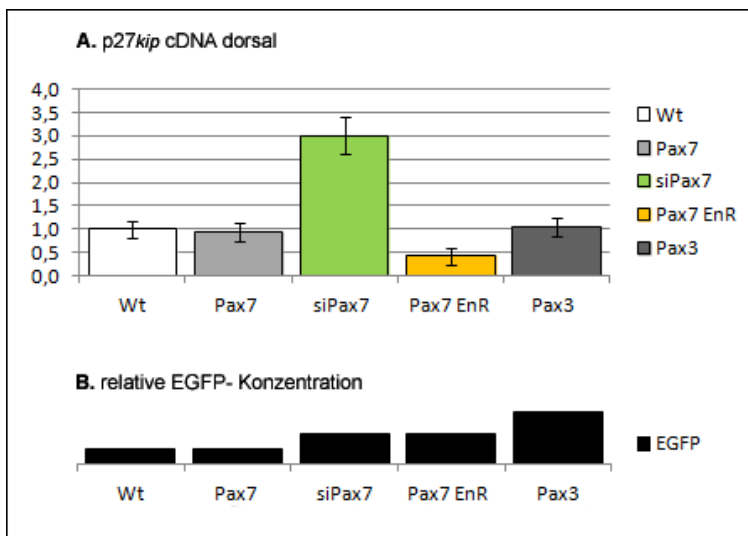


Tabelle 25: Fold Change und Standardabweichungen der p27^{kip} - Expression der einzelnen Proben im Vergleich zum Wildtyp (Kontrolle) normiert auf Beta- Actin.

Abbildung 33: A. 2,qRT-PCR zur Messung von p27^{kip}-cDNA dorsal. Die Werte sind als Fold Change (FC) der Proben angegeben.

B. Relatives Ausmaß der EGFP- Transfektion im dorsalen Mittelhirn.

Die Konzentration von p27^{kip} im dorsalen Mittelhirn war, wenn Pax7 oder Pax3 überexprimiert wurde, leicht reduziert oder leicht erhöht, jedoch in Relation zur Kontrolle und zu der jeweiligen Standardabweichung relativ unverändert. Ein Anstieg der Expression von p27^{kip} zeigte sich bei der Elektroporation mit siPax7, wenn zellzyklusfördernde Impulse wie von Pax7 inhibiert wurden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in dieser qRT-PCR- Analyse eine deutlich reduzierte Aktivität von p27^{kip} wenn die von Pax7 aktivierten Gene reprimiert werden, wie es bei Elektroporation mit Pax7 EnR der Fall war.

4.5. Zusammenfassung

4.5.1. Ergebnisse der qualitativen und semi-quantitativen PCR-Analyse

Zusammenfassend zeigte sich in den ventralen Gewebepreparationen der quantitativen PCR-Analyse trotz guter Transfektionsstärke der verwendeten Plasmide eine mangelnde Expression von Pax7. Pax3 war zwar teilweise in den ventralen Elektroporationen vertreten, jedoch zeigte sich eine inhomogene Expression, die es in der anschließenden Diskussion zu interpretieren gilt. Beide Situationen lassen keine eindeutigen Schlüsse über die Beeinflussung der Zellzyklusgene durch Pax7 und Pax3 im ventralen Mittelhirn zu.

In der qualitativen PCR-Analyse des dorsalen Mittelhirns ergab sich kein eindeutiges Bild, wie Pax7 oder Pax3 auf den Zellzyklus im dorsalen Mittelhirn einwirken könnte. Zusätzlich blieb die erwartete erhöhte Expression von Pax7 nach Transfektion mit Pax7 aus und stellte sich sogar eher in einem geringeren Ausmaß dar, wie die Expression von Pax7 im unbehandelten Gewebe. Die Transfektionen mit siPax7, die zu einer Erniedrigung der mRNA-Expression von Pax7 führen sollten, und die Transfektionen mit Pax7 EnR, die zu einer Hemmung aller von Pax7 geförderten Gene führten sollten, resultierten in einer deutlich geringeren Expression von Pax7 im dorsalen Mittelhirn. Interessanterweise änderte sich die Pax3-Expression kaum nach den verschiedenen Behandlungen.

In der qualitativen PCR-Analyse schien sich die Expression von Cyclin D1 im dorsalen Mittelhirn durch die verschiedenen Transfektionen nicht zu verändern. Cyclin D2 wies ein inhomogenes Expressionsmuster auf, wobei sich die Cyclin E-Expression durch die Reprimierung von Pax7 mittels siPax7 und Pax7 EnR verringerte. Pax7- und Pax3-Überexpression führten jedoch zusätzlich zu einer Verringerung der Expression.

Der negative Regulator des Zellzyklus- $p27^{kip}$ verringerte sich in allen Transfektionen. Die Expressionen von E2f1 und p53 blieben bei Pax3-Überexpression vergleichbar mit dem Wildtyp bestehen, verringerten sich aber durch Überexpression sowie durch Repression von Pax7 mittels siPax7 und Pax7 EnR.

Das inhomogene Expressionsmuster von E2f1 und p53 im dorsalen Mittelhirn nach den verschiedenen Behandlungen führte zum Ausschluss dieser beiden Transkriptionsfaktoren aus den anschließenden qRT-PCR-Analysen.

4.5.2. Ergebnisse der qRT-PCR- Analysen aus dem dorsalen Mittelhirn

Die dorsalen Mittelhirngewebe, die während der beiden qRT-PCR-Analysen untersucht wurden, wiesen im Vergleich, als auch zueinander, unterschiedliche starke Expressionen von EGFP auf (siehe Abbildung 34). Die EGFP-Expression war in der zweiten Analyse wesentlich stärker als in der ersten Analyse. Da die Stärke der EGFP-Expression auf die Transfektionsrate mit den verschiedenen Konstrukten hinweist, bedeutet dies, dass eine jeweils unterschiedlich starke Produktion der einzelnen Konstrukte und Proteine stattfand und diese deshalb einen anderen oder größeren Effekt haben könnten als in der ersten Analyse.

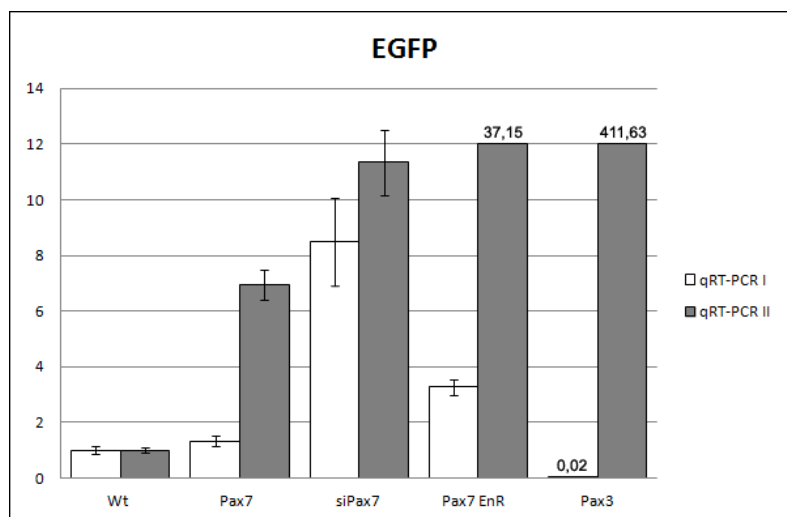


Abbildung 34: Vergleich der Transfektionsstärke der beiden qRT-PCR-Analysen anhand der EGFP- Expression. Es zeigte sich in der zweiten qRT-PCR- Analyse eine deutlich höhere Transfektion bei allen Elektroporationen. Ein besonders starker Expressionsunterschied ist bei den beiden Elektroporationen von Pax3HA zu erkennen. Diese unterschiedlichen Transfektionsstärken wurden in die nachfolgende Bewertung mit einbezogen.

Die Überexpression mittels Pax7 ergab trotz guter Transfektion des Plasmids unerwarteterweise keine Aktivitätserhöhung von Pax7, sondern eine gleichbleibende bis reduzierte Pax7- Konzentration in den einzelnen Analysen. Bei Überexpression mittels Pax3 führten schon geringe Transfektionsraten zu einer Expressionssteigerung von Pax3. Es zeigte sich demnach eine unterschiedliche Gewebesensibilität auf die beiden Pax- Gene.

Die reduzierte Pax7- Konzentration mittels siPax7 als auch mittels Pax7 EnR wurde durch eine unterschiedlich starke Steigerung der Pax3- Konzentration bei allen Proben ausgeglichen. Die erzielte Reduktion von Pax7 durch diese beiden Plasmide wurde wahrscheinlich teilweise von Pax7 selbst ausgeglichen, da sich eine gleiche bis leicht

erhöhte Pax7- Konzentration in den einzelnen Versuchen zeigte. Möglicherweise besteht zusätzlich eine positive Autoregulation, was in der nachfolgenden Diskussion näher erläutert wird.

Zwar ließen sich bei den elektroporierten dorsalen Mittelhirn- Proben in der PCR- Analyse keine deutlichen Unterschiede in der Aktivität von Cyclin D1 zeigen, jedoch konnten in den beiden qRT- PCR- Experimenten Unterschiede zwischen den einzelnen Proben festgestellt werden. Zusammengenommen aus beiden qRT-PCRs scheint ein Rückgang von Pax7 zu einer Erhöhung der Cyclin D1- Konzentration zu führen.

Bei Cyclin D2 konnten aufgrund hoher Standardabweichungen nur die Ergebnisse der zweiten qRT-PCR verwendet werden. Jedoch führte eine Unterdrückung der Pax7- Aktivität zu einer erhöhten Expression von Cyclin D2. Bei Überexpression von Pax7 und Pax3 zeigte sich eine leichte Reduktion bis gleichbleibende Expression der Cyclin D2-Aktivität.

Der CDK- Inhibitor $p27^{kip}$ zeigte eine gleichbleibende bis leicht reduzierte Aktivität bei Überexpression mittels Pax7 und Pax3 sowie eine zunehmende Aktivität bei Reprimierung mittels siPax7 an. Eine Reprimierung mittels Pax7EnR ergab hinsichtlich der $p27^{kip}$ - Konzentration ein inhomogenes Bild.

5. Diskussion

5.1. Überlegenheit der qRT-PCR-Analyse vor der PCR- Analyse

Die Ergebnisse der qualitativen PCR veranschaulichten die Spezifität der verwendeten Primer und deren Anwendbarkeit für weitere Analysen. Sie zeigten auch, dass sowohl Pax7 als auch Pax3 spezifisch im dorsalen Mittelhirn exprimiert sind und bestätigten unsere Vermutung, dass Pax7 und/oder Pax3 die Produktion von Zellzyklusgenen beeinflussen könnten.

Die qualitativen PCR- Ergebnisse zeigten allerdings große Variationen und ließen deshalb keine eindeutigen Schlussfolgerungen über die Expression eines Gens und dessen Abhängigkeit von der Expression anderer Gene zu.

Es gibt mehrere Gründe für diese Variationen. Zum einen können kleine Pipettierfehler, die zu verschiedenen Primer-, Puffer- oder DNA- Konzentrationen führen, eine große Auswirkung auf die letztendliche Menge des Produktes haben. Außerdem kann von der Bandenstärke und -dicke im Agarosegel nur eine ungenaue Schätzung der Mengenänderungen stattfinden. Das bedeutet, dass nur sehr große Mengenschwankungen im Agarosegel zu sehen sind. Dies zeigte sich in meinen Untersuchungen am Beispiel von Cyclin D1. Außerdem beeinflusst auch die Länge des PCR- Produktes die jeweilige Bandenstärke. Das heißt, dass keine endgültige Aussage getroffen werden kann, wie stark das Gen in seiner Gesamtheit exprimiert ist, sondern, dass lediglich ein Vergleich zwischen der Expression des Genes der einzelnen verwendeten Proben möglich ist.

Die qualitative PCR- Methode eignet sich gut für eine erste Übersicht, um Primerpaare und deren Effektivität zu testen. Wesentlich genauere Ergebnisse liefert die qRT-PCR, auch wenn sie eine teurere und zeitintensivere Methode darstellt. Der erste Vorteil ist, dass die Produktmenge photometrisch gemessen wird und dadurch sehr genaue Mengenangaben in Abhängigkeit von der Zeit geliefert werden. Ein Vorteil bei der hier verwendeten komparativen C_T -Methode ist die einfache Visualisierung der Ergebnisse durch deren Darstellung als FC -Werte. Ein Nachteil ist, dass diese Methode eine optimale PCR-Effizienz voraussetzt, die in der Praxis nicht immer erfüllt werden kann (Rutledge and Cote 2003) Außerdem sollte die Effizienz des Zielgens ähnlich des Haushaltgens sein (Schmittgen and Livak 2008), was aufgrund der unterschiedlichen Sequenzen der Gene oft nicht möglich ist. Primerdimere und andere Artefakte aus

doppelsträngiger DNA können zu einem unspezifischen Anstieg der Fluoreszenz führen. Um diese Artefakte soweit als möglich zu vermeiden, sind eine Schmelzkurvenanalyse sowie ein Test der Effektivität der unterschiedlichen Primerkonzentrationen unvermeidlich.

5.2 Konzentrationsunterschiede von Pax7 und Pax3 zeigen keinen eindeutigen Einfluss auf Zellzyklusgene und Transkriptionsfaktoren im ventralen Mesencephalon des Hühnerembryos

Aufgrund der in 5.1. erwähnten Gründe lassen sich nur wenige Schlüsse aus den qualitativen PCR- Ergebnissen der Elektroporation des ventralen Mittelhirns ziehen.

Insgesamt zeigten die Proben der ventralen Seite nur eine minimale Expression von Pax7 bei Elektroporation mit siPax7 bis fehlende Expression von Pax7 bei den anderen Proben, sodass angenommen werden kann, dass die Konzentrationsunterschiede von Pax7 trotz hoher Transfektionsstärke der Elektroporationen keinen Einfluss auf die Entwicklung des ventralen Mittelhirns hatten. Sehr wahrscheinlich wurden in diesen Proben die beiden Pax-Gene durch ventrale Mechanismen unterdrückt.

Interessanterweise konnte jedoch nach ventraler Pax7- Überexpression ein leichter Anstieg von Pax3 festgestellt werden. Dies könnte bedeuten, dass bei einer Pax7-Überexpression, bei der die dorsale Expression von Pax3 eher herunter reguliert wird, ventral die Expression von Pax3 induziert wird. Im ventralen Mesencephalon oder dorsalem Diencephalon führte eine ektopische Expression des einen Pax Genes immer zu einer Induktion des jeweils anderen (Matsunaga, Araki et al. 2001) und zu einer Induktion von dorsalem Mittelhirngewebe- dies entweder aufgrund einer indirekten Aktivierung durch andere Gene, die für die Ausbildung dorsaler Strukturen verantwortlich sind, oder durch Pax7 selbst (Matsunaga, Araki et al. 2001). Zusätzlich ist bekannt, dass ventral überexprimiertes Pax7 im ventralen Mittelhirn Pax 3 induziert und vice versa (Agoston, Li et al. 2012). Dies bestätigt, dass sich auch im Mittelhirn ventrale Nervenzellgruppen nur ausbilden, wenn die Expression von Pax7 und Pax3 unterdrückt wird, wie es im Rückenmark beschrieben wurde (Liem, Tremml et al. 1995; Mansouri and Gruss 1998). Meine Ergebnisse stimmen demnach mit den oben genannten Erkenntnissen überein. Dieser Effekt konnte nicht bei Überexpression mit Pax3 festgestellt werden. Wahrscheinlich wiesen die vorliegenden ventralen Proben

eine zu geringe Transfektionsstärke mit Pax3HA auf, um eine ventrale Induktion von Pax7 zu bewirken. Auch zeigte sich bei den ventralen Proben, dass eine noch höhere Pax3- Expression ventral nach Elektroporation mit siPax7 detektiert wurde. Dies steht im Gegensatz dazu, dass sich ventrale Nervenzellgruppen nur ausbilden, wenn die Expression von Pax7 und Pax3 unterdrückt wird (Liem, Tremml et al. 1995; Mansouri and Gruss 1998). Wahrscheinlich erfolgte eine unsaubere Resektion am Grenzbereich von dorsalem zu ventralem Mittelhirngewebe. Als mit dorsalem Gewebe verunreinigte ventrale Probe lässt sich der Anstieg von Pax3 bei Elektroporation mit siPax7 als ausbalancierende Interaktion von Pax3 mit Pax7 interpretieren.

Da sich in meinen Ergebnissen keine eindeutige Beeinflussung von Pax3 und Pax7 auf das ventrale Mittelhirngewebe gezeigt hatte, konnten die ventralen PCR- Ergebnisse der Zellzyklusgene nicht interpretiert werden. Weitere Aufschlüsse würden qRT-PCR-Analysen mit ventralem Gewebe mit ähnlicher Transfektionsstärke liefern.

5.3. Konzentrationsunterschiede von Pax7 haben einen Einfluss auf Pax3 als auch auf Pax7 selbst im dorsalen Mittelhirn des Hühnerembryos

5.3.1 Konzentrationsabhängige Redundanz von Pax7 und Pax3 im dorsalen Mittelhirn

Bei einer Vielzahl von Pax-Genen ist die gegenseitige gewebespezifische direkte und indirekte Interregulation beschrieben worden, wie zum Beispiel zwischen Pax1 und Pax9 während der Skelettentwicklung, zwischen Pax2 und Pax6 während der Augenentwicklung, zwischen Pax8 und Pax2 während der Nierenentwicklung, oder zwischen Pax2 und Pax5 im Bereich der MHB (mid-hindbrain-boundary) während der Entwicklung des ZNS (Peters, Wilm et al. 1999; Bouchard, Pfeffer et al. 2000; Schwarz, Cecconi et al. 2000; Bouchard, Souabni et al. 2002; Frost, Grocott et al. 2008). Dies geschieht entweder auf direktem Weg oder es sind Faktoren aus der TGF-Beta-Familie involviert (Frost, Grocott et al. 2008).

Für Pax3 und Pax7 besteht in bestimmten Regionen des zentralen Nervensystems und im Muskelgewebe eine funktionelle Redundanz (Mansouri 1998; Borycki, Li et al. 1999; Relaix, Montarras et al. 2006), wobei nicht immer die gesamte Funktion des anderen Gens ausgeglichen werden kann (Relaix, Rocancourt et al. 2004; Relaix, Montarras et al. 2006; Thompson, Zembrzycki et al. 2008). Bei Krallenfröschen (lat.

Xenopus) führte zum Beispiel der Verlust von Pax3 im Neuralrohr zu einem Verlust von Pax7 (Maczkowiak, Mateos et al. 2010). Studien im dorsalen Mittelhirn zeigten, dass eine dorsale Überexpression von Pax7 im dorsalen Mittelhirn zu einer Hochregulation der Pax3- Aktivität führen kann (Matsunaga, Araki et al. 2001; Agoston, Li et al. 2012). Eine Erhöhung der Pax7- Konzentration führt also nicht zwangsweise zu einer Reduktion der Pax3- Konzentration. Bis zu einem gewissen Ausmaß scheint Pax7 die Expression von Pax3 zu fördern oder zu stabilisieren. Überexpression von Pax3 im Mittelhirn scheint ab einer bestimmten Konzentration in einer Reduktion von Pax7 zu resultieren (Agoston, Li et al. 2012). Dies deutet daraufhin, dass eine gegenseitige Abhängigkeit der Konzentrationen von Pax3 und Pax7 im dorsalen Mittelhirn vorhanden ist. Bisher konnte jedoch noch keine eindeutige Korrelation nachgewiesen werden.

Meine qRT-PCR- Analysen zeigten, dass in der ersten Analyse eine geringe Transfektionsstärke von Pax3HA um nur das 0,02-fache im Vergleich zur elektroporierten Kontrollprobe (Wildtyp) zu einem geringen Anstieg um das 1,16- fache der Pax7-RNA führte. Die Pax3-RNA Menge blieb bei leichter Pax7 Überexpression um das 1,33-fache in der ersten Analyse nahezu unverändert. Die zweite qRT-PCR- Analyse hingegen mit einer hohen Transfektion von Pax3 (Pax3HA) und Pax7 (Pax7pMES) hatte eine Reduktion des jeweils anderen Pax-Gens zu Folge. Eine Erhöhung der Pax7 Konzentration um das 6,93-fache im Vergleich zur elektroporierten Kontrollprobe resultierte in einer um 0,13-fach verminderten Konzentration von Pax3. Eine Erhöhung der Pax3 Konzentration um das über 400- fache im Vergleich zum Wildtyp reduzierte die Pax7- Konzentration um das ungefähr 0,3-fache im Vergleich zum Wildtyp.

Dies deutet daraufhin, dass die Konzentrationen von Pax7 oder Pax3 erst einen bestimmten Schwellenwert überschreiten müssen, bis gegenregulative Schritte in Form eines Konzentrationsabfalls von Pax3 oder Pax7 eingeleitet werden. Dieses Ergebnis stimmt- was den Einfluss von Pax3 auf Pax7 betrifft- mit dem von Agoston et al dargestellten Ergebnissen überein (Agoston, Li et al. 2012). Allerdings zeigten die dort dargestellten Ergebnisse auch, dass eine Überproduktion von Pax7 auch im dorsalen Mittelhirn zu einer stärkeren in situ- Expression von Pax3 mRNA im dorsalen Gewebe

führt. Jedoch wurde im Gegensatz zu der hier angewendeten Methode der qRT-PCR-Analyse eine mRNA in-situ Hybridisierung angewendet, sodass diese beiden Ergebnisse nicht äquivalent miteinander verglichen werden können. Sehr wahrscheinlich liegt die Pax7-Expression der in Agoston et. al dargestellten Ergebnisse zwischen den beiden qRT-PCR Analysen. Diese Pax7-Expression hatte dementsprechend nach meiner These zufolge den spezifischen Schwellenwert zur Downregulation von Pax3 noch nicht erreicht und reagierte stattdessen mit einer Konzentrationserhöhung von Pax3.

Diese Schwellenwerte könnten zum einen wichtig sein, damit kleine Konzentrationsschwankungen nicht sofort zu eingreifenden Maßnahmen auf die Entwicklung der dorsalen Vorläuferzellen führen. Zum anderen könnten verschiedene dorsale Vorläuferzellen verschiedene Schwellenwerte besitzen, damit sich je nach Sensibilität der Vorläuferzelle und der damit verbundenen unterschiedlichen Konzentration der Transkriptionsfaktoren und der anderen Genen spezifizierte Neuronentypen im dorsalen Mittelhirn ausbilden können. Schlussfolgernd lässt sich beurteilen, dass eine stabile Konzentration von Pax3 und Pax7 für die Entwicklung des Mittelhirns von essentieller Bedeutung zu sein scheint.

Die Elektroporationen mit siPax7 und Pax7EnR führten bei guter Transfektionsrate zu einer gleichbleibenden oder sogar zunehmenden Aktivität von Pax7. Die Elektroporation mit siPax7 in der ersten qRT-PCR-Analyse bei einer Transfektionsrate um das ca. 8,5-fache im Vergleich zur Expression im Wildtyp führte nahezu zu keiner Konzentrationsänderung der Pax7-Expression. Im Vergleich dazu konnte bei der zweiten qRT-PCR-Analyse mit einer um das über 11-fach erhöhten Transfektionsrate im Vergleich zur Expression im Wildtyp eine Erhöhung der Pax7-Aktivität um das 1,56-fache erreicht werden. Im Vergleich dazu änderte sich die Pax7-Expression bei den Elektroporationen mit Pax7EnR trotz ausreichender Transfektionsrate (in der ersten qRT-PCR-Analyse eine über 3-fach erhöhte Transfektionsrate und in der zweiten qRT-PCR-Analyse eine 37,15-fach erhöhte Transfektionsrate als zum Wildtyp) nicht wesentlich. Diese auf den ersten Blick sehr widersprüchlichen Ergebnisse können durch die funktionelle Redundanz der beiden Pax-Gene erklärt werden.

Auf zellulärer Ebene hat die regulative Überexpression von Pax3 bei Elektroporation mit sipax7 (Fold Change von 1,67 in der ersten Analyse und Fold Change von 1,02 in der zweiten Analyse) den Mangel an Pax7 nach 24 Stunden wieder ausgeglichen. Auch bei der Elektroporation mit Pax7 EnR ist die Pax3- Expression in der ersten (Fold Change von 1,54) und in der zweiten (Fold Change von 1,31) qRT-PCR-Analyse erhöht und schafft somit eine zelluläre Balance der einzelnen Konzentrationen. Der geringe Expressionsanstieg von Pax3 um das nur 1,02-fache nach Elektroporation mit siPax7 in der zweiten qRT-PCR- Analyse legt noch einen anderen Regulationsmechanismus dar, der nachfolgend diskutiert wird.

SiPax7 führt zu einer Herunterregulation des Pax7-Proteins (Li, unveröffentlicht) und hat also eine direkte Wirkung auf die Pax7 Konzentration. Pax7 EnR führt als umgewandelter Transkriptionsrepressor zu einer Hemmung aller von Pax7 geförderten Gene. Pax3 scheint es also auf beiden Ebenen möglich zu sein, einen Konzentrationsmangel von Pax7 auszugleichen. Hierzu scheinen keine Schwellenwerte notwendig zu sein, oder die jeweiligen Transfektionswerte lagen über dem Schwellenwert.

5.3.2. Negative Autoregulation von Pax7

Wie auch die funktionelle Redundanz ist die Autoregulation der Pax-Gene ein häufig zu findender Mechanismus, um bestimmte Genexpressionsmuster während der Embryogenese konstant aufrechtzuerhalten oder um eine Balance dieser Gene trotz diverser zellulärer Störfaktoren herzustellen.

Diese Autoregulation findet man in Geweben wie dem Auge, dem ZNS, der Niere, des Pankreas, des Skelettsystems, den Muskeln, den Zähnen und des Thymus für die gewebespezifischen Pax- Gene (Frost, Grocott et al. 2008). Im Zebrafisch in der MHB (mid- hindbrain- boundary) ist eine indirekte positive Autoregulation von Pax2 über Engrailed bekannt (Picker, Scholpp et al. 2002; Frost, Grocott et al. 2008), eine negative Autoregulation von Pax4 besteht im menschlichen Pankreas vor allem über die eigene Homöodomäne (Smith, Watada et al. 2000). Von Pax6 sind mehrere Fälle von positiver und negativer Autoregulation in verschiedenen Gebieten beschrieben (Aota, Nakajima et al. 2003; Pinson, Simpson et al. 2006; Grocott, Frost et al. 2007; Frost, Grocott et al. 2008). - wie zum Beispiel die positive Autoregulation von Pax6 im kaudalen

Diencephalon von Mäusen (Grindley, Hargett et al. 1997) oder im Ektoderm der sich entwickelnden Augenlinse von Mäusen (Ashery-Padan, Marquardt et al. 2000). Im Kortex von Mäusen wird das Pax6 mRNA- Level zellautonom reduziert, wenn Pax6 überexprimiert wird (Manuel, Georgala et al. 2007).

Die vorliegenden Versuche zeigten, dass die Elektroporation mit Pax7 in der ersten qRT- Analyse bei geringer Transfektionsrate (nur 1,33-fach höher mehr als die Expression im Wildtyp) zu einer leicht verminderten Konzentrationsänderung um das 0,99-fache im Vergleich zur Kontrollprobe führte, wohingegen eine höhere Transfektionsrate (um das 6,93-fach höher im Vergleich zur Expression im Wildtyp) in einer leicht abfallenden Konzentration von Pax7 um das 0,09-fach geringer im Vergleich zum Wildtyp resultierte. Da die Pax3- Expression nahezu gleichbleibend in der ersten Analyse bis sogar reduziert in der zweiten Analyse war, kann der fehlende Konzentrationsanstieg von Pax7 nicht alleine durch eine Gegenregulation von Pax3 erklärt werden. Dies deutet eher daraufhin, dass Pax7 sich im Mittelhirn selbst negativ reguliert, und so Expressionsschwankungen in der Zelle autonom ausbalancieren kann. Aufgrund dieser negativen Autoregulation sind Schwankungen der Pax7- mRNA nur schwierig zu erkennen. Das von mir verwendete Gewebe wurde 24 Stunden nach der Elektroporation verarbeitet, sodass deshalb eine Überexpression auf mRNA Ebene schon ausgeglichen worden sein könnte. Auf Proteinebene ließ sich in anderen Experimenten in den elektroporierten Zellen eine deutliche Erhöhung des Pax7- Proteins ausmachen (Li, unveröffentlicht). Bisher besteht in der aktuellen Literatur kein weiterer Hinweis über eine mögliche direkte positive oder negative Autoregulation von Pax7 im zentralen Nervensystem (Stand September 2013).

Diese negative Autoregulation von Pax7 könnte auch der Grund sein, warum sich der Expressionslevel der Zellzyklusgene wie zum Beispiel $p27^{kip}$ trotz Schwankung der Pax7- Konzentration auf dem gleichen Niveau wie die Kontrollprobe bleibt (siehe unten). Bei Pax3 konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Schon eine sehr geringe Transfektionsrate um das 0,02-fache im Vergleich zum elektroporierten Wildtyp führte nach 24 Stunden zu einer leicht erhöhten Pax 3- Expression um das 1.19-fache. Bei einer sehr starken Überexpression von Pax3, um über das 400-fache im Vergleich zum elektroporierten Wildtyp, führte dies zu einem über doppelt so hohen Pax3- Expressionslevel (Fold Change= 2,38). Pax3 scheint meinen Ergebnissen nach zu keiner

negativen Autoregulation fähig zu sein und somit nicht selbstständig eigene Konzentrationsunterschiede ausgleichen zu können. Allerdings kann eine höhere Pax3-Expression aufgrund der funktionellen Redundanz die Pax7 Expression unterdrücken (Mansouri, Stoykova et al. 1996) und scheint so die generelle Expression der beiden Pax- Gene im zentralen Nervensystem wieder auszugleichen. Zusätzlich wurde von Pax3 eine positive Autoregulation im Muskelgewebe von Mäusen beschrieben, was mit meinen Ergebnissen zusätzlich in Relation gebracht werden könnte (Ridgeway and Skerjanc 2001). Meine Ergebnisse zeigen also deutlich, dass Pax7 im Mittelhirn zur negativen Autoregulation fähig ist, wohingegen Pax3 Pax7 negativ reguliert.

In Rhabdomyosarkomen, speziell im alveolaren Rhabdomyosarkom, entsteht durch chromosomale Translokation von Pax3 oder Pax7 ein Fusionsprotein mit FKHR, dem Forkhead transkriptions factor gene, diese Fusionsgene heißen dann Pax3-FKHR und Pax7-FKHR (Davis, D'Cruz et al. 1994; Barr, Nauta et al. 1996; Sorensen, Lynch et al. 2002; Tiffin, Williams et al. 2003). Sie sind in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor deutlich effektiver als das physiologisch vorkommende Pax3 oder Pax7, die Überexpression dieses Fusionsgens führt zur Verhinderung von Apoptose und zum schnellen Tumorwachstum (Bennicelli, Fredericks et al. 1995; Fredericks, Galili et al. 1995). Dies ist im Fall von Pax7-FKHR vermutlich dadurch möglich, dass durch die chromosomale Translokation die negative Autoregulation von Pax7 abgeschaltet wird.

Das Expressionsmuster bei der zweiten qRT-PCR- Analyse bei Elektroporation von siPax7 lässt noch einen anderen autoregulativen Mechanismus von Pax7 vermuten: Nach Elektroporation mit siPax7 zeigte sich eine erhöhte Pax7- Expression, obwohl in dieser Probe Pax3 nicht mit einer erhöhten Expression gegenregulierte (Fold Change von Pax3 betrug 1,02 im Vergleich zum Wildtyp). Die Zunahme von Pax7 nach Elektroporation mit siPax7 war ein unerwartetes Ergebnis und könnte auf ein Feedback-Mechanismus der Pax7- Konzentration in der Zelle im Sinne einer positiven Autoregulation zurückzuführen sein, der ab einer bestimmten Konzentration von Pax7 in Gang gesetzt wird. Von Pax7 selbst ist bisher nur eine indirekte positive Autoregulation über Engrailed2 im Vorder- und Mittelhirn bekannt (Frost, Grocott et al. 2008).

5.3.3. Die Spleißvariante und deren Auswirkung auf das dorsale Mittelhirn

Im Verlauf der PCR- Analyse wurde mit einem bestimmten Primerpaar, das die Transaktivierungs- Domäne (TA= engl. transactivation) von Pax7 nahe des 5'-Endes amplifizierte, eine 65- Basenpaare kürzere Spleißvariante von Pax7 im dorsalen Mittelhirn detektiert. Spleißvarianten bieten einen zusätzlichen Mechanismus zur Regulierung der DNA- Bindungseigenschaften eines Genes. Zum Beispiel kann eine alternative Spleißvariante innerhalb der Paired- Domäne die transkriptionale Aktivität reduzieren (Vogan, Underhill et al. 1996; Kozmik, Czerny et al. 1997).

Bisher sind vier Spleißvarianten von Pax7 in der Paired Domäne bekannt (Kozmik, Czerny et al. 1997; Barr, Fitzgerald et al. 1999), zwei davon haben sehr wahrscheinlich eine Funktion im zentralen Nervensystem, aber nur eine scheint wichtig für die neuronale Differenzierung zu sein (Ziman, Thomas et al. 2001).

Eine 66bp kürzere Spleißvariante wurde bisher nur im Muskelgewebe beschrieben, die sich dort im Zellkern von Myoblasten befindet (Mao, Hu et al. 2008). Die fehlenden Basenpaare im Bereich der Transaktivierungsdomäne von Pax7 führen zu einer starken Reduktion der Transaktivierungsfähigkeit von Pax7 in Cos- Zellen (Mao, Hu et al. 2008). Im Muskelgewebe sind beide Spleißvarianten zwischen Embryonaltag 9 und 16 unterschiedlich stark exprimiert. Die Expression beider Varianten wird zum Ende der Embryonalentwicklung herunter reguliert (Mao, Hu et al. 2008). Die Sequenz dieser Spleißvariante war 2007 direkt in PubMed publiziert worden (siehe [DQ471304.1](#); Kawano,R., Yoshioka,H. and Tanaka,H. Identification of Gallus gallus Pax7 variant form, ein Alignment der unterschiedlichen Sequenzen ist in Anhang G abgebildet). Welche Rolle diese Spleißvariante im Mittelhirn haben könnte, ist bis jetzt noch nicht bekannt. Es ist allerdings sehr wohl möglich, dass die Expression dieser Spleißvariante einen Einfluss auf die Aktivität von Pax7 im dorsalen Mittelhirn hat. Alternative Spleißvarianten sind während der Entwicklung des Nervensystems äußerst wichtig. Die kanonische Form von Pax6 beeinflusst zum Beispiel gleichzeitig Zellschicksal und Zellproliferation im Telencephalon (Haubst, Berger et al. 2004). Eine Spleißvariante von Pax6, die ein zusätzliches Exon in der Paired Domäne aufweist, wirkt jedoch nur auf das Zellschicksal (Haubst, Berger et al. 2004). Es könnte deshalb sehr gut sein, dass noch weitere Spleißvarianten von Pax7 im ZNS vorkommen und diese eine Rolle für Spezifizierung oder für die Proliferation neuronaler Subtypen spielen könnten.

5.4. Konzentrationsunterschiede von Pax7 und Pax3 haben einen Einfluss auf Zellzyklusgene und bestimmte Transkriptionsfaktoren im dorsalen Mesencephalon des Hühnerembryos

5.4.1. Die Zyklone der G1/S- Phase

Die Konzentration von Pax-Genen, vor allem die Konzentration von Pax7, scheint einen Einfluss auf die Expression der D- und E-Zyklone im dorsalen Mittelhirn zu haben. Zusätzlich zu ihrer proliferationsfördernden Funktion im Zellzyklus haben die Zyklone teilweise Isoform- spezifische zellzyklusunabhängige Funktionen, wie die Transkriptionsregulation verschiedener Zielgene und die Steuerung des Differenzierungsgrades von Zellpopulationen (siehe Einleitung). Diese Erkenntnisse müssen in die Auswertung der vorliegenden Ergebnisse mit einbezogen werden.

5.4.1.1. Cyclin D1

Verschiedene Versuche weisen darauf hin, dass Cyclin D1 neben seiner zellzyklusabhängigen Funktion auch eine andere Funktion hat, die die Transkription von Differenzierungsgenen beeinflusst und somit die Neurogenese bestimmter Vorläuferzellen fördern könnte (Ratineau, Petry et al. 2002; Bienvenu, Jirawatnotai et al. 2010). In Kombination mit spezifischen CDKs wie CDK4 agiert Cyclin D1 im Rahmen des Zellzyklus als positiver Regulationsmechanismus der Proliferation von neuronalen Stammzellen und hemmt deren weitere Differenzierung (Lange, Huttner et al. 2009). Wird jedoch so viel Cyclin D1 exprimiert, dass die gesamte Menge nicht mehr komplett an CDK4 gebunden werden kann, so kann ungebundenes Cyclin D1 neuronale Differenzierung unterstützen (Coqueret 2002; Lukaszewicz and Anderson 2011). Dies wurde dadurch bestätigt, dass ein Mangel von CDK2 und CDK4 zu einem Wechsel von Proliferation hin zur Differenzierung bestimmter neuronaler Vorläuferzellen führt (Lim and Kaldis 2012).

Cyclin D1 ist im embryonalen Rückenmark des Huhnes entlang der anterior-posterioren Achse in Abhängigkeit von Shh vorwiegend im Bereich der Neuralrinne der Neuralplatte exprimiert und trägt zur Entwicklung des Neuroepithels als auch des paraxialen Mesoderms bei (Lobjois, Benazeraf et al. 2004). Auch im Bereich der dorsoventralen Achse konnte eine vermehrte Cyclin D1- Aktivität im Bereich der ventralen Bodenplatte festgestellt werden (Lobjois, Benazeraf et al. 2004), zusätzlich

muss Cyclin D1 zur Ausreifung der ventralen Motoneuronen im embryonalen Rückenmark dauerhaft exprimiert sein (Lukaszewicz and Anderson 2011).

Bei beiden Versuchen führten alle Plasmid- Vektoren zu einer verstärkten Expression von Cyclin D1 im dorsalen Mittelhirn. Aufgrund der hohen Standardabweichung in der ersten qRT-PCR konnte die Expression von Cyclin D1 bei Überexpression mit Pax7 nicht in die Auswertung mit einbezogen werden. Die Überexprimierung mit Pax7 wie auch mit Pax3 führte selbst bei einer sehr hohen Transfektionsrate nur zu einer geringen Aktivitätssteigerung bis maximal das 1,60- fache bei der stärksten Transfektionsrate bei Pax7- Überexpression und bis maximal das 1,33-fache in der zweiten Analyse bei starker Pax3- Überexpression. Diese vergleichsweise geringe Expressionssteigerung von Cyclin D1 nach Überexprimierung mit Pax7 wie auch mit Pax3 könnte durch einen komplizierten Mechanismus der zuvor erwähnten Auto- und Interregulation der beteiligten Faktoren wie den Pax- Genen ausgelöst werden.

Auffällig ist jedoch, dass vor allem die Reprimierung von Pax7 mittels siPax7 zur stärksten Expression von Cyclin D1 zum einen um das 6,44- fache in der ersten Analyse und zum anderen um das 5,71-fache im Vergleich zur Expression in der Kontrolle geführt hatte. Eine Theorie wäre, dass diese hohe Expressionsrate durch die gegenregulative Überexpression von Pax3 zustande gekommen sein könnte, jedoch zeigte sich in der zweiten qRT-PCR- Analyse nur ein geringfügiger Expressionsanstieg von Pax3 um das 1,02-fache im Vergleich zum elektroporierten Wildtyp.

Eine andere Erklärung könnte jedoch auch die oben erläuterte ventralisierende Eigenschaft von Cyclin D1 geben: Wird dem Gewebe durch eine Reduktion von Pax7- die proliferativen als auch zugleich dorsalisierenden Faktoren entzogen, so könnte Cyclin D1 durch einen unbekanntem Faktor so stark überexprimiert werden, dass die Gesamtmenge an Cyclin D1 nicht mehr an CDK4 gebunden werden kann und freies Cyclin D1, als ventralisierender Faktor die Differenzierung ventraler Vorläuferzellen wie den Motoneuronen im Gewebe verstärkt. Somit könnten je nach Lokalisation im neuronalen Zellgewebe und je nach Aktivierung proliferationsfördernder und – hemmender als auch dorsalisierender und ventralisierender Faktoren Cyclin D1 jeweils zwei Funktionen zugesprochen werden: Zum einen eine proliferationsfördernde und zum anderen eine ventralisierende differenzierungsanregende Funktion, wenn dorsalisierende Signale wie zum Beispiel Pax7 unterdrückt werden. In dieser

Konstellation könnte dann die Überproduktion von Pax3 bei Cyclin D1 nicht den Mangel an Pax7 und dessen Funktion ausgleichen und somit die oben beschriebene funktionelle Redundanz nicht auf allen Bereichen existieren. Diese Theorie gilt es jedoch erst in weiteren Experimenten zu beweisen.

5.4.1.2. Cyclin D2

Cyclin D2 führt wie auch Cyclin D1 im Rahmen des Zellzyklus zu einer Steigerung von Proliferation zu Lasten der Differenzierung (Lobjois, Benazeraf et al. 2004). Zwar ist Cyclin D2 entlang der anterior-posterioren Achse beim Hühnerembryo in Abhängigkeit vom FGF- Signalweg im Bereich der posterioren Neuralplatte exprimiert und weist eine vorwiegend dorsale Expression im Rückenmark auf (Lobjois, Benazeraf et al. 2004), jedoch scheint Cyclin D2 im Gegensatz zu Cyclin D1 keine zellzyklusunabhängige Rolle im Bereich der neuronalen Spezifizierung und Differenzierung bestimmter neuronaler Vorläuferzellen zu spielen, sondern führt eher bei Überexpression zu einer Inhibition der Neurogenese und zu einer Proliferationssteigerung (Glickstein, Alexander et al. 2007; Lukaszewicz and Anderson 2011).

Im ersten qRT-PCR- Versuch konnte aufgrund der hohen Standardabweichung der Kontrollprobe keine eindeutige Aussage über die Aktivität von Cyclin D2 bei den einzelnen Elektroporationen getroffen werden. Bei der zweiten qRT-PCR- Analyse scheint die Überexpression mit Pax3 bei sehr hoher Transfektionsstärke eher zu einer Abnahme der CyclinD2- Konzentration zu führen (FC bei 0,91 im Vergleich zur Kontrollprobe), was höchstwahrscheinlich an der ausgleichenden Reduktion von Pax7 in der Probe liegt. Auch eine Überexpression mit Pax7 resultierte nur in einem 1,08-fachen erhöhten Konzentrationsunterschied im Vergleich zur Kontrollprobe. Gegenregulative Schritte wurden somit im Rahmen der negativen Autoregulation und eventuell der funktionellen Redundanz eingeleitet und führten somit zu einem Konzentrationsausgleich von Cyclin D2. Bei den Pax7- reduzierenden Elektroporationen mittels siPax7 und Pax7 EnR zeigte sich in der zweiten qRT-PCR- Analyse ein Konzentrationsanstieg von jeweils 1,51-fach höherem und 1,18-höherem Fold Change im Vergleich zur Kontrollprobe. Dies kann durch die funktionelle Redundanz der beiden Pax- Gene als auch durch die womögliche positive Autoregulation von Pax7 erklärt werden. Cyclin D2 scheint also in den vorliegenden

Ergebnissen als zellzyklusabhängiger Faktor zu agieren, bei dem kleine Unregelmäßigkeiten der einzelnen Faktoren durch eine Gegenregulation ausgeglichen werden, um die relevante Balance der beteiligten Gene im Gewebe aufrechtzuerhalten.

5.4.1.3. Cyclin E

Die qualitative PCR- Analyse zeigte dorsal eine leicht reduzierte Expression von Cyclin E, wenn Pax7 überexprimiert wurde- bei beiden Repressionen von Pax7 zeigte sich jedoch eine noch deutlichere Expressionsminderung von Cyclin E. Die Expression von Cyclin E reduzierte sich jedoch auch bei einer Überexpression von Pax3 aufgrund oben beschriebener Autoregulation. Es konnte jedoch kein Ausgleich bei Mangel an Pax7 geschaffen werden, wenn man annimmt, dass die Expression von Pax3 gegenregulativ ansteigen würde. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass nur Pax7 und nicht Pax3 den Übergang von der G1- zur S- Phase Richtung Proliferation erleichtert, in dem es die Transkription von Genen verstärkt, die die Transkription von Cyclin E fördern. Möglicherweise könnte auch ein direkter Einfluss von Pax7 auf Cyclin E existieren. Bisher gibt es in der Literatur keine Hinweise auf einen direkten Einfluss. Leider zeigte sich in der Schmelzkurvenanalyse von Cyclin E bei den beiden qRT- PCR- Analysen durch das Auftreten mehrerer Peaks eine zu geringe Primerspezifität oder eine Detektion unspezifischer Primerdimere, sodass Cyclin E von den weiteren Auswertungen ausgeschlossen werden musste. Es konnten auch keine weiteren passenden Primerpaare identifiziert werden. Inwieweit das Ergebnis der qualitativen PCR- Analyse, das mit den gleichen Cyclin E- Primern erzeugt wurde, berücksichtigt werden kann, kann nur durch weitere qRT- PCR-Analysen mit optimierten Cyclin E- Primern gesagt werden. Experimente mit anderen Primern für Cyclin E sind aktuell in Gange.

5.4.2. Die Transkriptionsfaktoren E2f1 und p53

Von E2f1 und p53 liegen nur die Daten der qualitativen PCR vor. Anhand der großen Variation der Ergebnisse von E2f1 konnten keine eindeutigen Schlussfolgerungen getroffen werden. Dorsal scheint die Aktivität von E2f1 durch Pax7 und vor allem durch Pax3 gefördert zu werden. Bei Elektroporation mit siPax7 und mit Pax7 EnR im dorsalen Mittelhirn reduzierte sich dessen Aktivität, was die These unterstützen würde, dass die Aktivität von E2f1 als positiver Proliferationsregulator durch diese beiden Pax-

Gene positiv gefördert wird und dadurch der Weg in Richtung Proliferation eingeleitet wird. Um diese These zu festigen, müssten qRT-PCR-Analysen mit E2f1 vorgenommen werden.

Von p53 ist bekannt, dass dessen transkriptionale Aktivität durch Pax3 negativ reguliert wird (Underwood, Amin et al. 2007). Der Schluss des Neuralrohrs durch Pax3 kann nur stattfinden, indem Pax3 die p53- abhängige Apoptose inhibiert (Pani, Horal et al. 2002). Dies findet jedoch durch transkriptionsunabhängige Ubiquitinierung von p53 durch Pax3 statt (Wang, Morgan et al. 2011). Die *splotch*- Variante der Maus zeigt eine Erhöhung von p53 auf Proteinebene, jedoch nicht auf mRNA-Ebene (Pani, Horal et al. 2002). In den jeweiligen PCR-Analysen zeigte sich interessanterweise vor allem bei Überexprimierung mit Pax3 eine stärkere Bande bei p53, wobei p53 bei den anderen Elektroporationen reduziert war. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Regulation von p53 durch Pax3 transkriptionsunabhängig nicht auf mRNA-Ebene sondern auf Proteinebene stattfindet, wie in der Literatur beschrieben. Um eine endgültige Aussage diesbezüglich zu treffen, sollten nicht nur qRT-PCR-Analysen mit verbesserten Primern für p53 vorgenommen werden, sondern auch Proteinanalysen wie Westernblots und Immunpräzipitationen.

5.4.3 Der CDK- Inhibitor p27^{kip}

Von Pax6 ist bekannt, dass es die Proliferation fördert, indem es negative Regulatoren des Zellzyklus wie p21, p27^{kip} und p57 unterdrückt, um den Fokus in Richtung Proliferation der Augenstrukturen zu richten (Duparc, Abdouh et al. 2007; Thompson and Ziman 2011). Im Gegensatz dazu führt jedoch eine Überexpression von Pax6 zu einer reduzierten Proliferationsrate kortikaler Vorläuferzellen in einer zellautonomen und autoregulierten Art (Manuel, Georgala et al. 2007). Von p27^{kip} sind zwei Funktionsdomänen bekannt: Eine, die am Zellzyklus teilnimmt und eine, die unabhängig davon Differenzierung begünstigt (Nguyen, Besson et al. 2006). Die Aktivität des CDK- Inhibitors p27^{kip} zeigte sich durch die Überexpression von Pax7 und Pax3 nahezu unbeeinflusst. Dies lässt vermuten, dass durch die negative Autoregulation von Pax7 als auch durch die funktionelle Redundanz der beiden Pax- Gene die p27^{kip} Expression im dorsalen Mittelhirn stabil gehalten werden kann.

Bei Reprimierung von Pax7 durch siPax7 wurde bei beiden qRT-PCR-Analysen eine verstärkte Aktivität von $p27^{kip}$, zum einen um das 1,5-fache in der ersten Analyse und zum anderen um das 3,0-fache in der zweiten Analyse detektiert. Wird die Expression von Pax7 also unterdrückt, so steigt die $p27^{kip}$ -Aktivität an, obwohl Pax3 durch eine erhöhte Expressionsrate gegenreguliert hatte. Die Unterdrückung des proliferationsfördernden Transkriptionsfaktors Pax7 führte also dazu, dass $p27^{kip}$ als antiproliferativer Faktor verstärkt exprimiert wurde und somit den Weg Richtung Differenzierung möglicherweise einleiten konnte. Anscheinend konnte die Gegenregulation durch eine erhöhte Expression von Pax3 dies nicht ausgleichen, wobei sich jedoch bei der zweiten qRT-PCR-Analyse auch nur ein geringer Anstieg von Pax3 um das 1,02-fache im Vergleich zum elektroporierten Wildtyp zeigte. Bei den Elektroporationen mit Pax7 EnR konnte sich dies nicht bestätigen. Bei der ersten Elektroporation kam es zu einer Steigerung der $p27^{kip}$ -Expression auf das 1,48-fache im Vergleich zur Kontrollprobe, bei der zweiten Elektroporation reduzierte sich die $p27^{kip}$ -Konzentration um das 0,42-fache im Vergleich zur elektroporierten Kontrollprobe. Dies könnte ein Hinweis sein, dass auf dieser Ebene im dorsalen Mittelhirn die $p27^{kip}$ -Expression durch einen anderen Mechanismus als durch die funktionelle Redundanz der beiden Pax- Gene reguliert wird.

Zwar scheinen Pax7 und Pax3 ihre Zellfunktionen auszugleichen, jedoch scheint dies nicht in jedem Fall möglich. In den Satellitenzellen im Muskelgewebe sind jeweils Pax3 und Pax7 exprimiert, wobei es in Pax7-defizienten Mäusen zu einem Verlust der Satellitenzellen kommt, der trotz der Präsenz von Pax3 nicht ausgeglichen werden kann. Im Muskelgewebe kann Pax3 also die antiapoptotische Funktion von Pax7 nicht ausgleichen (Relaix, Montarras et al. 2006).

$p27^{kip}$ ist ein CDK-Inhibitor, der unterdrückt werden muss, damit sich Zellen weiterhin proliferieren und nicht den Weg in Richtung Differenzierung einschlagen. Zum Erhalt von Stammzellen müsste Pax7 also $p27^{kip}$ unterdrücken. Wird jedoch Pax7 im dorsalen Mesencephalon reprimiert, so kann das gegenregulierte Pax3 diese Funktion nicht kompensieren und die Aktivität des differenzierungsfördernden $p27^{kip}$ steigt an und durch dessen antiproliferative Eigenschaft wird die Menge an Vorläuferzellen reduziert und deren Differenzierung eingeleitet. Es scheint also, als ob sich die Erkenntnisse im Muskelgewebe auf das zentrale Nervensystem übertragen lassen könnten. Jedoch führt

in der Literatur ein Knockout von Pax7 bei Mäusen zu keinen zentralnervösen Fehlbildungen (Mansouri, Stoykova et al. 1996).

5.5. Fazit

Die hier durchgeführten Experimente zeigen neue mögliche Interaktionsmuster zwischen Pax3 und Pax7 im dorsalen Mittelhirn auf und geben Hinweise auf weitere Regulationsmechanismen der jeweiligen Pax- Gene. Pax7 scheint dabei durch positive als auch negative Autoregulation der eigenen Regulation fähig zu sein, was bei den vorliegenden Ergebnissen bei Pax3 nicht der Fall zu sein scheint. Pax3 scheint also nur durch die funktionelle Redundanz von Pax7 reguliert zu werden. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass eine stabile Expression von Pax7 für die adäquate Ausreifung der neuronalen Vorläuferzellen im dorsalen Mittelhirn des Hühnerembryos wichtiger zu sein scheint als eine stabile Expression von Pax3.

Dies stellten auch die Ergebnisse der qRT-PCR- Analysen mit Cyclin D1 und $p27^{kip}$ im dorsalen Mesencephalon dar. Nur unterschiedliche Expressionen von Pax7 scheinen auf die Expression von Cyclin D1 einen Einfluss zu haben- eine gegenregulative Erhöhung der Pax3- Expression scheint dies nicht ausgleichen zu können. Interessanterweise wären nun die Expressionsmuster bei Reprimierung der Pax3- Expression im dorsalen Mittelhirn des Hühnerembryos mittels qRT- PCR- Analysen zu prüfen.

Neben diesen neuen Regulationsmechanismen wurde zusätzlich aufgrund der differierenden Transfektionseffizienzen in den einzelnen Elektroporationen eine mögliche schwellenwertspezifische funktionelle Redundanz von Pax3 und Pax7 festgestellt. Um diese Schwellenwerte in weiteren qRT-PCR- Analysen genauer zu ermitteln, müsste präpariertes Gewebe verwendet werden, das mit unterschiedlichen Konzentrationen des Pax7 oder Pax3- Gens transfiziert wurde. Dies wird erreicht, indem unterschiedliche $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -Konzentrationen des Pax7- oder Pax3- Plasmids in das dorsale Mittelhirn transfiziert werden. Außerdem müsste in weiteren Experimenten sehr darauf geachtet werden, dass nur gleichmäßig transfiziertes Gewebe für die mRNA Gewinnung verwendet wird und Gewebe mit geringen Transfektionsraten verworfen wird.

6. Zusammenfassung

Neuronale Vorläuferzellen des ZNS entscheiden während der G1- Phase des Zellzyklus, ob sie den Weg Richtung Proliferation oder Differenzierung einschlagen. In Hinblick auf kleinere Expressionsschwankungen oder auf veränderte Umweltsignale am G1/S-Punkt müssen sie dabei ihren Expressionslevel der Transkriptionsfaktoren innerhalb ihrer Zellgrenzen stabilisieren und gleichzeitig auch dazu fähig sein auf die unterschiedliche Expression ihrer spezifischen Transkriptionsfaktoren zu reagieren.

Ich veranschaulichte in meiner Dissertation, dass im dorsalen Mittelhirn des Hühnerembryos die Transkriptionsfaktoren Pax7 und Pax3 die Fähigkeit besitzen, die Transkription wichtiger Zellzyklusgene am Restriktionspunkt zu beeinflussen und somit dazu beitragen, dass sich geordnete regionalisierte neuronale Subtypen ausbilden.

Mittels der in ovo- Elektroporation verschiedener Plasmidkonstrukte, die entweder Pax7 oder Pax3 überexprimierten oder die Expression von Pax7 unterdrückten, konnte ich unterschiedliche Expressionskonzentrationen von Pax7 als auch von Pax3 im Mittelhirn erzielen. Die Auswirkungen der Konzentrationsunterschiede auf die Zellzyklusgene der G1/S-Phase prüfte ich durch qualitative und quantitative Analyse mittels der PCR- und der qRT-PCR- Technik.

Dabei präsentierte sich im dorsalen Mittelhirn ein komplexes Interaktionsmuster von Pax3 und Pax7. Zum einen scheint die funktionelle Redundanz der beiden Pax- Gene konzentrationsabhängig an einen Schwellenwert gebunden zu sein und zum anderen scheint Pax7- und nicht Pax3- einer negativen als auch positiven Autoregulation fähig zu sein. Bei der Analyse der Zellzyklusgene zeigten sich diese entweder durch die bestehende funktionelle Redundanz hinsichtlich ihrer Konzentration ausgeglichen oder sie veränderten bei Mangel an dem proliferationsfördernden Transkriptionsfaktor Pax7- was eine Erhöhung der Pax3- Konzentration nicht ausbalancieren konnte- ihr Expressionsmuster von Proliferation hin zur Differenzierung.

Diese Ergebnisse und deren weitere Evaluation können zum Verständnis beitragen, wie der Transkriptionsfaktor Pax7 im dorsalen Mittelhirn des zentralen Nervensystems mit den Zellzyklusgenen verknüpft ist und wie die Balance von Proliferation und neuronaler Differenzierung im Bereich der dorsalen Vorläuferregionen eingehalten werden kann.

7. Literaturverzeichnis

- A.E. Wiencken-Barger, V. A. C. (2002). Visual System Development and Neural Activity. Pages 791–804. Encyclopedia of the Human Brain. V. S. Ramachandran.
- Agarwala, S., T. A. Sanders, et al. (2001). "Sonic hedgehog control of size and shape in midbrain pattern formation." *Science* 291(5511): 2147-2150.
- Agerholm-Larsen, B., H. K. Iversen, et al. (2011). "Preclinical validation of electrochemotherapy as an effective treatment for brain tumors." *Cancer Res* 71(11): 3753-3762.
- Agoston, Z., N. Li, et al. (2012). "Genetic and physical interaction of Meis2, Pax3 and Pax7 during dorsal midbrain development." *BMC Dev Biol* 12: 10.
- Altmann, C. R. and A. H. Brivanlou (2001). "Neural patterning in the vertebrate embryo." *Int Rev Cytol* 203: 447-482.
- Alvarez, I. S. and G. C. Schoenwolf (1991). "Patterns of neurepithelial cell rearrangement during avian neurulation are determined prior to notochordal inductive interactions." *Dev Biol* 143(1): 78-92.
- Aota, S., N. Nakajima, et al. (2003). "Pax6 autoregulation mediated by direct interaction of Pax6 protein with the head surface ectoderm-specific enhancer of the mouse Pax6 gene." *Dev Biol* 257(1): 1-13.
- Armesilla-Diaz, A., P. Bragado, et al. (2009). "p53 regulates the self-renewal and differentiation of neural precursors." *Neuroscience* 158(4): 1378-1389.
- Ashery-Padan, R., T. Marquardt, et al. (2000). "Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye." *Genes Dev* 14(21): 2701-2711.
- Barnabe-Heider, F., K. Meletis, et al. (2008). "Genetic manipulation of adult mouse neurogenic niches by in vivo electroporation." *Nat Methods* 5(2): 189-196.
- Barr, F. G., J. C. Fitzgerald, et al. (1999). "Predominant expression of alternative PAX3 and PAX7 forms in myogenic and neural tumor cell lines." *Cancer Res* 59(21): 5443-5448.
- Barr, F. G., L. E. Nauta, et al. (1996). "In vivo amplification of the PAX3-FKHR and PAX7-FKHR fusion genes in alveolar rhabdomyosarcoma." *Hum Mol Genet* 5(1): 15-21.
- Basler, K., T. Edlund, et al. (1993). "Control of cell pattern in the neural tube: regulation of cell differentiation by dorsalin-1, a novel TGF beta family member." *Cell* 73(4): 687-702.
- Becker, E. B. and A. Bonni (2005). "Beyond proliferation--cell cycle control of neuronal survival and differentiation in the developing mammalian brain." *Semin Cell Dev Biol* 16(3): 439-448.
- Bennicelli, J. L., W. J. Fredericks, et al. (1995). "Wild type PAX3 protein and the PAX3-FKHR fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma contain potent, structurally distinct transcriptional activation domains." *Oncogene* 11(1): 119-130.
- Bienvenu, F., S. Jirawatnotai, et al. (2010). "Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic-proteomic screen." *Nature* 463(7279): 374-378.
- Blake, J. and M. R. Ziman (2003). "Aberrant PAX3 and PAX7 expression. A link to the metastatic potential of embryonal rhabdomyosarcoma and cutaneous malignant melanoma?" *Histol Histopathol* 18(2): 529-539.

- Bopp, D., M. Burri, et al. (1986). "Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*." *Cell* 47(6): 1033-1040.
- Borycki, A. G., J. Li, et al. (1999). "Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation." *Development* 126(8): 1665-1674.
- Bouchard, M., P. Pfeffer, et al. (2000). "Functional equivalence of the transcription factors Pax2 and Pax5 in mouse development." *Development* 127(17): 3703-3713.
- Bouchard, M., A. Souabni, et al. (2002). "Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8." *Genes Dev* 16(22): 2958-2970.
- Briscoe, J., A. Pierani, et al. (2000). "A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube." *Cell* 101(4): 435-445.
- Bronner, M. E. and N. M. LeDouarin (2012). "Development and evolution of the neural crest: an overview." *Dev Biol* 366(1): 2-9.
- Cai, J., T. St Amand, et al. (1999). "Expression and regulation of the chicken Nkx-6.2 homeobox gene suggest its possible involvement in the ventral neural patterning and cell fate specification." *Dev Dyn* 216(4-5): 459-468.
- Calegari, F. and W. B. Huttner (2003). "An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis." *J Cell Sci* 116(Pt 24): 4947-4955.
- Carruthers, S., J. Mason, et al. (2003). "Depletion of the cell-cycle inhibitor p27(Xic1) impairs neuronal differentiation and increases the number of ElrC(+) progenitor cells in *Xenopus tropicalis*." *Mech Dev* 120(5): 607-616.
- Chi, N. and J. A. Epstein (2002). "Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease." *Trends Genet* 18(1): 41-47.
- Chiarella, P., V. M. Fazio, et al. (2012). "Electroporation in DNA vaccination protocols against cancer." *Curr Drug Metab*.
- Cooper-Kuhn, C. M., M. Vroemen, et al. (2002). "Impaired adult neurogenesis in mice lacking the transcription factor E2F1." *Mol Cell Neurosci* 21(2): 312-323.
- Coqueret, O. (2002). "Linking cyclins to transcriptional control." *Gene* 299(1-2): 35-55.
- Dahl, E., H. Koseki, et al. (1997). "Pax genes and organogenesis." *Bioessays* 19(9): 755-765.
- Das, G., Y. Choi, et al. (2009). "Cyclin D1 fine-tunes the neurogenic output of embryonic retinal progenitor cells." *Neural Dev* 4: 15.
- Davis, R. J., C. M. D'Cruz, et al. (1994). "Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma." *Cancer Res* 54(11): 2869-2872.
- De Vry, J., P. Martinez-Martinez, et al. (2010). "In vivo electroporation of the central nervous system: a non-viral approach for targeted gene delivery." *Prog Neurobiol* 92(3): 227-244.
- Dehay, C. and H. Kennedy (2007). "Cell-cycle control and cortical development." *Nat Rev Neurosci* 8(6): 438-450.
- Del Bene, F. and J. Wittbrodt (2005). "Cell cycle control by homeobox genes in development and disease." *Semin Cell Dev Biol* 16(3): 449-460.
- Dessaud, E., A. P. McMahon, et al. (2008). "Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network." *Development* 135(15): 2489-2503.

- Diez del Corral, R., I. Olivera-Martinez, et al. (2003). "Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension." *Neuron* 40(1): 65-79.
- Duparc, R. H., M. Abdouh, et al. (2007). "Pax6 controls the proliferation rate of neuroepithelial progenitors from the mouse optic vesicle." *Dev Biol* 301(2): 374-387.
- Duus, P. *Neurologisch-topische Diagnostik: Anatomie-Funktion-Klinik*. 8. Aufl. Stuttgart. Thieme; 2003. 211.
- Eberhard, D., G. Jimenez, et al. (2000). "Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family." *EMBO J* 19(10): 2292-2303.
- Echelard, Y., D. J. Epstein, et al. (1993). "Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity." *Cell* 75(7): 1417-1430.
- Epstein, D. J., M. Vekemans, et al. (1991). "Spotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3." *Cell* 67(4): 767-774.
- Fantl, V., G. Stamp, et al. (1995). "Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development." *Genes Dev* 9(19): 2364-2372.
- Fredericks, W. J., N. Galili, et al. (1995). "The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3." *Mol Cell Biol* 15(3): 1522-1535.
- Frost, V., T. Grocott, et al. (2008). "Self-regulated Pax gene expression and modulation by the TGFbeta superfamily." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43(6): 371-391.
- Fuhrmann, S. (2010). "Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle." *Curr Top Dev Biol* 93: 61-84.
- Gallera, J. (1971). "Primary induction in birds." *Adv Morphog* 9: 149-180.
- Gammill, L. S. and M. Bronner-Fraser (2003). "Neural crest specification: migrating into genomics." *Nat Rev Neurosci* 4(10): 795-805.
- George, R., G. Sriram, et al. (2010). "Isolation of epithelial cells from acrylic removable dentures and gender identification by amplification of SRY gene using real time PCR." *J Forensic Dent Sci* 2(1): 32-36.
- Gilbert, S. F. *Developmental Biology*. 6. Auflage. Sunderland, MA. Sinauer Associates; 2000. 339-410
- Glickstein, S. B., S. Alexander, et al. (2007). "Differences in cyclin D2 and D1 protein expression distinguish forebrain progenitor subsets." *Cereb Cortex* 17(3): 632-642.
- Glickstein, S. B., J. A. Monaghan, et al. (2009). "Cyclin D2 is critical for intermediate progenitor cell proliferation in the embryonic cortex." *J Neurosci* 29(30): 9614-9624.
- Goulding, M. D., G. Chalepakis, et al. (1991). "Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis." *EMBO J* 10(5): 1135-1147.
- Greene, N. D. and A. J. Copp (2009). "Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube." *Prenat Diagn* 29(4): 303-311.
- Grindley, J. C., L. K. Hargett, et al. (1997). "Disruption of PAX6 function in mice homozygous for the Pax6Sey-1Neu mutation produces abnormalities in the early development and regionalization of the diencephalon." *Mech Dev* 64(1-2): 111-126.

- Grocott, T., V. Frost, et al. (2007). "The MH1 domain of Smad3 interacts with Pax6 and represses autoregulation of the Pax6 P1 promoter." *Nucleic Acids Res* 35(3): 890-901.
- Gros, J., K. Feistel, et al. (2009). "Cell movements at Hensen's node establish left/right asymmetric gene expression in the chick." *Science* 324(5929): 941-944.
- Guo Dx Fau - Li, H.-P., L. Li Hp Fau - Li, et al. "Allele-specific real-time PCR testing for minor HIV-1 drug resistance mutations: assay preparation and application to reveal dynamic of mutations in vivo." (0366-6999 (Print)).
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1992). "A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951." *Dev Dyn* 195(4): 231-272.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Harbour, J. W. and D. C. Dean (2000). "The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms." *Genes Dev* 14(19): 2393-2409.
- Haubst, N., J. Berger, et al. (2004). "Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development." *Development* 131(24): 6131-6140.
- Hindley, C. and A. Philpott (2012). "Co-ordination of cell cycle and differentiation in the developing nervous system." *Biochem J* 444(3): 375-382.
- Ho, A. and S. F. Dowdy (2002). "Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes." *Curr Opin Genet Dev* 12(1): 47-52.
- Holland, L. Z. and S. Short (2010). "Alternative splicing in development and function of chordate endocrine systems: a focus on Pax genes." *Integr Comp Biol* 50(1): 22-34.
- Holzappel, B. and L. Wickert (2007). "Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete." *Biologie in unserer Zeit* 37(2): 120-126.
- Huard, J. M., C. C. Forster, et al. (1999). "Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2." *Development* 126(9): 1927-1935.
- Hube, F., P. Reverdiau, et al. (2005). "Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences." *Mol Biotechnol* 31(1): 81-84.
- Inoshita, S., Y. Terada, et al. (1999). "Regulation of the G1/S transition phase in mesangial cells by E2F1." *Kidney Int* 56(4): 1238-1241.
- Itoh, Y., N. Masuyama, et al. (2007). "The cyclin-dependent kinase inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex." *J Biol Chem* 282(1): 390-396.
- Jacob, J. and J. Briscoe (2003). "Gli proteins and the control of spinal-cord patterning." *EMBO Rep* 4(8): 761-765.
- Jaynes, J. B. and P. H. O'Farrell (1991). "Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein." *EMBO J* 10(6): 1427-1433.
- Jostes, B., C. Walther, et al. (1990). "The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system." *Mech Dev* 33(1): 27-37.
- Kaptein, S. J., J. Jungscheleger-Russell, et al. (2008). "Generation of polyclonal antibodies directed against G protein-coupled receptors using electroporation-aided DNA immunization." *J Pharmacol Toxicol Methods* 58(1): 27-31.
- Kiecker, C. and A. Lumsden (2012). "The role of organizers in patterning the nervous system." *Annu Rev Neurosci* 35: 347-367.

- Kim, H., S. You, et al. (2001). "Alterations in p53 and E2F-1 function common to immortalized chicken embryo fibroblasts." *Oncogene* 20(21): 2671-2682.
- Kowalczyk, A., R. K. Filipkowski, et al. (2004). "The critical role of cyclin D2 in adult neurogenesis." *J Cell Biol* 167(2): 209-213.
- Kozmik, Z., T. Czerny, et al. (1997). "Alternatively spliced insertions in the paired domain restrict the DNA sequence specificity of Pax6 and Pax8." *EMBO J* 16(22): 6793-6803.
- Kozmik, Z., R. Kurzbauer, et al. (1993). "Alternative splicing of Pax-8 gene transcripts is developmentally regulated and generates isoforms with different transactivation properties." *Mol Cell Biol* 13(10): 6024-6035.
- Kulesa, P., D. L. Ellies, et al. (2004). "Comparative analysis of neural crest cell death, migration, and function during vertebrate embryogenesis." *Dev Dyn* 229(1): 14-29.
- Lacosta, A. M., P. Muniesa, et al. (2005). "Novel expression patterns of Pax3/Pax7 in early trunk neural crest and its melanocyte and non-melanocyte lineages in amniote embryos." *Pigment Cell Res* 18(4): 243-251.
- Lamey, T. M., A. Koenders, et al. (2004). "Pax genes in myogenesis: alternate transcripts add complexity." *Histol Histopathol* 19(4): 1289-1300.
- Lang, D., M. M. Lu, et al. (2005). "Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation." *Nature* 433(7028): 884-887.
- Lang, D., S. K. Powell, et al. (2007). "PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer." *Biochem Pharmacol* 73(1): 1-14.
- Lange, C. and F. Calegari (2010). "Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells." *Cell Cycle* 9(10): 1893-1900.
- Lange, C., W. B. Huttner, et al. (2009). "Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors." *Cell Stem Cell* 5(3): 320-331.
- Lee, K. J. and T. M. Jessell (1999). "The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system." *Annu Rev Neurosci* 22: 261-294.
- Lepper, C., T. A. Partridge, et al. (2011). "An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration." *Development* 138(17): 3639-3646.
- Li, N., A. Hornbruch, et al. (2005). "Specification of dorsoventral polarity in the embryonic chick mesencephalon and its presumptive role in midbrain morphogenesis." *Dev Dyn* 233(3): 907-920.
- Li, N., Schulte, D., Wizenmann, A. "Pax3/7 Function on the Expansion of Chick Dorsal Midbrain. [in preparation]."
- Li, N., J. N. Volff, et al. (2007). "Rab23 GTPase is expressed asymmetrically in Hensen's node and plays a role in the dorsoventral patterning of the chick neural tube." *Dev Dyn* 236(11): 2993-3006.
- Li, Y. P., D. D. Bang, et al. (2005). "Evaluation of the suitability of six host genes as internal control in real-time RT-PCR assays in chicken embryo cell cultures infected with infectious bursal disease virus." *Vet Microbiol* 110(3-4): 155-165.
- Liem, K. F., Jr., G. Tremml, et al. (1997). "A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord." *Cell* 91(1): 127-138.

- Liem, K. F., Jr., G. Tremml, et al. (1995). "Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm." *Cell* 82(6): 969-979.
- Lim, S. and P. Kaldis (2012). "Loss of Cdk2 and Cdk4 induces a switch from proliferation to differentiation in neural stem cells." *Stem Cells* 30(7): 1509-1520.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Lobjois, V., B. Benazeraf, et al. (2004). "Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and Shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development." *Dev Biol* 273(2): 195-209.
- Lorenz, T. C. (2012). "Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies." *J Vis Exp*(63): e3998.
- Lukaszewicz, A. I. and D. J. Anderson (2011). "Cyclin D1 promotes neurogenesis in the developing spinal cord in a cell cycle-independent manner." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(28): 11632-11637.
- Lumsden, A. and R. Krumlauf (1996). "Patterning the vertebrate neuraxis." *Science* 274(5290): 1109-1115.
- Lundberg, A. S. and R. A. Weinberg (1998). "Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes." *Mol Cell Biol* 18(2): 753-761.
- Mackay, I. M., K. E. Arden, et al. (2002). "Real-time PCR in virology." *Nucleic Acids Res* 30(6): 1292-1305.
- Maczkowiak, F., S. Mateos, et al. (2010). "The Pax3 and Pax7 paralogs cooperate in neural and neural crest patterning using distinct molecular mechanisms, in *Xenopus laevis* embryos." *Dev Biol* 340(2): 381-396.
- Mansouri, A. (1998). "The role of Pax3 and Pax7 in development and cancer." *Crit Rev Oncog* 9(2): 141-149.
- Mansouri, A. and P. Gruss (1998). "Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord." *Mech Dev* 78(1-2): 171-178.
- Mansouri, A., A. Stoykova, et al. (1996). "Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7^{-/-} mutant mice." *Development* 122(3): 831-838.
- Manuel, M., P. A. Georgala, et al. (2007). "Controlled overexpression of Pax6 in vivo negatively autoregulates the Pax6 locus, causing cell-autonomous defects of late cortical progenitor proliferation with little effect on cortical arealization." *Development* 134(3): 545-555.
- Mao, C., X. Hu, et al. (2008). "Identification and expression profile of a novel alternative splicing of Pax7 in chick skeletal muscle." *Poult Sci* 87(9): 1919-1925.
- Mark, M., F. M. Rijli, et al. (1997). "Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis." *Pediatr Res* 42(4): 421-429.
- Marti E, G.-C. L., Bovolenta P (2006). Dorso-Ventral Patterning of the Vertebrate Central Nervous System. In: Unsicker K, Kriegelstein K, Hrsg. Cell Signaling and Growth Factors in Development. Volume 2. Erste Aufl. Weinheim Wiley-Vch Verlag, 361-375

- Matsunaga, E., I. Araki, et al. (2001). "Role of Pax3/7 in the tectum regionalization." *Development* 128(20): 4069-4077.
- McClellan, K. A. and R. S. Slack (2006). "Novel functions for cell cycle genes in nervous system development." *Cell Cycle* 5(14): 1506-1513.
- McCulloch, R. S., M. S. Ashwell, et al. (2012). "Identification of stable normalization genes for quantitative real-time PCR in porcine articular cartilage." *J Anim Sci Biotechnol* 3(1): 36.
- Medic, S., H. Rizos, et al. (2011). "Differential PAX3 functions in normal skin melanocytes and melanoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* 411(4): 832-837.
- Medrano, S., M. Burns-Cusato, et al. (2009). "Regenerative capacity of neural precursors in the adult mammalian brain is under the control of p53." *Neurobiol Aging* 30(3): 483-497.
- Meletis, K., V. Wirta, et al. (2006). "p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells." *Development* 133(2): 363-369.
- Mey, J. and S. Thanos (2000). "Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis." *Brain Res Brain Res Rev* 32(2-3): 343-379.
- Meyer, N. P. and H. Roelink (2003). "The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord." *Dev Biol* 257(2): 343-355.
- Mir, L. M. (2008). "Application of electroporation gene therapy: past, current, and future." *Methods Mol Biol* 423: 3-17.
- Miyazaki, J., S. Takaki, et al. (1989). "Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5." *Gene* 79(2): 269-277.
- Moreno-Bravo, J. A., J. E. Martinez-Lopez, et al. (2012). "Mesencephalic neuronal populations: new insights on the ventral differentiation programs." *Histol Histopathol* 27(12): 1529-1538.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Muramatsu, T., Y. Mizutani, et al. (1997). "Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo." *Biochem Biophys Res Commun* 230(2): 376-380.
- Muratovska, A., C. Zhou, et al. (2003). "Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival." *Oncogene* 22(39): 7989-7997.
- Murdoch, B., C. DelConte, et al. (2012). "Pax7 lineage contributions to the mammalian neural crest." *PLoS One* 7(7): e41089.
- Muroyama, Y., M. Fujihara, et al. (2002). "Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord." *Genes Dev* 16(5): 548-553.
- Nakamura, H. and Y. Watanabe (2005). "Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon." *Int J Dev Biol* 49(2-3): 231-235.
- Niederleitner, B. and H. Luksch (2012). "Neuronal morphology in subdivisions of the inferior colliculus of chicken (*Gallus gallus*)." *J Chem Neuroanat* 44(1): 24-33.
- Nomura, T., A. Kawakami, et al. (1998). "Correlation between tectum formation and expression of two PAX family genes, PAX7 and PAX6, in avian brains." *Dev Growth Differ* 40(5): 485-495.

- Nygaard, A. B., C. B. Jorgensen, et al. (2007). "Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR." *BMC Mol Biol* 8: 67.
- Ohtsubo, M., A. M. Theodoras, et al. (1995). "Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition." *Mol Cell Biol* 15(5): 2612-2624.
- Olguin, H. C. and B. B. Olwin (2004). "Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal." *Dev Biol* 275(2): 375-388.
- Olguin, H. C. and A. Pisconti (2012). "Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions." *J Cell Mol Med* 16(5): 1013-1025.
- Pani, L., M. Horal, et al. (2002). "Rescue of neural tube defects in Pax-3-deficient embryos by p53 loss of function: implications for Pax-3- dependent development and tumorigenesis." *Genes Dev* 16(6): 676-680.
- Peters, H., B. Wilm, et al. (1999). "Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development." *Development* 126(23): 5399-5408.
- Picker, A., S. Scholpp, et al. (2002). "A novel positive transcriptional feedback loop in midbrain-hindbrain boundary development is revealed through analysis of the zebrafish pax2.1 promoter in transgenic lines." *Development* 129(13): 3227-3239.
- Pinson, J., T. I. Simpson, et al. (2006). "Positive autoregulation of the transcription factor Pax6 in response to increased levels of either of its major isoforms, Pax6 or Pax6(5a), in cultured cells." *BMC Dev Biol* 6: 25.
- Poh, A., A. Karunaratne, et al. (2002). "Patterning of the vertebrate ventral spinal cord." *Int J Dev Biol* 46(4): 597-608.
- Prud'homme, G. J., Y. Glinka, et al. (2006). "Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases." *Curr Gene Ther* 6(2): 243-273.
- Racz, A., N. Brass, et al. (2000). "Gene amplification at chromosome 1pter-p33 including the genes PAX7 and ENO1 in squamous cell lung carcinoma." *Int J Oncol* 17(1): 67-73.
- Ratineau, C., M. W. Petry, et al. (2002). "Cyclin D1 represses the basic helix-loop-helix transcription factor, BETA2/NeuroD." *J Biol Chem* 277(11): 8847-8853.
- Relaix, F., D. Montarras, et al. (2006). "Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells." *J Cell Biol* 172(1): 91-102.
- Relaix, F., D. Rocancourt, et al. (2004). "Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development." *Genes Dev* 18(9): 1088-1105.
- Relaix, F., D. Rocancourt, et al. (2005). "A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells." *Nature* 435(7044): 948-953.
- Resnitzky, D., M. Gossen, et al. (1994). "Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system." *Mol Cell Biol* 14(3): 1669-1679.
- Ridgeway, A. G. and I. S. Skerjanc (2001). "Pax3 is essential for skeletal myogenesis and the expression of Six1 and Eya2." *J Biol Chem* 276(22): 19033-19039.
- Robson, E. J., S. J. He, et al. (2006). "A PANorama of PAX genes in cancer and development." *Nat Rev Cancer* 6(1): 52-62.
- Roux, K. H. (2009). "Optimization and troubleshooting in PCR." *Cold Spring Harb Protoc* 2009(4): pdb ip66.

- Rutledge, R. G. and C. Cote (2003). "Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves." *Nucleic Acids Res* 31(16): e93.
- Salomoni, P. and F. Calegari (2010). "Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1." *Trends Cell Biol* 20(5): 233-243.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." *Nat Protoc* 3(6): 1101-1108.
- Schoenwolf, G. C. (1991). "Cell movements driving neurulation in avian embryos." *Development Suppl* 2: 157-168.
- Schulte, T. W., J. A. Toretsky, et al. (1997). "Expression of PAX3 in Ewing's sarcoma family of tumors." *Biochem Mol Med* 60(2): 121-126.
- Schwarz, M., F. Cecconi, et al. (2000). "Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6." *Development* 127(20): 4325-4334.
- Seale, P., L. A. Sabourin, et al. (2000). "Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells." *Cell* 102(6): 777-786.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* 13(12): 1501-1512.
- Shin, D. H., K. S. Lee, et al. (2003). "Pax-7 immunoreactivity in the post-natal chicken central nervous system." *Anat Histol Embryol* 32(6): 378-383.
- Sicinski, P., J. L. Donaher, et al. (1995). "Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast." *Cell* 82(4): 621-630.
- Smith, S. B., H. Watada, et al. (2000). "Autoregulation and maturity onset diabetes of the young transcription factors control the human PAX4 promoter." *J Biol Chem* 275(47): 36910-36919.
- Sorensen, P. H., J. C. Lynch, et al. (2002). "PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group." *J Clin Oncol* 20(11): 2672-2679.
- Stuart, E. T., R. Haffner, et al. (1995). "Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression." *EMBO J* 14(22): 5638-5645.
- Swartz, M. E., J. Eberhart, et al. (2001). "EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb." *Development* 128(23): 4669-4680.
- Tassabehji, M., V. E. Newton, et al. (1994). "PAX3 gene structure and mutations: close analogies between Waardenburg syndrome and the Splotch mouse." *Hum Mol Genet* 3(7): 1069-1074.
- Thomas, M., S. Lazic, et al. (2004). "Expression profiles suggest a role for Pax7 in the establishment of tectal polarity and map refinement." *Exp Brain Res* 156(3): 263-273.
- Thomas, M. G., R. A. Barker, et al. (2007). "Pax7 expression in the adult rat superior colliculus following optic nerve injury." *Neuroreport* 18(2): 105-109.
- Thompson, J. A., A. Zembrzycki, et al. (2008). "Pax7 is requisite for maintenance of a subpopulation of superior collicular neurons and shows a diverging expression pattern to Pax3 during superior collicular development." *BMC Dev Biol* 8: 62.
- Thompson, J. A. and M. Ziman (2011). "Pax genes during neural development and their potential role in neuroregeneration." *Prog Neurobiol* 95(3): 334-351.
- Tiffin, N., R. D. Williams, et al. (2003). "PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells." *Br J Cancer* 89(2): 327-332.

- Timmer, J. R., C. Wang, et al. (2002). "BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors." *Development* 129(10): 2459-2472.
- Titomirov, A. V., S. Sukharev, et al. (1991). "In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA." *Biochim Biophys Acta* 1088(1): 131-134.
- Ulloa, F. and J. Briscoe (2007). "Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord." *Cell Cycle* 6(21): 2640-2649.
- Underhill, D. A. (2012). "PAX proteins and fables of their reconstruction." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 22(2): 161-177.
- Underhill, D. A. and P. Gros (1997). "The paired-domain regulates DNA binding by the homeodomain within the intact Pax-3 protein." *J Biol Chem* 272(22): 14175-14182.
- Vasiev, B., A. Balter, et al. (2010). "Modeling gastrulation in the chick embryo: formation of the primitive streak." *PLoS One* 5(5): e10571.
- Vogan, K. J., D. A. Underhill, et al. (1996). "An alternative splicing event in the Pax-3 paired domain identifies the linker region as a key determinant of paired domain DNA-binding activity." *Mol Cell Biol* 16(12): 6677-6686.
- Vousden, K. H. and C. Prives (2009). "Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53." *Cell* 137(3): 413-431.
- Wang, Q., S. Kumar, et al. (2006). "Functional analysis of alternative isoforms of the transcription factor PAX3 in melanocytes in vitro." *Cancer Res* 66(17): 8574-8580.
- Wang, X. D., S. C. Morgan, et al. (2011). "Pax3 stimulates p53 ubiquitination and degradation independent of transcription." *PLoS One* 6(12): e29379.
- Wang, Z., Y. Xie, et al. (2008). "Migratory localization of cyclin D2-Cdk4 complex suggests a spatial regulation of the G1-S transition." *Cell Struct Funct* 33(2): 171-183.
- Watanabe, Y. and H. Nakamura (2000). "Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by Sonic hedgehog." *Development* 127(5): 1131-1140.
- Wilson, D., G. Sheng, et al. (1993). "Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA." *Genes Dev* 7(11): 2120-2134.
- Wilson, L., E. Gale, et al. (2004). "Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord." *Dev Biol* 269(2): 433-446.
- Wilson, L. and M. Maden (2005). "The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube." *Dev Biol* 282(1): 1-13.
- Wurst, W. and L. Bally-Cuif (2001). "Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer." *Nat Rev Neurosci* 2(2): 99-108.
- Yamada, T., S. L. Pfaff, et al. (1993). "Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate." *Cell* 73(4): 673-686.
- Yuan, J. S., A. Reed, et al. (2006). "Statistical analysis of real-time PCR data." *BMC Bioinformatics* 7: 85.
- Zeeb, M. (2008). Einfluss des Transkriptionsfaktors Pax7 auf die Entwicklung des Mesencephalons im Hühnerembryo [Diplomarbeit]. Eberhardt-Karls-Universität Tübingen: Fachbereich Biochemie
- Zetterberg, A., O. Larsson, et al. (1995). "What is the restriction point?" *Curr Opin Cell Biol* 7(6): 835-842.

- Zhou, H. M., J. Wang, et al. (2008). "Lineage-specific responses to reduced embryonic Pax3 expression levels." *Dev Biol* 315(2): 369-382.
- Ziman, M. R., S. Fletcher, et al. (1997). "Alternate Pax7 transcripts are expressed specifically in skeletal muscle, brain and other organs of adult mice." *Int J Biochem Cell Biol* 29(7): 1029-1036.
- Ziman, M. R., M. Thomas, et al. (2001). "A key role for Pax7 transcripts in determination of muscle and nerve cells." *Exp Cell Res* 268(2): 220-229.
- Zipper H Fau - Brunner, H., J. Brunner H Fau - Bernhagen, et al. "Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications." (0305-1048 (Print)).
- Zupanic, A., B. Kos, et al. (2012). "Treatment planning of electroporation-based medical interventions: electrochemotherapy, gene electrotransfer and irreversible electroporation." *Phys Med Biol* 57(17): 5425-5440.

8. Anhang

Anhang A:

Übersichtstabelle: Proteinstruktur und Domänen der Pax- Genfamilie




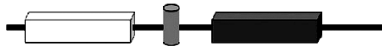

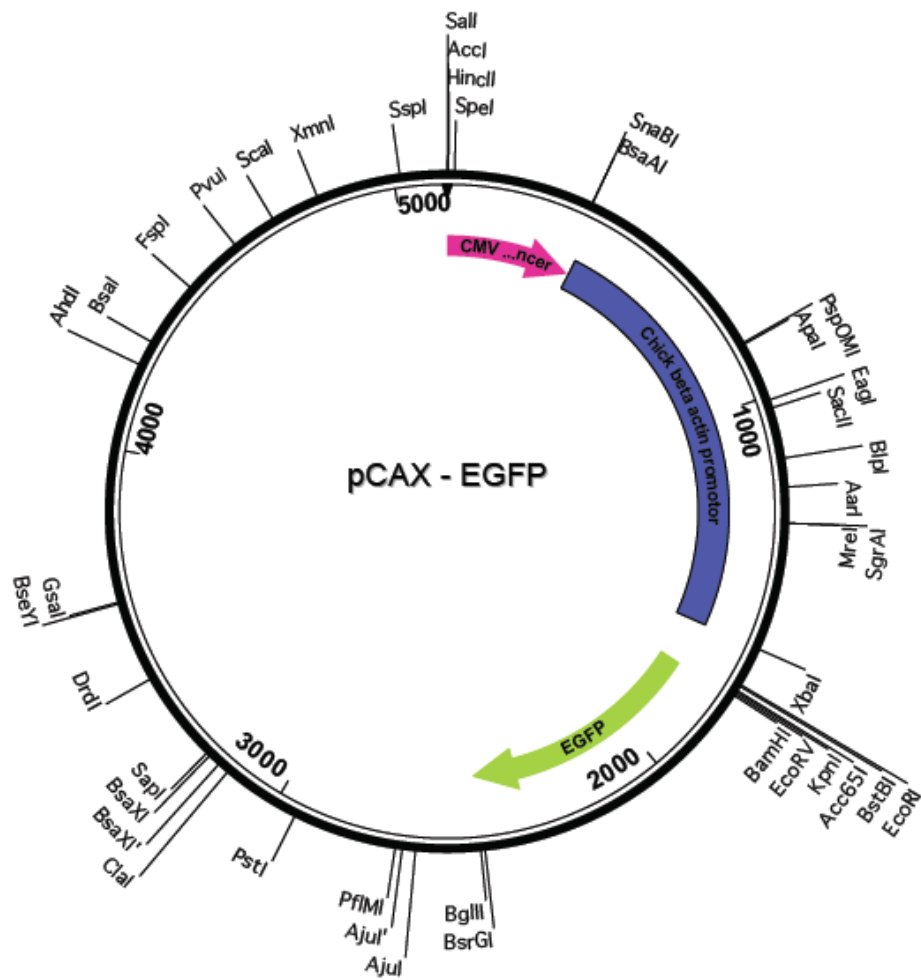
PAX family Group	Protein structure/domains	Protein family member	Embryonic Expression Domain	Expression/Mutation in human disease
	 Paired octapeptide homeodomain			
I		PAX1	Skeleton, thymus 3rd/4th pharyngeal pouch	Klippel-Feil Syndrome, Jarcho-Levin Syndrome
		PAX9	Skeleton, Teeth, Thymus	Jarcho-Levin Syndrome, Oligodentia
II		PAX2	Kidney, CNS	Hyperproliferative dysplastic kidney, Renal hyperplasia, Bladder and renal cancer, Coloboma Syndrome
		PAX5	B-Cells, CNS	Lymphomas
		PAX8	Kidney, Thyroid, CNS	Congenital hypothyroidism, Thyroid carcinomas/adenomas
III		PAX3	Neural Crest, CNS somites/muscle	Waardenburg Syndrome Types I/III, Melanoma, Rhabdomyosarcoma
		PAX7	Neural Crest, CNS somites/muscle	Rhabdomyosarcoma
IV		PAX4	Pancreas, gut	Diabetes
		PAX6	Pancreas, gut, CNS and eye	Aniridia, GI tumors Cataracts/Peter's Anomaly

Abbildung 35: Proteinstruktur und Domänen der Pax- Genfamilie. Die Pax-Proteinfamilie wird je nach Vorhandensein einer Paired-Domäne (engl. Paired), eines Oktapeptides (engl. octapeptide) und einer Homöodomäne (engl. homeodomain) in vier Gruppen unterteilt. Pax1/9 sind für die Entwicklung des Skelettsystems, der Zähne und des Thymus von Bedeutung, Pax2 ist an der Entwicklung des Urogenitalsystems beteiligt und ist u.a. im Frühstadium des Nierenzellkarzinoms exprimiert. Pax5 ist bei physiologischen und pathologischen Prozessen der B-Lymphozyten exprimiert. Pax8 spielt eine Rolle bei der Thymusentwicklung, bei der Produktion der Schilddrüsenhormone und ist im follikulären Schilddrüsenkarzinom und im T-Zell-Lymphom exprimiert. Pax3/7 haben jeweils eine essentielle Rolle in der Entwicklung der Skelettmuskulatur, der Neuralleistenzellen und des Mittelhirns. Pax4/6 tragen zur Entwicklung des exokrinen Pankreas bei, Pax6 hat zusätzlich eine wichtige Rolle in der ZNS-Entwicklung des Vorderhirns und des Auges (aus: Lang, Powell et al. 2007).

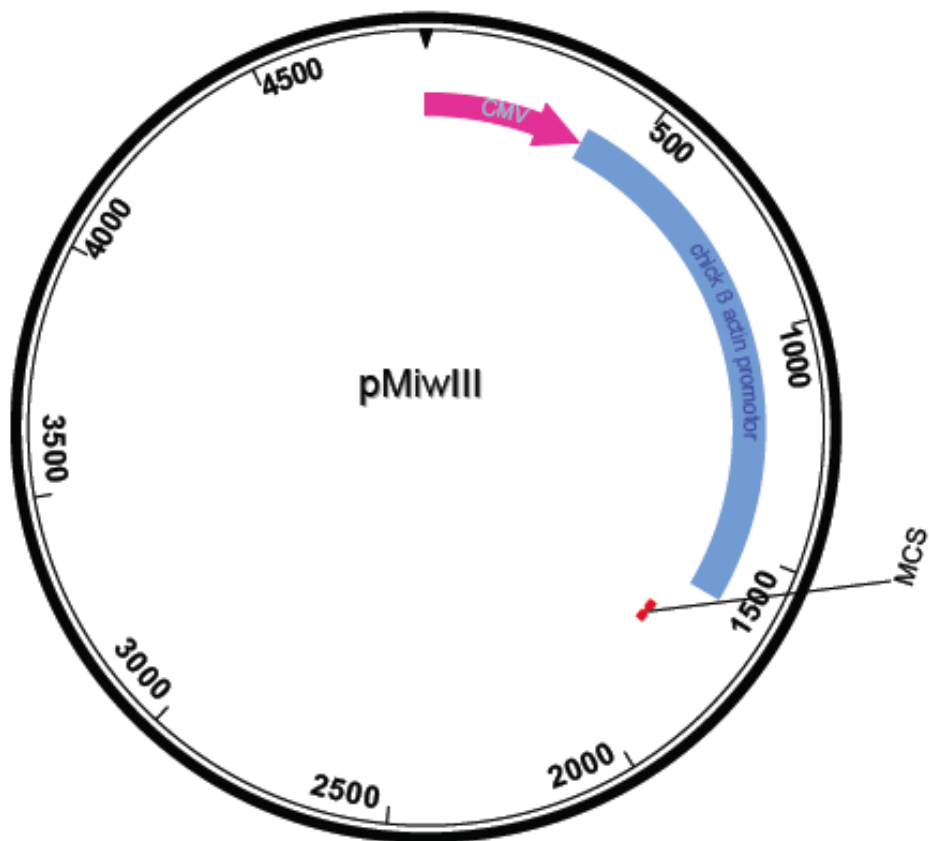
Anhang B:

Vektor pCAX- EGFP (Erläuterungen siehe Swartz, Eberhart et al. 2001)



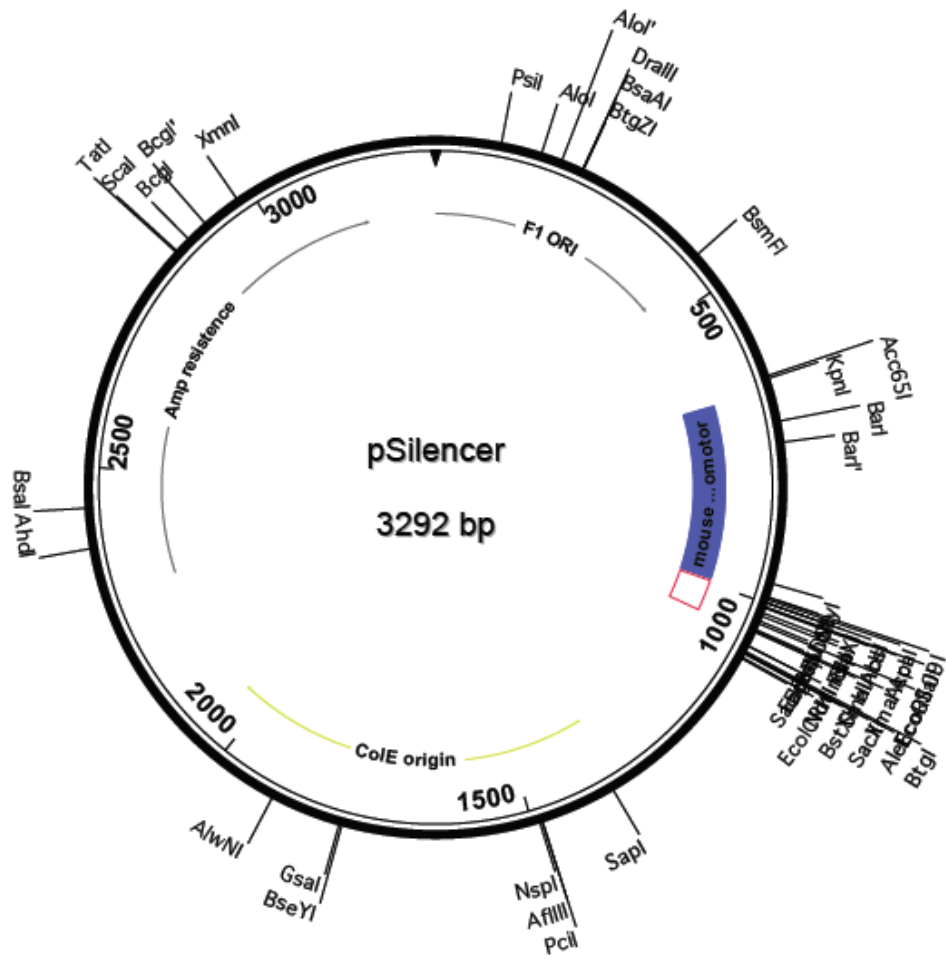
Anhang C:

Vektor pMIWIII für Pax3HA und Pax7EnR. (Erläuterungen siehe Agoston, Lit et al., 2012).



Anhang D

Vektor pSilencer für siPax7 (Ambion, Darmstadt).



Anhang E:

Primerliste

Primer Name	Primer Sequenz	Bindung in Gen	GC-Gehalt	Tm	Produktlänge	Annealing (PCR)	Zyklen	Zusätze
p53f-chick p53r-chick	cgttaccacgacgacgagaccacc a tgcagcgcctcattgatctcctt	NM_205264.1	60 52,2	67,9 62,4	498 498	55 55	25 25	MgCl ₂ MgCl ₂
E2F-1f-chick E2F-1r-chick	gtccaagaacaacatccagtggct g gtgacagtgcaatgaactcatccgc	NM_205219.1	52 52	64,6 64,6	632 632	53-55 53-55	28 28	MgCl ₂ MgCl ₂
CyclinEf-chick CyclinEr-chick	ggatctctgtgtgctggatattggc gagttagaaccagcagaacaggc ac	NM_00103135 8.1	52 52	64,6 64,6	445 445	60 60	25 25	DMSO DMSO
CyclinD1f-chick CyclinD1r-chick	tcaagtgcgtgcagaaggaatc gtagcgcacagagccacaaaagt	NM_205381.1	47,8 52,2	60,6 62,4	438 438	57 57	28 28	x x
CyclinD2f-chick CyclinD2r-chick	ggacccgaactgtctctacgac ccacttcaactccccaataccac	NM_204213.1	59,1 50	64 62,7	399 399	N/A N/A	N/A N/A	0,5 µM MgCl ₂ 0,5 µM MgCl ₂
p27f-chick p27r-chick	atggaggcgcggcagtcggagta aatcgtcggcggcgggtctttc	NM_204256.2	65,2 60,9	67,8 66	432 432	61 61	28 28	1 µM MgCl ₂ 1 µM MgCl ₂
c p53 f2 c p53 r2	gacttccgggtggggttcgtg tggggcggcgggtcatcc	NM_205264.1	66,7 72,2	65,7 62,8	432 432	N/A N/A	N/A N/A	N/A N/A
c CycD2 fo2 c CycD2 re2	acaattccatcaaacccaaga atctgtccccatcatcaagc	M_204213.1	40,9 50	56,5 57,9	281 281	59 59	30 30	x x
E2F1 fo2 E2F1 re2	gtctccgtgagaagcactc tcagaagtccaagtgcgtgaa	NM_205219.1	57,9 47,6	58,8 57,9	431 431	N/A N/A	N/A N/A	0,5 µM MgCl ₂ 0,5 µM MgCl ₂

Pax7 fwd Pax7 rev	atatcgggccgcatggcagcgctcc ttggcgcgcccgaagccttggcctgt	NM_205065.1	68 64	66 64	1500 1500	63 63	28 28	x x
β-Actin(chick) fwd β -Actin(chick) rev	gtgcgtgacatcaaggagaag ggacagggaggccaggataga	NM_205518.1	52,4 61,9	52,6 56,7	430 430	55-65 55-65	22-25 22-25	1,5 μM MgCl ₂ 1,5 μM MgCl ₂
GAPDH fwd GAPDH rev	ACCAGGTTGTCTCCTGT GACTT ACACGGTTGCTGTATCC AAACT	NM_204305.1		55,2 54,58	136 136	60,3 58,4	25 25	x x
cpax3 fo2 cpax3 rev2	TGCCGACTCTGCCGACA TACC AGGGGACAGGGCATAAT CAGTTTG	NM_204269.1		58,66 56,64	347 347	60 60	25 25	1 μM MgCl ₂ 1 μM MgCl ₂
cpax7 fo2 cpax7 rev2	CTGCAGCCAGCGGAGTG A CCCAGAACGGCCGAATG TT	NM_205065.1		60,5 58,8	331 331	65 65	28 28	1 μM MgCl ₂ , 0,5 μl DMSO 1 μM MgCl ₂ , 0,5 μl DMSO
EGFP fo1 EGFP rev1	CGTCCAGGAGCGCACCA TCTTCTT ATCGCGCTTCTCGTTGG GGTCTTT			61,05 60,99	373 373	61 61	25 25	0,5 μM MgCl ₂ , 0,5 μl DMSO 0,5 μM MgCl ₂ , 0,5 μl DMSO

Anhang F:

RNA Isolierung mit PeqGold RNA Pure Kit:

Sauber Arbeiten!

Handschuhe wechseln, wenn notwendig!

Unter dem Abzug arbeiten: Phenol!

- Gewebe mit 1ml PeqGold RNA Pure mit Potter Homogenisieren. Potter spülen.
- 5 min @ RT
- 200 µl Chloroform zugeben und die Probe für 15 s kräftig schütteln.
- 10 min @ RT
- 10-20 min bei 12.000x g und -20°C (wenn möglich, sonst 4°C) zentrifugieren: 3Phasen. RNA in der oberen, wässrigen.
- Wässrige Phase in neues Eppi überführen
- 500 µl Isopropanol zugeben
- 20 min @ RT
- 10 min bei 12.000x g und -20°C (wenn möglich, sonst 30 – 60 min bei 4°C) zentrifugieren.
- Überstand vorsichtig abgießen
- Pellet 2x mit 1 ml 75% Ethanol (-20°C) waschen: vortexen und anschließendes Zentrifugieren für 10 min bei 12.000 x g bei -20°C.
- Pellet 30 min @ RT trocknen
- Pellet in 50 µl RNase freiem Wasser aufnehmen und 10 min bei 60°C im Thermomixer schütteln.
- Bei -20°C aufbewahren

Anhang G:

DNA Alignment nach Martinez/Needleman-Wunsch zweier Pax7 (DQ471304 und NM_205065) Sequenzen des Huhnes.

Martinez/Needleman-Wunsch DNA Alignment Seq1(1>1509) Seq2(1>2132)
 Consensus DQ471304.seq (1>1509) & NM_205065.seq (186>1760)

```

v10      v20      v30      v40      v50      v60
ATGGCAGCGCTCCCCGGGACGGTACCGCGGATGATGCGCCCGGGCCGGGGCAGAACTAC
ATGGCAGCGCTCCCCGGGACGGTACCGCGGATGATGCGCCCGGGCCGGGGCAGAACTAC
ATGGCAGCGCTCCCCGGGACGGTACCGCGGATGATGCGCCCGGGCCGGGGCAGAACTAC
      ^190      ^200      ^210      ^220      ^230      ^240
v70      v80      v90      v100     v110     v120
CCGCGCACCGGCTTCCCTTTGGAAGTGTCCACCCCGCTGGGCCAGGGCCGGGTGAACCAA
CCGCGCACCGGCTTCCCTTTGGAAGTGTCCACCCCGCTGGGCCAGGGCCGGGTGAACCAA
CCGCGCACCGGCTTCCCTTTGGAAGTGTCCACCCCGCTGGGCCAGGGCCGGGTGAACCAA
      ^250      ^260      ^270      ^280      ^290      ^300
v130     v140     v150     v160     v170     v180
CTCGGAGGGGTTTTTCATCAACGGGGCGCCCACTGCCCAACCACATCCGCCATAAGATCGTG
CTCGGAGGGGTTTTTCATCAACGGGGCGCCCACTGCCCAACCACATCCGCCATAAGATCGTG
      ^310     ^320     ^330     ^340     ^350     ^360
v190     v200     v210     v220     v230     v240
GAGATGGCTCACCACGGCATCCGGCCCTGCGTGATCTCCAGGCAGCTGAGGGTCTCCAC
GAGATGGCTCACCACGGCATCCGGCCCTGCGTGATCTCCAGGCAGCTGAGGGTCTCCAC
GAGATGGCTCACCACGGCATCCGGCCCTGCGTGATCTCCAGGCAGCTGAGGGTCTCCAC
      ^370     ^380     ^390     ^400     ^410     ^420
v250     v260     v270     v280     v290     v300
GGCTGCGTTTCCAAAATCCTCTGCAGGTACCAAGAGACGGGCTCCATCCGGCCCGGGGCC
GGCTGCGTTTCCAAAATCCTCTGCAGGTACCAAGAGACGGGCTCCATCCGGCCCGGGGCC
      ^430     ^440     ^450     ^460     ^470     ^480
v310     v320     v330     v340     v350     v360
ATCGGGGGCAGCAAGCCAGGCAGGTTGCGACTCCCGACGTGGAGAAGAAAATCGAGGAA
ATCGGGGGCAGCAAGCCAGGCAGGTTGCGACTCCCGACGTGGAGAAGAAAATCGAGGAA
ATCGGGGGCAGCAAGCCAGGCAGGTTGCGACTCCCGACGTGGAGAAGAAAATCGAGGAA
      ^490     ^500     ^510     ^520     ^530     ^540
v370     v380     v390     v400     v410     v420
TACAAGAGGGAGAACCCCTGGGATGTTTCAGCTGGGAGATCCGGGACAGGCTGCTGAAGGAC
TACAAGAGGGAGAACCCCTGGGATGTTTCAGCTGGGAGATCCGGGACAGGCTGCTGAAGGAC
TACAAGAGGGAGAACCCCTGGGATGTTTCAGCTGGGAGATCCGGGACAGGCTGCTGAAGGAC
      ^550     ^560     ^570     ^580     ^590     ^600
v430     v440     v450     v460     v470     v480
GGACTGCGACCGCAGCACTGTGCCCTCAGTGAGTTCGATTAGCCGTGTGCTACGCATC
GGACTGCGACCGCAGCACTGTGCCCTCAGTGAGTTCGATTAGCCGTGTGCTACGCATC
GGACTGCGACCGCAGCACTGTGCCCTCAGTGAGTTCGATTAGCCGTGTGCTACGCATC
      ^610     ^620     ^630     ^640     ^650     ^660
v490     v500     v510     v520     v530     v540
AAATTCGGGAAGAAAGAGGAAGAGGAGGACTGCGACAAGAAGGAGGAAGACGGGGAGAAG
AAATTCGGGAAGAAAGAGGAAGAGGAGGACTGCGACAAGAAGGAGGAAGACGGGGAGAAG
AAATTCGGGAAGAAAGAGGAAGAGGAGGACTGCGACAAGAAGGAGGAAGACGGGGAGAAG
      ^670     ^680     ^690     ^700     ^710     ^720
v550     v560     v570     v580     v590     v600
AAGGCCAAGCACAGCATAGATGGCATCCTGGGCGACAAAGGGAACAGGCTGGATGAAGGC
AAGGCCAAGCACAGCATAGATGGCATCCTGGGCGACAAAGGGAACAGGCTGGATGAAGGC
AAGGCCAAGCACAGCATAGATGGCATCCTGGGCGACAAAGGGAACAGGCTGGATGAAGGC
      ^730     ^740     ^750     ^760     ^770     ^780
v610     v620     v630     v640     v650     v660
TCCGATGTCGAATCAGAACAGACCTGCCTTTGAAGAGGAAGCAGCGCCGACCCGGACC
TCCGATGTCGAATCAGAACAGACCTGCCTTTGAAGAGGAAGCAGCGCCGACCCGGACC
TCCGATGTCGAATCAGAACAGACCTGCCTTTGAAGAGGAAGCAGCGCCGACCCGGACC
      ^790     ^800     ^810     ^820     ^830     ^840

```

```

v670 v680 v690 v700 v710 v720
ACTTTCAGTCCGAGCAGCTGGAGGAGCTGGAGAAGGCCTTTGAGAGGACCCACTACCCG
ACTTTCAGTCCGAGCAGCTGGAGGAGCTGGAGAAGGCCTTTGAGAGGACCCACTACCCG
ACTTTCAGTCCGAGCAGCTGGAGGAGCTGGAGAAGGCCTTTGAGAGGACCCACTACCCG
^850 ^860 ^870 ^880 ^890 ^900
v730 v740 v750 v760 v770 v780
GACATCTACACCAGGGAGGAGCTGGCACAGAGAACCAAGCTCACCAGGCCCCTGTTTCAG
GACATCTACACCAGGGAGGAGCTGGCACAGAGAACCAAGCTCACCAGGCCCCTGTTTCAG
GACATCTACACCAGGGAGGAGCTGGCACAGAGAACCAAGCTCACCAGGCCCCTGTTTCAG
^910 ^920 ^930 ^940 ^950 ^960
v790 v800 v810 v820 v830 v840
GTGTGGTTTCAGCAACCCGACGAGCAAGATGGCGCAAGCAGGCGGGTGCAAACCAACTCGCA
GTGTGGTTTCAGCAACCCGACGAGCAAGATGGCGCAAGCAGGCGGGTGCAAACCAACTCGCA
GTGTGGTTTCAGCAACCCGACGAGCAAGATGGCGCAAGCAGGCGGGTGCAAACCAACTCGCA
^970 ^980 ^990 ^1000 ^1010 ^1020
v850 v860 v870 v880 v890 v900
GCATTCAACCATCTGCTGCCAGGGGATTTCCACCCACGGGAATGCCAACTCTGCCCCCG
GCATTCAACCATCTGCTGCCAGGGGATTTCCACCCACGGGAATGCCAACTCTGCCCCCG
GCATTCAACCATCTGCTGCCAGGGGATTTCCACCCACGGGAATGCCAACTCTGCCCCCG
^1030 ^1040 ^1050 ^1060 ^1070 ^1080
v910 v920 v930 v940 v950 v960
TACCAGCTGCCAGACTCCACCTACCCAACCACCACCATTTCCCAAGATGGAGGCAGCACC
TACCAGCTGCCAGACTCCACCTACCCAACCACCACCATTTCCCAAGATGGAGGCAGCACC
TACCAGCTGCCAGACTCCACCTACCCAACCACCACCATTTCCCAAGATGGAGGCAGCACC
^1090 ^1100 ^1110 ^1120 ^1130 ^1140
v970 v980 v990 v1000 v1010 v1020
GTGCACAGACCCAGCCCTTGCCACCATCCACCATGCACCAGGGAGGGCTCGCTGCCGCC
GTGCACAGACCCAGCCCTTGCCACCATCCACCATGCACCAGGGAGGGCTCGCTGCCGCC
GTGCACAGACCCAGCCCTTGCCACCATCCACCATGCACCAGGGAGGGCTCGCTGCCGCC
^1150 ^1160 ^1170 ^1180 ^1190 ^1200
v1030 v1040 v1050 v1060 v1070 v1080
GCTGCAGCCGACTCCAGCTCTGCCTATGGGGCCGACACAGCTTCTCCAGCTACTCAGAC
GCTGCAGCCGACTCCAGCTCTGCCTATGGGGCCGACACAGCTTCTCCAGCTACTCAGAC
GCTGCAGCCGACTCCAGCTCTGCCTATGGGGCCGACACAGCTTCTCCAGCTACTCAGAC
^1210 ^1220 ^1230 ^1240 ^1250 ^1260

v1090 v1100 v1110 v1120 v1130 v1140
AGCTTCATGAATGCTGCAGCTCCTGCCAACCACATGAATCCTGTTAGCAATGGCCTCTCT
AGCTTCATGAATGCTGCAGCTCCTGCCAACCACATGAATCCTGTTAGCAATGGCCTCTCT
AGCTTCATGAATGCTGCAGCTCCTGCCAACCACATGAATCCTGTTAGCAATGGCCTCTCT
^1270 ^1280 ^1290 ^1300 ^1310 ^1320

CCGCAG-----
CCGCAG
CCGCAGAGCAGGGTGCCCAAACAAGATGCAGTGCTCCAGGTGGAACTCACCATAGCC
^1330 ^1340 ^1350 ^1360 ^1370 ^1380
v1150 v1160 v1170 v1180 v1190
-----GTGATGAGCATCCTGAGCAACCCAGCGGGTTCTCCGAGCCCCAG
GTGATGAGCATCCTGAGCAACCCAGCGGGTTCTCCGAGCCCCAG
TTGAACAATCAGGTGATGAGCATCCTGAGCAACCCAGCGGGTTCTCCGAGCCCCAG
^1390 ^1400 ^1410 ^1420 ^1430 ^1440
v1200 v1210 v1220 v1230 v1240 v1250
GCTGACTTCTCCATCTCTCTCTTTCACGGTGGCCTGGACACCACCAACTCCATCTCTGCC
GCTGACTTCTCCATCTCTCTCTTTCACGGTGGCCTGGACACCACCAACTCCATCTCTGCC
GCTGACTTCTCCATCTCTCTCTTTCACGGTGGCCTGGACACCACCAACTCCATCTCTGCC
^1450 ^1460 ^1470 ^1480 ^1490 ^1500

```

```

          v1260      v1270      v1280      v1290      v1300      v1310
AGCTGCAGCCAGCGGAGTGACTCCATCAAGTCCGTGGACAGCCTCCCGACCTCGCAGTCC
AGCTGCAGCCAGCGGAGTGACTCCATCAAGTCCGTGGACAGCCTCCCGACCTCGCAGTCC
AGCTGCAGCCAGCGGAGTGACTCCATCAAGTCCGTGGACAGCCTCCCGACCTCGCAGTCC
          ^1510      ^1520      ^1530      ^1540      ^1550      ^1560
          v1320      v1330      v1340      v1350      v1360      v1370
TACTGTCTCTCCACCTACAGCACCACCAGTTACAGCGTGGACCCGGTGGCTGGCTACCAG
TACTGTCTCTCCACCTACAGCACCACCAGTTACAGCGTGGACCCGGTGGCTGGCTACCAG
TACTGTCTCTCCACCTACAGCACCACCAGTTACAGCGTGGACCCGGTGGCTGGCTACCAG
          ^1570      ^1580      ^1590      ^1600      ^1610      ^1620
          v1380      v1390      v1400      v1410      v1420      v1430
TATGGGCAGTATGGACAAACTGCTGTTGATTATTTGACCAAGAACGTGAGCCTGTCCACG
TATGGGCAGTATGGACAAACTGCTGTTGATTATTTGACCAAGAACGTGAGCCTGTCCACG
TATGGGCAGTATGGACAAACTGCTGTTGATTATTTGACCAAGAACGTGAGCCTGTCCACG
          ^1630      ^1640      ^1650      ^1660      ^1670      ^1680
          v1440      v1450      v1460      v1470      v1480      v1490
CAGCGCAGGATGAAGCTGGGAGAACATTGGGCCGTTCTGGGGCTCCTACCAGTAGAGACA
CAGCGCAGGATGAAGCTGGGAGAACATTGGGCCGTTCTGGGGCTCCTACCAGTAGAGACA
CAGCGCAGGATGAAGCTGGGAGAACATTGGGCCGTTCTGGGGCTCCTACCAGTAGAGACA
          ^1690      ^1700      ^1710      ^1720      ^1730      ^1740
          v1500
GGCCAAGCTTACTGA
GGCCAAGCTTACTGA
GGCCAAGCTTACTGA
          ^1750 ^1760

```

Erläuterungen: DNA Alignment nach Martinez/Needleman-Wunsch zweier Pax7 (DQ471304 und NM_205065) Sequenzen des Huhnes. Die DQ471304 Sequenz besteht nur aus cDNA von Pax7 (1509bp), wohingegen die NM_205065 Sequenz auch noch 5' und 3' untranslatierte Sequenzen umfasst (2132bp).

Die Consensus Sequenz umfasst bei DQ471304 die gesamte Sequenz (1>1509), bei NM_205065 nur den cDNA Anteil (186>1760). Der Consensus der beiden Sequenzen ist in der mittleren Reihe zu finden. DQ471304 ist in der oberen Reihe dargestellt, NM_205065 in der unteren.

Die beiden am 3' Ende lokalisierten Primerpaare sind farbig markiert (Primerpaare: cPax7 fo2, cPax7 rev2 und cPax7 fwd, cPax7 rev). Die einzelnen Domänen sind ebenfalls farblich angedeutet: die pairedbox domain in rot, die homeodomain in pink und die transactivation domain in blau. Deutlich zu erkennen sind die in DQ471304 fehlenden 65 Basenpaare in der transactivation domain.

Danksagung

Zuerst möchte ich meiner Betreuerin Frau PD Dr. Andrea Wizenmann für die intensive Betreuung bedanken- sie hat mich durch alle Motivationshöhen und -tiefen gebracht, mir immer mit vielfältigen und kreativen Denkansätzen zur Seite gestanden und mit mir viele gute Gespräche geführt, von denen ich noch lange profitieren werde.

Zusätzlich danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Wagner für die Übernahme der Betreuung der Doktorarbeit und für die Möglichkeit diese am Anatomischen Institut absolvieren zu dürfen als auch allen Kolleginnen und Kollegen für die gute Stimmung im Labor. Desweiteren bedanke ich mich bei Uli Kohler für die Einarbeitung in die diversen Labortechniken als auch für ihre große Hilfe und Unterstützung.

Bei meinen Kollaborationspartner Ricco Lindner, vom Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen möchte ich mich sehr herzlich für die Nutzung der qRT-PCR-Maschinen und für die zahlreichen Tipps zur Datenauswertung bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Vorgängern- Dr. Naixin Li und Martin Zeeb- für die gute Inspiration und die Fußstapfen, in die ich treten durfte, bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihre grenzenlose Unterstützung während meines Studiums und zu Beginn meines Berufslebens. Nur durch ihre liebevolle Erziehung und durch ihren allgegenwärtigen Glauben an meine Fähigkeiten konnte ich meine bisherigen Ziele erreichen. Vielen lieben Dank an meine große Schwester Karen für ihre Motivation, für gute Gespräche und für ihre Unterstützung bei der Formatierung.

Thomas Rinecker danke ich für die wundervolle gemeinsame Zeit, die wir bis jetzt verbracht haben und die wir hoffentlich in Zukunft noch verbringen werden, und für das Ertragen meiner Launen während der Examenszeit und während der Verfassung meiner Doktorarbeit.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Kollegin Marie- Hélène Rarra für die gemeinsame Zeit auf der Station als auch für ihre Motivation und die große Unterstützung am Ende der Doktorarbeit bedanken.