

Silke Stoll

Suche nach differentiell exprimierten Genen in der
frühen Augenanlage des Hühnchenembryos

2003

Zoologie

Suche nach differentiell exprimierten Genen in der frühen Augenanlage des Hühnchenembryos

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Silke Stoll
aus Löbau

2003

Dekan:	Prof. Dr. A. Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Klämbt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Dr. S. Thanos
Tag der mündlichen Prüfung(en):	08., 09. u. 24.04.2003
Tag der Promotion:	24.04.2003

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Positionspezifizierung und retinotectale Projektion	1
1.2	Der Hühnchenembryo als Untersuchungsmodell	2
1.3	Ziel der Arbeit	4
2	Material, Methoden, Techniken	6
2.1	Präparation von Embryonen und Augenanlagen	6
2.1.1	Allgemeines	6
2.1.2	Präparation von Embryonen	7
2.1.2.1	Präparation von Embryonen zur DNA-Isolierung	7
2.1.2.2	Präparation von Embryonen zur in situ Hybridisierung	7
2.1.3	Präparation von Augenanlagen zur RNA-Isolierung	8
2.2	Isolierung von Nukleinsäuren	9
2.2.1	RNA	9
2.2.2	DNA	9
2.2.3	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	10
2.2.4	Elution von DNA aus Polyacrylamid-Gelen	10
2.2.5	DNA-Extraktion nach Restriktionsverdau	11
2.3	Gelelektrophorese	11
2.3.1	RNA-Agarose-Gele	11
2.3.2	DNA-Agarose-Gele	12
2.3.3	DNA-Polyacrylamid-Gele	14
2.3.4	Sequenzierungs-Gele	15
2.3.5	Ethidiumbromidfärbung	15
2.3.6	Silberfärbung	16
2.4	Amplifikation von Nukleinsäuren	16
2.4.1	Reverse Transkription	17
2.4.2	Differential Display Analyse	18
2.4.2.1	Prinzip der DD-Analyse	18
2.4.2.2	DD-Reaktionsansätze	19
2.4.3	Polymerase-Ketten-Reaktion	21

2.4.4	Primerdesign	23
2.5	Ligation, Klonierung und Transformation	23
2.5.1	Ligation und Klonierung	23
2.5.2	Transformation	24
2.5.3	Agarplatten- und Mediumherstellung	24
2.5.4	Platten- und Schüttelkulturen	25
2.5.5	Lagerung von Bakterien	25
2.6	Plasmidpräparation	25
2.6.1	Minipräparation	25
2.6.2	Maxipräparation	26
2.7	Restriktion der Plasmid-DNA	26
2.7.1	Restriktionsanalyse nach Minipräparation	26
2.7.2	Restriktionsanalyse nach Maxipräparation	26
2.8	Sequenzierung	27
2.8.1	LI-COR	27
2.8.2	Auswertung der Sequenzen	28
2.8.2.1	Auswertung der Sequenzen mit „BLAST“	29
2.8.2.2	Auswertung der Sequenzen mit „Align“	29
2.9	<i>In vitro</i> Transkription	29
2.10	Dot Blot	30
2.11	<i>In situ</i> Hybridisierung	30
2.12	Materialien und Geräte	32
2.12.1	Allgemeine Lösungen und Puffer	32
2.12.2	Kits	35
2.12.3	Verbrauchsmaterialien	36
2.12.4	Instrumente	37
2.12.5	Geräte	37
2.12.6	Verzeichnis der Lieferbetriebe	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Präparation	41
3.2	Probendefinition und –charakterisierung	41
3.2.1	RNA-Gele	43

3.3	Reverse Transkription	44
3.4	Differential Display	45
3.4.1	Negativkontrollen und Optimierung	45
3.4.2	Vergleich der Bandenmuster	48
3.5	Polymerase-Ketten-Reaktion	50
3.5.1	Positivkontrollen	50
3.5.2	Reamplifikationen	52
3.6	DNA-Extraktionen	53
3.6.1	DNA-Isolierungen	53
3.6.2	DNA-Extraktion aus PAA-Gelen	53
3.7	Sequenzierungen	54
3.8.	<i>In situ</i> Hybridisierung	59
3.8.1	PCR für <i>in situ</i> Hybridisierung	60
3.8.2	<i>In situ</i> Hybridisierung der Positivkontrollen	63
3.8.3	<i>In situ</i> Hybridisierung potentiell differenzierter Gene	65
3.9	Zusammenfassung	66
4	Diskussion	67
4.1	Charakterisierung der Proben	67
4.2	Etablierung und Optimierung von Techniken	69
4.2.1	Differential Display-Analyse	69
4.2.1.1	RNA-Isolierung	69
4.2.1.2	Reverse Transkription	70
4.2.1.3	Polymerase-Ketten-Reaktion	71
4.2.1.4	Silberfärbung, Extraktion und Reamplifikation	73
4.2.2	<i>In situ</i> Hybridisierung	74
4.2.2.1	Fixierung	75
4.2.2.2	Sonden: Markierung, Nachweis und Qualität	76
4.2.2.3	Kontrollen	77
4.3	Sequenzanalyse	78
4.3.1	Erläuterungen zu den Genen	80
4.3.1.1	Positivkontrollen	80
4.3.1.2	Sequenzierung und „BLAST ^{cc} “-Analysen	81

5	Ausblick	87
6	Zusammenfassung	88
7	Literaturverzeichnis	89
8	Anhang	i
8.1	Abbildungen zur Präparation: HH10	i
8.2	Abbildungen zur Präparation: HH19	ii
8.3	Prinzip der DD-Analyse	iii
8.4	Genotyp des TOP10F ^c <i>E. coli</i> Stammes	iv
8.5	Plasmidkarte des pCR [®] II-TOPO [®] Vektors	iv
8.6	Die „Blau-Weiß-Selektion“	v
8.7	Das Prinzip der <i>in vitro</i> Transkription	vi
8.8	Sequenzinformationen zu den „BLAST“-Analysen	vii
8.8.1	β-Aktin	vii
8.8.2	Probe 2	viii
8.8.3	Probe 6	ix
8.8.4	Probe 8	x
8.8.5	Probe 13	xi
8.8.6	Probe 14	xii
8.8.7	Probe 19	xiv
8.8.8	Probe 20	xv
8.8.9	Probe 21	xvi
8.8.10	Probe 22	xvii
8.8.11	Probe 23.1	xviii
8.8.12	Probe 23.2	xix
8.8.13	Probe 23.3	xx
8.8.14	Probe 24	xx
8.9	Originalsequenzen der Gene für die PCR und ISH	xxii
8.9.1	β-Aktin	xxii
8.9.1.1	RNA-Template	xxii
8.9.1.2	DNA-Template	xxii

8.9.2	CBF-1	xxiii
8.9.3	CBF-2	xxiii
8.9.4	Pax6	xxiv
8.9.5	α B-Kristallin	xxiv
8.9.6	Notch-1	xxiv
8.9.7	Numb	xxv
8.9.8	DeltaEF-1	xxv
8.9.9	Ip3ka	xxvi

9 Danksagung

10 Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat 4-Toluidin-Salz
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	complementary DNA: komplementär zur mRNA
DD	Differential Display
DD-cDNA	cDNA des DD; diese cDNA wurde für alle DD-, PK-, und ISH-PCRs benutzt
DD-PCR	PCR des DD
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-H ₂ O	DEPC behandeltes Aqua bidest
DIG	Digoxigenin
DMF	N'-N' Dimethylformamid
dNTP	diNukleotidphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrietetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
EtOH	Ethanol
ETC	ETC Electrophorese-Technik
Fa.	Firma
HH	Hamburger-Hamilton bzw. Hamburger-Hamilton(-Stadium)
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galactosid
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung
ISH-PCR	PCR zur späteren Herstellung einer Sonde für die ISH
kb	Kilobase = 1000 Basenpaare
LB	Luria-Bertani
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA

NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK	Negativkontrolle
(NK _{/DD})	Negativkontrolle des DD
(NK _{/PCR})	Negativkontrolle der PCR
(NK _{/RT})	Negativkontrolle der RT
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PK	Positivkontrolle
PK-PCR	PCR einer PK
PrKo	Primerkombination
rRNA	Ribosomale RNA
RAP-PCR	RNA arbitrarily primed PCR
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Reverse Transkription (Enzym und Reaktion); Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TD-PCR	Touchdown-PCR
TE	Tris-EDTA-Puffer
UKM	Universitätsklinikum Münster
UV	Ultraviolett
ü. N.	Über-Nacht
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Weight/volume
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galactosid
 Sonderzeichen	
Σ	Summe (Zusammengefasste RNA-Proben; Kennzeichnung)

1 Einleitung

1.1 Positionsspezifizierung und retinotectale Projektion

Eine wichtige Frage in der neuro-retinalen Entwicklung ist die nach der Spezifizierung und Differenzierung von Zellen. Das visuelle System des Hühnchens besitzt topographisch geordnete Projektionseigenschaften, d. h. eine Punkt-zu-Punkt Spezifität, die sowohl im Ursprungs- als auch im Terminationsgebiet auf ursprünglichen Positionsmarkierungen von Zellen beruht. Das sich entwickelnde visuelle System gilt als ein typisches Beispiel einer positionsspezifischen Konnektivität, deren Präzision für die räumlich-zeitlichen Leistungen dieses Systems im Sinne der Repräsentation der Umgebung im Gehirn verantwortlich ist.

Vor einer Differenzierung retinaler Zellen liegt ihre Positionsspezifizierung. Sie basiert zunächst auf der antero-posterioren Markierung des Neuralrohres, dessen anteriorer Anteil beim Hühnchen in den Stadien HH8-9 (Hamburger-Hamilton, s. 1.2) das Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon bildet. Aus dem Diencephalon entwickeln sich die Augen, die Tecta aus dem dorsalen Anteil des Mesencephalon. Dieser neuromere Bauplan wird durch Homeobox-Gene reguliert, zu denen z. B. die *otx*-, *pax*- und *hox*-Gene zählen (Mey und Thanos, 2000, zur Übersicht). Die ursprüngliche antero-posteriore Achse des Neuralrohres wird in eine naso-temporale Achse der sich entwickelnden Retina übersetzt. Dabei wirken zwei Transkriptionsregulatoren („chicken brain factor“): CBF-1 und CBF-2 (Mey und Thanos, 2000, zur Übersicht). Die Expression von CBF-1 beschränkt sich in HH11 auf das anteriore Prosencephalon und den anterioren Teil der Augenanlagen, in HH19 auf die nasale Retina. CBF-2 wird dagegen im posterioren Bereich der Augenanlagen und in den Somiten bzw. in der temporalen Retina exprimiert (Yuasa et al., 1996). Es folgt die Differenzierung von retinalen Ganglienzellen aus Vorläuferzellen. Ganglienzellen sind die ersten retinalen Zellen, die sich aus den Neuroepithelzellen entwickeln (Kahn, 1974). Dieser Prozesses erfolgt unter dem Einfluss verschiedener Regulatoren, zu denen z. B. Numb, Numblike, Notch und Delta zählen (Bao und Cepko, 1997; Zhong et al., 1997; Wakamatsu et al., 1999) und verläuft beim Hühnchen etwa von Entwicklungstag (E) 2 bis E7 (Cepko et al., 1996).

Nach ihrer Differenzierung beginnen die Ganglienzellen Axone zu bilden, die in das kontralaterale Tectum ziehen. Der Aufbau dieser retinotectalen Verbindung beginnt etwa am

E3 und ist am E13 abgeschlossen (Rager, 1980). Dabei wird die zentral-periphere Entwicklung der Retina in der optischen Bahn fortgesetzt. Im Transplantationsmodell konnte gezeigt werden, dass sich nasale Fasern stärker als temporale Fasern nach posterior ausrichten (Thanos, 1983). Die Ursache hierfür kann eine Vorordnung der Fasern in der optischen Bahn, aber auch eine aktive Kommunikation mit den tectalen Projektionsgebieten sein. Dieses gerichtete Auswachsen der Fasern wird wahrscheinlich durch eine Kombination verschiedener Aspekte gewährleistet. Die ersten Überlegungen dazu wurden von Sperry (1963) in seiner Chemoaffinitätshypothese dargelegt. Diese beruht auf verschiedenen biochemischen Wechselwirkungen zwischen Axon und Zielzellen. Dazu werden potentielle Führungsmoleküle gradiert oder eingeschränkt innerhalb der Retina und des Tectum exprimiert (Stahl et al., 1990; Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995). Man nimmt an, dass sie komplementär im Ursprungs- und Zielgebiet verteilt sind und somit während der Etablierungsphase einer neuronalen Verbindung ihre Funktion ausüben. Wichtig ist dabei, dass die Axone in jedem Fall die positionsweisenden Informationen ihres intraretinalen Ursprunges (während der sehr frühen Embryonalentwicklung, bevor in den betreffenden Neuronen Differenzierungsvorgänge ablaufen) bewahren. Moleküle, die in ihrer Funktionalität diesen Anforderungen entsprechen, sind die Mitglieder der Ephrin-Familie. Dazu gehören die Eph Rezeptor Tyrosin Kinasen und ihre membrangebundenen Liganden. Der temporal-nasale Expressionsgradient von EphA3 in der embryonalen Retina setzt sich über die Axone bis in das Tectum fort (Cheng et al., 1995). Ähnliche gradierte Expressionsmuster entlang der dorso-ventral Achse der sich entwickelnden Retina sind für *EphB2*, *EphB3*, *ephrin B1* und *Ephrin B2* beschrieben (Connor et al., 1998). Untersuchungen an der Hühnchenretina ergaben, dass die Kontrolle der topographischen Spezifität entlang der retinalen naso-temporalen Achse wahrscheinlich auf verschiedene unabhängige Mechanismen in der sehr frühen Embryonalentwicklung aufgeteilt wird (Schulte und Cepko, 2000).

1.2 Der Hühnchenembryo als Untersuchungsmodell

Die bisher bekannten Gene, welche zu einer Positionsmarkierung der Retina führen, werden sehr früh exprimiert (HH9-11: Dütting und Thanos, 1995; Thanos et al., 1996; Thanos und Mey, 2001). Zu diesem Zeitpunkt besteht das gesamte Neuralrohr, also auch die prospektive Retina, aus einem einschichtigen, undifferenzierten Neuroepithel. Um Untersuchungen an Augenanlagen durchführen zu können, müssen diese bereits soweit evaginiert sein, dass sie

präparativ zugänglich und eindeutig zu identifizieren sind. Deshalb wurden für die vorliegende Arbeit die Stadien HH10 und HH19 gewählt (s. Abb. 1, 8.1).

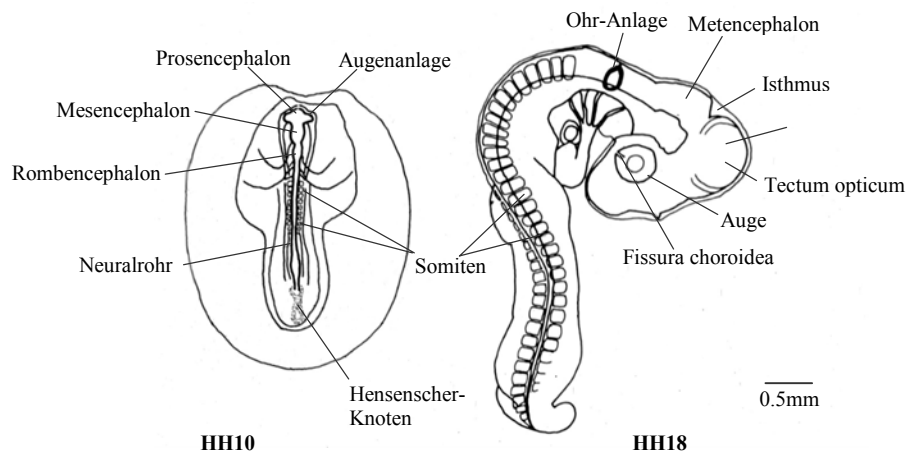


Abb. 1: Hühnchenembryonen der Stadien HH10 (links) und HH18 (rechts). In der vorliegenden Arbeit wurden die rechte und linke Augenanlage des jeweiligen Stadiums präpariert und außerdem noch in eine anteriore (prospektiv nasale) und posteriore (prospektiv temporale) Region unterteilt (s. 8.1). Diese Untergliederung sollte die Suche nach Genen, welche nur in einer der genannten Regionen aktiv sind, unterstützen. Das Stadium HH 19, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, unterscheidet sich nur in wenigen Merkmalen vom hier gezeigten Stadium HH18. Die Abb. wurde nach Mey und Thanos (2000) modifiziert. Abk.: HH. Hamburger-Hamilton.

Die Wahl dieses Modells erfolgte aus Gründen der experimentellen Zugänglichkeit und der technischen Vorteile, welche im Folgenden kurz erläutert werden sollen. Das visuelle System ist für embryologische Untersuchungen ausgezeichnet geeignet: es ist, im Gegensatz zu dem der Säugetiere, am Tag des Schlüpfens (Embryonalphase dauert 20-21 Tage) voll funktionsfähig (Hamburger und Hamilton, 1951; Patten, 1971). Der Embryo selbst ist präparativ zu allen Stadien leicht zugänglich und kann z. T. direkt im Ei untersucht werden. Die Organisation des visuellen Systems des Hühnchens ist übersichtlich. Die Augen und das Mittelhirn bilden sichtbar dominante Strukturen während der Ontogenese, was einerseits die Bedeutung des visuellen Systems dieser Tiere unterstreicht und andererseits die Zugänglichkeit für experimentelle und präparative Zugriffe erleichtert.

Für den gewählten experimentellen Ansatz war es wichtig, ein solch übersichtlich organisiertes neuronales System zu bearbeiten, um unerwünschte oder vielleicht auch unbekannte Nebeneffekte zu minimieren. Die relative Einfachheit des visuellen Systems des Hühnchens basiert vor allem auf den wenigen beteiligten Komponenten und auf der vollständigen Kreuzung der beiden *Nervi optici* am *Chiasma opticum*, welche dann als *Tracti*

optici das jeweilige kontralaterale *Tectum opticum* erreichen. Alle anderen etablierten Tiermodelle (Maus, Ratte, Affe) bilden zusätzlich ipsilaterale Fasern aus, die eine Interpretation der Ergebnisse möglicherweise verkomplizieren würden. Diese „Einfachheit“ wird allerdings durch die hohe Zahl an beteiligten Neurone kompromittiert, wenn man zugrunde legt, dass in der Hühnchenretina mit ca. 2.4 Millionen Ganglienzellen doppelt so viele wie in der menschlichen Retina (≈ 1.5 Millionen) und dreißig mal so viele wie in der Ratten- (≈ 100.000) oder Mausretina (≈ 40.000 - 80.000) angelegt werden (Thanos und Mey, 2001, zur Übersicht). Weiterhin sind in der Vogelretina acht morphologisch verschiedene Ganglienzelltypen nachweisbar, in der Ratte lediglich drei. Die Verwendung des Hühnchen-Modells kann deshalb mit zwei wichtigen Argumenten gerechtfertigt werden: (1) die Ergebnisse sollten aufgrund der Organisation des visuellen Systems eindeutig zuzuordnen sein und (2) eine mögliche, zumindest orientierende, Übertragung von Ergebnissen sollte aufgrund des verwandtschaftlichen Bezuges zu den „höher“ organisierten Vertebraten (s. o.) gegeben sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stadieneinteilung der Ontogenese anhand morphologischer Merkmale für Hühnchenembryonen von Hamburger und Hamilton (1951) benutzt. Sie definieren von der Befruchtung bis zum Schlupf 46 Stadien (Hamburger-Hamilton: HH), welche vereinfachend in „Entwicklungstagen“ (E) zusammengefasst werden können.

1.3 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten weitere molekulare Positionsmarker der Hühnchenretina identifiziert werden. Die Idee war, dass es während der Entwicklung der topografischen Verbindung zwischen Retina und Tectum zu einer asymmetrischen Expression von Genen kommen könnte, wie dies z. B. bei *SOHo* (Deitcher et al., 1994) und den *CBF*-Genen (Yuasa et al., 1996) der Fall ist. Aufgrund der Aktivierung verschiedener Gene entlang der topologischen Achse, könnte ebenfalls eine Determination retinaler Ganglienzellen stattfinden. Die Genprodukte solcher differentiell exprimierten Gene könnten z. B. als Transkriptionsfaktoren oder Rezeptoren eine große Rolle bei der Festlegung der räumlichen Identität von Neuronen in Retina und Tectum spielen und damit ganz entscheidend an der axonalen Wegfindung beteiligt sein. Aufgrund des frühen Abschlusses einer

Positionsspezifisierung der Ganglienzellen (Dütting und Thanos, 1995; Thanos und Mey, 2001; s. 1.2) musste mit sehr jungen Hühnchenembryonen gearbeitet werden (HH10).

Differentiell exprimierte Gene können z. B. über eine subtraktive Hybridisierung oder eine „Gene-Chip“ Analyse detektiert werden. Beide Techniken sind jedoch sehr materialintensiv und müssen aufgrund der zu erwartenden geringen Mengen an verfügbarem Material (Augenanlagen von frühen Hühnchenembryonen) methodisch ersetzt werden. Hinzu kommen die hohen Kosten, die durch eine Chip-Analyse verursacht werden, zumal erst gegen Ende dieses Projektes ausreichend hühnchenspezifische cDNAs für eine entsprechende „Chip“-Bestückung verfügbar wurden (s. 2.8.3.1, 4.3, Boardmann et al., 2002). Deshalb sollte die Differential Display (DD) Analyse im Labor etabliert werden. Sie wird auch als Differential Display Reverse Transkription Polymerase Ketten Reaktion (DDRT-PCR) bezeichnet und wurde 1992 von Liang und Pardee beschrieben. Diese Methode basiert auf der Amplifikation von cDNA mit ankerspezifischen und zufälligen Primern unter niedriger Stringenz (s. 2.4.2). Aufgrund ihrer hohen Sensitivität kann mit sehr wenig Ausgangsmaterial ein systematischer Parallelvergleich verschiedener Proben durchgeführt werden. Die Ergebnisse sollten in jedem Fall durch eine zweite Methodik überprüft werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu die „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen gewählt.

2 Material, Methoden, Techniken

Alle Lösungen, soweit nicht anders angegeben, wurden im Reinheitsgrad p. a. bezogen. Die Endkonzentrationen wurden prinzipiell in eckigen Klammern aufgeführt. Die Zusammensetzung von Lösungen und Puffern, die verschiedenen Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lieferbetriebe wurden z. T. im Text erwähnt, ausführlich jedoch unter 2.12 beschrieben.

2.1 Präparation der Embryonen und Augenanlagen

2.1.1 Allgemeines

Die morphologische Zuordnung der Embryonen in ihre Entwicklungsstadien erfolgte nach Hamburger und Hamilton (1951). Die für die vorliegende Arbeit verwandten Embryonen befanden sich in den Hamburger-Hamilton-Stadien (HH) 10 und 19. Die nötigen Eier wurden einmal pro Woche von der Geflügelzucht Brinkschulte bezogen. Die Befruchtungsrate lag im Durchschnitt bei 95-98%, war jedoch abhängig vom Alter der Herde. Die Eier wurden entweder bei 10°C zwischengelagert, oder sofort auf horizontale Roste des BSS-Brutschrankes eingelegt, bei 38-39°C sowie 58-60% Luftfeuchte und automatischer Rotation bebrütet. Das Stadium HH10 wurde nach ca. 44h, HH19 nach ca. 72h Bebrütung erreicht. Die Bebrütungsdauer richtete sich dabei u. a. nach dem Alter der Eier, Lagerungsdauer und -temperatur, Bebrütungstemperatur und Luftfeuchte.

Zur Präparation wurden die Eier dem Inkubator entnommen und in gleicher Lage auf Eierkartons zum Transport und zur weiteren Behandlung gelegt. Nach einer Ruhe von ca. 10 min wurden die Eier mit 70%igem Ethanol oberflächlich gesäubert und mit Tesafilm abgeklebt. Mit einer Skalpellklinge (Nr. 11) wurde das Ei am spitzen Ende einmal perforiert, und mit einer 10ml-Spritze und einer dicken Kanüle (1.2 x 40) etwa 4ml Eiweiß pro Ei abgesaugt. Dadurch sanken Dotter und Embryo ab und wurden für die Präparation zugänglich. Mittels einer feinen, gebogenen Schere konnte von der Einstichstelle ausgehend die Schale im Tesafilm-beklebten Bereich eröffnet werden („Ei-fenster“).

Um die jüngeren Embryonen in ihrem Entwicklungsstadium bestimmen und präparieren zu können, wurde mittels einer im Kapillarziehgerät dünn ausgezogenen Mikropipette ein

Tinten/PBS_(DEPC)-Gemisch in die Subgerminalhöhle, d. h. unter den Embryo, gespritzt. Die älteren Embryonen konnten ohne dieses Hilfsmittel den entsprechenden Altersstufen zugeordnet und präpariert werden (s. 8.1, 8.2).

2.1.2 Präparation von Embryonen

Embryonen wurden zur Isolierung von DNA und für die *in situ* Hybridisierung (ISH) benötigt. Die Präparation erfolgte in Petrischalen (Ø 35mm) in eiskalten Lösungen auf Eis (Nukleinsäure-Isolierung) oder bei Raumtemperatur (RT) in ebenso temperierten Fixativen (ISH).

HH10: Mit einem an seiner Spitze ca. 90° gebogenen Wolframdraht oder zweier fein geschliffener Pinzetten wurde anterior und lateral des Embryos die Eihaut eröffnet und entfernt. Der Embryo konnte mit den Pinzetten aus dem Ei in ein entsprechend vorbereitetes Gefäß überführt werden.

HH19: Mittels zweier spitzer Pinzetten (Nr. 3, 5) wurde die Eihaut über dem Embryo abgezogen, alle Gefäße durchtrennt, der Embryo aus dem Ei gehoben und in ein Gefäß überführt.

2.1.2.1 Präparation von Embryonen zur DNA-Isolierung

Embryonen des HH19-Stadiums wurden wie oben beschrieben präpariert und in eine Petrischale mit 1xPBS_(DEPC) überführt, wo Eihäute, Dotter und Blut entfernt wurden. Sie wurden auf Eis in 180µl ALT-Puffer (Qiagen) oder „trocken“ gesammelt und bei -20°C gelagert.

2.1.2.2 Präparation von Embryonen zur *in situ* Hybridisierung

Sowohl HH10- als auch HH19-Embryonen wurden wie beschrieben präpariert, in eine Petrischale mit 4% PFA/PBT_(DEPC) überführt und in dieser präparativ bearbeitet. Dabei wurde anhaftender Dotter, Eihüllen, z.T. auch Herz, Blut und Tinte (HH10) entfernt. Körperhöhlen (v. a. Tecta) der HH19-Embryonen wurden vorsichtig mit einem spitz ausgezogenem Wolframdraht perforiert. Alle weiteren Behandlungen wurden schüttelnd vorgenommen: die

Embryonen wurden über Nacht bei 4°C oder 4h bei RT in 4% PFA/PBT_(DEPC) fixiert, anschließend 2x 5min in PBT_(DEPC) gewaschen, über 50% und 75% Methanol (MethOH) in 100% MethOH (jeweils 2x 5min,) überführt und in diesem bei -20°C gelagert.

2.1.3 Präparation von Augenanlagen zur RNA-Isolierung

Die Augenanlagen wurden ausschließlich zur Isolierung von total-RNA. Um RNase-Kontaminationen gering zu halten, wurden Handschuhe, Mundschutz und ein Sartorius-Filter (Porengröße 30-45µm) statt des herkömmlichen Mundstücks benutzt. Zuerst wurde in 1x PBS_(DEPC) mit dem RNase Inhibitor „RNAGuard“ [12.5U/µl] präpariert und gelagert. Nach einigen Vorversuchen zeigte sich, dass die RNA-Konzentration dadurch nicht erhöht werden konnte, weshalb auf einen weiteren Einsatz des Inhibitors verzichtet wurde. Die Anlagen wurde in 50µl RLT-Puffer (Qiagen) in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die jungen Stadien (HH10) wurden direkt im Ei präpariert (s 2.1.1, 2.1.2, 8.1). Nach dem Freilegen des Embryos konnte mit Hilfe des Wolframdrahtes die rechte und linke Augenanlage zu ca. 3/4 vom Diencephalon abgetrennt und danach jeweils von distal nach proximal halbiert werden. Somit entstanden pro Anlage (rechts, links) zwei Hälften (anterior, posterior), die im Folgenden immer als „Regionen“ bezeichnet und mit „rechts-anterior“ (RA), „rechts-posterior“ (RP), „links-anterior“ (LA) und „links-posterior“ (LP) charakterisiert werden. Die Regionen wurden mit einer Mikropipette und Mundaspiration aufgezogen, in das entsprechende gekühlte Sammel-Kryoröhrchen ausgestoßen, auf Eis gelagert und nach Präparationsende sofort in flüssigem Stickstoff überführt. Pro Röhrchen wurden zwischen 20-60 Regionen gesammelt.

Embryonen des Stadiums HH19 wurden vorsichtig aus dem Ei in eine Petrischale (s. 2.1.2) mit eiskaltem PBS_(DEPC) überführt und dekapetiert. Mittels einer Vannasschere wurden die Anlagen ausgehend von der Fissura nach cranial halbiert (s. 8.2), mit zwei feinen Pinzetten vom Neuroepithel freipräpariert, mit einer Mikropipette aufgenommen, in ein gekühltes Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Pro Röhrchen wurde eine Region gesammelt.

2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1 RNA

RNA ist bei RNase-freier Handhabung ebenso unkompliziert wie DNA. Durch die extreme Stabilität und das ubiquitäre Vorhandensein von RNasen, muss jedoch sehr sauber gearbeitet werden. Deshalb wurden in vorliegender Arbeit ein spezieller RNA-Arbeitsplatz, gestopfte und Nuklease-freie Pipetten und ein extra Pipettensatz benutzt.

Die Isolierung der total-RNA erfolgte mit dem RNeasy[®] Mini Kit und dem RNase-Free DNase Set nach dem Herstellerprotokoll. Die benutzte Isolierungsmethode beruht auf der selektiven Bindung von RNA an eine Kieselgelmembran, während DNA (DNase-Verdau direkt auf Membran möglich), Proteine und Verunreinigungen durch verschiedene Waschschriffe entfernt werden. Es kann nur RNA einer Größe von mehr als 200 Basen isoliert werden. Die RNA wurde mit 50 μ l (in zwei Schritten: 1x 30 μ l, 1x 20 μ l) Nuklease-freiem Wasser eluiert, auf Eis zwischengelagert, spektralphotometrisch vermessen und in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Isolierung wurden bei den HH10-Stadien z. T. aus verschiedenen Präparationen „gepoolte“ Regionen verwandt, d. h. 52-54 Regionen für HH10 und eine Region für HH19 (s. 3.2). Zur Kontrolle des Differential Displays (DD) wurde für jedes Stadium ein gemeinsamer „Summen-Pool“ (Σ) geschaffen. Dazu wurden den Einzelisolierungen je 200ng (bzw. 10 μ l/HH19) total-RNA entnommen, in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt, gemischt und ebenfalls in flüssigem Stickstoff gelagert (s. 3.2). Die Qualität der isolierten RNA wurde anhand der 18S- und 28S-Banden der rRNA in einem denaturierendem RNA-Gel (s. 2.3.1, 3.2.1) abgeschätzt.

2.2.2 DNA

Die DNA wurde zur Optimierung und Kontrolle der PCRs und des DD benötigt. Sie wurde vorrangig aus überzähligen HH19-Embryonen isoliert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers (QIAamp[®] DNA Mini Kit) vorgegangen. Die DNA wurde mit 1x 200 μ l AE-Buffer (Qiagen) eluiert, spektralphotometrisch vermessen und bei -20°C gelagert.

2.2.3 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Sollte DNA aus einer Gelbande isoliert werden, wurde ein erstes Gel zur Überprüfung und Dokumentation (jeweils unter UV, $\lambda=312\text{nm}$), ein Zweites zum Ausschneiden der entsprechenden Banden angefertigt. In diesem zweiten Gel wurde nur sehr kurz die Größe der amplifizierten Produkte unter UV (70%) kontrolliert. Strangbrüche oder Mutationen sollten dadurch verhindert werden. Bei Tageslicht wurde der Markerlauf vom restlichen Gel mit einem Skalpell abgetrennt und die Bande der gesuchten Größe im Marker unter UV ausgeschnitten (Schutzhelm). Der Markerlauf wurde dem Gel wieder angepaßt, die Produktbanden der Proben anhand des Markerausschnittes bei Tageslicht mit einem spitzen Skalpell "blind" ausgeschnitten und in ein autoklaviertes, weißes 1.5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Gelbanden waren bei 4°C bzw. -20°C lagerbar. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe zweier Kits nach dem Herstellerprotokoll (JETsorb; QIAEX[®] II Gel Extraction Kit). Die DNA wurde mit $20\mu\text{l}$ Nuklease-freiem Wasser (JETsorb-Protokoll) bzw. mit $2 \times 20\mu\text{l}$ Aqua bidest, pH 8.0-8.2 (QIAEX[®]-Protokoll) eluiert, spektralphotometrisch vermessen und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Elution von DNA aus PAA-Gelen

Auf einem Leuchttisch konnten die silbergefärbten Gele (s. 2.3.6) aufgelegt und das Bandenmuster der Proben miteinander verglichen werden. Differentielle Banden wurden mit einem spitzen Skalpell ausgeschnitten und in ein 1.5ml Reaktionsgefäß überführt. Gelbanden konnten bei 4°C gelagert werden. Für die Isolierung der DNA wurden die Protokolle von Sambrook et al. und Feldkämper (Universitätsaugenklinik Tübingen) modifiziert:

Bande mit spitzem Skalpell ausschneiden

Gelstück mit $100\mu\text{l}$ -Pipettenspitze und/oder Skalpellklinge an der Reaktionsgefäß-Innenwand zerdrücken

+ $100\mu\text{l}$ 10mM Tris (pH 8.0) → 10min bei 65°C → 2min bei 13.000rpm und RT

→ Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen,

+ $10\mu\text{l}$ 3M NaAc (pH 5.6)

+ $5\mu\text{l}$ 10mg/ml Glycogen

+ $450\mu\text{l}$ eiskaltes 100% EtOH

→ mind. 30min bei -80°C fällen → Zentrifugation für 15min bei 13.000rpm und 4°C

Pellet unter Werkbank trocknen (15-30min)

Lösen des DNA-Pellets mit 10µl Nuklease-freiem-Wasser.

Die DNA wurde spektralphotometrisch vermessen, bei -20°C gelagert und für die Reamplifizierung (s. 2.4.2) verwandt.

2.2.5 DNA-Extraktion nach Restriktionsverdau

Nach Maxipräparation (s. 2.6.2) und Restriktionsverdau (s. 2.7.2) wurde die linearisierte DNA mittels Phenol-Chloroform-Fällung extrahiert. Dabei wurde das Protokoll von Sambrook et al. nur geringfügig modifiziert: alle Zentrifugationen wurden bei 13.000rpm durchgeführt. Außerdem wurde die DNA immer bei -80°C für mindestens 30min gefällt. Die Trocknung der DNA erfolgte unter der Werkbank und dauerte etwa 20-30min. Gelöst wurde mit 15µl EB-Puffer (Qiagen). Die DNA wurde spektralphotometrisch vermessen und bei -20°C gelagert. Sie wurde für die *in vitro* Transkription weiterverwandt.

2.3 Gelelektrophorese

Bei der Arbeit mit Ethidiumbromid (s. 2.3.5) wurden grundsätzlich Nitril-Handschuhe und eine extra Pipette benutzt, Geräte entsprechend gekennzeichnet sowie ge- und verbrauchte Gele und Puffer nach Gefahrstoffverordnung über die Abfallwirtschaft des Universitätsklinikums Münster (UKM) entsorgt. Der Zusatz von Bromphenolblau erleichterte den Probenauftrag und ermöglichte über eine sichtbare Lauffront die Kontrolle der Elektrophorese. Die Elektrophoresen erfolgten horizontal (Agarose und DD-Polyacrylamid) oder vertikal (Sequenzierung).

2.3.1 RNA-Agarose-Gele

Auf ein denaturierendes, 1.5%iges Agarose-Gel (s. u.) wurden 500ng RNA aufgetragen. Um RNase-Kontaminationen zu minimieren, wurde eine Gelapparatur ausschließlich für RNA-Gele verwandt. Die Kammer und Käme wurden mit DEPC- H_2O gespült, der Laufpuffer und das Gel mit DEPC- H_2O angesetzt. Zehn bis 20min vor Probenauftrag wurde ein Vorlauf gestartet. Das Gel wurde hierdurch erwärmt, so dass die aufgebrochene Sekundärstruktur der zuvor bei 65°C (5min) denaturierten RNA erhalten wurde.

Laufparameter (Elektrodenabstand: ca. 16.5cm):

120V, 80mA, 8W, 30min

RNA-Gel (100ml-Ansatz): 1.5% Agarose, 1xFA-Puffer, horizontaler Gellauf, denaturierend, Elektrophorese unter einem Abzug!

1.5g Seakem[®] LE Agarose (BMA / Biozym)

+ 10.0ml 10x MOPS

+ 73.8ml DEPC-H₂O

→ Lösung aufkochen (Mikrowelle, 600W) und bis auf ca. 70°C abkühlen lassen

+ 16.2ml 37% Formaldehyd (Calbiochem)

→ Gel gießen; Laufpuffer: 1x MOPS

RNA-Auftragspuffer:

(modifiziert nach Schulz, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)

Für den Auftrag wurde der Puffer 1:1 mit der RNA-Probe eingesetzt. Das Endvolumen richtete sich nach der Konzentration der RNA.

90.0µl deionisiertes Formamid (Sigma)

10.0µl 10x MOPS

16.1µl 37% Formaldehyd (Calbiochem)

2.0µl 1% Bromphenolblau_(DEPC) (Sigma)

2.0µl 1% Xylencyanol_(DEPC) (Sigma)

1.0µl 10mg/ml Ethidiumbromid (Amersham Pharmacia Biotech)

→ dunkel, bei 4°C gelagert und innerhalb von 3 Monaten aufgebraucht

2.3.2 DNA-Agarose-Gele

PCR-Produkt- oder Plasmid-DNA nach Restriktionsverdau wurde auf ein 1.2-1.5% Agarose-Gel (s. u.) aufgetragen und unter UV-Licht ($\lambda=312\text{nm}$) auf seine Größe, Spezifität und Qualität untersucht.

Laufparameter (Elektrodenabstand: ca. 21cm):

90-100V, 50mA, 10W, 30-45min

120-150V, 120-150mA, 45min

DNA-Gel (100ml-Ansatz): 1.5% Agarose, 1x TBE, horizontaler Gellauf

1.5g Seakem[®] LE Agarose (BMA / Biozym)

+ 100.0ml 1x TBE

→ Lösung aufkochen (Mikrowelle, 600W),

→ unter Rühren 6.0µl 10mg/ml Ethidiumbromid [0.6µg/ml] (Amersham Pharmacia Biotech) zugeben

→ unter Rühren abkühlen („handwarm“)

→ Gel gießen und auspolymerisieren in 15-30min

(→ unbenutzte Gele mit etwas 1x TBE bei 4°C im Dunkeln aufbewahren)

Laufpuffer: 1x TBE; Auftragspuffer: 6x Ficoll

Probenaufträge

PCR-Produkt	Minipräp.-DNA	Maxipräp.-DNA	Marker
3µl H ₂ O	---	---	4µl TE (pH 8.0)
2µl 6x Ficoll	5µl 6x Ficoll	2µl 6x Ficoll	2µl 6x Ficoll
5µl DNA	5µl DNA	2µl DNA	1µl Marker

Das Verhältnis 6xFicoll:DNA wurde nach einer Mini- oder Maxipräparation 1:1 gewählt, da sonst die Proben aus den Taschen diffundierten.

Es wurden verschiedene DNA-Größenmarker verwandt. Der „SMART-Ladder“ (200-10000bp) wurde gebrauchsfertig geliefert. Er war für eine Größen- und Quantitätsabschätzung geeignet. Pro Lauf wurden standardmäßig 5µl aufgetragen. Weiterhin wurden eine 20bp- (20-1000bp), 50bp- (50-500bp), zwei 100bp- (100-3000bp und 100-2000bp), und 1kb-Leiter verwandt. Diese Marker wurden nach oben beschriebenem Ansatz eingesetzt. Die 20bp-Leiter konnte außerdem mit einem vom Hersteller mitgelieferten Ladepuffer benutzt werden.

Um DNA-Konzentrationen schnell und ohne spektralphotometrische Analyse abschätzen zu können, wurden Ethidiumbromid-Agarose-Platten hergestellt (Protokoll nach: ZAP-cDNA[®]-

SynthesisKit, Stratagene). Als Standard wurde Kontroll-DNA aus dem AdvanTaq™ PCR Kit (Clontech) entnommen und entsprechend mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Vom DNA-Standard und der zu überprüfenden DNA wurden jeweils 0.5µl auf die Platte pipettiert, 10-15min bei RT inkubiert und anschließend auf dem UV-Tisch untersucht.

2.3.3 DNA-Polyacrylamid-(PAA)-Gele

Die Elektrophorese erfolgte horizontal bei 15°C. Für die Separation der DD-Produkte wurden Fertiggele (CleanGel Long-10: 22 Spuren, CleanGel Large-10: 40 Spuren; Gesamt-Gellänge jeweils 26cm, Lauflänge ca. 18cm; nicht denaturierend) benutzt. Nach Angaben der Firma ETC separieren die verwendeten PAA-Gele über einen Bereich von 100-2500bp. Die Gele wurden bei -20°C gelagert und mussten mindestens 90min vor Probenauftrag rehydriert werden (entsprechender Puffer von ETC). Die Vorbereitungen und Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Herstellerangaben.

Probenpuffer:

25ml Rehydrationspuffer
60µl 1% Bromphenolblau
40µl 1% Xylencyanol
250µl 0.2M EDTA

Probenauftrag:

5µl Probenpuffer
5µl DD-DNA
→ 7µl für Gelauftrag
→ 1µl DNA-Marker (pur)

Programmparameter (Long, Elektrodenabstand ca. 22cm)

150 Vmax (150V)	15mAmax (11mA)	5 Wmax (2W)		30'
400 Vmax (400V)	31mAmax (31mA)	12 Wmax (12W)		10'
500 Vmax (360V)	25mAmax (25mA)	12 Wmax (12W)		45'
800 Vmax (490V)	28mAmax (28mA)	13 Wmax (13W)	2h	20'
ENDE				

Programmparameter (Large, Elektrodenabstand ca. 22cm)

150 Vmax (150V)	25mAmax (20mA)	8 Wmax (4W)		30'
400 Vmax (400V)	60mAmax (53mA)	23 Wmax (15W)		10'
500 Vmax (360V)	44mAmax (44mA)	23 Wmax (15W)		45'
800 Vmax (490V)	49mAmax (49mA)	24 Wmax (24W)	4h	20'

ENDE

Falls eine Verlängerung der Elektrophorese nötig wurde (sichtbare Gelfront), waren beide Programme in ihrem Ende flexibel und konnten manuell im dritten Programmpunkt verlängert werden. Nach Laufende wurden die Gele fixiert und Silber gefärbt (s. 2.3.6). Anschließend wurden die noch feuchten Gele in eine Plastikfolie gegeben, mit Tesafilm verschlossen und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.3.4 Sequenzierungs-Gele

Die Sequenzierung erfolgte in einem LI-COR-Gerät (s. 2.8.1)

Vor dem Gießen wurden alle Apparatur-Bestandteile mit Aqua bidest oder 80% EtOH gesäubert. Das Polyacrylamid-Gel (0.2mm, 41cm Länge) wurde nach Herstellerangaben (Endkomponenten Flüssigel-Kit: 1x TBE [89mM Tris, 89mM Borsäure, 2mM EDTA], 6M Harnstoff, pH8.3, 4-6%) frisch angefertigt. Es wurde auf unbedingte Sauberkeit (separate Chemikalien, Geräte) und Vermeidung von Luftblasen (Filterbenutzung) geachtet. Das Gel musste mindestens 1h auspolymerisieren. Überschüssiges Gelmaterial wurde mit 80% EtOH entfernt. Der Gellauf erfolgte vertikal. Vor dem Probenauftrag war ein mindestens 30minütiger Vorlauf zur Gel- und Puffererwärmung sowie zur rechnergestützten Laserequilibrierung nötig. Bei Nutzung von „forward“ und „reverse“ Primer konnten maximal 8 verschiedene Proben pro Gellauf sequenziert werden (s. 2.8.1).

2.3.5 Ethidiumbromidfärbung

Ethidiumbromid diente als Farbstoff (orange unter UV) sowohl im RNA- als auch im DNA-Agarosegel. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA und ist deshalb als mutagen und kanzerogen eingestuft. Ethidiumbromid zerfällt unter UV-Licht und bildet keine Aerosole, was für die Verwendung einer 10mg/ml Stammlösung sprach. Für die Arbeiten wurden ein speziell gekennzeichnete Arbeitsplatz sowie Nitril-Handschuhe benutzt. Die Gelkammer wurde mit Aluminiumfolie unterlegt. Gebrauchte Pufferlösungen, Gelrückstände und Abfälle wurden entsprechend der Gefahrstoffverordnung über die Abfallwirtschaft des UKM entsorgt. Ethidiumbromid wurde entweder über einen Probenpuffer zu den Proben gegeben und mit diesen auf das Gel geladen (s. 2.3.1), oder aber dem Gelansatz beigefügt (s. 2.3.2).

Ethidiumbromid ist positiv geladen, wandert zur Anode, was zu einer Ethidiumbromid-verarmten Region im Gel, jedoch nicht zu einem beeinträchtigten Nachweis führte.

2.3.6 Silberfärbung

Diese Art der Färbung ist als äußerst sensitive Alternative zur radioaktiven Technik zu verstehen (Bassam et al., 1991; Lohmann et al., 1995). Das Färbeprotokoll des Herstellers (ETC) war auf dessen PAA-Gele (s. 2.3.3) abgestimmt und wurde nur geringfügig modifiziert. Beschrieben wird hier die Prozedur für „Long“-Gele. Gefärbt wurde schwenkend bei RT, alle benutzten Puffer und Lösungen wurden unter 2.12.1 beschrieben. Nach der Elektrophorese (s. 2.3.3) wurden die Gele für mind. 45min, besser jedoch ü. N. fixiert (15% EtOH, 5% Essigsäure). Anschließend wurde 3x 10min mit Aqua bidest gewaschen und 45min mit Silberlösung gefärbt. Nach dem Abspülen mit Aqua bidest wurde etwa 5min in Entwickler-Lösung geschwenkt. Die Silberfärbung ist keine Endpunktfärbung, sie wurde nach subjektivem Empfinden anhand verschiedener Merkmalen (Hintergrundfärbung, „Sichtbarwerden“ von Banden) gestoppt. Die Reaktion wurde in Stopp-Lösung (1x 15min) beendet und die Gele mit der Imprägnier-Lösung für mind. 15min, oder ü. N. behandelt. Danach wurden die feuchten Gele in Plastiktaschen gelegt, alle Öffnungen mit Tesafilm verklebt und bei RT gelagert.

2.4 Amplifikation von Nukleinsäuren

In vorliegender Arbeit wurden zwei PCR-Typen bearbeitet. Zum einen eine PCR, um verschiedene Gene mittels spezifischer Primer nachzuweisen und zu amplifizieren, zum anderen das Differential Display (DD), um differentiell exprimierte Gene zu detektieren. Alle Reaktionsansätze wurden unabhängig vom Enzym grundsätzlich auf Eis pipettiert und erst zu Beginn des 95°C-Denaturierungsschrittes in den Cycler gesetzt. Da die AdvanTaqTM DNA Polymerase (Clontech) konsequent als „Hot-start“ nach 2min bei 95°C direkt im Cycler zugesetzt wurde, wurde fast immer eine „Taq-Verdünnung“ angesetzt (s. 2.4.2.2). Dadurch war ein korrektes Pipettieren des in Glycerin gelagerten Enzyms selbst bei kleinsten Volumina und vielen Proben möglich. Der „Hot-start“ sollte unspezifische Bindungen, Primer-Dimere und Background minimieren. Sekundäre Verunreinigungen waren durch das erneute Öffnen der Reaktionsgefäße nicht auszuschließen. Die AdvanTaqTM wurde später vom Hersteller durch die mit einem Antikörper gekoppelte TitaniumTMTaq DNA Polymerase

gleicher Konzentration/Aktivität (U/ μ l) ersetzt, wodurch der klassische „Hot-start“ entfiel. Der Antikörper blockierte das Enzym bis etwa 70°C. Diese Polymerase wurde nicht für das DD genutzt.

Alle Primer wurden im lyophilisierten Zustand geliefert. Die 100pmol/ μ l Stamm- sowie unterschiedliche Arbeitskonzentrationen wurden mit Nuklease-freiem Wasser angesetzt und bei -20°C gelagert.

Folgende Negativkontrollen (NK) wurden immer mitgeführt: NK der RT (NK_{/RT}) und NK der PCR (NK_{/PCR}). Dabei wurde statt einer Probe Nuklease-freies Wasser bzw. die NK_{/RT} als „Template“ verwendet.

2.4.1 Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche RNA in einzelsträngige DNA umschreibt. Diese DNA wird als copy-DNA (cDNA) bezeichnet.

Durch die Verwendung eines oligo-d(T)-Primers (5'-pd(T)₁₂₋₁₈-3') wurde auf alle z. Zt. der RNA-Isolierung aktiven poly-A⁺-mRNAs selektiert. Jede RT resultierte demnach in einem Pool an cDNAs. Für alle RT-Reaktionen wurden bei HH10 und $\Sigma_{(HH10)}$ 200ng total-RNA eingesetzt. Die geringeren Mengen bei HH19 und $\Sigma_{(HH19)}$ zwangen zu einem Kompromiss: es wurden je 10 μ l RNA eingesetzt (s. 3.2).

Reaktionsansatz (50 μ l Endvolumen)

65°C: 10' Denaturieren der RNA

0°C: Abkühlen der denaturierten RNA, Zwischenlagerung und Reaktionsansatz auf Eis

	Endkonzentrationen
6.8 μ l RNA, denaturiert	[200ng]
12.2 μ l Nuklease-freies Wasser	
10.0 μ l 5x RT Puffer (Promega)	[1x]
5.0 μ l 0.1M DTT (Promega)	[10mM]
3.0 μ l 25mM dNTP (Amersham)	[1.5mM jeweils]

12.5µl 200U/µl M-MLV Reverse Transkriptase (Promega)	[50U/µl]
0.5µl 1µg/µl oligo-d(T)-Primer (Promega)	[0.01µg/µl]

Die RT-Reaktion erfolgte für 1h bei 37°C. Gestoppt wurde sie durch Erhitzen für 2min bei 95°C.

Nach der Transkription wurde die so generierte cDNA sofort oder nach Zwischenlagerung bei 4°C mit dem QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt. Hierdurch wurden nicht umgesetzte RNA, restliches Enzym, Nukleotide und Primer entfernt. Die cDNA wurde 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt, um für alle folgenden Reaktionen (DD, PCRs) dieselbe cDNA verwenden zu können. Hierdurch wurden Varianzen in der Präparation der cDNA, welche in nachfolgenden Analysen zu falsch-positiven Ergebnissen führen würden, ausgeschlossen. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.4.2 Differential Display Analyse

Das Differential Display (DD) wird auch als Differential Display Reverse Transkription Polymerase Ketten Reaktion (DDRT-PCR) bezeichnet, was auf die Verknüpfung einer besonderen Form der Reversen Transkription (RT) und der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) hinweisen soll. Sie wurde 1992 von Liang und Pardee beschrieben und als Alternativmethode zur materialintensiven subtraktiven Hybridisierung und der Protein-analysierenden 2D-Gelelektrophorese entwickelt. Das Grundprinzip der DD-Analyse soll folgend erläutert werden (s. 8.3).

2.4.2.1 Prinzip der DD-Analyse

Das DD basiert auf der Amplifikation von cDNA mit ankerspezifischen („anchor“) und zufälligen („arbitrary“) Primern unter niedriger Stringenz, d. h. einer Amplifikation ab $T_m=30^\circ\text{C}$. Die sogenannten „Anker“-Primer (auch „Downstream“-Primer= D-Primer) sind spezielle oligo-d(T)-Primer (13mere) der Art 5'-T₁₁VN-3' (N= jedes der vier Nukleotide [G, A, T oder C]; V= die Nukleotide G, A, C; Bauer et al., 1994). Sie selektieren auf einen poly-A⁺-Schwanz, wie ihn die meisten eukaryotischen mRNAs besitzen. Aufgrund der Kombinationsmöglichkeiten der Nukleotide („N“ mit „V“) ergeben sich 12 verschiedene Anker-Primer, mit denen je eine RT-Reaktion durchgeführt wird. Das Ergebnis sind 12

cDNA-Fraktionen. In der folgenden PCR-Reaktion müssen diese Fraktionen mit einem Primerpaar amplifiziert werden. Dafür wird der Anker-Primer der RT-Reaktion mit einem zufälligen Primer kombiniert. Dieser „Zufalls-Primer“ (auch „Upstream“-Primer= U-Primer) ist 10 Basen lang. Die Sequenz des Primers wird durch den GC-Gehalt (50%) und fehlende Selbst-Komplementarität bestimmt, während die Größe des Primers von der Bindungsfähigkeit an das „Template“ abhängig ist. Außerdem muss die Schmelztemperatur (= Annealing-Temperatur, T_m) des Primers noch ein effektives Arbeiten der DNA-Polymerase ermöglichen (Liang et al., 1995). Von Bauer et al. (1993, 1994) wurden 24 bis 26 U-Primer rechnerisch und experimentell als essentiell bestimmt. Soll jede mRNA-Spezies erfasst werden, müssen alle Anker- und Zufalls-Primer miteinander kombiniert werden (entspricht 288 (24 U-Primer) bzw. 312 (26 U-Primer) PCR-Reaktionen). Die Produkte können in einem de- oder nicht denaturierenden Sequenzier-Gel oder einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden.

2.4.2.2 DD-Reaktionsansätze

In der vorliegenden Arbeit wurde auf einen Einsatz der Anker-Primer in der RT-Reaktion wurde verzichtet, um die Komplexität der cDNA nicht zu minimieren. Statt dessen wurde der oligo-d(T)-Primer eingesetzt (s. 2.4.1). Außerdem wurden nicht alle 312 Kombinationsmöglichkeiten der 26 „U-“ und 12 „D-Primer“ bearbeitet, sondern sich, nach Vorversuchen, auf 42 Kombinationen beschränkt. Die Sequenz aller verwendeten Anker- und Zufalls-Primer wurde dem Protokoll von Bauer et al. (1993) entnommen.

Zufalls-Primer:

U3 5'-CTT TCT ACC C-3'
 U4 5'-TTT TGG CTC C-3'
 U6 5'-AAA CTC CGT C-3'
 U10 5'-GGT ACT AAG G-3'
 U11 5'-TAC CTA AGC G-3'
 U26 5'-GAT CTA AGG C-3'

Anker-Primer:

D2 5'-TTT TTT TTT TTC G-3'
 D3 5'-TTT TTT TTT TTC T-3'
 D5 5'-TTT TTT TTT TTG A-3'
 D8 5'-TTT TTT TTT TTG C-3'
 D9 5'-TTT TTT TTT TTA A-3'
 D11 5'-TTT TTT TTT TTA T-3'
 D12 5'-TTT TTT TTT TTA C-3'

Reaktionsansatz (20µl Endvolumen):	Endkonzentration
7.44µl Nuklease-freies Wasser	
2.00µl 10x AdvanTaq-Puffer (Clontech)	[1x]
0.16µl 25mM dNTP (Amersham Pharmacia Biotech)	[0.25mM]
0.40µl 20U/µl AdvanTaq (Clontech)	[0.4U/µl]
2.00µl 25pmol/µl D-Primer (Interactiva/Thermo Hybaid)	[2.5pmol/µl]
2.00µl 5pmol/µl U-Primer (Interactiva/Thermo Hybaid)	[0.5pmol/µl]
6.00µl cDNA	

Reamplifikationsansatz (20µl Endvolumen)	Endkonzentration
9.0µl MM	
2.0µl 25pmol/µl D-Primer (Interactiva/Thermo Hybaid)	[2.5pmol/µl]
2.0µl 5pmol/µl U-Primer (Interactiva/Thermo Hybaid)	[0.5pmol/µl]
2.0µl (10 ⁻¹ verdünnte) DNA	
5.0µl AdvanTaq-Verdünnung (Clontech); „Hot-start“	

MM:

xµl Nuklease-freies Wasser	
xµl 10x AdvanTaq-Puffer (Clontech)	[1x]
xµl 25mM dNTP (Amersham Pharmacia Biotech)	[0.2mM]

TAQ-Verdünnung:	Endkonzentration
xµl Nuklease-freies Wasser	
xµl 10x AdvanTaq-Puffer (Clontech)	[1x]
xµl 20U/µl AdvanTaq (Clontech)	[0.05U/µl]

Die PCR-Reaktionen für das DD erfolgten unter niedrig stringenten Bedingungen. Das erste „Annealing“ (Anbinden) der Primer erfolgte in der DD-PCR bei 30°C, in der DD-Reamplifikation bei 35°C. In den nachfolgenden PCR-Zyklen wurde diese Temperatur bei der DD-PCR um jeweils 0.1°C bis auf 33.9°C erhöht und in der DD-Reamplifikation um 1°C auf 30°C erniedrigt. In beiden Fällen sollte dies die Spezifität der Reaktionen erhöhen. Zusätzlich wurde die Synthesephase (Extension) pro Zyklus (DD-PCR: alle Zyklen; DD-

Reamplifikation: letzte 24 Zyklen) um eine Sekunde verlängert. Hierzu wurden folgende Parameter programmiert:

DD-PCR (PE 9700):

95°C: 5'
 40x 94°C: 30''
 30°C+0.1°C/Zyklus: 30''
 72°C: 30''+1''/Zyklus
 72°C: 10'
 4°C: ∞

DD-Reamplifikation (PE 9700):

95°C: 5'
 6x 94°C: 30''
 35°C-1°C/Zyklus: 30''
 72°C: 1'
 24x 94°C: 30''
 30°C: 30''
 72°C: 1'+1''/Zyklus
 72°C: 10'
 4°C: ∞

2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Im Folgenden werden die amplifizierten Gene, die dazugehörigen Primer und einige Parameter aufgeführt.

Tab. 1: Positivkontrollen: Darstellung der Primerpaare und ihrer Produkte.

Gen	Produktgröße		Primer-Sequenzen	
	RNA	DNA		
β-Aktin	335bp	640bp	β-F8	5'-AGC CGA GAG AGA AAT TGT GCG-3'
			β-B15	5'-TCT GCA TCC TGT CAG CAA TGC-3'
CBF-1	327bp		CBF1/F4	5'-TTT CCA CGT CCA ACG GGT TG-3'
			CBF1/B4	5'-TCG TGA AAC TCG GCA AAG AGG-3'
CBF-2	370bp		CBF2/F16	5'-GCT CTT TTT CTT TGC CGC TCG-3'
			CBF2/B20	5'-TCC CTC AAG CCT TCT CTG TTC C-3'
Pax-6	203bp		Pax6-F1	5'-AAA CAG AGT CCT CCG CAA CCT G-3'
			Pax6-B1	5'-TGA TGG AGT TGG TGT TCT CCC C-3'

Tab. 2: Zusammenfassung der potentiell differentiell exprimierten Gene und ihrer Primer.

Gen	Produktgröße RNA	Primer-Sequenzen	
α B-Kristallin	254bp	α B/F1	5'-ATC ACC ATT CAC AAC CCC CTG-3'
		α B/B1	5'-TCC TCA GGC GAG AAA TGC TTC-3'
DeltaEF-1	244bp	Delta/F7	5'-AAA CCC AGG CTG ACA ATG CTG-3'
		Delta/B7	5'-CGC ATG TGT TCG ATC AAA TGG-3'
Notch-1	251bp	Notch/F4	5'-TTC AAC GAC CCC TGG AAG AAC-3'
		Notch/B1	5'-GGC ATG TTG TTT GCA CAG TCC-3'
Numb	301bp	Numb/FL	5'-GGT ACA GCC CAT AGG TTC ACA-3'
		Numb/BR	5'-CCT CTG GAT TCA TCC ACT TCA-3'
Ip3ka	296bp	Ip3ka/F11	5'-TCT TAT GCA GCC CTT GTT CCC-3'
		Ip3ka/B11	5'-TCC ACA CAG ATC AAG CCA AGC-3'

Tab. 3: Zusammenfassung einiger Parameter der verschiedenen PCRs.

Gen	„Annealing“-Temperatur	Konzentration der Taq-DNA-Polymerase
α B-Kristallin	60.0°C	0.10U/ μ l
β -Aktin	57.2°C	0.05U/ μ l
CBF-1	60.9°C	0.05U/ μ l
CBF-2	57.2°C	0.05U/ μ l
DeltaEF-1	65.0°C	0.05U/ μ l
Ip3ka	65.2°C	0.10U/ μ l
Notch-1	60.0°C	0.10U/ μ l
Numb	60.0°C	0.10U/ μ l
Pax-6	60.2°C	0.05U/ μ l

Reaktionsansatz (20µl Endvolumen)	Endkonzentration
xµl Nuklease-freies Wasser	
2.00µl 10x Taq-Puffer (Clontech)	[1x]
0.16µl 25mM dNTP (Amersham Pharmacia Biotech)	[0.2mM]
1.00µl 100pmol/µl Primer1 (Interactiva/Thermo Hybaid)	[0.5pmol/µl]
1.00µl 100pmol/µl Primer2 (Interactiva/Thermo Hybaid)	[0.5pmol/µl]
xµl 20U/µl Taq (Clontech)	[0.05-0.4U/µl]
2.00µl (10 ⁻¹ verdünnte) cDNA	

Reaktionsparameter (PE 9700)

95°C: 10‘

40x: 94°C: 30‘‘

x°C: 30‘‘

72°C: 30‘‘

72°C: 10‘

4°C: ∞

2.4.4 Primerdesign

Um die Primer für die PCR festzulegen, wurden folgende Programme benutzt:

- MacVector, Version 7.0
(Oxford Molecules, London, U.K.; mit freundlicher Genehmigung des Institutes für Virologie, Münster),
- „Primer3“: http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer_3www.cgi
(Whitehead Institute / MIT: Center for Genome Research, Cambridge, M. A., U.S.A)

2.5 Ligation, Klonierung und Transformation

2.5.1 Ligation und Klonierung

Die Klonierung mit dem TOPO-TA-System wurde aufgrund von Erfahrungswerten (Institut für Neuropathologie, Münster) und Literaturhinweisen (z. B. Zimmermann und Schultz, 1994; Begum et al., 1999) übernommen. Benutzt wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit und das TA Cloning Kit. Die entsprechenden Vektoren (pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor, pCR[®]II-Vektor)

enthielten den *lac* promotor, das *lacZ α* Fragment, den SP6- und T7-Promotor, M13 „forward“ und M13 „reverse“ Primer-Bindungsstellen und sowohl Kanamycin- als auch Ampicillinresistenz (s. 8.5). Beiden Kits zugehörig waren chemisch kompetente TOP10F⁺ *E. coli* (s. 8.4). Essentiell für die Ligationen war ein 3' A-Überhang des PCR-Produktes/der DNA, welches durch die Verwendung der AdvanTaqTM bzw. der TitaniumTMTaq gewährleistet wurde. Die Angaben des Herstellers wurden vor allem in Bezug auf die Ligationsdauer modifiziert.

Reaktionsansatz:

TOPO TA Cloning[®] Kit:

1.0 μ l Salzlösung

4.0 μ l DNA

1.0 μ l Vektor/Topoisomerase-Gemisch

→ 30' bei RT

TA Cloning Kit:

4.0 μ l DNA

1.0 μ l 10x Ligationspuffer

2.0 μ l pCR[®]II Vektor

2.0 μ l steriles Wasser

1.0 μ l T4 DNA Ligase

→ mind. 4h bei 14°C

2.5.2 Transformation

Es wurde nach dem Herstellerprotokoll der Fa. Invitrogen gearbeitet. Die Bakterien wurden ca. 10min auf Eis aufgetaut. Statt vorgegebener 2 μ l wurden 4.5 μ l des Ligationsansatzes für die Transformation benutzt. Diese Menge wurde empirisch als optimal ermittelt. Ausplattiert wurden 80 μ l des Transformationsansatzes pro 37°C-warmer Agarplatte (\varnothing ca. 10cm). Diese wurden ü. N. bei 37°C inkubiert. Selektiert wurde auf Ampicillin und α -Komplementation der β -Galactosidase („Blau-Weiß-Test“; s. 8.6).

2.5.3 Agarplatten- und Mediumherstellung

Für die Agarplatten wurde autoklavierte LB-Agar-Lösung (Lennox L Agar, Gibco, Herstellerprotokoll) mit 100mg/ml Ampicillin [50 μ g/ml] versetzt, unter der Sterilbank in Petrischalen (\varnothing ca. 100x15mm) gegossen und nach Verfestigung bei 4°C gelagert. Alle weiteren Arbeiten wurden unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Etwa 30-60min vor dem Ausplattieren der Bakterien wurden auf die auf 37°C erwärmten Platten 40 μ l 40mg/ml x-

Gal und 40µl 100mM IPTG plattiert und bei 37°C getrocknet. Für die Mediumherstellung (für die anschließende Anzucht von Bakterien für die Mini- und Maxipräparation) wurde LB-Broth Base (Lennox L Broth Base, Gibco, Herstellerprotokoll) autoklaviert, nach Abkühlung unter der Sterilbank mit 100mg/ml Ampicillin [50µg/ml] versetzt und bei 4°C gelagert.

2.5.4 Platten- und Schüttelkulturen

Auf den Agarplatten wurden nach Vorversuchen immer 80µl Bakteriensuspension bis zur Trocknung ausplattiert (s. 2.5.2) und bei 37°C ü. N. inkubiert. (Danach konnten sie, verschlossen mit Parafilm, bei 4°C gelagert werden.) Für die Flüssigkulturen wurden ausschließlich rein weiße Kulturen (pro ausplattierter Probe 5-10 Kolonien) mit sterilen 10µl Pipettenspitzen gepickt und in Bakterienröhrchen mit 5ml kaltem LB-Medium gegeben. Diese Vorkulturen wuchsen mind. 13h ü. N. im Schüttelinkubator bei 37°C und 200rpm. Um Kulturen für eine Maxipräparation zu vermehren, wurden 100µl einer Vorkultur in 100ml kaltes LB-Medium pipettiert und mind. 13h bei 37°C und 260rpm inkubiert.

2.5.5 Lagerung von Bakterien

Die im Klonierungs-Kit enthaltenen chemisch kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden bei –80°C gelagert, auf Eis aufgetaut und transportiert. Für eine Lagerung wurden die Bakterien einer Flüssigkultur wie folgt behandelt:

500µl Bakteriensuspension

+ 500µl 99.5% Glycerin, sterilisiert (Roth)

→ im Kryoröhrchen gut durch Vortexen und Trituieren mischen.

→ Einfrieren und Lagerung in flüssigem Stickstoff.

2.6 Plasmidpräparationen

2.6.1 Minipräparation

Für die Plasmidpräparation wurden 2x 1ml einer Bakterienvorkultur für 5 min bei 13.000rpm pelletiert und die Plasmide nach Angaben des Herstellerprotokolls für das QIAprep® Spin

Miniprep Kit isoliert. Die Plasmid-DNA wurde in 50µl EB-Puffer eluiert, spektralphotometrisch vermessen und bei –20°C gelagert.

2.6.2 Maxipräparation

Es wurden die gesamten 100ml der Kultur mit dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die DNA wurde in 100µl TE (pH 8.0) eluiert, spektralphotometrisch vermessen und bei –20°C gelagert.

2.7 Restriktion der Plasmid-DNA

Die verwendete Restriktions-Endonukleasen (*Bam* HI, *Eco* RI und *Not* I) wurden nach den Herstellerangaben verwendet (Neb). Alle DNA-Proben mit bekannter Sequenz wurden vor einem Verdau *in silico* auf die Schnittstellenhäufigkeit einer Endonuklease in der Sequenz untersucht. Hierzu wurde ein Online-Service (<http://www.justbio.com>) genutzt.

2.7.1 Restriktionsanalyse nach Minipräparation

5.5µl Nuklease-freies Wasser

3.0µl Minipräp-DNA

1.0µl *Eco* R I-Puffer (Neb)

0.5µl *Eco* R I (Neb)

→ mind. 1h bei 37°C inkubieren

→ Hitzeinaktivierung: 20min bei 65°C

Der Verdau wurde in einem 1.5% Agarose-Gel qualitativ untersucht (s. 2.3.2).

2.7.2 Restriktionsanalyse nach Maxipräparation

28.0µl Nuklease-freies Wasser

10.0µl Maxipräp-DNA

5.0µl 10x BSA (Neb)

5.0µl 10x Puffer (Neb)

2.0µl *Bam* H I oder *Not* I (Neb)

→ Inkubation: ü. N. bei 37°C

→ Hitzeinaktivierung: *Bam* *H* I: nicht nötig; *Not* I: 20min bei 65°C

Dieser präparative Verdau wurde nach der qualitativen Untersuchung in einem 1.5% Agarose-Gel (s. 2.3.2) für die *in vitro* Transkription weiterverwandt (s. 2.9).

2.8. Sequenzierung

Eine Sequenzierung liefert die Basenfolge einer bestimmten DNA. Die Reaktion läuft nach dem Prinzip einer PCR ab, als Reaktionsprodukt erhält man jedoch DNA-Fragmente. Diese entstehen durch den Abbruch der „Elongation“ nach dem Einbau modifizierter Nukleotide. Diesen 2',3'Didesoxynucleosidtriphosphaten (ddNTP) fehlt die OH-Gruppe am 3'-C-Atom, wodurch kein weiteres Nukleotid angehängt werden kann. Eine Markierung der Fragmente kann durch markierte Primer, Nukleotide oder Didesoxynukleotide erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde die LI-COR-Sequenzierung mit markierten Primern benutzt.

2.8.1 LI-COR

Für diese Sequenzierungen wurde das SequiTherm EXCEL™ II Long-Read DNA Sequencing Kit – ALF™ nach dem Herstellerprotokoll benutzt. Die Sequenzierung, Dokumentation und Auswertung erfolgte im dNA Analyser Gene Reader 4200 (LI-COR) mit der Base Image IR (Single Dye / V4.10 Image Analysis) Software (MWG Biotech) am Institut für Neuropathologie.

Beide mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markierten Primer (100pmol/µl) wurden in kleinen Aliquots (5µl) bei -20°C gelagert, was wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermied. In der Arbeitskonzentration von 2pmol/µl (Verwendung des Kit-eigenen sterilen Wassers) konnten die Primer innerhalb einer Woche 2 bis 3 mal verwendet werden. Bei der Sequenzierung von PCR-Produkten sollte die für die Reaktion einzusetzende Menge der PCR-Produkte bei 25-125fmol liegen (130ng/kb = 200fmol), bei Untersuchung von Plasmid-DNA wurde dagegen das maximale Volumen von 3.4µl DNA eingesetzt (empirisch als Optimum ermittelt).

IRD 800 markierte Primer:

M13 universal (-21) 5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'

M13 reverse (-29) 5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'

Für die Reaktion wurde der halbe Ansatz der Herstellerempfehlung verwendet. Jedes ddNTP (G, A, T, C) wurde in ein 0.2ml Reaktionsgefäß pipettiert. Bei 8 Proben und einem „forward“ und „reverse“ Primer mussten also 64 Ansätze pipettiert werden.

Reaktionsansatz (3µl Endvolumen):

Premix:

3.6µl Puffer

1.0µl 2pmol Primer („forward“, „reverse“)

3.4µl Plasmid-DNA

0.5µl DNA-Polymerase

Terminationsmix:

1.0µl ddNTP pro Tube vorlegen

2.0µl Premix dazugeben

Reaktionsparameter (PE 9700; Mastercycler gradient)

95°C: 5'

30x: 95°C: 30''

50°C: 15''

70°C: 60''

4°C: ∞

Um die Reaktion zu stoppen, wurde 1.5µl des Stop/Loading-Puffers zugesetzt und 5min bei 70°C inkubiert. Es wurden jeweils 0.5µl der Proben aufgetragen. Gestoppte Proben konnten bei -20°C bis zu 2 Tagen gelagert, mussten vor erneutem Auftragen jedoch noch einmal für 5min bei 70°C erhitzt werden. Jede Sequenzierung wurde nach modifizierbaren Vorgaben (Probenauftrag, Taschenbeladung, Kammart, ddNTP-Folge etc.) vom Computer dargestellt und konnte anschließend analysiert werden.

2.8.2 Auswertung der Sequenzen

Die Analyse der Sequenzen fand zum einen statt, um die angewandten Techniken anhand von Positivkontrollen zu überprüfen. Zum anderen mussten die erhaltenen Sequenzen Organismen und Genen zugeordnet werden. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Analyse-Programme „BLAST“ (Altschul et al., 1997; s. 2.8.3.1) und „Align“ (s. 2.8.3.2) weiter untersucht.

2.8.2.1 Auswertung der Sequenzen mit „BLAST“

Nach der Bestimmung von Position und Größe des „Inserts“, wurde die Sequenz zuerst in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) analysiert. Das Ergebnis waren Informationen über die „Trefferquote“ und „Trefferhäufigkeit“ innerhalb einer Art für verschiedene Spezies. Außerdem wurde prozentual angegeben, inwieweit sich die zu analysierende Sequenz und das in den Datenbanken zugeordnete Gen ähnelten und wo genau diese Sequenzübereinstimmungen lagen. Nach Veröffentlichung der Arbeit von Boardman et al. (2002) wurden alle als potentiell differenziert exprimierte Sequenzen noch einmal mit der Datenbank des „BBSRC chicken EST Project“ überprüft (<http://www.chick.umist.ac.uk>). In beiden Fällen erfolgte die Analyse mit Hilfe des „BLAST“-Programmes (s. o.). In der BBSRC-EST-Datenbank wird die zu untersuchende Sequenz ausschließlich mit Hühnchen-cDNAs verglichen. Sie kann dabei einem Klon und dieser einem Gen zugeordnet werden, welche wiederum mit den Sequenzen anderer Datenbanken verglichen werden (z. B. SWISS-PROT/TrEMBL). Mit Hilfe der BBSRC-EST-Datenbank kann überprüft werden, ob die Sequenzen der DD-Analyse tatsächlich Hühnchen-spezifisch sind.

2.8.2.2 Auswertung der Sequenzen mit „Align“

Der Vergleich verschiedener Sequenzen in Bezug auf ihre Homologie wurde mit der Software ALIGN Plus: Sequence Alignment Program, Version2 (Scientific & Educational Software, Pennsylvania, U.S.A.) durchgeführt. Eine Zuordnung zu einer bestimmten Spezies oder einem spezifischen Gen erfolgte dabei nicht.

2.9 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde mit dem DIG RNA Labeling Kit nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurden die Sp6- und T7-RNA-Polymerasen eingesetzt. Die Markierung der neu synthetisierten RNA-Probe erfolgte mit Digoxigenin-UTP. Die RNA wurde in 100µl DEPC-behandeltem Wasser eluiert und als 10µl-Aliqots bei -80°C gelagert. Der Digoxigenin-Nachweis beruht auf einer immunhistochemischen blauen Farbreaktion, welche die DIG-markierten RNA-RNA-Hybride mittels Anti-DIG-alkalische-Phosphatase-Konjugat darstellt (s. 2.11). Das natürliche Vorkommen von DIG ist auf zwei Spezies des Fingerhutes (*Digitalis lanata*, *Digitalis purpurea*) beschränkt, so dass der DIG-Antikörper an kein anderes biologisches Substrat bindet (Roche, 1996). Um Folgefehler zu vermeiden, wurden die Sonden anhand der „Originalsequenzen“ (NCBI-Datenbank-Recherche) hergestellt.

2.10 Dot Blot

Dieser diente der Konzentrations-Abschätzung der RNA-Sonden. Das Protokoll wurde nach Roche Molecular Biochemicals (DIG Application Manual for Filter Hybridization, 2000) modifiziert: von jeder Probe und der mit dem Kit mitgelieferten DIG-markierten Kontroll-RNA wurde eine Verdünnungsreihe (1:10 – 1:100000) mit DEPC-H₂O angesetzt. Die positiv geladene Nylon-Membran (Roche) wurde mit Bleistift beschriftet, jeder zukünftige Spot zur späteren Identifikation markiert und mit 1µl jeder Verdünnung beladen. Nach Fixierung der markierten RNA durch „Backen“ des Filters für 30min bei 80°C wurde die Membran mit Maleat-Puffer angefeuchtet und mit Blockierlösung (10% BSA/Maleat-Lösung:Maleat-Puffer = 1:5) schüttelnd für 5min bei RT inkubiert. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten ebenfalls schüttelnd. Für den Antikörperansatz wurde der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelte Anti-DIG-Antikörper 1:5000 mit Blockierlösung verdünnt, die Membran 5min darin inkubiert, 2x 5min mit Maleat-Puffer gewaschen und 2min mit dem Genius-Puffer III (s. 2.12.1) inkubiert. Dieser Puffer wurde anschließend durch die Farbsubstratlösung (200µl NBT/BCIP Stammlösung (Roche) auf 10ml Genius-Puffer III) ersetzt. Die Farbreaktion erfolgte für ca. 45min im Dunkeln und wurde mit Aqua bidest gestoppt. Die Membran wurde zwischen Filterpapier getrocknet und konnte lichtgeschützt bei RT gelagert werden. Die Konzentrationsberechnung der Sonden erfolgte anhand des Vergleichs mit einem in gleicher Intensität gefärbten „Spot“ der Kontroll-RNA (Prinzip der Färbung s. 2.11).

2.11 *In situ* Hybridisierung (ISH)

Die ISH wurde über vier Tage nach einem geringfügig modifizierten Protokoll von Tabin durchgeführt (modifiziert nach Riddle et al., 1993 und 1995). Soweit nicht anders angegeben, wurde schüttelnd bei RT gearbeitet. Zu Beginn wurden 24-Well-Platten (Greiner) verwendet, welche sich bei den HH10-Embryonen als nachteilig herausstellten. Die Lösungen konnten nur unter einem Binokular gewechselt werden und häufig wurden Embryonen in die Pipette mit eingezogen. Daraufhin wurden 0.5ml Reaktionsgefäße benutzt. In diesen konnten mehrere Embryonen bearbeitet werden. Diese sanken im Reaktionsgefäß ab, was einen Wechsel der Lösungen deutlich erleichterte. Erst für die Färbung und die darauf folgenden Schritte wurden die Embryonen in die 24-Well-Platten überführt und dort bearbeitet.

Die in 100% MethOH gelagerten Embryonen wurden in 5min-Waschschritten über 75%, 50% und 25% MethOH:PBT in PBT überführt, 1h in 6% H₂O₂ gebleicht, 5min mit PBT gewaschen und 15min mit 10µg/ml Proteinase K/PBT (Merck) angedaut. Diese Reaktion wurde mit 2mg/ml Glycin/PBT (Merck) gestoppt. Nach zweimaligem Waschen in PBT wurde mit 4% PFA/0.2% Glutaraldehyd (Merck) in PBT für 20min nachfixiert, 2x mit PBT gewaschen und 1h bei 70°C in Prähybridisierungslösung (s. 2.12.1) inkubiert. Die DIG-markierten RNA-Proben (Sonden) wurden 5min bei 85°C denaturiert. Sie konnten anschließend zur Prähybridisierungslösung oder aber mit frischer Hybridisierungslösung auf die Embryonen gegeben werden. Hybridisiert wurde ü. N. bei 70°C. Nach dem Waschen (3x 30min mit 70°C-warmer Waschlösung I bei 70°C, 3x 30min mit 65°C-warmer Waschlösung III bei 65°C und 3x 5min mit TBST bei RT) wurde mit 10% Schafserum (Sigma, hitzeinaktiviert: 1h bei 55°C) in TBST für 1h geblockt. Bei 4°C folgte eine ü.-N.-Inkubation mit dem Antikörper-Mix (1:2000 Anti-DIG Antikörper:1%Schafserum/TBST). Der Antikörper wurde durch 8maliges Waschen (3x 5min, 5x 1-1.5h) mit TBST-Puffer und einem finalen Schritt ü. N. bei 4°C entfernt. Nach 3maligem Waschen für 10min mit NTMT-Puffer wurde die Farbreaktion mit NBT/BCIP in NTMT (200µl Stammlösung (Roche) auf 10ml) eingeleitet. Diese fand schüttelnd im Dunkeln statt. Ebenfalls im Dunkeln wurde die Farbreaktion durch Waschen in NTMT und PBT (pH 5.5) gestoppt (je 10min), die Embryonen mit 4%PFA/0.1% Glutaraldehyd in PBS für 1h nachfixiert und 2x mit PBT für jeweils 10min gewaschen. Eine Lagerung in PBT war möglich. Zum Klären wurden die „whole mount“-Färbungen über 30%, 50% und 70% in 80% Glycerin/PBT überführt und dunkel bei 4°C gelagert.

Der Nachweis der RNA-RNA-Hybride erfolgt mittels Anti-DIG-alkalische-Phosphatase-Konjugat (Anti-DIG-AP). Dabei wird 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) dephosphoryliert und oxidativ in einen Indigofarbstoff überführt. Nitroblau-Tetrazoliumsalm (NBT) dient als Oxidationsmittel und wird ebenfalls in einen blauen Farbstoff umgewandelt. Farbintensität und Sensitivität der Reaktion werden so erhöht.

2.12 Materialien und Geräte

2.12.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

„(DEPC)“ steht für die Verwendung und/oder den Ansatz mit DEPC-behandeltem Aqua bidest. Das verwandte Aqua bidest hatte eine Leitfähigkeit von $0.055\mu\text{S}/\text{cm}$. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit Reinheitsgrad p. a. verwandt und bei RT gelagert. Die finalen Konzentrationen wurden in eckigen Klammern angegeben.

Ampicillin

Sigma

Stammlösung von 100mg/ml mit autoklaviertem Aqua bidest ansetzen, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.

DEPC-H₂O

1l Aqua bidest

1ml DEPC

Fluka

→ über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend autoklavieren

DNA-Marker

20bp-„Molekular Ruler“ ($0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Biorad

50 „Base-Pair Ladder“ ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Amersham Pharmacia Biotech

100 „Base-Pair Ladder“ ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Amersham Pharmacia Biotech

100bp-„Molekular Ruler“ ($0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Biorad

1kb-„Ladder“ ($500\mu\text{g}/\text{ml}$)

Neb

„SMART-Ladder“

Eurogentec

Entwickler-Lösung (Silberfärbung)

„Long“-Gel („Large“-Gel):

6.25g (12.5g) Na_2CO_3 , wasserfrei

Merck

250 μl (500 μl) 37% Formaldehyd

Merck

250 μl (500 μl) 2% Na-Thiosulfat/Aqua bidest

Merck

ad 200ml (400ml) Aqua bidest

60% Ficoll (w/v)

3g Ficoll (Typ 400)

Sigma

5ml DEPC-H₂O

→ lösen: ca. 4h / 37°C / H₂O-Bad

6x Ficoll-Puffer (ohne Xylencyanol)

200µl Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Promega
100µl 1% Bromphenolblau	Sigma
100µl 60% (w/v) Ficoll (Typ 400)	Sigma

Fixierungs-Lösung (Silberfärbung)

15% EtOH abs.	Merck
5% Essigsäure	Merck
ad xml Aqua bidest	

Genius-Puffer III (pH 9.5) (Dot Blot)

100mM TrisHCl	Sigma
100mM NaCl	Merck
50mM MgCl ₂	Merck
(MgCl ₂ erst kurz vor Gebrauch zugeben, fällt leicht aus)	

Imprägnierungs-Lösung (Silberfärbung)

„Long“-Gel („Large“-Gel):

5% (10%) Glycerin	Merck, Roth
ad 500ml Aqua bidest (w/w)	

IPTG

ICN Biomedicals

Stammlösung von 100mM in Aqua bidest ansetzen, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei –20°C lagern.

Maleat-Puffer (pH 7.5) (Dot Blot)

100mM Maleinsäure	Merck
150mM NaCl	Merck

10x MOPS: (nicht autoklavierbar)

23.1g (N-Morpholino)propansulfonsäure	Merck
in 350ml DEPC-H ₂ O lösen	
80ml 0.5M Na-acetat _(DEPC) (pH 7.0)	Merck
pH 7.0 mit 2N NaOH einstellen	
10ml 0.5M EDTA _(DEPC) (pH 8.0)	Sigma
add 500ml DEPC-H ₂ O	
→ sterilfiltrieren und dunkel lagern; pH 7.0 einstellen	

NTMT-Puffer (frisch ansetzen und filtrieren)

100ml-Ansatz:	
8.2ml Aqua bidest	
1.0ml 1MTrisHCl pH 9.5	Sigma
200µl 5M NaCl	Merck
500µl 1M MgCl ₂	Merck
100µl 100% Tween-20 [1%]	Fluka

10x PBS_(DEPC) (Gebrauchslösung: 1x)

14.4g Na ₂ HPO ₄	Merck
2.4g KH ₂ PO ₄	Merck

80.0g NaCl Merck
 2.0g KCl Merck
 ad 1000ml DEPC-H₂O
 → autoklavieren; pH 7.4

PBT

1x PBS_(DEPC)
 100% Tween-20 [0.1%] Fluka

4% PFA_(DEPC)

4g PFA Merck
 100ml DEPC-H₂O

Modifikationen (ISH):

4% PFA/PBS_(DEPC): Ansatz mit 1x PBS_(DEPC)

4% PFA/PBT_(DEPC): Ansatz mit 1x PBT_(DEPC)

Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung (ISH)

50% Formamid Sigma
 5x SSC, pH 4.5 Sigma
 1% SDS Sigma
 50µg/ml Hefe-tRNA Roche
 50µg/ml Heparin Sigma
 ad xml DEPC-H₂O

Schärfungslösung (Wolframdraht)

71g NaNO₂ Merck
 34g KOH Merck
 ad 100ml Aqua bidest

Silberlösung

„Long“-Gel („Large“-Gel):

5ml (8ml) 5% AgNO₃ Merck
 250µl (400µl) 37% Formaldehyd Merck
 ad 250ml (400ml) Aqua bidest

Stopp-Lösung (Silberfärbung)

2% Glycin Merck
 0.5% EDTA Merck
 ad 1000ml Aqua bidest

5x TBE-Puffer (Agarose-Gele; Gebrauchslösung: 1x)

54.00g Tris Merck
 27.50g Borsäure Sigma
 3.72g Na₂EDTAx2H₂O Merck
 ad 1000ml DEPC-H₂O
 → autoklavieren

10x TBE-Puffer (Sequenziergel; Gebrauchslösung: 1x)

162.0g Tris	Sigma
27.5g Borsäure	Sigma
9.3g EDTA (Na ² ; 2xH ₂ O)	Sigma
ad 1000ml Aqua bidest	

10x TBS

8.0g NaCl	Merck
0.2g KCl	Merck
25ml 1M TrisHCl, pH 7.5	Sigma
75ml DEPC-H ₂ O	

TBST

10x TBS mit DEPC-H₂O auf 1x verdünnen und 100% Tween-20 [1%] (Fluka) dazugeben

TE-Puffer

10M Tris, pH 8.0	Merck
1mM EDTA, pH 8.0	Merck
in Aqua bidest oder DEPC-H ₂ O, je nach Verwendung; pH auf 8.0 einstellen	

X-Gal

Roth

Stammlösung von 40mg/ml in DMF ansetzen, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.

Waschlösung I (ISH)

50ml-Ansatz:	
25.0ml Formamid	Sigma
12.5ml 20x SSC, pH 4.5	Sigma
2.5ml 20% SDS	Sigma
10.0ml DEPC-H ₂ O	

Waschlösung III (ISH)

50ml-Ansatz:	
25.0ml Formamid	Sigma
5.0ml 20x SSC, pH 4.5	Sigma
20.0ml DEPC-H ₂ O	

Weitere Lösungen:

β-Mercaptoethanol	Merck
Chloroform	Merck
Isoamylalkohol	Sigma
Isopropanol	Merck
Natriumhypochlorit 12% (Reinigung: 1%)	Apotheke
Nuklease-freies Wasser	Promega, Qiagen
Tinte, 1:2 mit 1xPBS _{DEPC} verdünnt, autoklaviert	Pelikan
RNase Inhibitor „RNAguard“	Amersham Pharmacia Biotech

2.12.2 Kits

Aufreinigung	QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen
DNA-Isolierung	QIAamp [®] DNA Mini Kit	Qiagen
DNA-Elution (Agarose)	JETsorb QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	Genomed Qiagen
Gelelektrophorese	CleanGel Long-10 CleanGel-Large-10 DNA LongRun Buffer SequaGel [™] XR	ETC ETC ETC Biozym
<i>In vitro</i> -Transkription	DIG RNA Labeling Kit (Sp6/T7)	Roche
Klonierung	TOPO TA Cloning Kit (pCR [®] II-TOPO-Vektor, 3.9kb, Topoisomerase I, TOP10F ['] Zellen) TA Cloning Kit (pCR [®] II-Vektor, 4.0kb, T4 DNA Ligase, TOP10F ['] -Zellen)	Invitrogen Invitrogen
Maxipräparation	QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Minipräparation	QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen
RNA-Isolierung	RNeasy [®] Mini Kit RNase-Free DNase Set	Qiagen Qiagen
Sequenzierung	SequiTherm EXCEL [™] II Long-Read DNA Sequencing Kit	Biozym

2.12.3 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen

gestopft, RNase, DNase-frei:

10µl, 100µl, 200µl, 1000µl

Greiner

2.5µl, 20µl

Biorad

ungestopft:

10µl, 100µl, 200µl, 1000µl

Eppendorf, Sarstedt, Greiner

Reaktionsgefäße

RNase, DNase-frei:

0.5ml, 1.5ml, 0.2ml

Biorad

„normal“:

0.5ml, 1.5ml, 2.0ml; kein safe lock

Sarstedt

0.5ml, 1.5ml, 2.0ml; safe lock

Eppendorf

Allgemeines

Bakterienröhrchen, 15ml, steril

Falcon

Cellstar, 24 well

Greiner

Eier

Brinkschulte

Eierkartons

Brinkschulte

Einmal-Mikropipetten mit Ringmarke (50µl)

Brandt

Filter (Porengröße 30 und 45µm)

Sartorius

Mikropipetten-Halter und Mundstück

Richter Medizintechnik

Kosmetiktücher „astrein“

Igefa

Kryoröhrchen

Brandt

Mundschutz Surgine* Plus

Johnson + Johnson

Pasteur-Pipetten

Brandt

Petrischale (35x10mm)	Greiner
Petrischale (ca. 100x15mm)	Greiner
Plastikpipetten 5ml	Greiner
Plastikpipetten 10ml, 25ml	Falcon
Pur-Zellin	Paul Hartmann
Safeskin-Handschuhe (unsteril)	Kimberley-Clark
Safeskin-Handschuhe, Nitrile (unsteril)	Kimberley-Clark
UVette [®] 220-1600nm (Nuklease-frei)	Eppendorf

2.12.4 Instrumente

Augenschere, gebogen und fein	Hermle
Kanüle Microlance 1.2 x 40	Terumo
Dumont-Pinzetten Nr. 3, 5	Roth
Skalpellklinge Nr. 11	Feather
Spritze (10ml, 20ml)	Amera
Vannasschere, gerade	Hermle
Wolframdraht	MPI Tübingen

2.12.5 Geräte

AUTOKLAVEN

Tischautoklav Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec
Varioklav [®] VI 500 EP Dampfsterilisator	H + P Labortechnik

GELDOKUMENTATION

Grundig Electronics Minerva Kamera	Grundig
Diskus (Version 4.15)	Hilgers über Microvid
Polaroid Stativ	
Rex-Leuchttisch	Messinstrumentebau GmbH
Schutzhelm FOCO-C4	FMN
UV-Tisch, $\lambda = 312\text{nm}$	Rothhaar & Schröder Laborgeräte

GELELEKTROPHORESE

Agarose-Gel-Kammer „Midi“, horizontal (DNA)	Harnischmacher Labortechnik
Agarose-Gel-Kammer „Agagel Mini“ (RNA)	Biometra
Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL	Amersham Pharmacia Biotech
Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL	Amersham Pharmacia Biotech
Microcomputer EPS „CONSORT“	Fröbel Labortechnik
Multiphor II (PAA)	Amersham Pharmacia Biotech
Omnilab Kühlpumpe	National Lab

INKUBATOREN / ÖFEN

Bss-Brutgerät (mit Wendautomatik)	Grumbach/Ehret
Innova 4230 Refrigerated Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
Memmert-Inkubator	Memmert
Unitherm Hybridization Oven 6/12	UniEquip
WTC Binder Brutschrank	WTB Binder Labortechnik

MIKROSKOPIE / OPTIK

Binokular Stemi 2000-C	Zeiss
Binokular Stemi SV6	Zeiss
Elite CHROME Film für Diapositive	Estman Kodak
Kaltlichtleuchte KL 1500 electronic	Schott
Olympus OM 101 Kamera	Olympus

PHOTOMETRIE

Biophotometer	Eppendorf
DPU-414 Thermal Printer	Seiko Instruments Inc.

SEQUENZIERER

dNA Analyser Gene Reader 4200	LI-COR
-------------------------------	--------

STICKSTOFFBEHÄLTER

Dewar-Gefäß	Isotherm über Faust
Flüssig-Stickstoff-Behälter GT 80 (Lagerung)	Faust

THERMOCYCLER

Blockthermosthat BT 200	Kleinfeld Labortechnik
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf
GeneAmp® PCR System 9700 (gedrosselt: 9600)	Perkin Elmer Applied Biosystems
Trio-Thermoblock	Biometra

VERSCHIEDENES

Eismaschine Scotsman AF-1	Scotsman über Faust
Flaming/Brown Micropipette Puller P-87	Sutter Instrument Co.
Hera safe Werkbank Klasse II	Heraeus
Kühlkombination	AEG
Magnetrührer IKAMAG® RH	IKA® Labortechnik
Micromat-Microwelle	AEG
pH-Meter	Knick
Reinstwasseranlage Purelab Plus	USF
Spülmaschine MIELABOR G7783	Miele
Vortex Genie 2	Scientific Industries

WAAGEN

Feinwaage 0.5-3100g	Faust
Feinwaage 1mg-210g	Sartorius

ZENTRIFUGEN

Biofuge 13	Heraeus
Biofuge fresco	Heraeus
Sigma 6K15 Zentrifuge	Sigma

2.12.6 Verzeichnis der Lieferbetriebe

Amersham (Pharmacia) Biosciences	Freiburg, D
Applied Biosystems	Weiterstadt, D
AEGHaugeräte GmbH	Nürnberg, D

BD Clontech Biosciences	Heidelberg, D
Bender & Hobein AG	
Bernhard Hermle GmbH	Tuttlingen, D
Biometra GmbH	Göttingen, D
Biorad	München, D
Biozym	Hessisch-Oldendorf, D
Brinkschulte	Senden
Calbiochem-Novabiochem GmbH	Schwalbach, D
Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, D
Carl Zeiss (Geschäftsbereich Mikroskopie)	Oberkochen, D
Eppendorf AG	Hamburg, D
Estman Kodak Company	New York, U.S.A
ETC Elektrophorese-Technik	Recklinghausen, D
Eurogentec	Köln, D
Faust	Köln, D
Fluka / Riedel de Haën (Sigma-Aldrich Firmengr.)	Deisenhofen, D
Genomed	Bad Oeynhausen, D
Gerhard Fröbel	Lindau, D
Gibco-Life Technologies GmbH	Karlsruhe, D
Greiner Bio-One GmbH	Solingen
Grundig	Nürnberg
H + P Labortechnik	Oberschleißheim, D
Harnischmacher Labortechnik	Arnsbach
ICN Biomedicals GmbH	Eschwege, D
Igefa	Dahlewitz, D
IKA [®] Labortechnik	Staufen, D
Invitrogen life technologies	Paisley, U.K. über Groningen, NL
Isotherm	über Faust
Johnson + Johnson Medical GmbH	Norderstedt, D
Kimberley –Clark	Zaventem, B
Kleinfeld GmbH & Co Labortechnik	Gehrden, D
Knick – Elektronische Meßgeräte	Berlin, D
LI-COR Biosciences GmbH	Bad Homburg, D
Memmert	Schwabach, D
Merck Eurolab GmbH	Bochum, D
Messinstrumentebau GmbH	Erlangen, D
Microvid	Iserlohn-Letmathe, D
Miele & Cie. GmbH & Co	Gütersloh, D
MWG Biotech AG	Ebersberg, D
National Lab GmbH	Mölln, D
NEB (New England Biolabs)	Frankfurt/Main, D
New Brunswick Scientific	Nürtingen, D
Paul Hartmann	Heidenheim, D
Promega	Mannheim, D
Qiagen GmbH	Hilden, D
Roche Diagnostics GmbH / Applied Science	Mannheim, D
Sartorius AG	Göttingen, D
Schott	Wiesbaden
Scientific Industries	über Bender und Hobein AG
Science Products GmbH	Hofheim, D

Scotsman
Seiko Instruments Inc.
Serva Electrophoresis GmbH
Sigma (Sigma-Aldrich Firmengruppe)
Sigma Laborzentrifugen
Sutter Instrument
Systemc GmbH Labor Systemtechnik
Thermo Hybaid (ehemals Interactiva)
USF (USFilter Company) ELGA Seral

Mailand, I
Cambridge, U.K über Amersham
Heidelberg, D
Taufkirchen, D
Osterode am Harz, D
Novato CA, U.S.A. über Science Prod.
Wettenberg, D
Ulm, D
Ransbach-Baumbach, D

3. Ergebnisse

3.1 Präparation

Die individuellen Unterschiede in der Entwicklung der Embryonen spiegelten sich in erheblichen Variationen der entsprechenden Stadien, so dass eine Stadienzuordnung nach HH notwendig war. Der quantitative Erfolg einer Präparationen hing entscheidend von den Bebrütungsparametern ab, die in Vorversuchen bezüglich der Bebrütungstemperatur und Luftfeuchte optimiert wurden. Es wurden nur reine Proben, welche definitiv nur eine Region bzw. einen Pool einer Region repräsentierten, in den nachfolgenden Experimenten verwandt, so dass in diesen das Auftreten falsch positiver Klone / Ergebnisse minimiert werden konnte.

3.2. Probendefinition und -charakterisierung

Aus den Augenanlagen der HH10-Stadien konnte, aufgrund der wenigen Zellen pro Anlage (ca. 2000 Zellen; Romann, persönliche Mitteilung) nur wenig RNA isoliert werden. Deshalb wurden verschiedene Präparationen (unterschiedlicher Tage) einer Region zusammengefasst („gepoolt“). Dabei wurden immer 52-54 Regionen „gepoolt“. Diese „Pools“ bildeten die Grundlage der RNA-Isolierungen, welche anhand ihrer RNA-Mengen und Ratio-Werte miteinander verglichen wurden. Die in Tab. 4-6 aufgeführten RNA-Isolierungen wurden für das Differential Display (DD), die PCRs der Positivkontrollen (PK-PCR) und die PCRs für die Herstellung der Sonden für die *in situ* Hybridisierung (ISH-PCR) ausgewählt. Die Proben wurden mit römischen Ziffern gekennzeichnet und in dieser Bezeichnung für die gesamte Arbeit beibehalten. Es wurden „Parallelproben“ benutzt, um die Wahrscheinlichkeit einer Aussage zu erhöhen und eventuelle Fehler besser zu detektieren. Da besonders die Gene der frühen Augenentwicklung gesucht wurden, wurden zum besseren Vergleich zweimal das Stadium HH10 („HH10 I“, „HH10 II“) und einmal das Stadium HH19 mit den jeweiligen Parallelansätzen (HH10 I/I, HH10 I/II, HH10 II/I usw.) bearbeitet.

Tab. 4: Isolierte total-RNA von Hühnchen-Augenanlagen. Es wurden verschiedene Präparationen zu „Pools“ zusammengefasst. In der folgenden Tabelle sind die Angaben für die „gepoolten“ Regionen für das Stadium **HH10 I** mit seinen Parallelansätzen (I, II) aufgeführt. Abk.: RA: Rechts-anteriore Region; RP: Rechts-posteriore Region; LA: Links-anteriore Region; LP: Links-posteriore Region; HH: Hamburger-Hamilton-Stadium.

Region	Anzahl [Stck.]		RNA-Menge [ng/μl]		Ratio (260nm/280nm)	
	I	II	I	II	I	II
RA	54	52	36.0	37.8	2.03	1.99
RP	54	52	50.9	60.8	2.04	1.91
LA	54	52	39.7	40.8	2.02	2.03
LP	54	52	51.9	48.1	1.72	2.04

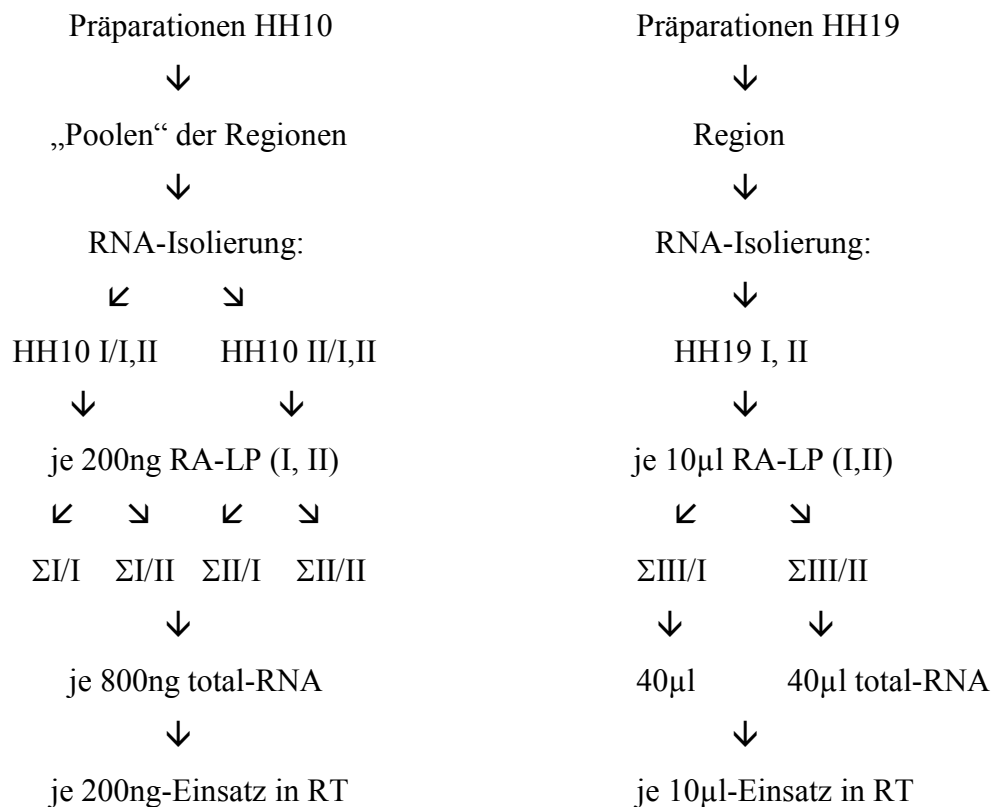
Tab. 5: Isolierte total-RNA von Hühnchen-Augenanlagen. Es wurden verschiedene Präparationen zu „Pools“ zusammengefasst. In der folgenden Tabelle sind die Angaben für die „gepoolten“ Regionen für das Stadium **HH10 II** mit seinen Parallelansätzen (I, II) aufgeführt. Abk.: RA: Rechts-anteriore Region; RP: Rechts-posteriore Region; LA: Links-anteriore Region; LP: Links-posteriore Region; HH: Hamburger-Hamilton-Stadium.

Region	Anzahl [Stck.]		RNA-Menge [ng/μl]		Ratio (260nm/280nm)	
	I	II	I	II	I	II
RA	53	53	29.0	30.6	1.99	1.89
RP	52	53	49.5	55.8	2.03	2.04
LA	52	53	31.3	39.6	2.04	1.60
LP	52	53	33.1	47.8	1.40	1.69

Tab. 6: Isolierte total-RNA von Hühnchen-Augenanlagen. Es wurden verschiedene Präparationen zu „Pools“ zusammengefasst. In der folgenden Tabelle sind die Angaben für die „gepoolten“ Regionen für das Stadium **HH19** mit seinen Parallelansätzen (I, II) aufgeführt. Abk.: RA: Rechts-anteriore Region; RP: Rechts-posteriore Region; LA: Links-anteriore Region; LP: Links-posteriore Region; HH: Hamburger-Hamilton-Stadium.

Region	Anzahl [Stck.]		RNA-Menge [ng/μl]		Ratio (260nm/280nm)	
	I	II	I	II	I	II
RA	1	1	10.4	20.5	1.14	1.19
RP	1	1	4.5	16.7	1.37	1.21
LA	1	1	10.5	18.7	1.27	1.15
LP	1	1	10.7	11.4	1.22	1.24

Um falsch positive Banden in der DD-Analyse zu minimieren, wurde eine weitere Kontrolle eingeführt. Hintergrund war, dass alle Banden, die im Vergleich der Einzelproben eventuell differentiell auftraten, in jedem Fall in einer Probe der gesamten Augenanlage nachzuweisen sein müssten. Um Variationen auszuschließen wurde keine neue RNA isoliert, sondern jeweils 200ng (HH10) bzw. 10 μ l (HH19; aufgrund der geringen Mengen dieser Kompromiss) der in Tab. 4-6 aufgeführten RNA zusammengefasst (s. 2.2.1).



3.2.1 RNA-Gele

Denaturierende RNA-Gele wurden zur Qualitätsprüfung der isolierten RNA anhand der 18S und 28S rRNA angefertigt. Es wurden je Probe 500ng RNA (1:1 mit Auftragspuffer, s. 2.3.1) aufgetragen. Für die RNA-Proben der HH19-Stadien wurde aufgrund der geringen RNA-Mengen kein Gel angefertigt.

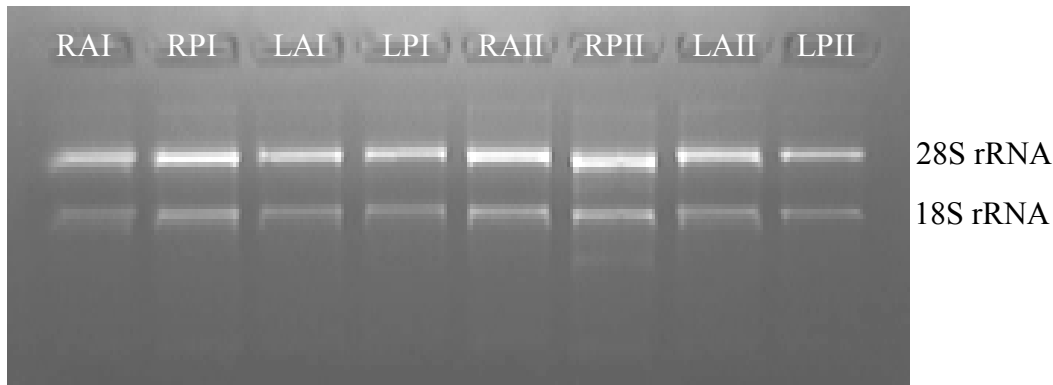


Abb. 2: Denaturierendes RNA-Gel. Aufgetragen sind 500ng total-RNA der Parallelansätze des Stadiums HH10 I (s. Tab. 4). Abk.: RA: Rechts-anteriore Region; RP: Rechts-posteriore Region; LA: Links-anteriore Region; LP: Links-posteriore Region.

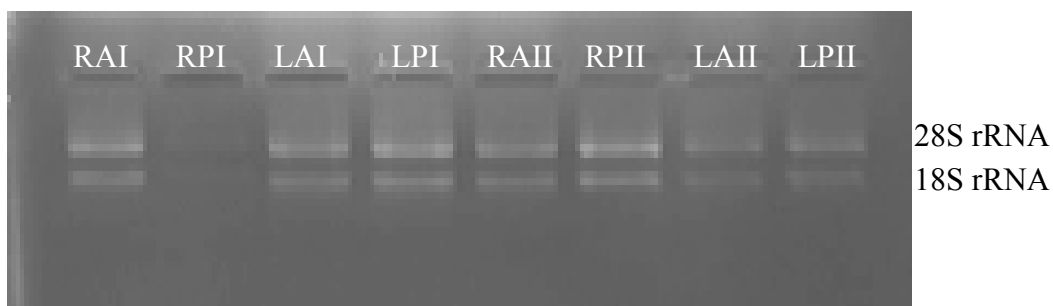


Abb. 3: Denaturierendes RNA-Gel. Aufgetragen sind 500ng total-RNA der Parallelansätze des Stadiums HH10 II (s. Tab. 5). Abk.: RA: Rechts-anteriore Region; RP: Rechts-posteriore Region; LA: Links-anteriore Region; LP: Links-posteriore Region.

3.3 Reverse Transkription (RT)

Aus der Verwendung eines oligo-d(T)-Primers in der RT-Reaktion resultierte ein „Pool“ an poly-A⁺-mRNA-Kopien (cDNA). Durch die RNaseH-Aktivität der verwendeten Reversen Transkriptase wurde ein Abbau nicht umgeschriebener RNA gewährleistet. Eine Aufreinigung der cDNA sollte die Qualität dieser verbessern. Um alle folgenden Reaktion (DD, PK-PCRs, ISH-PCRs) mit ein und derselben cDNA-Probe durchführen zu können, wurde diese 1:10 verdünnt. Anhand der Ergebnisse von Vorversuchen, wurden 6µl dieser cDNA in die DD-Analysen und 2µl in die PCRs (s. 2.4.2, 2.4.3) eingesetzt.

3.4 Differential Display

3.4.1 Negativkontrollen und Optimierung

Die DD-Analyse wurde optimiert, um ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit zu erreichen. Es wurden verschiedene Protokolle getestet (s. 4.2.1) und schließlich modifiziert nach Bauer et al. (1993, 1994) sowie Kociok et al. (1998) gearbeitet. Da Zufalls-Primer unter niedriger Stringenz benutzt wurden, waren immer auch Amplifikationen von DNA-Kontaminationen möglich. Solche unspezifische Produkte wurden in den Negativkontrollen (NK/RT, NK/DD, s. 2.4) als solche erkannt. Selbsthybridisierungen und Fehlbindungen der Primer im DD waren nie auszuschließen, deshalb wurde ein reproduzierbares Muster, je nach Primerkombination, erwartet. Ein solches hätte als Background für ein Primerpaar festgelegt und vom jeweiligen spezifischen Bandenmuster der Proben subtrahiert werden können. Das wurde nicht bestätigt. In den Vorversuchen zeigten die Negativkontrollen verschiedene Bandenmuster, welche sich mit zunehmender Dauer der Experimente immer weniger von denen der Proben unterschieden. Sie waren deshalb unbrauchbar. Die anschließende Optimierung der Reaktion resultierte in reproduzierbaren Negativkontrollen ohne Bandenmuster, so dass das einer Probe als spezifisch definiert werden konnte. Durch den Auftrag der „Parallelproben“ und der Σ -cDNA wurden Falschpositive minimiert bzw. also solche erkannt.

In den Vorversuchen wurden verschiedene Primerkombinationen getestet. Dabei zeigte sich, dass einige Primerpaare besser als andere, einige gar nicht funktionierten. Deshalb wurde eine Auswahl an Primern getroffen (s. 2.4.2.2). Alle Proben (inklusive Σ) wurden mit diesen Primerkombinationen amplifiziert und die Gele miteinander verglichen. Unterschiede im Bandenmuster verschiedener Proben (Stadien und Regionen) wurden als potentiell differentiell exprimierte Gene betrachtet. Ihre Banden wurden markiert und weiter bearbeitet.

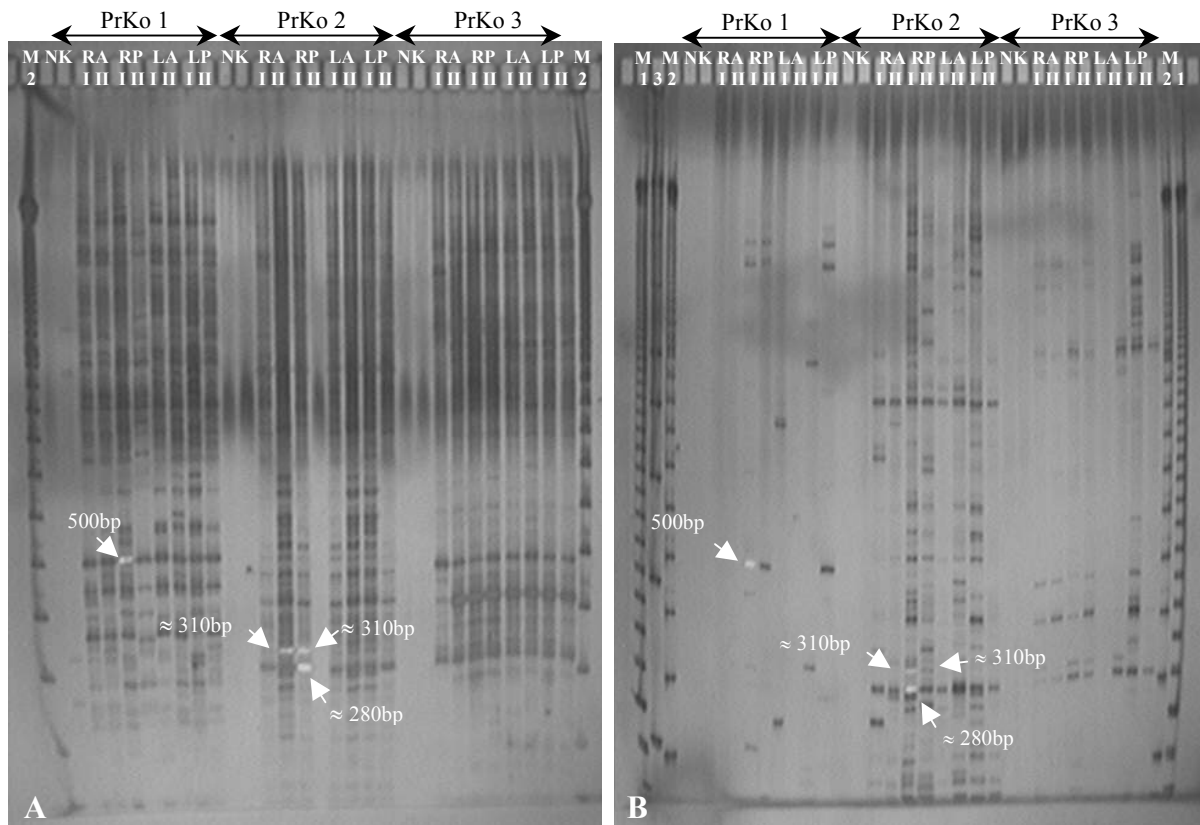


Abb. 4: Zwei silbergefärbte Polyacrylamid-Gele. Aufgetragen sind Proben der Stadien HH10 I (A) und HH19 (B) mit drei verschiedenen Primerkombinationen (PrKo 1-3). Die Parallelansätze einer Region (I, II) wurden nebeneinander aufgetragen. Zu beachten ist, dass sich beide Gele von der Probenauftrennung, d. h., der Anzahl der Banden stark unterscheiden. Die Pfeilspitzen markieren drei Banden verschiedener Größe, z. T. bereits ausgeschnitten. Zwei Reverenzbanden lagen in beiden Gelen bei 500bp (RPI) und ≈ 280 bp (RPI). Außerdem ist sichtbar, dass die Bande bei ≈ 310 bp in den Stadien in verschiedenen Regionen auftrat (HH10 I: RAI, RPI; HH19: RPI, II). In (A) ist weiterhin ein Totalausfall bei RPII der PrKo 2 sichtbar. Die Silberfärbung wurde immer nach empirischen Beurteilungskriterien gestoppt, so dass eine unterschiedliche Hintergrundfärbung nicht zu vermeiden war. Abk.: HH: Hamburger-Hamilton-Stadium; RA: Rechts-anteriore Region; RP: Rechts-posteriore Region; LA: Links-anteriore Region; LP: Links-posteriore Region; M1: 50bp-Marker; M2: 100bp-Marker; M3: „SMART-Ladder“ (s. 2.3.2); NK: Negativkontrolle; PrKo: Primerkombination; I, II: Parallelansätze.

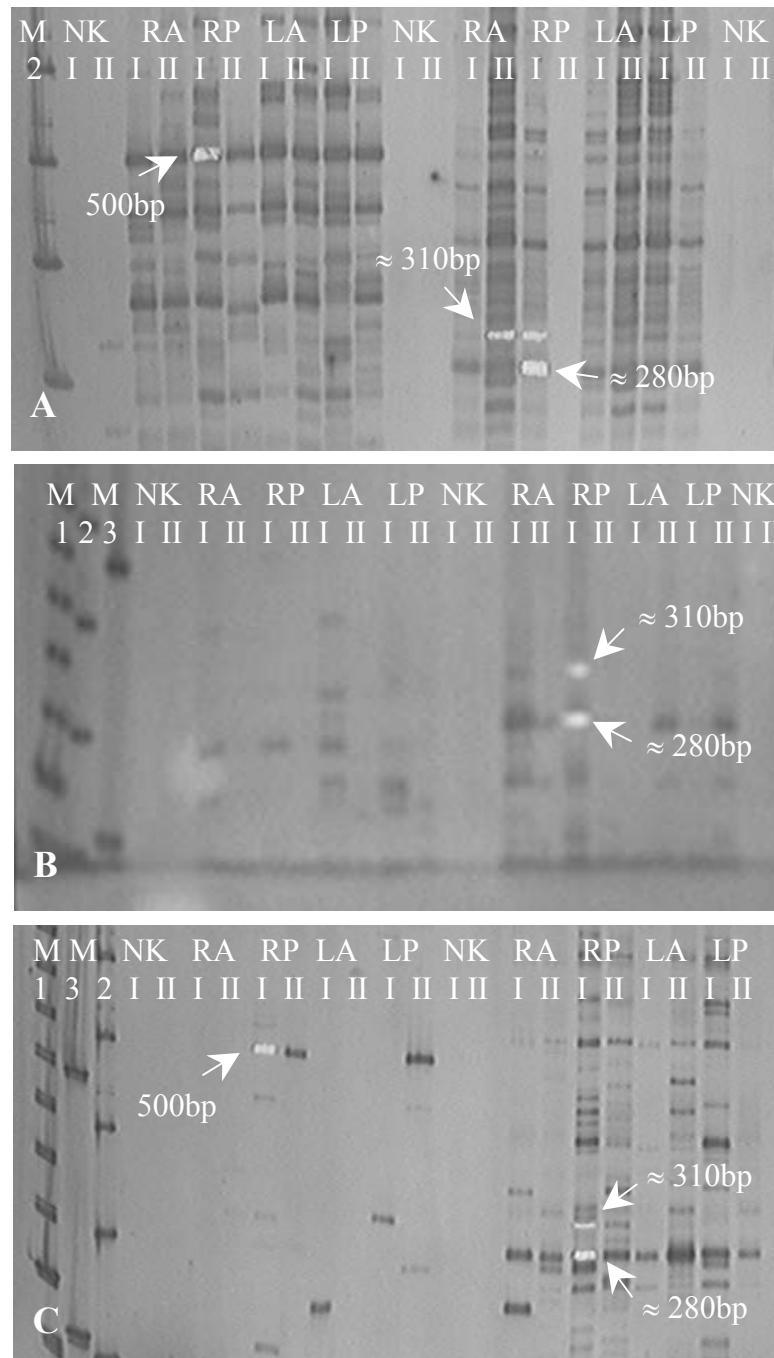


Abb. 5: Vergleich von silbergefärbten PAA-Gel-Ausschnitten. Dargestellt wurde der Bereich von 200-650bp der gleichen Primerkombinationen für folgende Proben: (A): Stadium HH10 I; (B): Stadium HH10 II und (C): Stadium HH19. Die Abb. (A) und (C) geben einen fokussierten Ausschnitt der Abb. 4 (A) und (B) wieder. Einige Banden wurden bereits ausgeschnitten. Abk.: HH: Hamburger-Hamilton-Stadium; RA: Rechts-anteriore Region; RP: Rechts-posteriore Region; LA: Links-anteriore Region; LP: Links-posteriore Region; M1: 50bp-Marker; M2: 100bp-Marker; M3: „SMART-Ladder“ (s. 2.3.2); NK: Negativkontrolle; PrKo: Primerkombination; I, II: Parallelansätze.

3.4.2 Vergleich der Bandenmuster

Bis zur Überprüfung durch PCR und ISH wurden alle Unterschiede im Bandenmuster als „potentiell“ angesehen. Diese Verschiedenheit äußerte sich in einer unterschiedlich starken Färbung der Banden bzw. deren Abwesenheit und wurde als „schwächer“ oder „abreguliert“ bzw. „stärker“ und „hochreguliert“ beschrieben. Diese Formulierung wurde als Vereinfachung angesehen, da die DD-PCR und die anschließende elektrophoretische Auftrennung im PAA-Gel unter semiquantitativen Bedingungen erfolgte und nur vorsichtige Aussagen zuließ.

Bei allen Primerkombinationen wurden Unterschiede im Bandenmuster festgestellt. Diese bezogen sich auf die Stadien (HH10, HH19) und die verschiedenen Regionen (z. B. RP/HH19), oder sie konnten in den Σ -Proben detektiert werden. Insgesamt wurden 85 Banden als potentiell differentiell markiert. In Tab. 7 wurden sie den Stadien (HH10, HH19) und Regionen zahlenmäßig zugeordnet. Dabei wurde eine weitere Vereinfachung vorgenommen: häufig unterschieden sich die Regionen nur in ihrer Zuordnung zu „Rechts“ (R), „Links“ (L), „Anterior“ (A) oder „Posterior“ (P) und wurden dementsprechend zusammengefasst. Ebenso vereint wurden die Stadien HH10 I und HH10 II mit ihren Parallelproben. In Tab. 7 nicht erfasst wurden 11 Banden, welche sich zwischen den beiden HH10-Ansätzen unterschieden und auf falsch positive Banden hindeuteten. Interessant waren Banden, die sich zwischen HH10 und HH19 nicht unterschieden, sondern in beiden Stadien entweder hoch-, oder abreguliert erschienen (4. Spalte der Tab.7).

Tab. 7: Dargestellt wurde die unterschiedliche Verteilung der als potentiell differentiell markierten Banden. Die Spezifizierung hatte Vorrang vor der Verinfachung: eine gezählte Bande „RP“ wurde nicht mehr in „R“ oder „P“ erfasst. Abk.: R: gesamte rechte Augenanlage; RA: Rechte-anteriore Region; RP: Rechte-posteriore Region; L: gesamte linke Augenanlage; LA: Linke-anteriore Region; LP: Linke-posteriore Region; A: Anteriore Region (unabhängig von R oder L); P: Posteriore Region (unabhängig von R oder L); Abreguliert: Banden waren schwächer gefärbt; Negativ: Banden traten in einem Stadium nicht auf.

Region	HH10	HH19	HH10 und HH19
R	-	7	2
RA	-	2	1
RP	1	7	1
L	-	6	-
LA	-	1	-
LP	-	1	-
A	1	3	-
P	2	19	2
abreguliert	7	5	-
negativ	6	-	-

Σ -Proben

Im Vergleich dieser Proben wurden 29 Banden erfasst, die entweder bei Stadium HH10 oder bei HH19 auftraten, bzw. deutlich schwächer oder stärker exprimiert wurden. So wurden 19 Banden bei HH10 gegenüber 10 Banden bei HH19 gezählt, die allein oder zumindest deutlich stärker auftraten.

Durch eine zeitliche Limitierung und der angestrebten sekundären Überprüfung der ersten Ergebnisse durch die ISH, wurden von den 85 potentiell differentiellen Banden 37 ausgeschnitten, aus denen die DNA extrahiert, reamplifiziert und kloniert werden sollte. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Reamplifikation (s. 4.2.1.4) wurden nur 23 dieser Proben sequenziert und mit Hilfe des Programmes „BLAST“ analysiert (s. 2.8.3, 2.8.3.1).

3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

3.5.1 Positivkontrollen

Die Positivkontrollen wurden zur Überprüfung und Kontrolle der verschiedenen Methoden und Techniken durchgeführt. Deshalb wurde die cDNA verwendet, die auch in die DD-Analyse eingesetzt wurde. Es wurden Gene ausgewählt, die in beiden Stadien während der Augenentwicklung exprimiert wurden: CBF-1 („Chicken Brain Factor 1“), CBF-2 („Chicken Brain Factor 2“), Pax-6 und β -Aktin. CBF-1 wird in der nasalen Retina, dem retinalen Pigmentepithel (RPE) und dem Telencephalon exprimiert, während CBF-2 die temporale Retina mit assoziiertem RPE und partiellem Diencephalon spezifiziert. Pax-6 wird im Linsenvesikel, der Retina und im RPE, das „housekeeping“ Gen β -Aktin ubiquitär exprimiert (s. 4.3.2.1).

Der Nachweis von β -Aktin bot gleichzeitig die Möglichkeit, die Proben auf DNA-Kontaminationen zu testen, da die Primer Exon-übergreifend ausgewählt wurden. Das Produkt auf mRNA-Ebene lag bei 335bp, auf DNA-Ebene bei 640bp (s. 2.4.3, Tab. 1).

Die Sequenzen wurden in der Datenbank des NCBI recherchiert, die Primerkombinationen mit der MacVector-Software (s. 2.4.4) ermittelt und die PCRs anhand genomischer DNA optimiert.

Die in Abb. 6 dargestellten Agarose-Gele zeigen die Nachweise mittels PCR für β -Aktin, Pax-6, CBF-1 und CBF-2. β -Aktin wurde, wie erwartet, in allen Regionen auf gleichem Level exprimiert. Pax-6 wurde in den Stadien HH10 I und HH10 II etwa gleich stark exprimiert, im älteren Stadium HH19 scheint die Expression dagegen vermindert. Überraschend war der gleichmäßige Nachweis von CBF-1, welches eigentlich anterior-spezifisch exprimiert wird. In Stadium HH19 war ebenfalls eine etwas schwächere Expression im Vergleich zu den HH10-Stadien auszumachen. Leichte Unterschiede zwischen den anterioren und posterioren Regionen konnte man dagegen bei CBF-2 erkennen. Hier waren etwas stärkere Banden in den meisten posterioren Regionen zu finden. Diese nicht eindeutig auf posteriore Regionen zuzuordnende CBF-2-Aktivität wird als Bestätigung einer Gradienten-Expression gewertet.

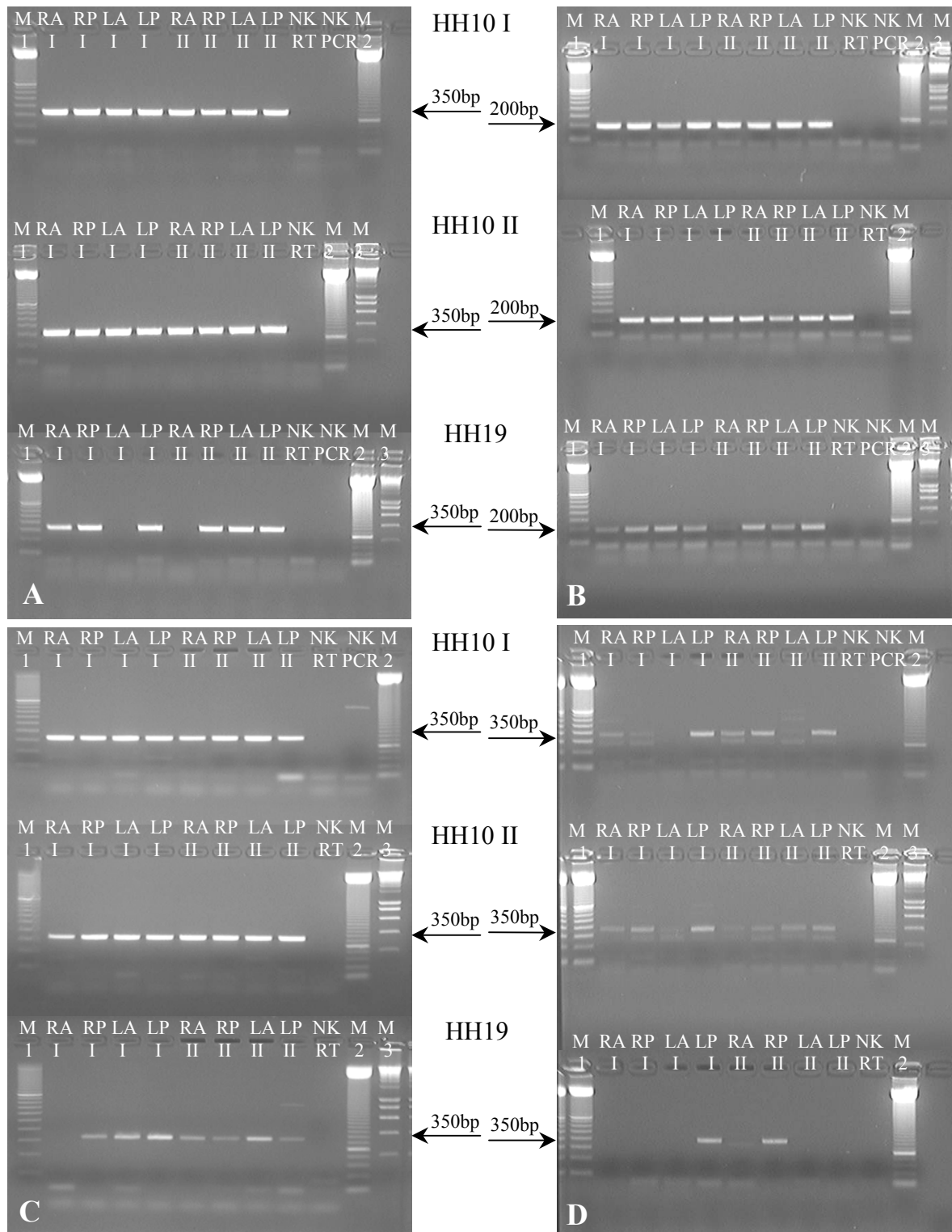


Abb. 6: Überprüfung und Analyse der DD-cDNA anhand der Positivkontrollen auf 1.5% Agarose-Gelen. Nachweise von β -Aktin (A) bei 335bp, Pax-6 (B) bei 203bp, CBF-1 (C) bei 327bp und CBF-2 (D) bei 370bp. β -Aktin und Pax-6 werden in allen Regionen beider Stadien (Ausnahmen: Pipettierfehler) exprimiert. CBF-1 wird nicht ausschließlich nasal und CBF-2 nicht ausschließlich temporal exprimiert, sondern gradiert entlang der naso-temporalen Achse, was die Nachweise in fast allen Regionen und die ungleiche Bandenstärke erklärt. Alle Proben waren frei von genomischer DNA, wie der β -Aktin-Nachweis zeigte (s. o.). Abk.: RA: Rechts-anteriore

Region; RP: Rechts-posteriore Region; LA: Links-anteriore Region; LP: Links-posteriore Region; I, II: Parallelansätze; NK-RT: Negativkontrolle der RT-Reaktion; NK-PCR: Negativkontrolle der PCR; M1: 100bp-Marker, M2: 50bp-Marker, M3: „SMART“-Ladder (s. 2.3.2).

3.5.2 Reamplifikationen

Bei den Reamplifikationen zeigte sich, dass jede Bande im PAA-Gel genau genommen einer DNA-Population (d. h. DNAs ähnlicher Größe) entsprach. Außerdem war eine Reamplifikationen nur im Bereich von 150-550bp erfolgreich (s. 3.6.1). Nach Vorversuchen und Optimierung der PCR-Bedingungen bewährte sich eine „Touchdown“-PCR (TD-PCR, s. 2.4.2.2). Bei dieser TD-PCR entstanden v. a. „Amplikon“ und nur wenige Artefakte. Die niedrige „Annealing“-Temperatur (T_m) der DD-Analyse und die kurzen Zufalls-Primer führten zu Fehlhybridisierungen. Die TD-PCR wurde so eingestellt, dass ein Produkt, in der Größe der ausgeschnittenen DD-PAA-Bande, deutlich stärker amplifiziert wurde (s. Abb. 7). Diese Bande konnte ausgeschnitten, kloniert, sequenziert und für eine *in vitro* Transkription mit anschließender ISH weiter verwendet werden.

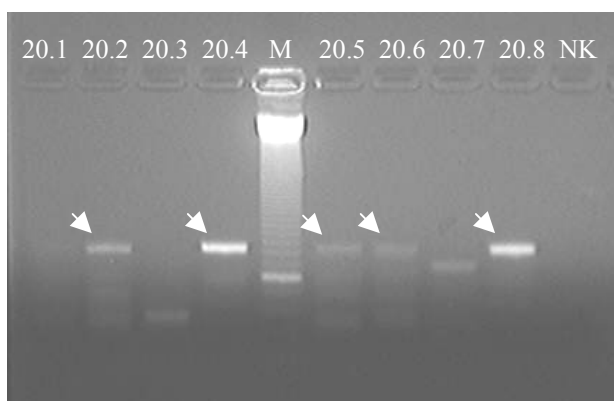


Abb. 7: Reamplifikation einer DD-PAA-Bande (≈ 430 bp), 1.5% Agarose-Gel unter UV-Licht. Der Einsatz einer Population verschiedener DNAs (gebunden in der ausgeschnittenen PAA-Bande) und einer niedrig stringenten Reamplifikation resultierte in einem unspezifischen Produktmuster, welches jedoch eine Bande im gesuchten („ursprünglichen“) Größenbereich dominierte. Diese hatte eine Größe von ≈ 430 bp (verschieden intensiv zwischen den Proben) und war bei 5 von 8 Proben sichtbar (Pfeile). Nach einem zweiten Gellauf wurde die entsprechende Bande „blind“ ausgeschnitten (s. 2.2.3), die DNA extrahiert, kloniert, sequenziert und mit „BLAST“ analysiert. Abk.: NK: Negativkontrolle der Reaktion; M: 50bp-Marker; Nummern: verschiedene Klone einer Probe.

3.6 DNA-Extraktionen

3.6.1 DNA-Isolierungen

DNA wurde mittels verschiedener Verfahren kontrolliert und isoliert (s. 2.2.3, 2.2.5, 2.6, 2.7.2). In Tab. 8 wird ein kurzer Überblick über die verwandten Methoden und die Konzentration der erhaltenen DNA gegeben.

Tab. 8: Kurzer Überblick zu den verschiedenen Methoden der DNA-Isolierung, welche in der vorliegenden Arbeit benutzt wurden. Aufgeführt wurden die durchschnittlich isolierten DNA-Mengen und deren Ratio-Werte (260nm/280nm).

Methode	DNA-Menge [ng/μl]	Ratio (260nm/280nm)
Elution aus Agarose-Gelen:		
Reamplifikation	7.5 - 480	1.1 - 1.2
Amplifikation	10 - 200	1.0 - 1.1
Plasmid-Minipräparation	150 - 400	1.8 - 1.9
Plasmid-Maxipräparation	700 - 8600	1.8 - 1.9
Phenol-Chloroform-Extraktion	700 - 5600	1.8 - 2.0
Isolierung aus Kontrollgewebe	60 - 100	1.9 - 2.1

3.6.2 DNA-Extraktion aus PAA-Gelen

Die isolierte DNA wurde nur in Vorversuchen photometrisch vermessen. Die Mengen und Ratio-Werte (260nm/280nm) variierten z. T. stark. Da nur 10μl Eluat zur Verfügung standen (s. 2.2.4), wurde in den hier beschriebenen Analysen auf eine Vermessung verzichtet, die DNA 1:10 verdünnt und direkt in die Reamplifikation eingesetzt. Diese Technik wurde anhand des „housekeeping“ Gens β-Aktin (einschließlich Sequenzierung) optimiert und überprüft.

Die eluierte DNA wurde nicht direkt in einen Vektor kloniert, sondern zuerst reamplifiziert. Das bot die Möglichkeit, die Größe der isolierten DNA auf einem Agarose-Gel zu überprüfen und gleichzeitig aufzureinigen, denn es wurden neben Einzelbanden auch multiple und Doppelbanden beobachtet. In den letzten beiden Fällen wurde entweder die Bande im gesuchten Bereich ausgeschnitten oder es wurden, häufig bei Doppelbanden, beide Fragmente isoliert. Nur selten konnten Banden bis zu einer Größe von 550bp isoliert und reamplifiziert

werden. Der besser zu bearbeitende Größenbereich lag zwischen 200 und 400bp. Die optimale Größe (ohne exakte Gründe zu benennen) gab die Firma GenHunter (DD-Kits, Nashville, U.S.A) mit 200-600bp an, mit dem Hinweis, dass auch Reamplifikationen außerhalb dieses Bereiches möglich seien. Alle Versuche, eine erfolgreiche Reamplifikation ab 600bp durchzuführen, d. h. auch das Reamplifikationsprodukt lag in diesem Größenbereich, schlugen fehl.

3.7 Sequenzierungen

Es wurden 23 Proben sequenziert und mit Hilfe des Programmes „BLAST“ analysiert (s. 2.8.3.1). Zwölf Proben zeigten nur Homologien zu Bakterien, verschiedenen Plasmiden oder wurden aufgrund der großen Wahrscheinlichkeitswerte als nicht homolog eingestuft. Diese Sequenzen wurden nicht näher untersucht (s. 4.3.2.2). Während der Analyse wurde festgestellt, dass sich die sequenzierten Proben in ihrer Größe von den ursprünglich ausgeschnittenen Banden des PAA-Gels der DD-Analyse unterschieden (s. Tab. 9). Die Hauptursache dafür ist eine ungenaue Größenzuordnung anhand der Marker im PAA-Gel. Die deutlichen Unterschiede bei Probe 8 und 22 können in einem Verlust an DNA durch die verschiedenen Arbeitsschritte begründet liegen. Wahrscheinlich ist ebenfalls, dass DNAs verschiedener Größe durch Co-Migration im PAA-Gel in einer Bande repräsentiert und zusammen ausgeschnitten sowie eluiert wurden. Durch eine Selektion im Agarose-Gel nach der Reamplifikation konnten sie z. T. separiert werden.

Tab. 9: Zusammenfassung der Proben, welche als potentiell differenziert eingestuft bzw. als Kontrolle benutzt und deshalb sequenziert wurden. Aufgeführt sind ausschließlich die Proben, die zu einem Ergebnis in der „BLAST“-Analyse führten (s. Tab. 10). Abk.: HH: Hamburger-Hamilton-Stadium; P: Posterior; R: Rechts; RP: Rechts-posteriore Region

Proben-Nr.	Beobachtung im PAA-Gel	Größe im PAA-Gel	Größe nach der Sequenzierung
β-Aktin	Positivkontrolle	335bp	337bp
2	Abregulation in HH19, dort nur RP vorkommend	310-330bp	271bp
6	Hochregulation in HH19, dort deutlich stärkere Banden	290bp	249bp
8	Abregulation in HH19, dort deutlich schwächere Banden	410bp	325bp

13	In allen Stadien ausschließlich RA vorkommend	380bp	334bp
14	In allen Stadien vorhanden; wurde als zusätzliche Kontrolle eines zuvor nicht bekannten Gens verstanden (im Gegensatz zu β -Aktin)	300bp	284bp
19	Abregulation in HH19, dort nur RP vorkommend	290bp	257bp
20	Abregulation in HH19, dort nur P vorkommend	430bp	367bp
21	In allen Stadien ausschließlich R vorkommend	480bp	444bp
22	In allen Stadien ausschließlich P vorkommend	650bp	511bp
23	In allen Stadien ausschließlich P vorkommend	450bp	483bp
24	Abregulation in HH19, dort nur R vorkommend	380bp	395bp

Es ist zu erkennen, dass besonders im Stadium HH19 eine Abregulation von Genen aufzutreten scheint. Dabei ist zu beachten, dass weder alle Primerkombinationen verwandt noch alle potentiell differentiellen Banden ausgeschnitten und untersucht wurden (s. 3.4.2).

An dieser Stelle soll kurz die Verwendung von „Probe“ und „Klon“ in dieser Arbeit erklärt werden. Die eluierte DNA aus einer als differentiell identifizierten Bande wurde als „Probe“ bezeichnet und als solche, nach einer Reamplifikation, in den TOPO[®]-Vektor kloniert. Etwa 5-10 Kolonien wurden in einer Flüssigkultur vermehrt (s. 2.5.4) und nach einer Maxipräparation sequenziert. Ergab die Sequenzierung dieser DNAs unterschiedliche Ergebnisse, wurden diese aufgeführt und im vorliegenden Fall als „Klon“ einer „Probe“ bezeichnet (s. Tab. 10: 23.1-23.3). Die Ursache dafür kann zum einen in einer fehlerhaften Sequenzierung, zum anderen in einer Sammlung verschiedener DNAs gleicher Größe in einer Bande liegen. Eine Reamplifikation und anschließende Aufreinigung über ein Agarose-Gel muss nicht in einer Separation dieser DNA resultieren (s. 4.2.1.4).

Die einzelnen Sequenzen wurden zunächst mit Hilfe der NCBI-Datenbank analysiert. Die Ergebnisse waren oft unbefriedigend, da keine oder nur sehr geringe Homologien zum Hühnchengenom gefunden werden konnten. Aufgrund der großen Wahrscheinlichkeitswerte der „BLAST“-Analyse, wurden die verschiedenen Gene noch mit einer ISH untersucht. Die BBSRC-EST-Datenbank mit ihrer „BLAST“-Analyse wurde erst im Januar 2003 zugänglich, nachdem die Arbeiten zu dem vorliegenden Projekt abgeschlossen waren. Alle Proben und Klone mit bis dahin positivem Ergebnis nach der NCBI-Recherche (s. Tab. 9, 10) wurden

noch einmal in dieser Datenbank analysiert. Mit Hilfe dieser zweiten Untersuchung konnten Aussagen darüber getroffen werden, ob die sequenzierten Klone tatsächlich einer Hühnchen-mRNA entsprechen.

Die Ergebnisse beider „BLAST“-Analysen wurden in Tab. 10 dargestellt. Dabei wurden auch Proben und Klone aufgeführt, die nur geringe bzw. keine Homologien zu bekannten Genen aufwiesen, trotzdem jedoch später weiter bearbeitet wurden. Die genauen Sequenzvergleiche sind unter 8.8 aufgeführt.

Tab. 10: Ergebnisse der „BLAST“-Analysen der potentiell differentiellen Proben und Kontrollen. Die Probennummern entsprechen denen in Tab. 9. Aufgeführt sind die Ergebnisse der NCBI- und der BBSRC-EST-Recherche. Es wurde die der jeweiligen Datenbank entsprechende Identifikations-Nummer des Gens oder Klon, die Kurzbeschreibung des Klon, die Wertung („Score“: Ähnlichkeit der Sequenzen) und der Wahrscheinlichkeitswert („E-Value“) angegeben. Abk.: E-Value: „Expectation value“; gi: „Genebank identifier“; si: „Sequence identifier“.

Proben-Nr.	Ergebnisse der „BLAST“-Analyse der NCBI-Datenbank	Ergebnisse der „BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank
β -Aktin	gi 211236 gb L08165.1 CHKBACTN Gallus gallus beta-actin mRNA, complete cds Score = 666 bits (336), E-Value = 0.0	si: 603004187F1 cloneID='ChEST19m21' stage_20-21_whole_chick_embryos ACTIN, Cytoplasmatic 1 (Beta-Actin) Score = 666 bits (336), E-Value = 0.0
2	gi 7330334 ref NM_013943.1 Homo sapiens chloride intracellular channel 4 (CLIC4), mRNA Score = 218 bits (110), E-Value = 3e-54	si: 603121019F1 cloneID='ChEST82f5' stage_36_heads CHLORINE Channel Protein 64 Score = 454 bits (229), E-Value = e-126
6	gi 508798 gb U10526.1 AH005411S11 Homo sapiens Human DNA polymerase beta gene, exon 14, complete cds Score = 71.9 bits (36), E-Value = 4e-10	si: 603481352F1 cloneID='ChEST369g13' stage_36_limbs DNA Polymerase Beta (EC 2.7.7.7) Score = 159 bits (80), E-Value = 7e-38
8	gi 24046427 ref NG_001516.1 Mus musculus SMT3 (supressor of mif two, 3) homolog 2, pseudogene 4 (S. cerevisiae) (Smt3h2-ps4) Score = 174 bits (88), E-Value = 5e-41	si: 603234686F1 cloneID='ChEST235122' Chondrocytes No BLAST hits found for 603234686F1 Score = 591 bits (298), E-Value = e-168
13	gi 4092493 gb AF067824.1 AF067824 Mus musculus clone SMT3B-g1/mSMT3 SMT3B pseudogene, complete sequence Score = 174 bits (88), E-Value = 5e-41	si: 603234686F1 cloneID='ChEST235122' Chondrocytes No BLAST hits found for 603234686F1 Score = 551 bits (278), E-Value = e-156

14	gi 24046427 ref NG_001516.1 Mus musculus SMT3 (supressor of mif two, 3) homolog 2, pseudogene 4 (S. cerevisiae) (Smt3h2-ps4) Score = 180 bits (91), E-Value = 8e-43	si: 603234686F1 cloneID='ChEST235122' Chondrocytes No BLAST hits found for 603234686F1 Score = 583 bits (2), E-Value = e-165
19	gi 7108354 ref NM_006769.2 Homo sapiens LIM domain only 4 (LMO4), mRNA Score = 391 bits (197), E-Value = e-106	si: 603487625F1 cloneID='ChEST384b7' stage_36_heads LIM Domain Only 4. Score = 464 bits (234), E-Value = e-129
20	gi 263999 gb S53164.1 S53164 alpha B-crystallin [chickens, lens epithelial cells, mRNA, 1251 nt] Score = 38.2 bits (19), E-Value = 9.1	si: 603505842F1 cloneID='ChEST430c12' stage_22_limbs No BLAST hits found for 603505842F1 Score = 664 bits (335), E-Value = 0.0
21	gi 27707477 ref XM_217587.1 Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 1500019M23 [Mus musculus] (LOC302500), mRNA Score = 228 bits (115), E-Value = 5e-57	si: 603525943F1 cloneID='ChEST472f12' adult_brain_- _cerebellum RIKEN cDNA 1500019M23 Gene. Score = 718 bits (362), E-Value = 0.0
22	gi 577045 emb X82799.1 GRR45A1 G.gallus repeat region (clone 45A1) Score = 58.0 bits (29), E-Value = 1e-05	si: 603764781F1 cloneID='ChEST688b21' chicken_ovary No BLAST hits found for 603764781F1 Score = 198 bits (100), E-Value = 2e-49
23.1	gi 4584404 emb AJ012220.1 GGA012220 Gallus gallus ip3ka gene, exons A to D and alternative partial transcripts Score = 56.0 bits (28), E-Value = 5e-05	si: 603408052F1 cloneID='ChEST320h13' stage_22_heads No BLAST hits found for 603408052F1 Score = 79.8 bits (40), E-Value = 1e-13
23.2	gi 5733119 gb AF176086.1 AF176086 Gallus gallus NUMB mRNA, complete cds Score = 266 bits (134), E-Value = 4e-68	si: 603469293F1 cloneID='ChEST342j23' Chondrocytes No BLAST hits found for 603469293F1 Score = 266 bits (134), E-Value = 1e-69
23.3	gi 1027493 dbj D76434.1 D76433S2 Chicken gene for transcriptional repressor deltaEF1, exon2-exon9 and complete cds Score = 50.1 bits (25), E-Value = 0.003	603408052F1 cloneID='ChEST320h13' stage_22_heads No BLAST hits found for 603408052F1 Score = 79.8 bits (40), E-Value = 9e-14
24	gi 4584404 emb AJ012220.1 GGA012220 Gallus gallus ip3ka gene, exons A to D and alternative partial transcripts Score = 38.2 bits (19), E-Value = 8.5	si: 603949263F1 cloneID='ChEST906n15' stage_20- 21_whole_chick_embryos No BLAST hits found for 603949263F1 Score = 56.0 bits (28), E-Value = 1e-06

Im Vergleich beider Datenbanken wird deutlich, dass die „BLAST“-Analyse des NCBI häufig nur große Wahrscheinlichkeitswerte bei mittlerer Ähnlichkeit der Sequenz ergab. Dagegen waren die Wahrscheinlichkeitswerte nach dem BBSRC-EST-Datenbank Vergleich fast immer

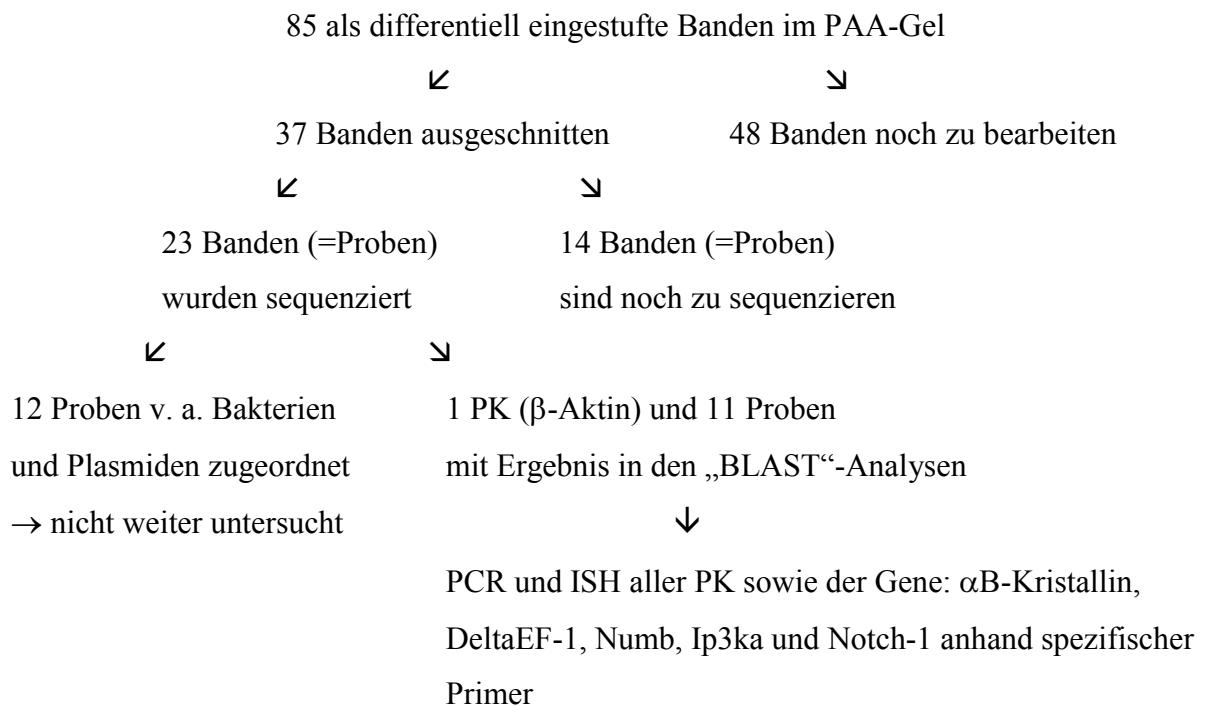
kleiner und die Sequenzähnlichkeiten größer (s. dazu 8.8). Bei den Proben 8 und 14 wurde die gleiche Gen-Identifikationsnummer (gi) ermittelt, d. h. es wurde dasselbe Gen sequenziert. Die Überlappung der beiden Sequenzen beträgt fast 100% (s. 8.8.4, 8.8.6). Anhand der „BLAST“-Analyse der EST-Datenbank wurde beiden Sequenzen der gleiche Klon zugeordnet. Das bedeutet: (1) die Proben 8 und 14 repräsentieren ein und dasselbe Gen; (2) es wurde als differentiell und nicht differentiell beobachtet (s. Tab. 9). Es ist wahrscheinlich, dass Probe 8 eine falsch-positive Bande repräsentierte. Um dies jedoch genau einschätzen zu können, sollte eine PCR mit spezifischen Primern und eventuell eine ISH durchgeführt werden, was aus zeitlichen Gründen in der vorliegenden Arbeit unterblieb. Für den Klon 23.1 und der Probe 24 wurde ebenfalls dasselbe Gen ermittelt, jedoch ist der Wahrscheinlichkeitswert bei Probe 24 sehr groß. Beide Sequenzen wurden nach der „BLAST“-Analyse der EST-Datenbank verschiedenen Hühnchensequenzen zugeordnet, wobei auch hier die Wahrscheinlichkeitswerte noch relativ groß sind, weshalb die Aussagen als sehr unsicher zu betrachten sind.

Aufgrund der ähnlichen Aussagen in der DD-Analyse und der Tatsache, dass mit Hilfe der Ergebnisse der „BLAST“-Analyse der NCBI-Datenbank verschiedene Klone einer Probe unterschiedlichen Genen zugeordnet wurden (s. Tab. 10), wurden diese Klone miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Sequenzen der Klone 23.1, 23.2 und 23.3 eine 98-100%ige Homologie zueinander aufwiesen. Das bedeutet, dass die gleiche Sequenz unterschiedlichen Genen zugeordnet wurde (s. Tab. 10). Gleichzeitig wiesen die Sequenzen der Klone 23.1 und 24 eine 51%ige Homologie auf. Der große Wahrscheinlichkeitswert von Probe 24 lässt jedoch nur den Schluss zu, dass die Zuordnung zu dem Gen Ip3ka zufällig und nicht auf Homologie basierend erfolgte. Das Gleiche gilt für die Probe 20.

Aufgrund der Sequenzhomologien zwischen den Klonen aber der unterschiedlichen Zuordnung zu den Genen der Datenbanken wurde beschlossen, diese näher zu untersuchen (zu diesem Zeitpunkt war die BBSRC-EST-Datenbank noch nicht verfügbar). Es wurden die Gene α B-Kristallin (Probe 20), Ip3ka (Proben 23.1, 24), Numb (Probe 23.2) und DeltaEF-1 (Probe 23.3) ausgewählt, um sie durch eine ISH näher zu charakterisieren. Dafür wurden die Sonden der ISH anhand der Originalsequenzen (Recherche: NCBI-Datenbank) dieser Gene hergestellt, um eindeutige Aussagen zu den einzelnen Genen und ihren Expressionsmustern

zu erhalten (s. 2.4.3, Tab.2, 8.9). Obwohl Notch-1 nicht durch die bisherigen Analysen detektiert werden konnte, wurde ein entsprechender Nachweis mittels ISH vorbereitet. Notch-1 inhibiert die Neurogenese, im Gegensatz zu Numb, weshalb ein direkter Expressionsvergleich beider Gene interessant erschien.

Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse



→ PCR und ISH mit den Sequenzen der einzelnen Proben sowie der Klone der EST-Datenbank konnten ebenso wie eine genauere Analyse der Proben 8 und 14 aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

3.8 *In situ* Hybridisierung

Mittels der ISH sollten die Ergebnisse der DD-Analyse anhand ihrer gewebsspezifischen Expression der Proben überprüft werden. Es wurden Sonden mittels ihrer Originalsequenz für β -Aktin, CBF-1, CBF-2 und Pax-6 (Positivkontrollen) sowie für α B-Kristallin, DeltaEF1, Ip3ka, Notch-1 und Numb angefertigt. Die Sonden wurden immer als „Sense“- (d. h. nicht färbend) und „Antisense“-Proben hergestellt und im Folgenden auch so bezeichnet. Bei

diesen Sonden handelte es sich um DIG-markierte RNA-Sonden, welche in der ISH-Reaktion eine stabile RNA:RNA Hybridisierung eingingen (s. 2.9, 2.11).

3.8.1 PCR für die ISH

Um eine Basis für die Sondenherstellung der ISH zu schaffen und gleichzeitig die Ergebnisse der DD-Analyse zu überprüfen, wurden PCRs mit spezifischen Primern (s. 2.4.3) und den DD-Proben (s. 3.2) durchgeführt (s. Abb. 6, 8, 9). Die Ergebnisse der Parallelproben wurden anhand der Σ -cDNA überprüft. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1.5% Agarose-Gel aufgetragen, die Banden ausgeschnitten, die DNA extrahiert, kloniert, sequenziert und schließlich, nach einer Plasmid-Maxipräparation, in einer *in vitro* Transkription in DIG-markierte RNA-Sonden umgeschrieben.

Ein Vergleich der Ergebnisse von DD-Analyse und PCR zeigte keine Übereinstimmung. Nach dem Ergebnis der PCR wird α B-Kristallin in den Stadien HH10 und HH19 etwa gleich stark exprimiert (s. Abb. 8/A). Ip3ka wird in HH10 I und II bis auf die Region LAI exprimiert, im Stadium HH19 dagegen ist nur eine schwache Expression in der LPI-Region sichtbar (s. 8/C). Die Ergebnisse der PCR von DeltaEF-1, Numb und Notch-1 sind sich erstaunlich ähnlich. Es wurde eine deutliche Expression in HH10I und II in allen Regionen nachgewiesen, während in HH19 bis auf je einen sehr schwachen Nachweis (RPI, RAI, RPI) keine Expression angezeigt wird (s. Abb. 8/C, D; Abb. 9).

Es ist auffällig, wie sehr sich die Expressionsnachweise von Ip3ka, DeltaEF-1, Numb und Notch-1 ähneln, obwohl diese Amplifikationen auf den Originalsequenzen der Gene beruhen (s. 8.9) und Primer sowie Amplifikationsprodukte auf ihre Spezifität in der NCBI-Datenbank getestet wurden. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die anhand der DD-Analyse gemachten Aussagen einer potentiell differentiellen Expression falsch waren (s. Tab. 9). Anhand der PCR kann eine stadienspezifische aber keine regionenspezifische Expression vermutet werden.

In den folgenden Abbildungen werden die PCR-Produkte der Parallelproben dargestellt.

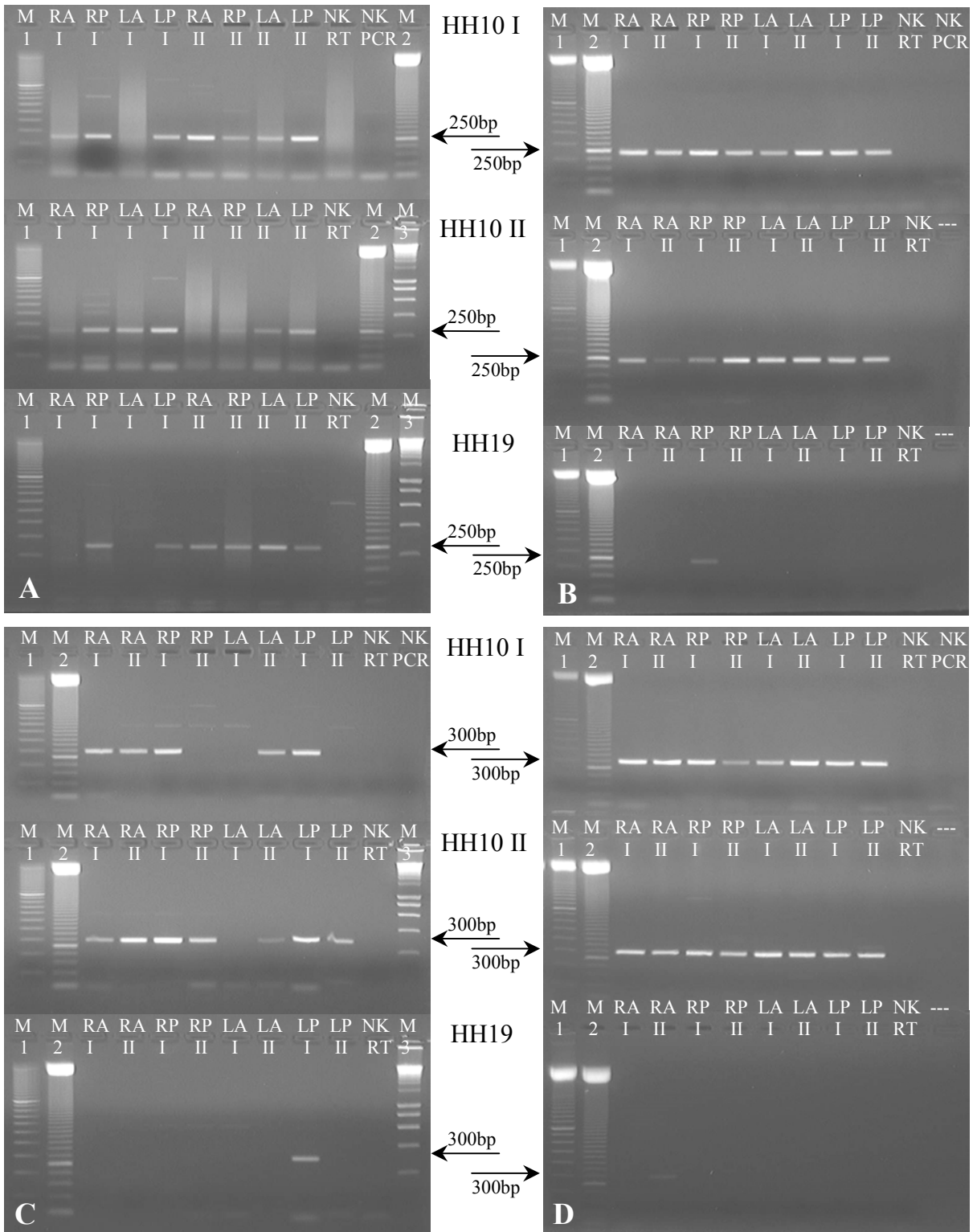


Abb. 8: Agarose-Gele der PCR-Produkte für die Herstellung von RNA-Sonden für die *in situ* Hybridisierung. (A): α B-Kristallin, 254bp; (B): DeltaEF-1, 244bp; (C): Ip3ka, 296bp; (D): Numb, 301bp. Abk.: HH: Hamburger-Hamilton-Stadium; RA: Rechts-anteriore Region; RP: Rechts-posteriore Region; LA: Links-anteriore Region; LP: Links-posteriore Region; I, II: Parallelansätze; NK-RT: Negativkontrolle der RT-Reaktion; NK-PCR: Negativkontrolle der PCR; M1: 100bp-Marker, M2: 50bp-Marker, M3: „SMART“-Ladder (s. 2.3.2).

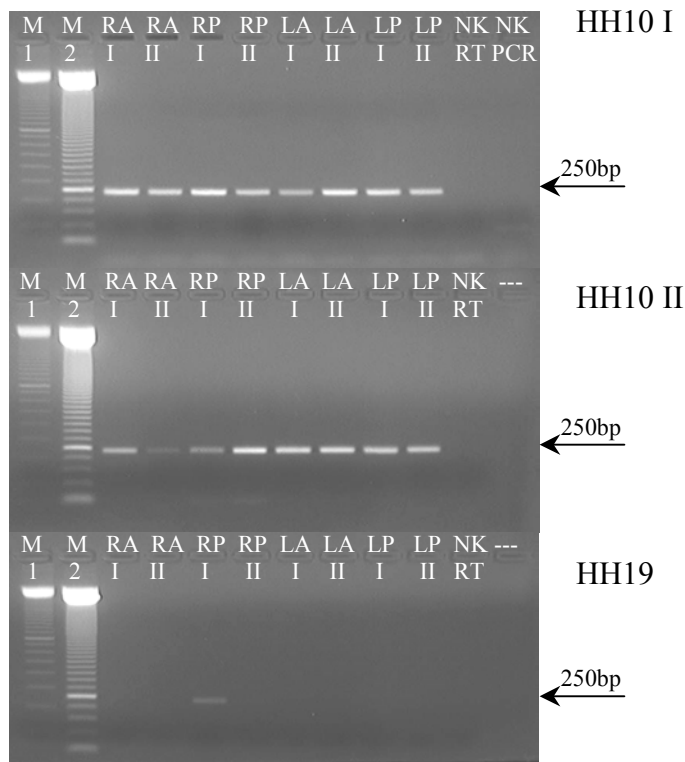


Abb. 9: Agarose-Gele der PCR-Produkte für die Herstellung von RNA-Sonden für die *in situ* Hybridisierung: Notch-1, 251bp. Notch-1 wurde nicht direkt in der DD-Analyse detektiert, sondern aufgrund seiner Neurogenese-inhibierenden Eigenschaften (im Gegensatz zu Numb) ausgewählt. Abk.: HH: Hamburger-Hamilton-Stadium; RA: Rechts-anteriore Region; RP: Rechts-posteriore Region; LA: Links-anteriore Region; LP: Links-posteriore Region; I, II: Parallelansätze; NK-RT: Negativkontrolle der RT-Reaktion; NK-PCR: Negativkontrolle der PCR; M1: 100bp-Marker, M2: 50bp-Marker (s. 2.3.2).

Um die Aussagen der DD-Analyse und der PCRs besser miteinander vergleichen zu können und gleichzeitig eine Aussage über die Gewebsspezifität der verschiedenen Gene zu erhalten, wurden „whole mount“ ISH angefertigt.

3.8.2 *In situ* Hybridisierung der Positivkontrollen

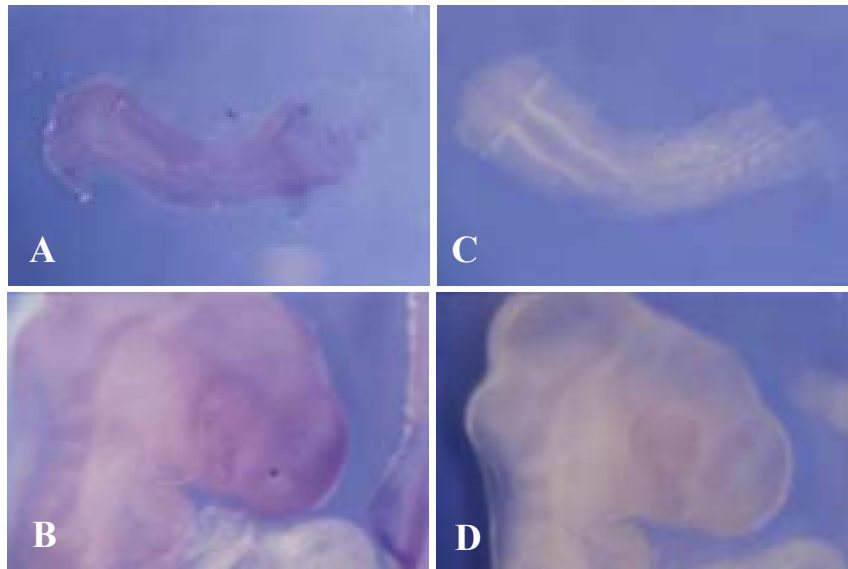


Abb. 10: *In situ* Hybridisierung von β -Aktin. Als „housekeeping“ Gen wird es ubiquitär in den „Antisense“-Proben exprimiert (A, B). Die „Sense“-Proben (C, D) sind negativ. (A) HH10: „Antisense“; (B) HH19: „Antisense“; (C) HH10: „Sense“; (D) HH19 „Sense“. 12.5x; Abk.: HH: Hamburger-Hamilton-Stadium.

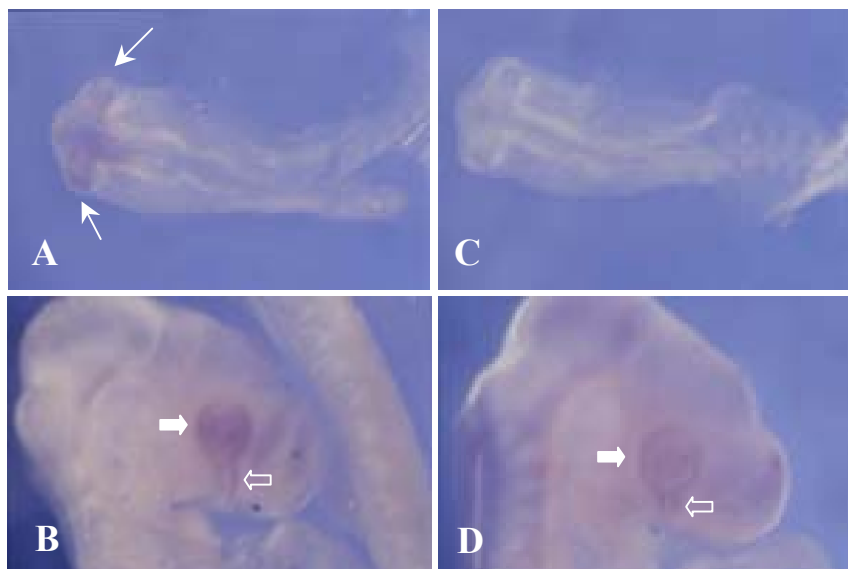


Abb. 11: *In situ* Hybridisierung von Pax-6. Im HH10-Stadium (A) ist ein Signal im Pro- und Mesencephalon sowie in den optischen Vesikeln (Pfeile) zu erkennen, im älteren Embryo (B) im Linsen- und Neuroepithel der Augenanlage (gefüllter Pfeil) und im Sehnerv (transparenter Pfeil). Die „Sense“-Probe des HH10-Stadiums (C) ist negativ, die des HH19-Stadiums (D) zeigt ein schwaches Signal des Linsen- und Neuroepithels (gefüllter

Pfeil) und des Sehnerven (transparenter Pfeil). (A) HH10: „Antisense“; (B) HH19: „Antisense“; (C) HH10: „Sense“; (D) HH19: „Sense“. 12.5x; Abk.: HH: Hamburger-Hamilton(-Stadium).

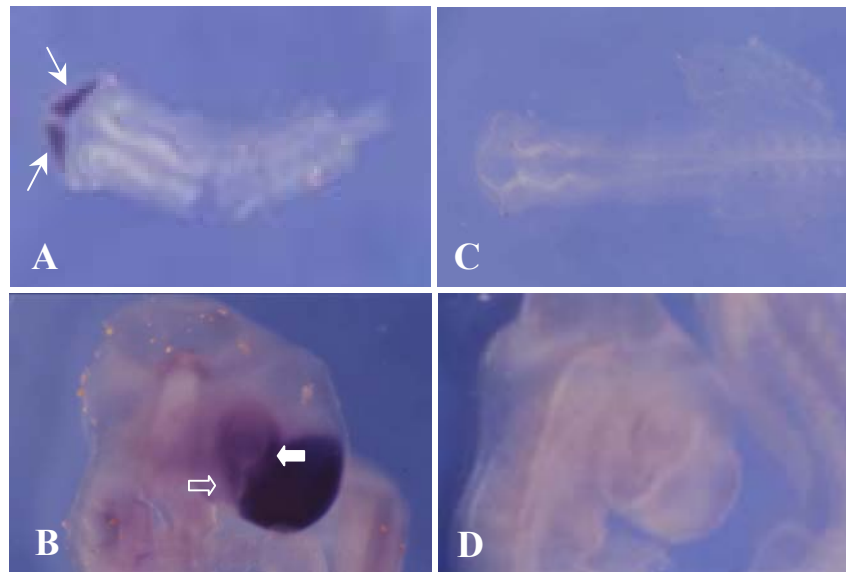


Abb. 12: *In situ* Hybridisierung von CBF-1. In beiden Stadien der „Antisense“-Probe (A, B) ist eine Expression im Prosencephalon lokalisiert. Im HH10-Stadium (A) wird CBF-1 außerdem im anterioren Bereich der Augenanlagen (Pfeile) exprimiert. Im Gegensatz dazu das Expressionsmuster im HH19-Stadium (B): hier ist das gesamte Neuroepithel gefärbt, wobei anterior die Expression deutlich stärker ist (gefüllter Pfeil). Dies spricht für eine gradierte Expression. CBF-1 wird außerdem schwach im Sehnerven exprimiert (transparenter Pfeil). Die „Sense“-Proben (C, D) sind negativ. (A) HH10: „Antisense“; (B) HH19: „Antisense“; (C) HH10: „Sense“; (D) HH19: „Sense“. 12.5x; Abk.: HH: Hamburger-Hamilton(-Stadium).

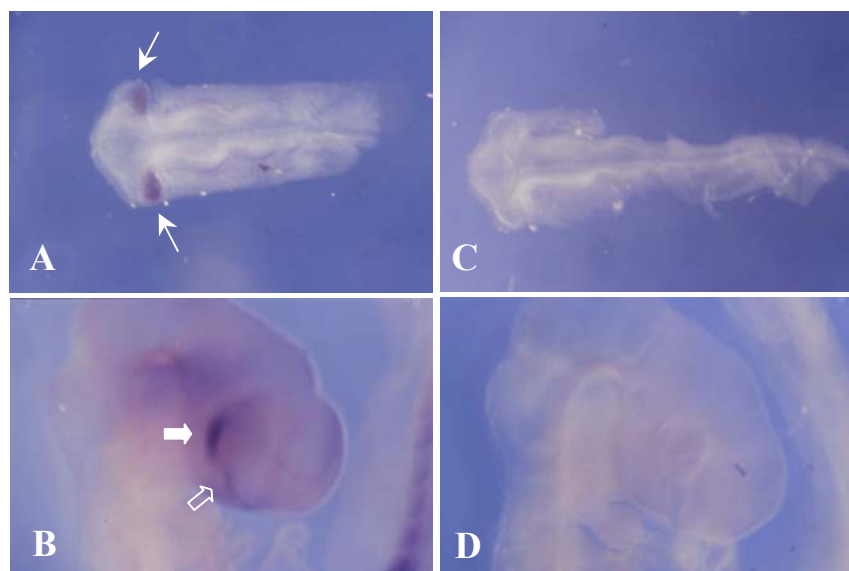


Abb. 13: *In situ* Hybridisierung von CBF-2. Dessen Expression kann eindeutig in beiden Stadien (A, B) den posterioren Bereichen der Augenanlagen zugeordnet werden. Im Stadium HH10 (A) ist sie viel flächiger als bei CBF-1 (s. Abb. 12/A), bleibt dabei jedoch posterior begrenzt (Pfeile). Im älteren Stadium (B) ist das Expressionssignal im posterioren Neuroepithel (gefüllter Pfeil) und im Sehnerven (transparenter Pfeil) sichtbar. Die „Sense“-Proben sind negativ (C, D). (A) HH10: „Antisense“; (B) HH19: „Antisense“; (C) HH10: „Sense“; (D) HH19: „Sense“. 12.5x; Abk.: HH: Hamburger-Hamilton(-Stadium).

3.8.3 *In situ* Hybridisierung potentiell differenzierter Gene

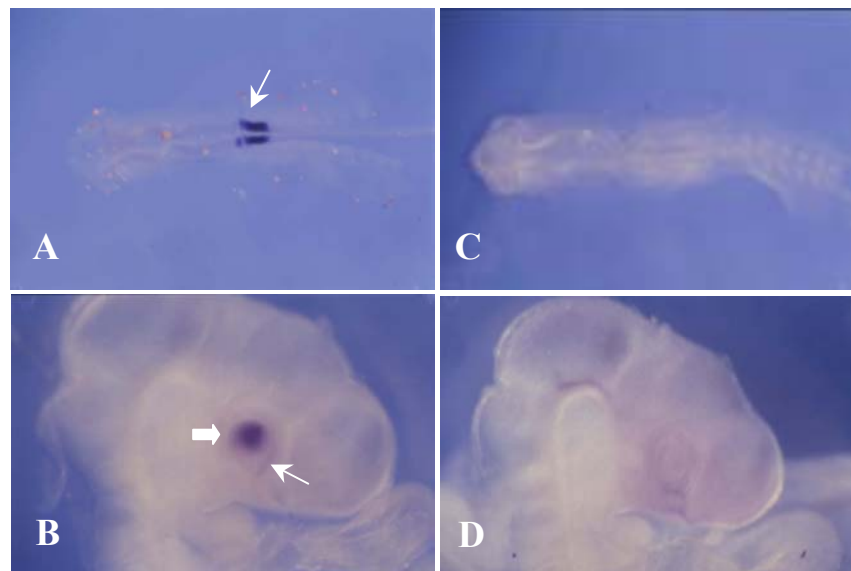


Abb. 14: *In situ* Hybridisierung von α B-Kristallin. Im Stadium HH10 (A) konnte keine Expression in den Augenanlagen, dafür jedoch im prospektiven Nierenbereich (Pfeil) nachgewiesen werden. Im HH19-Stadium (B) ist die Expression auf die Linse (gefüllter Pfeil) und einen schmalen posterioren Neuroepithel-Bereich beschränkt (Pfeil). Die „Sense“-Proben sind negativ (C, D). (A) HH10: Antisense; (B) HH19: Antisense; (C) HH10: „Sense“; (D) HH19: „Sense“. 12.5x; Abk.: HH: Hamburger-Hamilton(-Stadium).

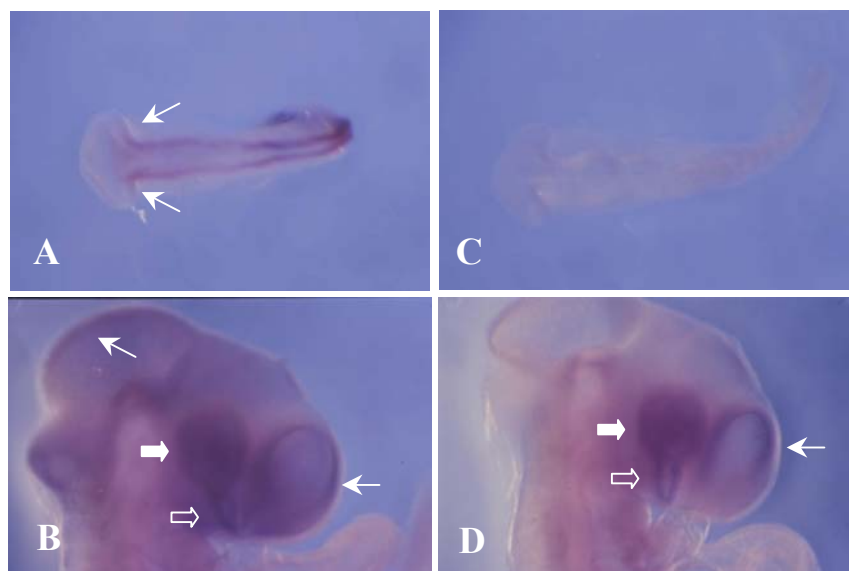


Abb. 15: *In situ* Hybridisierung von Notch-1. Die „Sense“-Probe des Stadiums HH10 (C) ist negativ. In der „Antisense“-Probe (A) wurde Notch-1 bis auf das Prosencephalon im neuralen System nachgewiesen. Die Expression in der Augenanlage beschränkt sich auf eine kleine posteriore Region am Übergang zum Mesencephalon (Pfeile). In den älteren Stadien (B, D) tritt eine rötliche Hintergrundfärbung auf. Mit einem blauen Signal sind in der Antisense-Probe (B) das retinale Neuroepithel (gefüllter Pfeil), der Sehnerv (transparenter Pfeil) sowie das Tectum und das Prosencephalon (Pfeile) charakterisiert. In der „Sense“-Probe (D) erscheinen neben dem retinalen Neuroepithel (gefüllter Pfeil), der Sehnerv (transparenter Pfeil) und das

Prosencephalon (Pfeile) bläulich und lassen auf eine Expression schließen. Anhand der Nachweise der PCR müsste Notch-1 im Stadium HH19 abreguliert sein. In diesem Fall ist die in (B) ersichtliche Färbung als unspezifisch anzunehmen. (A) HH10: „Antisense“; (B) HH19: „Antisense“; (C) HH10: „Sense“; (D) HH19: „Sense“. 12.5x; Abk.: HH: Hamburger-Hamilton(-Stadium).

Die ISH von Ip3ka, Numb und DeltaEF-1 konnten, trotz verschiedener Optimierungsversuche, nicht dargestellt werden. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen „Sense“- und „Antisense“-Proben war nicht möglich. Im Gegensatz zu den kräftigen Blaufärbungen der ISH der Positivkontrollen sowie von α B-Kristallin und teilweise Notch-1, war nur eine rötliche Hintergrundfärbung zu beobachten.

3.9 Zusammenfassung

Im Ergebnis der DD-Analyse wurden 11 Proben als potentiell differentiell exprimiert eingestuft. Anhand der „BLAST“-Analyse der NCBI-Datenbank wurden diesen Proben verschiedene Gene zugeordnet. Gleichzeitig wurden die Sequenzen verschiedener Proben miteinander verglichen und hohe Homologien zueinander festgestellt. Aufgrund der großen Wahrscheinlichkeitswerte einiger Sequenzvergleiche können keine Homologie-Aussagen getroffen werden. Die Ergebnisse der PCR deuten auf eine stadienspezifische aber keine regionenspezifische Expression hin. Eine sekundäre gewebsspezifische Überprüfung mit Hilfe einer „whole mount“ ISH gelang nur bei den Positivkontrollen sowie bei α B-Kristallin und Notch-1. Es davon auszugehen, dass die anhand der Ergebnisse der DD-Analyse gemachten Vermutungen einer potentiell differentiellen Expression falsch waren. Gleichzeitig konnte anhand der „BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank jeder Probe ein Klon und damit eine reelle Hühnchen-mRNA zugeordnet werden.

Aus zeitlichen Gründen musste auf eine genauere Analyse der Proben 8, 13 und 14 verzichtet werden. Ebenso wie auf eine PCR und anschließende ISH anhand der Sequenzen der einzelnen Proben sowie der Klon-Sequenzen der EST-Datenbank.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Proben

Bei der Präparation der Augenanlagen wurde im Wesentlichen nach den Protokollen von Dütting und Thanos (1995) und Hong (1997) verfahren. Dabei ist zu beachten, dass v. a. im Stadium HH10 die Grenzen zwischen Prosencephalon und Augenanlage und zwischen anteriorer und posteriorer Region während der Präparation zwar immer gleich, aber dennoch willkürlich gesetzt werden. Sie sind nicht durch anatomische Merkmale (Furchen o. Ä.) gekennzeichnet. Das bedeutet, dass jede Probe auch immer mit Zellen einer anderen Region „verunreinigt“ wird. Die Sensitivität einer PCR-Reaktion ist außerdem sehr hoch, so dass theoretisch ein „Target“ für eine erfolgreiche Amplifikation ausreicht. In der Konsequenz ist es demnach möglich, dass eventuell existierende Unterschiede zwischen den Regionen in der PCR angeglichen werden und in der PAA-Gel-Analyse als solche nicht mehr aufzufinden sind. Eine 100%ige Eindeutigkeit besteht aber bei der in dieser Arbeit ebenfalls durchgeführten „rechts-links“-Analyse.

Für die Untersuchung geringer Gewebsmengen, wie sie z. B. bei frühen Embryonalstadien anfallen (Adati et al., 1995), wird ein Zusammenfassen von Proben („Poolen“; Zimmermann und Schultz, 1994, Chambers et al., 2000) notwendig. Bei der Probenwahl der vorliegenden Arbeit wurden (s. 3.2) einige Hinweise von Bauer et al. (1993, 1994) und Keyvani et al. (2000, mündliche Hinweise) beachtet. Folgende Strategien (I-IV) wurden deshalb entwickelt und verfolgt:

I. Stadien HH10 und HH19: Durch das Zusammenführen von Regionen wurden individuelle Unterschiede maskiert. Gleichzeitig konnte jedoch ausreichend RNA isoliert werden, um sowohl eine qualitative Analyse (denaturierendes RNA-Gel) als auch eine Reverse Transkription (RT) durchzuführen. Das HH10-Stadium wurde als besonders wichtig angesehen, da während dieses Entwicklungszeitraumes die Positionsdetektion der Ganglienzellen stattfindet (Thanos et al., 1996; Yuasa et al., 1996; Müller et al., 1998; Thanos und Mey, 2001). Bei den älteren Embryonen wurden die Regionen nicht „gepoolt“. Die RNA-Mengen waren nur für eine RT-Reaktion, nicht aber für ein RNA-Gel ausreichend.

II. Σ -Ansätze: Ein mögliches „Aufsummieren“ von Fehlern wurde bereits angesprochen. Ein Vermeiden dieser Fehler ist besonders wichtig, da viele erst in einer zweiten, von der DD-Analyse unabhängigen Methode erkannt werden können (s. 4.2.2). Zur zusätzlichen Überprüfung des Experimentes wurden deshalb die „ Σ “-Proben eingeführt. Dabei wurde eine bestimmte Menge an RNA der bisherigen Proben eines Stadiums zusammengefasst. Und zwar die RNA aller Regionen einer rechten oder linken Augenanlage, was damit einer ganzen Augenanlage (bzw. einem „Pool“ im HH10-Stadium) entsprach (s. 3.2). Es wurde weder „neu“ präpariert noch „neue“ RNA isoliert. Damit wurde eine weitere Fehlerquelle im Vergleich von bisherigen und neuen Proben vermieden. Die Überlegung war, dass sich Unterschiede im Bandenmuster der Proben, die auf dem PAA-Gel identifiziert und sich in zusätzlichen Banden äußern würden, ebenfalls in solch einer Σ -Probe zu detektieren sein müssten. Bereits auf dem Gel konnte so zwischen „sicheren“ und „unsicheren“ Banden unterschieden und damit die Rate von falsch-Positiven gesenkt werden. Fehlende, d. h. potentiell abregulierte Banden konnten so jedoch nicht überprüft werden.

III. Reproduzierbarkeit: Nach Monschau (1995) erscheinen durchschnittlich 10-15% aller Banden als falschpositive und nicht reproduzierbare Banden, die es durch eine Wiederholung der Versuche herauszumitteln galt. Besonders Bauer et al. (1993, 1994) wiesen auf die Unerlässlichkeit von Wiederholungen der DDRT-PCR mit der gleichen RNA und 1-2x mit RNA einer neuen Isolierung hin. Mit Parallelproben arbeiteten u. a. Chambers et al. (2000) und Keyvani et al. (2000, sowie mündliche Mitteilung). Beide Ideen wurden in der vorliegenden Arbeit vereint. Zum einen wurde die RNA der gleichen Region und des gleichen Stadiums, aber verschiedener Präparationen als Parallelprobe in der gleichen Reaktion geführt (z. B. HH10 I: RAI, RAII usw., s. 3.2), zum anderen wurde dieser Vorgang noch einmal wiederholt (z. B. HH10 II: RAI, RAII usw., s. 3.2). Fehler konnten damit nicht vollständig vermieden, zumindest jedoch minimiert werden.

IV. Kontrollen. Es wurden Negativ- und Positivkontrollen bei jeder Art von Reaktion mitgeführt. Negativkontrollen enthielten im Allgemeinen kein „Template“, sondern Wasser. Diese Negativkontrollen geben Rückschluss auf Kontaminationen innerhalb der Reaktionsbestandteile und auf eine saubere Arbeitsweise. Die Reinheit von RNA wurde z. B. in einer PCR mit der entsprechenden RNA als „Template“ getestet. Ein positiver Nachweis deutet auf eine DNA-Kontamination hin. Positivkontrollen ermöglichen die Überprüfung

einer Methode oder Technik. Können z. B. bekannte Gene in einer PCR-Reaktion nachgewiesen werden, „unbekannte“ Gene jedoch nicht, kann das vielleicht an einem falsch-positiven Nachweis dieser „unbekannten“ Kandidaten in der DD-Analyse liegen.

4.2. Etablierung und Optimierung von Techniken

4.2.1 Differential Display-Analyse

Das Differential Display ist als Methode sehr komplex, weshalb versucht wurde, die Technik auf verschiedenen Ebenen zu optimieren. Minimale Änderungen (z. B. im Primerdesign, Zyklendauer der PCR etc.) führten jedoch bei verschiedenen Versuchsgruppen zu sehr heterogenen Ergebnissen. Die meisten Gruppen arbeiten mit radioaktiven Nukleotiden, obwohl sich nicht radioaktives Arbeiten als sensitiv und zeitsparend erwies. (Lohmann et al., 1995; Kociok et al., 1998).

4.2.1.1 RNA-Isolierung

Liang et al. (1993) untersuchten den Einfluss des „Templates“, welches in die RT-Reaktion eingesetzt wird, auf das Ergebnis der DD-Analyse. Sie fanden keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Einsatz von poly-A-RNA oder total RNA. Liang et al. (1995) plädierten für total RNA als das „Template“ der Wahl, da die Isolierung einfacher ist, die Integrität der RNA per Agarose-Gel überprüft werden kann und weniger Hintergrund-Schmier auftritt. Aufgrund all dieser Informationen und der laboreigenen Erfahrungen wurde in der vorliegenden Arbeit total RNA (vereinfacht als „RNA“ bezeichnet) isoliert. Während Welsh et al. (1992) in ihrem Arbeitsprotokoll geringe Mengen an genomischer DNA tolerierten, (aufgrund der geringen Stringenz der Reaktion sei diese DNA als Template nicht geeignet), drängen Liang et al. (1993), Monschau (1995), Liang und Pardee (1995) und Liang et al. (1995) ausdrücklich auf die Notwendigkeit einer DNase-Behandlung. Sie weisen darauf hin, dass die Ursache falsch-positiver oder -negativer Nachweise häufig in einer Kontamination mit genomischer DNA liegt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb immer ein DNase-Verdau durchgeführt.

Vergleichswerte von isolierten RNA-Mengen aus Augenanlagen werden in der Literatur nicht erwähnt. Es zeigte sich, dass 52-54 Augenanlagen ausreichende Mengen total-RNA lieferten

(s. 3.2, Tab. 4, 5). Die RNA-Isolierung der einzelnen Regionen des HH19-Stadiums resultierten in deutlich geringeren Mengen an RNA (s. 3.2, Tab. 6), die jedoch für die anschließende RT-Reaktion ausreichte.

4.2.1.2 Reverse Transkription

Da gleiche RNA-Mengen (bis auf HH19) in die RT-Reaktion eingesetzt wurden, konnten Unterschiede im Expressionsmuster, die durch unterschiedlichen Mengeneinsatz hervorgerufen würden vermieden werden. Es wurden pro RT-Reaktion 200ng (HH10) oder 10 μ l RNA (HH19) eingesetzt. Das entsprach den bekannten Literatur-Werten z. B.: Welsh et al. (1992): 0.2 μ g/ μ l total RNA; Liang et al. (1993): 0.2 μ g total RNA oder 0.1 μ g poly-A-RNA; Sokolov und Prockop (1994): 520ng mRNA; Zhao et al. (1998): 100-200ng total RNA; Chambers et al. (2000): 200ng total RNA. Nach Liang et al. (1993) ermöglichen 200ng RNA außerdem eine gute DD-Analyse (s. 1.2).

In der Literatur wurde immer wieder diskutiert, welche Länge die verschiedenen Anker- und Zufalls-Primer haben sollten und in welchen Kombinationen sie einzusetzen sind. Die Auswahl der Anker-Primer bestimmt entscheidend den Erfolg einer DD-Analyse. Die Anker-Primer werden folgend mit T_xVN (T_x= Anzahl des Nukleotids T, V= die Nukleotide G, A, C, N= jedes der vier Nukleotide [G, A, T oder C]; Bauer et al., 1994; s.1.2) beschrieben. In den ersten Arbeiten wurden T₁₀ und T₁₄ lange Anker-Primer benutzt (Liang und Pardee, 1992; Liang et al., 1993; Bauer et al., 1994). Gleichzeitig wurden bereits Zufalls-Primer mit mind. 18 Basen in der RT-Reaktion (Welsh et al., 1992), z. T. mit anschließenden RNA-„fingerprinting“ Reaktionen verwandt (McClelland et al., 1994) und im DD getestet (McClelland et al., 1995). Ein wesentliches Merkmal besteht außerdem im 3'-Basenbestandteil - dem „Anker“. Dieser kann aus zwei (Liang et al., 1992; Bauer et al., 1993; Hong, 1997; Hong et al., 1998) oder einer Base bestehen (Liang et al., 1994; Zhang et al., 1996; Zhao et al., 1998; Keyvani et al., 2000). Beide Arten von Anker-Primern wurden erfolgreich eingesetzt. Der ein-Basen-Anker reduziert die Zahl der RT-Reaktionen erheblich, während der zwei-Basen-Anker die Reproduzierbarkeit erhöhen soll und weniger komplexe Fragmentmuster entstehen lässt (DeFrancesco, 1998). Sowohl hexamer-Primer als auch oligo-d(T)-Primer ohne Ankerbase wurden als nicht tauglich beschrieben (Liang und Pardee, 1995). Da eine RT-Reaktion mit einem Anker-Primer immer auch zu einem Verlust an RNA führen

kann, wurde in Vorversuchen der Einsatz des oligo-d(T₁₂₋₁₈) Primers getestet und schließlich in vorliegender Arbeit eingesetzt. Das bot außerdem den entscheidenden Vorteil, dass die erhaltene cDNA für weitere PCRs mit spezifischen Primern (s. 2.4.1, 3.3, 3.5.1, 3.8.1) verwandt werden konnte, was einen direkten Vergleich zwischen der DD-Analyse und den entsprechenden Positivkontrollen, d. h. dem Nachweis bekannter Gene, ermöglichte. Ebenso wurden die RNA-Sonden für die ISH auf der Basis dieser cDNA hergestellt.

4.2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Einige grundlegende Probleme der DD-Analyse sind der Hintergrund-Schmier und zu komplexe bzw. zu wenige Fragmente. Ursachen sind z. B. eine oligo-d(T)-Verunreinigung (s. 4.2.1), der Verzicht auf einen RNase H-Verdau oder auf einen „Hot-start“ (Sokolov und Prockop, 1994; Kociok et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine Reverse Transkriptase mit RNase H-Aktivität gewählt, die erhaltene cDNA aufgereinigt und generell ein „Hot-start“ durchgeführt (s. 2.4). In der Literatur werden die Reaktionsbedingungen z. T. an der erhaltenen Fragmentzahl oder an der Reproduzierbarkeit der Bandenmuster optimiert. Verändert wurden v. a. Reaktionsbedingungen, wie z. B. die Länge der Zyklen, die Annealing-Temperatur, die Annealing- und Elongationszeiten oder die Länge der Zufalls-Primer. Auch die Verwendung verschiedener Reaktionsgefäße und Thermocycler kann zu unterschiedlichen Ergebnissen führen (Chen et al., 1994; Monschau, 1995). Es ist offensichtlich, dass es kein allgemeingültiges Protokoll gibt und geben wird. Die Zyklenzahl einer DD-PCR kann z. B. zwischen 30 (Callard et al., 1994; Diachenko et al., 1996) und 40 Zyklen (Monschau, 1995; Thomson et al., 1997) schwanken, die Annealing- und Elongationszeiten werden von 30s bis 5min (Diachenko et al., 1996; Kociok et al., 1998) Dauer angegeben. Die Annealing-Temperatur liegt meist bei 40°C (Mou et al., 1994; Livesey und Hunt, 1996). Durch eine Erhöhung der Stringenz der Gesamtreaktion (indem die ersten Zyklen niedrig stringent, alle weiteren höher stringent ablaufen) konnten diskrete und reproduzierbare Banden erhalten werden (Welsh und McClelland, 1990; Keyvani et al., 2000). Letztlich wurde in dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt, welches verschiedene Bestandteile der bisher aufgeführten Vorschriften in sich vereinte: 40 Reaktionszyklen, in denen die Annealing-Temperatur von 30°C schrittweise auf 33.9°C erhöht und die Synthesephase um eine Sekunde verlängert wurde (s. 2.4.2).

Kontrollen sind essentiell um das Auftreten falsch-positiver Banden zu erkennen und zu minimieren (Poirier et al. 1997; Chambers et al., 2000). Obwohl häufig das Bandenmuster (Spezifität und Reproduzierbarkeit verschiedener Proben, Anzahl der Banden pro Primerkombination) als Indikator für eine erfolgreiche DD-PCR-Reaktion angesehen wird, wurde aufgrund der erst von mir im Labor durchgeführten Etablierung und der damit zusammenhängenden fehlenden Erfahrung im Umgang mit der DD-Interpretation, in der vorliegenden Arbeit die DD-PCR anhand von Negativkontrollen optimiert (s. 3.4.1). Diese gestatteten eine Überprüfung der Reaktionsbestandteile und –parameter sowie das Maß der Primerhybridisierung. Bereits Bauer et al. (1994) wiesen darauf hin, dass nicht alle Primer gut „zueinander passen“, sondern je nach Fragestellung und Ansatz die entsprechenden Paare erst experimentell getestet werden müssten. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Reproduzierbarkeit des Bandenmusters, den Hintergrund-Schmier und die Anzahl an Banden generell getestet.

Dabei erwiesen sich die Negativkontrollen als sehr guter Marker für die Optimierung. Zunächst hybridisierten die verschiedenen Primerpaare (aus Anker- und Zufalls-Primer) miteinander, ohne dass sich für jede bestimmte Kombination ein spezifisches Bandenmuster herauskristallisierte. Dieses hätte als primerspezifischer Hintergrund vom Bandenmuster der Proben abgezogen werden können. Die Primer bildeten miteinander und mit dem „Template“ unspezifische Bandenmuster, die in zunehmendem Maße auf eine DNA-Kontamination durch DNA-Aerosolbildung (Eing, Inst. f. Virologie des UKM Münster, mündliche Mitteilung) der einzelnen Reaktionsbestandteile und des gesamten Labors hinwiesen. Eine Dekontamination (1% Natriumhypochlorit)und logistische Veränderung des Labors (räumliche Trennung von Arbeitsplätzen) resultierten in rein negativen Kontrollen, egal bei welcher Kombination. Das Bandenmuster der Proben mit einer bestimmten Primerpaar-Kombination konnte somit als spezifisch angenommen werden.

Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass die DD-PCR ein äußerst sensibles System ist, welches sofort sichtbar auf DNA-Kontaminationen reagiert. Hauptursache dafür ist sicherlich die Verwendung von Zufalls-Primern unter niedrig stringenten Bedingungen, welche jede Art von DNA als „Template“ erkennen sollen, was sie unter diesen Bedingungen auch bei nicht 100%iger Komplementarität tun. Diese Sensitivität resultiert sowohl in einem Nachweis gering exprimierter Gene als auch kleinster DNA-Verunreinigungen. Eine Toleranz

gegenüber genomischer DNA (Welsh et al., 1992; s. 4.1.1) ist deshalb völlig inakzeptabel. Eine Verwendung von Negativkontrollen ist essentiell für die Optimierung der Reaktion und für das Erkennen falsch-positiver Banden.

4.2.1.4 Silberfärbung, Extraktion und Reamplifikation

Aufgrund der hohen Sensitivität der Färbung konnten kleinste Mengen an DNA dargestellt, jedoch z. T. nicht wiedergewonnen werden. Die Vorschläge GenHunters (Firma des DD-Erstbeschreibers Liang) zur Verbesserung der Extraktion und PCR-Bedingungen (Differential Display News, 1999) wurden zwar befolgt, jedoch waren die Ergebnisse immer negativ. Deshalb wurde v. a. im Bereich von ca. 100-550bp nach differentiellen Banden gesucht.

Außerdem scheint Silber DNA fest zu binden, so dass diese häufig nur sehr schwierig und unzureichend aus dem Gel gelöst werden konnte. Dieses Problem ist der Firma ETC (Bezug der PAA-Gele, s. 2.3.3) bekannt. Es wird empfohlen, die gleiche Probe zweimal nebeneinander aufzutragen, jedoch nur eine Silber zu färben. Anhand dieser kann die entsprechende Bande im nicht gefärbten Gel ausgeschnitten und die DNA leichter extrahiert werden (Herstellerprotokoll AN 1009 - Ko et al., Bonn). Dieses Vorgehen bedeutet bei einem hohen Probenumfang einen weiteren arbeitstechnischen und auch finanziellen Aufwand. Als beste und deshalb hier verwandte Methode erwies sich das „crush and soak“-Protokoll von Sambrook et al., modifiziert nach Feldkämper (Universitätsaugenklinik Tübingen).

Die mehrfach beschriebene Tatsache, dass eine Bande verschiedene cDNAs repräsentieren kann (Bauer et al., 1994; Liang und Pardee, 1995), beruht vielfach auf einer leicht veränderten elektrophoretischen Mobilität der DNAs, welche dadurch in einer Bande konzentriert werden können. Die Ursachen liegen in kleinen Unterschieden der komplementären Stränge (Liang et al., 1993) oder einer Fragmentbildung. Diese DNA-Fragmente entstehen z. B. durch das Anhängen eines additiven Adenins durch die Taq-DNA-Polymerase (Bauer et al., 1993). Verändertes Laufverhalten mit den oben genannten Ursachen kann auch zu einer Doppel- oder Tripletbildung von DNA-Banden im Bereich unter 300bp führen (Liang et al., 1993; Zimmermann und Schultz, 1994).

Bei jeder Gel-basierenden Auftrennung kann eine „Co-Migration“ und eine „Co-Aufreinigung“ von DNA stattfinden, was wiederum in einer möglichen Zunahme von falsch-Positiven resultiert (Mahadeva et al., 1998). Wird deshalb bei einer elektrophoretischen Auftrennung im Agarose-Gel das Reamplifikationsprodukt in mehrere Banden separiert, kann davon ausgegangen werden, dass auch die „ursprüngliche“ PAA-Gelbande mehrere cDNAs umfasste (Mou et al., 1994). In vorliegender Arbeit wurde von Probe zu Probe entschieden, welche DNA welcher Bande später kloniert und sequenziert werden sollte.

Trotz zahlreicher Literaturhinweise, die eine Reamplifikation als nötig, aber nicht schwierig beschreiben, musste sie hier stark optimiert werden. Bei gleichen Primer- und PCR-Bedingungen sollten ca. 90% der Proben nach einer Reamplifikation wieder aufzufinden sein (Liang et al., 1993; Liang et al., 1995). Bei Sokolov und Prockop (1994) gelang die Reamplifikation vieler Fragmente nicht oder resultierte häufig in multiplen Banden. Deshalb arbeiteten sie unter DD-PCR-Bedingungen welche nur 15-30 DNA-Fragmente hoher Konzentration pro Probe und Reaktion amplifizierten, was eine anschließende Reamplifikation vermied. Liang und Pardee (1995) bezweifeln jedoch eine genügend hohe Sensitivität gegenüber gering exprimierten Genen. In der vorliegenden wurden einzelne Reaktionsbedingungen (z. B. die Konzentrationen der Taq-DNA-Polymerase und der Nukleotide) verändert. Die niedrig stringenten Reaktionsbedingungen wurden beibehalten, jedoch in Form einer „touchdown“ PCR (s. 2.4.2).

Aufgrund dieser Unsicherheiten und der Gefahr falsch-positiver Klone, wurden immer mehrere Proben kloniert und vor allem sequenziert, wie u. a. von Bauer et al. (1994) und Liang und Pardee (1995) gefordert. Denn auch reamplifizierte und gereinigte Produkte können durchaus noch verschiedene DNA-Spezies enthalten, wie von Callard et al. (1994) gezeigt wurde.

4.2.2 *In situ* Hybridisierung

Fast alle Anwender der DD-Technik betonen die Notwendigkeit, die Ergebnisse dieser Analyse zu überprüfen, um dadurch die differentielle Expression des identifizierten Gens nachzuweisen und zu bestätigen. In den meisten Fällen wurde dafür ein Northern-Blot (z. B. Bauer et al., 1994; Sokolov und Prockop, 1994; Adati et al., 1995; Liang und Pardee, 1995),

ein Dot Blot (Zhang et al., 1996; Hong, 1997; Hong et al., 1998) oder eine ISH mit radioaktiven Sonden verwandt (Kiryu et al., 1995; Livesey und Hunt, 1998). Da eine „whole mount“ ISH die Möglichkeit zu einer Analyse der zeitlich-räumlichen Expression von Genen am gesamten Embryo bot, wurde diese Technik favorisiert.

Der Vorteil, gegenüber der Nutzung von Schnitten, liegt in der leichteren Identifizierung kleiner Zellgruppen, da diese nicht durch verschiedene Schnitte und/oder Objektträger voneinander getrennt sind. Außerdem kann auf eine 3D-Rekonstruktion von Mustern verzichtet werden, da die räumlichen Verhältnisse direkt sichtbar sind (Nieto et al., 1996; Abraham, 2001). Solche „whole mount“ ISH sind von Zebrafisch (Jowett, 2001), Drosophila (Hauptmann, 2001), Maus (Parr et al., 1993; Pennekamp et al., 2002) und auch Hühnchen (Nieto et al., 1996; Yamagata et al., 1999; Basch et al., 2000) bekannt. Obwohl relativ häufig Embryonen und Schnittpräparate (Paraffin, Gelantine, Kryoschnitte) parallel kombiniert (Parr, et al., 1993; Schulte et al., 1999; Zhang et al., 2000) oder die bereits gefärbten Embryonen noch zusätzlich geschnitten werden (Riddle et al., 1993; Borghjid und Siddiqui, 2000; Martí, 2000), wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit „whole mounts“ nach einem geringfügig modifizierten Protokoll von Tabin (nach Riddle et al., 1993 und 1995) gearbeitet.

Bei der Verwendung von Embryonen ist es wichtig, deren Körperhöhlen zu perforieren, um eine Farbstoffakkumulation in diesen zu vermeiden (Streit und Stern, 2001). Bei den älteren Embryonen (HH19) wurden deshalb zumindest beide Tecta perforiert. Außerdem wurden, nach Hinweisen von Hauptmann (2001), beim Lösungswechsel niemals die gesamte Flüssigkeit entfernt. Das beugt einem Aufsaugen, Beschädigen und Trockenfallen der Embryonen vor.

4.2.2.1 Fixierung

Über die Qualität des finalen Signals einer ISH entscheidet bereits die Initialfixierung (Nieto et al., 1996; Streit und Stern, 2001). Das meistbenutzte Fixierungsmittel ist 4%iges PFA (z. B. Sasaki und Hogan, 1993; Barbieri et al., 2002). Die Fixierungszeiten schwanken zwischen 10min (Hühnchen-Makrophagen: Gandrillon et al., 1996), 45min-2h bei RT oder auf Eis (Sasaki und Hogan, 1993; Jowett, 2001) und über Nacht, meist bei 4°C (Riddle et al., 1993; Borghjid und Siddiqui, 2000). In der vorliegenden Arbeit bewährte sich eine Fixierung mit

4% PFA in PBT entweder 4h bei RT, oder ü. N. bei 4°C (s. 2.1.2.2). Es ist zu beachten, dass eine Fixierung immer auf einem Kompromiss beruht: einerseits müssen Nukleinsäuren und morphologische Strukturen stabilisiert werden, andererseits muss jedoch eine gewisse Permeabilität gewährleistet bleiben, damit die Sonden und Antikörper überhaupt ihre Ziele erreichen können. (Nieto et al., 1996). Wird ein vernetzendes Fixativ wie PFA verwendet, müssen zelluläre Proteine anschließend verdaut werden. Das geschieht mittels Proteinase K oder durch Hitzeeinwirkung. Eine Anpassung auf Alter und Größe der Embryonen ist unerlässlich, denn ein nicht optimierter Verdau kann auf der einen Seite zu unzureichender Permeabilität, auf der anderen zu Fragilität und damit einer erhöhten Gefahr des Zerbrechens der Embryonen führen (Hauptmann, 2001; Jowett, 2001).

4.2.2.2 Sonden: Markierung, Nachweis und Qualität

Benutzt wurden RNA-Sonden, welche eine hohe Stringenz der Hybridisierung und der Waschschrte zulassen (Hauptmann, 2001). Außerdem sind die resultierenden RNA-RNA-Hybride stabiler als RNA-DNA- oder DNA-DNA-Hybride (Wetmur et al., 1998; Abraham, 2001). Unspezifisch gebundene Sonden können durch einen RNase-Verdau abgebaut und ausgewaschen werden, was die Hintergrundfärbung stark reduziert (Hauptmann, 2001). Der Nachteil von RNA-Sonden liegt in ihrer Anfälligkeit gegenüber RNase-Kontaminationen, weshalb, besonders bis zur Hybridisierungsreaktion, möglichst RNase-frei gearbeitet werden muss. Markiert wurden die Sonden mit Digoxigenin (DIG) während der *in vitro* Transkription. Die Vorteile nicht radioaktiver Markierungen liegen in deren unkomplizierter Handhabung, in der Möglichkeit, den Reaktionsverlauf anhand der Farbentwicklung zu beobachten und entsprechend zu stoppen sowie in der simultanen Nutzung verschiedener Sonden (fluoreszent, chromogen) an demselben Präparat (Nieto et al., 1996; Hauptmann, 2001; Jowett, 2001). In Kombination von DIG, alkalischer Phosphatase und BCIP/NBT-Substrat wird eine zuverlässige Färbung, auch von Transkripten geringer Level erreicht (Streit und Stern, 2001). Aufgrund dieser Eigenschaften und der positiven Bewertung vieler Autoren (z. B. Sasaki und Hogan, 1993; Gandrillon et al., 1996; Martí, 2000; Zhang et al., 2000) wurde diese Methode auch in der vorliegenden Arbeit verwandt.

Den größten Einfluss auf den Erfolg einer ISH hat die Qualität der Sonde, d. h. die Effizienz ihrer Markierung, Reinheit, Spezifität und Größe (Abraham et al., 2001). In Vorversuchen

wurde das benutzte *in vitro* Transkriptionssystem (s. 2.9) als optimal in Handhabung, Sondenreinheit und Markierungseffizienz eingestuft. Als problematisch wird die Größe der Sonde eingeschätzt. Zu kurze Proben binden häufig unspezifisch, zu lange können schlecht in das Gewebe eindringen (Nieto et al., 1996). Streit und Stern (2001) stellten außerdem fest, dass DIG an Hühnchengewebe häufig „festklebt“ und derart markierte Sonden zu einem hohen Hintergrund führen können. Generell besteht bei Proben kleiner als 300bp immer die Gefahr von Kreuzreaktionen, v. a., wenn die Stringenz der Hybridisierung und Waschschrte verringert werden muss, oder wenn Mitglieder großer Genfamilien detektiert werden sollen (Streit und Stern, 2001). Parr et al. (1993) benutzten Sonden im Bereich von 0.306-1.45kb, Nieto et al. (1996) von 0.2-1kb und 0.5-3kb, Yamagata et al. (1999) von 716-1883bp. Jowett (2001) beschrieb 500-2000bp als ideale Probengröße. Aufgrund dieser Angaben und den Ergebnissen der Vorversuche, wurde eine Sondengröße von 200-400bp als optimal eingestuft und die Proben in der entsprechenden Größe hergestellt (s. 2.4.3, Tab. 1, 2).

4.2.2.3 Kontrollen

Als Negativkontrolle einer ISH wird häufig die „Sense“ Probe benutzt (Nieto et al., 1996; Hauptmann, 2001). Sonden, die konservierten Regionen eines Gens entsprechen, können kreuzhybridisieren und sind deshalb zu vermeiden (Nieto et al., 1996; Hauptmann, 2001). Dagegen sollte die ISH anhand bereits bekannter Proben optimiert (Nieto et al., 1996) oder mehrere „Antisense“ Proben, aus verschiedenen Bereichen derselben mRNA, verwendet werden (Hauptmann, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden alle Sequenzen auf ihre Spezifität in der „BLAST“-Analyse untersucht. Die Expressionsmuster der Positivkontrollen (dieselben der gesamten bisherigen Arbeit) waren bekannt, so dass deren eindeutige Bestätigung für eine gute Handhabung der Technik sprach und als sukzessiver oder simultaner Vergleich bei den Proben der DD-Analyse diente. Weiterhin wurden immer „Sense“ Proben mitgeführt. Durch diese konnte vor allem die Frage nach der Spezifität eines Signals eingeschätzt werden.

4.3 Sequenzanalyse

Es wurde bereits vielfach darauf hingewiesen, dass eine PAA-Gelbande durchaus mehrere DNAs repräsentieren kann, was der Größenvergleich der analysierten Sequenzen andeutet (s. Tab. 9). Die verschiedenen Klone einer Probe differierten in ihrer Größe untereinander,

aber auch zur ursprünglichen PAA- und Agarose-Gelbande. Die Ursachen dafür könnten in einer ungenauen Größenzuordnung durch den DNA-Marker, in einem Verlust an Nukleotiden durch die verschiedenen Bearbeitungsschritte, in einer qualitativ schwachen Sequenzierung oder auch in der Konzentration verschiedener DNAs gleicher Länge bzw. Co-Migration von DNAs verschiedener Länge in einer PAA-Gelbande liegen. Diese DNA-Sammlung würde z. T. auch erklären, warum nicht alle Klone einer Probe in der „BLAST“-Analyse in einem gleichen Ergebnis resultierten (s. 3.7).

Aufgrund der geringen Zahl bekannter Hühnchen-Sequenzen in den Datenbanken (z. B. NCBI) wurden bei einer „BLAST“-Analyse nur wenige spezifische „Treffer“ erwartet, was sich auch bestätigte. Die Ursachen dafür lagen wahrscheinlich sowohl in den Sequenzen selbst (zu kurz für einen Vergleich bzw. Abschnitte aus nicht transkribierten Regionen) als auch im limitierten Umfang an Hühnchen-Sequenzen der NCBI-Datenbank. Erst mit der Arbeit von Boardman et al. (2002) wurden 339314 Hühnchen-ESTs („expressed sequenced tags“) öffentlich zugänglich und abrufbar (<http://www.chick.umist.ac.uk>). Über diese BBSRC-EST-Datenbank wurden alle als potentiell differentiell bewerteten Klone noch einmal analysiert. Jedem dieser Klone konnte eine Hühnchen-spezifische mRNA zugeordnet werden, wenn diese auch nicht immer auf ein bekanntes Gen zurückzuführen war.

Wurden alle potentiell differentiellen Banden auf Zusammenhänge hin untersucht, konnte festgestellt werden, dass der Schwerpunkt sehr deutlich bei den „posterior-rechten“ Regionen lag. Beim direkten Vergleich zwischen den Stadien war zu erkennen, dass in HH19 sowohl mehr differentielle Banden als auch in einer größeren Streuung über die verschiedenen Regionen auftraten (s. 3.4.2, Tab. 7).

Was könnten die Gründe für diesen deutlichen Unterschied zwischen HH10 und HH19 sein? Der Nachweis aller Gene einer Zelle basiert auf statistischen Überlegungen und der Nutzung aller Primerkombinationen (s. 2.4.2.1). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Auswahl der Primer anhand der Ergebnisse der Vorversuche, also eher zufällig (s. 2.4.2). Das könnte, ungewollt, eine verstärkte Amplifikation von HH19-Produkten zur Folge gehabt haben. Vielleicht wurden durch „unpassende“ Primerpaare die positionsmarkierenden Gene nicht erfasst bzw. nicht differentiell dargestellt. Durch DNA Co-Migration im PAA-Gel (s. 4.2.1.4), könnten eventuelle Unterschiede maskiert worden sein. Es ist durchaus denkbar, dass sich

Kandidatengene außerhalb des reamplifizierbaren Größenbereiches befanden (s. 4.1.2.4). Auch der Verlust an DNA war durch die vielen Arbeitsschritte wahrscheinlich nicht unerheblich.

Eine weitere Ursache könnte in einer unterschiedlich hohen Expression von Genen der Augenanlagen beider verwandter Stadien begründet liegen. Wenn in den optischen Vesikeln von HH10 deutlich weniger Gene exprimiert werden als in den Anlagen von HH19, ist auch die Wahrscheinlichkeit, diese zu erfassen, geringer. So ist in HH19 die Positionsdeterminierung zwar abgeschlossen, das Auge als solches wird jedoch modelliert (Bildung von Neuro- und Pigmentepithel, Retina und Linse) und die optischen Bahnen werden durch auswachsende retinale Fasern angelegt (*Nervus opticus - Chiasma opticum - Tractus opticus*, s. 1.1.3). Entsprechend viele Gene sind aktiv.

Es ist wahrscheinlich, dass zwar verschiedene differentiell exprimierte Gene wie CBF-1 und CBF-2 zum Zeitpunkt des HH10-Stadiums noch deutlich nachweisbar sind, andere dagegen nicht mehr. Das heißt, es müssten mehr jüngere Stadien untersucht und innerhalb dieser eine noch exaktere Unterscheidung eingeführt werden. In der Zahl der potentiell abregulierten Gene unterscheiden sich beide hier verwandten Stadien kaum. Auch hier könnten in HH10 bereits viele Gene abreguliert sein, so dass sie nicht mehr erfasst werden konnten. Im HH19-Stadium wird wahrscheinlich kaum abreguliert, sondern differenziert (s. o.).

Vielleicht war die Wahl von Stadien, welche in ihrer Entwicklung so weit voneinander entfernt liegen, falsch. Es ist ebenso möglich, dass Gene und ihre Produkte in ihrem Zusammenwirken und nicht in ihrer differentiellen Expression positionsdeterminierend wirken und dadurch mit der DD-Analyse nicht zu erfassen waren.

4.3.1 Erläuterungen zu den verschiedenen Genen

4.3.1.1 Positivkontrollen

Das hoch konservierte „housekeeping“ Gen **β -Aktin** wird in jeder Zelle exprimiert. Seine ubiquitäre Expression wurde mit Hilfe der PCR nachgewiesen (s. Abb. 6/A) und durch die ISH bestätigt (s. Abb. 10).

CBF-1 wird ab Stadium HH9 asymmetrisch exprimiert und ist auf die nasale Retina, das Pigmentepithel und das Telencephalon beschränkt (Yuasa et al., 1996). Mittels ISH konnte eine nasale Expression in den Augenanlagen von HH10 bestätigt werden. Bei dem älteren Stadium läßt sich eine gradierte Expression detektieren: CBF-1 wird im gesamten Neuroepithel des Auges exprimiert, jedoch ist der Expressionslevel in der anterioren Region deutlich stärker (s. Abb. 12). In der vorangegangenen PCR (s. Abb. 6/C) war diese Aussage nicht so eindeutig. Es konnte eine stärkere Expression in HH10 als in HH19 festgestellt werden, jedoch kein eindeutiger anterior-posterior Gradient. **CBF-2** wird asymmetrisch in der posterioren Retina, im assoziierten Pigmentepithel und in Teilen des Diencephalon ab HH9 exprimiert (Yuasa et al., 1996). In der PCR konnte keine eindeutig posteriore Expression nachgewiesen werden (nur LPI, RPII, s. Abb. 6/D), dafür jedoch in der ISH. Dort wurde im HH19-Stadium zusätzlich CBF-2 im Sehnerven nachgewiesen (s. Abb. 13). CBF-1 und CBF-2 sind Mitglieder der Winged-helix Familie (WH-Domäne = DNA-bindendes Motiv) und regional-spezifische Transkriptions-Regulatoren. Sie sind Homologe zu HNF-3 der Vertebraten und identisch mit *forkhead* in *Drosophila* (Kaufmann und Knöchel, 1996, zur Übersicht).

Die Expression von **Pax-6** ist im frühen Kopfektoderm, im Linsenvesikel (initiiert Linsenentwicklung aus dem Oberflächenektoderm), in der Retina, im retinalen Pigmentepithel, im Neuraepithel des Vorderhirns und im Rückenmark (7-10 Somiten-Stadien) nachweisbar. Pax-6 ist essentiell für die Multipotenz retinaler „Progenitorzellen“ (Marquardt et al., 2001) sowie für eine normale Entwicklung von z. B. Gehirn, Auge (Linse, Retina) und Nase (Grindley et al., 1995; Ashery-Padan et al., 2000). Pax-6 hat, wie alle Mitglieder der Pax-Gen-Familie (Walter et al., 1991) während der Entwicklung regulatorische Funktion. Als DNA bindender Transkriptionsfaktor reguliert er u. a. die Expression von Kristallinen (Cvekl und Piatigorsky, 1996; Duncan et al., 1998; Piatigorsky, 1998). Anhand der PCR-Ergebnisse (s. Abb. 6/B) wurde auch in der ISH (s. Abb. 11) eine stärkere Expression in HH10 als in HH19 erwartet. Das bestätigte sich teilweise, da in HH10 ein Nachweis von Pax-6 im Pros- und Mesencephalon sowie in den optischen Vesikeln gelang. Im älteren Embryo ist die Expression auf das Linsen- und Neuroepithel der Augenanlage und den Sehnerven beschränkt (s. Abb. 11).

Mit Hilfe dieser Positivkontrollen konnte die methodische Beherrschung (d. h. Vermeidung von grundsätzlichen technischen Fehlern) der ISH nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass weder die DD-Analyse noch die PCR allein für ausreichend klare und vor allem eindeutige Ergebnisse und Aussagen geeignet sind. Beide sollten zusätzlich überprüft werden (z. B. zweite PCR mit anderen Primer). Dafür spricht auch, dass in einer PCR die spezifischen Primer eine falsche Basenpaarung weniger gut tolerieren, als die deutlich längere RNA-Sonde in einer ISH. Außerdem kann die PCR aufgrund ihrer Sensitivität eventuell vorhandene Unterschiede maskieren, indem die verschiedenen Präparationen bereits von Zellen einer anderen Region „verunreinigt“ waren, bevor die RNA isoliert wurde (s. 4.1). Das würde z. B. den Unterschied zwischen PCR und ISH bei CBF-2 erklären (s. o.).

4.3.1.2 Sequenzierung und „BLAST“-Analysen

Mit „Probe 20“ wurde in der DD-Analyse eine Abregulation im Stadium HH19 benannt. Dabei wurde eine Expression ausschließlich in den posterioren Regionen identifiziert. (s. Tab. 9). Nach einer „BLAST“-Analyse der NCBI-Datenbank konnte kein Gen mit einer ausreichenden Homologie zugeordnet werden. Ein „Zufallstreffer“ (hoher Wahrscheinlichkeitswert) bezog sich auf das Gen **α B-Kristallin**. Dieses Gen kodiert für ein kleines Hitzeschock-Protein, welches als molekularer Chaperon agieren kann (Horwitz, 1992). Es ist eines der wichtigsten Strukturproteine der Linse, wurde aber auch in anderen Geweben (Testikel, Muskel, Herz, Lunge, Niere) nachgewiesen (Dubin et al., 1989; Sawada et al., 1992; Sax and Piatigorsky, 1994; Macip et al., 1997; Oertel et al., 2000). Kristalline werden durch ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren reguliert, z. B. durch Pax-6 (Piatigorsky, 1998, zur Übersicht) und sind u. a. für die Refraktionseigenschaften der Linse verantwortlich (Wistow und Piatigorsky, 1988; Cvekl und Piatigorsky, 1996). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde α B-Kristallin für eine weitere Untersuchung (ISH) herangezogen. Mit Hilfe der PCR wurde α B-Kristallin in HH10 und HH19 gleichermaßen nachgewiesen (s. Abb. 8/A), während in der ISH eine fehlende Expression in den Augenanlagen von HH10 detektiert werden konnte (s. Abb. 14). Es ist deutlich zu erkennen, dass α B-Kristallin nicht gradiert, sondern gleichmäßig über die gesamte Linse und einem schmalen Neuroepithel-Streifen exprimiert wird. Macip et al. (1997) untersuchten verschiedene Gewebe von Hühnchenembryonen (E6 und E8) und verglichen deren Kristallin-cDNAs. Eine asymmetrische Verteilung wurde jedoch nicht ermittelt. Interessant in der vorliegenden Arbeit

war die Expression im prospektiven Nierengewebe in HH10 (s. Abb. 14). Obwohl die Expression von α B-Kristallin in der Niere in Maus, Ratte und Mensch bekannt ist, beschränkte sich diese häufig auf nachgeburtliche Untersuchungen, so dass die Daten nicht verglichen werden konnten (Iwaki et al., 1991). Aufgrund der vorliegenden Daten (PCR, ISH) ist α B-Kristallin wahrscheinlich nicht im Sinne einer Positionsdetermination durch differentielle Expression an der Entwicklung der Augenanlagen beteiligt, aber eindeutig am Aufbau der Linse (bereits im Stadium HH19). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Probe 20 zwar nicht homolog zu α B-Kristallin ist, jedoch durch die „BLAST“-Analyse der EST-Datenbank einem Hühnchen-Klon, d. h. einer existenten Hühnchen-mRNA zugeordnet werden konnte. Eine nähere Charakterisierung dieses Klons steht noch aus. Durch eine ISH mit dieser Sequenz und der von Probe 20 könnte eine Lokalisation sowie eine potentiell differentielle Expression untersucht werden.

Ip3ka (Inositol 1,4,5-triphosphat-3-kinase) vermittelt u. a. die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium, ist an der Entfernung des Kalzium-freisetzenden „second messenger“ $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (Drayer et al., 1996) und der Erzeugung von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ (mutmaßlicher „second messenger“ und zentraler Vorläufer vieler hoch phosphorylierten Inositolphosphate) beteiligt (Fukuda und Mikoshiba, 1997, zur Übersicht). Als Ergebnis von DD-Analyse und Sequenzierung wurden zwei Proben ermittelt, die potentiell differentiel exprimiert erschienen (s. Tab. 9). Beide wurden anhand der „BLAST“-Analyse Ip3ka zugeordnet, obwohl im Falle von Probe 24 nicht von einer Homologie gesprochen werden kann. Im Vergleich beider Proben wurde jedoch eine 51%ige Homologie zwischen diesen beiden festgestellt. Trotz des großen Wahrscheinlichkeitswertes (s. Tab. 10) wurde der Hinweis auf Ip3ka weiter untersucht (PCR, ISH). Eine potentielle asymmetrische Expression (s. Tab. 9) muss jedoch anhand der Ergebnisse der PCR als falsch verworfen werden (s. Abb. 8/C). Eine Kontrolle mit Hilfe der ISH war aufgrund deren unspezifischen Färbung nicht möglich.

DeltaEF-1 (δ EF1; δ -crystallin/E2-box factor 1) wurde als Repressor des δ 1-Crystallin „Enhancer“ beim Hühnchenembryo entdeckt (Funahashi et al., 1991) und ist inzwischen als Transkriptionsrepressor, welcher an die CACCTG-Sequenz (E2-Box) bindet, umfangreich beschrieben worden. δ EF1 trägt sieben Zink-Finger-Motive in zwei Clustern, eine Homeodomäne und ist homolog zu *zfh1* in Drosophila (Sekido et al., 1994; Sekido et al., 1996). DeltaEF-1 wurde anhand der „BLAST“-Analyse dem Klon 23.3 zugeordnet, welcher

jedoch eine fast 100%ige Homologie zu den Klonen 23.1 und 23.2 zeigte und es sich damit um ein und dasselbe Gen handeln müsste. Mittels PCR wurde eine gleichmäßige Expression in HH10 und eine fast vollständige Abregulation im gesamten Stadium HH19 nachgewiesen (s. Abb. 8/B). Das würde lediglich für eine zeitlich begrenzte, jedoch nicht für eine differentielle Expression sprechen. Eine Bestätigung durch die ISH war aufgrund der unspezifischen Färbung nicht möglich. Die immunhistologische Untersuchung an Hühnchenembryonen zeigte, dass die Expression von DeltaEF-1 nicht auf die Linse beschränkt ist, sondern im zentralen Nervensystem, in Neuralrohr-Derivaten und im Mesoderm weitverbreitet ist (Funahashi et al., 1993). Anhand dieser Untersuchungen beginnt die Expression von δ EF1 zwischen HH10 und HH12 im Mesoderm, ist im späten HH10 bzw. frühen HH11 im Kopfmesoderm und danach z. B. im Notochord, den Somiten, im Herz und im Amnion nachweisbar. Die erste schwache Expression in Retina und Linse wurde ab HH18 detektiert, nach dem Beginn der δ -Kristallin Expression (Funahashi et al., 1993). Die in vorliegenden Arbeit mittels PCR nachgewiesene Expression im HH10 würde diese Erkenntnisse stützen, auch wenn der Nachweis in HH19 nicht gelang. Von einer potentiellen asymmetrischen Expression muss Abstand genommen werden.

Numb ist im Hühnchen u. a. im basalen Cortex mitotischer neuroepithelialer Zellen lokalisiert, unterdrückt den Notch-Signalweg in neugeborenen prospektiven Neuronen (Wakamatsu et al., 1999) und führt damit zu einer neuronalen Differenzierung. Numb inhibiert die Signalaktivität von Notch: es bindet direkt an die intrazelluläre Domäne von aktiviertem Notch-1 und verhindert dadurch dessen Translokation zum Kern (Wakamatsu et al., 1999). Die essentielle Rolle von Numb während der corticalen Neurogenese, seine asymmetrische Expression in der apicalen Membran sich teilender corticaler Vorläuferzellen, welche zu deren Proliferation und Differenzierung führt, wurde an Mäusen beschrieben (Zhong et al., 1997; Zhong et al., 2000.). Im Gegensatz dazu steht die Numb-Konzentration an der basalen Seite von mitotischen Zellen in der sich entwickelnden Hühnchenretina (Silva et al., 2002). Diese Gegensätze sind nicht vollständig verstanden und werden teilweise durch die verschiedenen Isoformen von Numb erklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde Numb dem Klon 23.2 zufällig, aufgrund der „BLAST“-Analyse der NCBI-Datenbank, zugeordnet. Die Homologie aller drei Klone der Probe 23 wurde mehrfach erwähnt (s.3.7). Das Expressionsmuster (PCR) gleicht dem von Ip3ka und DeltaEF-1: gleichmäßig exprimiert in HH10, Abregulation in HH19 (s. Abb. 8/D), der Nachweis mittels einer ISH blieb

unspezifisch. Die Vermutung einer asymmetrischen Expression konnte nicht manifestiert werden. Silva et al. (2000) untersuchten sich differenzierende Zellen in der Retina von HH18, HH23 und HH27 mit Hilfe des RA4- und eines Numb-Antikörpers. Der Nachweis gelang sicher im Stadium HH23. Das bedeutet, dass in HH19 Numb nicht abreguliert, sondern nicht exprimiert wird, was durch das Ergebnis der PCR gestützt wird.

Notch-1 wurde nicht über das DD nachgewiesen, sondern aufgrund des engen Zusammenhanges zur neuronalen Differenzierung ausgewählt. Notch kontrolliert die Zahl der sich entwickelnden Ganglienzellen, indem es deren Differenzierung unterdrückt (Austin et al., 1995; Wakamatsu et al., 2000). Sein Genprodukt ist ein Transmembranprotein (mit verschiedenen Isoformen), dessen intrazelluläre Domäne mit unterschiedlichen zytoplasmatischen und nukleären Faktoren interagiert. Notch gilt als weitverbreiteter Universalempfänger für extrazelluläre Signale und zentrales Element bei der Zellkommunikation (Artavanis-Tsakonas et al., 1999, zur Übersicht). Die PCR ließ dabei auf eine relativ gleichmäßige Expression in HH10 und nur eine sehr geringe Aktivität in HH19 schließen (s. Abb. 9). Die Ähnlichkeit zum Expressionsmuster von Numb sind offensichtlich. Da Austin et al. (1995) die Expression von Notch im HH24 nachwies, wurde die Expression in HH19 nicht abreguliert, sondern wahrscheinlich noch nicht begonnen (s. Numb). Notch-1 wurde in der PCR und in der ISH im gesamten neuronalen System am HH10 nachgewiesen. Die nur in der ISH sichtbare stark posterior begrenzte Expression in den Augenanlagen ließ auf eine Asymmetrie schließen (s. Abb. 9, 15), was das Ergebnis der PCR nicht bestätigte. Die Färbung der ISH in HH19 ist zu unspezifisch, als dass eine eindeutige Aussage gemacht werden könnte.

Im Gegensatz zu den Positivkontrollen gelang die ISH der beschriebenen Gene häufig nicht. Die Ursache könnte sowohl in einem generell hohen Level an Ip3ka, Numb, DeltaEF-1 und Notch-1 liegen als auch in einer ubiquitären Verteilung dieser Gene in verschiedenen Stadien der Entwicklung. Das trifft wahrscheinlich besonders auf die jüngeren Stadien zu (s. PCR, Abb. 8, 9). Darum sind eventuelle Unterschiede in der Expressionsstärke durch eine ISH nicht mehr zu detektieren. Bereits Haddon et al. (1998) bezweifelten, ob die Sensitivität einer ISH immer ausreicht, um eine bestimmte Expression zu identifizieren. Zwar ist bei einer ISH mit radioaktiven Sonden an Schnittpräparaten die Sensitivität deutlich größer, aber auch hier kann eine eindeutige Aussage nicht gewährleistet werden.

Anhand der Daten wird eine deutliche Diskrepanz zwischen den sequenzierten Proben und den daraus resultierenden Ergebnissen der „BLAST“-Analysen sichtbar. Etwa 50% dieser Sequenzen zeigten Homologien zu Bakterien und Plasmiden oder wurden anhand ihrer großen Wahrscheinlichkeitswerte nicht weiter untersucht. Warum können so viele Sequenzen nicht wirklich zugeordnet werden? Trotz ständiger Kontrollen können Verunreinigungen natürlich nie ausgeschlossen werden, aber die verwandten Kits und Reagenzien sollten als Hauptursache ausscheiden. Eine weitere Möglichkeit könnte in einer unsachgemäßen Behandlung der DNA liegen, welche durch die Kontrollen jedoch ebenfalls ausgeschlossen werden kann. Vielleicht haben auch die vielen verschiedenen Arbeitsschritte die DNA zerstört oder es wurden Mutationen verursacht. Das kann natürlich passieren, jedoch nicht in diesem Umfang. Der Grund ist eher in den Primerkombinationen zu suchen. Zum einen könnten dadurch vor allem nichttranskribierte Bereiche amplifiziert worden sein, zum anderen können die Primer einfach „unpassend“ gewesen sein (Bauer et al., 1994; s. 4.2.1.3). Auch der Probenumfang war wahrscheinlich zu klein. So sind noch 48 Banden zu bearbeiten und 14 Proben zu sequenzieren (s. 3.7).

Alle zuvor als potentiell differentiell beschriebenen Proben konnten keinem bekannten Gen anhand einer Homologie eindeutig zugeordnet werden. Es wurden zwar PCRs und ISH durchgeführt, diese hatten ihre Grundlage aber in den Sequenzen der „Originalgene“, um Folgefehler zu vermeiden (NCBI-Datenbankrecherche, s.3.8, 8.9). Für die analysierten Proben konnten jedoch Hühnchen-spezifische Klone ermittelt werden. Das bedeutet, die anhand der DD-Analyse identifizierten Kandidaten konnten einer Hühnchen-mRNA zugeordnet werden, auch wenn nicht alle in der EST-Datenbank mit einem bekannten Gen verknüpft waren. Durch PCR und ISH könnte eine nähere Charakterisierung dieser Klone (anhand ihrer Sequenzen und der Sequenzen der Proben) gelingen. Damit wäre es möglich, Aussagen über die gewebsspezifischen Lokalisationen zu treffen. Gleichzeitig wären, durch die Analyse weiterer Stadien vor und nach HH19, die exakten Expressionszeitpunkte zu ermitteln. Die verschiedenen Expressionsmuster der Kandidatenproben, der Hühnchenklone und der bisher untersuchten Gene könnten dann miteinander verglichen und vielleicht verschiedene Wechselwirkungen erkannt werden.

5 Ausblick

Die DD-Analyse ist in ihrer Etablierung, Optimierung und Durchführung ein sehr anspruchsvolles, jedoch durchaus beherrschbares System. Der Einsatz einer DD-Analyse sollte angestrebt werden, wenn die Ausgangsmaterialien limitiert vorliegen oder es sich um Organismen handelt, deren genetischer Hintergrund nicht oder nur ungenügend bekannt ist. Mit Hilfe der DD-Analyse können neue und bisher nicht annotierte Gene oder ESTs anhand geringer Materialmengen gefunden werden. Der Kostenfaktor ist relativ gering.

Als Alternativen dazu bieten sich die SAGE („serial analysis of gene expression“) Technik und die „Gene-Chip“ Technologie an. Beide Verfahren sind jedoch kostenintensiv und erfordern eine gut etablierte teure Ausstattung inklusive einer entsprechenden Bioinformatik. Die Chip-Technologie benötigt ein Vielfaches an Material, als zur DD-Analyse notwendig ist. Die „Gene-Chips“ können jedoch Organismen-spezifisch angefertigt und mit einer großen Menge verschiedener Gene bestückt werden, was eine enorme Zeiteinsparung bedeutet. Durch die seit Januar 2003 zugängliche BBSRC-EST-Datenbank (enthält ≈ 340000 Hühnchen ESTs) könnten Hühnchen-spezifische Chips hergestellt und analysiert werden. Ein gleichzeitiger Nachteil eines solchen Chips ist seine begrenzte Kapazität. Wirklich neue Gene mit dieser Analyse zu finden, ist sehr schwierig und teuer, die Reproduzierbarkeit noch relativ gering.

Durch eine sich anschließende „Real-time-PCR“, welche aus Zeitgründen in der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnte, könnte eine eindeutige Aussage über Ab- oder Hochregulation von Genen getroffen werden. Die Suche nach differentiell exprimierten positionsmarkierenden Genen in der frühen Augenanlage des Hühnchen könnte erfolgreicher fortgesetzt werden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten differentiell exprimierte Genen in der frühen Augenanlage des Hühnchenembryos identifiziert werden. Hierzu wurde zunächst von mir die Technik des Differential Display (DD), die für diesen Zweck am besten geeignet erschien, im Labor etabliert. Die aus dieser Analyse resultierenden Kandidatengene wurden sequenziert und durch *in situ* Hybridisierung (ISH) wurde deren gewebspezifisches Expressionsmuster charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine DD-Analyse in der Lage ist, eine differentielle Expression von Genen zu erfassen. Sie ermöglicht einen parallelen systematischen Vergleich verschiedener Proben mit sehr wenig Ausgangsmaterial. Die DD-Technik ist hoch sensitiv und deshalb anfällig für geringste DNA-Kontaminationen, die jedoch in dieser Arbeit ausgeschaltet werden konnten. Durch die verwandte Silberfärbung konnten kleinste DNA-Mengen nachgewiesen werden, der anschließenden Reamplifikation waren jedoch ab einer bestimmten Fragmentgröße Grenzen gesetzt, so dass sowohl die Isolierung der DNA aus dem Gel als auch deren Reamplifikation weiter optimiert werden sollte.

Es wurden 85 potentiell differentiell exprimierte Gene / Banden mittels der in dieser Arbeit durchgeführten DD-Analyse gefunden, von denen 23 isoliert und sequenziert wurden. Die Sequenzen von 11 dieser Proben wurden mit Hilfe der „BLAST“-Analyse der NCBI- und EST-Datenbank charakterisiert. Anhand von PCR und „whole mount“ *in situ* Hybridisierung konnte keine der bisher näher charakterisierten Proben in ihrem vermuteten Expressionsmuster eindeutig bestätigt werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass die gemachten Vermutungen, bezüglich einer differentiellen Expression, falsch waren. Gleichzeitig konnte jedoch jeder Probe ein spezifischer Klon in der BBSRC-EST-Datenbank und damit eine reelle Hühnchen-mRNA zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Gene mit eindeutig differentieller Expression identifiziert werden, was die Grenzen des Verfahrens bei komplex aufgebauten Systemen aufzeichnet. Eine exaktere Isolierung des zu untersuchenden Gewebes z. B. mit Hilfe der Mikrodissektion sollte jedoch eine wesentlich bessere Ausgangsbasis darstellen und könnte bei allen Verfahren der Genexpressionsstudien, falls möglich, in Zukunft angewendet werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, T. W. (2001): Preparation of nonradioactive probes for *in situ* hybridization. *Methods* 23: 297-302.
- Adati, N., T. Ito, C. Koga, K. Kito, Y. Sakaki, K. Shiokawa (1995): Differential display analysis of gene expression in developing embryos of *Xenopus laevis*. *Biochim Biophys Acta* 1262: 43-51.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Artavanis-Tsakonis, S., M. D. Rand, and R. J. Lake (1999): Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776.
- Ashery-Padan, R., T. Marquardt, X. Zhou, and P. Gruss (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.
- Austin, C. P., D. E. Feldmann, J. A. Ida, Jr. and C. L. Cepko (1995): Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of *Notch*. *Dev* 121: 3637-3650.
- Bao, Z.-Z., and C. L. Cepko (1997): The expression and function of *Notch* pathway genes in the developing rat eye. *J Neurosci* 17 (4): 1425-1434.
- Barbieri, A. M., V. Broccoli, P. Bovolenta, G. Alfano, A. Marchitello, C. Mocchetti, L. Crippa, A. Bulfone, V. Marigo, A. Ballabio, and S. Banfi (2002): *Vax2* inactivation in mouse determines alteration of eye dorsal-ventral axis, misrouting of the optic fibres and eye coloboma. *Development* 129: 805-813.
- Basch, M. L., M. A. J. Selleck, M. Bronner-Fraser (2000): Timing and competence of neural crest formation. *Dev Neurosci* 22: 217-227.
- Bassam, B. J., G. Caetano-Anollés, and P. M. Gresshoff (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196: 80-83.
- Bauer, D., H. Müller, J. Reich, H. Riedel, V. Ahrenkiel, P. Warthoe, and M. Strauss (1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR) *Nucleic Acids Res* 21 (18): 4272-4280.
- Bauer, D., P. Warthoe, M. Rohde, and M. Strauss (1994): Detection and differential display of expressed genes by DDRT-PCR. *PCR Methods and Applications (Manual Supplement)* 4: 97-108.

- Begum, N. A., S. Tsuji, M. Nomura, K. Shida, I. Azuma, A. Hayashi, M. Matsumoto, T. Seya, and K. Toyoshima (1999): Human MD-1 homologue is a BCG-regulated gene product in monocytes: its identification by differential display. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 325-329.
- Boardman, P. E., J. Sanz-Ezquerro, I. M. Overton, D. W. Burt, E. Bosch, W. T. Fong, C. Tickle, W. R. A. Brown, S. A. Wilson, and S. J. Hubbard (2002): A comprehensive collection of chicken cDNAs. *Curr Biol* 12: 1965-1969.
- Borghjid, S. and M. A. Q. Siddiqui (2000): Chick homeobox gene *cDlx* expression demarcates the forebrain anlage, indicating the onset of forebrain regional specification at gastrulation. *Dev Neurosci* 22: 183-196.
- Callard, D., B. Lescure, and L. Mazzolini (1994): A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *Biotechniques* 16 (6): 1096-1103.
- Cepko, C. L., C. P. Austin, X. Yang, M. Alexiades, and D. Ezzeddine (1996): Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 589-595.
- Chambers, D., A. D. Medhurst, F. S. Walsh, J. Price, and I. Mason (2000): Differential display of genes expressed at the midbrain-hindbrain junction identifies *sprouty2*: an FGF8-inducible member of a family of intracellular FGF antagonists. *Mol Cell Neurosci* 15: 22-35.
- Chen, Z., K. Swisshelm, and R. Sager (1994): A cautionary note on reaction tubes for differential display and cDNA amplification in thermal cycler. *Biotechniques* 16 (6): 1003-1006.
- Cheng, H.-J., M. Nakamoto, A. D. Bergemann, and J. G. Flanagan (1995): Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic projection map. *Cell* 82: 371-381.
- Connor, R. J., P. Menzel, and E. B. Pasquale (1998): Expression and tyrosine phosphorylation of Eph receptors suggest multiple mechanisms in patterning of the visual system. *Dev Biol* 193: 21-35.
- Cvekl, A., and J. Piatigorsky (1996): Lens development and crystallin gene expression: many roles for Pax-6. *Bioessays* 18: 621-630.
- DeFrancesco, L. (1998): Identify differential expressed genes with differential display kits. *The Scientist: Expression Detection* 12 (7):
- Deitcher, D. L., D. M. Fekete, C. L. Cepko (1994): Asymmetric expression of a novel homeobox gene in vertebrate sensory organs. *J Neurosci* 14 (2): 486-98.
- Diachenko, L. B., J. Ledesma, A. A. Chenchik, and P. D. Siebert (1996): Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 824-828.
- Differential Display News. – 4 (1). – 1999: www.genhunter.com

- Drayer, A. L., X. Pesesse, F. DeSmedt, D. Communi, C. Moreau, C. Emeux (1996): The family of inositol and phosphatidylinositol phosphate 5-phosphatases. *Biochem Soc Trans* 24: 1001-1005.
- Drescher, U., C. Kremoser, C. Handwerker, J. Loschinger, M. Noda, and F. Bonhoeffer (1995): In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82: 359-370.
- Dubin, R. A., E. F. Wawrousek and J. Piatigorsky (1989): Expression of the murine α B-crystallin gene is not restricted to the lens. *Mol Cell Biol* 9: 1083-1091.
- Dütting, D. and S. Thanos (1995): Early determination of nasal-temporal retinotopic specificity in the eye anlage of the chick embryo. *Dev Biol* 167: 263-281.
- Duncan, M. K., J. I. Haynes II, A. Cvekl, and J. Piatigorsky (1998): Dual Roles for Pax-6: a transcriptional repressor of lens fiber cell-specific β -crystallin genes. *Mol Cell Biol* 18 (9): 5579-5586.
- Fukuda, M. and K. Mikoshiba (1997): The function of inositol high polyphosphate binding proteins. *BioEssays* 19: 593-603.
- Funahashi, J., Y. Kamachi, K. Goto, and H. Kondoh (1991): Identification of nuclear factor δ EF1 and its binding site essential for lens-specific activity of the δ 1-crystallin enhancer. *Nucleic Acids Res* 19: 3543-3547.
- Funahashi, J., R. Sekido, K. Murai, Y. Kamachi, and H. Kondoh (1993): δ -crystallin enhancer binding protein δ EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. *Dev* 119: 433-446.
- Gandrillon, O., F. Solari, C. Legrand, P. Jurdic, and J. Samarut (1996): A rapid and convenient method to prepare DIG-labelled RNA probes for use in non-radioactive *in situ* hybridization. *Mol Cell Probes* 10: 51-55.
- Grindley, J. C., D. R. Davidson, and R. E. Hill (1995): The role of *Pax-6* in eye and nasal development. *Development* 121: 1433-1442.
- Haddon, C., L. Smithers, S. Schneider-Maunoury, T. Coche, D. Henrique, and J. Lewis (1998): Multiple *delta* genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development* 125: 359-370.
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 88: 49-92.
- Hauptmann, G. (2001): One-, two-, and three-color whole-mount *in situ* hybridization to *Drosophila* embryos. *Methods* 23: 359-372.
- Hong, Y.-M. (1997): Investigation of asymmetric mRNA expression in retinal ganglion cells of adult rats and the retinal neuroepithelium of chick embryos using differential display polymerase chain reaction. *Dissertation*. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

- Hong, Y.-M., S. von Kannen, and S. Thanos (1998): Asymmetrical mRNA expression in the retinal neuroepithelium of the chick embryo assessed by differential display polymerase chain reaction. *Neuroreport* 9: 000-000.
- Horwitz, J. (1992): α -Crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10449-10453.
- Iwaki, T., A. Iwaki, R. K. Liem, J. E. Goldmann (1991): Expression of alpha B-crystallin in the developing rat kidney. *Kidney Int* 40 (1): 52-56.
- Jowett, T. (2001): Double *in situ* hybridization techniques in Zebrafish. *Methods* 23: 345-358.
- Kahn, A. J. (1974): An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev Biol* 38: 30-40.
- Kaufmann, E., W. Knöchel (1996): Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* 57: 3-20.
- Keyvani, K., S. Reinecke, H. F. Abts, W. Paulus, O. W. Witte (2000): Suppression of proteasome C2 contralateral to ischemic lesions in rat brain. *Brain Res* 858: 386-392.
- Kiryu, S., G. L. Yao, N. Morita, H. Kato, and H. Kiyama (1995): Nerve injury enhances rat neuronal glutamate transporter expression. Identification by differential display PCR. *J Neurosci* 15 (12): 7872-7878.
- Kociok, N., K. Unfried, P. Esser, R. Krott, U. Schraermeyer, and K. Heimann (1998): The nonradioisotopic representation of differentially expressed mRNA by a combination of RNA fingerprinting and differential display. *Mol Biotechnol* 9: 25-33.
- Liang, P. and A. B. Pardee (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Liang, P. and A. B. Pardee (1995): Recent advances in differential display. *Curr Opin Immunol* 7: 274-280.
- Liang, P., L. Averboukh, K. Keyomarsi, R. Sager, and A. B. Pardee (1992): Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer *versus* mammary epithelial cells. *Cancer Res* 52: 6966-6968.
- Liang, P., L. Averboukh, and A. B. Pardee (1993): Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* 21 (14): 3269-3275.
- Liang, P., W. Zhu, X. Zhang, Z. Guo, R. P. O'Connell, L. Averboukh, F. Wang, and A. B. Pardee (1994): Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res* 22 (25): 5763-5764.
- Liang, P., D. Bauer, L. Averboukh, P. Warthoe, M. Rohrwild, H. Muller, M. Strauss, and A. B. Pardee (1995): Analysis of altered gene expression by differential display. *Methods Enzymol* 254: 304-321.

- Livesey, F. J. and S. P. Hunt (1996): Identifying changes in gene expression in the nervous system: mRNA differential display. *TINS* 19 (3): 84-88.
- Livesey, F. J. and S. P. Hunt (1998): Differential display cloning of genes induced in regenerating neurons. *Methods* 16: 386-395.
- Lohmann, J., H. Schickle, and T. C. G. Bosch (1995): REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Biotechniques* 18 (2): 200-202.
- Macip, S., C. Mezquita, J. Mezquita (1997): Alternative transcriptional initiation and alternative use of polydenylation signals in the α B-crystallin gene expressed in different chicken tissues. *Gene* 187: 253-257.
- Mahadeva, H., M. P. Starkey, F. N. Sheikh, C. R. Mundy, N. J. Samani (1998): A simple and efficient method for the isolation of differentially expressed genes. *J Mol Biol* 284: 1391-1398.
- Marquardt, T., R. Ashery-Padan, N. Andrejewski, R. Scardigli, F. Guillemot, and P. Gruss (2001): *Pax6* is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105 (1): 43-55.
- Martí, E. (2000): Expression of chick BMP-1/Tolloid during patterning of the neural tube and somites. *Mech Dev* 91: 415-419.
- McClelland, M., D. Ralph, R. Cheng, and J. Welsh (1994): Interactions among regulators of RNA abundance characterized using RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *Nucleic Acids Res* 22 (21): 4419-4431.
- McClelland, M., F. Mathieu-Daudé, and J. Welsh (1995): RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet* 11 (6).
- 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: 343-379.
- Monschau, B. (1995): Etablierung der "Differential Display"-Methode: Suche nach unterschiedlich exprimierten mRNA-Spezies in nasaler und temporaler Retina des embryonalen Huhns. *Diplomarbeit*. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Mou, L., H. Miller, J. Li, E. Wang, and L. Chalifour (1994): Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 199 (2): 564-569.
- Müller, B. K., D. Dütting, A. Haase, A. Feucht, P. Macchi (1998): Partial respecification of nasotemporal polarity in double-temporal chick and chimeric chick-quail eyes. *Mech Dev* 74: 15-28.
- Nicholl, D. S. T.: *Gentechnische Methoden*. – Heidelberg [u. a.] : Spektrum Akad. Verl., 1995.
- Nieto, M. A., K. Patel, and D. G. Wilkinson (1996): *In situ* hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Methods Cell Biol* 51: 219-235.

- Oertel, M. F., C. A. May, H. Bloemendal, E. Lütjen-Drecoll (2000): Alpha-B-Crystallin expression in tissue derived from different species in different age groups. *Ophthalmologica* 214: 13-23.
- Parr, B. A., M. J. Shea, G. Vassileva, and A. P. McMahon (1993): Mouse *Wnt* genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* 119: 247-261.
- Patten, B. M.: Early Embryology of the Chick. – 5th Edition. – New York : McGraw-Hill, 1971.
- Pennekamp, P., C. Karcher, A. Fischer, A. Schweickert, B. Skryabin, J. Horst, M. Blum, and B. Dworniczak (2002): The ion channel Polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol* 12: 1-20.
- Piatigorsky, J. (1998): Multifunctional lens crystallins and corneal enzymes. More than meets the eye. *Ann N Y Acad Sci* 842: 7-15.
- Poirier, G. M.-C., J. Pyati, J. S. Wan, and M. G. Erlander (1997): Screening differential expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Res* 25 (4): 913-914.
- Rager, G. (1980): Die Ontogenese der retinotopen Projektion: Beobachtung und Reflexion. *Naturwissenschaften* 67: 280-287.
- Riddle, R. D., R. L. Johnson, E. Laufer, and C. Tabin (1993): *Sonic hedgehog* mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-1416.
- Riddle, R. D., M. Ensini, C. Nelson, T. Tsuchida, T. M. Jessell, and C. Tabin (1995): Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83: 631-640.
- Roche Molecular Biochemicals: Nonradioactive In Situ Hybridization, Application Manual. - 2. Aufl. - Boehringer Mannheim – Roche, 1996
- Roche Molecular Biochemicals: DIG Application Manual for Filter Hybridization. - Boehringer Mannheim – Roche, 2000.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis: Molecular Cloning: A Laboratory Manual I-III. – 2nd ed. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sasaki, H. and B. L. M. Hogan (1993): Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* 118: 47-59.
- Sawada, K., K. Agata, and G. Eguchi (1992): Crystallin gene expression in the process of lentoidogenesis in cultures of chicken lens epithelial cells. *Exp Eye Res*: 879-887.
- Sax, C. M. and J Piatigorsky (1994): Expression of the α -crystallin/small heat shock protein/molecular chaperone genes in the lens and other tissue. *Adv Enzymol* 69: 155-201.

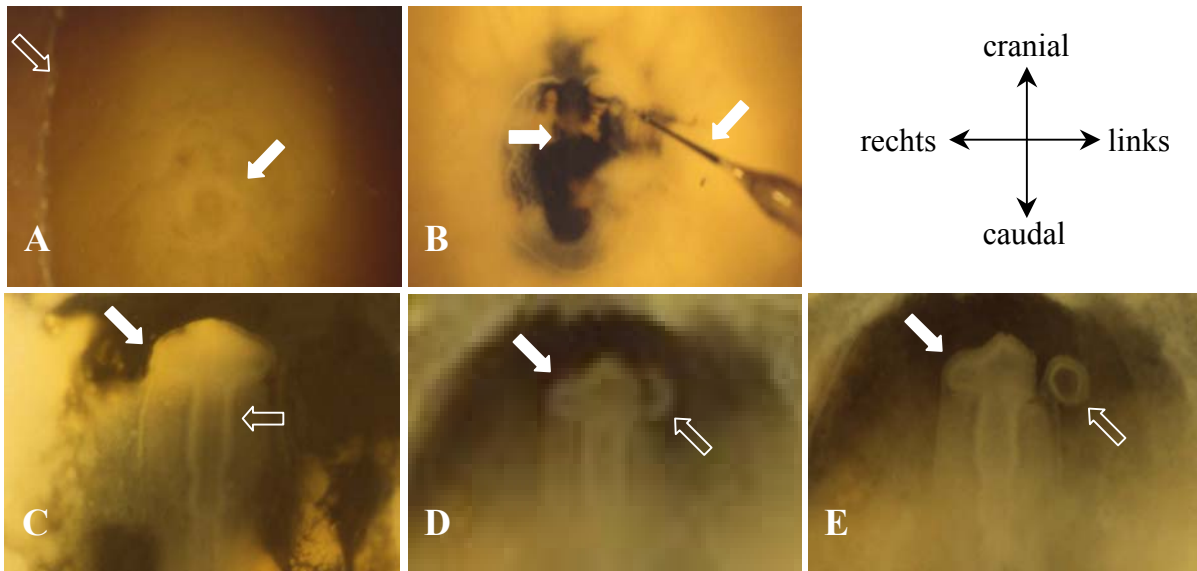
- Schulte, D. and C. L. Cepko (2000): Two homeobox genes define the domain of *EphA3* expression in the developing chick retina. *Dev* 127: 5033-5045.
- Schulte D., T. Furukawa, M. A. Peters, C. A. Kozak, and C. L. Cepko (1999): Misexpression of the Emx-related homeobox genes *cVax* and *mVax2* ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map. *Neuron* 24: 541-553.
- Sekido, R., K. Murai, J.-I. Funahashi, Y. Kamachi, A. Fujisawa-Sehara, Y-I Nabeshima, and H. Kondoh (1994): The δ -Crystallin enhancer-binding protein δ EF1 is a repressor of E2-Box-mediated gene activation. *Mol Cell Biol* 14 (9): 5692-5700.
- Sekido, R., T. Takagi, M. Okanami, H. Moribe, M. Yamamura, Y. Higashi, and H. Kondoh (1996): Organization of the gene encoding transcriptional repressor δ EF1 and cross-species conservation of its domains. *Gene* 173: 227-232.
- Silva, A. O., C. E. Ercole, and S. C. McLoon (2002): Plane of cell cleavage and Numb distribution during cell division relative to cell differentiation in the developing retina. *J Neurosci* 22 (17): 7518-7525.
- Sockolov, B. P. and D. J. Pockop (1994): A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 22 (19): 4009-4015.
- Sperry, R. W. (1963): Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50: 703-710.
- Stahl, B., B. Müller, Y. von Boxberg, E. C. Cox, and F. Bonhoeffer (1990): Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system. *Neuron* 5: 735-743.
- Streit, A. and C. D. Stern (2001): Combined whole-mount *in situ* hybridization and immunohistochemistry in avian embryos. *Methods* 23: 339-344.
- Thanos, S. (1983): Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen der Entwicklung des Verlaufes retinitectaler Nervenfasern im Hühnerembryo. *Dissertation*. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Thanos, S. and J. Mey (2001): Development of the visual system of the chick: II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res Brain Res Rev* 35: 205-245.
- Thanos, S., J. Mey, D. Dütting, and E. Hummler (1996): Positional determination of the naso-temporal retinal axis coincides with asymmetric expression of proteins along the anterior-posterior axis of the eye primordium. *Exp Eye Res* 63: 479-492.
- Thomson, J. M., H. W. Waldrip, and M. M. Compton (1997): Identification of a differential display product associated with apoptosis in chicken thymocytes. *Dev Comp Immunol* 21 (5): 413-424.

- Wakamatsu, Y., T. M. Maynard, S. U. Jones, and J. A. Weston (1999): NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron* 23: 71-81.
- Wakamatsu, Y., T. M. Maynard, and J. Weston (2000): Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Dev* 127: 2811-2821.
- Walter, C., J. L. Guenet, D. Simon, U. Deutsch, B. Jostes, M. D. Goulding, D. Plachov, R. Balling, and P. Gruss (1991): Pax: a murine mutigene family of paired box-containing genes. *Genomics* 11: 424-434.
- Welsh, J. and M. McClelland (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18 (24): 7213-7218.
- Welsh, J., K. Chada, S. S. Dalal, R. Cheng, D. Ralph and M. McClelland (1992): Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* 20 (19): 4965-4970. 91: 639-643.
- Wetmur, J. G., W. T. Ruyechan, and R. J. Douthart (1981): Denaturation and renaturation of *Penicillium chrysogenum* mycophage double-stranded ribonucleic acid tetraalkylammonium salt solutions. *Biochemistry* 20: 2999-3002.
- Wistow, G., and J. Piatigorsky (1988): Lens crystallins: evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu Rev Biochem* 57: 479-504.
- Yamagata, M., A. Mai, G. E. Pollerberg, and M. Noda (1999): Regulatory interrelations among topographic molecules CBF1, CBF2 and EphA3 in the developing chick retina. *Develop Growth Differ* 41: 575-587.
- Yuasa, J., S. Hirano, M. Yamamata, and M. Noda (1996): Visual projection map specified by topographic expression of transcription factors in the retina. *Nature* 382: 632-635.
- Zhang, H., R. Zhang, and P. Liang (1996): Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucleic Acids Res* 24 (14): 2454-2455.
- Zhang, X.-M., E. Lin, X.-J. Yang (2000): Sonic hedgehog-mediated ventralization disrupts formation of the midbrain-hindbrain junction in the chick embryo. *Dev Neurosci* 22: 207-216.
- Zhao, S., G. Molnar, J. Zhang, L. Zheng, L. Averboukh, and A. B. Pardee (1998): 3'-End cDNA pool suitable for differential display from a small number of cells. *Biotechniques* 24: 842-852.
- Zhong, W., M.-M. Jiang, G. Weinmaster, L. Y. Jan, and Y. N. Jan (1997): Differential expression of mammalian Numb, Numlike and Notch1 suggests distinct roles during mouse cortical neurogenesis. *Dev* 124 1887-1897.
- Zhong, W., M.-M. Jiang, M. D. Schonemann, J. J. Meneses, R. A. Pedersen, L. Y. Jan, and Y. N. Jan (2000): Mouse *numb* is an essential gene involved in cortical neurogenesis. *PNAS* 97 (12): 6844-6849.

Zimmermann, J. W. and R. M. Schultz (1994): Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: use of mRNA differential display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5456-5460.

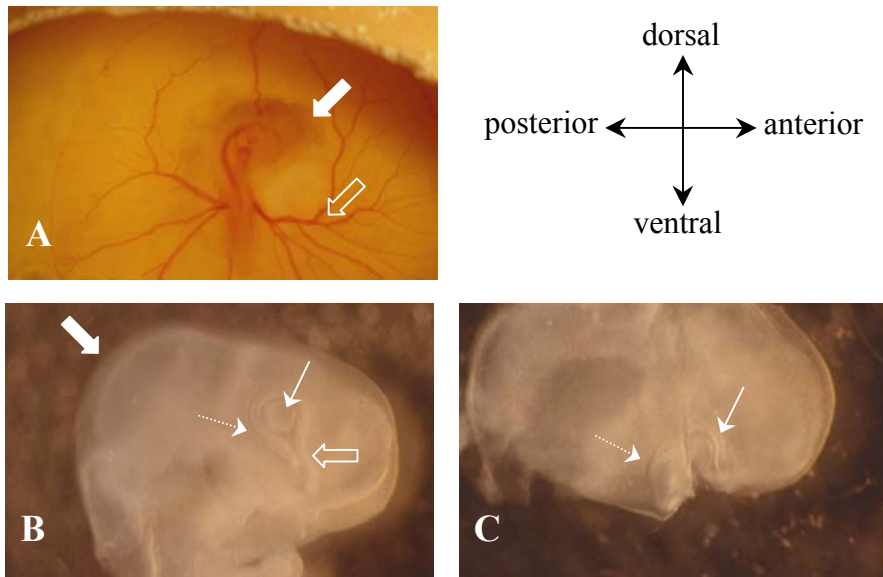
8 Anhang

8.1 Abbildungen zur Präparation: HH10



Präparation der rechten Augenanlage eines Hühnchenembryos im Stadium HH10. (A): Gefensteretes, ca. 44.5h bebrütetes Ei. Dorsale Aufsicht auf das abgesunkene Dotter. Zentral ist der Furchungsbezirk mit dem Embryo zu erkennen (gefüllter Pfeil), der Eierschalenrand ist links zu sehen (transparenter Pfeil). (B): In die Subgerminalhöhle, unter den Embryo (gefüllter Pfeil) wird mittels einer fein ausgezogenen Mikropipette Tinte eingespritzt (transparenter Pfeil). (C): Die rostrale Kopfpartie mit den Augenanlagen (gefüllter Pfeil) wurde vergrößert dargestellt. Deutlich ist das Mesencephalon zu sehen (transparenter Pfeil). (D): Die rechte Augenanlage (transparenter Pfeil) wurde mit Hilfe eines Wolframdrahtes vom Proencephalon abgetrennt. Die linke Augenanlage (gefüllter Pfeil) ist zum Vergleich erhalten worden. (E): Aufsicht auf die rechte, abpräparierte Augenanlage aus (D) (transparenter Pfeil). Deutlich ist seine Becherform zu erkennen. Die linke Augenanlage (gefüllter Pfeil) ist noch nicht präpariert. 12.5x; Abk.: HH: Hamburger-Hamilton.

8.2 Abbildungen zur Präparation: HH19



Präparation der rechten Augenanlage eines Embryos in einem späten HH18-Stadium. Der Embryo hat sich auf die linke Seite gedreht und liegt mit dieser dem Dotter auf. (A): Aufsicht auf den Embryo. Auffällig ist das bereits entwickelte Blutgefäß-System (transparenter Pfeil), welches vor allem den Kopf versorgt. Dieser ist dorso-caudal eingebogen und gegenüber dem restlichen Körper überproportional groß. Der geschlossene Pfeil markiert das rechte Tectum. (B): Der Kopf des dekapitierten Embryos in einer Petrischale mit PBS. Aufsicht auf die rechte Seite. Deutlich sind das große Tectum (gefüllter Pfeil), die Linse (Pfeil), das Neuroepithel (gestrichelter Pfeil) und die optische Fissur (transparenter Pfeil) zu erkennen. (C): Die rechte Augenanlage wurde in eine anteriore (Pfeil) und eine posteriore Region (gestrichelter Pfeil) geteilt. Diese müssen noch vom umliegenden Gewebe freipräpariert und anschließend gesammelt werden. 12.5x; Abk.: HH: Hamburger-Hamilton.

8.3 Das Prinzip der DD-Analyse

Isolierung von total RNA aus Augenanlagen

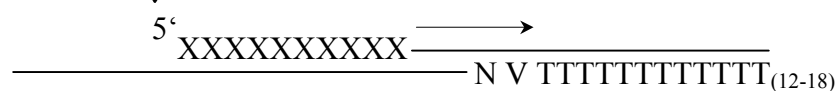
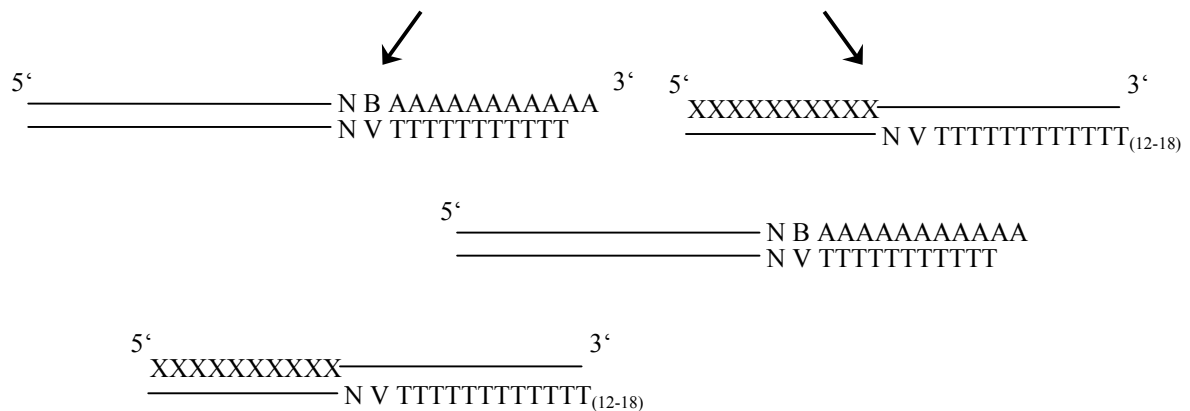
↓ (poly-A⁺-RNA in total-RNA-Probe)cDNA-Synthese mit oligo-d(T)₁₂₋₁₈-Primer

↓



Erster Zyklus der PCR-Reaktion: Hybridisierung des Zufalls-Primers (5'-XXXXXXXXXX-3')

↓

PCR-Amplifikation mit Anker- (5'-T₁₁VN-3') und Zufalls-Primern (5'-XXXXXXXXXX-3')

↓

Gelelektrophorese, Analyse, Reamplifikation, Klonierung, Sequenzierung,

Gencharakterisierung

↓

in vitro Transkription, *in situ* Hybridisierung

Prinzip des in der vorliegenden Arbeit verwandten Differential Displays (modifiziert nach Liang und Pardee (1992) und Bauer et al. (1994) mit der Angabe der auf die Analyse folgenden Arbeiten.

Abk.: **B**: die Nukleotide G, T, C; **N**: die Nukleotide: G, A, T, C; **V**: die Nukleotide G, A, C

8.4 Genotyp des TOP10F^c *E. coli* Stammes

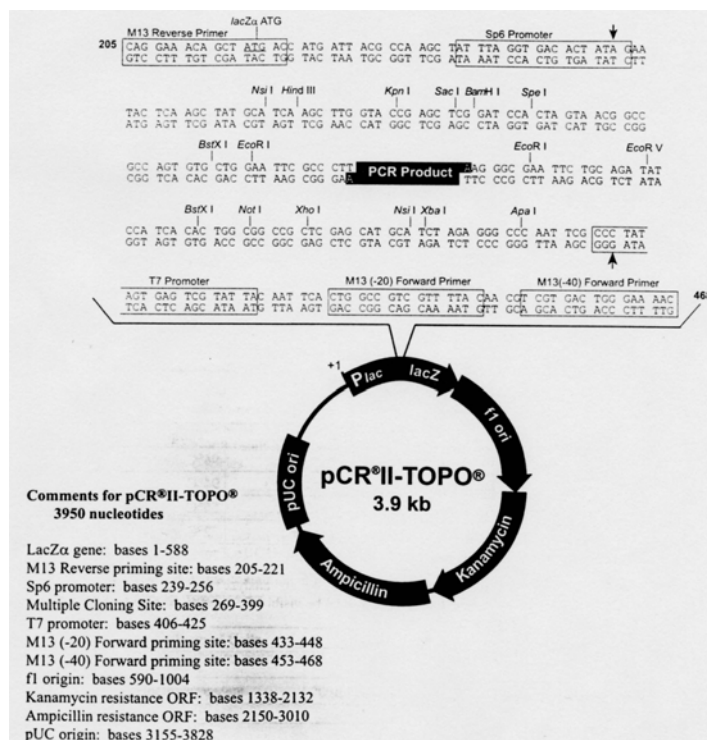
TOPO TA Cloning[®] Kit:

F^c {*lacI^q* Tn10 (Tet^R)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1*
deoR *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

TA Cloning Kit:

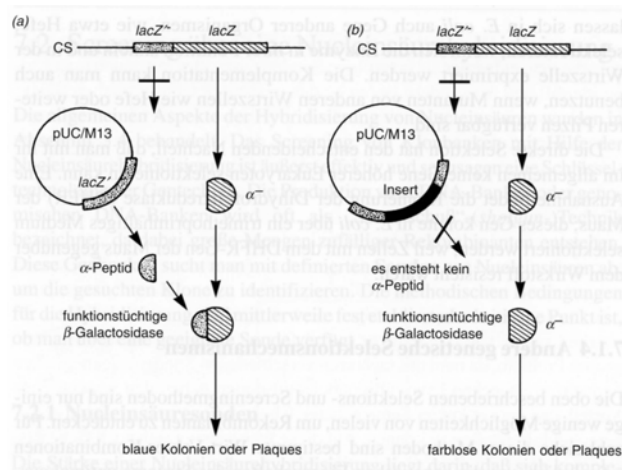
F^c {*lacI^q* Tn10 (Tet^R)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1*
araD139 Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

8.5 Plasmidkarte des pCR[®]II-TOPO[®] Vektors

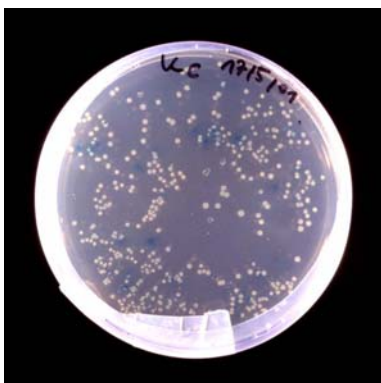


Der Vektor ist schematisch im Überblick dargestellt, ausführlich dagegen seine „Multiple Cloning site“. (Abb. aus dem Lieferbegleitheft)

8.6 Die „Blau-Weiß-Selektion“

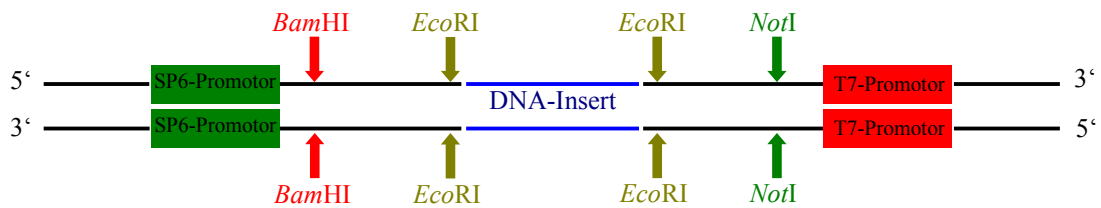


Grafik zum Prinzip der Insertionsinaktivierung im α -Komplementations- System. (a): Das $lacZ$ -Gen des Chromosoms ist fehlerhaft. Die fehlende Information zur Bildung des N-terminalen α -Peptids der β -Galaktosidase wird im $lacZ'$ -Genfragment des hier verwendeten pUC-Vectors (bzw. M13-Phagen) codiert. Wird diese Information bereitgestellt, wird funktionstüchtige β -Galaktosidase gebildet. Die entsprechenden Kolonien sind unter X-Gal und IPTG blau gefärbt. (b): Durch Klonierung von DNA in den Vektor („Insert“), wird das $lacZ'$ -Gen inaktiviert, das fehlende Peptid und damit die β -Galaktosidase kann nicht gebildet werden. Die Kolonien sind weiß. (Abb. aus Nicholl: Gentechnische Methoden, 1995; S. 109)



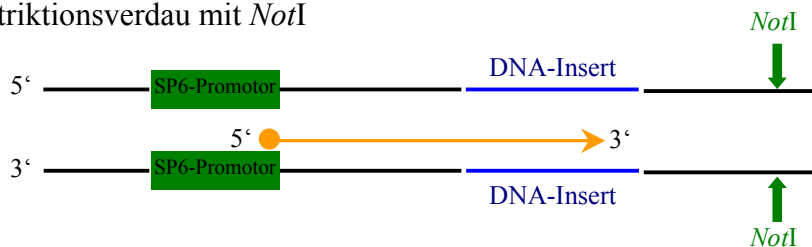
LB-Agarplatte mit Bakterien des TOP10F' *E. coli* Stammes. In die Bakterien wurde DNA mit Hilfe des pCR[®]II-TOPO[®] Vektors (s. 8.5) kloniert. Selektiert wurde auf Ampicillin und Komplementation der β -Galaktosidase („Blau-Weiß-Test“).

8.7 Das Prinzip der *in vitro* Transkription



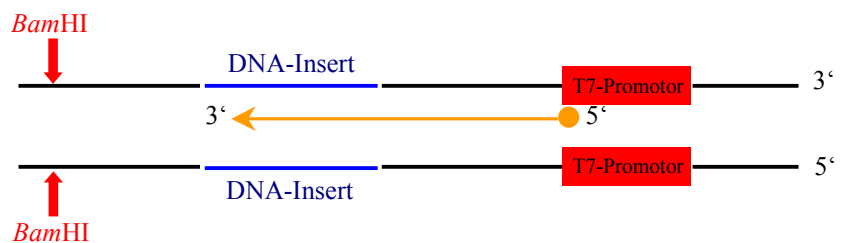
Schematische Darstellung der „Multiplen Cloning Site“ des pCRII-Vektors (s. 8.3). Die DNA-Insertionsstelle wird von 2 *EcoRI*-Schnittstellen flankiert. Für die *in vitro* Transkription wurden der SP6- oder T7-Promoter durch einen Verdau mit *BamHI* bzw. *NotI* für die entsprechende RNA-Polymerase aktiviert.

Restriktionsverdau mit *NotI*



Ein Restriktionsverdau mit *NotI* führt zu einer Aktivierung des SP6-Promotors. Die SP6-RNA-Polymerase erkennt dadurch „ihren“ codogenen Strang und beginnt mit der RNA-Synthese.

Restriktionsverdau mit *BamHI*



Ein Restriktionsverdau mit *BamHI* aktiviert den T7-Promotor für eine RNA-Synthese durch die T7-RNA-Polymerase.

8.8 Sequenzinformationen zu den „BLAST“-Analysen

8.8.1 β -Aktin

Sequenz des Klons:

```
AGCCGAGAGAGAAAATTgTGCgTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCACTGGATTTTCGAGCAGGAGATGGC
CACAGCTGCCTCTAGCTCTTCCCTGGAGAAGAGCTATGAACTCCCTGATGGTCAGGTCATCACCATTGGCAATGA
GAGGTTTCAGGTGCCCGAGGCCCTCTCCAGCCATCTTTCTTGGGTATGGAGTCTGTGGTATCCATGAAACTAC
CTTCAACTCCATCATGAAGTGTGATGTGGATATCCGTAAGGATCTGTATGCCAACACAGTGTCTGTCTGGTGGTAC
CACAATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAA
```

„BLAST“-Analyse des NCBI

gi|211236|gb|L08165.1|CHKBACTN Gallus gallus beta-actin mRNA, complete cds
Length = 1736

Score = 666 bits (336), Expect = 0.0

Identities = 336/336 (100%)

Strand = Plus / Plus

```
Query: 1 agccgagagagaaaattgtgctgacatcaaggagaagctgtgctacgtcgcaactggattt 60
|||||
Sbjct: 677 agccgagagagaaaattgtgctgacatcaaggagaagctgtgctacgtcgcaactggattt 736

Query: 61 cgagcaggagatggccacagctgcctctagctcttccctggagaagagctatgaactccc 120
|||||
Sbjct: 737 cgagcaggagatggccacagctgcctctagctcttccctggagaagagctatgaactccc 796

Query: 121 tgatggtcagggtcatcaccattggcaatgagaggttcaggtgccccgaggccctcttcca 180
|||||
Sbjct: 797 tgatggtcagggtcatcaccattggcaatgagaggttcaggtgccccgaggccctcttcca 856

Query: 181 gccatcttcttgggtatggagtcctgtggtatccatgaaactaccttcaactccatcat 240
|||||
Sbjct: 857 gccatcttcttgggtatggagtcctgtggtatccatgaaactaccttcaactccatcat 916

Query: 241 gaagtgtgatgtggatatccgtaaggatctgtatgccaacacagtgctgtctggtggtac 300
|||||
Sbjct: 917 gaagtgtgatgtggatatccgtaaggatctgtatgccaacacagtgctgtctggtggtac 976

Query: 301 cacaatgtaccctggcattgctgacaggatgcagaa 336
|||||
Sbjct: 977 cacaatgtaccctggcattgctgacaggatgcagaa 1012
```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

603004187F1 cloneID='ChEST19m21' stage_20-21_whole_chick_embryos
Length = 674

Score = 666 bits (336), Expect = 0.0

Identities = 336/336 (100%)

Strand = Plus / Plus

```
Query: 1 agccgagagagaaaattgtgctgacatcaaggagaagctgtgctacgtcgcaactggattt 60
|||||
Sbjct: 195 agccgagagagaaaattgtgctgacatcaaggagaagctgtgctacgtcgcaactggattt 254

Query: 61 cgagcaggagatggccacagctgcctctagctcttccctggagaagagctatgaactccc 120
|||||
Sbjct: 255 cgagcaggagatggccacagctgcctctagctcttccctggagaagagctatgaactccc 314
```

```
Query: 121 tgatggtcagggtcatcaccattggcaatgagagggttcagggtgccccgaggccctcttcca 180
      |||
Sbjct: 315 tgatggtcagggtcatcaccattggcaatgagagggttcagggtgccccgaggccctcttcca 374

Query: 181 gccatctttcttgggtatggagtcctgtggtatccatgaaactaccttcaactccatcat 240
      |||
Sbjct: 375 gccatctttcttgggtatggagtcctgtggtatccatgaaactaccttcaactccatcat 434

Query: 241 gaagtgtgatgtggatatccgtaaggatctgtatgccaacacagtgctgtctggtggtac 300
      |||
Sbjct: 435 gaagtgtgatgtggatatccgtaaggatctgtatgccaacacagtgctgtctggtggtac 494

Query: 301 cacaatgtaccctggcattgctgacaggatgcagaa 336
      |||
Sbjct: 495 cacaatgtaccctggcattgctgacaggatgcagaa 530
```

8.8.2 Probe 2: Intrazellulärer Chlorid-Kanal

Sequenz des Klons

```
TTTTTTTTTTTTCTGCAAATGCTGTTTACTTAGTGAGTCTCTTGGCTACATCACTGTAAGCTATTTCAATTTCTTT
GTCTCCaGGaCAGGTATTGGTGAACCTCATCCCTGCTGTAAgcATTGCTCAGGTATCTCCAAATCCCCGTCAATTC
CTTGGGGATCTCAAAGTTGCGATATTTTTTGGCCACCACCTTCACAATGTGTAGTTTGGGCAGCAGGTTGCAGTC
TgCTAATGTCATCTcATTGCCATCCaAAAACTTGCGGGTAGaAGA
```

„BLAST“-Analyse des NCBI

[gi|7330334|ref|NM_013943.1](#) Homo sapiens chloride intracellular channel 4 (CLIC4), mRNA

Length = 4318

Score = 218 bits (110), Expect = 3e-54

Identities = 212/246 (86%)

Strand = Plus / Minus

```
Query: 24 tttacttagtgagtctcttggctacatcactgtaagctatttcaatttcttcttctccag 83
      |||
Sbjct: 960 tttacttggtgagtccttggctacatcactatgctatttcaacctccttatcactgg 901

Query: 84 gacaggattggtgaactcatccctgctgtaagcattgctcaggatctccaaatccccg 143
      |||
Sbjct: 900 gacaggattggtgaactcgtccctactgctatgcattagttaggatctccagatgccag 841

Query: 144 tcatttccttggggatctcaaagttgcatatTTTTTggccaccaccttcacaatgtgta 203
      |||
Sbjct: 840 tcatttccttgggaatatcaaagttgcatatTTTTTggccaccaccttgacaatgca 781

Query: 204 gtttgggcagcagggttgcaatgctgctaatgtcatctcattgccatccaaaaacttgcggg 263
      |||
Sbjct: 780 gtttgggcagcagggttgcaatgctgctaatgtcatttcattgccatccagaaatttactgtg 721

Query: 264 tagaaa 269
      |||
Sbjct: 720 tagaaa 715
```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

```

603234686F1 cloneID='ChEST235122' Chondrocytes
Length = 677
Score = 591 bits (298), Expect = e-168
Identities = 301/302 (99%)
Strand = Plus / Plus

Query: 12  aagagtaatttaccctacttagacagattgctctacaatgtaacagctacgtacaaaaa 71
          |||
Sbjct: 71  aagagtaatttaccctacttagacagattgctctacaatgtaacagctacgtacaaaaa 130

Query: 72  agttataaaattgtccttggttttacaatgataaaagaaaaacattgaaattatccaatc 131
          |||
Sbjct: 131 agttataaaattgtccttggttttacaatgataaaagaaaaacattgaaattatccaatc 190

Query: 132  aaacaaagtatgtaagggttttggtttttaacaatgagagcaaaataacttactggaata 191
          |||
Sbjct: 191  aaacaaagtatgtaagggttttggtttttaacaatgagagcaaaataacttactggaata 250

Query: 192  taaagataaaagttagaaggggcatgccactaatggagaaaggggcattttcacagaacca 251
          |||
Sbjct: 251  taaagataaaagttagaaggggcatgccactaatggagaaaggggcattttcacagaacca 310

Query: 252  gtttgttttccaccatctccattaaatggtgatcaaaacataaccattggccatttag 311
          |||
Sbjct: 311  gtttgttttccaccatctccattaaatggtgatcaaaacataaccattggccatttag 370

Query: 312  tt 313
          ||
Sbjct: 371  tt 372

```

8.8.3 Probe 6: DNA Polymerase beta gene

Sequenz des Klons

```

TTTTGGCTCCCGGTATTTCCACTGTATGTAGTCAAAGATGTCTTTCTCACATTCTACTGGTAGGGCCTCCCCAGC
AACTCCTGCAAGCACATTACAGATACTATTGAAAAGGTGGAAATTCATATAAATCTGCACTGTCAAAGCATTG
CAAGATCAAGATGATTGAGACAATCAATTTCACTGTACGCAAAACACATTTGCAAGTGAAACGAtGAGCACCCCC
CTCTCCCTCCCGAAAAAAAAAAAAA

```

„BLAST“-Analyse des NCBI

```

gi|508798|gb|U10526.1|AH005411S11 Homo sapiens Human DNA polymerase beta
gene, exon 14, complete cds
Length = 784
Score = 71.9 bits (36), Expect = 4e-10
Identities = 69/80 (86%)
Strand = Plus / Minus

Query: 8  tcccggtatccactgtatgtagtcaaagatgtctttctcacattctactggtagggcc 67
          |||
Sbjct: 359 tcccggtatccactggatgtaaatcaaagatgtctttttcactatccactggcaggggt 300

Query: 68  tcccagcaactcctgcaag 87
          ||
Sbjct: 299 tctcctgcaactcctgcaag 280

```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

603481352F1 cloneID='ChEST369g13' stage_36_limbs
 Length = 771
 Score = 159 bits (80), Expect = 7e-38
 Identities = 80/80 (100%)
 Strand = Plus / Minus

```
Query: 2   tttggctcccgggtatttccactgtatgtagtcaaagatgtctttctcacattctactggt 61
          |||
Sbjct: 254 tttggctcccgggtatttccactgtatgtagtcaaagatgtctttctcacattctactggt 195

Query: 62   agggcctccccagcaactcc 81
          |||
Sbjct: 194 agggcctccccagcaactcc 175
```

8.8.4 Probe 8: SMT3

Sequenz des Klons:

```
TTTTTTTTTTTAAAGaGTAATTTACCCCTACTTAGACAGATTGCTcTACAATGTAACAGCTACGTACAAAAAAGTT
ATAAAATTGTCCTTGGTTTTACAATGATAAAAAGAAAAACATTGAAATTATCCaATCAAACAAAGTATGTAAGGTT
TTTGTTTTAAACAATGAGAGCAAAATAACTTACTGGAATATAAAGaTAAAAGTAGaAGGGGCATGCCACTAATG
GAGAAAGGGGCATTTTCACAGAACCgTTTgTTTTCCCACCCCATCTCCATTAAATGTTGATCAAAACATACCAT
TGGCCATTTAGTTAAAAA
```

„BLAST“-Analyse des NCBI

[gi|24046427|ref|NG_001516.1|](#) Mus musculus SMT3 (supressor of mif two, 3)
 homolog 2, pseudogene 4 (S. cerevisiae) (Smt3h2-ps4)
 Length = 2166
 Score = 174 bits (88), Expect = 5e-41
 Identities = 128/139 (92%), Gaps = 3/139 (2%)
 Strand = Plus / Minus

```
Query: 12   aagagtaatttaccctactta--gacagattgctctacaatgtaacagctacgtacaaa 69
          |||
Sbjct: 1525 aagagtaatttaccctacttaaaagacagattgacctaca-tgtaacagctacgtacaaa 1467

Query: 70   aaagttataaaattgctccttggttttacaatgataaaagaaaaacattgaaattatccaa 129
          |||
Sbjct: 1466 aaagttataaaattgctccttggttttacaatgataaatgaaaaacattaaattctccaa 1407

Query: 130   tcaaacaaagtatgtaag 148
          || ||| ||| |||
Sbjct: 1406 tcgaacaaggtatgcaag 1388
```

Score = 99.6 bits (50), Expect = 2e-18
 Identities = 77/86 (89%)
 Strand = Plus / Minus

```
Query: 160   aaacaatgagagcaaaataacttactggaatataaaagataaaagtagaaggggcatgcc 219
          ||| ||| | ||| |||
Sbjct: 1360 aaacaatgagagcaaaataacttactggaatataaaagataaagagctgaatgagcatgcc 1301

Query: 220   ctaatggagaaggggcattttcaca 245
          ||| ||| ||| | ||| |||
Sbjct: 1300 ctagtggagaaggaggattttcaca 1275
```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

```

603121019F1 cloneID='ChEST82f5' stage_36_heads
Length = 752
Score = 488 bits (246), Expect = e-137
Identities = 256/258 (99%), Gaps = 1/258 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 13  tgcaaatgctgtttacttagtgagtctcttggctacatcactgtaagctatttcaatttc 72
          |||
Sbjct: 683  tgcaaatgctgtttacttagtgagtctcttggctacatcactgtaagctatttcaatttc 624

Query: 73  tttgtctccaggacaggtattggtgaactcat-ccttgcctgtaagcattgctcaggtatc 131
          || |||
Sbjct: 623  ttggtctccaggacaggtattggtgaactcatgccctgctgtaagcattgctcaggtatc 564

Query: 132  tccaaatccccgctcatttccttggggatctcaaagttgcatatTTTTTggccaccacct 191
          |||
Sbjct: 563  tccaaatccccgctcatttccttggggatctcaaagttgcatatTTTTTggccaccacct 504

Query: 192  tcacaatgtgtagtttgggcagcaggttgagctctgctaagtcatctcattgccatcca 251
          |||
Sbjct: 503  tcacaatgtgtagtttgggcagcaggttgagctctgctaagtcatctcattgccatcca 444

Query: 252  aaaacttgccgggtagaaa 269
          |||
Sbjct: 443  aaaacttgccgggtagaaa 426

```

8.8.5 Probe 13: SMT3B

Sequenz des Klons:

```

TTTTTTTTTTTAAAGaGTAATTTACCCCTACTTAGACAGATTGCTCTACAATGTAACAGCTACGtACAAAAAAGTT
ATAAAAATTGTCCTTGGTTTTTACAATGATAAAAAGAAAAACATTGAAATTATCCAATCAAACAAAGTATGTAAGGTT
TTTgTTTTTAAACAATGaGaGCAAAATAACTTACTGGAaTaTAAAGATAAAAAGTAGAAGGAGCATGCCACTaaTG
GAGAAAGGGGCATTTTCACAGAACCAgTTtTTTTCCCACCCCaTCTCCaTTAAATgTTGaTCAAAACATACCAT
TGGCCATTTAGTTAAAAA

```

„BLAST“-Analyse des NCBI

```

gi|4092493|gb|AF067824.1|AF067824 Mus musculus clone SMT3B-g1/mSMT3 SMT3B
pseudogene, complete sequence
Length = 2166
Score = 174 bits (88), Expect = 5e-41
Identities = 128/139 (92%), Gaps = 3/139 (2%)
Strand = Plus / Minus

Query: 12  aagagtaatttaccctactta--gacagattgctctacaatgtaacagctacgtacaaa 69
          |||
Sbjct: 1525  aagagtaatttaccctacttaagacagattgctcctaca-tgtaacagctacgtacaaa 1467

Query: 70  aaagttataaaattgctccttgggttttacaatgataaaagaaaaacattgaaattatccaa 129
          |||
Sbjct: 1466  aaagttataaaattgctccttgggttttacaatgataaaatgaaaaacattgaaattatccaa 1407

```

```

Query: 130 tcaaacaagatgtaagg 148
      || ||||| ||||| |||||
Sbjct: 1406 tcgaacaaggtatgcaagg 1388
Score = 107 bits (54), Expect = 1e-20
Identities = 78/86 (90%)
Strand = Plus / Minus

Query: 160 aaacaatgagagcaaaataacttactggaatataaagataaaaagtagaaggagcatgccca 219
      ||||||| ||||||| ||||||| || || || |||||||
Sbjct: 1360 aaacaatgagagcaaaataacttactggaatataaagataaagagctgaatgagcatgccca 1301

Query: 220 ctaatggagaaggggcattttcaca 245
      ||| ||||| | || |||||
Sbjct: 1300 ctagtggagaaggaggtattttcaca 1275

```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

```

603234686F1 cloneID='ChEST235122' Chondrocytes
Length = 677
Score = 551 bits (278), Expect = e-156
Identities = 294/302 (97%)
Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 12 aagagtaatttaccctacttagacagattgctctacaatgtaacagctacgtacaaaa 71
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 71 aagagtaatttaccctacttagacagattgctctacaatgtaacagctacgtacaaaa 130

Query: 72 agttataaaattgctccttggttttacaatgataaaagaaaaacattgaaattatccaatc 131
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 131 agttataaaattgctccttggttttacaatgataaaagaaaaacattgaaattatccaatc 190

Query: 132 aaacaaagtatgtaagggtttttggttttaacaatgagagcaaaataacttactggaata 191
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 191 aaacaaagtatgtaagggtttttggttttaacaatgagagcaaaataacttactggaata 250

Query: 192 taaagataaaagtagaaggagcatgccactaatggagaaaggggcattttcacagaacca 251
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 251 taaagataaaagtagaaggagcatgccactaatggagaaaggggcattttcacagaacca 310

Query: 252 gnnnnnnnnccccaccctatccattaaatggtgatcaaaacataaccattggccatttag 311
      | ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct: 311 gtttggttttccccaccctatccattaaatggtgatcaaaacataaccattggccatttag 370

Query: 312 tt 313
      ||
Sbjct: 371 tt 372

```

8.8.6 Probe 14: SMT3

Sequenz des Klons:

```

TTTTTTTTTTTAACTAAATGGCCAATGGTATGTTTTGATCAACATTTAATGGAGATGGGGtGGGgAAACAAACTG
GTTCTGTGAAAATGCCCTTTCTCCATTAGTGGCATGCTCCTTCTACTTTTTATCTTTATATCCAGTAAGTTATT
TTGCTCTCATTGTTTAAAAACAAAACCGTACATACCTTTGTTTGTATTGGaTAATTTCAATGTTTTTCTTTTATCA
TTGTAAAACCAAGGACAATTTTATAACCTTTTGTACGTAGCTGTTACATTGTAGGGCAATCTGTCTAAGTAGGG
GTAAATTACTCTTAAAAAAAAAAAAA

```

„BLAST“-Analyse des NCBI

gi|24046427|ref|NG_001516.1| Mus musculus SMT3 (supressor of mif two, 3)
homolog 2, pseudogene 4 (S. cerevisiae) (Smt3h2-ps4)

Length = 2166

Score = 180 bits (91), Expect = 8e-43

Identities = 125/134 (93%), Gaps = 3/134 (2%)

Strand = Plus / Plus

```
Query: 182  catactttgtttgattggataatttcaatgtttttcttttatcattgtaaaaccaaggac 241
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 1393 cataccttgttcgattggagaattttaatgtttttcttttatcattgtaaaaccaaggac 1452
```

```
Query: 242  aatstttataactttttgtacgtagctgttacattgtagggaatctgtc--taagtagg 299
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 1453 aatstttataactttttgtacgtagctgttaca-tgtagggaatctgtcctttaagtagg 1511
```

```
Query: 300  ggtaaattactctt 313
          | ||||| |||||
Sbjct: 1512 gataaattactctt 1525
```

Score = 107 bits (54), Expect = 1e-20

Identities = 78/86 (90%)

Strand = Plus / Plus

```
Query: 80   tgtgaaaatgccctttctccattagtgccatgctccttctacttttatctttatattcc 139
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 1275 tgtgaaaatacctccttctccactagtgccatgctcattcagctcttatctttatattcc 1334
```

```
Query: 140  agtaagttatsttgctctcattgttt 165
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 1335 agtaagttatsttgctctcattgttt 1360
```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

603234686F1 cloneID='ChEST235122' Chondrocytes

Length = 677

Score = 583 bits (294), Expect = e-165

Identities = 300/302 (99%)

Strand = Plus / Minus

```
Query: 12   aactaaatggccaatggatgttttgatcaacatttaatggagatgggggtgggaaaacia 71
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 372  aactaaatggccaatggatgttttgatcaacatttaatggagatgggggtgggaaaacia 313
```

```
Query: 72   actggttctgtgaaaatgccctttctccattagtgccatgctccttctacttttatctt 131
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 312  actggttctgtgaaaatgccctttctccattagtgccatgctccttctacttttatctt 253
```

```
Query: 132  tatattccagtaagttatsttgctctcattgtttaaaaacaaaaaccgtacatactttgt 191
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 252  tatattccagtaagttatsttgctctcattgtttaaaaacaaaaacccttacatactttgt 193
```

```
Query: 192  ttgattggataatttcaatgtttttcttttatcattgtaaaaccaaggacaattttataa 251
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 192  ttgattggataatttcaatgtttttcttttatcattgtaaaaccaaggacaattttataa 133
```



```

Query: 252 cttttttgtacgtagctgttacattgttagggcaatctgtcctaagtaggggtaaattactc 311
          |||
Sbjct: 132 cttttttgtacgtagctgttacattgttagagcaatctgtcctaagtaggggtaaattactc 73

Query: 312 tt 313
          ||
Sbjct: 72  tt 71

```

8.8.7 Probe 19: LIM

Sequenz des Klons:

```

CTTTCTACCCCTCATTAAACAATTAGCAGGGCACTGGCCAGTTTgTACCCTGTGTTTTACCTTAACAACATTCTATT
TGCTCTTTGTATATTTAAGTGTGTGTAAGGaAATGTGTTTCAATCAAACCTGAACATGAGATAAAGGAAAGATGTGG
CTTTTGTGATATTCTATCACAAATACTTTTATTGTATCTCTGTAAAATACAATGTATGTATGCATGTAAGtGTTT
TTGTCCtAATGTTGCTACTTCCCATGGCGAAAAAAAAAAAAA

```

„BLAST“-Analyse des NCBI

```

gi|7108354|ref|NM_006769.2| Homo sapiens LIM domain only 4 (LMO4), mRNA
Length = 2126
Score = 391 bits (197), Expect = e-106
Identities = 247/258 (95%), Gaps = 8/258 (3%)
Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 1   ctttctaccctcattaacaattagcagggcactggccag--tttgtaccctgtgttttac 58
          |||
Sbjct: 1611 ctttctaccctcattaacaattagcagggcactggccagagtttgtaccctgtgttttac 1670

Query: 59  cttaacaacattctatattgtctctttgtatatttaagtgttgaaggaaatgtgtttcaat 118
          |||
Sbjct: 1671 cttaacaacattctatattgtctctttgtatatttaagtgttgaaggaaacgtgtttcaat 1730

Query: 119 c-aaactgaacatgagataaaggaa--agatgtggcttttgtgatattctatcacaata 175
          | |||
Sbjct: 1731 caaaactgacatgagataaaggaaagagatgtggcttttgtgatattctatcacaaca 1790

Query: 176 cttttattgtatctctgtaaaatacaatgtatgtatgcatgtaagtgtttttgtccta 235
          | |||
Sbjct: 1791 c--ttattgtatctctgtaaaatacaatgtatgtatgcatgtaagtgtttttgtccta 1848

Query: 236 gttgctacttcccatggc 253
          |||
Sbjct: 1849 gttgctac-tcccatggc 1865

```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

```

603487625F1 cloneID='ChEST384b7' stage_36_heads
Length = 787
Score = 464 bits (234), Expect = e-129
Identities = 250/254 (98%), Gaps = 1/254 (0%)
Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 1   ctttctaccctcattaacaattagcagggcactggccagtttgtaccctgtgttttacct 60
          |||
Sbjct: 394 ctttctaccctcattaacaattagcagggcactggccagtttgtaccctgtgttttacct 453

Query: 61  taacaacattctatattgtctctttgtatatttaagtgttgaaggaaatgtgtttcaatca 120
          |||
Sbjct: 454 taacaacattctatattgtctctttgtatatttaagtgttgaaggaaatgtgtttcaatca 513

Query: 121 aactgaacatgagataaaggaaagatgtggcttttgtgatattctatcacaatactttt 180

```

```

|||||
Sbjct: 514 aactgaacatgagataacggacagatgtggcttttgtgatattctatcacaataactttt 573
Query: 181 attgtatctctgtaaaatacaaatgtatgtatg-catgtaagtgtttttgtcctaagtgtg 239
|||||
Sbjct: 574 attgtatctctgtaaaatacaaatgtatgtatgccatgtaagtgtctttgtcctaagtgtg 633

Query: 240 ctacttcccatggc 253
|||||
Sbjct: 634 ctacttcccatggc 647

```

8.8.8 Probe 20: α B-Kristallin

Sequenz des Klons:

```

TTTTTTTTTTTCGGACTgATGGAGCTTTATTACAGGAGATTGGGGAAGGAAGGAGATTCTTAAGaGTGCTTTCCA
AATAAAGGGAACGGCTCTGAAAATGGCCCAACTGCGaCTTTcTTTTTATTTTAGACTATTTAAAAGGCTGGCTCGA
GTCGtGCAGCTACTTGCAGTTGTGTCCCTCAAGGAGGaAAGCTGCTTTTCTTCACTCTGCACCCAACCTCGTGTGCT
TTAGAGTAAGACCACACAATAAATACCATCTGAAGTCTGTTAACTTTCCCATATACAATCAACACAAGGGAAAAA
AATTTACAAAGAATCTTGTGTCCCACATGAAAACAGACATCTTATGATACACTATTTACAAGCAAGGGTAGAAAG
A

```

„BLAST“-Analyse des NCBI

```

gi|263999|gb|S53164.1|S53164 alpha B-crystallin [chickens, lens epithelial
cells, mRNA, 1251 nt]
Length = 1251
Score = 38.2 bits (19), Expect = 9.1
Identities = 22/23 (95%)
Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 241 acaataaataccatctgaagtct 263
|||||
Sbjct: 1209 acaataaatagcatctgaagtct 1231

```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

```

603505842F1 cloneID='ChEST430c12' stage_22_limbs
Length = 533
Score = 664 bits (335), Expect = 0.0
Identities = 352/360 (97%)
Strand = Plus / Minus

```

```

Query: 14 gactgatggagctttattacaggagattggggaaggaaggagattcttaagagtgctttc 73
|||||
Sbjct: 526 gactgatggagctttattacaggagattggggaaggaaggagattcttaagagtgctttc 467

Query: 74 caaataaaggaacggctctgaaaatggcccaactgcgactttctttttattttagacta 133
|||||
Sbjct: 466 caaataaaggaacggctctgaaaatggcccaactgcgactttctttttattttagacta 407

Query: 134 ttaaaaggctggctcgagtcgctgcagctacttgagttgtgtcctcaaggaggaaagctg 193
|||||
Sbjct: 406 ttaaaaggctggctcgagtcgctgcagctacttgagttgtgtcctcaaggaggaaagctg 347

Query: 194 cttttcttctactctgcaccaactcggtgtgcttttagagtaagaccacacaataataacca 253

```

```

|||||
Sbjct: 346 cttttcttcactctgcaccaactcgtgtgcttttagactaagaccacacaataaatacca 287
Query: 254 tctgaagtctgttaactttcccatatacaatcaacacaagggnnnnntttacaagaa 313
|||||
Sbjct: 286 tctgaagtctgttaactttcccatatacaatcaacacaagggaaaaaaatttacaagaa 227
Query: 314 tcttgtgtcccacatgaaaacagacatcttatgatacactatttacaagcaagggtagaa 373
|||||
Sbjct: 226 tcttgtgtcccacatgaaaacagacatcttatgatacactatttacaagcaagggtagaa 167

```

8.8.9 Probe 21: RIKEN cDNA

Sequenz des Klons:

```

GGTACTAAGGGGAGCTAATATAATGTGTCTGCTGGcCTgACGtCTcCTGGaGCAAAACTTTACCCTGCTGCCGTTGA
TACTGTTGTTGCAATAATGGCAGAGGGAAAACAACATGCATTATGTGTGGGAGTCATGAAGATGTCAGCTGATGA
CATTGAGAAGGTCAACAAAAGGGATTGGTATTGAAAATATCCACTATTTAAATGATGGTCTTTGGCATATGAAGAC
ATACAAGTGAAAACAAAAGGAGCTGTGTTACTCCAAGGGAATGCACCTTAGGTTAAATGTGGACTgCTTTGTAATTC
CTCGTTTTTAATGTGACTGAATGTACAAATTATTTTGTCTGTGGCAATGCTAAATAAAACAAGTGAATGCGaAA
AAAAAAAAA

```

„BLAST“-Analyse des NCBI

[gi|27707477|ref|XM_217587.1|](#) Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA
1500019M23 [Mus musculus] (LOC302500), mRNA
Length = 754

Score = 228 bits (115), Expect = 5e-57
Identities = 199/227 (87%)
Strand = Plus / Plus

```

Query: 2   gtactaaggggagctaataataatgtgtcctggcctgacgtctcctggagcaaaaactttac 61
|||||
Sbjct: 400 gtactcagtgagcaaatatcatgtgtcccggcctaacgtctcctggagctaagcctttat 459
Query: 62   cctgctgccgttgatactgttgttgcaataatggcagagggaaaaacaacatgcattatgt 121
|||||
Sbjct: 460 cctgctgcagtagatactattgttgcaatcatggcagaaggaaaaacaacatgctttatgt 519
Query: 122  gtgggagtcatgaagatgtcagctgatgacattgagaaggtaacaaagggattgggtatt 181
|||||
Sbjct: 520 gtgggcgcatgaagatgtctgcagaagatattgagaaagtcaacaaaggaattggcatt 579
Query: 182  gaaaatatccactatttaaatgatggcttttggcatatgaagacata 228
|||||
Sbjct: 580 gaaaatatccattatctaaatgatgggctgtggcatatgaagacata 626

```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

[603525943F1](#) cloneID='ChEST472f12' adult_brain_-_cerebellum
Length = 523
Score = 718 bits (362), Expect = 0.0
Identities = 368/370 (99%)
Strand = Plus / Plus

```

Query: 2   gtactaaggggagctaataataatgtgtcctggcctgacgtctcctggagcaaaaactttac 61
|||||
Sbjct: 143 gtactaagtgagcaaatataatgtgtcctggcctgacgtctcctggagcaaaaactttac 202

```

```

Query: 62 cctgctgccgttgataactgttgttgcaataatggcagagggaaaacaacatgcattatgt 121
          |||
Sbjct: 203 cctgctgccgttgataactgttgttgcaataatggcagagggaaaacaacatgcattatgt 262

Query: 122 gtgggagtcataagatgtcagctgatgacattgagaaggtaacaaagggttggatt 181
          |||
Sbjct: 263 gtgggagtcataagatgtcagctgatgacattgagaaggtaacaaagggttggatt 322

Query: 182 gaaaatatccactatTTAAatgatggctttggcatatgaagacatacaagtgaacaaa 241
          |||
Sbjct: 323 gaaaatatccactatTTAAatgatggctttggcatatgaagacatacaagtgaacaaa 382

Query: 242 aggagctgtgttactccaagggatgcacttaggttaaagtggactgctttgtaattcc 301
          |||
Sbjct: 383 aggagctgtgttactccaagggatgcacttaggttaaagtggactgctttgtaattcc 442

Query: 302 tcgTTTTtaatgtgactgaatgtacaaattatTTTgttctgtggcaatgctaaataaac 361
          |||
Sbjct: 443 tcgTTTTtaatgtgactgaatgtacaaattactTTTgttctgtggcaatgctaaataaac 502

Query: 362 aagtgaatgc 371
          |||
Sbjct: 503 aagtgaatgc 512

```

8.8.10 Probe 22: Gallus gallus repeat region

Sequenz des Klons:

```

TTTTTTTTTTTCGGAAGCCAGGGGGCCACGGGCCTACTGCCCCCTGTCACGGGCACAgATTTATcTACAtAA
CTCCgTGACAGATTTTGGTAGAGaATGTGGGCAATCTGAAGCTTTTAACGTTAGTAGAAAAAAGGATTTcTTTA
AGCCAGAGACTGCGGAGACTACAAGGCATGCTAGTGTGACCTTCAGAGATTAGATTATAGTCCAGGCAGTCTGCC
AAACTTCAGACACTTTACCCAGTGCTTTCTTTTTGGTTGTCCCCCCCCCACAcAcACTTTTAGTAGTTATCAGC
TATGaGTTTgCTCTTTATTgTAGGAGCGCTGTATAAGGGATTAAAAGCTATCATGTTCTTTGCCAGTTACTGGCC
tATAATTAACGTCACGgTTTCTTGTGTTGGAATTGTGTTTCATATATAACCaATAAGGGCATTgATGGAGGCACC
cgCCTGGtACTTTTATGCAATGTTGGATAAATTTGAATTTTGACAcTTTCGAAAAAAAAAAAAA

```

„BLAST“-Analyse des NCBI

```

gi|577045|emb|X82799.1|GGRR45A1 G.gallus repeat region (clone 45A1)
Length = 397
Score = 58.0 bits (29), Expect = 1e-05
Identities = 49/53 (92%), Gaps = 2/53 (3%)
Strand = Plus / Minus

```

```

Query: 12 cggaagccaggggg-cccacgggcctactgccccctgtcacgggcacagat 63
          |||
Sbjct: 53 cggaagccagggggcccgagcctactgcccc-tgtcacgggcacagat 2

```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

```

603764781F1 cloneID='ChEST688b21' chicken_ovary
Length = 770
Score = 198 bits (100), Expect = 2e-49
Identities = 175/200 (87%)
Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 298 agctatgagtttctctttattgtaggagcgtgtataaggattaaaagctatcatgtt 357

```


Score = 79.8 bits (40), Expect = 1e-13
 Identities = 85/100 (85%)
 Strand = Plus / Plus

```
Query: 2   gtactaagggacatatTTTTAGTGGGAAAGTATTGGTACTAAGTGGATGGTTAGACTAGATGATCTTGGAGTTCT
          |||
Sbjct: 158 gtactaaggggatgtaatttagtggtaaaatattggtggttaggtgggtggttgactggat 217

Query: 62   gatccttggagttcTTTTCTAACCTTGGTGGTCTGTGATT 101
          |||
Sbjct: 218 gatccttggaggtcTTTTCCAACCTTGGTgattctatgatt 257
```

8.8.12 Probe 23.2: Gallus gallus NUMB

Sequenz des Klons:

```
GGTACTAAGGGACATATTTTAGTGGGAAAGTATTGGTACTAAGTGGATGGTTAGACTAGATGATCTTGGAGTTCT
TTTCTAACCTTGGTGGTCTGTGATTTTAGGGAAATGGAAGTACTACTTCACTTGCAACAGAGCACGGGAAAAC
CTGGtGCTCTAAACTTGCTCTAAAACCTGGGAAACTGAGTCTGTATTCTTTGGCTCATACTCTATGTATAGT
TTATGGAATATCCtATTTTGGTCTACGCCATGTTATAAATGGGAGTTAGCAATGGTCTCTTAATGTAGAGAGATG
TAATGGGCTAAAATCAGAAGGGGTTTCAGAAGGAATAACTAATTCAGACAATAACCAAACCTTAAGTGAAGGGGATGA
AATGAACTGATAGTCTATATATCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAACAtACTTCAAATCCACAGCTCACTGTAATCCtT
ATgTTTCTCTCCgTGGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTAAAAAACCCCTAAGgCCTATTGaCAGACAAACAGAAAA
TGGGTTCctAGGcAGCCCCAGGgTGTTAGAtATGGTTAcAgtAAGTtTTTGTcACAGTAGTgTTAGAAcCAATAG
ATTaAGACAAGAAAACCTGCAGCAATAcATGAAAGAAAAAAAAAAAAA
```

„BLAST“-Analyse des NCBI

[gi|5733119|gb|AF176086.1|AF176086](#) Gallus gallus NUMB mRNA, complete cds
 Length = 3468
 Score = 266 bits (134), Expect = 4e-68
 Identities = 146/150 (97%)
 Strand = Plus / Minus

```
Query: 485   gttaaaaaacccctaaggcctattgacagacaaacagaaaatggggttcctaggcagcccc 544
          |||
Sbjct: 3250  gttaaaaaacctctaagatctattgacagacaaacagaaaatggggttcctaggcagcccc 3191

Query: 545   aggggtgtagatatggttacagtaagttttgtcacagtagtggttagaaccaatagatta 604
          |||
Sbjct: 3190  aggatgtagatatggttacagtaagttttgtcacagtagtggttagaaccaatagatta 3131

Query: 605   agacaagaaaactgcagcaatacatgaaag 634
          |||
Sbjct: 3130  agacaagaaaactgcagcaatacatgaaag 3101
```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

[603469293F1](#) cloneID='ChEST342j23' Chondrocytes
 Length = 645
 Score = 266 bits (134), Expect = 1e-69
 Identities = 146/150 (97%)
 Strand = Plus / Minus

```
Query: 485   gttaaaaaacccctaaggcctattgacagacaaacagaaaatggggttcctaggcagcccc 544
          |||
Sbjct: 439   gttaaaaaacctctaagatctattgacagacaaacagaaaatggggttcctaggcagcccc 380
```


8.8.14 Probe 24: Gallu gallus ip3ka

Sequenz des Klons:

```
GGTACTAAGGGACATGATTTAGTGGGCAATATCACTGAAAAGTGTATAGTTGGACTTGATTATCTGAGAGGTCTT
TTTTTCAGCTTTAATGATTCTACAATTCTATGATTGTTCAAATAGTTTTCTGATATGATACACTAGAAGGATATCT
GAGGGAACATGTGGGTACAAATCTTGCCCTTATGGACTAGGGGAGATGTGTAAACACCTCGCCAGTCTGAAGTTCC
TTTAGCAGAGAAGGGACACAGTTTGTGTTGCCTGTTACATTATTTTGTGTCAGCTGCTCTTTTAACTTTCTTGTA
CTGTCTCCTATTCCCTTGAGATTAAATGCTTCTACTCCTTAAAAAAAAAAAA
```

„BLAST“-Analyse des NCBI

```
gi|4584404|emb|AJ012220.1|GGA012220 Gallus gallus ip3ka gene, exons A to D
and alternative partial transcripts
Length = 18499
Score = 38.2 bits (19), Expect = 8.5
Identities = 28/31 (90%)
Strand = Plus / Minus
```

```
Query: 2      gtactaagggacatgatttagtgggcaatat 32
           ||||| ||||| || |||||
Sbjct: 14559 gtactgaggacgtgcttagtgggcaatat 14529
```

„BLAST“-Analyse der BBSRC-EST-Datenbank

```
603949263F1 cloneID='ChEST906n15' stage_20-21_whole_chick_embryos
Length = 701
Score = 56.0 bits (28), Expect = 1e-06
Identities = 37/40 (92%)
Strand = Plus / Minus
```

```
Query: 70      ggtcttttttcagctttaatgattctacaattctatgatt 109
           ||||| || | |||||
Sbjct: 500 ggtctttttccaaccttaatgattctacaattctatgatt 461
```


8.9 Originalsequenzen für die PCR-Nachweise

Im Folgenden werden die relevanten Sequenzabschnitte der Positivkontrollen angegeben. Es handelt sich dabei um die Originalsequenzen nach einer NCBI-Datenbankrecherche. Sie bildeten den Ausgangspunkt für die Herstellung der ISH-Sonden. Angegeben wurden die Primersequenzen (rot), die Sequenz des „Amplikons“ sowie Registriernummer und Kurzbeschreibung aus der Datenbank des NCBI.

8.9.1 β -Aktin

8.9.1.1 RNA-Template

β -actin: CHKBACTN, 1736 bp, mRNA, linear, VRT 28-APR-1993

Quelle: Gallus gallus beta-actin mRNA, complete cds
gi|211236|gb|L08165.1|CHKBACTN[211236]

BASE COUNT 430 a 449 c 434 g 421 t 2 others
ORIGIN

```

601 tggatctggc tggccgtgac ctgacggact acctcatgaa gatcctgaca gagagaggct
661 acagcttcac caccacagcc gagagagaaa ttgtgctgta catcaaggag aagctgtgct  $\beta$ -F8
721 acgtcgcact ggatttcgag caggagatgg ccacagctgc ctctagctct tccctggaga
781 agagctatga actccctgat ggtcaggta tcaccattgg caatgagagg ttcagggtcc
841 ccgaggccct cttccagcca tctttcttgg gtatggagtc ctgtggtatc catgaaacta
901 cttcaactc catcatgaag tgtgatgtgg atatccgtaa ggatctgtat gccaacacag
961 tgctgtctgg tggatcaca atgtaccctg gcattgctga caggatgcag aaggagatca  $\beta$ -B15
1021 cagccctggc acctagcaca atgaaaatca agatcattgc cccacctgag cgcaagtact

```

Produktgröße (RNA-Template) Primerpaar β -F8, β -B15: 335bp

```

agccgagagagaaaattgtgctgacatcaaggagaagctgtgctacgtcgcactggatttcgagcaggagatggccacagctgcctctagctct
tccctggagaagagctatgaactccctgatggtcaggtaaccattggcaatgagaggttcagggtccccgaggccctcttccagccatctt
tcttgggtatggagtcctgtggtatccatgaaactaccttcaactccatcatgaagtgtgatgtggatatccgtaaggatctgtatgccaacac
agtgtgtctggtgtaccacaatgtaccctggcattgctgacaggatgcaga

```

8.9.1.2 DNA-Template

β -actin: GGAC01, 5046 bp, DNA, linear, VRT 10-FEB-1999

Quelle: X00182: Gallus gallus cytoplasmic beta-actin gene

gi|63017|emb|X00182.1|GGAC01[63017]

```

2881 ctatgaaggc tacgcctccc cccatgccat
cctcgtctg gatctggctg gccgtgacct
2941 gacggactac ctcatgaaga tcctgacaga gagaggctac agcttcacca ccacagccga  $\beta$ -F8
3001 gagagaaatt gtgctgac tcaaggagaa gctgtgctac gtcgcactgg atttcgagca
3061 ggagatggcc acagctgcct ctgactcttc cctagagaag agctatgaac tccctgatgg
3121 tcaggtcatc accattggca atgagaggtt caggtgcccc gaggcctct tccagccatc
3181 tttcttgggt aagtctgact cctttgagga gattccatgc cccttctgcc tagagcgact
3241 tagagactgg ccacaatatt gctggccctt agcaggtctg tccattcca ctgcagtctt
3301 ttttcttctc cagtttgagg atgattgagg tacctaggtc agtagaacag gaggtgagc
3361 ctgtcagcca tgcctttgtc tgtgttgtt cccactatgg ggtgtttgat tctcttgtt
3421 tcccatagca gtaggtcttc tgtcttctt gtccctgaac catttactga cttgacactg
3481 ctttttgctt gcaggtatgg agtctgtgg tatccatgaa actacctca actccatcat
3541 gaagtgtgat gtggatatcc gtaaggatct gtatgccaac acagtgctgt ctggtggtac
3601 cacaatgtac cctggcattg ctgacaggat gcagaaggag atcacagccc tggcacctag  $\beta$ -B15
3661 cacaatgaaa atcaaggtag gctggagccc taggtgtctc ttagcacacc tcttaatgct

```

Produktgröße (DNA-Template) Primerpaar β -F8, β -B15: 640bp

```

agccgagagagaaattgtgctgacatcaaggagaagctgtgctacgtgcactggatttcgagcaggagatggccacagctgcctctagctct
tccctagagaagagctatgaactcctgatggcaggtcatcaccattggcaatgagaggttcaggtgccccgaggccctcttccagccatctt
tcttgggtaagtctgactcctttgaggagattccatgcccttctgcctagagcacttagagactggccacaatattgctggcccttagcagg
tctgtccattccactgcagctctttttcttctcagtttgaggatgattgaggtacctaggtcagtagaacaggaggtgagcctgtcagcca
tgctttgtctgtgttttccactatggggtgtttgattctctgttttccatagcagtaggtcctctgtcttcttctgtccctgaaccatt
tactgacttgacactgctttttgttgcaggtatggagtcctgtgttatccatgaaactaccttcaactccatcatgaagtgtgatgtggat
ccgtaaggatctgtatgccaacacagtgctgtctgtgtgtaccacaatgtaccctggcattgctgacaggatgcaga

```

8.9.2 CBF-1

CBF-1: GGU47275, 1883 bp, mRNA, linear, VRT 19-SEP-1996

Quelle: Gallus gallus chicken brain factor-1 (CBF-1) mRNA, complete cds

gi|1546781|gb|U47275.1|GGU47275[1546781]

BASE COUNT 375 a 664 c 513 g 331 t
ORIGIN

```

1261 agcagcacgc tgagctacaa cgggacggcg tcocgctacc ccagccacc catgcctac
1321 agctcgggtg tgactcagaa ctccttgggg aacaatcact cctttccac gtccaacggg CBF1/F4
1381 ttgagcgtcg atagactcgt caacggggag atcccctacg ccaactacca cctcacggcc
1441 gccgccctgg ccgctcgggt gccgtgccc ttgtcggctc cctgctcgg cacctactcc
1501 ctaaaacct gctccgtgaa cctcctggcg ggacagacga gttactttt cccccagtc
1561 cctcaccct caatgacttc tcagagcagc acttcgatga cggccagggc cgcctcttcg
1621 tccacatcgc cgcaggcacc ctccaccctg cctgagcagt ccctaagacc ctctttgccc CBF1/B4
1681 agtttcaagc cgggactctc cggaggactc tccgattatt tcacacatca aaatcagggg
1741 tcttcttcca accctttaat acattaacgt ccatgggatc agactgtaag tgaacatctt

```

Produktgröße (RNA-Template) Primerpaar CBF1/F4, CBF1/B4: 327nt

```

Tttccacgtccaacgggttgagcgtcgatagactcgtcaacggggagatcccctacgccactcaccacctcagggccgcccctggccgctc
gggtcctgctgggtgtcgggtcccctgctcggcactactccctaaacctgctcctgtaacctcctggcgggacagacgagttacttttc
ccccagctccctcaccctcaatgacttctcagagcagcacttcgatgacggccagggccctctctctgccaatcgcgcagggcaccctcca
cctgcccctgaggtccctaagaccctctttgcccagtttcaagc

```

8.9.3 CBF-2

CBF-2: GGU47276; 2026bp mRNA

Quelle: U47276 Gallus gallus chicken brain factor-2 (CBF-2) mRNA, complete cds

gi|1546783|gb|U47276.1|GGU47276[1546783]

gi|1143827|gb|U26661.1|GGU26661[1143827]

BASE COUNT 205 a 234 c 216 g 191 t
ORIGIN

```

121 cacgggtata aagctgcccc ctgtgcccgc cacagtactg cagcagtcgt ttgcttggtt
181 cctccgtcgc gctccgatgg atatcaccat tcacaacccc ctgatccgca gacctctggt αB/F1
241 ttcttggttg acaccgagcc gtatctttga ccagatattt ggagagcacc tgcaggagtc
301 agagctgctc cctacctccc ccagcctcag cccttctctg atgagatccc ccttctttcg
361 gatgcccagt tggctggaga cgggactctc agagatgcga ctggagaagg acaaattttc
421 tgtaaatctt gatgtgaagc atttctcgcc tgaggagcta aaagtgaagg tgctcgggga αB/B1
481 catgatagaa attcattgga aacacgagga gcgccaggat gacatggct ttattgccag

```

Produktgröße (RNA-Template) Primerpaar αB/F1, αB/B1: 254nt

atcaccattcacaaccccctgatccgcagacctctgttttcttggttgacaccgagccgctatctttgaccagatatttggagagcacctgcagg
agtcagagctgctccctacctccccagcctcagcccccttctctgatgagatcccccttctttcggatgccaggttggtggagacgggactctc
agagatgcgactggagaaggacaaaattttctgtaaatcttgatgtgaagcatttctcgccctgagga

8.9.6 Notch-1

Notch-1: AF159231, 3716 bp, mRNA, linear, VRT 06-JUL-1999

Quelle: AF159231 Gallus gallus NOTCH-1 mRNA, partial cds

gi|5360173|gb|AF159231.1|AF159231[5360173]

BASE COUNT 842 a 1191 c 1046 g 637 t
ORIGIN

```

301 atgctggcaa taagatctgt gatgggaagt gcaacaacca cgctgcggc tgggacggcg
361 gcgactgctc gctcaatttc aacgaccctt ggaagaactg ctcacagtca ctgcagtgtt Notch/F4
421 ggaagtactt caatgatggc aagtgtgact cgcagtgcaa caacgcgggc tgctctgatg
481 atgggtttga ctgccagaag tacgaggggc agtgcaacc tctgtacgac cagtactgta
541 aggaccactt ctcagatggt cactgtgacc agggctgcaa taactttgag tgtgagtggg
601 acgggctgga ctgtgcaaac aacatgctt agaagctggc ggatggcacg ctgggtgggg Notch/B1
661 tggctcctcat caccctgag aacctgaaga acaattcctt caatttctg agggagctga

```

Produktgröße (RNA-Template) Primerpaar Notch/F4, Notch/B1: 251nt

Gctcaatttcaacgacccttggagaactgctcacagtcactgcaagtgtggaagtacttcaatgatggcaagtgtgactcgcagtgcacaac
gccccgctgctctgatgatgggttctgactgcccagaagtagggggcagtgcaaccctctgtacgaccagtagctgtaaggaccacttctcagatg
gtcactgtgaccagggtgcaataactttgagtgtgagtgggacgggctggactgtgcaacaacatgccc

8.9.7 Numb

Numb: AF176086, 3468 bp, mRNA, linear, VRT 15-AUG-1999

Quelle: AF176086 Gallus gallus NUMB mRNA, complete cds

gi|5733119|gb|AF176086.1|AF176086[5733119]

BASE COUNT 912 a 820 c 909 g 827 t
ORIGIN

```

241 accagggctc accogaagtg aagattgtgc atgcaggagc tcttcccttg gcgtttcttc
301 caaatgcata agtgatgccc gcataggaga gagaccactg ataacttggg acagcccata Numb/FL
361 ggttcacatc ttttctgta tccatggagt caaggttata gctccaagag aaggattttg
421 caagaggagt tgtaagagaa gtactgctgg tggacctgag ggaaaaaacg ttatcaacat
481 ctgagaaatg aataaattac ggcagagctt taggagaaag aaagatgtct atgtgccaga
541 ggccagtagg cctcatcagt ggcagactga tgaagaaggc gtccgtagct gcaagtgtag
601 cttccctggt aagtacttgg ggcattgtga agtggatgaa tccagaggaa tgcatatctg Numb/BR
661 tgaagatgct gtgaagagac tgaatctac tgggaagaag gcggttaaag cggctcctgtg

```

Produktgröße (RNA-Template) Primerpaar Numb/FL, Numb/BR: 301nt

Ggtacagcccataaggttcacatcttttctctgtatccatggagtcaaggttatagctccaagagaaggattttgcaagaggagttgtaagagaag
tactgctggtggacctgagggaaaaaacgttatcaacatctgagaaatgaataaattacggcagagcttttaggagaaagaaagatgtctatgtg

ccagaggccagtaggacctcatcagtgccagactgatgaagaaggcgctccgtactggcaagtgcagcttcctgttaagtaacttggggcatgtg
aagtggatgaatccagagg

8.9.8 DeltaEF-1

DeltaEF-1: D76433S2, 22268 bp, DNA, linear, VRT 14-APR-2000

Quelle: D76433 Chicken gene for transcriptional repressor deltaEF1, exon1 and CR1 transposon sequence

gi|1027492|dbj|D76433.1|D76433S1[1027492]

```

19021 ctcttgatgt tcatttttcc taagaagggt acaataacct ttgtagttaa gcaccgtgcc
19081 cttgtattcc tatgcaagaa accaggctg acaatgctga gagcaaactg ttaaatacaa Delta/F7
19141 ttacttggtg ttggcaatac attcaccaac agcatattat tatgaaagca gcagcacaga
19201 gtttaaaata ttacatttaa ggaatccttt tttttgtttt gtttggttgt ttttgtgctt
19261 attttctag taaaagacct catgagtggt gaatctgtaa aaaagccttc aaacacaaac
19321 accatttgat cgaacacatg cgactgcatt ctggggagaa acctaccaa tgtgacaaat Delta/B7
19381 gcgggaagcg cttctcacac tcggggctgt actctcagca catgaatcat cgctactct

```

Produktgröße (RNA-Template) Primerpaar **Delta/F7**, **Delta/B7**: 244nt

Aaaccaggctgacaatgctgagagcaaactgttaatacaattacttgttggtaacattcaccaacagcatattattatgaaagcagc
agcacagagtttaaaatattacatttaaggaatcctttttttgtttgtttgtttttgtgcttattttctaggtaaaagacctcatgag
tgtggaatctgtaaaaaagccttcaacacaaaaca**ccatttgatcgaacacatgcg**

8.9.9 Ip3ka

Ip3ka: GGA012220, 18499 bp, DNA, linear, VRT 07-APR-1999

Quelle: AJ012220 Gallus gallus ip3ka gene, exons A to D and alternative partial transcripts

gi|4584404|emb|AJ012220.1|GGA012220[4584404]

BASE COUNT 4948 a 3608 c 4299 g 5644 t
ORIGIN

```

10441 caaacaagca aaacaaacag aaaaaaaaa caccagtaag gagaagtcat caggtttgct
10501 tctgttacgc ttcatttaat tcttatgcag cccttgctcc ctatgtgcta gtgtgggggt Ip3ka/F11
10561 tattagtaca cacgtgggca ggcacctacg ctgcatctgt ctttaatgca gtactcaaac
10621 cagctctttg tatgttaatg ccttaatgta gtgcccttca gggctgtgca gagagattta
10681 tttagtccca gaaatggagt agctgcatt gcctagtggg gtactgacct gtatcacaca
10741 gtgccaagat gactttgtct tactgtagtt tctatcacag tgtgtctggg tctgggcttg Ip3ka/B11
10801 gcttgatctg tgtggagtgt tgcattgaat gtgtgtgtaa tcataaccct tctgagtgt
10861 tgtgtagggt ggaagaagag ggttgagagg ttaccaaaga taattaggag agataccgtt

```

Produktgröße (RNA-Template) Primerpaar **Ip3ka/F11**, **Ip3ka/B11**: 296nt

tcttatgcagcccttgctccctatgtgctagtgtgggtttattagttacacagctgggcaggcacctacgctgcatcgtgctttaatgcagtac
tcaaaccagctctttgtatgttaatgccttaatgtagtgccttcagggtgtgagagagatttatttagtctagaaaatggagtagctgcat
ttgcctagtgggtgactgacctgtatcacacagtgccaagatgactttgtcttactgtagtttctatcacagtggtctggctgg**gcttgcc**
ttgatctgtgtgga

9 Dank

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. S. Thanos für die Überlassung dieses interessanten Themas, seine Unterstützung, die freundliche Aufnahme in sein Team und die Bereitstellung eines Arbeits- und Schreibplatzes.

Herzlich danke ich Prof. Dr. C. Klämbt für die Übernahme der externen Betreuung im Fachbereich Biologie und die vielen anregenden Diskussionen mit konstruktiver Kritik und wertvollen Hinweisen.

Prof. Dr. W. Paulus danke ich für die Möglichkeit, die Sequenzierungen in seinem Labor durchführen zu können. Der Dank gilt besonders Frau B. Hillmann für die ausführliche technische Einweisung und stete Hilfe.

Mein ganz besonderer Dank gebührt PD Dr. B. Eing für seine hervorragende Unterstützung und ausdauernde Hilfe bei allen Problemen. Seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und fachliche Kompetenz haben diese Arbeit im Wesentlichen vorangetrieben.

Für ihre Hilfe bei verschiedenen Telexperimenten und ihre Diskussionsbereitschaft danke ich Dr. U. Lammel und Dr. P. Macchi. Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. R. Naskar für ihre Einweisung in die ISH und die vielen Diskussionen. Konstruktive Kritik und Hilfe bei der ISH und vor allem am Manuskript fand ich bei Dr. P. Pennekamp. Ich danke ihr herzlich!

Für ihre geduldige Einweisung in die Molekularbiologie und deren Tücken sowie ihre Hilfe am Manuskript danke ich Frau S. Schröder. Für technische Hilfe und ausdauernde Unterstützung aller Art gebührt mein Dank Frau I. Romann und Frau M. Wissing. Frau M. Wagner und Frau S. von der Heide übernahmen die Foto-Arbeiten, Frau L. Pinheiro half mir sehr beim Druck. Vielen Dank!

Meiner gesamten Arbeitsgruppe in ihren wechselnden Besetzungen danke ich für die freundliche Aufnahme, die Diskussionsvielfalt und die großen und kleinen (all-) täglichen Unterstützungen.

Ein Riesendankeschön meinen Freunden! Sie können hier nicht namentlich genannt werden, die Liste ist lang, aber ich hoffe, es fühlen sich alle angesprochen! Ihre Freundschaft und vielfältigen Frustbewältigungs-Strategien haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Nicht zu vergessen meine Mannschaft, die mir mehr half, als sie es wahrscheinlich vermutet.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern mit ihren Familien sowie meinem Freund Thomas. Sie haben mich immer und in Allem mit ganzer Kraft unterstützt und mir den Rücken gestärkt, auch wenn es wahrscheinlich nicht ganz einfach und verständlich für sie war.

Lebenslauf

Name Silke Anke Stoll
Geboren am 09.07.1971 in Löbau
Familienstand ledig
Name des Vaters Joachim Stoll
Name der Mutter Renate Stoll, geb. Schmidt

Schulbildung

1978-1988 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule Marie Curie, Dohna / Sachsen
1988-1990 Erweiterte Oberschule Rainer Fetscher, Pirna / Sachsen
06.07.1990 Hochschulreife (Abitur), Gesamtnote sehr gut, Pirna / Sachsen

Beruflicher Werdegang

1990–1992 Ausbildung zur Assistentin an Bibliotheken an der Kreis- und Stadtbibliothek, Zossen / Brandenburg
09.07.1992 Abschluss, Gesamtnote sehr gut, Weimar / Thüringen
1992 Assistentin an Bibliotheken an der Kreis- und Stadtbibliothek, Zossen / Brandenburg
1994-1995 Studentische Hilfskraft, Dr. R. Rost
Institut für Physiologie, Friedrich Schiller Universität Jena / Thüringen
1996-1998 Studentische Hilfskraft, Prof. Dr. M. S. Fischer
Institut für Spezielle Zoologie und Evolutionsbiologie mit Phyletischem Museum, Friedrich Schiller Universität Jena / Thüringen
1998- Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie, Klinik für Augenheilkunde, Prof. Dr. Dr. S. Thanos, Universitätsklinikum Münster / Nordrhein-Westfalen

Studium

1992-1994 Biologiestudium, Universität Potsdam / Brandenburg
23.09.1994 Vordiplom, Gesamtnote befriedigend, Universität Potsdam / Brandenburg
1994-1998 Biologiestudium, Friedrich Schiller Universität Jena / Thüringen

- 1996-1997 Studienaufenthalt, Universidad Nacional de Rio Cuarto
Rio Cuarto / Cordoba, Argentinien
- 12.10.1998 Diplom (Hauptfach: Spezielle Zoologie), Gesamtnote sehr gut,
Friedrich Schiller Universität Jena / Thüringen
- 1998-2003 Promotionsstudium Biologie, Westfälische Wilhelms Universität Münster /
Nordrhein-Westfalen
- 1998-2003 Philosophiestudium, Westfälische Wilhelms Universität Münster /
Nordrhein-Westfalen

Beginn der Dissertation

01.09.1998 in der Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie, Klinik für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Münster, unter der Betreuung von Prof. Dr. Dr. S. Thanos und der Mitbetreuung durch Prof. Dr. C. Klämbt, Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Westfälische Wilhelms Universität Münster.

Publikationen

Abstracts

Stoll, S., A. Haas (1998): Skeletogenesis and growth of the toad, *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae), up to the end of metamorphosis. *Zoology* 101, Supplement I (DZG 91.1): 42

Originalarbeiten

Stoll, S., S. König, S. Thanos (2002): Isolation of total-RNA from formalin-fixed rat retina. *J Neurosci Meth* 120: 55-63

.....
Unterschrift