

Aus dem Department für Anatomie Tübingen  
Institut für klinische Anatomie

**Zeitliche und funktionelle Charakterisierung von microRNA-9  
während der Entwicklung des Mittelhirns im Hühnerembryo**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
**Carola Barbara Huber**

2017

Aus dem Department für Anatomie Tübingen  
Institut für klinische Anatomie

**Zeitliche und funktionelle Charakterisierung von microRNA-9  
während der Entwicklung des Mittelhirns im Hühnerembryo**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
**Carola Barbara Huber**

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Just  
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Klein

Tag der Disputation: 12.05.2017

**Meiner Familie gewidmet**

**Inhaltsverzeichnis** **Seite**

---

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	V
Anhangsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Frühe Entwicklung des Nervensystems	1
1.2 MicroRNAs (miRs)	4
1.2.1 Funktion	5
1.2.2 Biogenese	6
1.2.3 MicroRNA und die Entwicklung des Mittelhirns	8
1.2.4 MicroRNA-9	8
1.3 Das Hühnchen als Modellorganismus	8
1.4 Fragestellung	9
2. Material	11
2.1 Lösungen	11
2.1.1 Elektroporation und Arbeiten am Hühnchen	11
2.1.2 Immunhistochemie / Antikörper-Färbung	12
2.1.3 In situ-Hybridisierung	12
2.1.4 Arbeiten mit Bakterien	14
2.1.4.1 Medien	14
2.1.4.2 Plasmid-Aufreinigung	15
2.1.5 Arbeiten mit DNA	15
2.1.5.1 DNA-Größenstandards (Ladder)	16
2.1.5.2 Kits zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen	17
2.1.6 Arbeiten mit RNA	17
2.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.2.1 Arbeiten am Hühnerembryo	17
2.3 Geräte	18
2.3.1 Arbeiten am Hühnerembryo	18
2.3.2 Arbeiten mit Bakterien	18
2.3.3 Arbeiten mit DNA	18

2.3.4 Zentrifugen	18
2.4 Enzyme	19
2.4.1 Arbeiten mit DNA	19
2.4.2 Arbeiten mit RNA	19
2.4.3 Restriktionsendonukleasen	19
2.5 Anti-sense mRNA (Riboprobes)	20
2.6 Antikörper	21
2.6.1 Antikörper für in situ-Hybridisierung	21
2.6.2 Immunhistochemie	21
2.7 Plasmide und Vektoren	23
2.7.1 Expressionsvektoren	23
2.7.2 DFRS-S9 und DFRS-control Vektoren	23
2.8 Verwendete Zellen/Bakterien	25
2.9 Mikroskope	25
2.10 Programme, Software, Webseiten	25
3. Methoden	26
3.1 Manipulationen am Hühnerembryo	26
3.1.1 Brüten und Vorbereitung	26
3.1.2 In ovo-Elektroporation	28
3.1.2.1 Herstellen von Mikrokapillaren für DNA-Injektion	30
3.1.3 Embryonen fixieren	30
3.1.4 „Open book“ Präparationen	31
3.2 Klonierung/Arbeiten mit Bakterien	31
3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen	31
3.2.2 Transformation	32
3.2.3 Plasmidpräparation	32
3.3 DNA-Manipulation	32
3.3.1 Agarosegelelektrophorese	32
3.3.2 Gel-Aufreinigung / Gelextraktion	33
3.3.3 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	33
3.3.4 PCR	34
3.3.4.1 Mini-PCR	35
3.3.5 Restriktionsendonukleasen	35

3.3.5.1 Kontrollverdau	36
3.3.5.2 Double digest	36
3.3.5.3 Herstellung neuer Vektoren	37
3.3.5.4 Dephosphorylierung	37
3.3.6 Ligation	38
3.3.7 microRNA9-Vektor-Design	39
3.3.7.1 Annealing der Oligonukleotide	40
3.3.8 in vitro-Transkription	40
3.4 Immunhistochemische Analyse	41
3.5 RNA-Analyse	42
3.5.1 RNA-ISH	42
3.5.2 LNA-ISH	43
3.6 Bildgebung / Datengewinnung	43
3.6.1 Kontrolle nach Fixierung	43
3.6.2 Fotografieren von „open book“ Präparationen	43
3.6.3 Fotografieren von Embryonen nach ISH	44
3.6.4 Auswertung	44
3.6.5 Computeranalyse von MicroRNA-9-Bindungsstellen	44
4. Ergebnisse	45
4.1 Expression von microRNA-9	45
4.1.1 LNA-in situ-Hybridisierung	45
4.1.2 DFRS-S9 und DFRS-control	50
4.1.3 Funktionelle Überexpression von microRNA-9	53
4.2 Auswirkung von microRNA-9 auf die Genexpression	55
4.2.1 Computeranalyse der microRNA-9-Bindungsstellen für Gene der MHB	56
4.2.2 FGF8	56
4.2.3 WNT1	58
4.3 Auswirkung von microRNA-9 auf die Differenzierung in der MHB	59
5. Diskussion	62
5.1 Expressionsmuster von microRNA-9	62
5.2 Auswirkung von microRNA-9 auf die Genexpression	65
5.2.1 Regulation von WNT1 und FGF8	65
5.3 Auswirkung von microRNA-9 auf die Differenzierung	68

5.4 Zusammenfassung	68
6. Literaturverzeichnis	70
7. Erklärung zum Eigenanteil	76
8. Danksagung	77
9. Anhang	78
9.1 Anleitung immunhistochemische Analyse	78
9.2 Anleitung whole mount RNA-ISH	80
9.3 Anleitung LNA-ISH	83



## **Abbildungsverzeichnis**

---

Abb. 1	Entstehung der Blastula	1
Abb. 2	Neurulation	2
Abb. 3	Einteilung der AP Achse des Neuralrohres	4
Abb. 4	Biogenese und Genregulation von microRNA	7
Abb. 5	Verwendete DNA Standards	17
Abb. 6	DFRS-S9 und DFRS-control Vektoren	25
Abb. 7	Verschiedene Stadien eines Hühnchenembryos	29
Abb. 8	Injektion und Elektroporation am Hühnchenembryo	31
Abb. 9	Schema des pSilencer 1.0-U6 Expressionsvektors	40
Abb. 10	Whole mount ISH mit LNA-Sonden gegen miR-9	47
Abb. 11	Schnitte durch HH10 und HH23 Embryonen nach LNA ISH gegen microRNA-9	49
Abb. 12	Expressionsmuster von miR9 im embryonalen Gehirn	52
Abb. 13	Kontrollvektor für DFRS-S9	53
Abb. 14	Überexpression von microRNA-9 entlang der anterior-posterioren Achse des Gehirns	55
Abb. 15	Herunterregulation von FGF8 durch ektope miR9	58
Abb. 16	Überexpression von microRNA-9 kann die Wnt-1 Expression regulieren	60
Abb. 17	Auswirkung von miR9 auf die Differenzierung in der MHB	61
Abb. 18	Gene zur Aufrechterhaltung der MHB	65

## **Tabellenverzeichnis**

---

Tabelle 1	Restriktionsendonukleasen NEB	21
Tabelle 2	Restriktionsendonukleasen Fermentas	21
Tabelle 3	Informationen zu Riboprobes	21
Tabelle 4	Entwicklungsstadien beim Hühnchen nach HH	27
Tabelle 5	Verwendete Einstellungen des Elektroporators	31
Tabelle 6	Standardprotokoll für eine PCR	35

## **Anhangsverzeichnis**

---

Anhang 1	Immunhistochemische Analyse	76
Anhang 2	RNA-ISH	78
Anhang 2	LNA-ISH	81

## **Abkürzungsverzeichnis**

---

AK	Antikörper
AP	anterior-posterior
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DE	Diencephalon
DEPC	Diethylcarbonat
DIG	Digoxigenin
DMB	diencephalon-mesencephalon boundary
DMF	Dimethylformamid
DV	dorso-ventral
E	Embryonaltag
FCS	fetal calf serum – fetales Kälberserum
Fgf8	fibroblast growth factor 8
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FP	floorplate – Bodenplatte
GFP	green fluorescent protein – grün fluoreszierendes Protein
HH	Stadieneinteilung nach Hamburger und Hamilton
ISH	in situ-Hybridisierung
LNA	locked nucleid acid
MABT	Maleinsäurepuffer mit Tween-20
MCS	multiple cloning site
ME	Mesencephalon
MHB	mid-hindbrain boundary
miRNA	microRNA
miR9	microRNA-9

mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nt	nucleotides
NTMT	Natrium-Tris-Magnesiumchlorid mit Tween-20
OD	optische Dichte
o/n	over night – über Nacht
PBS	phosphate buffered saline - phosphatgepufferte Salzlösung
PBT	PBS mit Polysorbat 20 (Tween-20)
PCR	polymerase chain reaction – Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
piRNA	Piwi-interacting RNA
pre-miRNA	precursor microRNA
pri-miRNA	primary microRNA
qiRNA	QDE1-interacting RNA
RE	Rhombencephalon
REN	Restriktionsendonuklease
RFP	red fluorescent protein – rot fluoreszierendes Protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid – Ribonukleinsäure
RP	roofplate – Deckplatte
rpm	rounds per minute – Drehungen pro Minute
siRNA	small interfering RNA
sncRNA	small non-coding RNA
snRNA	small nuclear RNA
Te	Tectum
Teg	Tegmentum
Tel	Telencephalon
tRNA	transfer RNA
U	Aktivität von Enzymen
UTR	untranslatierte Region
Wnt1	wingless-type MMTV integration site family, member 1
WT	wild type – Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

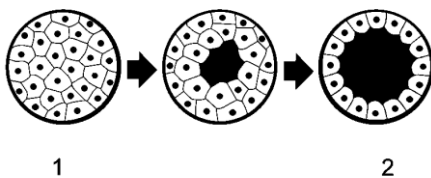
## 1. Einleitung

---

### 1.1. Frühe Entwicklung des Nervensystems

Die Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) der Vertebraten beginnt während der Gastrulationsphase der Entwicklung. Dies ist ein außerordentlich komplexer Vorgang, welcher durch Interaktionen verschiedenster Faktoren wie Morphogene, nicht kodierende RNA (small non-coding RNA, sncRNA) und Transkriptionsfaktoren bewirkt wird.

Nach den ersten Teilungen der Zygote entsteht die Morula, ein kugeliges Zellhaufen aus 8 bis 32 Zellen (Blastomeren). In diesem Stadium differenzieren sich die Zellen in eine innere und äußere Zellmasse, deren Zellen noch keine morphologischen Unterschiede zeigen. Die äußeren Zellen bilden untereinander tight junctions aus, wodurch die innere Zellmasse vom äußeren Flüssigkeitsmilieu getrennt wird. Mit diesem Schritt verlieren die Zellen ihre Totipotenz und werden pluripotent. Die Abtrennung nach Außen bildet die Grundlage für die Entstehung der Blastula, einem von Zellen umschlossenen, flüssigkeitsgefüllten Hohlraum (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Entstehung der Blastula**

1: Morula, 2: Blastula

Academic dictionaries and encyclopedias  
(<http://en.academic.ru>)

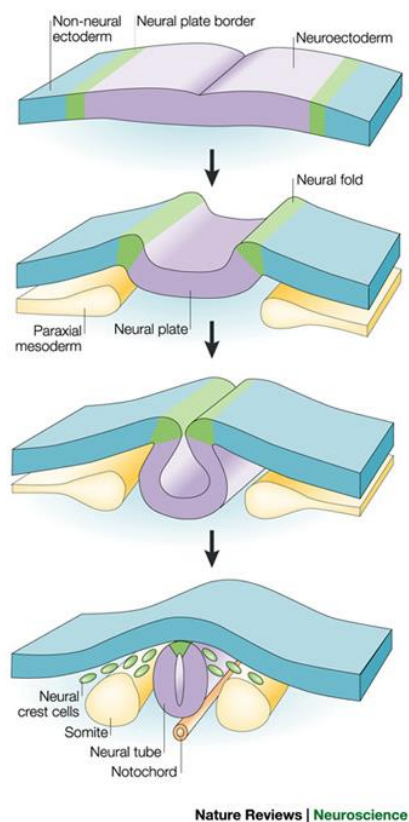
Auf das Stadium der Blastula folgt die Gastrulation. Während der Gastrulation werden Zellen durch gerichtete Wanderungen neu positioniert und es kommt zur Ausbildung der drei Keimblätter: Ektoderm, Mesoderm und Entoderm. Diese Zellen etablieren den vielschichtigen Bauplan des Organismus. Aus dem Ektoderm gehen Hautzellen (Epidermis) sowie das zentrale und periphere Nervensystem hervor. Das Mesoderm bildet die Grundlage für Knochen, Bindegewebe und Muskulatur. Aus dem Entoderm entstehen der Verdauungstrakt sowie alle inneren Organe.

Bei Vögeln und Säugern unterscheidet sich diese Entwicklung von der der Amphibien. Bei Vögeln bleibt durch die große Menge an Dotter die Blastula eine flache Scheibe (Keimscheibe). Am hinteren Pol der Keimscheibe bildet sich der Primitivstreifen, von welchem aus die einzelnen Keimblätter gebildet werden.

Am rostralen Ende des Primitivstreifens sitzt ein Organisationszentrum, das im Hühnchen „Hensen’s Node“ (Hensens Knoten), bei Amphibien Spemann’s Organizer (Spemann Organisator) und bei Säugern nur Node (Primitivknoten) genannt wird (Lumsden and Krumlauf, 1996). Dieses Organisationszentrum produziert Signalproteine, welche zur Bildung der Neuralplatte und somit letztendlich zur Entwicklung des Gehirns führen.

Bei höheren Vertebraten beginnt während der Gastrulation schon die Neurulation. Sie ist gekennzeichnet durch ein Aufrollen der Neuralplatte entlang ihrer anterior-posterioren Achse zu einer Röhre, dem sogenannten Neuralrohr,

und einer Abtrennung von der Epidermis (Abbildung 2). Die anterioren und posterioren Öffnungen, die sogenannten Neuroporen, schließen sich erst später. Aus dem Neuralrohr wandern die Neuralleistenzellen aus und bilden das periphere Nervensystem.



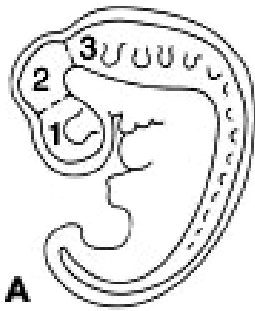
**Abbildung 2: Neurulation**

*Das Neuroektoderm separiert sich vom nicht-neuronalen Ektoderm und bildet die Neuralplatte. Diese rollt sich auf und bildet das Neuralrohr. Die Neuralleistenzellen wandern aus dem Neuralrohr aus und bilden das periphere Nervensystem (Gammill and Bronner-Fraser, 2003).*

Makroskopisch bildet das Neuralrohr mehrere Ausstülpungen, wodurch sich die Hirnanlage in verschiedene Bereiche gliedert. Diese frühe Gliederung trägt zur Ausbildung unterschiedlicher Funktionen und auch Zelltypen bei. Gleichzeitig kommt es auf zellulärer Ebene zu einer ortsspezifischen Expression von Proteinen (Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren und Signalproteine), die das weitere Schicksal der Zellen determinieren.

Entlang der anterior-posterioren (AP) Achse werden diese Hirnbläschen zuerst in Prosencephalon (Vorderhirn), Mesencephalon (Mittelhirn), Rhombencephalon (Rautenhirn) und Medulla spinalis (Rückenmark) eingeteilt (Abbildung 3). Das Prosencephalon unterteilt sich später in Telencephalon und Diencephalon. Aus letzterem entwickelt sich auch die Augenanlage. Das Rhombencephalon gliedert sich noch in Metencephalon (Hinterhirn) und Myelencephalon (Nachhirn). Aus dem Mesencephalon gehen die funktionell unterschiedlichen Strukturen des Mittelhirns, das dorsale Tectum (Mittelhirndach) und das ventrale Tegmentum (Mittelhirnhaube) hervor. Bei Vögeln, Fischen und Amphibien werden die Neurone des Tectums in Schichten angeordnet und empfangen synaptische Signale aus der Retina. Die Neurone des Tegmentums bilden verschiedene Kerne, wie z. B. die Substantia nigra, deren Neurone bei Morbus Parkinson degenerieren.

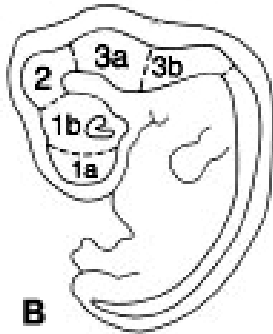
Morphogene aus den verschiedenen Organisationszentren entlang der anterior-posterioren und dorso-ventralen (DV) Achse definieren die Grenzen dieser Regionen z.B. durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren während der Neuralentwicklung (Altmann and Brivanlou, 2001). Im Laufe der Entwicklung werden die Hohlräume zu den Hirnventrikeln und im Bereich des Rückenmarks zum Zentralkanal (Canalis centralis).



**A**

**Abbildung 3: Einteilung der AP Achse des Neuralrohres**

**A:** Am anterioren Ende stülpen sich zuerst die 3 sogenannten Primärbläschen aus: das Prosencephalon (1), das Mesencephalon (2) und das Rhombencephalon gefolgt vom Rückenmark.



**B**

**B:** Aus dem Prosencephalon entwickeln sich Telencephalon (1a) und Diencephalon (1b). Das Rhombencephalon (3) präsentiert sich früh in der Entwicklung wie ein segmentierter Regenwurm.

## 1.2 MicroRNAs (miRs)

MicroRNAs sind hoch konservierte, nicht kodierende RNA-Einzelstränge mit einer allgemeinen Größe von 21 bis 23 Nukleotiden (nt), die an unzähligen biologischen und zellulären Vorgängen beteiligt sind. Nur ungefähr 1,2% des Genoms von Säugetieren kodiert für Proteine. In den vergangenen Jahren zeigten unterschiedliche Forschungsarbeiten, dass es verschiedene Klassen dieser sncRNAs im Genom von Vertebraten gibt. Sie werden eingeteilt in snRNA (small nuclear RNA), tRNA (transfer RNA), microRNA (microRNA), siRNA (small interfering RNA), qiRNA (QDE1-interacting RNA) und piRNA (Piwi-interacting RNA). Außer snRNA und tRNA greifen alle diese Moleküle in die Regulation von Genen ein. Ein Teil von diesen sogenannten kleinen nicht-kodierenden RNAs (small non-coding RNAs, sncRNAs) werden zu regulatorischen RNAs prozessiert, welche in allen Zellarten zu finden sind (Kapsimali et al., 2007; Cao, et al., 2006; Krichevsky, et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2002; Wienholds et al., 2005; Landgraf et al., 2007; Sempere et al., 2004; Wulczyn et al., 2007).

### 1.2.1 Funktion

MicroRNAs wurden erstmals im Fadenwurm *C. elegans* beschrieben (Lee et al., 1993). Mittlerweile wurden in den verschiedensten Pflanzen und Tieren (Bartel, 2004) und auch in einzelligen Algen (Zhao et al., 2007) microRNAs gefunden.

MicroRNAs regulieren die Genexpression auf zwei verschiedene Arten: sie binden an die messengerRNA (mRNA) und hemmen somit die Translation, oder aber die Bindung an die mRNA führt direkt zum Abbau (Kosik, 2006). Die Komplementarität der Bindesequenz und die Beteiligung verschiedener Proteine bestimmen, ob es zur Hemmung der Translation oder zur Degradation der mRNA kommt (Wienholds & Plasterk, 2005). In Säugetieren wurde gezeigt, dass die Genregulation über Bindung der microRNA an die 3' untranslatierte Region (3'-UTR) der mRNA von Zielgenen geschieht. Es zeigte sich, dass eine nur partielle Komplementarität zur Translationshemmung führte, während eine perfekte Basenpaarung die Degradation der Ziel-mRNA einleitete. Guo et al. zeigten, dass bei Säugern microRNA hauptsächlich zur Degradierung der Ziel-mRNA führt (Guo et al., 2010).

MicroRNAs werden in großer Menge im Gehirn exprimiert und können dort Region-spezifisch oder Gehirn-spezifisch exprimiert sein (Li & Jin, 2010; Saba & Schratt, 2010). Sie sind für die Embryonalentwicklung ebenso unentbehrlich wie für die Funktion differenzierter Gewebe. Ebenfalls spielen sie eine Rolle bei der Entwicklung und Verhinderung von Krankheiten (Friedman & Jones, 2009; Malone & Hannon, 2009; Stefani & Slack, 2008).

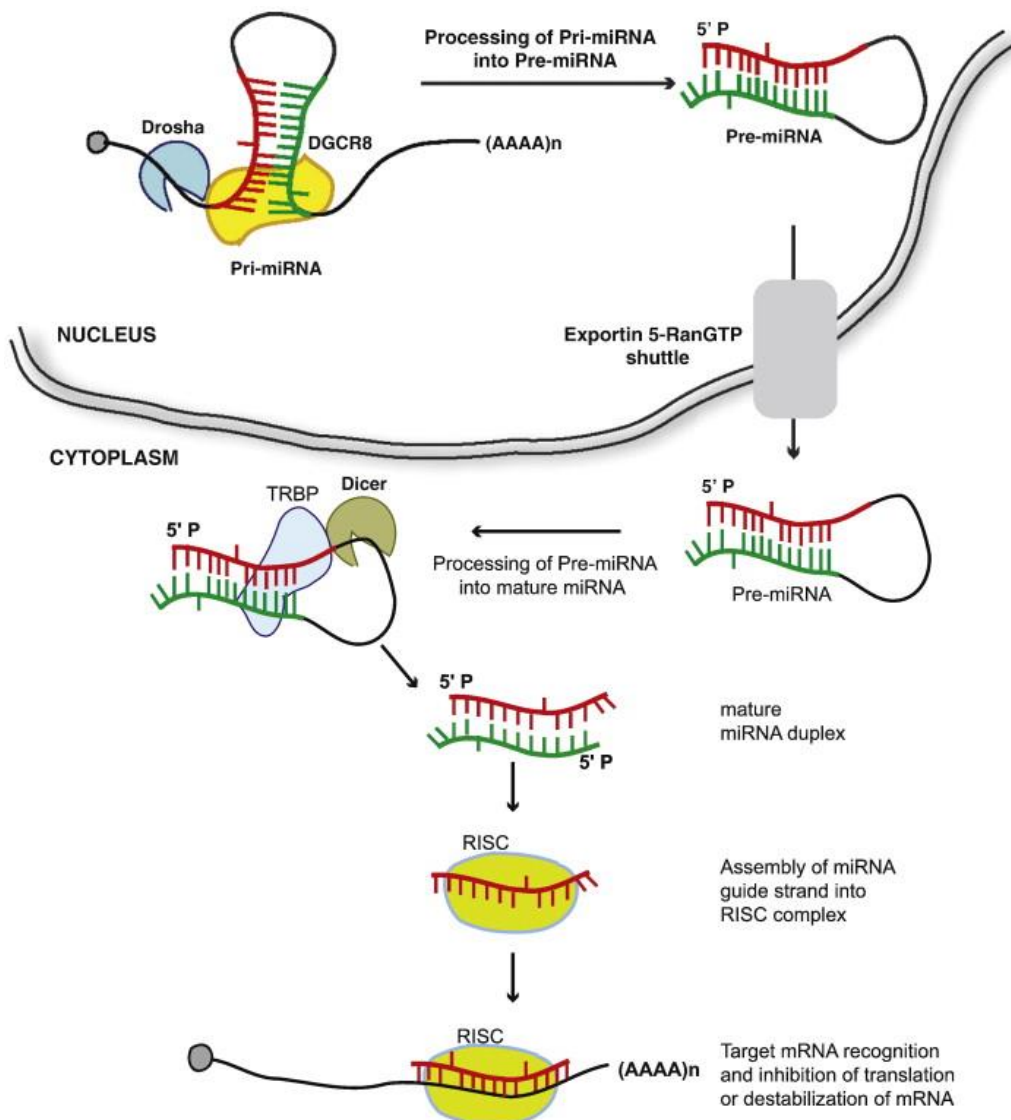
Während der Embryonalentwicklung regulieren microRNAs die Entwicklungsprozesse durch An- bzw. Ausschalten von Genen. Die Helikase Dicer spielt eine zentrale Rolle bei der Biogenese von microRNAs. Knockout-Studien von Dicer in Mäusen und Zebrafischen zeigten, dass ohne microRNA die Embryonalentwicklung gestört ist (Bernstein et al., 2003; Wienholds et al., 2003). Eine fehlende Produktion von microRNAs nach dem Ausschalten von Dicer führte dazu, dass der normale Ablauf biologischer Prozesse wie Proliferation und Differenzierung von Zellen nicht mehr funktionierte (Inui et al., 2010; Murchison et al., 2005) und die meisten Embryonen starben (Bernstein et al., 2003; Wienholds et al., 2003).



Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass microRNAs wichtige Komponenten der Entwicklung des Nervensystems sind, v.a. in Bezug auf Proliferation, Differenzierung und Zellreifung. Dennoch ist bisher relativ wenig bekannt über die genauen Mechanismen und Interaktionen dieser microRNAs.

### **1.2.2 Biogenese**

Die Gene der microRNAs befinden sich in intronischen, exonischen oder intergenischen Regionen sowie in nicht-codierenden Regionen des Genoms. Sie werden mittels einer RNA-Polymerase II oder III vom Genom abgelesen (Friedman and Jones, 2009; Grillari and Grillari-Voglauer, 2010; Rodriguez et al., 2004). Das entstehende Primärtranskript, die primary microRNA (pri-miRNA), lagert sich als Doppelstrang mit einem Loop zusammen (Länge 500 bis 3000 bp) und trägt den üblichen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende sowie eine 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende der Kette (Abbildung 4). Im Zellkern wird die pri-miRNA durch den Drosha(RNaseIII)/Pasha-Komplex in die precursor microRNA (pre-miRNA) prozessiert, welche eine Länge von ungefähr 70 nt aufweist. Die pre-miRNA zeigt dabei eine charakteristische Haarnadelstruktur (hairpin). Die pre-miRNA wird durch Exportin-5 mit Hilfe des Co-Faktors Ran-GTP über die Kernporen aktiv in das Zytoplasma exportiert (Yi et al., 2003, Stewart, 2009). Die weitere Reifung der pre-miRNA zur microRNA findet im Zytoplasma statt. Durch das RNase III Enzym (Helicase) Dicer werden die precursor-miRNA in 21 bis 23 bp lange ds-miRNA geschnitten (guide- und passenger-Strang). MicroRNA und andere sncRNA können nicht für sich alleine arbeiten. Sie formen einen Effektor-Ribonukleoprotein-Komplex, genannt RISC (RNA-induced silencing complex). Aufgrund thermodynamischer Stabilitätsunterschiede der beiden Stränge wird der passenger-Strang ausrangiert. Der Strang, der im RISC Komplex bleibt ist der guide-Strang, welcher die Ziel-mRNA zerstört oder die Translation hemmt (Mallanna and Rizzino, 2010). Der Gegenstrang wird in Annotation mit einem Stern markiert. Interessanterweise kann in wenigen Fällen der passenger-Strang (miRNA\*) auch an der Genregulation mitwirken (Chen and Rajewsky, 2007; Packer et al., 2008).



**Abbildung 4: Biogenese und Genregulation von microRNA**

Die Gene der microRNA werden im Zellkern in primäre microRNA (pri-miRNA) transkribiert, welche zur Vorläufer-microRNA (pre-miRNAs) prozessiert wird. Nach dem Transport ins Zytoplasma werden die pre-miRNA zu miRNA-Doppelsträngen verarbeitet. Nach Integration in den RNA-induced silencing complex (RISC) wird einer der beiden Stränge - miR (guide) oder miR\* (passenger) - zur Ziel-mRNA geleitet, was entweder zur Hemmung der Translation oder zur Degradation der mRNA führt (Mallanna & Rizzino, 2010).

### **1.2.3 MicroRNA und die Entwicklung des Mittelhirns**

Das embryonale Mittelhirn des Hühnchens exprimiert schon früh verschiedene microRNAs in seinen Regionen (Darnell et al., 2006; Sweetman et al., 2006). Konditionelle Dicer Knockouts im Mittelhirn in Mäusen zeigten außerdem eine Fehlbildung in Tectum und Cerebellum sowie ein Fehlen von miR-9, miR-124 und miR-218. Daraus lässt sich folgern, dass microRNAs eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Mittelhirns spielen. MiR-9 und miR-124 sind dafür bekannt, in die Entwicklung und Proliferation von Neuronen und Ihren Vorläuferzellen einzugreifen, jedoch zeigten Untersuchungen dieser microRNAs unterschiedliche und zum Teil auch widersprüchliche Ergebnisse in einer Vielzahl von Modellen.

### **1.2.4 MicroRNA-9**

Sowohl guide als auch passenger Strang (microRNA-9 und microRNA-9\*) werden reichlich im ZNS exprimiert (Kapsimali et al., 2007; Lagos-Quintana et al., 2002; Wienholds & Plasterk, 2005; Wienholds et al., 2005). Die Rolle von microRNA-9 in Vertebraten wurde bisher in verschiedenen Modellen wie Fisch, Xenopus und Maus mit „gain and loss of function“-Experimenten untersucht (Bonev et al., 2011; Leucht et al., 2008; Shibata et al., 2008 & 2011). In Fischen und Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) wird microRNA-9 im ganzen Gehirn exprimiert. Im Zebrafisch zeigte sich, dass in der Region der mid-hindbrain boundary (MHB) frühzeitig in der Entwicklung keine microRNA-9 mehr exprimiert wird. Diese fehlende Expression zeigt sich als wichtig für den Erhalt der proliferierenden Zellen in der MHB. Eine Überexpression von microRNA-9 in der MHB führte zu einer reduzierten Expression von *Fgf8*, *Her5* und *Her9* in dieser Region (Leucht et al., 2008). In *Xenopus* regulierte microRNA-9 die neuronalen Progenitorzellen Region-spezifisch: die Proliferation von Progenitorzellen wurde abgeschwächt, die Differenzierung beschleunigt.

## **1.3 Das Hühnchen als Modellorganismus**

Das Hühnchen ist ein idealer Modellorganismus der Entwicklungsbiologie. Einige seiner größten Vorteile sind der einfache Zugang zu Eiern und

Embryonen in gleichem Maße. Befruchtete Eier sind günstig zu erwerben und unterliegen in Deutschland nicht dem Tierversuchsgesetz, da es sich um Lebensmittel handelt. Dadurch können Hühnerembryonen leicht und ohne Aufwand erworben und bearbeitet werden. Ebenso einfach ist der Zugang zum Embryo sowie dessen Kultivierung. Hühnerembryonen können sich auch bei geöffnetem Ei oder sogar in der Kulturschale unter den richtigen Bedingungen problemlos weiter entwickeln. Dies ermöglicht die einfache, direkte und längerfristige Beobachtung der Entwicklung, die in diesem Umfang *in vivo* ansonsten nur noch beim Zebrafisch möglich ist. Gegenüber dem Zebrafisch hat das Hühnchen jedoch den Vorteil, dass seine embryonale Entwicklung als höherer Vertebrat viel eher dem der Säugetiere entspricht. Die Vögel stellen hier die Brücke zwischen den Amphibien und den Säugetieren dar. Für die Experimente am sich entwickelnden Mittelhirn ist auch dessen absolute Größe im Hühnerembryo von Vorteil.

Viele der in dieser Arbeit verwendeten Methoden sind seit langer Zeit etabliert und führten zum Beispiel zur Entdeckung und Beobachtung von Wanderung und Differenzierung der Neuralleistenzellen (Le Douarin and Teillet, 1973). Obwohl die Methoden zur genetischen Manipulation noch relativ neu sind, sind ihre Erfolge für die lokale Überexpression und Unterdrückung von Genen beachtenswert. Mittels *in ovo*-Elektroporation können Vektoren mit inseriertem Gen in lokal begrenzten Regionen (z.B. Hirnregionen) zu fast jedem beliebigen Zeitpunkt ekto exprimiert werden. Bei der *in ovo*-Elektroporation werden die Zellenmembranen mit schwachen Stromstößen niedriger Spannung (ca. 10V) durchlässig gemacht, um den Durchtritt applizierter DNA-Moleküle zu erleichtern (Muramatsu et al., 1997). Durch Verwendung unterschiedlich geformter Elektroden lassen sich dadurch örtlich begrenzte Gebiete zu jedem beliebigen Zeitpunkt in der Entwicklung elektroporieren.

#### **1.4 Fragestellung**

Alle Erkenntnisse über microRNA-9 deuten auf eine außerordentlich wichtige Rolle für die Entwicklung und Differenzierung des Mittelhirnes hin. Die molekularen Details, wie microRNA-9 seinen Einfluss ausübt, auf welche Gene

sie wirkt und wie sie aktiviert wird, sind bisher noch nicht genau bekannt. Aus vorherigen Arbeiten lässt sich jedoch ein Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation der neuronalen Progenitorzellen vermuten. Obwohl die Sequenzen vieler microRNAs in verschiedenen Spezies sehr konserviert sind, wissen wir noch nicht viel darüber, ob auch ihre Wirkungsweise konserviert ist. Unterschiede, selbst kleine, könnten während der Evolution zu morphologischen Unterschieden geführt haben.

Zuerst habe ich die Expression von microRNA-9 im Gehirn des Hühnerembryos in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht, um die genaue Expression während der Entwicklung im Vergleich zu anderen Spezies festzustellen. Die spezifische Genexpression deutet auf die mögliche Rolle von microRNA-9 in der Entwicklung des Mittelhirnes hin. Um diese Regulationsmechanismen im Hühnerembryo zu untersuchen, habe ich die Konzentration von microRNA-9 im Mittelhirn und der MHB embryonaler Hühner ektopisch durch die Überexpression von microRNA-9 im Mittelhirn- und MHB- Vorläuferzellen mittels *in ovo*-Elektroporation beeinflusst. Für eine schnell wirkende Überexpression wurde käuflich erworbene microRNA-9 in die Zellen elektroporiert. Diese RNA-Konstrukte sind in der Zelle sofort aktiv, werden aber auch schnell wieder abgebaut. Für eine längere aber etwas später einsetzende Exposition der Zellen mit microRNA-9 wurde die DNA-Sequenz von microRNA-9 in einen Vektor kloniert.

Um analysieren zu können, welchen Einfluss microRNA-9 auf die Gene hat, die für die Aufrechterhaltung der MHB entscheidend sind, wurden diese Gene sowohl in wild type Embryonen untersucht und sichtbar gemacht als auch in Embryonen, welche durch o.g. Modifikationen microRNA-9 im Übermaß produzieren.

Im Anschluss an die Überexpressionsexperimente wurden anhand neuronaler Marker wie RMO-270 differenzierte Neurone sichtbar gemacht und deren Anzahl mit Kontrollembryonen verglichen.



Paraformaldehyd (PFA): 40 g PFA in 1xPBS  
pH 7,4 (mit NaOH)

Mowiol/DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan):  
2,4 g Mowiol Callbiochem  
6 g Glycerol  
6 ml H<sub>2</sub>O  
1 Spatelspitze Dabco Merck  
0,001% Thiomersal Merck  
12 ml PBS (pH 8,5)

PBS:Glycerol:  
5 ml PBS  
45 ml Glycerol  
0,001% Thiomersal  
1 Spatelspitze Dabco für Fluoreszenz

### 2.1.2 Immunhistochemie / Antikörper-Färbung

AB-Lösung  
PBS  
10 % FCS  
0,1 % Triton X-100  
0,001 % Thiomeroisal

### 2.1.3 In-situ Hybridisierung

PBT:  
1xPBS  
0,1 % Tween-20

DetergentMix (DetMix): 1 % Nonidet / Igepal Sigma  
1 % SDS  
0,5 % Desoxycholat Sigma  
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
1 mM EDTA (pH 8,0)  
NaCl (150 mM)

Hyb Mix: 50 % Formamid  
5x SSC (pH 4,5)  
2 % SDS  
50 µg/ml tRNA Roche  
2% Blocking Reagent powder Roche  
50µg/ml Heparin-Natrium EVRO OTC

Lösung X: 50 % Formamid  
2 x SSC  
1 % SDS

NTMT: 100 mM NaCl  
100 mM Tris-HCl (pH 9,5)  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 % Tween-20

Maleinsäurepuffer mit Tween-20 (MABT)  
100mM Maleinsäure  
150mM NaCl  
0,01 % Tween-20  
pH 7,5

Block: MABT  
20 % FCS Biochrom  
2 % BR powder (10 % stock in MABT)

Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT): Roche  
100 g/l (in 70 % Dimethylformamid (DMF))



5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP):  
50 g/l (in 70 % DMF)

Roche

#### 2.1.4 Arbeiten mit Bakterien

RF I:  
3 g RbCl  
2,02 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
0,74 g KAc  
0,38 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
37,5 ml Glycerol  
ad 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
pH 5,8 mit Essigsäure

RF II:  
0,3 g RbCl  
0,52 g MOPS  
2,75 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
37,5 ml Glycerol  
ad 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
pH 6,8 mit NaOH

##### 2.1.4.1 Medien

SOC-Medium:  
20 g/l Trypton  
0,5 g/l Hefeextrakt  
0,6 g/l NaCl  
0,2 g/l KCl  
10 mM  $\text{MgCl}_2$   
20 mM Glucose

NZY<sup>+</sup>-Medium:  
10 g/l Casein  
5 g/l Hefeextrakt  
5 g/l NaCl  
0,94 g/l  $\text{MgCl}_2$   
pH 7

LB-Amp Medium: 10 g/l Trypton  
 5 g/l Hefeextrakt  
 10 g/l NaCl  
 1:1000 Ampicillin (100 g/l Stammlösung)  
 (Konzentration und Art des Antibiotikums  
 austauschbar)  
 pH 7 – 7,4 (mit HCl/NaOH)

LB-Amp Platten: 100 ml LB-Amp-Medium  
 mit 1,5 g Agar-Agar

#### 2.1.4.2 Plasmid-Aufreinigung

Die folgenden Kits wurden zur Gewinnung („Aufreinigung“) von Plasmiden aus Bakterien verwendet. Die Inhaltsstoffe der einzelnen Puffer können den Anleitungen entnommen werden.

Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

#### 2.1.5 Arbeiten mit DNA

TBE 10-fach konzentrierte Stammlösung  
 108 g (890 mM) Tris Base  
 55 g (890 mM) Borsäure  
 40 g EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O

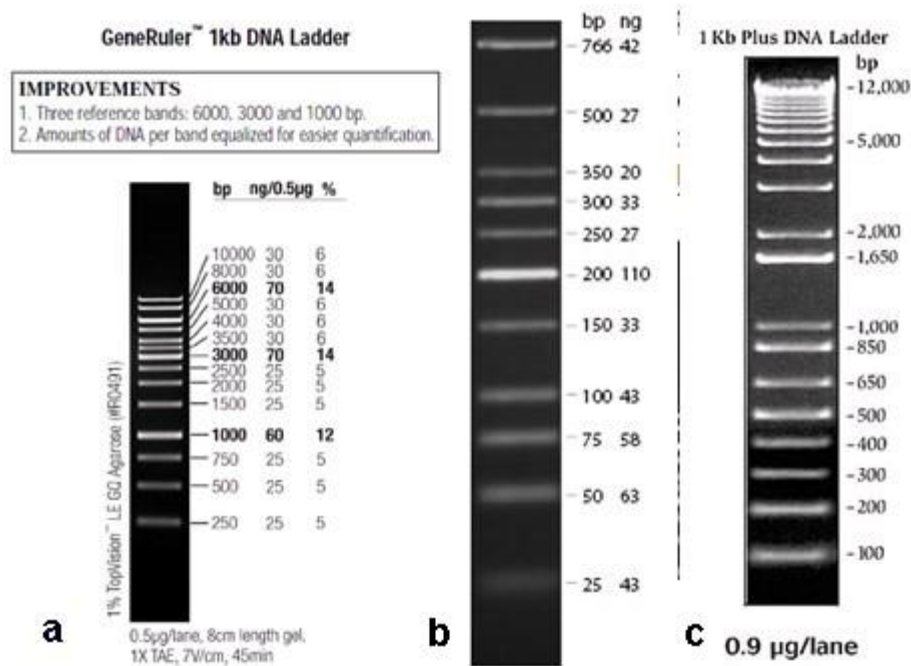
6x Ladepuffer 4 g Sucrose  
 0,025 g Bromphenolblau (Na-Salz)  
 in 10 ml H<sub>2</sub>O

Ethidiumbromidbad 50 µl Ethidiumbromid (10 g/l Stammlösung)  
 auf 250 ml H<sub>2</sub>O

Annealing Buffer                    100 mM Kaliumacetat  
     30 mM Hepes-KOH  
     2 mM Magnesiumacetat

### 2.1.5.1 DNA-Größenstandards (Ladder)

Fermentas GeneRuler:    0,5 µg/µl.  
 NEB LMW Ladder:        0,5 µg/µl. (0,5 µg/lane).  
 Invitrogen 1 kb Plus:    1µg/µl (0,7µg/lane).



**Abbildung 5:** Verwendete DNA Standards nach einer Gelelektrophorese  
 a) Fermentas Gene Ruler 1kb, b) NEB LMW Ladder, c) Invitrogen 1 kb Plus  
 DNA Ladder. Die Leitern wurden zur Verwendung im Verhältnis 1:10 verdünnt.  
 Die Leitern entstammen der Internetpräsenz der jeweiligen Firmen  
 ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com), [www.neb.com](http://www.neb.com)).

### **2.1.5.2 Kits zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die folgenden Kits wurden zur quantitativen Rückgewinnung („Aufreinigung“) aus Agarosegelen verwendet. Die Inhaltsstoffe der einzelnen Puffer kann den Anleitungen entnommen werden.

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

### **2.1.6 Arbeiten mit RNA**

Für alle Arbeiten mit mRNA wurden stets neue autoklavierte Pipettenspitzen und gesonderte Pipetten verwendet. Es wurde ausschließlich mit Handschuhen und nach Möglichkeit unter dem Abzug gearbeitet, um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden. Die benötigten Lösungen sind stets von großer Reinheit und/oder DEPC-behandelt, um RNAsen zu inaktivieren. Sie wurden nur für Arbeiten mit RNA verwendet. RNaseOUT (Ribonuclease Inhibitor; Invitrogen, Karlsruhe) wurde für die in vitro Transkription von Antisense-mRNA benutzt. Die Aufreinigung von mRNA aus Zellen erfolgte mittels Säulen anhand eines Kits (Qiagen, siehe nachfolgend). Die Bestandteile der im Kit enthaltenen Puffer kann der Anleitung entnommen werden.

RNeasy Mini Kit

Qiagen, Hilden

## **2.2 Verbrauchsmaterialien**

### **2.2.1 Arbeiten am Hühnerembryo**

Embryonale Hühner zählen nach deutschem Recht nicht zu Versuchstieren. Befruchtete Eier sind frei verkäuflich und bedürfen keines Tierversuchsantrages. Aus diesem Grund wurden die Eier bei den Verbrauchsmaterialien aufgeführt. Trotz dieser Tatsache wurden die Hühnerembryonen mit der notwendigen ethischen Sorgfalt behandelt.

Hisex Bruteier

Firma Weiss, Kirchberg/Iller

Glaskapillaren (für Mikroinjektionen)

World Precision Instruments

## 2.3 Geräte

### 2.3.1 Arbeiten am Hühnerembryo (inkl. Immunhistochemie und in situ-Hybridisierung)

Inkubatoren	Ehret, Emmendingen
PUL-1 (Herstellung von Glaskapillaren)	World Precision Instruments
Einmalspritzen 1ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	B Braun, Melsungen
Elektroporator: Intracel TSS10	Intracel, UK
Binokular: Stemi 2000-C	Zeiss
Schüttler: IKA-VIBRAX-VXR	Janke & Kunkel, Staufen

### 2.3.2 Arbeiten mit Bakterien

Inkubator: Certomat BS-1	B. Braun, Melsungen
Brutschrank	Fa. Binder, Tuttlingen
Spektroskop für OD-Messungen: Genesys10	ThermoScientific
Spektroskop für DNA- und RNA-Messungen	GeneQuantPharmacia (Heute: GE Healthcare)
Thermomixer comfort	Eppendorf

### 2.3.3 Arbeiten mit DNA

PCR-Geräte:	
Primus 96 plus	MWG Biotech, Ebersberg
MyCycler	Biorad, München
ABI Prism 7000 Detection System	Applied Biosystems, USA
Geldoku-System: Image Master VDS	Pharmacia, Uppsala (heute: GE Healthcare)
Transilluminator: MacroVue UV-25	Hofer, USA

### 2.3.4 Zentrifugen

Die verschiedenen Zentrifugen wurden, je nach benötigten Bedingungen, bei verschiedenen Experimenten verwendet und sind daher gesondert aufgeführt.

Centrifuge 5415D	für Eppendorf-Gefäße	Eppendorf
MiniSpin	für Eppendorf-Gefäße	Eppendorf
Biofuge fresco	Kühlzentrifuge für Eppendorf-Gefäße	Heraeus
Multifuge 3	für Bakterienarbeiten	Heraeus
Sorvall RC5B Plus	Kühlzentrifuge Bakterienarbeiten	ThermoScientific

## 2.4 Enzyme

Enzyme wurden für die Modifikation von DNA oder das Arbeiten mit RNA benötigt. Die Enzyme wurden mit den vom Hersteller empfohlenen Puffern verwendet; Ausnahmen sind aufgeführt. Die Zusammensetzung der Puffer kann den jeweiligen Anleitungen entnommen werden.

### 2.4.1 Arbeiten mit DNA

AmpliTaq DNA Polymerase	10x PCR Buffer	Applied Biosystems
Pfu Ultra Polymerase	10x Pfu Ultra Reaction Buffer	Stratagene
T4 DNA Polymerase	5x Incubation Buffer	Roche, Mannheim
Antarktische Phosphatase	PNK Puffer (siehe unten)	NEB
Shrimp Alkaline Phosphatase	PNK Puffer (s.u.)	USB, Staufen
T4 Ligase	10x Ligation buffer	Roche, Mannheim
Quick Ligase	2x Ligase buffer	NEB
SuperScript II Rev. Transkriptase	5x First Strand Buffer	Invitrogen

### 2.4.2 Arbeiten mit RNA

T3 RNA Polymerase	Fermentas
T7 RNA Polymerase	Fermentas

### 2.4.3 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von NEB (Frankfurt a.M.), oder Fermentas (St. Leon-Rot), bezogen und ausschließlich mit den vorgegebenen Puffern und nach Anleitung verwendet.

Für ‚double digests‘ (Doppolverdau) wurden die Vorschläge des ‚double digest‘ finders auf [www.neb.com](http://www.neb.com) oder [www.invitrogen.de](http://www.invitrogen.de) beachtet. Die Tabelle enthält alle wichtigen Informationen, inklusive der Schnittstelle, in 5'→3' Richtung geschrieben.

**Tabelle 1: Restriktionsendonukleasen NEB**

Restriktionsendonuklease	Puffer	Sequenz/Schnittstelle
Apal	4	GGGCC"C
BamHI	3*	G"GATCC
BglII	3	A"GATCT
EcoRI	EcoRI	G"AATTC
HindIII	2	A"AGCTT
MluI	3	A"CGCGT
NotI	3*	GC"GGCCGC
SacI	1*	GAGCT"C

(\* plus BSA, " Schnittstelle)

**Tabelle 2: Restriktionsendonukleasen Fermentas**

Restriktionsendonuklease	Puffer	Schnittstelle
Apal	B	GGGCC"C
EcoRI	EcoRI	G"AATTC

(" Schnittstelle)

## 2.5 Anti-sense mRNA (Riboprobes)

Alle verwendeten Riboprobes wurden mit Digoxigenin oder FITC gekoppelt um den Nachweis zu ermöglichen. Die folgende Tabelle zeigt alle wichtigen Informationen über die verwendeten Riboprobes.

**Tabelle 3: Informationen zu Riboprobes**

Gen	Restriktionsenzym	kloniert in (Plasmid)	Polymerase für Antisense	Hersteller
Fgf8	EcoRI	pBS	T7	S. Martinez
Wnt1	EcoRI	pGEM42	T7	A. McMahan

## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Antikörper für situ – Hybridisierung

#### Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments

Hersteller: Roche, Mannheim

Spezies: Maus

Bindet an: Digoxigenin

Stock: 0,75 U/μl

Verdünnung: 1:2000

#### Anti-Fluoreszein (FITC) Fab fragments

Hersteller: Roche, Mannheim

Spezies: Maus

Bindet an: FITC

Stock: 0,75 U/μl

Verdünnung: 1:2000

### 2.6.2 Immunhistochemie

Es wurden Primärantikörper gegen GFP (grün fluoreszierendes Protein) und Neurofilament eingesetzt. Als sekundäre Antikörper wurden Cy3-gekoppelte Antikörper gegen Maus-IgG sowie gegen Kaninchen-IgG (beide rot) und Alexa488-gekoppelte Antikörper gegen Kaninchen-IgG (grün) verwendet.

#### Primär-Antikörper:

##### **GFP**

Hersteller: Polyscience Inc., Eppelheim

Spezies: Kaninchen

Bindet an: GFP

Verdünnung: 1:1000



**RMO-270**

Hersteller: Zymed / Invitrogen, Karlsruhe

Spezies: Maus

Bindet an: Neurofilament-M

Stock: 0,5 mg/ml

Verdünnung: 1:500

**Sekundär-Antikörper:****Alexa 488**

Hersteller: Invitrogen, Karlsruhe

Spezies: Ziege

Bindet an: Kaninchen IgG

Stock: 2 mg/ml

Verdünnung: 1:400

**Cy3 (anti Maus-AK)**

Hersteller: Jackson Lab, USA

Spezies: Ziege

Bindet an: Maus IgG

Verdünnung: 1:400

**Cy3 (anti Kaninchen-AK)**

Hersteller: Jackson Lab, USA

Spezies: Ziege

Bindet an: Kaninchen IgG

Verdünnung: 1:400

## 2.7 Plasmide und Vektoren

### 2.7.1 Expressionsvektoren

#### **pCAX**

Größe: 4259 bp

Unterschiede zu pCCAGS: EGFP

Verwendung: Kontrollvektor

#### **pSilencer 1.0-U6**

Größe: 3292 bp

Verwendung: leerer Vektor für miR-Subklonierung

#### **pSilencer-miR9**

Größe: ca. 3300 bp

Verwendung: MiR9-Expressionsvektor

### 2.7.2 DFRS-S9 und DFRS-control Vektoren

#### **DFRS-S9**

Größe: ca. 5600 bp

Backbone: pCMS-EGFP (Clontech)

Besonderheit: Enthält 2 identische SV40 Promotoren.

#### **DFRS-Control**

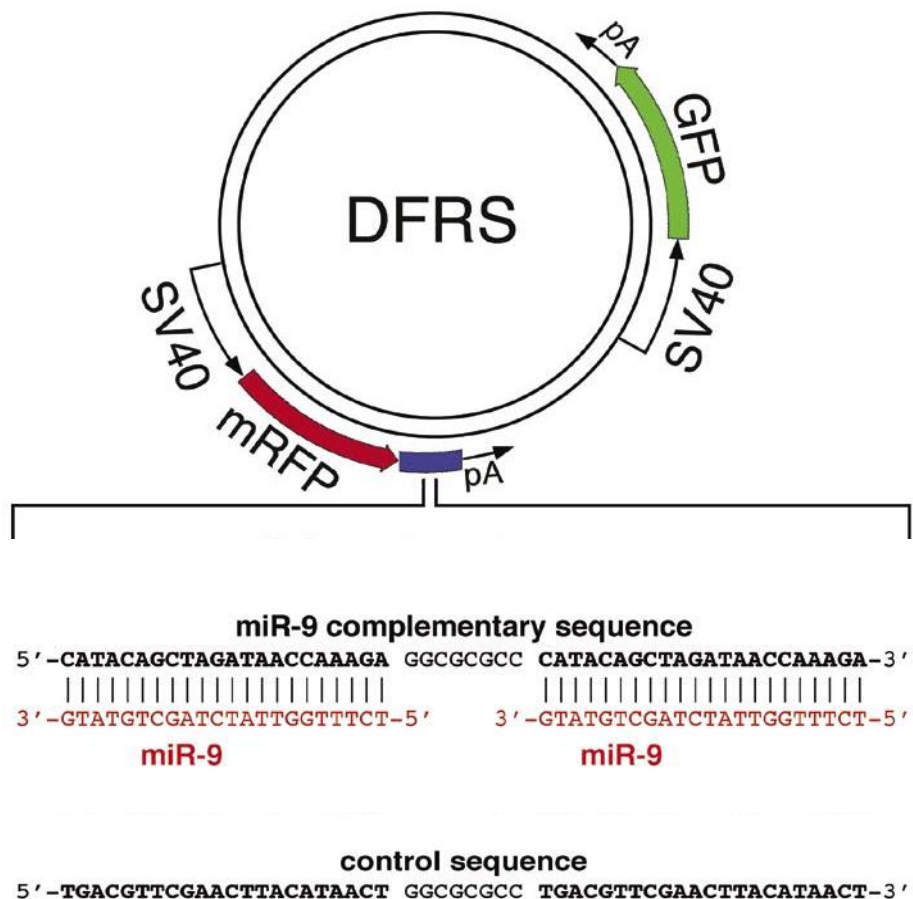
Größe: 5752 bp

Backbone: pDSV2-EGFP-mRFP

Besonderheit: Enthält 2 identische SV40 Promotoren.

DFRS steht für "*dual fluorescent red sensor*", was auf die Gene für GFP und RFP zurückzuführen ist. GFP wird kontinuierlich von allen Zellen exprimiert, welche während der Elektroporation den Vektor aufgenommen haben. Jede

Zelle, die den Vektor enthält, erscheint im Fluoreszenzmikroskop folglich grün. Am Ende des Gens für RFP liegt eine Bindungsstelle für microRNA-9. Wird microRNA-9 in einer Zelle exprimiert, bindet sie an den Vektor und verhindert somit die Expression von RFP. Das Fehlen des roten Signals ist somit ein Hinweis auf die Expression von microRNA-9 in dieser Zelle. Als Kontrollvektor dient der DFRS-control-Vektor (DFRS-ctrl). Er enthält anstatt der Bindungsstelle für microRNA-9 eine Sequenz, welche von keiner bisher bekannten Struktur erkannt wird. Ein Beweis für die Funktion des DFRS-S9-Vektors ist, dass sobald sich microRNA-9 in Zellen befindet, die Zellen keine rote Fluoreszenz zeigen, wohingegen beim DFRS-control-Vektor in allen Zellen mikroskopisch sowohl grüne als auch rote Fluoreszenz sichtbar ist (Tonelli et al., 2006)



**Abbildung 6: DFRS-S9 und DFRS-control Vektoren**

Der DFRS-S9-Vektor besitzt eine Bindungsstelle, welche von miR-9 erkannt wird. Aufgrund der identischen SV40 Promotoren werden in allen Zellen sowohl

*GFP als auch RFP exprimiert. Nach Bindung von microRNA-9 kommt es zur Störung des RFP-Signals, das Fehlen von rot leuchtenden Zellen wird somit als Anwesenheit von microRNA-9 gedeutet. Beim DFRS-Kontrollvektor wurde die Bindungsstelle für microRNA-9 durch eine Sequenz ersetzt, welche von keiner bislang bekannten microRNA detektiert wird. Hier wird somit in allen Zellen, welche den Vektor aufgenommen haben, sowohl das rote als auch das grüne Signal exprimiert (Tonelli et al., 2006).*

## **2.8 Verwendete Zellen/Bakterien**

Folgende Bakterienstämme wurden zum Klonieren von DNA-Fragmenten und Plasmiden verwendet:

XL1 Blue	Stratagene
Top 10F	Invitrogen
SURE competent cells	Stratagene

## **2.9 Mikroskope**

- Axiovert 200 Zeiss
- Axioplan 2 imaging Zeiss
- Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss
- Fluoreszenzmikroskop Leica

## **2.10 Programme, Software, Webseiten**

- Lasergene DNA-Star
- Zeiss Axio Vision
- NEB double digest finder:  
[www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp](http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp)
- Fermentas double digest webtool:  
<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/>
- Blast: [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)
- PubMed: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)

### **3. Methoden**

---

#### **3.1 Manipulationen am Hühnerembryo**

Alle Arbeitsschritte wurden soweit als möglich steril durchgeführt, das verwendete Material war steril verpackt und/oder wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Die Arbeitstische wurden vor jeder Tätigkeit mit EtOH (70%) sterilisiert. Wolframnadeln wurden mit dem Gasbrenner abgeflammt und alle Präparationen wurden mit sterilem Präparierbesteck durchgeführt.

##### **3.1.1 Brüten und Vorbereitung**

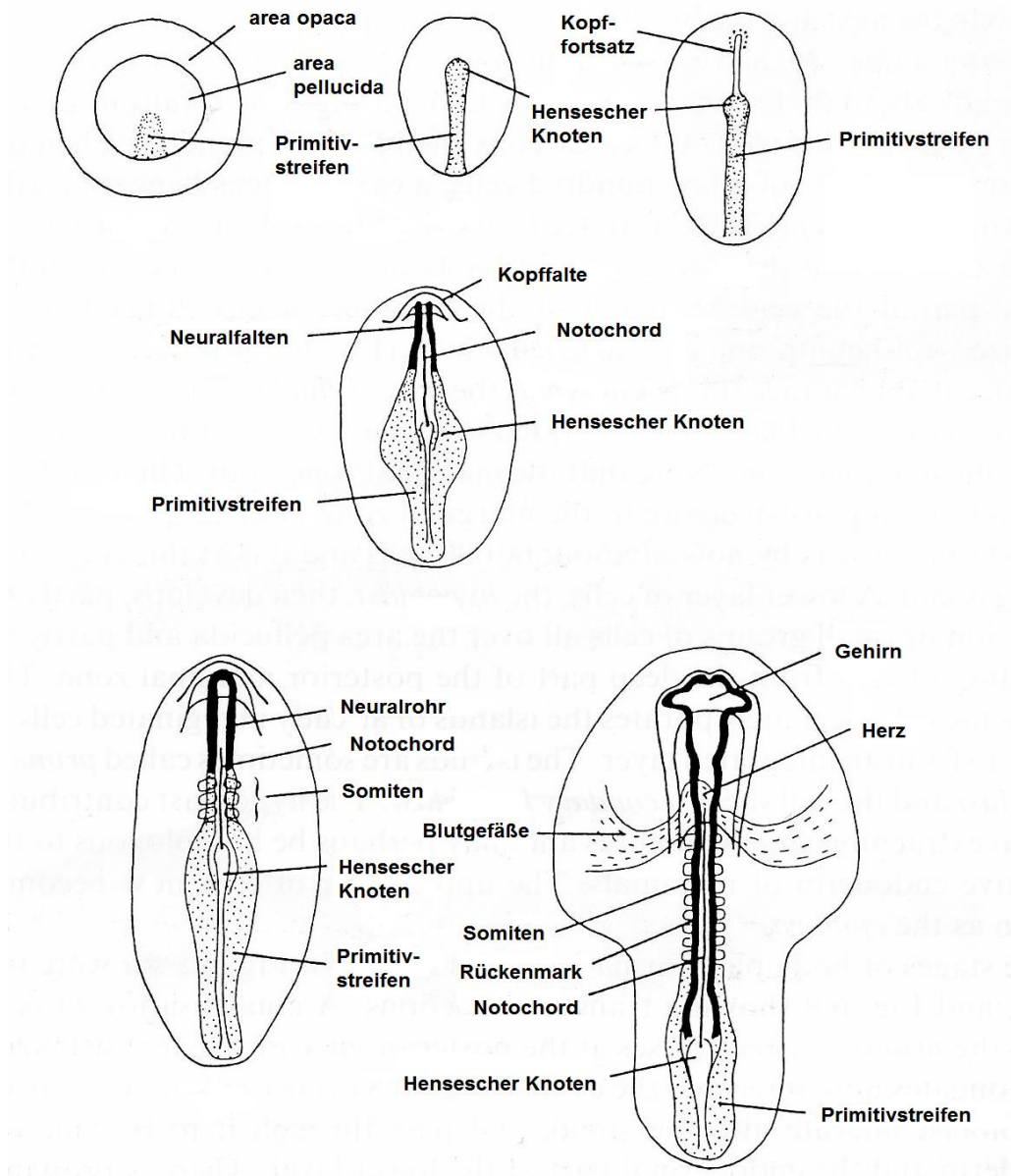
Die Bruteier wurden bis zur Verwendung bei Raumtemperatur auf der Seite liegend gelagert. Für Experimente wurden die Eier im Inkubator bei 37 °C und 65 % Luftfeuchtigkeit bis zum gewünschten Alter bebrütet. Die Eier wurden auf ihrer flachen Seite inkubiert, auf der Oberseite markiert und im Laufe der Inkubation nicht mehr bewegt.

Der Embryo ist so im Ei aufgehängt, dass er immer auf der nach oben zeigenden Seite des Eies zu Liegen kommt. Dadurch wird die größtmögliche Wärmezufuhr beim Bebrüten durch die Vogelmutter gewährleistet. Dieses natürliche Phänomen erleichtert die Arbeit mit Eiern enorm, da nach der Inkubation in der Regel bekannt ist, wo sich der Embryo befindet. Das Alter der Embryonen wurde gemäß Hamburger und Hamilton (Hamburger and Hamilton, 1951), anhand der Zahl der Somiten und der Form des Kopfes, bestimmt.

<b>Entwicklungsstadium (HH)</b>	<b>Anzahl der Somiten</b>	<b>Inkubationszeit [h]</b>
7	1	24
8	3 - 4	26
9	7	29
10	10	33
11	13	42
12	16	47

**Tabelle 4: Entwicklungsstadien beim Hühnchen nach Hamburger und Hamilton (HH)**

Nach der Inkubation wurden die Eier mit 70% Ethanol desinfiziert. Mit einer Nadel wurde an der stumpfen Seite ein Loch in die Schale gestochen und mit einer Spritze ca. 2 ml Eiweiß abgesaugt. Dies ist notwendig, damit sich die Embryonen von der Schale lösen. Ein Streifen klares Klebeband wurde über die Markierung geklebt. Aus den Eiern wurde um die angebrachte Markierung an der Oberseite herum mit einer Schere ein ovales Loch ausgeschnitten. Das vorher angebrachte Klebeband verhindert ein Abbröckeln der Schale und somit eine Verletzung des Embryos. Der Embryo wurde bei Bedarf mit Tinte vom Rande der zona opaca her unterspritzt (Abb. 7).



**Abb. 7: Verschiedene Stadien eines Hühnerembryos in der Entwicklung**

*Basierend auf From Egg to Embryo: Regional Specification in Early Development, J. M. W. Slack, Cambridge, second edition, 1991*

### 3.1.2 In-ovo Elektroporation

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden, falls nicht anders erwähnt, Embryonen der Stadien 9-11 injiziert. Ältere Stadien zeigen schon eine Determinierung der anterior-posterioren Achse (Harris et al., 2011).

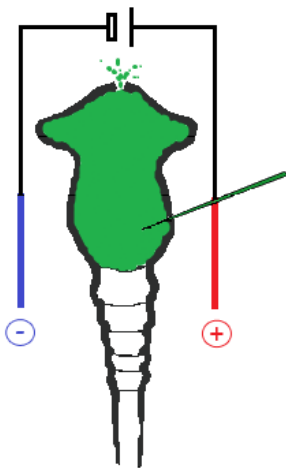
Jüngere Stadien sind sehr schwer zu elektroporieren, ohne dass das Gewebe geschädigt wird. Es wird zunächst das generelle Vorgehen des Experiments beschrieben und im Anschluss daran die verschiedenen elektroporierten Plasmide und damit Experimente erläutert.

Unter dem Binokular wurde am vorbereiteten Embryo im Bereich des Gehirns die Vitellinmembran mit einem Wolframdraht entfernt. Zum Absenken des Embryos im Ei wurde eine Mischung aus PBS/Thyrode's und Pen/Strep in einer Relation von 1:1000 verwendet. Die DNA-Lösung wurde in eine Mikrokapillare gefüllt. Die Lösung besteht aus einem oder mehreren zu elektroporierenden Vektoren und ggf. Fast Green in der Relation 1:10. Die Konzentration der Vektoren beträgt 1 – 5 µg/ml. Die Mikrokapillare wurde an der gewünschten Stelle, meist etwas unterhalb der MHB, ins Neuralrohr eingestochen und die Mischung ins Mittelhirn injiziert (Huber et al., 2013). Anschließend wurden zwei Platinelektroden links und rechts des Mittelhirns und/oder der MHB parallel zum Embryo platziert. Je nach Alter des Embryos wurden drei bis fünf Gleichstrompulse aus einem Puls Simulator appliziert. In der Regel wurden Embryonen der Stadien 8-9 drei Pulse und Embryonen der Stadien 10-12 fünf Pulse zugeführt. Durch dieses Verfahren wird die Stabilität der Zellmembranen kurzzeitig herabgesetzt und es entstehen transiente Poren in der Zellmembran, durch welche negativ geladene Moleküle wie z.B. DNA, RNA und Proteine, aber auch einige synthetisch hergestellte Konstrukte in die Zelle wandern können. Dieses Verfahren, welches normalerweise bei Bakterienzellen angewandt wird, nennt man Elektroporation. Die Vektoren werden aufgrund ihrer negativen Ladung zum positiven Pol der Elektroden gezogen. Dadurch wird automatisch nur eine Seite des Gehirns transfiziert. Die andere Seite, ohne eingebrachtes Plasmid, diente als interne Kontrollseite. Im Anschluss wurden die Eier mit Gewebeklebeband verschlossen und erneut wie oben beschrieben inkubiert.



Frequenz:	500 Hz
Delay:	50 ms
Width:	5 ms
Voltage:	15 V

**Tabelle 5:** Verwendete Einstellungen des Elektroporators



**Abbildung 8:** Injektion und Elektroporation am Hühnerembryo

### 3.1.2.1 Herstellen von Mikrokapillaren für DNA-Injektionen

Die für die Elektroporation nötigen Mikrokapillaren wurden selbst aus Glaskapillaren mit einem Durchmesser von 1,0 mm (außen) und 0,8 mm (innen) hergestellt. Verwendet wurde hierfür der PUL-1 Puller von World Precision Instruments.

### 3.1.3 Embryonen fixieren

20 bis 24 Stunden nach der Elektroporation, am Embryonaltag (E) 3, wurden die Embryonen aus dem Ei entfernt und fixiert. Hierfür wurde eine feine Präparierschere benutzt, mit welcher der Embryo aus dem Ei geschnitten und zur weiteren Präparation in PBS gelegt wurde. Der Embryo wurde von den ihn umgebenden Membranen befreit, so dass der Kopf und ganze Körper frei lag. Am Schwanzende wurden Reste der Allantois und des Amnions nicht entfernt, um den Embryo ohne Verletzung gut mit den Pinzetten greifen zu können. Zur besseren Diffusion der Chemikalien und somit zur Abschwächung

unspezifischer Färbungen wurde ein Schnitt ins Vorderhirn gesetzt. Anschließend wurden die Embryonen in 4% PFA fixiert und konnten bei 4 °C aufbewahrt werden. Für Langzeit-Studien wurden Embryonen nach Elektroporation bis zu E6 weiter inkubiert, die Präparation erfolgte wie oben beschrieben. Die Embryonen wurden möglichst schnell weiterverarbeitet, für immunhistochemische Färbungen und *in situ*-Hybridisierungen wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C fixiert und am nächsten Tag verwendet. Die dauerhafte Lagerung (über Monate) von bereits gefärbten Embryonen erfolgt in PBS/Glycerol.

#### **3.1.4 „Open book“ Präparation**

Als „open book“ Präparation, auch „flat mount“ genannt, versteht man die Isolation des neuronalen Mittelhirns, dessen anschließendes Aufschneiden und Aufklappen. Dadurch blickt man am Ende der Präparation entweder auf die gesamte Mantelzone (außen) oder Ventrikularzone (innen) des Mittelhirns. Dieses Verfahren ist ähnlich wie die Herstellung einer Landkarte aus einem Globus; deshalb müssen auch teilweise Schnitte in das Mittelhirn eingefügt werden um es flach ausbreiten zu können.

Für einen „flat mount“ wurde das Mesenchym-Gewebe von Neuralrohr und Gehirn entfernt und das freigelegte Mesencephalon mit einer Mikroschere an der dorsalen Seite aufgeschnitten. Das Gehirn wurde flach auf einem Objektträger mit dem Deckglas fixiert und in PBS/Glycerol/Dabco eingebettet.

„Open book“ Präparationen werden hergestellt, um Färbungen besser betrachten zu können. Störendes Mesenchym ist entfernt, die Betrachtung ist einfacher, weil das Objekt flach ist und es ist leicht möglich die ventrikuläre Seite zu untersuchen (siehe z.B. Abbildung 17).

### **3.2 Klonierung/Arbeiten mit Bakterien**

#### **3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen**

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte in dieser Arbeit durch die CaCl<sub>2</sub>-Methode. Dazu wurde eine 100 ml Flüssigkultur nicht kompetenter Zellen bis zu

einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 herangezogen, die Bakterien geerntet und für 15 min in RF I auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation und Abgießen des Überstandes wurde das Pellet in RF II resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann aliquotiert und bei  $-80^{\circ}C$  gelagert.

### **3.2.2 Transformation**

Die Protokolle für die Ligation basieren auf denen der New England BioLabs. Eventuelle Änderungen wurden nach eigenen Erfahrungen vorgenommen.

Kompetente E. coli Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 50  $\mu$ l Bakterienzellen wurden mit ungefähr 5 ng des zu transfizierenden Vektors vorsichtig gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Gemisch für 30 Sekunden im Wasserbad einem Hitzeschock bei  $42^{\circ}C$  ausgesetzt und anschließend weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert. Die so transformierten Zellen wurden in 150 - 250  $\mu$ l NZY+ Medium aufgenommen und bei  $37^{\circ}C$  eine Stunde auf dem Schüttler bei 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50  $\mu$ l des Mixes, bzw. 250  $\mu$ l bei einer neuen Ligation, auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen und bei  $37^{\circ}C$  über Nacht inkubiert.

### **3.2.3 Plasmidpräparation**

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus Flüssigkulturen mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits (siehe 2.1.3.2 Plasmid-Aufreinigung). Für eine Mini-Präp genügten 2 - 5 ml, für eine Maxi-Präp wurden 100 - 150 ml verwendet. Die Präparation erfolgte durch eine Anionenaustauscher-Säule, die Elution durch  $H_2O$ . Die Anleitung zur Präparation und für die Kultur kann dem jeweils verwendeten Kit entnommen werden. Es wurde stets nach diesem Protokoll verfahren.

## **3.3 DNA-Manipulationen**

### **3.3.1 Agarosegelelektrophorese**

Für DNA-Fragmente mit weniger als 100 bp wurden 1,8% Gele hergestellt, von 200 bis 1000 bp wurden 1 % Gele verwendet.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in TBE-Puffer durch Kochen gelöst, in Eis kurz gekühlt und dann in eine Gelhalterung gegossen. Zu untersuchende DNA-Fragmente wurden mit einem Ladepuffer (Bromphenolblau) versetzt, so dass dieser dabei 1:6 verdünnt wurde. Die DNA-Fragmente wurden zumeist bei 100 V für 45 bis 70 min und max. 400 mA getrennt. Für eine genauere Aufteilung eng beieinanderliegender Banden wurden die ersten 15 min bei 60 V aufgetrennt. Das Gel wurde danach für 15 bis 25 min in ein Ethidiumbromid-Bad gelegt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaarung von Guanin und Cytosin in der DNA- oder RNA-Doppelhelix. Da Ethidiumbromid im UV-Licht fluoresziert, kann die DNA somit mittels UV-Lampen sichtbar gemacht und fotografisch festgehalten werden.

### **3.3.2 Gel-Aufreinigung / Gelextraktion**

Die zu gewinnenden DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits (siehe 2.1.4.2 Kits zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen). Bei diesem Vorgang wurde das Agarosegel aufgelöst und die DNA durch Anionenaustauschchromatographie über eine Säule gereinigt. Die Anleitung zur Präparation kann dem jeweils verwendeten Kit entnommen werden. Es wurde stets nach diesem Protokoll verfahren.

### **3.3.3 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren**

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden 1 - 2 µl Nukleinsäure (je nach erwarteter Menge) auf 100 µl H<sub>2</sub>O verdünnt (1:100 oder 1:50) und bei 260 nm und 280 nm spektralphotometrisch gemessen. Die maximale Absorptionsrate von DNA und RNA liegt bei 260 nm, sie wurde daher zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Das Verhältnis von  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  spiegelt die Reinheit der Probe wider. Für DNA sollte dieser Quotient größer als 1,5, für reine RNA größer als 1,8 sein.

Die Konzentration der Nukleinsäure bestimmt man wie folgt: Absorption von 1 entspricht 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Über die Absorption kann also die Menge Nukleinsäure in der gesamten Küvette (100 µl) berechnet werden. Diese

Menge entstammt vollständig der eingesetzten Nukleinsäurelösung (1 - 2 µl). Also ist auch die Menge in diesen 1 - 2 µl und damit die Konzentration bekannt.

### 3.3.4 PCR

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [sec]
Initiale Denaturierung	1x	95	
Denaturierung	25-30x	95	45
Annealing	25-30x	55 bis 65 abhängig von Primer	50
Synthese	25-30x	72	45
Endsynthese	1x	72	300
Reaktionsstopp / Ruhephase		20	∞

**Tabelle 6: Standardprotokoll für eine PCR**

Die PCR wurde in der Regel entsprechend den Angaben in Tabelle 6 und 7 durchgeführt. Für noch unbekannte Primer- und Template-Kombinationen wurden die für die Amplifikation notwendigen Bedingungen (z.B. Hybridisierungstemperatur, Salzkonzentration im Puffer (Polymerasen benötigen MgCl<sub>2</sub>) und eventuelle Zusätze neu ausgetestet.

Standardbedingungen für einen PCR Ansatz (25 µl Gesamtvolumen):

1 µl	Ausgangs- cDNA (wenige Nanogramm sind ausreichend)
0,25 µl	Taq-Polymerase (10 U/µl)
1 µl	dNTP- Mix 1
1 µl	Primer fwd (10 µM)
1 µl	Primer rev (10 µM)
2,5 µl	10x PCR-Puffer
18,25 µl	H <sub>2</sub> O (destilliert, autoklaviert)

Zur Gewinnung größerer Mengen DNA, zum Beispiel zur Klonierung, wurden größere Ansätze verwendet. Die amplifizierten Sequenzen wurden mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

#### **3.3.4.1 Mini-PCR**

Die Mini-PCR ist eine schnelle und einfache Methode, um die Anwesenheit eines gewünschten Vektors in einem Bakterienklon nachzuweisen. Dies kann einen Restriktionsverdau ersetzen und Zeit einsparen. Eine Mini-PCR ist nur dann möglich, wenn für den Vektor spezifische Primer vorliegen.

Für die Mini-PCR wurde der o.g. Ansatz ohne Template verwendet. Für das Template wurden vollständige Bakterienzellen verwendet, die im Reaktionspuffer ausreichend zerstört werden, um die benötigte Menge DNA freizusetzen. Die Bakterienklone einer Plattenkultur wurden mit einer Pipettenspitze (10 µl) kurz berührt, dann auf eine Replikaplatte übertragen und anschließend in ein PCR-tube, das bereits den Reaktionsmix enthält, gesteckt. Dort wurde die Pipettenspitze ausgespült und die PCR gestartet.

#### **3.3.5. Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen (REN) sind Enzyme, welche DNS-Doppelstränge definiert an ihren spezifischen Erkennungssequenzen schneiden. Sie werden unterteilt in Typ I bis Typ III. Die verschiedenen Typen unterscheiden sich in der Nähe des Schnittes zu ihrer spezifischen Erkennungssequenz; Typ I schneidet in zufälligem, meist größerem Abstand zur Sequenz, Typ II in bzw. unmittelbar bei und Typ III ungefähr 20 bis 25 bp entfernt von ihrer Erkennungssequenz. Beim schneiden von DNS-Doppelsträngen können glatte Schnitte, sogenannte 'blunt ends', oder versetzte Enden, sogenannte 'sticky ends', entstehen. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen gehören zu den REN Typ II mit Produktion von versetzten Enden. Meist handelt es sich bei den Erkennungssequenzen um palindromische Sequenzen von 6 bis 8 Basenpaaren. Da die Schnittstellen der REN sowie das Genom der verwendeten Plasmide bekannt sind, kann man diese Methode gut dazu verwenden um festzustellen, ob ein Bakterienklon den gewünschten Vektor

aufgenommen hat, oder ob ein Vektor nach der Ligation das gewünschte Gen enthält.

Ansatz eines Restriktionsverdau:

200-300 ng DNA (z.B. Plasmid)	X µl
mind. 0,3 U Restriktionsenzym	0,5 µl
entsprechender Puffer	1 µl
BSA (sofern notwendig)	0,5 µl
Wasser	ad 10 µl

Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dies kann allerdings je nach Enzym variieren. Hierzu wurden die Anleitungen der jeweiligen Hersteller berücksichtigt. Um das Enzym zu inaktivieren konnte bei Bedarf eine Hitze-Inaktivierung (meist 15 min bei 75 °C) notwendig werden. Für größere Ansätze konnten auch 20 bis 100 µl verwendet werden. In der Regel wurde dabei auch die DNA-Menge erhöht. Die exakt benötigte Menge und Hinweise zur Anwendung des Enzyms kann den Angaben des Herstellers entnommen werden (siehe 2.4.3 Restriktionsendonukleasen). [U] bezeichnet die Aktivität von Enzymen. 1 U entspricht der Enzymmenge, die nötig ist, um unter optimalen Bedingungen 1 µg Referenz-DNA in 60 Minuten zu spalten.

### **3.3.5.1 Kontrollverdau**

Es wurde eine kleine Menge Plasmid aus einem Bakterienklon präpariert (siehe 2.1.3.2 Plasmid-Aufreinigung) und anschließend mit REN geschnitten. Somit war die Größe der Fragmente bekannt, welche beim gewünschten Plasmid entstehen. Mittels Agarosegelelektrophorese konnte der Kontrollverdau analysiert werden.

### **3.3.5.2. Double digest**

Die korrekten Bedingungen (Temperatur, Zeiten, Puffer und Zusätze) für einen Verdau mit zwei Restriktionsendonukleasen zugleich wurden den Anleitungen der verschiedenen Hersteller entnommen. In manchen Fällen war ein

gleichzeitiger Verdau nicht möglich. In diesem Fall wurde der Verdau sequenziell durchgeführt. Hierzu wurde eine Hitzeinaktivierung nach komplett durchlaufenem ersten Verdau notwendig.

### **3.3.5.3 Herstellung neuer Vektoren**

Die zweite Einsatzmöglichkeit der REN war die Herstellung neuer Vektoren. Durch das Schneiden zweier DNA-Fragmente (zum Beispiel ein Plasmid und ein PCR-Produkt) mit identischen Restriktionsenzymen wurden Produkte generiert, die sich aneinander anlagern können und die mittels Ligation (siehe 3.3.6. Ligation) zu einem neuen DNA-Stück (in obigem Fall zu einem neuen Vektor) verbunden wurden.

### **3.3.5.4 Dephosphorylierung**

Um zu vermeiden, dass sich ein erfolgreich geschnittener DNS-Doppelstrang direkt nach dem Verdau wieder aneinanderlagert (Autoligation), erfolgte vor einer Ligation (siehe unten) stets eine Dephosphorylierung, d.h., das Entfernen der Phosphatgruppen an beiden offenen 5'-Enden mittels einer Phosphatase. In dieser Arbeit wurde hierfür die Antarktische Phosphatase (AAP) verwendet. Zur Dephosphorylierung benötigt man 0,5 U Phosphatase für 1 µg eines 3 kbp großen Plasmids.

#### Ein Dephosphorylierungsansatz besteht aus:

ca. 400 ng	Plasmid
entsprechende Menge	Phosphatase
2 µl	PNK Puffer
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

Dieser Ansatz wurde für 1 - 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach kann eine Hitzeinaktivierung (15 min bei 65 °C) folgen.



### 3.3.6. Ligation

Die Protokolle für die Ligation basieren auf denen der New England BioLabs. Änderungen wurden nach eigenen Erfahrungen vorgenommen.

#### Ansatz einer Ligation:

10X T4 DNA Ligase-Puffer	2 µl
Vector-DNS	X µl
3-molarer Überschuss Insert-DNS	X µl
Nuclease-freies Wasser	ad 20 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

Die T4 DNA-Ligase sollte dem Ansatz zuletzt zugefügt werden. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt. Anschließend folgte die Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur (25 °C) bzw. über Nacht bei 4 °C. Nach kurzer Lagerung auf Eis konnte der Vektor in kompetente E. Coli - Bakterien transformiert oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

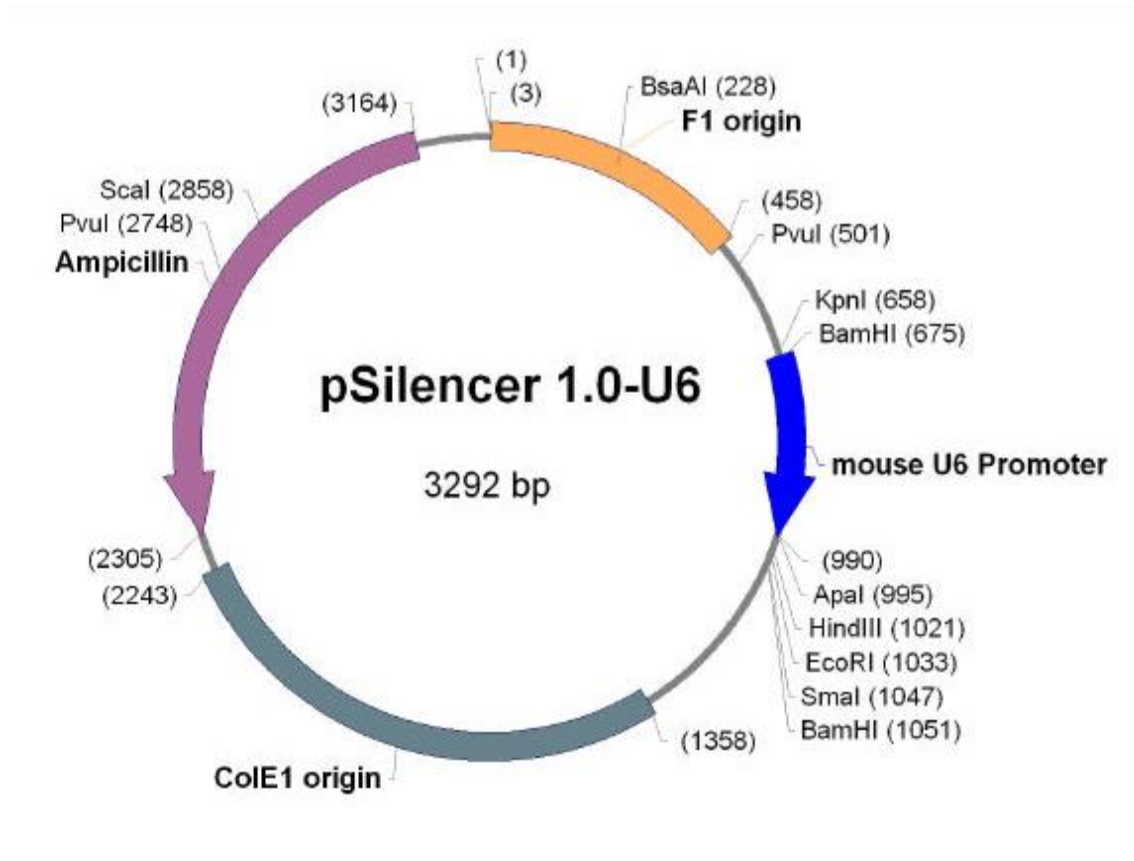
#### Ansatz einer Quick Ligation:

2X T4 Quick Ligase-Puffer	10 µl
Vector-DNS	X µl
3-molarer Überschuss Insert-DNS	X µl
Nuclease-freies Wasser	ad 20 µl
Quick T4 DNA Ligase	1 µl

Der Ansatz wurde vermischt und anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur (25 °C) inkubiert. Nach kurzer Lagerung auf Eis konnte der Vektor in kompetente E. Coli- Bakterien transformiert oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

Das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert spielt eine große Rolle. Eine erfolgreiche Ligation von Fragmenten mit glatten Enden erfordert dabei ein viel höheres Verhältnis von Vektor zu Insert als Fragmente mit klebrigen Enden. Gängige Verhältnisse von Vektor zu Insert für klebrige Enden sind 1:3 bis 1:7.

### 3.3.7 microRNA9-Vector-Design



Sense	Loop	Antisense	
5'-N(19)	TTCAAGAGA	N(19)	TTTTTT-3' (53 bases)
3'-CCGG N(19)	AAGTTCTCT	N(19)	AAAAAATTAA-5' (61 bases)
<b>Apal</b>			<b>EcoRI</b>

**Abb. 9: Schema des pSilencer 1.0-U6 siRNA Expressionsvektor**  
([www.ambion.com](http://www.ambion.com))

Der käuflich erworbene Expressionsvektor pSilencer 1.0 (Ambion) enthält einen Polylinker (multiple cloning site, MCS) mit Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen. Nach Anleitung des Herstellers wurden die Inserts zur Überexpression von microRNA, wie in Abb. 9 beschrieben, entworfen und

als Einzelstrang-Oligonukleotide bestellt. (Hierbei sei darauf zu achten, dass im obigen Beispiel des Herstellers die Schnittstellen so verändert wurden, dass durch das Fehlen einer Base für künftige Subklonierungen die Bindungsstellen für EcoRI und ApaI zerstört werden). Die gegenläufigen Einzelstrang-Oligonukleotide (Inserts für den Expressionsvektor) wurden miteinander „annealed“, sodass ein doppelsträngiges, kurzes Segment entstand, an dessen beiden Enden sich überhängende Schnittstellen befinden (siehe Abbildung 9). Der pSilencer-Vektor wurde gleichzeitig durch die Endonukleasen EcoRI und ApaI geschnitten. Nach erfolgreicher Ligation entsteht nun der pSilencer-miR-9-Expressionsvektor, der kontinuierlich große Mengen an microRNA-9 ekto exprimieren kann.

### **3.3.7.1 Annealing der Oligonukleotide**

Die Oligonukleotide zur Herstellung des Inserts für den Expressionsvektor wurde käuflich erworben und streng nach Anleitung des Herstellers „annealed“. Hierfür wurden nach Lösung der Oligonukleotide auf eine Konzentration von 1 µg/µl jeweils 2 µl der DNA-Einzelstränge mit 46 µl Pufferlösung (100mM K-acetate, 30mM Hepes –KOH, 2mM Mg-acetate) vermischt und über 3 Minuten bei 90 °C „annealed“. Nach einer Stunde bei 37 °C erfolgte die Ligation oder die Aufbewahrung bei – 20 °C.

#### Ansatz einer Annealing-Reaktion:

2 µl forward primer

2 µl reverse primer

46 µl annealing buffer

→ 90 °C, 3 min

→ 37 °C, 1 h

Ligation oder bei -20 °C lagern

### **3.3.8. Herstellung von Sonden für die in-situ-Hybridisierung**

Sonden für die ISH sind mRNA-antisense-Stücke, also RNA-Stränge, welche komplementär mit der Ziel-mRNA binden können. Um RNA-Sonden

herzustellen wurde aus einer DNA-Sequenz mittels einer in vitro Transkription die antisense RNA gewonnen. Die gewünschte Gensequenz wird mit spezifischen Primern via PCR amplifiziert und in einen speziellen Vektor (pBS KS+) kloniert. cDNA für die PCR wurde aus den Mittelhirnen unbehandelter Embryonen (E4) isoliert.

Zur effizienten Herstellung von antisense mRNA wurde der Vektor, der die gewünschte Gensequenz enthält, mittels eines Restriktionsenzym auf der 5'-Seite der Sequenz geschnitten. Danach dient ein Teil dieses linearisierten Vektors als Template für die in vitro Transkription, wobei über die Wahl der richtigen Polymerase der anti-sense-Strang zur gewünschten mRNA hergestellt werden kann. Durch die Koppelung von Digoxigenin an bestimmte Basen (La Roche/Invitrogen) an jedes 40. Uracil kann die Sonde über einen Antikörper gegen Digoxigenin sichtbar gemacht werden.

### **3.4 Immunhistochemische Analyse**

In der vorliegenden Arbeit wurde als Marker zumeist ein fluoreszierender Farbstoff verwendet. Eine Ausnahme stellt die in situ - Hybridisierung dar, bei welcher in der Regel eine andere Farbreaktion verwendet wurde. Die exakte Anleitung (Anzahl der Waschschriffe und Inkubationszeiten) findet sich im Anhang.

Fixierte Embryonen wurden in AB-Lösung gewaschen. Danach wurde der Primär-Antikörper (Konzentration: siehe Material) zugegeben und zwei Tage inkubiert. Nach weiteren Waschschriffen in AB-Lösung wurde der Sekundär-Antikörper zugegeben und über Nacht inkubiert. Alle Antikörper-Inkubationen finden bei 4 °C, alle Waschschriffe bei Raumtemperatur statt. Nach Entfernen des Sekundär-Antikörpers wurde erneut gewaschen und in PFA fixiert. Verwendet wurden Antikörper gegen GFP und RMO-270, welches allgemein Neurone und ihre Axone färbt.

### 3.5 RNA-Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurden mRNAs verschiedener Proteine sowie microRNAs qualitativ untersucht. Dies erfolgte durch whole-mount *in situ* Hybridisierung (ISH), d.h. Hybridisierung am vollständigen Embryo.

#### 3.5.1 RNA-ISH

Die exakte Anleitung (Anzahl der Waschschriffe und Inkubationszeiten) findet sich im Anhang.

Für die ISH wurden fixierte Embryonen zunächst in phosphatgepufferter Salzlösung mit Tween-20 (PBT) gewaschen und anschließend durch eine aufsteigende Methanolreihe (25 %, 50 %, 75 %, 100 % MeOH) gezogen. Dies ist notwendig, um die Zellmembranen instabiler zu machen. Nach einer Nacht in 100 % Methanol folgte eine absteigende Methanol-Reihe und Waschen in PBT. Mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBT wurden dann die endogenen Peroxidasen geblockt. Danach wurde wiederum in PBT und „Detergent Mix“ gewaschen. Es folgte eine erneute Fixierung in PFA/Glutaraldehyd. Nach weiteren drei Waschschriffen in PBT wurden die Embryonen in „Hyb Mix“ ohne RNA inkubiert. Anschließend wurde die gewünschte RNA-Hybridisierungslösung (Sonde, ca. 1 µg/µl in „Hyb Mix“) zugegeben.

Nach der Hybridisierung wurde zunächst mit Lösung X, dann mit Maleinsäurepuffer mit Tween-20 gewaschen und zuletzt in „Block“ inkubiert.

Im Anschluss gibt man den Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 hinzu. In der Regel wurde an Alkalische Phosphatase gekoppeltes anti-Digoxigenin verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht, danach wurde 8x bis 10x in MABT und dann 2x in Natrium-Tris-Magnesiumchlorid mit Tween-20 (NTMT) gewaschen.

Zuletzt wurde die Färbungsreaktion der alkalischen Phosphatase durch Zugabe von NBT und BCIP gestartet. Die Farbreaktionen wurde mit 4 % PFA gestoppt, dann in PBT gewaschen und erneut in 4 % PFA fixiert.

### **3.5.2 LNA-ISH**

LNA-Moleküle ("locked nucleic acid") sind kommerziell erhältliche Moleküle auf RNA-basis. Eine Methylen-Brücke zwischen dem 2'-O Atom und dem 4'-C Atom "blockt" das Molekül in genau der Konformation, welche ideal für die Watson-Crick-Bindung ist. Dadurch werden kleine komplementäre Moleküle wie microRNAs schneller gebunden und der LNA/RNA-Duplex weist eine sehr viel höhere Stabilität auf ([ww.exiqon.com](http://www.exiqon.com)). Die exakte Anleitung (Anzahl der Waschschriffe und Inkubationszeiten) findet sich im Anhang und wurde nach Anleitung vom Hersteller und eigener Erfahrung modifiziert.

## **3.6 Bildgebung / Datengewinnung**

Alle Kontrollen und Fotos wurden an den oben beschriebenen Fluoreszenz-Mikroskopen oder Binokularen durchgeführt und mit Hilfe der zugehörigen Software ausgewertet.

### **3.6.1 Kontrolle nach Fixierung**

Nach der Fixierung jedes Probensatzes wurden die Embryonen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Fluoreszenzstereomikroskop oder AxioVert) auf grüne Fluoreszenz überprüft. Hierfür wurde ein FITC-Filter (Anregung 467 - 498 nm, Emission 513 - 556 nm) verwendet. Nur Embryonen, die im Mittelhirn grüne Fluoreszenz zeigten, wurden für die weiteren Analysen verwendet.

### **3.6.2 Fotografieren von „open book“ Präparationen**

Immunhistochemisch gefärbte Embryonen, welche gemäß Kapitel 3.1.4 als „open book“ Präparationen verarbeitet wurden, wurden am AxioPlan Fluoreszenzmikroskop oder Laserscanning Mikroskop fotografiert. Anhand dieser Fotos fand die quantitative Auswertung statt. Zur Detektion der Fluoreszenz wurde neben dem FITC-Filter (grüne Fluoreszenz) auch ein Rhodamin/Cy3-Filter (Anregung 513 - 556 nm, Emission 570 - 613 nm; rote Fluoreszenz) eingesetzt.

### **3.6.3 Fotografieren von Embryonen nach ISH**

Embryonen, welche gemäß Kapitel 3.5.1 und 3.5.2 einer in situ Hybridisierung zugeführt wurden, wurden nach der Färbereaktion mit NBT und BCIP unter dem Lichtmikroskop dargestellt und fotografiert.

### **3.6.4 Auswertung**

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe des zu Kamera und Mikroskop gehörigen Programms: Zeiss, AxioVision und eines Zellzählers (tally). Dabei wurden Fotos der Vergrößerung verwendet bei der einzelne Zellen noch gut voneinander zu unterscheiden sind, also 20- oder 40-fach.

### **3.6.5 Computeranalyse von microRNA-9-Bindungsstellen**

Die theoretischen 3'UTR Bindungsstellen von microRNA-9 wurden mithilfe der online zugänglichen Berechnungen miRanda, TargetScan und EMBL-EBI erworben. Eine Bindungsstelle konnte im Hühnerembryo für Fgf8, jedoch nicht für Wnt1 berechnet werden (s. Kapitel 4.2.1).

## **4. Ergebnisse**

---

### **4.1 Expressionsmuster von microRNA-9**

Eine genaue Kenntnis über das Expressionsmuster und die ektopische Lokalisation von microRNA-9 ist eine wesentliche Grundlage, um ihre Funktion untersuchen zu können. Um eine Idee zu erhalten, welche Funktionen microRNA-9 im sich entwickelnden Gehirn reguliert, muss zuerst bekannt sein, in welchen Teilen des Gehirns sie exprimiert wird. Dies wurde auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt; zum einen durch Hybridisierung mit einer LNA-Sonde, zum anderen durch einen Vektor, der über eine Kombination fluoreszierender Proteine genaue Angaben zum Vorliegen von microRNA-9 machen kann.

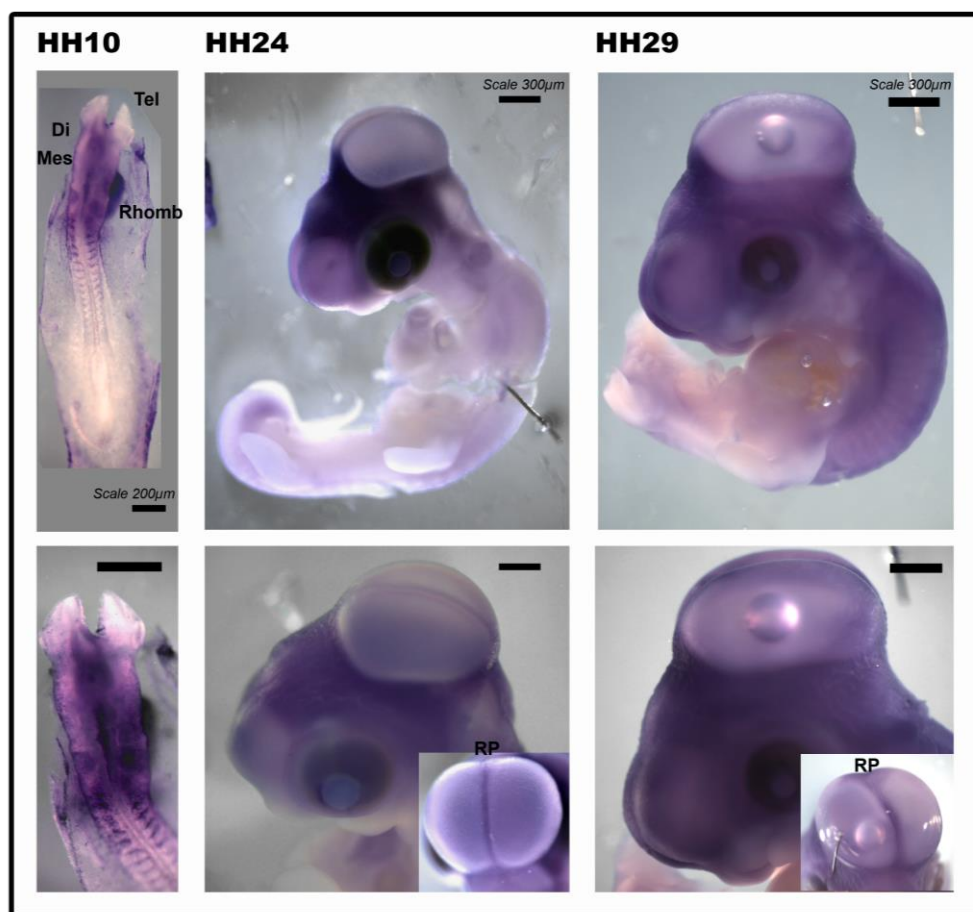
#### **4.1.1 LNA-in situ-Hybridisierung**

Für die Darstellung der microRNA-9-Expression in WT Embryonen wurden Hühnereier unterschiedlich lange inkubiert, um unterschiedliche Entwicklungsstufen zu erhalten. Die Experimente umfassen die Embryonaltage E2, E4 und E5. Zum jeweiligen Tag wurden die Hühnerembryonen unter extremer Sorgfalt fixiert, um eine mögliche Verunreinigung mit RNasen zu vermeiden. Die LNA-Hybridisierung wurde nach einem an Sweetman et al. (2006) angelehnten Protokoll durchgeführt (Kapitel 3.5.2).

Abbildung 10 zeigt in situ-Hybridisierungen von ganzen (whole mount) Embryonen mit LNA-Sonden gegen microRNA-9. Dargestellt sind die Stadien HH10 (ca. 35 h), HH24 (ca. 4,5 d) und HH29 (ca. 5,5 d) nach Hamburger und Hamilton (1992). Am Anfang der Neuralentwicklung (HH10) wird microRNA-9 ubiquitär im sich entwickelnden Hirn exprimiert (Abb. 10 links). Einzige Ausnahme bilden die Vorderhirnanlage (Telencephalon) und das Rückenmark. 14 Stadien später lokalisiert sich microRNA-9 spezifischer in den unterschiedlichen Gehirnbereichen (Abb. 10 Mitte). In den beiden Vorderhirnhälften ist microRNA-9 jetzt schwach exprimiert. Im Diencephalon, den Augen und dem ventralen Mittelhirn zeigt microRNA-9 eine starke Expression, ebenso wie in der Deckplatte (RP) des Mesencephalons.



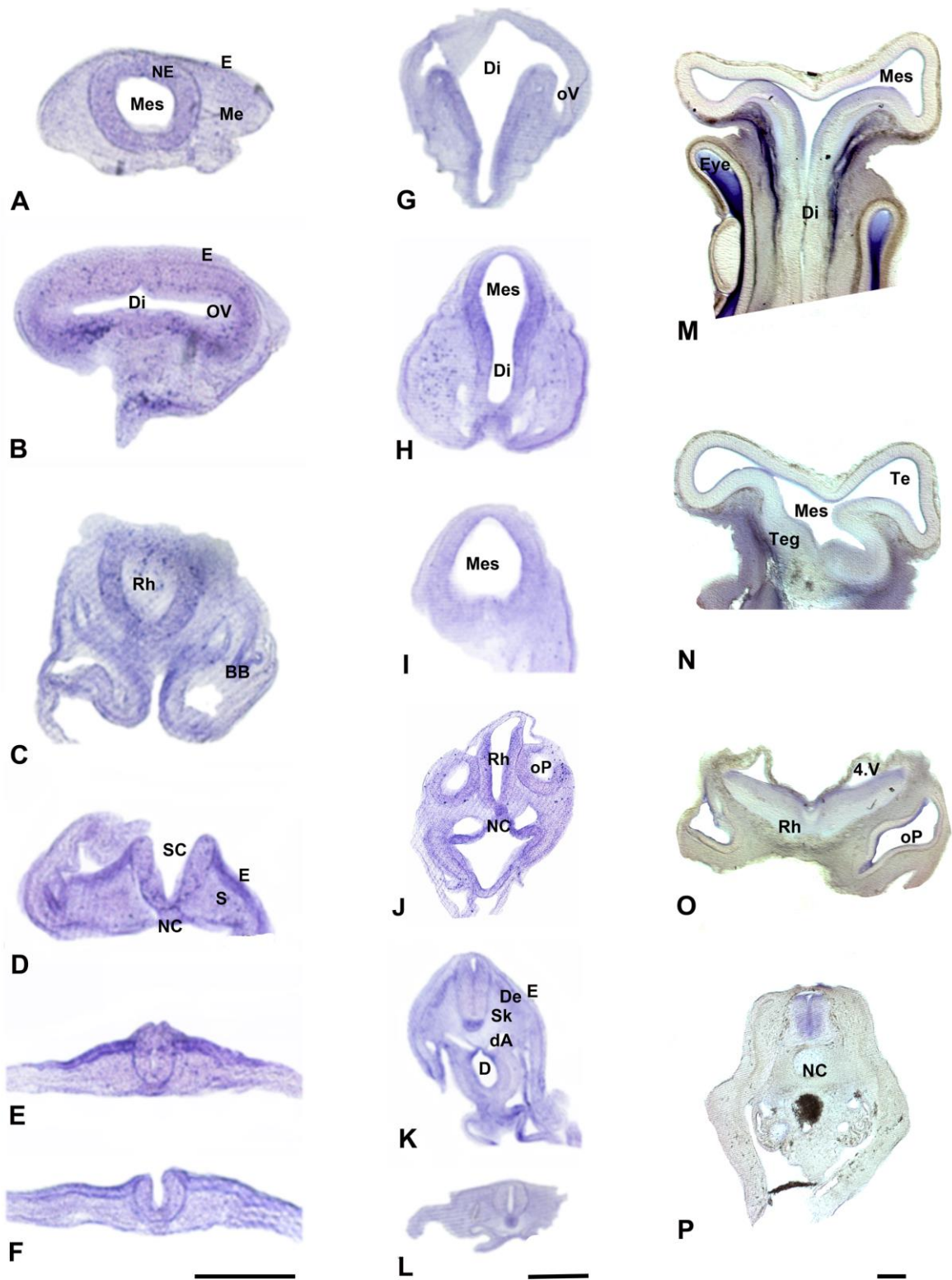
MicroRNA-9 ist auch posterior der MHB sowie im ganzen Rhombencephalon (mit Ausnahme der Deckplatte) exprimiert. Das Expressionsmuster von microRNA-9 ändert sich von E4,5 bis E5,5 kaum (Abb. 10 rechts). Die Expression im Telencephalon wird stärker und die Expression breitet sich entlang des Rückenmarks nach caudal aus. Da ein ‚whole mount‘ die genaue Expression in Ektoderm, Mesoderm oder Neuralrohr nicht genau aufzeigt, wurden die Gehirne im Anschluss koronar geschnitten (Abbildung 11).



**Abbildung 10: Whole mount ISH mit LNA-Sonden gegen microRNA-9.**  
*HH10 Embryonen zeigen eine ubiquitäre Expression von microRNA-9 entlang der AP Achse des Neuralrohres, außer im Telencephalon und im Rückenmark. 2 Tage später, an HH24 (ca. E4), ist microRNA-9 nun schwach im Telencephalon exprimiert, eine starke Expression zeigt sich im ganzen*

*Diencephalon, den Augen, dem ventralen Mesencephalon, der mesencephalen Deckplatte sowie dem ganzen Rhombencephalon (außer dessen Deckplatte). Das Rückenmark ist kaum gefärbt. In der Vergrößerung in der unteren Bildreihe ist die Expression im Kopfbereich und der mesencephalen Deckplatte deutlich zu sehen.*

Von HH24 (E4,5) bis HH29 (E5,5) ändert sich das Expressionsmuster im Gehirnbereich nur wenig. Die Expression im Telencephalon wird stärker und auch die rhombencephale Deckplatte scheint jetzt microRNA-9 zu exprimieren. In diesem Stadium fängt auch das Mesenchym im anteriorern Rückenmark an, microRNA-9 zu exprimieren. An HH24 und HH29 ist posterior vom Mittelhirn eine stärkere microRNA-9 Expression erkennbar.



**Abbildung 11: Schnitte durch HH10, HH18 und E3 Embryonen nach LNA ISH gegen microRNA-9**

Die Embryonen wurden als whole mount Embryonen gefärbt und anschließend mithilfe eines Vibratoms 60 µm dick koronar geschnitten.

**A-F: HH10 Koronarschnitte** durch das Mesencephalon (**A**), das Diencephalon (**B**), das Rhombencephalon (**C**) und das Rückenmark (**D-F**). MicroRNA-9 zeigt ein ubiquitäres Verteilungsmuster im Mes- und Rhombencephalon. Zudem zeigt sich auf Ebene des Rückenmarks eine stärkere Expression im Dermatomyotom und eine leicht stärkere Expression im dorsalen Rückenmark.

**G-L: Schnitte durch HH18 Embryonen.** Schräger Horizontalschnitt auf Ebene des Di- (**G**) und des Mesencephalons (**H, I**), aufgrund der mesencephalen Kopfbiegung übergehend in Koronarschnitt des Metencephalon (**J**). Im Rhombencephalon ist deutlich die otische Plakode zu erkennen (**oP**). (**K**) und (**L**) sind Koronarschnitte durch das anteriore (**K**) und posteriore (**L**) Rückenmark. Hier ist die geringe Expression im posterioren Rückenmark sowie die stärkere Expression in der Chorda zu beachten.

**M-P: Koronarschnitte durch E6 Embryonen.** Anteriores (**M**) und posteriore Mesencephalon (**N**) mit Tegmentum (**Teg**) und Tectum (**Te**) sowie Schnitte durch das Rhombencephalon (**O**) und das Rückenmark (**P**).

BB – Branchialbogen, D – Darm, dA – dorsale Aorta, De – Dermatomyotom, Di – Diencephalon, E – Ektoderm, Me - Mesenchym, Mes – Mesencephalon, NC – Notochord, NE – Neuroektoderm, oP – otische Plakode, OV – optischer Vesikel, Rh – Rhombencephalon, S – Somite, SC – spinal cord / Rückenmark, Sk - Sklerotome

Maßstab: 200 µm

Nach anfangs ubiquitärer Expression im Neuralrohr lokalisiert sich microRNA-9 in höheren Entwicklungsstadien in bestimmten Gebieten. In den frühen Stadien scheint das Telencephalon eine nur schwache microRNA-9 Expression aufzuweisen (Abbildung 10 und Abbildung 11 G). Interessanterweise erscheint aber die Expression von microRNA-9 in Schnitten durch HH10 Telencephalon (Abbildung 11 A) fast so intensiv wie im Mittelhirn (Abbildung 11 C). Eine Ursache hierfür könnte sein, dass der Embryo in Abbildung 11 A etwas weniger weit entwickelt ist als der Embryo in Abbildung 10. Da die HH Stadien nur

Richtwerte sind, kann dies durchaus der Fall sein. Eine Färbung von jüngeren Embryonen würde hier zur Aufklärung beitragen.

Die Expression im Neuralrohr ist in HH18 in manchen Gebieten zurückgegangen (Abbildung 11 G, K, L). Das Telencephalon zeigt eine wesentlich geringere Expression als das Diencephalon (Abbildung 11 G). Die ubiquitäre Expression im Mesencephalon scheint sich auf die ventrikuläre Seite zu reduzieren, das bedeutet auf die Vorläuferzellen im Mittelhirn. Ebenso scheint die Expression im ventralen Rückenmark schwächer geworden zu sein (vergleiche Abbildung 11 E und K), wobei das anteriore Rückenmark (K) eine stärkere microRNA-9 Expression aufweist als das posteriore (L) und vor allem das dorsale Rückenmark. Im angrenzenden Mesoderm ist die Färbung von Dermatomyotomen in HH23 Embryonen nur noch im Myotom zu finden (K). Außerdem zeigt die Chorda eine starke Expression entlang des ganzen Rückenmarks (K, L). Interessanterweise scheint microRNA-9 an HH23 noch nicht in der Deckplatte im dorsalen Mittelhirn vorhanden zu sein (Abbildung 11), sondern erst ab HH24 (Abbildung 10).

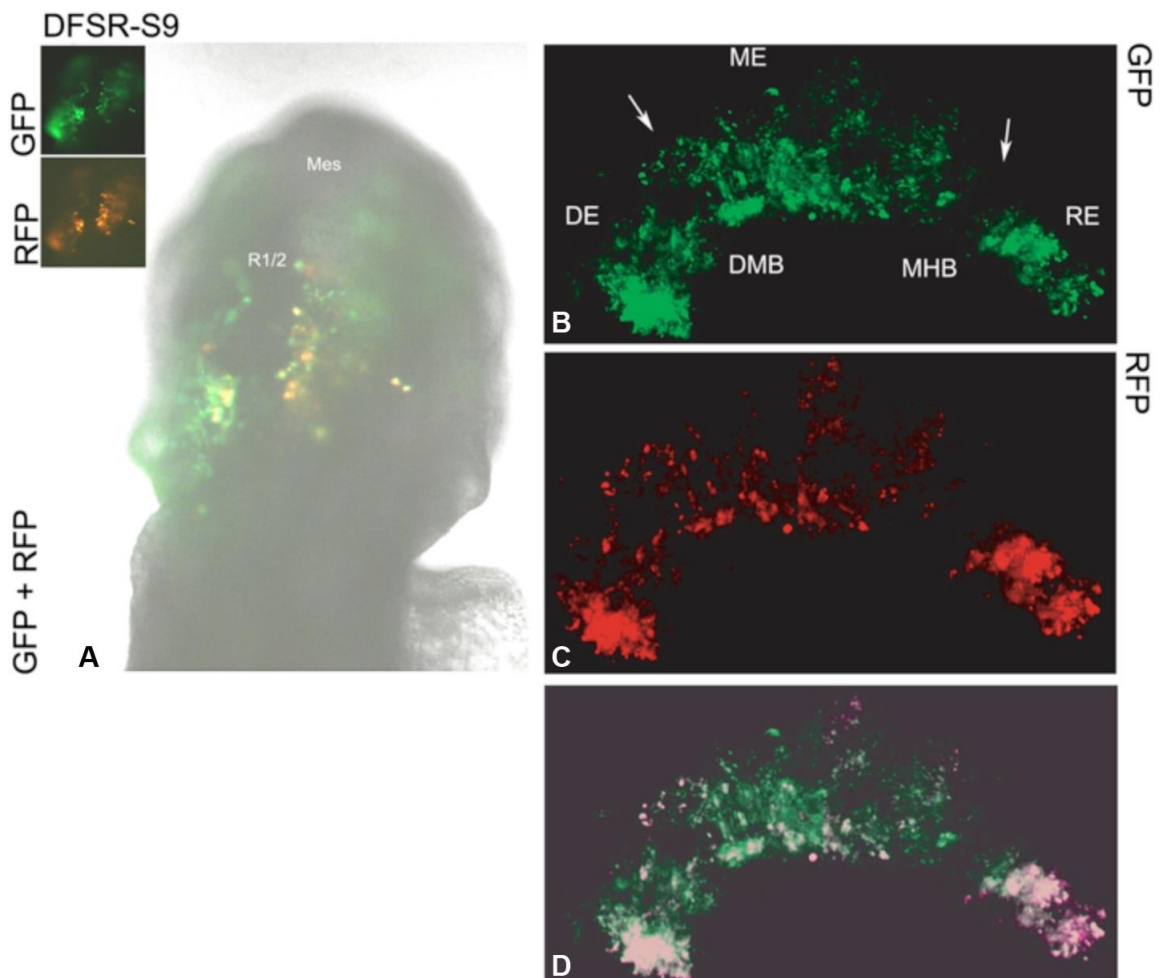
#### 4.1.2 DFRS-S9 und DFRS-control

Um die Expressionsergebnisse der LNA-ISH zu verifizieren und die zelluläre Expression in der MHB festzustellen, wurde die Expression von microRNA-9 mit Hilfe der DFRS-Vektoren *in vivo* untersucht (s. Kapitel 2.7.2). Die verschiedenen Vektoren wurde den Embryonen in den Stadien HH9, HH10 und HH11 injiziert und anschließend elektroporiert.

Abbildung 12 zeigt die Aktivität von microRNA-9 in Di-, Mes- und Rhombencephalon im Stadium HH17. Hierfür wurde der DFRS-Vektor spezifisch in Di-, Mes- und anteriores Rhombencephalon elektroporiert (**12A**). Die grün fluoreszierenden Zellen (**12B**) zeigen, welche Zellen während der Elektroporation den Vektor aufgenommen haben. Die rot fluoreszierenden Zellen (**12C**) sind die Zellen, in denen microRNA-9 nicht aktiv ist. Deutlich erkennbar ist die Abschwächung des roten Signals im Bereich des Mesencephalon (ME), vor allem im dorsalen und kaudalen Abschnitt, kranial der MHB sowie eine etwas schwächere Abnahme des roten Signals im posterioren

Diencephalon (Pfeilspitzen). Anteriore Diencephalon und Rhombencephalon zeigen kaum eine Abnahme der roten Fluoreszenz.

Daraus lässt sich schließen, dass an HH17 microRNA-9 stark im posterioren und kaum im anterioren Diencephalon aktiv ist. Kaum aktives microRNA-9 ist zu diesem Zeitpunkt im Rhombencephalon zu sehen, wohingegen das dorsale Mittelhirn eine starke microRNA-9-Expression zeigt, vor allem in den kaudalen Anteilen. Interessanterweise sind kaum grüne oder rote Zellen in der MHB zu finden. Von den wenigen Zellen lässt sich leider nicht deduzieren, ob microRNA-9 im Huhn in der MHB aktiv oder wie im Zebrafisch inaktiv ist.



**Abb. 12: Expressionsmuster von microRNA-9 im embryonalen Gehirn**

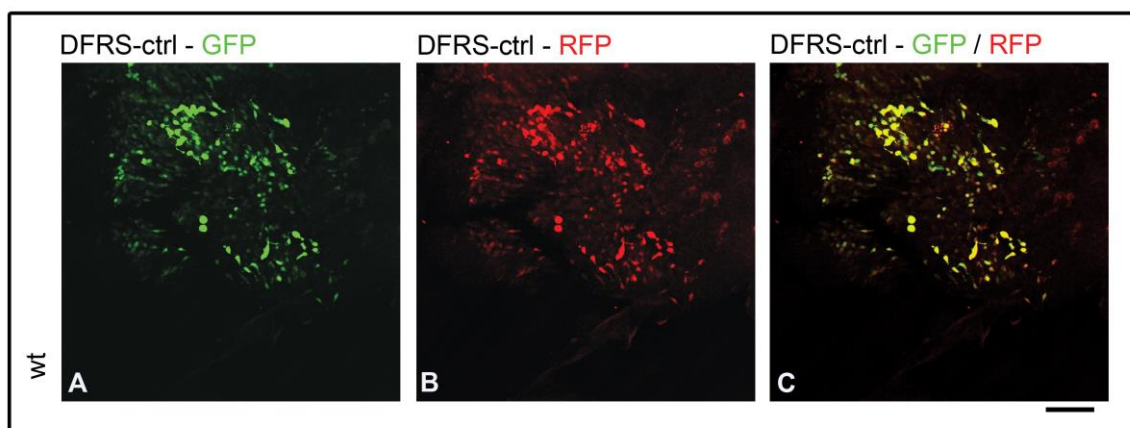
Die Expression des DF5R-S9 Vektors zeigt die Aktivität von microRNA-9 im embryonalen Gehirn im Stadium HH17. (A) zeigt den Kopf eines HH17-Embryos mit Blick auf das Rhombencephalon (RE) und das posteriore



Mesencephalon (ME) nach Elektroporation mit dem DFRS-S9-Vektor. (B) bis (D) zeigen die dazugehörigen flat mounts zur besseren Übersicht. Hier kann eine Abschwächung des roten Signals im Bereich des kaudalen Mesencephalons (ME), kranial der MHB sowie im posterioren Diencephalon (Pfeilspitzen) erkannt werden.

DE – Diencephalon, DMB – diencephalon-mesencephalon boundary, ME/Mes – Mesencephalon, MHB – mid-hindbrain boundary, RE – Rhombencephalon, R1/2 – Rhombomer 1/2

Da im DFRS-control-Vektor (DFSR-ctrl) die Bindungsstelle für microRNA-9 fehlt und durch eine Bindungsstelle ersetzt wurde, welche von keiner bisher bekannten Struktur erkannt wird, sollten GFP und RFP (rote und grüne Fluoreszenz) in gleichem Masse exprimiert werden (Tonelli et al., 2006). Abbildung 13 zeigt ein Mittelhirn nach Transfektion mit dem DFRS-control-Vektor. Hier wird deutlich, dass GFP und RFP in allen Zellen gleichzeitig exprimiert werden. Dieses Ergebnis konnte in allen untersuchten Embryonen (n=5) gefunden werden. Es kann weiterhin festgehalten werden, dass der DFRS-S9 Vektor die Aktivität von microRNA-9 durch das Fehlen der Expression von RFP in Zellen anzeigt.



**Abbildung 13: Kontrollvektor für DFRS-S9**

Die Abbildung zeigt ein Mittelhirn (flat mount) nach Transfektion mit dem DFRS-control-Vektor. (A) zeigt die Expression von GFP, (B) die Expression von RFP

und (C) die Überlagerung von (A) und (B). Aus (C) wird deutlich, dass alle GFP exprimierenden Zellen auch das rote Signal von RFP enthalten. Dies spricht für eine ungehinderte Expression des RFP, da keine Bindung von microRNA-9 oder irgendeiner anderen Struktur erfolgt ist.

Maßstab: 200 µm

Die Ergebnisse dieser beiden Versuche zeigen erstens, dass microRNA-9 in frühen Entwicklungsstadien im Mittelhirn des Hühnerembryos exprimiert wird. Die Expressionsmuster aus den DFRS-Experimenten weisen darauf hin, dass in frühen Embryonalstadien microRNA-9 stärker im Mesencephalon exprimiert wird als im Di- und Rhombencephalon. Wobei im Mittelhirn die Expression dorsal stärker ist als ventral und dorsal mehr Zellen posterior microRNA-9 exprimieren als anterior an HH17. Zweitens ist ersichtlich, dass der DFRS-S9-Vektor sich auch sehr gut eignet, um eine funktionelle ektopische Expression von microRNA-9 zu überprüfen.

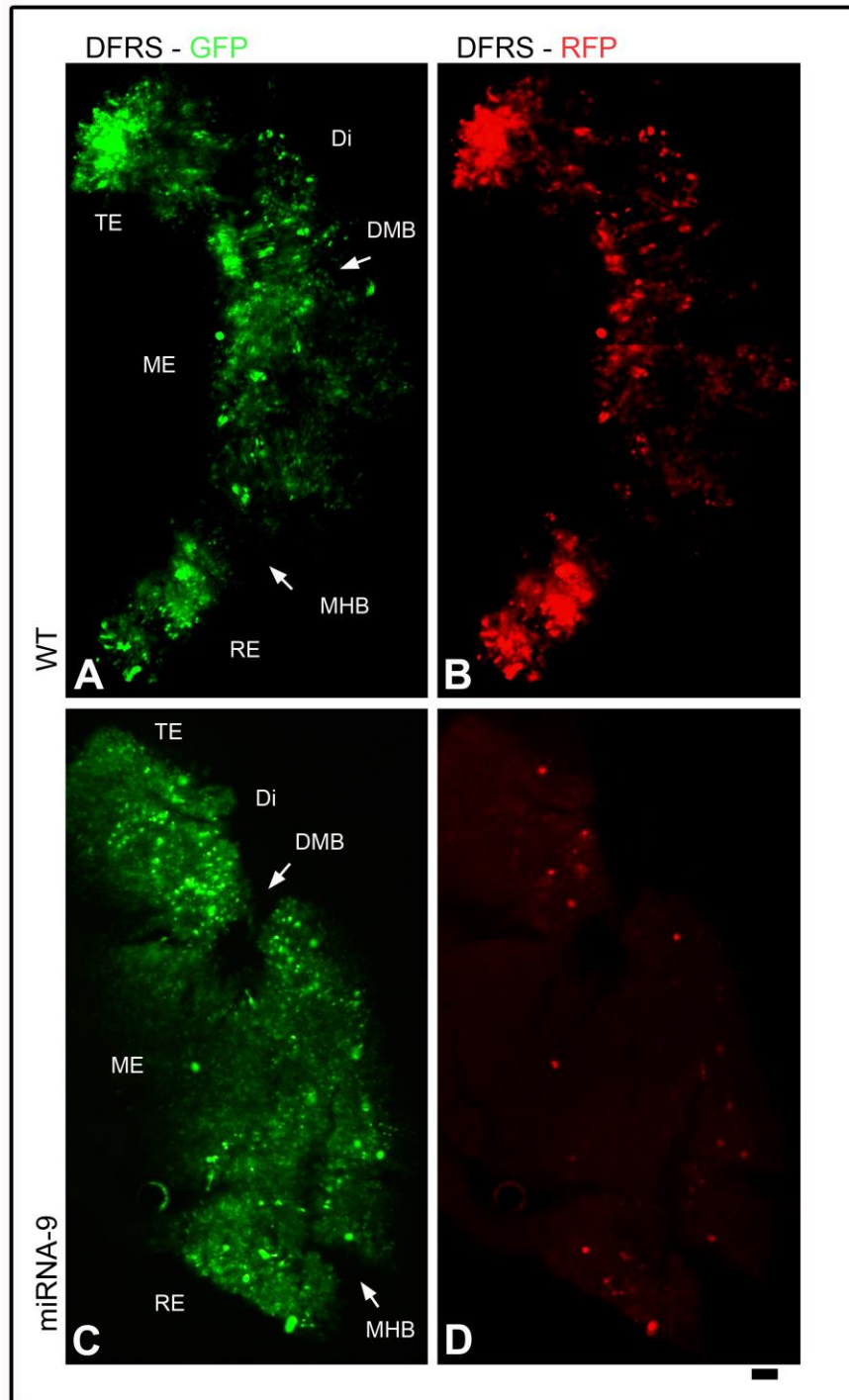
#### **4.1.3 Funktionelle Überexpression von microRNA-9**

Aus den oben genannten Ergebnissen lässt sich schließen, dass sich der DFRS-S9-Vektor eignet, die Effizienz einer Überexpression von microRNA-9 anzuzeigen. Um meine verschiedenen microRNA-9-Konstrukte zu überprüfen, wurden diese zusammen mit DFRS-S9 in die Mittelhirnregion des Embryos elektroporiert.

Aus Abbildung 14 wird deutlich, dass dieser Vektor sensitiv auf microRNA-9 reagiert. Die Überexpression von microRNA-9 durch den pSilencer-miR9-Vektor führt zu einer starken Herunterregulation des RFP Signals (**14C** und **14D**) im Vergleich mit dem intrinsisch aktiven microRNA-9 im Mittelhirn des Wildtyp-Embryos (**14A** und **14B**). GFP exprimierende Zellen sind hingegen entlang der ganzen AP Achse des Gehirns (TE, Di, ME, RH) präsent. Dieses Ergebnis war in allen untersuchten Embryonen zu sehen (n = 20). Alle grün leuchtenden Zellen exprimieren demnach den DFRS-Vektor sowie den pSilencer-miR9-Vektor, wodurch RFP (rote Fluoreszenz) inhibiert wird. In diesem Embryo sind keine bis kaum grün fluoreszierende Zellen in der MHB des Wildtyps zu finden.



Somit kann keine Aussage über die Expression von microRNA-9 in der MHB gemacht werden.



**Abbildung 14: Überexpression von microRNA-9 entlang der anterior-posterioren Achse des Gehirns**

Die Abbildung zeigt die Aktivität von microRNA-9 im embryonalen Mittelhirn (wild type; **A, B**) und nach Überexpression von microRNA-9 (**C, D**) mithilfe des DFRS-S9-Vektors. Die Überexpression von microRNA-9 führt zu einer starken Herunterregulation von RFP (rote Fluoreszenz in **D**).

TE – Telencephalon, Di – Diencephalon, DMB – diencephalon-mesencephalon boundary, ME – Mesencephalon, MHB – mid-hindbrain boundary, RE – Rhombencephalon, WT – wild type.

Maßstab: 200 µm

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass durch den von mir erzeugten pSilencer-miR9-Vektor kontinuierlich eine große Menge microRNA-9 in den transfizierten Zellen produziert wird. Somit ist dieses Konstrukt sehr gut für die Überexpression von microRNA-9 geeignet. Außerdem zeigen diese Ergebnisse, dass der auf die Anwesenheit von microRNA-9 sensitiv reagierende DFRS-Vektor sich gut als Nachweis für die Effizienz einer Überexpression von microRNA-9 eignet. In diesem Embryo sind grün fluoreszierende Zellen in der MHB zu finden, jedoch keine rot fluoreszierenden. Dies kann zum Beispiel an einer kürzeren Inkubationszeit liegen.

Aus dem ersten Teil dieser Arbeit lässt sich schließen, dass microRNA-9 in frühen Entwicklungsstadien im Mittelhirn des Hühnchens exprimiert wird. Eindeutig sensitiver um die genaue Expression von microRNA-9 zu ermitteln, hat sich die Verwendung des DFRS-S9 Vektors erwiesen. Die Expressionsmuster aus den DFRS-Experimenten weisen darauf hin, dass an E3 microRNA-9 stärker im Mesencephalon aktiv ist als im Di- und Rhombencephalon.

#### **4.2 Auswirkung von microRNA-9 auf die Genexpression**

Um die Wirkung von microRNA-9 auf das Expressionsmuster verschiedener Gene im embryonalen Mittelhirn und der MHB zu untersuchen, wurden pre-microRNA-9, microRNA-9 oder der pSilencer-miR9-Vektor in das mes- und rhombencephale Neuralrohr elektroporiert. Als Kontrolle diente zum einen die

kontralaterale Gehirnhälfte des Embryos, zum anderen Gehirne, welche ektopisch nur GFP exprimierten.

#### **4.2.1 Computeranalyse der microRNA-9-Bindungsstellen für Gene der MHB**

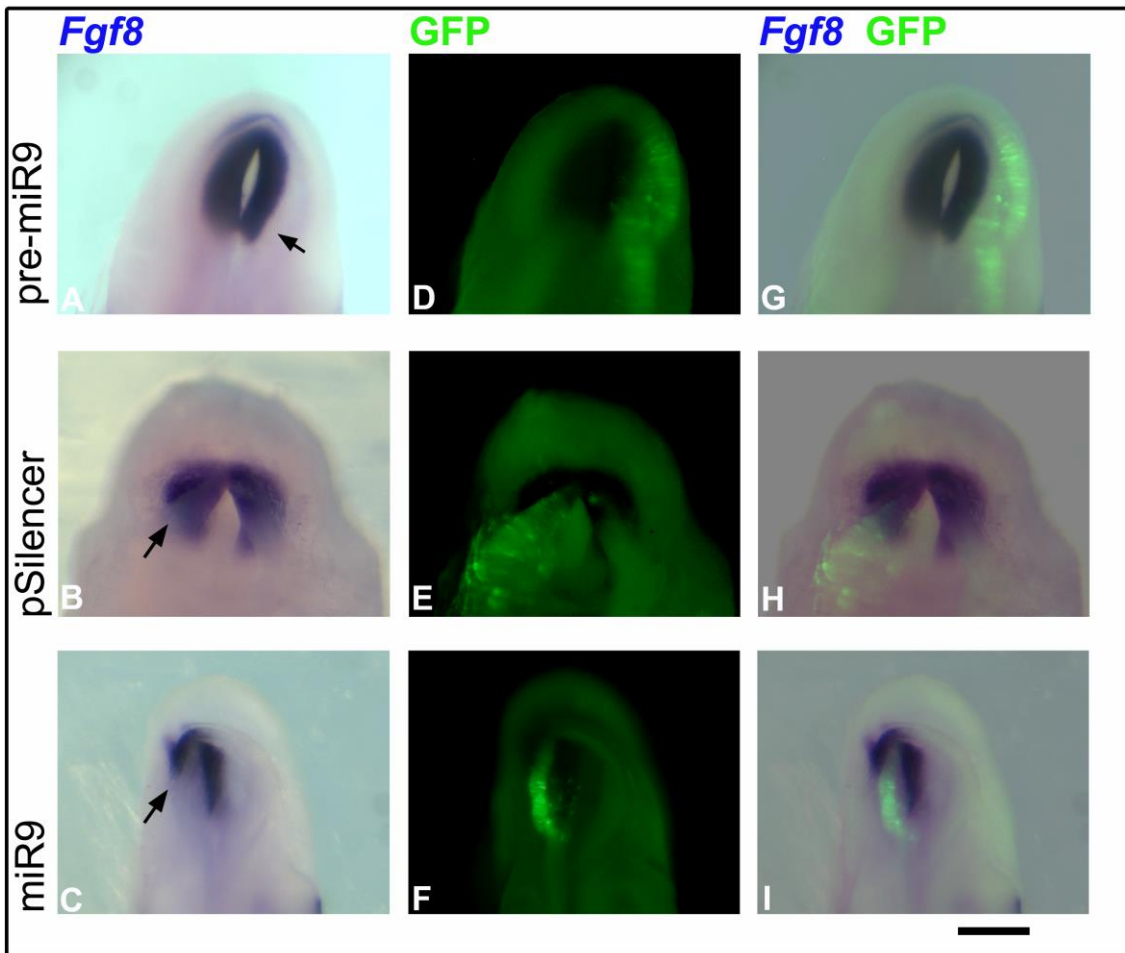
Theoretische Bindungsstellen am 3'UTR von microRNA-9 für Gene, die an der MHB der Maus exprimiert sind, wurden mithilfe der online zugänglichen Berechnungen miRanda, TargetScan und EMBL-EBI erworben ([www.microrna.org](http://www.microrna.org), [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org), <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/>). Interessanterweise scheint microRNA-9 keine direkte Bindungsstelle für Wnt1 zu haben, wie es auch im Zebrafisch beschrieben wurde (Leucht et al., 2008), aber dafür für die Transkriptionsfaktoren Tcf4 (Maus) oder Lef (Huhn), welche die Effektoren des kanonischen Wnt1 Signalweges darstellen. Sequenzanalysen des 3'UTR zeigten, dass auch im Huhn eine Fgf8-Bindungsstelle für miR9 vorliegt (Gene: FGF8, Position: 31-53 of FGF8 3'UTR).

#### **4.2.2 FGF8**

Das FGF8-Gen kodiert für ein Protein aus der "fibroblast growth factor"-Familie (White et al., 1995). Die FGF-Gene sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. Embryonalentwicklung, Zellwachstum, Morphogenese, Zellreparatur sowie Tumorwachstum und -ausbreitung. FGF8 spielt auch eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der MHB. In der MHB beeinflusst Fgf8 die Entwicklung und Differenzierung von Progenitorzellen. (Development of the Nervous System, Third Edition. Harris, Sanes, Reh, 2011; Dworkin et al., 2013).

Um zu analysieren, ob die Expression von FGF8 durch microRNA-9 beeinflusst wird, wurde microRNA-9 im Mittelhirn und der MHB überexprimiert. Dies geschah durch Elektroporation mit pre-miR9-Molekülen, microRNA-9 sowie mit dem pSilencer-miR9-Vektor. Im Anschluss an die Elektroporation und Fixierung wurde die FGF8-mRNA mittels DIG-gekoppelten Sonden sichtbar gemacht.

Eine nachfolgende Antikörperfärbung gegen GFP zeigte, welche Seite des embryonalen Hirns den elektroporierten Vektor aufgenommen hat (s. Abb. 15). Als Kontrolle wurde zum einen die kontralaterale Gehirnhälfte des Embryos genommen, zum anderen Gehirne, welche nur mit GFP oder dem pCAX-Vektor elektroporiert wurden.



**Abbildung 15: Herunterregulation von FGF8 durch ektopische microRNA-9**

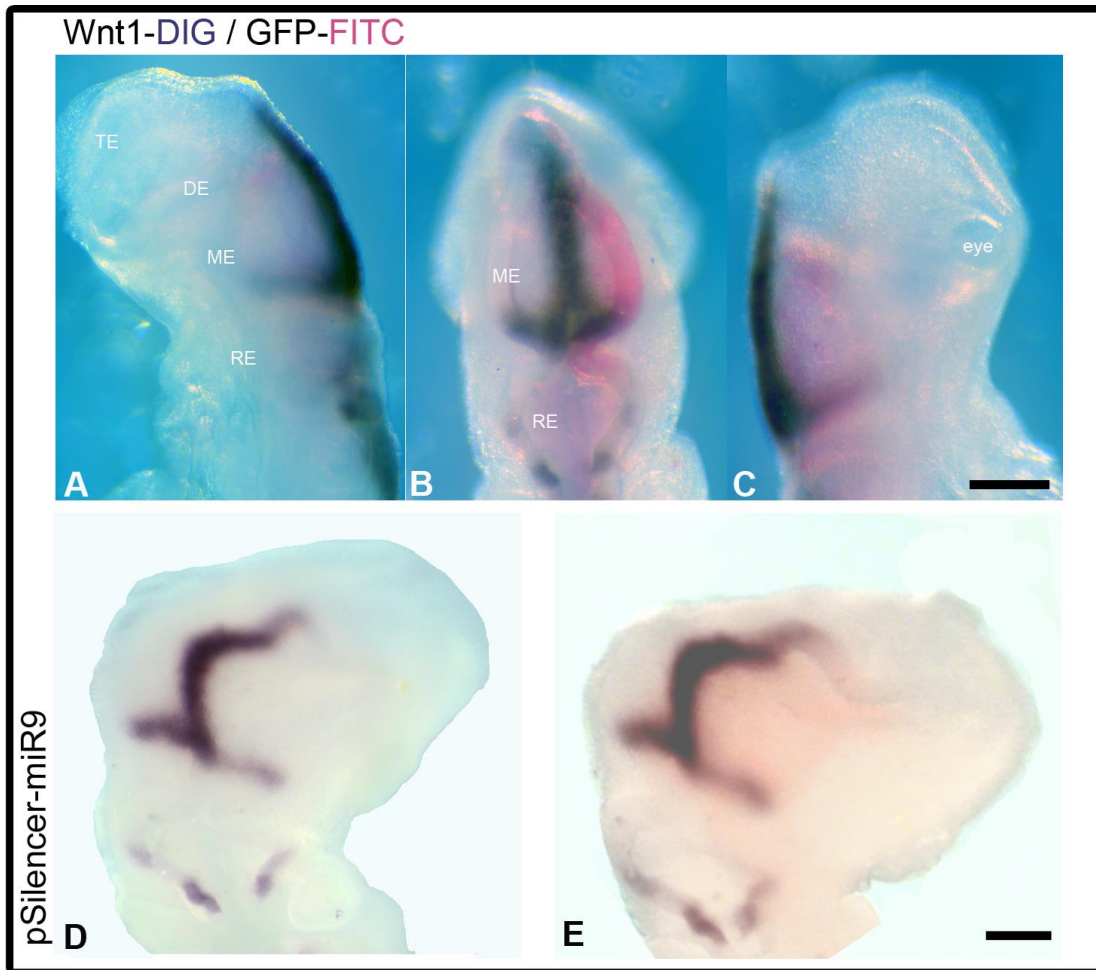
Die Abbildung gibt einen Blick auf die Grenze zwischen Mittelhirn und Rhombencephalon (die MHB) vom Rhombencephalon aus. FGF8-mRNA-Expression ist als blaue Färbung zu sehen (A-C, G-I). Die Expression von GFP (grüne Fluoreszenz) zeigt, in welchen Zellen pre-miR9, pSilencer-miR9 oder microRNA-9 ektopisch exprimiert wurden (D-F, G-I). Alle drei microRNA-9 Konstrukte reduzierten die FGF8-mRNA (siehe Pfeile in A-C), wobei microRNA-

*9 die stärkste Wirkung zeigte. Die ektope Expression von pre-miR9, microRNA-9 und pSilencer-miR9 führte in den meisten Embryonen zu einer Herunterregulation von FGF8 in den Zellen, die microRNA-9 exprimierten. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass microRNA-9 die FGF8 Expression negativ reguliert.*

#### **4.2.3 WNT1**

Das Protein WNT1 ist ein Proto-Onkogen aus der Familie der WNT-Gene. Diese Gene spielen eine Schlüsselrolle in verschiedenen Entwicklungsprozessen, z.B. der Regulation von Zellschicksalen und der embryonalen Musterbildung, sowie in der Entwicklung des neuronalen Netzwerks. Ebenfalls spielen sie eine Rolle bei der Erhaltung der Stammzellen sowie bei der Onkogenese. Studien in Maus-, Xenopus-, Zebrafisch- und Hühnerembryonen zeigten, dass WNT1 für die Entwicklung von Mesencephalon und Cerebellum sehr wichtig ist (Arheden et al., 1988; Buckles et al., 2004; Canning et al., 2007; Ciani and Salinas, 2005; Kelly and Moon, 1995; Kunz et al., 2004; van Ooyen et al., 1985).

Abbildung 16 zeigt einen Embryo im Stadium HH17 nach einer Färbung der WNT1-mRNA (blau) und der ektopischen mRNA von GFP (rot) als Indikator für die ektopische microRNA-9-Expression. Die ektopische Expression von microRNA-9 (rot) führte in manchen Mittelhirnen zu einer nur sehr leichten Reduktion des WNT1-Signals (n=2/20, Abb. 16 **D, E**). In den meisten Fällen konnte kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp gesehen werden (n=18/20, Abb. 16 **B, C**).



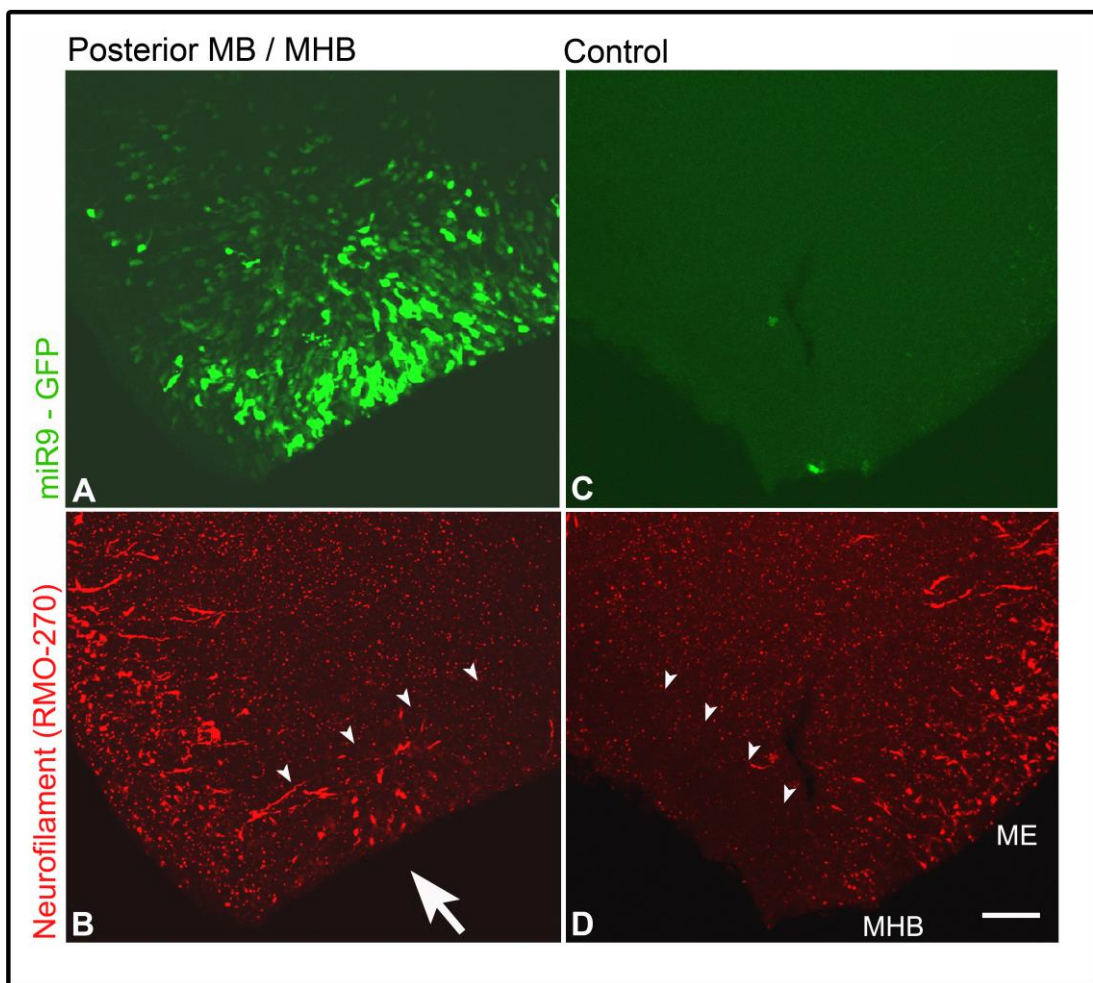
**Abbildung 16: Überexpression von microRNA-9 kann die WNT-1 Expression beeinflussen**

Die Mittelhirne wurde an HH9 (D,E) und HH10 (A-C) mit pSilencer-miR9 elektroporiert und an HH15 (A-C) HH17 (D,E) fixiert. Die mRNA von WNT-1 (blau) und GFP (rot) wurde mittels ISH angefärbt. In Mittelhirn (A-C) zeigt das WNT-1 Signal keine auffälligen Unterschiede in der Expression zwischen ‚wild typ‘ Seite (A) und miR-9 überexprimierenden (C). Eine schwächere Expression der WNT-1 mRNA zeigt sich in (D) und (E). Maßstab: 200 µm

#### 4.3 Auswirkung von microRNA-9 auf die Differenzierung in der MHB

Um herauszufinden, ob eine Überexpression von microRNA-9 zur verfrühten Neurogenese führt, wurde im Anschluss an die Elektroporation der Embryonen

mit pSilencer-miR9 eine Antikörperfärbung mit RMO-270 durchgeführt. RMO-270 ist ein monoklonaler Antikörper, welcher an die NF-M-Untereinheit des Neurofilaments bindet und somit spezifisch differenzierte Nervenzellen nachweisen kann. In der MHB konnte man bei allen untersuchten Embryonen (n=12) eine im Vergleich zur kontralateralen Kontrollseite erhöhte Zahl von fluoreszierenden, also differenzierten, Zellen feststellen. Dies lässt darauf schließen, dass microRNA-9 die Proliferation der Zellen in der MHB hemmt und die Differenzierung einleitet.



**Abbildung 17: Auswirkung von miR9 auf die Differenzierung in der MHB**

Die Abbildung zeigt die midhindbrain boundary (MHB) und das posteriore Mittelhirn. Links ist die Seite des Mittelhirns zu sehen, in welcher microRNA-9 überexprimiert wurde, was an der Expression von GFP zu sehen ist (A). Die



*MHB zeigt hier eine erhöhte Differenzierungsrate von Neuronen (Pfeil in B) im Vergleich zur Kontrollseite, welche zu diesem Zeitpunkt noch keine Differenzierung von Neuronen eingeleitet hat (D). ME – Mesencephalon, MHB – midhindbrain boundary*

*Maßstab: 100 µm*



## **5. Diskussion**

---

Meine Ergebnisse zeigen, dass microRNA-9 schon früh ubiquitär im Gehirnbereich exprimiert wird und eine Überexpression von microRNA-9 FGF8 und in geringerem Maße WNT1 in der MHB herunterreguliert sowie die Neurogenese in der MHB fördert.

### **5.1 Expressionsmuster von microRNA-9**

Um das Expressionsmuster von microRNA-9 zu visualisieren, wurde auf zwei unterschiedliche Methoden zurückgegriffen. Einmal die LNA-ISH, welche den Vorteil hat, in jedem beliebigen Embryonalalter nach Fixierung des Embryos durchgeführt werden zu können. Hierzu werden spezifische veränderte antisense Sequenzen für microRNA benötigt, die sogenannten locked nucleic acid (LNA-) Sonden. Binden die LNA-Sonden an die sense-microRNA-9-Sequenz, kann das sense/antisense Konstrukt über eine Antikörperbindung erkannt werden. Obwohl die Methode durch die verwendeten Antikörper sehr sensitiv ist, gibt es 2 Nachteile. Erstens wird hier RNA nachgewiesen, d.h. es muss sehr sauber (RNAse-frei) gearbeitet werden. Zweitens ist die Färbung oft nicht stark ausgeprägt oder zeigt ein ausgeprägtes Hintergrundsignal, da die microRNA-Moleküle sehr klein sind.

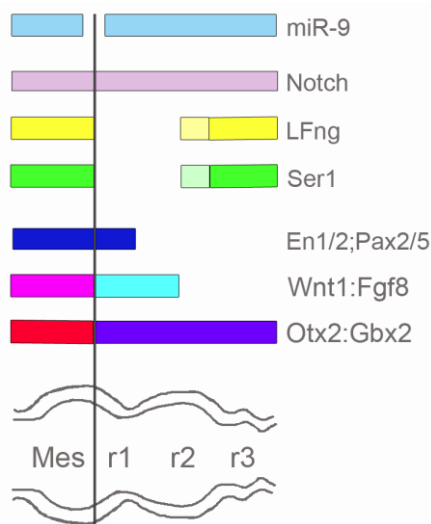
Aus diesem Grund wurde die Präsenz von microRNA-9 auch mithilfe von Fluoreszenz nachgewiesen. Der von De Pietri Tonelli et al. 2006 konstruierte Vektor lässt alle Zellen, welche den Vektor enthalten, GFP und RFP exprimieren. Ist microRNA-9 in den Zellen präsent, wird RFP herunterreguliert. Das heißt, dieser Vektor zeigt auf zellulärer Ebene die Präsenz von microRNA-9. Zelluläre Auflösung ist mit einer LNA-Färbung nicht möglich. Der andere große Vorteil dieser Methode ist, dass eine Verunreinigung durch RNAsen keine Rolle spielt. Als Nachteil kann die einseitige und je nach Elektroporation nur sehr regionale Expression des Vektors angesehen werden. Dies erfordert die Injektion mehrerer Neuralrohre und eine genaue Untersuchung der Expression in den unterschiedlichen Gebieten. Allerdings können mit dem DFRS-Vektor transformierte Gehirne über mehrere Tage inkubiert werden.

Jedoch muss man sich bewusst sein, dass das exprimierte RFP kein destabilisiertes RFP ist. Das bedeutet, das Protein bleibt, nachdem es einmal produziert wurde, länger als ein paar Stunden in der Zelle und spiegelt nicht den aktuellen Zustand der microRNA-9-Aktivität wider. Deshalb sollte immer nur ein paar Stunden vor dem gewünschten Entwicklungsstadium mit DFERS transformiert werden. RFP benötigt nach Elektroporation ungefähr vier bis sechs Stunden, bis es in der Zelle exprimiert und somit sichtbar wird. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sie schon fünf bis sieben Stunden nach Elektroporation die Expression von microRNA-9 auf Zellebene zeigt und somit ein wirkungsvoller Detektor einer herbeigeführten Überexpression ist. Bei Inkubationen über mehrere Tage muss allerdings beachtet werden, dass ein Fehlen von RFP nicht unbedingt auf ein Fehlen von microRNA-9 im Moment der Fixierung hindeuten muss, sondern die Herunterregulation bereits einige Stunden vorhergegangen sein kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, einen Vektor zu produzieren, der ein destabilisiertes RFP enthält, das nach kürzerer Zeit wieder abgebaut wird.

Interessanterweise zeigte sich, dass ein oder auch zwei Tage nach Elektroporation von Mes- und Rhombencephalon oft keine fluoreszierenden Zellen in der MHB zu finden waren (Abb. 12). Dies könnte ein Resultat der mes-rhombencephalen Morphologie sein. Nämlich, dass die Verengung zwischen Mittel- und Hinterhirn, die MHB, vielleicht im „Spannungsschatten“ der hier benutzten Elektroden liegt. Meist wurden hier parallel zur AP Achse des Neuralrohres verlaufende Elektroden benutzt (Huber et al., 2013). Diese Art von Elektroden (anstatt senkrecht zum Neuralrohr verlaufende) hat einen unterschiedlichen Abstand zum embryonalen Neuralrohr (Abb. 8). Da in beiden umgebenden Gehirngebieten, dem Mes- und dem Rhombencephalon, fluoreszierende Zellen zu finden waren, könnten auch alle fluoreszierenden Zellen aus der MHB ausgewandert sein. Träfe dieser Vorgang zu, dann müssten diese elektroporierten Zellen eine andere Zelladhäsion zeigen als die Umgebung. Dies könnte zutreffen, wenn die Zellen ektopisch microRNA-9 exprimieren und microRNA-9 Neurogenese-inhibierende Gene wie die Hes-Gene blockiert. So scheinen z.B. ektopische Notch-aktive Zellen aus der MHB

auszuwandern (Tossell et al., 2011). Allerdings wurden in meinen Embryonen, in denen die MHB ohne GFP exprimierende Zellen zu finden war, nicht nur microRNA-9 exprimiert, sondern auch einfach nur GFP (siehe auch Abb. 12). Eine weitere Möglichkeit ist der Zelltod der elektroporierten Zellen in der MHB. Dies scheint eher unwahrscheinlich, da man sonst auch im Mittelhirn oder Hinterhirn Lücken sehen müsste. Allerdings kann nur nach den entsprechenden Tests (wie Zelltod oder Aggregationsassay) eine klare Aussage darüber gemacht werden.

Der DFRS-Vektor diente nicht nur zur zellulären Darstellung der Aktivität von microRNA-9, er wurde auch eingesetzt, um die Effektivität einer Überexpression zu testen. MicroRNA-9-RNA-Oligonucleotide oder microRNA-9-Expression mittels pSilencer-Vektor konnten über den DFRS-S9 Vektor überprüft werden. In Abbildung 14 sieht man als Funktion des pSilencer-miR9-Vektors in Kombination mit dem DFRS-Vektor ein ubiquitäres Fehlen des roten Signals im gesamten Mittelhirn und der MHB. Dieser Effekt war in allen untersuchten Embryonen sichtbar (n = 20). Hier konnten jedoch in der MHB Zellen gefunden werden, welche GFP produzieren. Dies könnte an der aufgrund der o.g. Umstände verkürzten Inkubationszeit nach Elektroporation liegen.



**Abb. 18: Gene zur Aufrechterhaltung der MHB**

Die Abbildung zeigt die normale Genexpression in der MHB in einem wild type Embryo. Der senkrechte Strich zwischen Mesencephalon und Rhombencephalon zeigt die MHB. MicroRNA-9 ist normalerweise auf beiden Seiten der MHB aktiv.

(Abgeändert nach Tossell et al., 2011)

## 5.2 Auswirkung von microRNA-9 auf die Genexpression

Die MHB spielt eine sehr wichtige Rolle für die Entwicklung der AP Achse des Mittelhirns und des anterioren Rhombencephalon, aus dem sich unter anderem das Cerebellum entwickelt. Störungen in der Bildung und Aufrechterhaltung der MHB resultieren nicht nur in morphologischen Veränderungen, sondern auch in Funktionsstörungen des Gehirns (Stoeckli et al., 2012).

### 5.2.1 Regulation von WNT1 und FGF8

Die korrekte Entwicklung der MHB hängt vom Zusammenspiel mehrerer Gene ab. Die Signalproteine FGF8 und WNT1 sowie die Transkriptionsfaktoren PAX2, PAX5, ENGRAILED1 und ENGRAILED2 sind alle in und um die MHB exprimiert (Abb. 18) und regulieren sich gegenseitig. Das Fehlen eines dieser Proteine führt zu einem Zusammenbruch der MHB, gefolgt von einer Fehlentwicklung von Mittelhirn und anteriorem Hinterhirn. FGF8 scheint für die Aufrechterhaltung der MHB als Proliferationszentrum verantwortlich zu sein (Nakamura et al., 2008; Nakamura, 2001). In frühen Entwicklungsstadien der Hühnerembryonen zeigte sich auch in meinen Expressionsanalysen eine Expression von WNT1 und FGF8 in der MHB, wobei FGF8 die Expression von WNT1 im anterioren Teil und WNT1 die Expression von FGF8 im posterioren Teil der MHB hemmt (Dworkin et al., 2013). Im Zebrafisch reguliert microRNA-9 nur FGF8 und über FGF8 auch indirekt die WNT1 Expression entlang der MHB (Leucht et al., 2008). Eine online Analyse mittels miRanda zeigte, dass auch im Hühnerembryo FGF8 sehr wahrscheinlich ein target von microRNA-9 ist, wohingegen WNT1 keine 3'UTR Bindungsstelle aufweist. Interessanterweise scheint im Huhn LEF, ein Transkriptionsfaktor im kanonischen WNT Signalweg, Bindungsstellen für microRNA-9 aufzuweisen. Dies könnte darauf hinweisen, dass der WNT-Signalweg nicht nur indirekt über FGF8 sondern auch downstream durch microRNA-9 gehemmt wird. Um die Auswirkung von microRNA-9 auf die Expression von FGF8 und WNT1 zu untersuchen, wurde deren natürliche Verteilung zuerst in WT Embryonen analysiert. Durch die Überexpression von microRNA-9-Oligonukleotiden oder microRNA-9-

Überexpression mittels eines Vektors in eine Seite des mesencephal-rhombencephalen Neuralrohres konnte die Wirkung von microRNA-9 auf FGF8 und WNT1 gezeigt werden.

Meine Experimente zeigten eine deutliche Herunterregulierung der Expression von FGF8 und eine wesentlich geringere von WNT1 in Gegenwart von microRNA-9. Dies deutet darauf hin, dass - wie im Zebrafischembryo (Leucht et al., 2008) - auch im Hühnerembryo FGF8 von microRNA-9 feinreguliert und WNT1 nur indirekt beeinflusst wird. Dieses Ergebnis korreliert mit der Präsenz einer microRNA-9-Bindungsstelle nur im FGF8-3'UTR im Huhn und Zebrafisch. Unsere ersten Target-Scans ergaben bei LEF1 und TCF4, beides Transkriptionsfaktoren im kanonischen WNT1-Signalweg, 3'UTR-Bindungsstellen für microRNA-9. Dies könnte darauf hinweisen, dass der WNT1-Signalweg nicht nur indirekt über FGF8 sondern auch downstream durch microRNA-9 gehemmt wird. Im Gegensatz zum Zebrafisch gäbe es dann im Huhn noch eine zusätzliche Kontrolle der Signalwege in der MHB. Diese These müsste allerdings über *in vivo* Versuche verifiziert werden. Allerdings wies eine erneute Suche in 2016 keine dieser Bindungsstellen mehr auf (<http://mirdb.org/miRDB/>; [www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/mirna.pl](http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/mirna.pl); <http://www.mirbase.org/>) (Wong & Wang, 2015; Wang, 2016; Kozomara & Griffiths-Jones, 2014; Kozomara & Griffiths-Jones, 2011; Griffiths-Jones et al., 2008; Griffiths-Jones et al., 2006; Griffiths-Jones, 2004). Dieser neue Target-Scan für 3'UTRs von microRNA-9 im Hühnerembryo zeigte jedoch jetzt auch Bindungsstellen für HES1, ENGRAILED1 (EN1) und ENGRAILED2 (EN2) und KREMEN. Letztere wurde im Zebrafisch bisher noch nicht beschrieben. EN1 und EN2 sind, wie FGF8 und WNT1, wichtig für die Erhaltung der MHB (Dworkin et al., 2013). KREMEN ist ein sogenannter „gatekeeper“ des WNT-Signalweges und könnte hiermit auch Einfluss auf die WNT1 Expression haben (Nakamura et al., 2008). Theoretische 3'UTR-Bindungsstellen müssen immer auf ihre Richtigkeit überprüft werden, da die Algorithmen, mit denen die Bindungsstellen berechnet werden, stets verfeinert werden. Man kann diese 3'UTR-Bindungsstellen *in vitro* zum Beispiel mittels

eines Luciferase-Tests evaluieren (Kuhn et al., 2008; Goljanek-Whysall et al., 2011). Eine besser Alternative wäre die Durchführung eines *in vivo* Tests, um zu klären, ob in einem spezifischen Gewebe die untersuchte microRNA ein Gen tatsächlich reguliert. Eine Herunterregulation wie in unserem Fall bei FGF8 zeigt eine eindeutige Wirkung. Um dies noch weiter zu bestätigen, kann zusätzlich eine sogenannte „target site protection“ durchgeführt werden. Hierbei wird zusammen mit der microRNA eine sense-Sequenz zum 3'UTR des betreffenden Genes injiziert. Diese müsste dann den Effekt der microRNA verringern, da diese vor ihrer Bindung an die 3'UTR abgefangen wird. In unserem Falle würde dies wahrscheinlich zu einer breiteren Expression von FGF8 im Mittelhirn und an der MHB führen.

Im Zebrafisch zeigte sich eine deutliche Downregulation der Gene FGF8 und WNT1 sowie ein Verlust der MHB nach Überexpression von microRNA-9 (Leucht et al., 2008). In meinen Experimenten zeigte sich ebenfalls eine Herunterregulation von FGF8 und später auch von WNT1, jedoch blieb die MHB zu jeder Zeit abgrenzbar und sichtbar. Im Unterschied zu meinen Experimenten wurden im Zebrafisch pre-miR-9-Moleküle im 2- oder 4-Zellstadium injiziert, d.h. die Hälfte oder ein Viertel der Zebrafischzellen zeigen eine Überexpression von microRNA-9. Dadurch ist die Wirkung einerseits stärker, andererseits setzt die Überexpression deutlich früher ein als im Hühnerembryo. Die von mir erzeugte lokale Überexpression von microRNA-9 findet außerdem in einem Stadium statt, in dem die Induktion und Lokalisation der MHB durch OTX2 und GBX2 bereits stattgefunden hat. Folglich kann eine ektopische Expression von microRNA-9 nur noch die Erhaltung der MHB im Hühnerembryo beeinflussen, aber nicht mehr deren Entstehung und Lokalisation. Das bedeutet aber auch, dass man über die Elektroporation die Wirkung von microRNAs an spezifischen Zeitpunkten gezielter untersuchen kann. Meine Ergebnisse deuten deshalb darauf hin, dass microRNA-9 auch nach der Induktions- und Lokalisierungsphase der MHB noch eine Rolle für die Expression von FGF8 spielt. Zu diesem Zeitpunkt scheint dann wirklich nur eine Feinregulierung von FGF8 stattzufinden, da nie eine komplette

Herunterregulierung beobachtet wurde, auch wenn fast die Hälfte der Mes-Metencephalonregion elektroporiert wurde.

### **5.3 Auswirkung von microRNA-9 auf die Differenzierung**

Nach Überexpression von microRNA-9 zeigte sich in unseren Experimenten nach RMO270-AK-Färbung eine erhöhte Differenzierungsrate von Neuronen im Bereich der MHB im Vergleich zu WT-Embryonen sowie der nicht-modifizierten Kontrollseite, welche zu diesem Zeitpunkt noch keine Differenzierung von Neuronen zeigt (Abbildung 17). Dies zeigt, dass microRNA-9 eine Differenzierung der neuronalen Progenitorzellen einleitet und die Proliferationsrate senkt. Leucht et al. zeigten im Zebrafisch, dass nach microRNA-9-Überexpression die Anzahl von mitotischen Zellen zurückging und die Differenzierung eingeleitet wurde (Leucht et al., 2008). Bonev et al. zeigte eine verminderte Anzahl von differenzierten Neuronen in microRNA-9-knockout-Experimenten nach Injektion von Morpholinos in Krallenfrösche (Bonev et al., 2011).

### **5.4 Zusammenfassung**

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkung von microRNA-9 auf unterschiedliche Gene sowie auf die Proliferation und Differenzierung im sich entwickelnden Mittelhirn des Hühnerembryos zu analysieren. Die ektopische Expression von microRNA-9 ermöglichte es, Unterschiede in der Genexpression und Entwicklung gegenüber dem Wildtyp-Embryo zu analysieren. Eine Überexpression von microRNA-9 erfolgte entweder durch Elektroporation von pre-miR-9 oder microRNA-9 als auch über Elektroporation eines Expressionsvektors, welcher kontinuierlich microRNA-9 in den Zellen exprimiert. Erstere Methode führt zu einer schnellen, aber kurzen Expression von microRNA-9, wohingegen letztere eine lange Verweildauer von microRNA-9 im Gewebe garantiert. So konnten frühe und späte Wirkungen untersucht werden. Eine Überexpression von microRNA-9 führte zu einer Herunterregulation verschiedener Gene im Bereich der MHB während der frühen Entwicklung des Nervensystems in Hühnerembryonen. Die hier

aufgeführten Experimente zeigen eine eindeutige Beteiligung von microRNA-9 an der direkten Regulation von FGF8 im Bereich der MHB und des Mittelhirns. Wnt1 hingegen scheint nicht direkt von microRNA-9 reguliert zu werden. Computergestützte Analysen der theoretischen Bindungsstellen von microRNA-9 zeigten, dass die mRNA von FGF8 im Hühnchen eine Bindungsstelle für microRNA-9 enthält. Dies war für WNT1 jedoch nicht zu finden. Hier ist davon auszugehen, dass microRNA-9 WNT1 nicht direkt inaktiviert, jedoch über die Herunterregulation von FGF8 auf die Expression von WNT1 Einfluss nimmt. Des Weiteren zeigte sich nach Überexpression von microRNA-9 eine vermehrte Differenzierungsrate im Bereich der MHB im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen. Die MHB spielt in der Entwicklung des embryonalen Gehirns beim Hühnchen eine wichtige Rolle als Organisations- und Proliferationszentrum. Somit lässt sich schließen, dass eine Fehlregulation von microRNA-9 während der frühen Entwicklung des Nervensystems zu strukturellen und somit zu funktionellen Beeinträchtigungen des zentralen Nervensystems führen kann.



## 6. Literaturverzeichnis

---

### Publikationen:

Altmann, C.R. & Brivanlou, A.H. 2001. Neural patterning in the vertebrate embryo. *International Review Of Cytology* **203**, 447–482.

Arheden, K., Mandahl, N., Strömbeck, B., Isaksson, M. & Mitelman, F. 1988. Chromosome localization of the human oncogene INT1 to 12q13 by in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics* **47**(1-2), 86–87.

Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116**(2), 281–297.

Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K. V & Hannon, G.J. 2003. Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics* **35**(3), 215–217.

Bonev, B., Pisco, A. & Papalopulu, N. 2011. MicroRNA-9 Reveals Regional Diversity of Neural Progenitors along the Anterior-Posterior Axis. *Developmental Cell* **20**(1), 19–32.

Buckles, G.R., Thorpe, C.J., Ramel, M.C. & Lekven, A.C. 2004. Combinatorial Wnt control of zebrafish midbrain-hindbrain boundary formation. *Mechanisms of Development* **121**(5), 437–447.

Canning, C.A., Lee, L., Irving, C., Mason, I. & Jones, C.M. 2007. Sustained interactive Wnt and FGF signaling is required to maintain isthmic identity. *Developmental Biology* **305**(1), 276–286.

Cao, X., Yeo, G., Muotri, A.R., Kuwabara, T. & Gage, F.H. 2006. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annual review of neuroscience* **29**, 77–103.

Chen, K., Chen, K., Rajewsky, N. & Rajewsky, N. 2007. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature reviews Genetics* **8**(2), 93–103.

Ciani, L. & Salinas, P.C. 2005. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nature reviews Neuroscience* **6**(5), 351–362.

Darnell, D.K., Kaur, S., Stanislaw, S., Konieczka, J.H., Yatskievych, T.A. & Antin, P.B. 2006. MicroRNA expression during chick embryo development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**(11), 3156–3165.

- Le Douarin, N.M. & Teillet, M. a 1973. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *Journal of embryology and experimental morphology* **30**(1), 31–48.
- Dworkin, S. & Jane, S.M. 2013. Novel mechanisms that pattern and shape the midbrain-hindbrain boundary. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**(18), 3365–3374.
- Friedman, J.M. & Jones, P.A. 2009. MicroRNAs: Critical mediators of differentiation, development and disease. *Swiss Medical Weekly* **139**(33-34), 466–472.
- Gammill, L.S. & Bronner-Fraser, M. 2003. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature reviews Neuroscience* **4**(10), 795–805.
- Goljanek-Whysall, K., Sweetman, D., Abu-Elmagd, M., Chapnik, E., Dalmay, T., Hornstein, E. & Münsterberg, A. 2011. MicroRNA regulation of the paired-box transcription factor Pax3 confers robustness to developmental timing of myogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(29), 11936–41.
- Griffiths-Jones, S. 2004. The microRNA Registry. *Nucleic acids research* **32**(Database issue), D109–11.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A. & Enright, A.J. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research* **34**(Database issue), D140–4.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., Van Dongen, S. & Enright, A.J. 2008. miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research* **36**(SUPPL. 1).
- Grillari, J. & Grillari-Voglauer, R. 2010. Novel modulators of senescence, aging, and longevity: Small non-coding RNAs enter the stage. *Experimental Gerontology* **45**(4), 302–311.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S. & Bartel, D.P. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**(7308), 835–840.
- Hamburger, V. & Hamilton, H.L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* **88**(1), 45–92.
- Huber, C., Alwin Prem Anand, A., Mauz, M., Künstle, P., Hupp, W., Hirt, B. & Wizenmann, A. 2013. In ovo expression of microRNA in ventral chick midbrain. *Journal of visualized experiments : JoVE* (79), e50024.
- Inui, M., Martello, G. & Piccolo, S. 2010. MicroRNA control of signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**(4), 252–263.

Kapsimali, M., Kloosterman, W.P., de Bruijn, E., Rosa, F., Plasterk, R.H.A. & Wilson, S.W. 2007. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome biology* **8**(8), R173.

Kelly, G.M. & Moon, R.T. 1995. Involvement of *wnt1* and *pax2* in the formation of the midbrain-hindbrain boundary in the zebrafish gastrula. *Developmental Genetics* **17**(2), 129–140.

Kosik, K.S. 2006. The neuronal microRNA system. *Nature reviews Neuroscience* **7**(12), 911–920.

Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. 2011. MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research* **39**(SUPPL. 1).

Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. 2014. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research* **42**(D1).

Krichevsky, A.M., King, K.S., Donahue, C.P., Khrapko, K. & Kosik, K.S. 2003. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA (New York, N.Y.)* **9**(10), 1274–1281.

Kuhn, D.E., Martin, M.M., Feldman, D.S., Terry, A. V., Nuovo, G.J. & Elton, T.S. 2008. Experimental validation of miRNA targets. *Methods* **44**(1), 47–54.

Kunz, M., Herrmann, M., Wedlich, D. & Gradl, D. 2004. Autoregulation of canonical Wnt signaling controls midbrain development. *Developmental Biology* **273**(2), 390–401.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. & Tuschl, T. 2002. Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse. *Current Biology* **12**(9), 735–739.

Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N.D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foà, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Müller, R.U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D.B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H.I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C.E., Nagle, J.W., Ju, J., Papavasiliou, F.N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M.J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J.J., Sander, C., Zavolan, M. & Tuschl, T. 2007. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* **129**(7), 1401–1414.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**(5), 843–854.

Leucht, C., Stigloher, C., Wizenmann, A., Klafke, R., Folchert, A. & Bally-Cuif, L. 2008. MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. *Nature neuroscience* **11**(6), 641–648.

Li, X. & Jin, P. 2010. Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity. *Nature reviews Neuroscience* **11**(5), 329–338.

Lumsden, A. & Krumlauf, R. 1996. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science (New York, N.Y.)* **274**(5290), 1109–1115.

Mallanna, S.K. & Rizzino, A. 2010. Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. *Developmental Biology* **344**(1), 16–25.

Malone, C.D. & Hannon, G.J. 2009. Small RNAs as Guardians of the Genome. *Cell* **136**(4), 656–668.

Muramatsu, T., Mizutani, Y., Ohmori, Y. & Okumura, J. 1997. Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo. *Biochemical and biophysical research communications* **230**(2), 376–380.

Murchison, E.P., Partridge, J.F., Tam, O.H., Cheloufi, S. & Hannon, G.J. 2005. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(34), 12135–12140.

Nakamura, H. 2001. Regionalisation and acquisition of polarity in the optic tectum. *Progress in Neurobiology* **65**(5), 473–488.

Nakamura, H., Sato, T. & Suzuki-Hirano, A. 2008. Isthmus organizer for mesencephalon and metencephalon. *Dev. Growth Differ.* **50 Suppl 1**(1440-169X (Electronic)), S113–S118.

Nakamura, T., Nakamura, T. & Matsumoto, K. 2008. The functions and possible significance of Kremen as the gatekeeper of Wnt signalling in development and pathology: Molecular Medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **12**(2), 391–408.

Van Ooyen, A., Kwee, V. & Nusse, R. 1985. The nucleotide sequence of the human int-1 mammary oncogene; evolutionary conservation of coding and non-coding sequences. *The EMBO journal* **4**(11), 2905–2909.

Packer, A.N., Xing, Y., Harper, S.Q., Jones, L. & Davidson, B.L. 2008. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9\* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **28**(53), 14341–14346.

- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L. & Bradley, A. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research* **14**(10 A), 1902–1910.
- Saba, R. & Schratt, G. 2010. MicroRNAs in neuronal development, function and dysfunction. *Brain Research* **1338**, 3–13.
- Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E. & Ambros, V. 2004. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome biology* **5**(3), R13.
- Shibata, M., Kurokawa, D., Nakao, H., Ohmura, T. & Aizawa, S. 2008. MicroRNA-9 modulates Cajal-Retzius cell differentiation by suppressing Foxg1 expression in mouse medial pallium. *The Journal of neuroscience* **28**(41), 10415–10421.
- Shibata, M., Nakao, H., Kiyonari, H., Abe, T. & Aizawa, S. 2011. MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors. *The Journal of neuroscience* **31**(9), 3407–3422.
- Stefani, G. & Slack, F.J. 2008. Small non-coding RNAs in animal development. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**(3), 219–230.
- Stoeckli, E.T. 2012. What does the developing brain tell us about neural diseases? *European Journal of Neuroscience* **35**(12), 1811–1817.
- Sweetman, D., Rathjen, T., Jefferson, M., Wheeler, G., Smith, T.G., Wheeler, G.N., Münsterberg, A. & Dalmay, T. 2006. FGF-4 signaling is involved in mir-206 expression in developing somites of chicken embryos. *Developmental Dynamics* **235**(8), 2185–2191.
- Tonelli, D.D.P., Calegari, F., Fei, J.F., Nomura, T., Osumi, N., Heisenberg, C.P. & Huttner, W.B. 2006. Single-cell detection of microRNAs in developing vertebrate embryos after acute administration of a dual-fluorescence reporter/sensor plasmid. *BioTechniques* **41**(6), 727–732.
- Wang, X. 2016. Improving microRNA target prediction by modeling with unambiguously identified microRNA-target pairs from CLIP-Ligation studies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 1–7.
- White, R.A., Dowler, L.L., Angeloni, S. V, Pasztor, L.M. & MacArthur, C.A. 1995. Assignment of FGF8 to human chromosome 10q25-q26: mutations in FGF8 may be responsible for some types of acrocephalosyndactyly linked to this region. *Genomics* **30**(1), 109–111.
- Wienholds, E. & Plasterk, R.H.A. 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters* **579**(26), 5911–5922.

Wienholds, E., Koudijs, M.J., van Eeden, F.J.M., Cuppen, E. & Plasterk, R.H.A. 2003. The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nature genetics* **35**(3), 217–218.

Wienholds, E., Kloosterman, W.P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., Horvitz, H.R., Kauppinen, S. & Plasterk, R.H.A. 2005. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science (New York, N.Y.)* **309**(5732), 310–311.

Wong, N. & Wang, X. 2015. miRDB: An online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Research* **43**(D1), D146–D152.

Wulczyn, F.G., Smirnova, L., Rybak, A., Brandt, C., Kwidzinski, E., Ninnemann, O., Strehle, M., Seiler, A., Schumacher, S. & Nitsch, R. 2007. Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *The FASEB journal* **21**(2), 415–426.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. & Cullen, B.R. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development* **17**(24), 3011–3016.

Zhao, T., Li, G., Mi, S., Li, S., Hannon, G.J., Wang, X.-J. & Qi, Y. 2007. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes & development* **21**(10), 1190–1203.

### **Bücher:**

Harris WA, Sanes DH, Reh TA (2011). *Development of the Nervous System*, Third Edition. Boston: Academic Press. pp. 33–34. ISBN 0-12-374539-2.

J. M. W. Slack (1991). *From egg to Embryo: Regional Specification in Early Development*, Cambridge, second edition. ISBN 0-521-40943-8.

## **7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation**

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Frau PD Dr. rer. nat. Andrea Wizenmann, Frau Ulrike Kohler, Frau Leokadia Macher) von mir eigenständig durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig (nach Anleitung durch Frau Dr. rer. nat. Andrea Wizenmann) verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Carola Huber

## **8. Danksagung**

---

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Andrea Wizenmann für die intensive und überdurchschnittliche Betreuung sowie ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation während der Fertigstellung dieser Arbeit. Ich danke dir für die vielen produktiven und auch freundschaftlichen Gespräche in den letzten Jahren sowie die Unterstützung in allen Lebenslagen. Ich habe, nicht nur wissenschaftlich, sehr viel von dir lernen dürfen.

Zudem möchte ich mich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Lothar Just für das Überlassen des Themas und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten, sowie für die Unterstützung und das Interesse am Verlauf meiner Arbeit bedanken.

Eine Arbeit dieser Form erfordert eine gute Zusammenarbeit aller Beteiligten. Ich bedanke mich bei meinen Kollegen des Anatomischen Institutes der Universität Tübingen für die Unterstützung und die schöne Zeit, die ich im Laufe der letzten Jahre erleben durfte. Besonderen Dank schulde ich hier Frau Ulrike Kohler für die gute Einarbeitung und Hilfestellung sowie Herrn Jürgen von der Ruhr für die kulinarische Betreuung während der Laborarbeit.

Ich danke meinen Eltern und meinen Schwestern für die unermüdliche Unterstützung sowie die ständige Erinnerung an die noch ausstehende Arbeit. Wie jede wissenschaftliche Arbeit war auch diese nicht frei von Tiefen und ich bedanke mich für das Aussitzen meiner Launen während der Fertigstellung.



## 9. Anhang

---

### 9.1 Anleitung immunhistochemische Analyse

Achtung: Möglich in whole mount Embryonen bis HH 22, danach ist eine mechanische Verkleinerung der Embryonen nötig.

Alle Waschschritte soweit nicht anders angegeben ca. 5-10 min.

1. Open roof plate of neural tube/brain.
2. Fix embryos in 4% PFA solved in 0.05M PBS, pH 7.3, at 4°C o/n
3. 5x wash with PBS + 5-10% fetal calf serum (FCS) + 0.1% Triton-X-100, continue with step 4.

➔ **for DAB staining:** block endogenous peroxidase: PBS + 0.05 - 0.1% hydrogen peroxidase + 1.0% Triton-X-100 + 5-10% fetal calf serum, 4°C o/n

4. 3x wash with PBS + 0.1% Triton-X-100 + 5-10% FCS
5. Primary antibody: in PBS + 10% FCS + 1% Triton-x-100 + 0.01% thimerosal. Antibody (Ab) dilution as appropriate for sections (MAbs 1:1, PAbs 1:500-1000), 2-4 days at 4°C with rocking. Incubate 4 days in IgM MAbs, shorter in IgG MAbs.
6. Draw off and save Ab solution (can be re-used 3-4x, reduces background). 5x or more washes with PBS + 5-10%FCS + 0.1% triton with rocking at 4°C. **No azide** here or later (interferes with DAB staining)
7. Second antibody: IgG or IgM or fluorochrome coupled antibody or peroxide or AP coupled, in PBS + 5-10%FCS + 0.1% triton, 4°C over night.

Keep **dark** now! Wrap in alu-foile when using fluorochrome.

8. wash as in step 6.
- ➔ **for DAB staining:** wash carefully to get rid of all azide (you will have azide in the 2ndary AB).

9. Mount in 90% glycerol/PBS + DABCO, when you used a fluorochrome coupled secondary.
- 9.1 **for Peroxide coupled secondary to stain with DAB:** 2x wash in PBS or TRIS (100mM, pH 7.4%; (Tris is to prefer because it's a better buffer than PBS for DAB, that means with the hydrogen peroxidase the pH will be more stable).
- 9.2 Add inactive DAB: diaminobenzidine 5mg/10ml Tris (NB filtered 0.2µm), 3 hours, 4°C in the **dark** with rocking. The colour may be enhanced by adding 0.5% (a dash) of NiCl<sub>2</sub> to the dAB solution.
- 9.3 Add active DAB: 5mg/10ml cold TRIS + 3µls hydrogen peroxide (of 60% or 200 vols). Develop in the dark at RT for 5-15min. Stop reaction as soon as background begins to colour by immersion in tap water several times then wash repeatedly in PBS (around 3x)
10. Further block dissection, if required.
11. Mount in glycerol (90%) + PBS(10%) + thimerosal (0,02%), seal prep with nail varnish, or dehydrate and mount in entellan or similar stuff.

## 9.2 Anleitung whole mount RNA-ISH

Dissect emryos in PBS	
Fix embryos in 4% PFA/PBS (no more than 2 weeks)	o/n
Wash embryos in PBT	5 min
Wash embryos in PBT	5 min
25 % MeOH in PBT	5 min
50 % MeOH in PBT	5 min
75 % MeOH in PBT	5 min
100 % MeOH in PBT	5 min
100 % MeOH in PBT (can store a few days at this point at -20 °C)	60 min / o/n
75 % MeOH in PBT	5 min
50 % MeOH in PBT	5 min
25 % MeOH in PBT	5 min
Wash embryos in PBT	5 min
Wash embryos in PBT	5 min
6% Hydrogen peroxidase in PBT (wash carefully, otherwise bubbles)	60 min
Wash embryos in PBT	5 min
Wash embryos in PBT	5 min
Wash embryos in PBT	5 min
Detergent mix	20 min
Detergent mix	20 min
Detergent mix	20 min
Fix in 4% pPFA, 0.2% Glutaraldehyde	20 min
Wash embryos in PBT	5 min
Wash embryos in PBT	5 min
Wash embryos in PBT	5 min
Pr'e-hybe mix (store at -20 °C possible. Heat for at least 60 mins at 70°C upon defrosting)	60 min / o/n
Replace with preheated hyb-mix and 0.5 to 1 µg RNA probe	o/n
Preheat Solution X	15 min
Wash embryos in Solution X	30 min

Wash embryos in Solution X	30 min
Wash embryos in Solution X	30 min
Wash embryos in Solution X	30 min
Wash embryos in MABT	5 min
Wash embryos in MABT	5 min
Wash embryos in MABT	5 min
MABT + 20% GS + 2% BR (block)	1 - 2 hrs
Add antibody (1:2000) in block	o/n
Wash embryos in MABT	5 min
Wash embryos in MABT	5 min
Wash embryos in MABT	5 min
Wash embryos in MABT	60 min
Wash embryos in MABT	60 min
Wash embryos in MABT	60 min
Wash embryos in MABT	60 min
Wash embryos in MABT	60 min
Wash embryos in MABT	o/n
(or 1 more day* or 2 nights over weekend at 4 °C)	
Wash in NTMT	10 min
Wash in NTMT	10 min
Wash in NTMT	10 min
Incubate in NTMT with 3.5 µl NBT and 3.5 µl BCIP (X-Phosphate) per 2 (or 3) ml	
Wash in PBT, changing the solution until it is no longer coloured by the reaction by-products	o/n
Store in 4 % PFA in PBS or 50% Glycerol/PBS	

\*MABT washes: hourly over the day, around 8 x

### **Doubles:**

After colour precipitation wash 2x 5' in PBT

Stop AP reaction with Glycine buffer (15min) or PFA o/n

Wash 3x 5' in PBT, then 3X MABT 10 mins each

Block as before, incubate with 2ry AB (anti fitc), washes as before

For fast red use NTMT pH 8.0; solve 1 fast red tablet in 2-3 ml or use

BCIP/INT (pH9.5), gives an orange precipitation

wash and fix (7 $\mu$ l/ml)

note: for doubles, one RNA probe with dig, one with FITC; both into the hyb-buffer

### 9.3 Anleitung LNA-ISH (angelehnt an RNA-ISH):

Alle Waschschritte soweit nicht anders angegeben ca. 5-10 min, siehe RNA-ISH 8.2.

1. Fix embryos in fresh, cold 4% paraformaldehyde in PBS o/n at 4°C
2. Rinse embryos in PBS
3. Rinse embryos in PBT (PBS plus 1% Tween 20)
4. Dehydrate embryos in methanol (25%, 50%, 75%, 100%, 100%)
5. Cool embryos to -20°C o/n (or up to 10 days)
6. Rehydrate embryos in methanol (100%, 75%, 50%, 25%)
7. Rinse 2x in PBS/PBT
8. Transfer embryos to prehybridization solution (50% formamide, 5x SSC, 2% blocking powder, 0,1% Tween 20, 0,1% CHAPS, 50 µg/ml yeast RNA, 5 mM EDTA, 50 µg/ml heparin, DEPC water)
9. 2 hr in 24-well plates (1ml / well) in a shaking hybridization oven at a temperature between 21°C and 23°C below the reported melting temperature of the LNA
10. Add probe to 1 ml fresh prehyb buffer and hybridization occurs o/n at prehyb temperature (20-40 ng/ml)
11. After hybridization, transfer embryos to 6- or 12-well plates (containing 15- or 24 mm Netwell Inserts) in 2x SSC, 0,1% CHAPS prewarmed to hybridization temperature
12. Prewarm the wash solutions to hybridization temperature (crucial for maximum signal-to-background ratio)
13. Wash 3 x 20 min in the high salt wash
14. Wash 3 x 20 min in 0,2x SSC, 0,1% CHAPS
15. Rinse twice in KTBT (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM KCl, 1% Tween-20)
16. Transfer back to 24-well plates (to minimize volume for antibody step)
17. Pretreat embryos in 20% sheep serum in KTBT at 4°C for 2-3 hour or longer
18. Anti-DIG antibody binding (1 : 2000 – 1 : 4000) at 4°C on a nutator

19. Wash in KTBT in large Netwell Inserts at RT (min. 5 changes over 5 hr, often including at 4 °C o/n)
20. Back into 24-well plates in NTMT (two solution changes x 10 min; 100 mM NaCl, 100 mM Tris pH 9,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween-20)
21. Color reactions (NBT / BCIP in NTMT) for 1-6 hr RT on a nutator
22. Over night washing in KTBT (evtl. second or third color reaction)
23. Stop reactions with KTBT
24. Wash embryos in PBS
25. Dehydrate embryos in methanol (25%, 50%, 75%, 100%, 100%) to remove background
26. Rehydrate in methanol (100%, 75%, 50%, 25%)
27. Store embryos in PBS plus 0,1% sodium azide

<u>Pre-/Hyb buffer</u>	
50% Formamide	25ml
1.3 % SSC	12.5ml 20x SSC (pH 4.5 with citric acid)
5mM EDTA	0.5ml 0.5M EDTA pH 8
50µg/ml tRNA	250µg of 10mg/ml Stock (125µl also functions)
0.1% Tween 20	50µl Tween 20
0.1% CHAPS	0.5ml 5% CHAPS
100µg/ml Heparin	100µl of 50mg/ml stock
2% Blocking powder	1g BP
DEPC H <sub>2</sub> O	