

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer



**UNTERSUCHUNGEN ZU  
SIGNALZENTREN DER ACHSEN-BILDUNG  
WÄHREND DER GASTRULATION IM KANINCHEN**

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

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

von Jan Idkowiak  
geboren am 08.07.1977 in Wolfenbüttel

Betreuer: Prof. Dr. med. Christoph Viebahn

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Christoph Viebahn  
2. Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hollemann  
3. Prof. Dr. rer. nat. Martin Blum (Stuttgart)

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 21.09.2006

Datum der Verteidigung: 25.01.2007

**urn:nbn:de:gbv:3-000011640**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011640>]

***Meinen Eltern,  
die mich immer unterstützen***

## **KURZREFERAT:**

In der vorliegenden Arbeit sollten molekulare Signalzentren untersucht werden, die im Kaninchenembryo bei der Etablierung der Körperachsen und bei der Bildung des Mesoderms als dem ersten der drei Keimblätter während der Gastrulation beteiligt sind. Insbesondere sollte die Bedeutung des Hypoblasten, die ventrale Schicht der zweiblättrigen Keimscheibe, hinsichtlich seiner modulierenden Eigenschaften auf die Mesodermbildung im Epiblasten, der dorsalen Zellschicht, genauer untersucht werden. Als Modellorganismus wurde das Kaninchen aufgrund seiner in diesen Entwicklungsstadien für die experimentelle Analyse vorteilhaften Morphologie und einer etablierten Stadieneinteilung gewählt.

Im ersten Teil der Untersuchungen wurde ein Kulturmodell für Keimscheiben des Kaninchens entwickelt, in dem der Hypoblast von Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien *in toto* reseziert und die Genexpression des Mesodermmarkers *Brachyury* nach Inkubation *in vitro* ermittelt werden kann: Während das Gen in kultivierten, hypoblastresezierten Embryonen in Stadien bis 24 Stunden vor Beginn der Primitivstreifenbildung von prinzipiell allen Epiblastzellen exprimiert wurde, trat diese experimentelle *Brachyury*-Expression in späteren Stadien nur innerhalb eines posterioren Areals der Keimscheibe auf, das zwar der physiologischen Expressionsdomäne entsprach, jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe wesentlich verbreitert war. Im Hypoblasten existiert somit ein Signalzentrum, das hemmend auf mesoderminduzierende Faktoren wirkt, wobei der Epiblast nur in einem engen stadienspezifischen Zeitfenster reagiert.

Um die Natur der vom Hypoblasten ausgehenden Signale genauer zu untersuchen, wurden durch *in situ* Hybridisierungen an ganzen Keimscheiben unterschiedlicher Entwicklungsstadien mRNA-Expressionsmuster von Genen untersucht, die an diesen Musterungsprozessen beteiligt sind. Die Expression der Gap junction-Proteine Cx32 und Cx43 ist auf den Hypoblasten bzw. Epiblasten beschränkt und zeigt damit eine strenge konstitutive Trennung der interzellulären Kommunikation in der Keimscheibe auf; darüber hinaus bildet Cx32 schon in undifferenzierten Entwicklungsstadien im Hypoblasten eine anterior-posterior polarisierte Expressionsdomäne. Das Signalmolekül *Wnt3* und der nachgeschaltete Transkriptionsfaktor *Lef1* werden verstärkt in einem Areal exprimiert, in dem sich später der Primitivstreifen ausbildet;  *$\beta$ -Catenin*, das Wnt-Signale vom Zytoplasma in den Zellkern weiterleiten kann, wird erst zu Beginn der Primitivstreifenbildung verstärkt in Mesodermzellen exprimiert. Das Signalmolekül *Cerberus-related1*, ein Inhibitor Mesoderm induzierender Faktoren, zeigt zunächst eine dynamische Expression im anterioren Hypoblasten und findet sich später im anterioren Abschnitt des Primitivstreifens.

Die Kulturexperimente und die Genexpressionsanalysen definieren damit neue Signalzentren, die an der Etablierung der Körperachsen beteiligt sind, und bilden die Grundlage für ein hypothetisches Modell, das geeignet ist, die initiale Entwicklung der Achsenpolarität im Säugerembryo zu beschreiben.

**Idkowiak, Jan: Untersuchungen zu Signalzentren der Achsenbildung während der Gastrulation im Kaninchen.**

**Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2006**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	Aminosäure	kV	Kilovolt
ATP	Adenosintri-phosphat	nm	Nanometer
(A)VE	(anteriores) viszerales Endoderm	ORF	<i>open reading frame</i>
bidest.	bidestilliert	p.a.	pro analysis
bp	Basenpaare	PCR	Polymerasekettenreaktion
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>	PEG	Polyethylenglykol
BrdU	5-Brom-2-Desoxyuridin	PGE	Posteriore Gastrulaextension
cDNA	komplementäre DNA	RACE	<i>rapid amplifikation of cDNA ends</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat	RNA	Ribonukleinsäure
DIC	Differentialinterphasen- kontrast	RNase	Ribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid	rpm	Umdrehungen pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
dNTP	Desoxyribonukleotid- triphosphat	ssDNA	einzelsträngige DNA
<i>dpc</i>	dies post conceptionem	TGF	<i>transforming growth factor</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
E. coli	Escherichia coli	tRNA	<i>transfer RNA</i>
EMT	epithelio-mesenchymale Transformation	U	Weiss Units
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	UTR	<i>untranslated region</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>	UV	Ultraviolett
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalacto- pyranosid	VRB	Vorderer Randbogen
kB	Kilobase	(W)ISH	<i>(whole mount) in situ hybridisation</i>
kDa	Kilodalton	X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β- galactosid
mRNA	<i>messenger RNA</i>		

Abkürzungen für Nukleotidbasen:

A:	Adenosin	C:	Cytosin
T:	Thymin	G:	Guanin

Abkürzungen für Nukleotidbasenkombinationen:

K	[G, T]	M	[A, C]
R	[A, G]	S	[G, C]
W	[A, T]	Y	[C, T]
B	[G, T, C]	D	[G, A, T]
H	[A, C, T]	V	[G, A, C]
N	[A, G, C, T]		

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Gastrulationsformen verschiedener Wirbeltiere .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Krallenfrosch ( <i>Xenopus laevis</i> ) .....	2
1.1.2 Huhn ( <i>Gallus gallus</i> ) .....	3
1.1.3 Säuger (Mammalia) .....	4
<b>1.2 Molekulare Steuerung der Mesodermbildung .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Form und Funktion des Hypoblasten.....</b>	<b>7</b>
1.3.1 Morphologische und molekulare Polarisierung des Hypoblasten.....	7
1.3.2 Vertikale Musterungsvermittlung.....	8
<b>1.4 Fragestellung.....</b>	<b>10</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Verbrauchsmaterial .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Allgemeine Laborchemikalien .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Substanzen für die Molekularbiologie .....</b>	<b>11</b>
2.3.1 Substanzen für die <i>in situ</i> Hybridisierung .....	12
2.3.2 Puffer und Lösungen für <i>in situ</i> Hybridisierung .....	12
2.3.3 Primer.....	13
<b>2.4 Standardlösungen .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 Nährmedien und Zusätze .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Gewinnung von Embryonen und Gewebepräparationen.....</b>	<b>14</b>
<b>2.7 Flachkulturtechnik und <i>in vitro</i> Manipulation an Keimscheiben.....</b>	<b>15</b>
<b>2.8 Histologie.....</b>	<b>16</b>
2.8.1 Einbettung der Keimscheiben zur Aufsichtbetrachtung .....	16
2.8.2 Einbettung der Keimscheiben in Technovit® und Anfertigung von Semidünnschnitten .....	16
<b>2.9 Herstellung von cRNA-Sonden für <i>in situ</i> Hybridisierungen.....</b>	<b>17</b>
2.9.1 RNA-Präparationen.....	17
2.9.2 Reverse Transkription für cDNA-Synthese .....	18
2.9.3 Ableitung von degenerierten Primern .....	18
2.9.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Agarosegelelektrophorese.....	19
2.9.5 Verschachtelte PCR (Nested PCR) .....	20
2.9.6 PCR-Strategie zur Amplifizierung verschiedener Wnt-cDNAs .....	21
2.9.7 Ligation und Klonierung von cDNA-Fragmenten .....	21
2.9.8 <i>in vitro</i> Transkription zur cRNA-Synthese .....	22
<b>2.10 <i>in situ</i> Hybridisierung an ganzen Keimscheiben.....</b>	<b>22</b>

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Hypoblastresektionsexperimente</b>	<b>24</b>
3.1.1	Morphologische Entwicklung der Flachkulturen	24
3.1.2	Hypoblastresektion	25
3.1.3	<i>Brachyury</i> -Expression nach Hypoblastresektion im Stadium 1	25
3.1.4	<i>Brachyury</i> -Expression nach Hypoblastresektion im Stadium 2	27
3.1.5	<i>Brachyury</i> -Expression nach Hypoblastresektion im Stadium 3	28
<b>3.2</b>	<b>Isolierung, Charakterisierung und Expression von Connexin 32 (Cx32) und Connexin 43 (Cx43)</b>	<b>30</b>
3.2.1	cDNA und Aminosäuresequenzen	30
3.2.2	Expressionsmuster von <i>Connexin 32</i>	31
3.2.3	Expressionsmuster von <i>Connexin 43</i>	34
<b>3.3</b>	<b>Isolierung, Charakterisierung und Expression von <i>Wnt3</i>, <math>\beta</math>-Catenin und Lymphoid enhancer binding factor 1 (Lef1)</b>	<b>36</b>
3.3.1	Klonierung verschiedener Wnt-cDNAs	36
3.3.2	cDNA, Aminosäuresequenz und Expressionsmuster von <i>Wnt3</i>	36
3.3.3	cDNA, Aminosäuresequenz und Expressionsmuster von $\beta$ -Catenin	39
3.3.4	cDNA, Aminosäuresequenz und Expressionsmuster von <i>Lef1</i>	41
<b>3.4</b>	<b>Isolierung, Charakterisierung und Expression von <i>Cerberus-related1</i> (Cer1)</b>	<b>45</b>
3.4.1	cDNA, Aminosäuresequenz und Expressionsmuster	45
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodisches</b>	<b>48</b>
4.1.1	Modellorganismus	48
4.1.2	Flachkulturtechnik	49
4.1.3	cDNA-Gewinnung, <i>in situ</i> Hybridisierung und Histologie	51
<b>4.2</b>	<b>Hypoblastresektionen</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Sequenzanalysen und Expressionsmuster</b>	<b>55</b>
4.3.1	Sequenzanalysen von <i>Connexin 32</i> (Cx32) und <i>Connexin 43</i> (Cx43)	55
4.3.2	Expressionsmuster von <i>Connexin 32</i> (Cx32) und <i>Connexin 43</i> (Cx43)	57
4.3.3	Sequenzanalyse von <i>Wnt3</i>	58
4.3.4	Expressionsmuster von <i>Wnt 3</i>	59
4.3.5	Sequenzanalyse von $\beta$ -Catenin	61
4.3.6	Expressionsmuster von $\beta$ -Catenin	62
4.3.7	Sequenzanalyse von <i>Lymphoid enhancer binding factor 1</i> (Lef1)	63
4.3.8	Expressionsmuster von <i>Lymphoid enhancer binding factor 1</i> (Lef1)	64
4.3.9	Sequenzanalyse von <i>Cerberus-related-1</i> (Cer1)	65
4.3.10	Expressionsmuster von <i>Cerberus-related-1</i> (Cer1)	66
<b>4.4</b>	<b>Zusammenfassung: Signalzentren und Achsenbildung</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>THESEN</b>	<b>79</b>

# 1 EINLEITUNG

Jeder vielzellige Organismus ist aus einer einzigen Zelle hervorgegangen, der befruchteten Eizelle (Zygote). Diese enthält die gesamte Information für seine Entwicklung, die Embryogenese. Die Komplexität z.B. eines Wirbeltieres erfordert eine fein abgestimmte Koordination und Regulation von Entwicklungsprozessen wie Zellteilung, Formänderung, Zelldifferenzierung, Musterbildung und Wachstum. Diese Entwicklungsprozesse bis ins molekulare Detail aufzuklären, ist die Aufgabe der aktuellen entwicklungsbiologischen Forschung.

Die Interpretation der in der Zygote enthaltenen Entwicklungsinformationen erfolgt generativ: Sie enthält eher eine „Bauanleitung“ im Sinne eines Programms, das aus einer Abfolge von Entwicklungsschritten besteht. Der Sitz dieses Programms ist das Genom, zunächst der Zygote und schließlich der aus ihr hervorgegangenen Zellen, wobei die Aktivierung oder Inaktivierung bestimmter Gene Abläufe in Gang setzt, die zu tiefgreifenden Veränderungen führen. Bei zunehmender Komplexität des Organismus ist zwischen dem Entwicklungsprogramm des Embryos und einer Zelle oder Zellgruppe zu unterscheiden, wobei Zellen ein bestimmtes Entwicklungsschicksal einschlagen. Beispielsweise differenziert sich in der frühen Säugerentwicklung aus Zellen, die prinzipiell jedes Entwicklungsschicksal annehmen können („omnipotente“ Zellen), eine Subpopulation von Zellen, welche die Plazenta bildet. Dieses eigene Entwicklungsprogramm ergibt sich aus unterschiedlichen Genaktivitätsmustern, das aus Wechselwirkungen zwischen den Zellen hervorgerufen wird. Die Zellinteraktion findet auf unterschiedlichem Wege statt: (1) auf parakrinem Weg, (2) durch direkten Kontakt über Oberflächenmoleküle und (3) durch kanalvermittelte Kommunikation via Gap junctions.

Ein grundlegendes Konzept der Entwicklungsbiologie, das auf Zell-Zell-Interaktion beruht, ist die Induktion. Dabei beeinflusst ein Gewebe das Entwicklungsschicksal benachbarter Zellen. Der experimentelle Beweis dieses Konzeptes gelang Hans Spemann und Hilde Mangold (1924), die nach Verpflanzung eines kleinen Teils des Molchembryos im Wirtsembryo im Bereich des Transplantates die Ausbildung einer kompletten Körperachse beobachteten. Sie nannten den Bereich, aus dem das Transplantat entstammte, Organisator. Man vermutet bei der Entwicklung unterschiedlichster Strukturen während der Embryogenese Zellpopulationen, die ähnlich dem Organisator deren Ausbildung induzieren und als Signalzentren bezeichnet werden können.

Spemann und Mangold entnahmen das Organisatorgewebe aus Entwicklungsstadien, in denen sich der zukünftige Aufbau des Organismus, insbesondere die Ausbildung der Körperachsen und die Anlage der Organe, bereits abzeichnet. Die Phase, in der diese Prozesse stattfinden, wird als Gastrulation bezeichnet. Während der Gastrulation wandern die Zellen an vorbestimmte Abschnitte des Embryos, verlassen zum Teil einen dichten Zellverband und nehmen dabei grundlegend neue Formen an. Dass sich durch diese Zellbewegungen auch die äußere Gestalt des Embryos dramatisch ändert, hat schon der deutsche Arzt und Naturforscher Ernst Haeckel (1843-1919) beschrieben und prägte damit den Begriff der Gastrulation. Bei vergleichenden anatomischen Untersuchungen verschiedener Invertebraten (u.a. Kalkschwämme, Seeigel und Lanzettfische) fand er ein einfach strukturiertes Stadium in Form einer hohlen Kugel. In der Erwartung, dass damit die Entwicklung der Darmanlage vorgezeichnet war, bezeichnete er

dieses Stadium in Anlehnung an den griechischen Begriff für Magen als *Gastrea* (Haeckel 1872; 1874). In Folge der evolutionären Anpassung verschiedener Spezies hat schon Haeckel bedeutende Unterschiede nachgewiesen, die Grundmuster der Gastrulation sind jedoch bis zu einem gewissen Grad bei allen Metazoa („Gewebetiere“) ähnlich. Als gemeinsames Element der Gastrulation lassen sich drei Hauptziele in dieser frühen Entwicklungsphase unterscheiden:

(1) Durch Bildung der drei Keimblätter Mesoderm, Endoderm und Ektoderm wird das interne Milieu des Embryos geschaffen.

(2) Nahezu gleichzeitig werden zu der bereits etablierten dorso-ventralen (Rücken-Bauch) Achse die weiteren Körperachsen des Embryos festgelegt, wobei sich eine antero-posteriore (Kopf-Schwanz) und daraus resultierend eine Rechts-links-Achse ausbildet.

(3) Entlang dieser neuen Körperachsen wird der zukünftige Körperbauplan sichtbar an den ersten, z.T. vorläufigen Organanlagen (wie zum Beispiel die Rückensaite, die *Chorda dorsalis*) festgelegt.

## 1.1 Gastrulationsformen verschiedener Wirbeltiere

Die Erforschung entwicklungsbiologischer Vorgänge erfordert geeignete Modellorganismen. Für die Embryogenese des Wirbeltieres sind die etablierten Spezies hauptsächlich der Zebrafärbung *Brachydanio rerio*, der Krallenfrosch *Xenopus laevis*, das Huhn *Gallus gallus* und die Maus *Mus musculus*. Hinter den morphologischen Veränderungen, die man bei anatomischen Betrachtungen unterschiedlicher Tierarten während der Gastrulation fand, konnten als einer der Grundmechanismen Zellwanderungsbewegungen entdeckt werden, die bisher im Krallenfrosch und im Huhn am umfassendsten verstanden werden.

### 1.1.1 Krallenfrosch (*Xenopus laevis*)

Zu Beginn der Gastrulation besteht der Froschembryo, der in diesem Stadium nach Abschluß der Furchungsteilungen als „Blastula“ bezeichnet wird, aus mehreren tausend Zellen und besitzt die Form einer Kugel, deren Durchmesser von etwa 2 mm sich nicht wesentlich vom unbefruchteten Ei unterscheidet (s. Abb. 1 A). Es lässt sich ein dunkelpigmentierter animaler Pol von einem blassen dotterreichen vegetativen Pol unterscheiden, die sich etwa in der Äquatorialebene des Embryos voneinander abgrenzen. In der späten Blastula befinden sich die Zellen, die das spätere Ektoderm bilden, am animalen Pol und grenzen an eine flüssigkeitsgefüllte Höhle (Blastocoel; s. Abb. 1 A). Zellen des zukünftigen Mesoderms befinden sich in der Äquatorialebene (also an Randbereichen des Ektoderms), die deshalb auch als Marginalzone bezeichnet wird. Zellen, die sich zu Endoderm differenzieren werden, bilden dabei die äußerste Schicht der Marginalzone und bedecken die zukünftigen Mesodermzellen. Die Gastrulation beginnt jedoch mit der Bildung von Mesodermzellen: An einer Stelle der Dorsalseite der Blastula, zwischen Marginalzone und vegetativem Pol, bildet sich zunächst eine kleine Delle oder Furche, die als Urmund oder Blastoporus bezeichnet wird. Die Zellen dieser Region spielen eine bedeutende Rolle bei der Organisation des Gastrulationsgeschehens. Die äußeren Zellen der Marginalzone wandern um den Urmund herum in das Innere des Embryos ein (Involution). Als Resultat der Involution entstehen zunächst Mesoderm- und anschließend Endodermzellen. Diese konvergieren unter der Ektodermschicht und dehnen sich aus, während das Ektoderm sich ebenfalls ausbreitet und nach und



nach die Kappe des dotterreichen vegetativen Pols überdeckt (Epibolie) (s. Abb. 1 A). Das Resultat dieser komplexen morphogenetischen Prozesse ist die Entstehung eines dreischichtigen Embryos mit einer äußeren Ektoderm-, einer mittleren Mesoderm- und einer inneren Endodermis. Als Fortsetzung des Urmundes bildet sich zwischen zwei Endodermblättern der Urdarm (Archenteron). Der Urmund selber wird sich später zum Anus entwickeln, und so wird im Embryo mit der Bildung des Blastoporus die antero-posteriore Achse festgelegt.

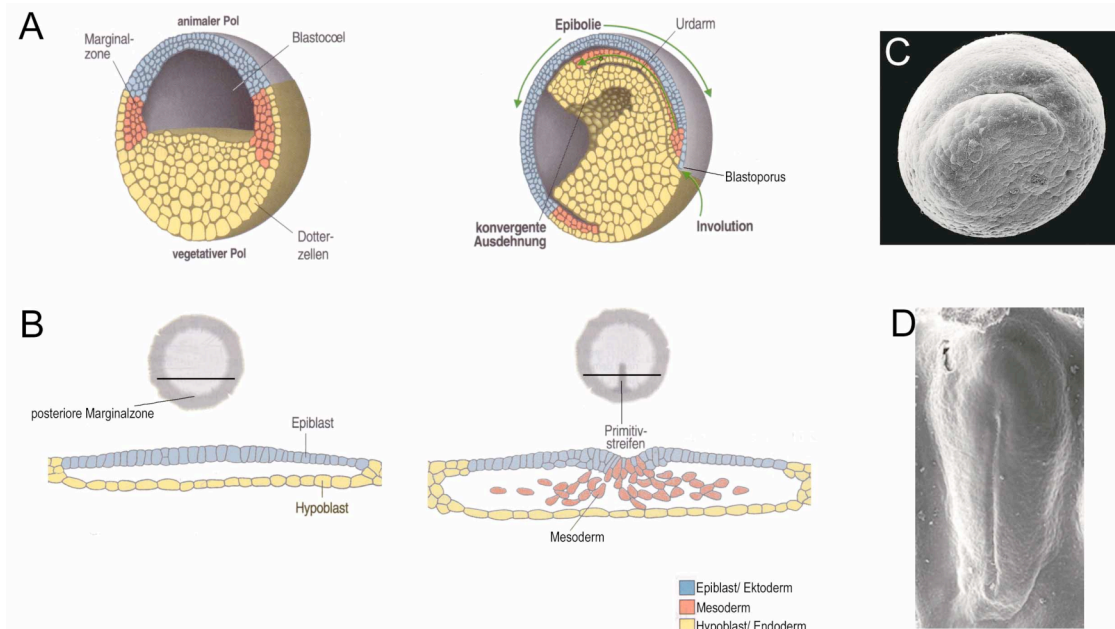


Abb. 1: Schematische Darstellung des Froschembryos (A) und der Keimscheibe des Huhnes (B) unmittelbar vor (links) und zu Beginn (rechts) der Gastrulation. (C) und (D) zeigen eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Frosch- (C) und Hühnerembryos (D) in Gastrulationsstadien. (A) und (B) entnommen aus: Lewis Wolpert, *Entwicklungsbiologie*, Spektrum Verlag, Heidelberg, 1999; (C) aus Bard, 1995; (D) aus Böttger, 1997.

### 1.1.2 Huhn (*Gallus gallus*)

Der Hühnerembryo besitzt zum Zeitpunkt der Gastrulation eine zum Frosch vergleichsweise einfache Morphologie in Form einer Keimscheibe. Sie liegt als mit dem bloßen Auge erkennbarer, wenige Millimeter großer Fleck der großen Dottermasse des Hühnereies auf. Die Keimscheibe ist zunächst kreisrund, zweischichtig und besteht kurz vor der Gastrulation aus ca. 60.000 durch Furchungsteilungen entstandenen Epiblastzellen, welche die obere der beiden Zellschichten bilden. Der darunter liegende Hypoblast ist in Stadien vor Beginn der Gastrulation aus einwandernden Epiblastzellen hervorgegangen, wobei sich zunächst ein primärer Hypoblast ausbildet. Dieser wird vom sekundären Hypoblasten, der von posterior gelegenen Epiblastzellen der sogenannten posterioren Marginalzone entstammt, nach anterior verdrängt. Ebenfalls ausgehend vom posterioren Pol des Embryos und unter dem steuernden Einfluss der posterioren Marginalzone entsteht zu Beginn der Gastrulation der Primitivstreifen. Der Primitivstreifen ist Ausdruck einer lokal erhöhten Zelldichte als Folge von Proliferation und Wanderungsbewegungen von Epiblastzellen. Medial gelegene Epiblastzellen des Primitivstreifens befinden sich in einem Transformationsprozess, der auch als epithelio-mesenchymale Transformation (EMT) bezeichnet wird: Epiblastzellen, die einen geordneten epithelialen Zellverband bilden, runden sich basalwärts ab und verjüngen ihr apikales Zellkompartiment, wodurch sie (ähnlich der Mesodermbildung des Frosches) eine Flaschenform

ausbilden (s. Abb. 1 B). Diese Zellen durchbrechen die Basalmembran des Epiblasten und wandern als Mesodermzellen zwischen Epiblast und Hypoblast ein. Hat der Primitivstreifen seine längste Ausdehnung erreicht, bildet sich an seiner anterioren Spitze als Ausdruck einer lokalen Zellverdichtung der sogenannte Primitivknoten oder Hensensche Knoten (Hensen 1876). Die Zellen des Primitivknotens haben eine wichtige Funktion bei der Organisation weiterer Entwicklungsprozesse wie z.B. der Neurulation und sind den Zellen der dorsalen Urmundlippe der Amphibien äquivalent (Stern 2000). Als zweites Keimblatt bildet sich das definitive Endoderm, das sich aus Epiblastzellen der Primitivknotenregion entwickelt und den Hypoblasten nach lateral verdrängt. Die zurückbleibenden Epiblastzellen differenzieren sich schließlich zu Ektodermzellen.

### **1.1.3 Säuger (Mammalia)**

Wie die meisten Säugerspezies besitzt der menschliche Embryo zu Beginn der Gastrulation eine plane Morphologie in Form einer Keimscheibe und ähnelt in mancher Hinsicht dem Hühnerembryo. Die Entwicklung der Keimscheibe im Säuger unterscheidet sich jedoch zu der des Huhnes. Die Eutheria als zahlenmäßig überragende Gruppe der Säugetiere bilden eine Plazenta zur Ernährung des Embryos und sind nicht auf ein Dotterreservoir angewiesen, weshalb die Größe des „Eies“ um etwa 60.000fach kleiner ist. Nach den ersten sechs bis sieben Zellteilungen der befruchteten Eizelle erreicht der menschliche Embryo etwa am fünften Tag nach der Befruchtung das sogenannte Blastozystenstadium, welches der Blastula der Amphibien entspricht. Die Blastozyste ist eine flüssigkeitsgefüllte Kugel, in der sich zwei Zellpopulationen unterscheiden lassen: Der Trophoblast, welcher die Blastozystenwand bildet, und die innere Zellmasse, die als prominente Zellverdichtung dem Trophoblasten anhaftet. Aus der inneren Zellmasse entwickeln sich zu Beginn der zweiten Woche nach der Befruchtung die beiden Gewebeschichten der Keimscheibe, die wie im Huhn als Epiblast (äußere Zellschicht) und Hypoblast (innere Zellschicht) bezeichnet werden. Im Gegensatz zum Huhn geht der Hypoblast jedoch aus jenen Zellen der inneren Zellmasse hervor, die an die Blastozystenhöhle grenzen und entwickelt sich nicht aus Epiblastzellen. Weitere Gemeinsamkeiten mit der Entwicklung des Huhnes zeigen sich zu Beginn der Gastrulation in der dritten Entwicklungswoche: Im posterioren Teil der menschlichen Keimscheibe bildet sich der Primitivstreifen als Ausdruck der EMT von Epiblastzellen. Die sich bildenden Mesodermzellen wandern dabei ebenso zwischen Epiblast und Hypoblast ein und bilden das erste der drei Keimblätter.

Zwischen Embryonen des Menschen und des Kaninchens finden sich Ähnlichkeiten sowohl hinsichtlich der Entwicklung der embryonalen und extraembryonalen Gewebe als auch der Morphologie der Keimscheibe während der Gastrulation (Viebahn 1999). Wegen der planen Morphologie, der späten Implantation der Blastozysten in die Gebärmutterschleimhaut und der damit verbundenen einfachen Gewinnung eignet sich das Kaninchen gut zur Untersuchung der Gastrulation im Säuger (vgl. z.B.: Kölliker 1882; Viebahn et al. 1995a; Weisheit 2002; Viebahn et al. 2002). Eine auf morphologischen Merkmalen gegründete Stadieneinteilung der frühen Gastrulationsphase (Viebahn 2004), ermöglicht die Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

Keimscheiben des Kaninchens bilden in der Aufsichtsbetrachtung vor der Bildung des Primitivstreifens transiente Strukturen, die sich mittels einer Osmiumfixierung (OsO<sub>4</sub>; Viebahn 1995) besonders gut darstellen lassen (s. Abb. 2).

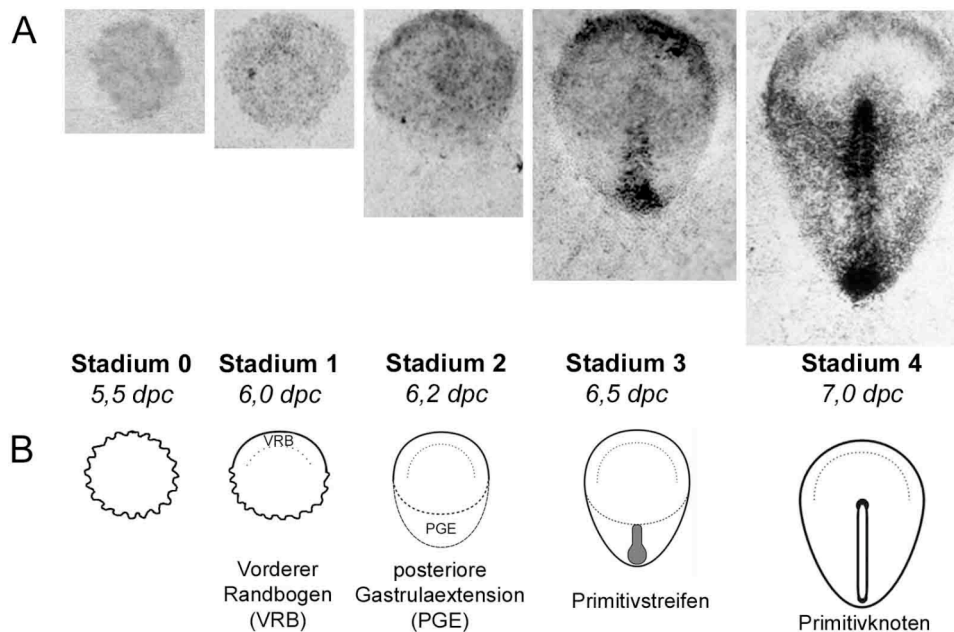


Abb. 2: (A) Dorsale Aufsichten OsO<sub>4</sub>-fixierter Kaninchenkeimscheiben der Stadien 0 bis 4 und (B) schematische Darstellung der entsprechenden Stadien. Stadium 1 ist durch den Vorderen Randbogen (VRB), Stadium 2 durch die Posteriore Gastrulaextension (PGE), Stadium 3 durch den Primitivstreifen und Stadium 4 durch den Primitivknoten gekennzeichnet. Unter den Stadien ist das durchschnittliche Entwicklungsalter in Tagen nach der Befruchtung angegeben (*dies post conceptionem*, dpc).

Wie bei allen Säugerembryonen ist die Keimscheibe des Kaninchens zunächst zweischichtig, bestehend aus einer oberen Epiblast- und einer unteren Hypoblastschicht. Der Rand der Keimscheibe ist im Stadium 0 unregelmäßig mit dem extraembryonalen Gewebe verzahnt und zeigt keine Polarisierung. Im geometrischen Sinne ist der Embryo punktsymmetrisch. Als erstes Zeichen einer anterior-posterioren Differenzierung bildet sich der Vordere Randbogen (VRB) mit einem Entwicklungsalter von etwa sechs Tagen nach der Befruchtung (*dies post conceptionem*, dpc): ein Abschnitt des Keimscheibenrandes, glättet sich und zeichnet sich scharf vom extraembryonalen Gewebe ab. Der VRB liegt dem sich später ausbildenden Primitivstreifen gegenüber und charakterisiert das Stadium 1. Wenige Stunden vor der Primitivstreifenbildung entwickelt sich etwa 6,2 dpc die sogenannte Posteriore Gastrulaextension (PGE) und definiert das Stadium 2. Die PGE ist Ausdruck einer Elongation der Keimscheibe; sie ist in der Aufsichtsbetrachtung als sichelförmiger Bereich mit geringerer Zelldichte als in anterioren Regionen des Embryos charakterisiert. Aufgrund der Position des VRB und der PGE ist es möglich, eine axiale Orientierung noch vor der Primitivstreifenbildung als erstes definitives Zeichen der antero-posterioren Achse vorzunehmen. Im Stadium 3 bildet sich der Primitivstreifen etwa 6,5 dpc innerhalb der PGE. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der EMT im Kaninchen zeigen Ähnlichkeiten im Vergleich zu Frosch und Huhn: Nach einer initialen Phase der apikalen Verjüngung von Epiblastzellen mit Ausbildung einer Flaschenform verlassen die Zellen in einer zweiten Phase den epithelialen Verband des Epiblasten und durchbrechen die Basalmembran, um schließlich als Mesodermzellen in den Raum zwischen Epi- und Hypoblast

einzuwandern (Viebahn 1995). Auf zellulärer Ebene ist die Mesodermentstehung im Rahmen der EMT ein gemeinsames und konserviertes Element der Gastrulation von Amphibien bis zum Säuger. Nach der vollen Ausdehnung des Primitivstreifens bildet sich im Stadium 4 an dessen vorderer Spitze der Primitivknoten, der von seinem Entdecker Victor Hensen im Kaninchen beschrieben wurde (Hensen 1876).

## 1.2 Molekulare Steuerung der Mesodermbildung

Das Mesoderm bildet das mittlere der drei Keimblätter. Aus ihm differenzieren sich eine Vielzahl von Geweben wie Muskulatur, Blutzellen und Dermis. Da sich das Mesoderm als erstes der drei Keimblätter bildet, steht die Mesodermentwicklung am Anfang des eigentlichen Gastrulationsprozesses.

Auf molekularer Ebene fanden sich zunächst sezernierte Signalmoleküle der Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-Superfamilie (Slack et al. 1987) und des Fibroblast-Growth-Factor (FGF) (Rosa et al. 1988) als Kandidaten der Mesoderminduktion. Ein weiterer Signalweg der Mesodermbildung ist der kanonische Wnt-Signalweg, der über  $\beta$ -Catenin die Informationen vom Zytoplasma in den Zellkern weiterleitet.  $\beta$ -Catenin, bekannt als Komponente des Zytoskeletts, fungiert zusätzlich als Botenstoff und diffundiert in den Zellkern, um Transkriptionsfaktoren zu aktivieren (Moon et al. 2004). Im Frosch regulieren Wnt-Signale nur in Synergie mit anderen Botenstoffen die Formation des Organisators, sind jedoch allein nicht in der Lage, Mesoderm zu induzieren (Christian et al. 1992). Nach heutigem Erkenntnisstand sind somit die induzierenden Faktoren der Mesodermentwicklung in allen Vertebraten Moleküle der Wnt-, TGF $\beta$ - und FGF-Familie, die in unterschiedlichen Bereichen der Blastula exprimiert werden und synergistisch Mesodermzellen induzieren und spezifizieren.

TGF $\beta$ -Signalproteine der Nodal-Subfamilie, die im Frosch Xnrs (Xenopus nodal related proteins) genannt werden, nehmen eine Schlüsselposition ein: Xnrs werden in dorsalen (posterioren) Bereichen der vegetativen Hälfte der Xenopusblastula vermehrt exprimiert. Ein Xnrs-Gradient wird durch ein Zusammenspiel des maternal in der vegetativen Hälfte exprimierten Transkriptionsfaktors *VegT* und des dorsal lokalisierten  $\beta$ -Catenins aktiviert (Agius et al. 2000; Hyde und Old 2000). Das induzierte Mesoderm erhält in Folge dieser Gradienten eine Polarisierung in dorso-ventraler Richtung: dorsal exprimiertes  *$\beta$ -Catenin* aktiviert neben Xnrs weitere Gene wie den Homeoboxtranskriptionsfaktor *siamois*, der mit Xnrs die Ausbildung des Organisators am dorsalen Pol des Embryos induziert. FGFs spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von Mesodermzellpopulationen. Sie regulieren die weitere Expression von mesodermspezifischen Genen wie z.B. *Brachyury* (Amaya et al. 1993; Northrop und Kimelman 1994) und sind wichtig für die terminale Spezialisierung von Mesodermzellen z.B. in Muskelzellen (Standley et al. 2001).

Obwohl die Bedeutung des Organisators während der Gastrulation seit den Transplantationsexperimenten von Spemann und Mangold (1924) bekannt war, forschte man über 70 Jahre nach dem „Organisatormolekül“. Schließlich fand man in den Organisatorzellen neben Transkriptionsfaktoren wie z.B. dem Homeoboxgen *gooseoid* (Cho et al. 1991) Signalmoleküle, die Wachstumsfaktoren unter anderem der Mesodermkaskade antagonisieren. Zu diesen

Faktoren gehören z.B. die TGF $\beta$ -Antagonisten Chordin und Noggin (Piccolo et al. 1996; Zimmerman et al. 1996), die Wnt-Antagonisten Dickkopf1 (Glinka et al. 1998) und Moleküle der „secreted frizzled-related-proteins“ (sFRPs) (Pera und De Robertis 2000) sowie den Antagonisten Cerberus, der gleichzeitig Xnr-, BMP4- und Wnt8-Signale inhibiert (Piccolo et al. 1999). Durch die Injektion von Cerberus mRNA in Froschembryonen werden sekundäre Kopfanlagen induziert und die Mesodermbildung in Rumpf- und Schwanzbereichen supprimiert (Bouwmeester et al. 1996; Belo et al. 1997; Biben et al. 1998).

Im Huhn spielt bei der Mesoderminduktion wie im Frosch das TGF $\beta$ -Molekül Nodal eine zentrale Rolle, da es in der prospektiven Primitivstreifenregion exprimiert wird (Lawson et al. 2001) und TGF $\beta$ -Moleküle Mesodermzellen induzieren können (Mitrani et al. 1990). Die initiale Expression von cNodal (chick Nodal) in der posterioren Marginalzone (s. Abb. 1 B) steht unter der synergistischen Kontrolle des TGF $\beta$ -Faktors Vg1 und Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalen: Vg1 wird zeitlich vor cNodal in der posterioren Region der Keimscheibe exprimiert (Seleiro et al. 1996), während sich cWnt8c Expression entlang des gesamten Keimscheibenrandes in Epiblastzellen findet (Skromne und Stern 2001). Wenn Vg1 innerhalb der cWnt8c Domäne misexprimiert wird, kommt es zur Bildung eines ektopen Primitivstreifens (Skromne und Stern 2001).

Eine wichtige Funktion übernimmt im Säuger ebenfalls Nodal, das in der Maus entdeckt wurde (Zhou et al. 1993): homozygote *Nodal*<sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse entwickeln keinen Primitivstreifen und nur wenige Mesodermzellen (Conlon et al. 1994). Ein weiteres Schlüsselgen der Mesoderminduktion im Säuger ist *Wnt3*: Die Knockout-Maus bildet kein Mesoderm und exprimiert kein *Nodal*, weshalb *Wnt3* zur Initiation und Aufrechterhaltung der *Nodal*-Expression während der Primitivstreifenbildung benötigt wird (Liu et al. 1999). Auch die Überexpression eines Wnt-Moleküls des Huhns (cWnt8c) führt zur Bildung von ektopen Primitivstreifen in der Maus (Popperl et al. 1997). Ferner vermutet man Signale aus extraembryonalen Geweben, die zeitlich vor Nodal in der Mesodermkaskade wirken (Lu et al. 2001). Anders als im Frosch und im Huhn werden die sogenannten Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), eine Subfamilie der TGF $\beta$ -Moleküle, im Säuger zur Mesoderminduktion benötigt und könnten die *Nodal* Expression induzieren: *BMP4* wird extraembryonal exprimiert (Lawson et al. 1999); die *BMP4*<sup>-/-</sup> Knockout-Maus zeigt keine Expression des Mesodermmarkers *Brachyury* und bildet nur wenige Mesodermzellen (Winnier et al. 1995). Allerdings konnten bislang keine direkten Zielgene von BMP4 gefunden werden.

### 1.3 Form und Funktion des Hypoblasten

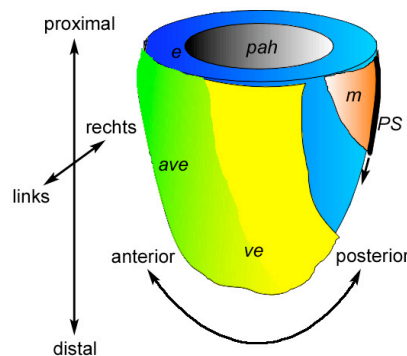
Untersuchungen im Säuger und im Huhn zeigen, dass der Hypoblast eine wichtige Rolle bei der Achsenbildung und Initiierung des Gastrulationsprozesses spielt (Beddington und Robertson 1999; Foley et al. 2000). Der Hypoblast des Säugers differenziert sich nicht zu den definitiven Organen des Organismus; er zählt zu den extraembryonalen Geweben (Gardner und Rossant 1979), wurde jedoch vor Gardners Experimenten als Vorläufer des Endoderms angesehen.

#### 1.3.1 Morphologische und molekulare Polarisierung des Hypoblasten

Der Hypoblast besitzt eine frühe morphologische Differenzierung, während der Epiblast noch morphologisch undifferenziert erscheint. Eine frühe axiale Differenzierung des Säugerembryos ist schon vor über 100 Jahren beobachtet worden. Der als erstes Zeichen einer Körperachse schon

erwähnte Vordere Randbogen (VRB; s. Abb. 2) ist im Kaninchen ursprünglich von Albert Kölliker (1847-1903) beschrieben worden (Kölliker 1882). Im Kaninchen wurde der VRB noch vor der Primitivstreifenbildung nachgewiesen (Rabl 1915). Eine vergleichende, phylogenetische Untersuchung des VRB in den unterschiedlichen Spezies ergab, dass sowohl Epiblast als auch Hypoblast eine anteriore Differenzierung zeigen, die morphologischen Charakteristika des Hypoblasten jedoch den prominentesten Bestandteil des VRB ausmachen (Viebahn 1999).

Im Mausembryo zeigte sich eine molekulare Differenzierung von Zellen, die sich innerhalb eines umschriebenen Bereiches des Hypoblasten (auch als „viszerales Endoderm, VE“ bezeichnet) befinden (Rosenquist und Martin 1995). Der Mausembryo dieser Stadien ist im Vergleich zur säugertypischen Keimscheibe im Zentrum stark nach ventral vorgewölbt und bildet so eine Becherform: Der Epiblast kleidet dabei das Innere des Bechers aus, während das VE den Becher von außen bedeckt (s. Abb. 3). Dieser sogenannte „Eizylinder“ erhält dadurch neben der dorso-ventralen Achse eine proximal-distale Achse, wobei sich der Boden des Bechers distal und der Rand proximal befindet (s. Abb. 3). Eine distal gelegene Zellpopulation des VE unterscheidet sich etwa 12 Stunden vor der Primitivstreifenbildung molekular von Zellen des übrigen VE und exprimiert Transkriptionsfaktoren wie *Otx2* (Ang et al. 1994), *Hesx1* (Thomas und Beddington 1996), *Hex* (Thomas et al. 1998) oder das Signalmolekül *Cerberus-related-1* (Belo et al. 1997). Diese Zellen wandern an einer Seite des Eizylinders nach proximal, und zwar der Seite gegenüber liegend, an der sich in der weiteren Entwicklung der Primitivstreifen ausbilden wird (Thomas et al. 1998). Aufgrund dieser frühen molekularen Differenzierung und seiner Lage im zukünftigen anterioren Bereich des Embryos wurde diese Subpopulation des VE als anteriores VE (AVE) bezeichnet (s. Abb. 3).



**Abb. 3:** Schematische Zeichnung des Mausembryos zu Beginn der Gastrulation (etwa 6,5 *dpc*). Der Embryo hat eine becherförmige Morphologie, wobei sich der Epiblast (blau) innen und das viszerale Endoderm (VE, gelb) außen befindet. Am posterioren Pol entwickelt sich der Primitivstreifen (PS) und weitet sich nach distal aus (schwarzer Pfeil). Mesoderm (rot) breitet sich zwischen Epiblast- und Hypoblastschicht aus. Neben den Hauptkörperachsen besitzt der Embryo eine distal-proximale Achse, welche die Orientierung des Eizylinders beschreibt. E: Epiblast; ve: viszerales endoderm; ave: anteriores viszerales Endoderm; pah: präamniotische Höhle. Zur Illustration ist das viszerale Endoderm am posterioren Pol schematisch aufgerissen.

### 1.3.2 Vertikale Musterungsvermittlung

Nach der polarisierten Genexpression im Hypoblasten werden im darüberliegenden Epiblasten Musterungsprozesse ausgelöst (vertikale Musterungsvermittlung); Folge ist die Polarisierung des Embryos selbst und der Beginn der Gastrulation im engeren Sinne (Thomas und Beddington 1996; Rhinn et al. 1998; Knoetgen et al. 1999; Perea-Gomez et al. 2001b).

Der Transkriptionsfaktor *Hesx1* (Syn.: ANF für Anterior Neural Fold), ein Marker für anteriore Hirnstrukturen, wird vor der Gastrulation zunächst im AVE und wenige Stunden später im Epiblasten exprimiert (Thomas und Beddington 1996; Weisheit 2002). Mikrochirurgisches Abtragen des AVE in diesen Stadien führt zu einer Reduktion der *Hesx1*-Expression in prospektiven Vorderhirngeweben und zur Ausbildung einer kleineren Neuralplatte (Thomas und Beddington 1996). Umgekehrt induziert der anteriore Hypoblast des Kaninchens nach Transplantation in einen Hühnerembryo die Expression von Vorderhirnmarkern wie *Hesx1* und *Sox3* im Epiblasten und im Trophoblasten (Knoetgen et al. 1999). *Brachyury*, ein Transkriptionsfaktor und Marker für Mesodermvorläuferzellen (Papaioannou und Silver 1998), wird zunächst im gesamten proximalen Epiblasten des Eizylinders exprimiert und verlagert sich während der Ausbildung des AVE in den posterioren Teil des Eizylinders, in dem sich der Primitivstreifen entwickelt (Wilkinson et al. 1990). Als Ursache dieser Verlagerung der *Brachyury* Expression in die prospektive Primitivstreifenregion wurden nach posterior gerichtete Zellwanderungen im proximalen Epiblasten beobachtet (Lawson et al. 1991; Beddington und Robertson 1999). Eine Kultivierung von Epiblastexplantaten von Mausembryonen vor und zu Beginn der Gastrulation, denen das gesamte VE entfernt wurde, führte zu einer starken Expression von *Brachyury* im gesamten Epiblasten. Durch eine Kokultivierung mit dem AVE wurde die *Brachyury*-Expression im Epiblasten unterdrückt (Kimura et al. 2000; Perea-Gomez et al. 2001b).

Als Kandidaten für die Vermittlung von Signalen der vertikalen Musterungsvermittlung wurden Signalproteine identifiziert, die auch im AVE exprimiert werden. Zu ihnen zählen die TGF $\beta$ -Antagonisten Cerberus-related-1 (*Cer1*) und *Lefty1* sowie der Wnt-Antagonist Dickkopf1 (*Dkk1*). *Cer1* gehört zur Can-Familie sezernierter Glykoproteine (Pearce et al. 1999) und zeigt Verwandtschaft zum *Xenopus*-Protein Cerberus. Während Cerberus im Frosch gleichzeitig BMP-, Wnt- und Nodal-Signale inhibiert und ektope Kopfanlagen induziert (Bouwmeester et al. 1996; Belo et al. 1997; Biben et al. 1998), ist das Mausehomolog *Cer1* nicht in der Lage, die Wirkung von Cerberus zu imitieren und inhibiert in der Maus nur Nodal- und BMP-Proteine (Belo et al. 2000). Ferner zeigt die Knockout-Maus von *Cer1* einen völlig unauffälligen Phänotypen (Belo et al. 2000; Shawlot et al. 2000). Durch die *Cer1*<sup>-/-</sup>;*Lefty1*<sup>-/-</sup>-Doppelmutante konnte gezeigt werden, dass beide TGF $\beta$ -Antagonisten synergistisch wirken und im Epiblasten mesoderminduzierende Nodal-Signale in anterioren Bereichen des Embryos inhibieren (Perea-Gomez et al. 2002): Neben vergrößerten und ektop lokalisierten zusätzlichen Primitivstreifen wurden *Brachyury* und *Nodal* sowie die Nodal-Zielgene *gooseoid* und *Hex* in breiteren Domänen exprimiert.

Somit hemmt das AVE in anterioren Bereichen des Embryos „posteriorisierende“ Signale des Epiblasten und beschränkt deren Expression auf posteriore Abschnitte. Da Wnt-Signale in die Primitivstreifenbildung eingebunden sind (Liu et al. 1999), spielt der Wnt-Inhibitor *Dkk1* aufgrund seiner Expression im AVE ebenfalls eine mögliche Rolle bei der Steuerung der Mesodermbildung. Im Frosch induziert Dickkopf die Anlage sekundärer Kopfstrukturen und inhibiert Wnt- und BMP-Moleküle (Glinka et al. 1998). Obwohl *Dkk1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse keine Hirnstrukturen rostral des Mittelhirns ausbilden, zeigten Untersuchungen an Chimären, dass *Dkk1* im Epiblasten und nicht im AVE für die Kopfinduktion in der Maus benötigt wird (Mukhopadhyay et al. 2001).

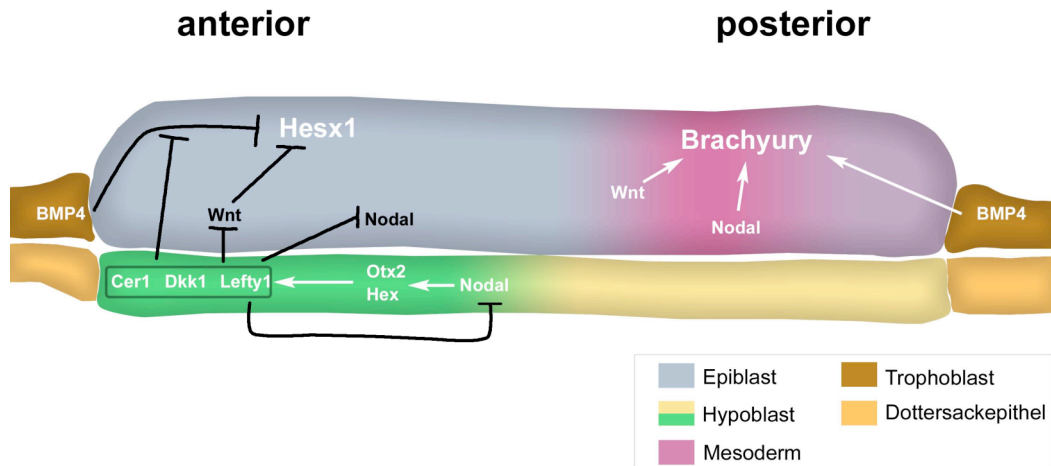


Abb. 4: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen, die im Säuger zur posterioren Induktion von mesodermspezifischen Genen führen. Das Schema zeigt exemplarisch für die Säugermorphologie einen medialen sagittalen Schnitt durch eine Keimscheibe (anterior: links; posterior: rechts). Im anterioren Hypoblasten exprimierte antagonistische Signalmoleküle (Cer1, Dkk1 und Lefty1) inhibieren die mesoderminduzierende Wirkung von Wnt-, BMP- und Nodal-Molekülen. Der fehlende hemmende Einfluss dieser Moleküle führt anterior zur Expression von Vorderhirnmarkern wie *Hesx1* während posterior das Zielgen der Mesodermkaskade *Brachyury* exprimiert wird. Nach Beddington und Robertson, 1999.

## 1.4 Fragestellung

Offensichtlich zeigen die vorgestellten Modellorganismen hinsichtlich der für die Gastrulation wesentlichen Musterungsprozesse mehr Gemeinsamkeiten als Unterschiede. Bei den Säugern ist die genaue Topographie der Expression und des Zusammenspiels der bekannten Moleküle, insbesondere bei den Prozessen, welche der Primitivstreifenbildung vorausgehen, aufgrund der komplexen Morphologie des Eizylinders der Maus, die in der entwicklungsbiologischen Forschung derzeit die dominierende Rolle einnimmt, weitgehend unbekannt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte deshalb in Keimscheiben des Kaninchens, einem möglicherweise für die Gastrulationsphase eher repräsentativen Modellorganismus, anhand von Hypoblastresektionsexperimenten untersucht werden, ob der inhibierende Einfluss des Hypoblasten auf die Mesodermbildung von der Maus *in vitro* reproduziert und inwieweit dieser Einfluss abhängig vom Entwicklungsstadium des Embryos beobachtet werden kann.

Im zweiten Teil sollte die topographische Verteilung der Expressionen verschiedener Gene untersucht werden, die an der Vermittlung dieser inhibierenden Wirkung oder der vertikalen Musterungsvermittlung beteiligt sind. Zusammen mit den durchgeführten Hypoblastresektions-Experimenten könnten dadurch neue Kompartimente der Keimscheibe aufgedeckt werden, die im Sinne von Signalzentren eine entscheidende Rolle bei der Achsenbildung und Mesodermentstehung während der Gastrulation spielen.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertationsschrift wurden im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zum Teil auch im Anatomischen Institut der Universität Bonn und im Zentrum Anatomie (Abteilung Anatomie und Embryologie) der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

Folgende Verbrauchsmaterialien, Versuchsprotokolle und Gewebeproben kamen dabei zum Einsatz:

### 2.1 Verbrauchsmaterial

Elektroporationsküvetten	Bio Rad, Wien (A)
Kryogefäße, Micro-Röhrchen, 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Multiwell-Kulturplatten 4, 6, 12, 24 wells / Platte	TPP, Trasadingen (CH)
Organkulturschalen	Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen mit Aerosol Filter	Biozym, Hess. Oldendorf
Petrischalen Ø 4cm, 6cm, 10cm	TPP, Trasadingen (CH)
Reaktionsgefäße	
0,2 ml (für PCR)	Biozym, Hess. Oldendorf
0,5ml, 1,5ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg

### 2.2 Allgemeine Laborchemikalien

Borsäure	Biomol, Hamburg
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Fluka, Seelze
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck, Darmstadt
Narcoren® (Pentobarbital-Na)	Merial, Hallbergmoos
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Receptal® (Buserilin)	Hoechst, Unterschleißheim
Tris-Cl	Biomol, Hamburg

Alle weiteren hier nicht aufgelisteten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a. und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Seelze) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

### 2.3 Substanzen für die Molekularbiologie

Chloroform	Roth, Karlsruhe
Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade	Roche, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma, München
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
6x Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon-Rot
Phenol (Rotiphenol equilibriert)	Invitrogen, Karlsruhe
Seakem Agarose	Biozym, Oldendorf

### 2.3.1 Substanzen für die *in situ* Hybridisierung

BM-Purple AP-Substrat	Roche, Mannheim
DIG-RNA-Labeling Mix	Roche, Mannheim
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Mowiol 4-88	Hoechst, Frankfurt
Phosphat buffered Saline (PBS) 10x (RNase frei)	Roche, Mannheim
Technovit 8100-System	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Anti-DIG Antikörper (Fab Fragment)	Roche, Mannheim

### 2.3.2 Puffer und Lösungen für *in situ* Hybridisierung

<b><u>MABT</u></b>	100mM Maleinsäure 150mM NaCl 0,1% Tween 20 <i>in bidest. Wasser lösen; pH=7,5</i>	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Fluka, Seelze
<b><u>NTMT</u></b>	100mM TrisCl (pH 9,5) 100mM Natriumchlorid (NaCl) 50mM Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) 2mM Levamisol 0,1% Tween 20 <i>in bidest. Wasser lösen</i>	BioMol, Hamburg Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma, Taufkirchen Fluka, Seelze
<b><u>BBR</u></b>	5g Boeringer Blocking Reagens in 50 ml MAB (ohne Tween 20) lösen	Roche, Mannheim
<b><u>NGS</u></b>	Normal Goat Serum (NGS) <i>auftauen, bei 60°C im Wärmeschränk inaktivieren, bei -20°C lagern</i>	Roche, Mannheim

#### **Hybridisierungs-Mix**

50% Formamid	Fluka, Seelze	
1,4x SSC (20x Stock)	Sigma, Taufkirchen	
0,5 mM EDTA	Merck, Darmstadt	
50µg/ml tRNA	Sigma, Taufkirchen	
0,2% Tween 20	Fluka, Seelze	
0,5% CHAPS	Sigma, Taufkirchen	
50 µg/ml Heparin	Sigma, Taufkirchen	
<b><u>Proteinase K</u></b>	100 mg Proteinase K <i>in 10ml DEPC-Wasser lösen, bei -20°C lagern</i>	Roche, Mannheim

### 2.3.3 Primer

In der Tabelle sind rechts neben der Auflistung der Primer die in der nested-PCR erwarteten Amplifikatgrößen der jeweiligen Primerkombinationen angegeben. Das Amplifikat der markierten Primerkombination wurde kloniert. Zur Amplifizierung von Wnt-cDNAs wurde keine nested-PCR-Technik (vgl. Abschnitt 2.9.5) eingesetzt. Die Primer wurden von Invitrogen, Karlsruhe, bezogen.

#### Primer für 3'RACE

**Q<sub>I</sub>** GAG GAC TCG AGC TCA AGC

**Q(Q<sub>0</sub>Q<sub>I</sub>dT<sub>17</sub>)** CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GC(Tx17)

**Q<sub>I</sub>/T<sub>7</sub>** GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG A

#### Connexin 32 (interne Sequenz und 3'RACE)

		Cx32 +/-	+01	+02	+03
<b>+01</b>	GTG AAY CGG CAY TST ACW GCN A				
<b>+02</b>	TGT CAT CTT CAT CTT YMG NAT HAT GGT	-01	745		
<b>+03</b>	GAT GAG AAR TCY TCY TTC ATH TGY AAY AC	-02		658	
<b>-01</b>	CTA TGT CTT TCA GRG ANC CRT CYT G	-03			559
<b>-02</b>	AGC TTG TTG ATC TCA TTY TGY TTR TAY TC				
<b>-03</b>	GAG GTT AGG TGG RAG NKC NTT YC	Cx32 3'			
<b>3' +01</b>	CTA TGT GAT CAG CGT GGT GTT CC	Q <sub>I</sub>	1080		
<b>3' +02</b>	ATG GTG CGG CTG GTC AAG TG	Q <sub>M</sub>		1000	
<b>3' +03</b>	GCA TCT GCA TCA TCC TCA ACG	Q <sub>0</sub>			880

#### Connexin 43 (interne Sequenz)

		Cx43 +/-	+01	+02	+03
<b>+01</b>	AAT CTT CTK GAC AAR GTY CAR GCN TA				
<b>+02</b>	TGC CTT TCG YTG TAA YAC NCA RCA	-01	1060		
<b>+03</b>	CTG GTT GTG AAA ATG TYT GYT AYG AYA	-02		881	
<b>-01</b>	GTT GTT CCA CRA TRG CTA RNG GYT G	-03			760
<b>-02</b>	CAT TTT GGT TRT CRT CRG GRT TRT C				
<b>-03</b>	GCC CAG TTT TGC TCR SWN GC				

#### Wnt (interne Sequenz)

**+Wnt** GGG GAA TTC CAR GAR TGY AAR TGY CAT

**-Wnt** AAA ATC TAG ARC ARC ACC ART GRA A

#### β-Catenin (interne Sequenz)

		βCat +/-	+01	+02	+03
<b>+01</b>	GCT GAT TTS ATG GAR YTN GAY ATG G				
<b>+02</b>	TAC MTC SCA AGT CCT KTA YGA RTG G	-01	1400		
<b>+03</b>	CCT GAT ACR YTR GAY GAR GGM ATG CA	-02		1119	
<b>-01</b>	TGA AGR CGW ACK GCR TTY TGR GCC	-03			850
<b>-02</b>	CTA CTG CCT CKA TRC CNC CMA CYT G	-short	600		
<b>-03</b>	CCT TCC ATY CCY TCY TGY TTR GTY GC				
<b>-short</b>	GTG TTC TGC ATG GTG CGT ACG ATA G				

#### Lymphoid enhancer binding factor 1 (interne Sequenz und 3'RACE)

		Lef1 +/-	+01	+02	+03
<b>+01</b>	YGC NAC NGA YGA RAT GAT HCC				
<b>+02</b>	CCG AAG AGG ARG GYG AYY TWG C	-01	978		
<b>+03</b>	CAC GAC AAR GCY MGW GAR CAY CC	-02		816	
<b>-01</b>	TRT GTA GCT GTC TYT CYT TCC RYG C	-03			695
<b>-02</b>	TGC CMA GRA TYT GRT TKA TAG CTC G				
<b>-03</b>	TGT RCA CTC RGC WAC KAC RTT YGC				
<b>3' +01</b>	TGC AGC TAT CAA CCA GAT CC				
<b>+Ex6</b>	TGA AGA GGA AGG CGA CTT GG				
<b>-Ex6</b>	GAG GCT TCA CGT GCA TTA GG				

#### Cerberus-related-1 (interne Sequenz)

		Cer1 +/-	+01	+02	+03
<b>+01</b>	CTT ATT TCA GCT GYT KGT WYT YYT KCC				
<b>+02</b>	TTG TTC TCT TGC CTY TRG GRA ARR C	-01	674		
<b>+03</b>	GAT GGC YGC CAR ARY CAR RG	-02		646	
<b>-01</b>	CCG TCT TCA CYW TRC AYT GRC AYT C	-03			547
<b>-02</b>	CAC TGT CAC TCY TCY ACY WGC ATN ACC				
<b>-03</b>	GCA TSG TGG TGA AYT TNG YRG G				

## 2.4 Standardlösungen

<b><u>DEPC-H<sub>2</sub>O</u></b>	1000ml bidest. Wasser	
	1000µl Diethylpyrocarbonat	Sigma, Taufkirchen
	<i>bei Raumtemperatur unter dem Abzug für 2h inkubieren; mind. 40 min. bei 121°C autoklavieren</i>	
<b><u>PBS (10x)</u></b>	10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
	1,37 M NaCl	Merck, Darmstadt
	27mM KCl	Merck, Darmstadt
	<i>in bidest. Wasser lösen</i>	
<b><u>PBT</u></b>	Tween 20	Fluka, Seelze
	<i>0,1%ig in PBS lösen</i>	
<b><u>PFA (4%)</u></b>	Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
	<i>4%ig in DEPC-PBS lösen; pH=7,4</i>	
<b><u>TBE-Puffer</u></b>	890 mM Tris-Cl	Merck, Darmstadt
	890 mM Borsäure	Merck, Darmstadt
	20mM EDTA	Sigma, Taufkirchen
	<i>in bidest. Wasser lösen; pH=8,3</i>	

## 2.5 Nährmedien und Zusätze

Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit (USA)
fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
HAM's F10-Medium	Biochrom, Berlin
IPTG	Sigma, München
<b>LB-Flüssigmedium (1l)</b>	
10g NaCl	Sigma, München
5g Hefeextrakt	Oxoid, Basingstoke (UK)
10g Tryptone	Difco Laboratories, Detroit (USA)
<i>mit bidest. Wasser ansetzen und 30min bei 120°C autoklavieren</i>	
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal	Sigma, München

## 2.6 Gewinnung von Embryonen und Gewebepräparationen

Embryonen wurden von ca. drei Monate alten Kaninchen (Weiße Neuseeländer, Lammers, Euskirchen) durch natürliche Besamung („Natursprung“) gewonnen. Um die Konzeptionsrate zu verbessern, wurden drei Wochen vor der Befruchtung einmalig 0,2 ml Receptal<sup>®</sup> (entspricht 0.004 mg Buserilin) intramuskulär injiziert. Gravide Uteri wurden nach intravenöser Applikation einer Überdosis Pentobarbital (320 mg/kg Körpergewicht) zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung durch Kaiserschnitt *in toto* reseziert. Die Entwicklungszeiten der Embryonen lagen zwischen 5,5 bis 11,0 Tage nach der Befruchtung (*dies post conceptionem*, *dpc*). Bis zu einer Tragezeit von ca. 6,5 *dpc* konnten die Blastozysten mit 37°C warmem PBS aus den an ihrem proximalen und distalen Enden eröffneten Uterushörnern mittels einer 10ml Spritze ausgespült werden. Ab 6,5 *dpc* waren die Blastozysten bereits an der Uterusschleimhaut

angeheftet und mussten durch longitudinale Eröffnung der Uteruswand freipräpariert werden. Sollten *in situ* Hybridisierungen durchgeführt werden, wurden die Blastozysten eine Stunde lang in 4% PFA (in PBS gelöst) fixiert. Bei den noch nicht implantierten Embryonen wurde die Proteinhülle, welche die Blastozysten umgibt, mit Hilfe einer Wolframnadel abgelöst. Schließlich wurde die Keimscheibe mit Iridektomiescheren kreisrund ausgeschnitten, wobei ein breiter Saum extraembryonalen Gewebes belassen wurde. Die Keimscheiben wurden in einer aufsteigenden Methanolreihe (25%, 50%, 75%, 100% in PBS) entwässert und gegebenenfalls bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Methanol gelagert. Embryonen zur Gewinnung von RNA wurden unmittelbar nach der Präparation in flüssigem Stickstoff gefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Embryonen für Kultivierungsexperimente (Flachkulturen) wurden nach Abschnitt 2.7 präpariert und kultiviert.

## 2.7 Flachkulturtechnik und *in vitro* Manipulation an Keimscheiben

Mit der Kulturtechnik nach New (1955) ist es möglich, Hühnerembryonen über einen begrenzten Zeitraum zu kultivieren und mikrochirurgische Manipulationen vorzunehmen. Diese Technik wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in folgender Weise für die ebenfalls flachen, jedoch im Vergleich mit der Keimscheibe des Huhnes erheblich kleineren Keimscheiben des Kaninchens modifiziert (sog. "Flachkultur"):

Die Blastozysten wurden wie unter 2.6 beschrieben dem Uterus entnommen und zweimal in sterilem PBS gewaschen. Aufgrund der längeren Präparationszeiten wurden die Blastozysten bis zur Präparation im Nährmedium (Ham's F10 mit 20% fötalem Kälberserum, FCS) im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  bis zu 4 Stunden aufbewahrt, ohne dass eine Beeinträchtigung der Entwicklungspotenz beobachtet werden konnte. Aus jeder Blastozyste wurde mit einer Iridektomieschere die Keimscheibe nach Entfernung der Proteinhülle herausgeschnitten. Dabei wurde ein Saum extraembryonales Gewebe um die Keimscheibe herum belassen, der in seiner Breite etwa dem Keimscheibendurchmesser entspricht. Die ausgeschnittenen Keimscheiben wurden nun auf Agarosehügeln in Organkulturschalen ausgebreitet. Dazu wurden 70  $\mu\text{l}$  erhitzte Agarose (ca.  $70^{\circ}\text{C}$ ; BioRad, Wien, Österreich) in die Mitte der Schale pipettiert. Nachdem sich dieser Tropfen ausgebreitet hatte und abgekühlt war, wurden weitere 20  $\mu\text{l}$  auf den ersten Tropfen aufgesetzt, um eine kleinere, stärker gekrümmte Oberfläche als Matrix für die Kultur der Keimscheiben zu erzeugen. Schließlich wurde Nährmedium in die Schale gefüllt, bis der gesamte Tropfen bedeckt war. Nachdem man die präparierten Keimscheiben mit einer stumpfen Pasteurpipette in die Kulturschale überführt hatte, wurde sie mit Wolframnadeln mit der Seite des Hypoblasten nach oben über den mit Medium bedeckten Agarosehügel gezogen und entfaltet. In dieser Position wurde das Medium mit einer dünn ausgezogenen Glaspipette soweit langsam abgezogen, bis sich die Keimscheibe auf dem Agarosehügel vollständig ausgebreitet hatte und die Ränder des Präparates nicht mehr mit dem Medium in Berührung waren. Um ein Abschwimmen der Keimscheibe während der Kultur zu vermeiden, sollte sich die Keimscheibe dabei genau in der Mitte des Hügels befinden. Durch wiederholte Zugabe und Abnahme von Medium konnte die Position der Keimscheibe korrigiert werden.

Unter der Stereolupe konnten nun an der Keimscheibe mikrochirurgische Manipulationen vorgenommen werden, wobei sich am besten kontrastiertere Hellfeldbeleuchtung (Mittelstellung zwischen Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung) eignete, da hier der Hypoblast durch den wesentlich

größeren Zelldurchmesser sicher vom Epiblast unterschieden werden konnte. Bei Totalresektionen des Hypoblasten wurde am Rande der Keimscheibe mit einer spitzen abgeflamten Wolframnadel der leicht verschiebbliche Hypoblast aufgenommen, wobei sich schnell ein kleines Loch bildete. Hier konnte mit der Nadel der Spalt zwischen Epiblast und Hypoblast sondiert werden und der Hypoblast durch vorsichtige Zieh- und Reißbewegungen langsam abgetragen werden. Für Kontrolloperationen wurde der Hypoblast mit den Nadeln vorsichtig am Randbereich gelöst und gemäß der ursprünglichen Position wieder an die gleiche Stelle gelegt. Im Anschluss an die Präparation und Manipulation wurden die Keimscheiben im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) bis zu 16 Stunden inkubiert

Im Anschluss an die Kultur wurden die Keimscheiben in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dazu wurde das Medium aus der Organkulturschale abgesaugt und anschließend durch langsame Zugabe von PFA die Keimscheiben vom Agarosehügel aufgeschwemmt. Nach 30 Minuten wurde die auf der Oberfläche des Fixans schwimmende Keimscheibe durch Tropfengabe mit einer Pasteurpipette untergetaucht und für weitere 30 Minuten fixiert. Abschließend wurde die Keimscheibe zweimal in PBT gewaschen. Nach Entwässerung in Methanol konnten *in situ* Hybridisierungen durchgeführt werden oder die Präparate wurden bei -20°C gelagert.

## 2.8 Histologie

### 2.8.1 Einbettung der Keimscheiben zur Aufsichtbetrachtung

Um die Intensität und Verteilung der Genexpression nach *in situ* Hybridisierung auf der gesamten Keimscheibe bei hoher Auflösung und ohne Überlagerungen beurteilen und fotografieren zu können, wurden die Präparate auf Objektträger in einer viskösen Lösung, die den Polyvinylalkohol Mowiol 4-88 (Hoechst, Frankfurt) enthält, eingedeckt und ausgebreitet. Die Lösung wurde nach Osborn und Weber (1982) zubereitet. Die Keimscheibe wurde nach Beendigung der Farbreaktion zwei mal fünf Minuten im NTMT Puffer gewaschen und in PBS überführt (vgl. Abschnitt 2.10). Mit einer stumpfen Glaspipette wurde der Embryo mit möglichst wenig PBS in einen Tropfen mowiolhaltiger Lösung (20 µl), der auf einem Objektträger vorbereitet worden war, überführt. Mit Hilfe von Wolframnadeln wurde der Tropfen auf dem Objektträger ausgebreitet und die Keimscheibe konnte glatt gezogen werden. Dabei wurde die Keimscheibe stets so ausgebreitet, dass die dorsale Seite (Epiblast) nach oben orientiert war. Nun ließ man das Deckglas vorsichtig über das Präparat fallen, wodurch sich die visköse Lösung vollständig zwischen Deckglas und Objektträger ausbreitete und den Embryo umschloss. Unter einer Stereolupe wurden die Präparate betrachtet und mit einer Digitalkamera fotografiert.

### 2.8.2 Einbettung der Keimscheiben in Technovit<sup>®</sup> und Anfertigung von Semidünnschnitten

Um die Expressionsmuster den zellulären Schichten des Embryos zuordnen zu können, wurden die gefärbten Keimscheiben nach ISH in Technovit 8100<sup>®</sup> eingebettet und mit einem Ultramikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt.

Die Faltung der Embryonen konnte weitgehend vermieden werden, indem die Keimscheiben zunächst nach Abschnitt 2.8.1 auf Objektträger eingebettet und so in 90%igem Methanol eine

Stunde dehydriert wurden. Anschließend wurde das Deckglas mit zwei Skalpelln entfernt und die Keimscheiben für weitere 5 Minuten in 100% Methanol gelegt. Die entwässerten Embryonen wurden 2 Stunden im Infiltrationsmedium (50 ml Technovit 8100 und 0,3g „Härter I“) inkubiert und anschließend in einer Mischung aus Infiltrationslösung und Härter II im Verhältnis 30:1 in Tablettenhüllen (Bayer, Leverkusen) eingebettet. Dabei wurden die Embryonen unter einer Stereolupe mit Wolframnadeln ausgerichtet. Die Tablettenhülle wurde bis zum Rand mit dem Polymerisat aufgefüllt und durch zwei Kunststoffstreifen luftblasenfrei abgedichtet. Durch Inkubation über Nacht auf einem Kälteblock (4°C) wurde das Gemisch fest und konnte am nächsten Tag aus der Hülle entnommen werden. Mit Rasierklingen wurde das im Wasserbad auf etwa 70°C erwärmte Präparat zugetrimmt und mit den Glasmessern des Ultramikrotoms geschnitten. Die Schnitte wurden mit einer Pinzette aufgenommen und in einen Tropfen 70% Ethanol auf Objektträger gelegt. Bis zu 5 Schnitte fanden auf einem Objektträger Platz und wurden zum Trocknen auf eine Heizplatte (37°C) gelegt.

Die Schnitte wurden mit differentiellem Interphasenkontrast (DIC) am Mikroskop beurteilt. Dadurch ist eine morphologische Beurteilung der Präparate erleichtert wie z.B. die Differenzierung der Gewebsschichten (Epiblast, Hypoblast, etc.) oder die Begrenzungen der Keimscheibe. Die Farbreaktion kann somit deutlicher morphologischen Strukturen zugeordnet werden. Bei schwacher Färbintensität wurden die Schnitte in ausgewählten Fällen unter normalen Hellfeldbedingungen untersucht.

## 2.9 Herstellung von cRNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen

### 2.9.1 RNA-Präparationen

RNAsen sind stabile und ubiquitär vorkommende Enzyme (z.B. im Schweiß oder Speichel), die RNA innerhalb kürzester Zeit und nahezu ohne Kofaktoren abbauen können. Bei Arbeiten mit RNA wurden daher besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen (Arbeiten mit Handschuhen und auf Eis, bei 240°C trockensterilisierte Gefäße, Verwendung von p.a. Chemikalien, Verwendung von DEPC-Wasser).

Die Gewinnung von Gesamt-RNA (gRNA) erfolgte mit Trizol<sup>®</sup>. Dem Protokoll des Herstellers folgend wurden zu 100 mg Gewebe (frisch oder bei -80°C gelagert) 1000 µl Trizol<sup>®</sup> gegeben. Das Gewebe wurde mit einer 26G Kanüle und einer 1ml Insulinspritze durch mehrmaliges Durchpressen aufgeschlossen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis keine Gewebereste mehr sichtbar waren. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und kräftigem Schütteln wurde das Zwei-Phasen-Gemisch auf zwei Phase-Lock<sup>®</sup> Gel Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) verteilt und die wässrige Phase durch fünf minütige Zentrifugation (13.000g) abgetrennt. Nach deren Vereinigung in einem neuen Reaktionsgefäß wurde die RNA ausgefällt: dazu wurden der RNA-haltigen Lösung 0,6-0,8 Volumen Isopropanol hinzugegeben, durch einmaliges Schwenken des Gefäßes durchmischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mindestens 30 Minuten bei 13.000g (4°C) in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Mit einer Pipette wurde der Überstand ohne das entstandene Pellet zu berühren abgesaugt und dieses bei Raumtemperatur getrocknet. Durch Zugabe von 70%igem Ethanol (-20°C, in der Menge, die dem Gesamtvolumen vor dem Absaugen entsprach) und

anschließender 30minütiger Zentrifugation (13.000g) wurde das Pellet gewaschen und nach dem erneuten Trocknen in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Mit einem Photometer wurde anschließend absorptionsspektrometrisch die Menge der gRNA bestimmt. Die Konzentration wurde mittels der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Zur Bestimmung des Nullwertes diente DEPC-Wasser. Mithilfe folgender Formel wurde die RNA-Konzentration  $c$  berechnet:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times V \times F$$

( $V$  = Verdünnungsfaktor;  $F$  = Multiplikationsfaktor: 40 für RNA und einzelsträngige (ss) DNA, 50 für doppelsträngige (ds) DNA)

Zur Qualitätskontrolle wurde mit 1 µl der erhaltenen Lösung eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.9.4), wobei die Banden für die 28S-, 18S- und 5,8/5S ribosomale RNA deutlich zu erkennen sein sollten. RNA Extraktionen wurden mit zwei Gewebeproben vom Kaninchen (Hoden adult und 11 Tage alte Embryonen) durchgeführt; 6,2 *dpc* gRNA stand aus anderen Experimenten zur Verfügung (freundliches Geschenk von B. Püschel, Göttingen). Aus den folgenden Geweben wurden die in dieser Arbeit beschriebenen Genfragmente isoliert (s. Tabelle 1).

Gewebe zur RNA-Extraktion	Klonierte Kaninchengenfragmente
Kaninchen Hoden, adult	<i>Cx32</i> , <i>Cx43</i>
Kaninchen Embryo, 6,2 <i>dpc</i>	<i>Lef1</i>
Kaninchen Embryo, 11,0 <i>dpc</i>	<i>Cer1</i> , $\beta$ - <i>Catenin</i> , <i>Lef1</i> <sup><math>\Delta</math>Exon6</sup> , <i>Wnt3</i>

Tabelle 1: Ursprungsgewebe der daraus klonierten Entwicklungsgene

## 2.9.2 Reverse Transkription für cDNA-Synthese

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) wurde mit dem Kit Superscript™ II RT (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt, wobei pro Ansatz in der Regel 5 µg gRNA eingesetzt wurden. Als Primer diente ein Oligo-dT-Primer ( $Q_T$ ; vgl. Abschnitt 2.3.3), der am Poly-A-Schwanz der mRNA bindet und Bindungsstellen für Primer bei Amplifizierungen des 3'UTRs (sog. 3'RACE) beinhaltet (vgl. Weisheit, 2002). Alle nachfolgenden Reaktionen wurden in einem Reaktionsgefäß (0,2 ml) im „Thermal Cycler“ durchgeführt.

Die RNA wurde 10 Minuten bei 70°C mit dem Oligo-dT-Primer inkubiert und das Protokoll des Herstellers befolgt, wobei in zwei Schritten von insgesamt 90 Minuten Dauer bei 42°C nach Zugabe des Enzyms die RT-Reaktion durchgeführt wurde. Nach der Transkription wurde die RNA durch Zugabe von RNase H degradiert. Der cDNA enthaltende Ansatz wurde bei -20°C gelagert und konnte ohne weitere Aufreinigung in PCR Reaktionen eingesetzt werden.

## 2.9.3 Ableitung von degenerierten Primern

Um die jeweiligen Gensequenzen des Kaninchens mittels PCR zu amplifizieren wurden die dazu benötigten Primer aus Sequenzvergleichen der cDNA- und Proteinsequenzen von Mensch, Maus, Huhn und soweit vorhanden Ratte abgeleitet. Bei bekannter hoher Homologie wurden zusätzlich die Sequenzen von Krallenfrosch und Zebrafisch herangezogen. Als Quelle der Protein- und DNA Sequenzen diente die Sequenzdatenbank des *National Center for*



*Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Vergleiche wurden mit Hilfe des Computerprogramms „GeneRunner®“ (<http://www.generunner.com>) durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden die Proteinsequenzen der einzelnen Spezies verglichen und eine Konsens-Proteinsequenz ermittelt, die anschließend in eine degenerierte DNA-Sequenz übersetzt wurde. Diese wiederum wurde mit den bekannten DNA-Sequenzen der Spezies verglichen. Daraus ergab sich eine ebenfalls degenerierte Konsens-DNA-Sequenz. Aus Bereichen hoher Homologie dieser Sequenz wurden Primer abgeleitet, die neben definierten Nukleotiden (z.B. T für Thymin) an nicht einheitlich definierten Positionen der Ausgangssequenz Nukleotidgemische enthielten (z.B. steht bei der Beschreibung der Primer in Abschnitt 2.3.3 „W“ für den Einbau von Thymin oder Adenin). Bei der Primererstellung wurden vom Hersteller an diesen Positionen statistisch die angegebenen Nukleotide eingebaut, so dass man Primergemische erhielt. Um trotzdem eine zuverlässige Amplifikation zu gewährleisten, wurde über eine 128fache Degeneration nicht hinausgegangen und die nested-PCR-Technik unter Touch-Down Bedingungen (vgl. Abschnitt 2.9.5) verwendet.

## 2.9.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Agarosegelelektrophorese

Zur Amplifikation für Klonierungen wurde ein Enzymmix aus Taq- und Pwo-DNA-Polymerase aus dem „Expand™ High Fidelity PCR System“ verwendet. Durch die korrekturlesende Funktion des Pwo-Polymerase-Anteils (3'-5'-Exonukleaseaktivität) wird eine 18fach höhere Sequenzgenauigkeit der erhaltenen Amplifikate erreicht als bei alleinigem Einsatz der Taq-Polymerase.

Der Standardansatz der PCR ist in Tabelle 2 aufgeführt. Zur weiteren Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden „Hot-Start“- und „Touch-Down“-Bedingungen (s.u.) eingesetzt.

1-2µl	DNA-Template (0,5-50ng)	
5µl	10x dNTP-Lösung (jeweils 2,5mM pro Nukleotid)	
5µl	10x PCR-Puffer	
1-1,5µl	<i>forward</i> -Primer, (+)-Primer (10 bzw. 50pmol/µl*)	* Bei degenerierten Primergemischen wurden 50pmol/µl, bei gen-spezifischen Primern 10pmol/µl verwendet.
1-1,5µl	<i>reverse</i> -Primer, (-)-Primer (10 bzw. 50pmol/µl*)	
0,5µl	Taq- oder Taq/Pwo DNA-Polymerase	
<i>Mit steril filtriertem bidest. Wasser auf 50µl auffüllen</i>		

Tabelle 2 : Standardprotokoll für eine PCR.

Die Reaktionen wurden im „Thermal-Cycler PTC-200“ (MJ Research) mit beheiztem Deckel durchgeführt. Es wurden in der Regel 32 Zyklen der folgenden drei sich wiederholenden Phasen durchgeführt:

1. Denaturierung: 1 Minute bei 94°C
2. Anlagerung der Primer: 30 Sekunden bei ca. 5°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur der Primer
3. Elongation: ca. 60 Sekunden für 1000 Basenpaare Amplifikatlänge bei 72°C

Die theoretische Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer wurde durch das Programm „GeneRunner®“ berechnet.  $T_m$  kann auch näherungsweise durch folgende Formel ermittelt werden:  $T_m = \{4x \text{ (Anzahl G bzw. C)} + 2x \text{ (Anzahl T bzw. A)}\}^\circ\text{C}$ . Die Elongationszeit wurde nach der erwarteten

Länge des zu amplifizierenden Fragmentes bestimmt bei bekannter Syntheserate des „Expand™ High Fidelity PCR Systems“ von 1000 Bp pro Minute.

Die Ansätze wurden direkt in den auf 94°C vorgeheizten Thermal Cycler gestellt, um ein falsches Anlagern der Primer und Fehlamplikate während des ersten Zyklus zu verhindern („Hot Start“). Nach erfolgter PCR-Amplifizierung wurden die DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. In der Regel wurde ein 1%iges Gel eingesetzt. Dazu wurden in 50ml TBE-Puffer 0,5g Agarose durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Aufkochen wurde die Lösung mehrmals zur Durchmischung geschwenkt und anschließend gewartet, bis sie handwarm (ca. 40-50°C) temperiert war. Schließlich wurde unter einem Laborabzug Ethidiumbromid (EtBr) im Verhältnis 1:10.000 (v/v) aus einer EtBr-Stammlösung (10mg/ml) zugesetzt. Zur Vermeidung einer Kontamination mit dem hochtoxischen und kanzerogenen EtBr wurden alle Arbeiten in einem gesonderten und gekennzeichneten Bereich des Labors (Gelkammerplatz mit Geldokumentationssystem) durchgeführt und spezielle EtBr undurchlässige Nitril-Handschuhe getragen. Die Agaroselösung wurde anschließend in eine Gelkammer luftblasenfrei gegossen und ein Auftragskamm eingesetzt. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit 1xTBE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Pro Tasche wurden 20 ng bis 1 µg DNA aufgetragen, die mit einem Sechstel ihres Volumens 6xLadepuffer versetzt wurden. Zur Auftrennung der DNA wurde eine konstante Spannung angelegt (100-120V), bis die Bromphenolbande des Ladepuffers die Gelfront erreicht hatte. Die Gele wurden mit einer Digitalkamera fotografiert, wobei die Banden durch UV-Licht von 302 nm Wellenlänge sichtbar gemacht wurden.

### **2.9.5 Verschachtelte PCR (Nested PCR)**

Die Nested-PCR eignet sich zur Amplifikation bei geringen Ausgangsmengen cDNA und für PCRs mit degenerierten Primern, bei denen eine Bindung an das Template und damit zuverlässige Amplifikation erschwert ist.

Drei statt einem Primerpaar flankieren die zu amplifizierende Sequenz, wobei sich die Größe des Sequenzabschnittes vom ersten Primerpaar (+01/-01) zum dritten (+03/-03) verkleinert und diese ineinander verschachtelt liegen. Für die Reaktionsschritte wurden „Touch-Down“-Bedingungen gewählt, da die Schmelztemperaturen für degenerierte Primer nicht exakt berechnet werden können: Während der ersten zehn Zyklen der PCR wurde die Annealingtemperatur von einem Ausgangswert (etwa 60 °C) pro Zyklus um ein Grad gesenkt. Die erste, „äußere“ PCR wurde mit den Primern +01 und -01 bzw. Q<sub>O</sub> durchgeführt. Als Matrize wurde 1 µl cDNA aus dem Ansatz der RT-Reaktion (vgl. Abschnitt 2.9.2) eingesetzt. Eine Verdünnung von 1 zu 2500 dieser Reaktion diente als Matrize für die erste verschachtelte („1st nested“) PCR, die mit dem Primerpaar +02 und -02/Q<sub>M</sub> durchgeführt wurde. Dessen Produkt wiederum diente in einer 1:2500-Verdünnung als Template für die innere („2nd nested“) PCR mit dem Primerpaar +03 und -03/Q<sub>I</sub>. Die Sequenzlänge, um die das Amplifikat bei jeder „Verschachtelung“ verkürzt wurde, wurde in der Gelelektrophorese abgeschätzt. Für die Ligation eines cDNA-Fragmentes in ein Plasmid wurden die längsten Amplifikate gewählt, sofern eine ausreichende Menge DNA zur Verfügung stand.

### 2.9.6 PCR-Strategie zur Amplifizierung verschiedener Wnt-cDNAs

Eine PCR-Strategie, mit der bei der Maus mittels eines einzigen degenerierten Primerpaares verschiedene neue Wnt-Moleküle amplifiziert werden konnten, wurde in der vorliegenden Arbeit auch beim Kaninchenembryo angewandt (Gavin et al. 1990). Durch den Vergleich von Aminosäuresequenzen verschiedener Wnt-Proteine (Wnt1, Wnt2) und verschiedener Spezies (Maus, Mensch, Fruchtfliege, Krallenfrosch) wurden einige hoch konservierte Sequenzabschnitte ermittelt, die in einer großen Anzahl von Wnt-Genen konserviert sind. Von diesen Sequenzabschnitten wurden degenerierte Primer abgeleitet. Dies führte zu einem Plus-Primer, der dem Aminosäuremotiv „QECKCH“ und eine Minus-Primer, der dem Motiv „FHWCC“ entspricht (vgl. Abschnitt 2.3.3). Die zu erwartenden Amplifikatgrößen (ausgehend von den bekannten Maus Sequenzen) liegen zwischen 408 Bp (136 AS) bei Wnt1 und 378 Bp (126 AS) bei Wnt 5a/b und Wnt6. Die PCR wurde wie unter Abschnitt 2.9.4 beschrieben mit Taq-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon Rot) und Zugabe von 1,5 µl Primer (50pmol/µl in DEPC-Wasser gelöst) unter Standardbedingungen durchgeführt. Als Matrize diente fetale gesamt cDNA aus 11,0 Tage alten Kaninchenembryonen (vgl. Abschnitt 2.9.1). Zur Erhöhung der Ausbeute wurden die Amplifikate aus 10 PCR-Ansätzen vereinigt und für die Klonierung mit dem Kit „Nucleo Spin Extract“ (Macherey und Nagel, Düren) aufgereinigt. Die erhaltenen Amplifikate wiesen eine Länge zwischen 300 und 450 Bp auf (nicht gezeigt) und wurden nach Abschnitt 2.9.7 kloniert und sequenziert.

### 2.9.7 Ligation und Klonierung von cDNA-Fragmenten

Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden in den Vektor pBlueskript SK(-) der Firma Stratagene eingefügt (Ligation), um nach Vermehrung des Vektors in Bakterien eine ausreichende Menge des gleichen cDNA-Fragmentes zu erhalten.

Die Technik der Ligation der cDNA in den Vektor ist in der Dissertationarbeit von G. Weisheit detailliert beschrieben (Weisheit 2002). Die Vektor-cDNA, in den das Amplifikat ligiert wurde, ist durch Elektrotransformation in E.coli-Bakterien (DH5α, Clontech, Heidelberg) transferiert worden; die Bakterien wurden danach eine Stunde in S.O.C.-Medium inkubiert und anschließend auf Agar-Platten ausgestrichen (vgl. Weisheit 2002). Nach Inkubation der Platten im Wärmeschrank (37°C über Nacht) wurden mehrere Kolonien aufgenommen, jeweils in 3 ml LB-Medium überführt und die Vektor-DNA mit dem Kit „PlasmidMini“ der Firma Qiagen freipräpariert und aufgereinigt. Durch eine PCR, die als Matrize DNA von Bakterienkolonien enthielt, konnte vorher bestimmt werden, ob der Klon das gewünschte Amplifikat enthielt („Colony-PCR“; vgl. Weisheit 2002). Die Sequenzierungen der klonierten Sequenzen wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

Die Arbeiten mit Bakterienkulturen wurden nach dem Sicherheitsrichtlinien des Gentechnikgesetzes vom 16. Dezember 1993 unter der Sicherheitsstufe „S1“ durchgeführt (vgl. §7(1) GenTG). Alle mit gentechnisch veränderten Bakterien in Berührung gekommenen Verbrauchsmaterialien, sowie Lösungen, die Bakterien beinhalteten, wurden getrennt gesammelt und nach Hitzesterilisation bei 121°C im Autoklaven entsorgt.

### 2.9.8 *in vitro* Transkription zur cRNA-Synthese

Zur Sondenherstellung wurde vom isolierten und gereinigten Plasmid eine PCR unter Standardbedingungen (vgl. Abschnitt 2.9.4) mit Hybridprimern durchgeführt, die neben der genspezifischen Sequenz zur Bindung an das Plasmid auch die T3 bzw. T7 Promotorsequenz der RNA-Polymerase beinhalteten. Die Amplifikate dieser Reaktion wurden mit dem Kit „Nucleo Spin Extract“ (Macherey und Nagel, Düren) aufgereinigt und dienten als Matrizen für die *in vitro* Transkription.

Für eine *in vitro* Transkription wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

x µl	200 ng PCR Produkt
2,0µl	DIG-RNA labelling mix
2,0µl	10x Transkriptionspuffer
2,0µl	RNA-Polymerase (T3 oder T7)
<i>mit DEPC-Wasser auf 20µl auffüllen</i>	

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz durch Zugabe von 1µl „Dig-RNA labelling mix“, 1µl 10x Transkriptionspuffer, 1µl RNA-Polymerase und 7µl DEPC Wasser auf 30µl vergrößert und nochmals für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5µl 0,4M EDTA gestoppt und die RNA-Transkripte wurden unter Zugabe von 2µl Lithiumchlorid (4M) und 60µl Ethanol (-20°C) für 2 Stunden bei -20°C gefällt und bei 13.000g in der Kühlzentrifuge (4°C) pelettiert. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 25µl DEPC-Wasser gelöst. Die Qualität der cRNA-Sonden wurde durch Gelelektrophorese überprüft. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.10 *in situ* Hybridisierung an ganzen Keimscheiben

Um die Genexpressionen in ihrer Verteilung auf verschiedene Abschnitte des Embryos zu beurteilen, wurden *in situ* Hybridisierungen an ganzen Kaninchenkeimscheiben (sog. Whole-Mount-Präparate) durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Protokolle kombiniert (Lowe und Kuehn 2000; Weisheit et al. 2002) und die sog. Körbchentechnik verwendet, bei der das Gewebe in einem Kunststoffkörnchen in die jeweiligen Lösungen umgesetzt wurde. Das Körbchen wurde aus Kryogefäßen (2ml; Sarstedt, Nümbrecht) hergestellt, indem der Boden entfernt und stattdessen ein feinmaschiges Kunststoffnetz angebracht wurde (Weisheit et al. 2002). Die Gewinnung und Dehydrierung der Embryonen in Methanol ist in Abschnitt 2.6 beschrieben. Bis zu sechs Embryonen wurden maximal in ein Körbchen gegeben.

Das Protokoll der ISH erstreckt sich über drei Tage (s. Tabelle 3). Am ersten Tag wurde das fixierte Gewebe angedaut, nachfixiert und mit der Digoxigenin-markierten cRNA-Sonde über Nacht bei 70°C hybridisiert. Damit so hohe Hybridisierungstemperaturen erreicht werden konnten, ohne dass sich die Hybridisierungsbedingungen durch unkontrollierte Verdunstung während der mehrstündigen Hybridisierungsreaktion verändern, wurden die Körbchen in 7ml Bijou-Gefäße aus Polystyren (Dunn, Ansbach) überführt, die mit einem Schraubdeckel verschlossen wurden. Am folgenden Tag wurde die Sonde ausgewaschen; anschließend wurden mit BBR (Boehringer Blocking Reagent) und Ziegen Serum (Natural Goat Serum, NGS) unspezifische

Antikörperbindungsstellen blockiert und mit dem Anti-Digoxigenin Antikörper über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am dritten Tag wurde der nichtgebundene Antikörper ausgewaschen und zum Start der Farbreaktion die Embryonen in 2ml des Digoxigeninsubstrates BM-Purple gelegt. Die Inkubation im BM-Purple dauerte je nach eingesetzter Sonde zwischen 4 Stunden und 3 Tagen unter Lichtausschluss.

**Tag 1**

75%, 50%, 25% Methanol/PBT	je 5 Min.	Auf Eis
2x PBT waschen	je 5 Min.	<i>Bei Raumtemperatur (RT) auf Schaukel</i>
10 mg/ml Proteinase K	2 bis 10 Min.	
2x PBT waschen	je 5 Min.	
0,2 % Glutaraldehyd in PBT (v/v)	20 Min.	
2x PBT waschen	je 5 Min.	
50% Hybridisierungsmix in PBT (v/v)	5 Min.	<i>Bei 70°C im Heizblock</i>
Hybridisierungsmix	5 Min.	
Hybridisierungsmix	60 Min.	
+0,4 µg DIG-cRNA-Sonde	über Nacht	

**Tag 2**

3x in Hybridisierungsmix waschen	je 30 Min.	<i>Bei 70°C im Heizblock</i>
50% Hybridisierungsmix in MABT (v/v)	15 Min.	<i>Bei RT auf Schaukel</i>
3x MABT	je 10 Sek.	
2x MABT	je 30 Min.	
2% BBR in MABT (v/v)	60 Min.	
2% BBR, 20% NGS in MABT (v/v)	60 Min.	<i>Im Kühlschrank über Nacht</i>
2 % BBR, 20% NGS + Anti-DIG-Ak 1:2000 in MABT	über Nacht	

**Tag 3**

3 x MABT	je 10 Sek.	<i>Bei RT auf Schaukel</i>
7 x in MABT	je 60 Min.	
4x in NTMT	je 10 Min.	
BM-Purple	4 h bis 3 Tage	<i>Bei RT unter Lichtausschluss</i>

Tabelle 3: Protokoll der *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen.

### 3 ERGEBNISSE

Im folgenden Kapitel werden zunächst die Kulturexperimente beschrieben, bei denen *in vitro* der Effekt einer Totalresektion des Hypoblasten auf die Expression von *Brachyury*, dem Markergen für die Mesodermbildung, bestimmt wurde. Im zweiten Teil folgen die Beschreibung der hier isolierten cDNA-Sequenzen und die Ergebnisse der für diese cDNAs durchgeführten Genexpressionsuntersuchen (*in situ* Hybridisierungen): Zunächst für die konstitutiven Proteine Connexin32 und Connexin43, die am Aufbau von Gap junctions beteiligt sind, danach für drei Faktoren der kanonischen Wnt-Signalkaskade (Wnt3 als sezerniertes Signalprotein,  $\beta$ -Catenin als intrazellulärer Mediator, und Lef1 als Wnt-abhängiger Transkriptionsfaktor) und schließlich für Cer1, der als Antagonist von TGF $\beta$ -ähnlichen Signalmolekülen wirkt.

#### 3.1 Hypoblastresektionsexperimente

##### 3.1.1 Morphologische Entwicklung der Flachkulturen

Bereits unmittelbar nach Beginn einer Flachkultur ließen sich interne Strukturen der Keimscheiben, wie z.B. der Vordere Randbogen (VRB) oder die Posteriore Gastrulaextension (PGE), die an unversehrten Keimscheiben zur Bestimmung des Stadiums 1 und 2 herangezogen werden, nicht ohne weiteres erkennen. Um das Wachstum der Keimscheiben ausgehend von den Stadien 1 und 2 nach der Kultur beurteilen zu können, wurden Veränderungen in der Kontur der Keimscheibe als Wachstumsparameter gewählt. Ausgehend vom kreisrunden Stadium 1 wurde eine längs-ovale Elongation in anterior-posteriorer Richtung als Merkmal für ein erreichtes Stadium 2 angesehen, und ausgehend vom Stadium 2 die Ausbildung der spitz zulaufenden, dreiecksförmigen Keimscheibenkontur am posterioren Pol als Zeichen für ein erreichtes Stadium 3. Bei einer Keimscheibe, die zu Beginn der Kultur im Stadium 3 ist, kommt es außer einer Größenzunahme zu keiner wesentlichen Änderung der Kontur der Keimscheibe, dafür konnte jedoch der Primitivknoten als Zeichen eines erreichten Stadiums 4 und ein kurzer Chordafortsatz als Entwicklungsmerkmal für ein erreichtes Stadium 5 herangezogen werden.

Stadium vor Kultur	Anzahl	Erkennbare Struktur nach Kultur	Tabelle 4: Übersicht über alle inkubierten Keimscheiben und deren morphologische Entwicklung unter Flachkulturbedingungen. Ausgehend vom Stadium 1 wurden eine Elongation in antero-posteriorer Richtung, vom Stadium 2 die Entwicklung einer spitz zulaufenden Keimscheibenkontur und vom Stadium 3 die Ausbildung von Primitivknoten und Chordafortsatz als morphologische Entwicklungsparameter gewählt.
		<u>Elongation</u>	
<b>Stadium 1 (VRB) 6,0 dpc</b>	<b>47</b>	<b>5</b>	
Hypoblast entfernt	27	5	
Kontroll-OP	10	<i>nicht bestimmt</i>	
Kontrolle	10	0	
		<u>spitz zulaufender post. Pol</u>	
<b>Stadium 2 (PGE) 6,2 dpc</b>	<b>22</b>	<b>18</b>	
Hypoblast entfernt	16	13	
Kontrolle	6	5	
		<u>Primitivknoten (+Chordafortsatz)</u>	
<b>Stadium 3 (PS) 6,5 dpc</b>	<b>25</b>	<b>9 (5)</b>	
Hypoblast entfernt	18	4 (1)	
Kontrolle	7	5 (4)	

Von insgesamt 47 kultivierten Keimscheiben im Stadium 1 (6,0 *dpc*) entwickelten fünf Embryonen eine längs-ovale Form, wobei 32 Keimscheiben eine kreisrunde Form beibehielten. Bei allen Embryonen, die eine längs-ovale Kontur ausbildeten, war der Hypoblast entfernt worden, während bei Keimscheiben aus der Kontrollgruppe keine Elongation beobachtet wurde (0/10). 18 von 22 Embryonen, die sich zu Beginn der Kultur im Stadium 2 (6,2 *dpc*) befanden, entwickelten eine für Primitivstreifenstadien typische spitz zulaufende Kontur am posterioren Pol. Bei 13 dieser Embryonen war der Hypoblast entfernt worden, während fünf dieser Embryonen aus der Kontrollgruppe stammten. Neun von insgesamt 25 kultivierten Embryonen im Stadium 3 entwickelten einen Primitivknoten, fünf dieser Embryonen bildeten zusätzlich einen Chordafortsatz aus. Bei allen Embryonen im Stadium 3 zeigte sich eine symmetrische und der physiologischen Form entsprechende Größenzunahme.

### 3.1.2 Hypoblastresektion

43 der 61 Embryonen, bei denen der Hypoblast entfernt worden war, zeigten nach der 16stündigen Kulturdauer eine *Brachyury*-Expression sowohl in einer größeren orthotopen Domäne als auch in ektopen Bereichen der Keimscheibe. Die Größe und Form der Expressionsdomänen unterscheidet sich jedoch in Abhängigkeit vom Stadium zu Beginn der Kultur (s. Abb. 5 bis 9)













Entwicklungsalter vor Kultur	<i>Brachyury</i> -Expression nach 16 Stunden Kultur			
 Stadium 1	 3/27	 4/27	 10/27	 10/27
	15/16	1/16	0/16	0/16
	10/10	0/10	0/10	0/10
	Keimscheiben mit entferntem Hypoblasten			
	Keimscheiben mit scheinoperiertem Hypoblasten			
	Keimscheiben ohne Hypoblastresektion			
 Stadium 2	 3/16	 6/16	 7/16	
	6/6	0/6	0/6	
	Keimscheiben mit entferntem Hypoblasten			
	Keimscheiben ohne Hypoblastresektion			
 Stadium 3	 12/18	 6/18		
	7/7	0/7		
	Keimscheiben mit entferntem Hypoblasten			
	Keimscheiben ohne Hypoblastresektion			

Abb. 5: Schematische Zusammenstellung der *Brachyury*-Expressionsmuster kultivierter Keimscheiben nach Hypoblastresektion, bzw. nach Scheinoperationen und bei Kontrollen (rechte Spalte), geordnet nach dem Entwicklungsstadium vor Kulturbeginn (linke Spalte). Dunkelblaue Bereiche zeigen die orthotope Domäne der physiologischen *Brachyury*-Expression, während hellblaue Bereiche eine ektope Expression anzeigen. In der linken Spalte ist schematisch das physiologische *Brachyury*-Expressionsmuster gezeigt (Viebahn et al. 2002).

### 3.1.3 *Brachyury*-Expression nach Hypoblastresektion im Stadium 1

Embryonen im Stadium 1 vor Kultur exprimierten nach totaler Hypoblastresektion und anschließender 16stündiger Inkubation das *Brachyury*-Gen in 24 von 27 Fällen (s. Abb. 5 und Abb. 6). Da *Brachyury* im Stadium 2 physiologischerweise innerhalb der posterioren Gastrulaextension (PGE), später in Zellen des Primitivstreifens und des umgebenden Mesoderms

exprimiert wird (Viebahn et al. 2002), wurde eine Expression im posterioren Quadranten des Embryos als „orthotop“ bezeichnet. Eine Expression außerhalb dieser Domäne wurde im Vergleich dazu „ektop“ genannt.

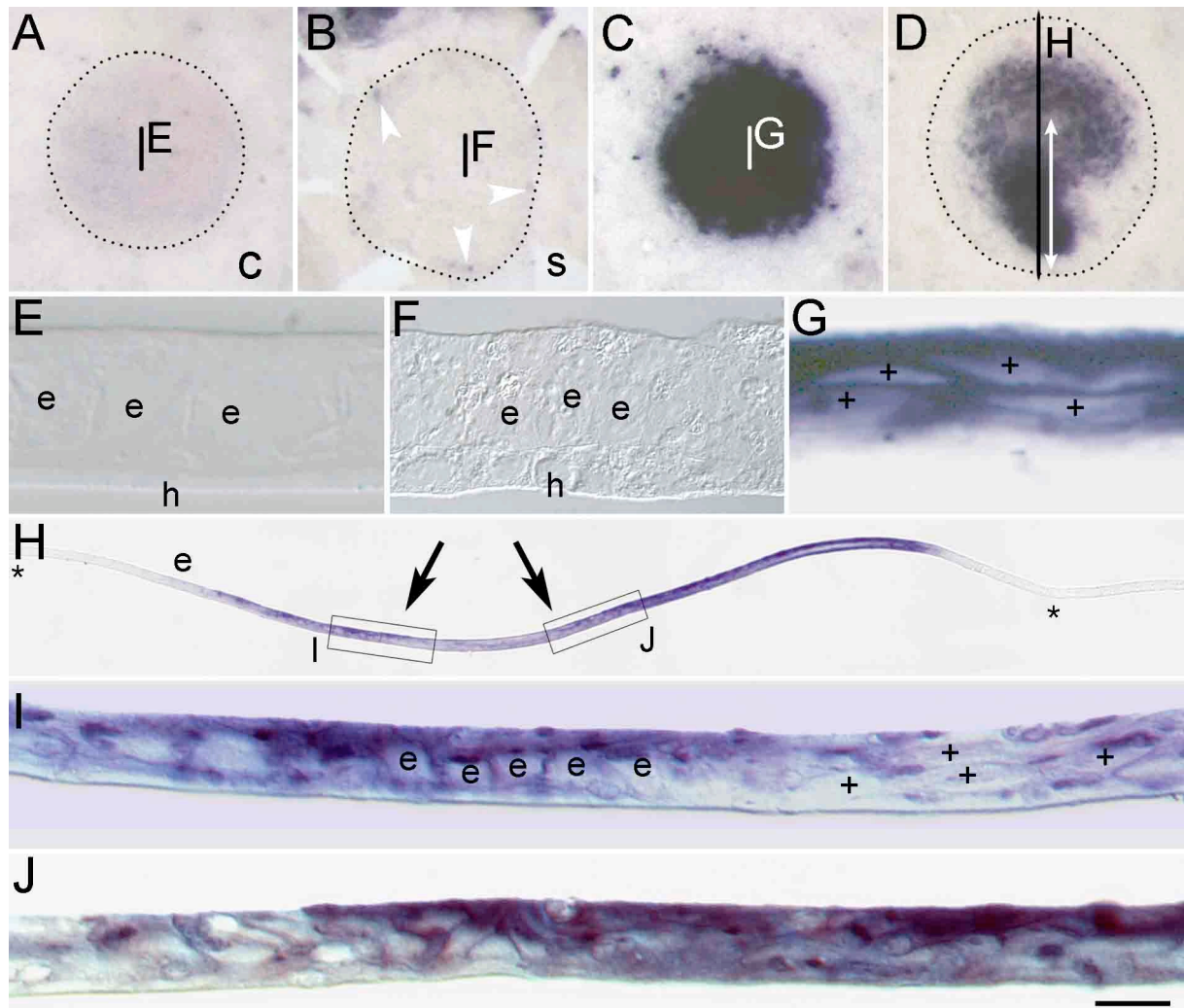


Abb. 6: *Brachyury*-Expression von Keimscheiben im Stadium 1 (vor Kultur) ohne Hypoblastresektion (A, E), Scheinoperation des Hypoblasten (B und F) und mit totaler Hypoblastresektion (C, D, G-I). Die Linien und Buchstaben der Aufsichten (A-D) geben die Position der Schnitte in E-J an. Die gepunktete Umrandung in A, B und D markiert den Keimscheibenrand. Der weiße Doppelpfeil in D gibt die Ausdehnung des Primitivstreifens an. H zeigt einen Semidünnschnitt der Keimscheibe in D (durch die schwarze Linie in D angedeutet). Sternchen in H markieren den Keimscheibenrand; der Schnitt ist mit dem anterioren Pol nach links ausgerichtet. Zwischen den schwarzen Pfeilen in H befindet sich eine Region im Bereich des anterioren Primitivstreifens mit geringerer Expressionsintensität. Die schwarzen Rechtecke in H geben die Bereiche des Schnittes an, die in I und J vergrößert dargestellt sind. Weiße Pfeilköpfe in B deuten auf schwach *Brachyury* exprimierende Zellen. E: Epiblast, h, schwarze Pfeilköpfe: Hypoblast; +: Mesoderm. Maßstabsbalken: 150  $\mu$ m in A-D, 10  $\mu$ m E-G, 50  $\mu$ m in H, 20  $\mu$ m in I und J.

Entsprechend dieser Kriterien exprimierten 14 Embryonen mit reseziertem Hypoblast *Brachyury* in einer orthotopen Domäne, während zehn Keimscheiben eine ektope *Brachyury*-Domäne aufwiesen ohne gleichzeitige orthotope Expression (s. Abb. 5). Vier dieser zehn Embryonen exprimierten *Brachyury* innerhalb der gesamten Keimscheibe (s. Abb. 6 C), während die verbleibenden sechs eine scheibenförmige Expression in zentralen Bereichen aufwiesen ohne den Keimscheibenrand zu erreichen (nicht gezeigt). Semidünnschnitte dieser Embryonen zeigten, dass innerhalb der *Brachyury*-Expressionsdomäne spindelförmige flache Zellen überwogen, die morphologisch Mesodermzellen ähnelten (s. Abb. 6 G). Zehn Embryonen



exprimierten *Brachyury* sowohl innerhalb der orthotopen Domäne als auch in ektopen Bereichen. Die Expressionsstärke der orthotopen Domäne war dabei generell intensiver als in der ektopen (s. Abb. 6 D). In Semidünnschnitten zeigten sich in der orthotopen Domäne mehrschichtige mesodermähnliche Zellen und stark apikal gefärbte Epiblastzellen. In der ektopen Domäne waren überwiegend große kubische Epiblastzellen, welche das Gen weniger stark und in apikalen Zellkompartimenten exprimierten. Zwischen der orthotopen und ektopen Domäne fanden sich in einer mehrschichtigen Anordnung Mesodermzellen, die *Brachyury* schwach exprimierten (s. Abb. 6 D, H-J). Solche Mesodermzellen waren in einem primitivstreifenähnlichen Bereich zu finden, der sich vom posterioren Rand der Keimscheibe bis in die anteriore Hälfte der Keimscheibe erstreckte (weißer Doppelpfeil Abb. 6 D).

Keiner der zehn Kontrollembryonen mit intaktem Hypoblasten entwickelte eine sichelförmige orthotope Domäne oder eine ektople Domäne mit *Brachyury*-Expression (s. Abb. 6 A). Der Embryo blieb zweischichtig mit einer säulenförmigen Epiblastschicht und einer schmalen Hypoblastschicht. (s. Abb. 6 E). Um einen Einfluss der Manipulation des Hypoblasten auf die *Brachyury*expression auszuschließen, wurden Scheinoperationen durchgeführt. Dabei wurde der Hypoblast komplett abgehoben und anschließend unmittelbar wieder repositioniert (vgl. Abschnitt 2.7). Nach der Inkubation variierte die *Brachyury*-Expression und zeigte negative Reaktionen (6/16), gleichmäßig über der Keimscheibe verteilte schwach-positive Reaktionen (7/16) als auch einige einzelne schwach-positive ektople Zellen (2/16; weiße Pfeilspitzen in Abb. 6 B). In einem Fall fand sich eine starke *Brachyury*-Expression innerhalb der orthotopen Domäne. In allen Fällen war die Expression jedoch sehr schwach, und es konnte keine eigenständige ektople Domäne differenziert werden. Der Embryo blieb zweischichtig, wobei die Hypoblastzellen eine kubische Form hatten (s. Abb. 6 F).

### 3.1.4 *Brachyury*-Expression nach Hypoblastresektion im Stadium 2

Embryonen im Stadium 2 vor Kultur exprimierten nach Hypoblastentfernung in 13 von 16 Fällen das *Brachyury*-Gen (s. Abb. 7) in einer vergrößerten orthotopen, dem während der Kultur entstandenen Primitivstreifen entsprechenden Domäne; die orthotope Domäne galt dabei als vergrößert, wenn der vordere Rand der Domäne über den „Äquator“ der Keimscheibe hinausging. Bei sieben dieser 13 Embryonen fanden sich zusätzlich spangenförmige Ausläufer *Brachyury* exprimierender Zellen entlang des vorderen und seitlichen Umfangs der Keimscheibe (s. Abb. 7 B und C). Eine vergrößerte orthotope Domäne, die über das anteriore Ende der Primitivstreifenregion hinausgeht, fand sich in keiner der sechs Kontrollen. Es zeigte sich ein rautenförmiges *Brachyury*-Expressionsmuster innerhalb der posterioren Elongation der Keimscheibe. In Schnitten zeigten sich hier die normal konfigurierten Epiblast- und Mesodermzellen der Primitivstreifenregion (s. Abb. 7 A und E). Sowohl in der orthotopen als auch in der ektopen Domäne exprimierten Epiblast- und Mesodermzellen das *Brachyury*-Gen; in der Primitivstreifenregion fanden sich mehrere Schichten spindelförmiger Mesodermzellen (s. Abb. 7 H). In der spangenförmigen anterior-lateralen Domäne fanden sich *Brachyury* exprimierende Zellen in der Mesodermschicht. Die darüber liegende Epiblastschicht exprimierte nicht oder nur sehr schwach *Brachyury* (s. Abb. 7 I). In den Randbereichen, jedoch nicht im Keimscheiben-

zentrum, wurden Zellen gefunden, welche der Lage nach als Hypoblastzellen angesehen werden müssen und kein *Brachyury* exprimierten (s. schwarze Pfeilspitzen in Abb. 7 G und H).

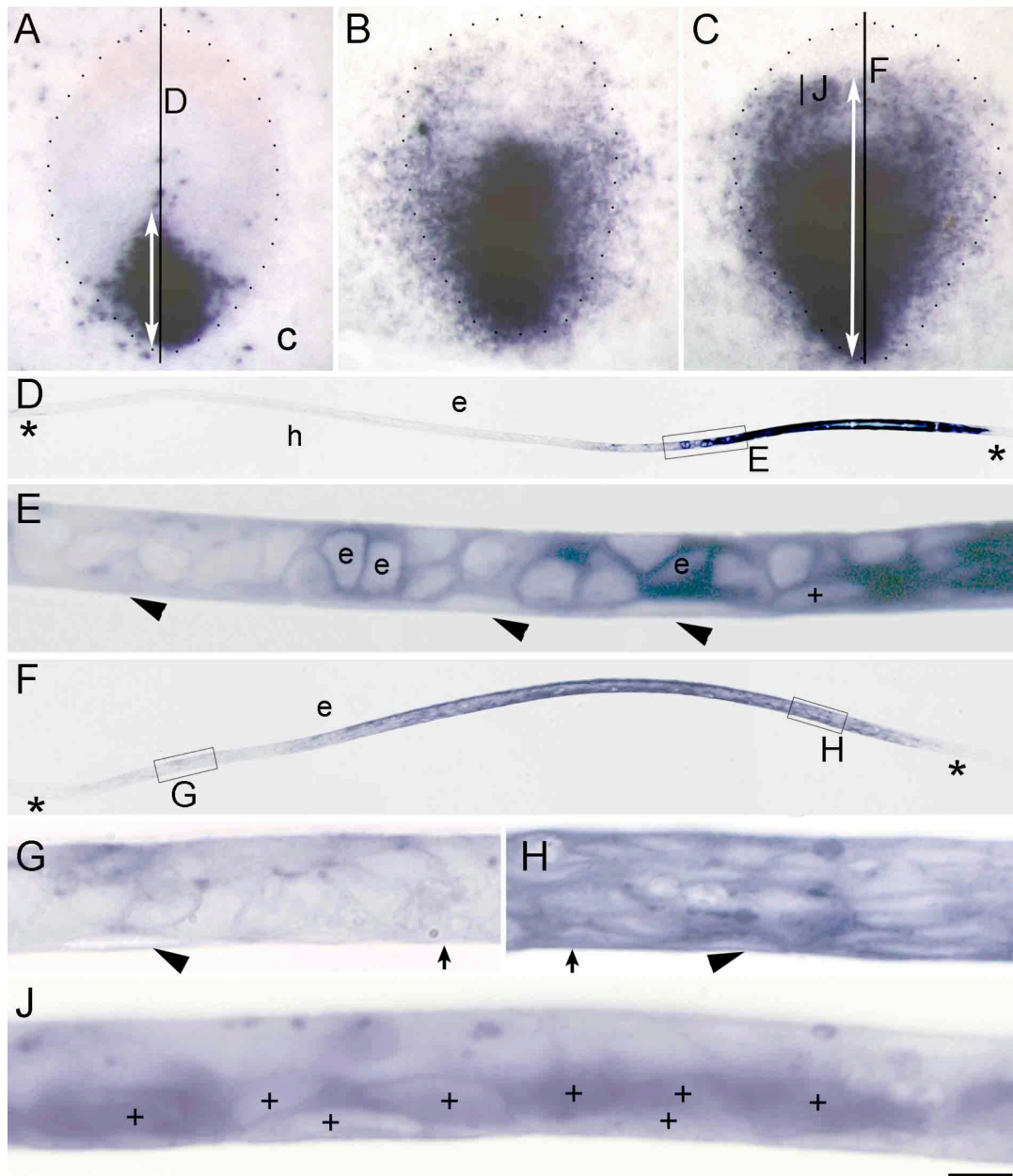


Abb. 7: *Brachyury* Expression in kultivierten Embryonen des Stadiums 2. A-C: Aufsichten von Keimscheiben ohne (A) und mit Hypoblastresektion (B und C). Buchstaben und Linien in A-C verweisen auf die Position der Schnitte in D-J. Die weißen Doppelpfeile in A und C zeigen die Ausdehnung des Primitivstreifens. Hypoblastzellen fanden sich am Rand (Pfeilköpfe in G und H), aber nicht in zentralen Bereichen der Keimscheibe (Pfeile in G und H). Sternchen in D und F markieren den Keimscheibenrand. Die Boxen in D und F umranden die Ausschnittvergrößerung in E, G und H. E: Epiblast; h: Hypoblast; +: Mesoderm. Maßstab: 150  $\mu\text{m}$  in A-C, 60  $\mu\text{m}$  in D und F, 10  $\mu\text{m}$  in E, G und H, 7  $\mu\text{m}$  in J.

### 3.1.5 *Brachyury*-Expression nach Hypoblastresektion im Stadium 3

Im Primitivstreifenstadium (Stadium 3) führte die Hypoblastresektion in sechs von 18 kultivierten Keimscheiben zu einer ektopten *Brachyury*-Expression; diese fand sich anterior zur orthotopen Domäne, in 2 spangenförmigen Expressionsdomänen entlang dem anterior-lateralen Keimscheibenrand (s. Abb. 8 B).

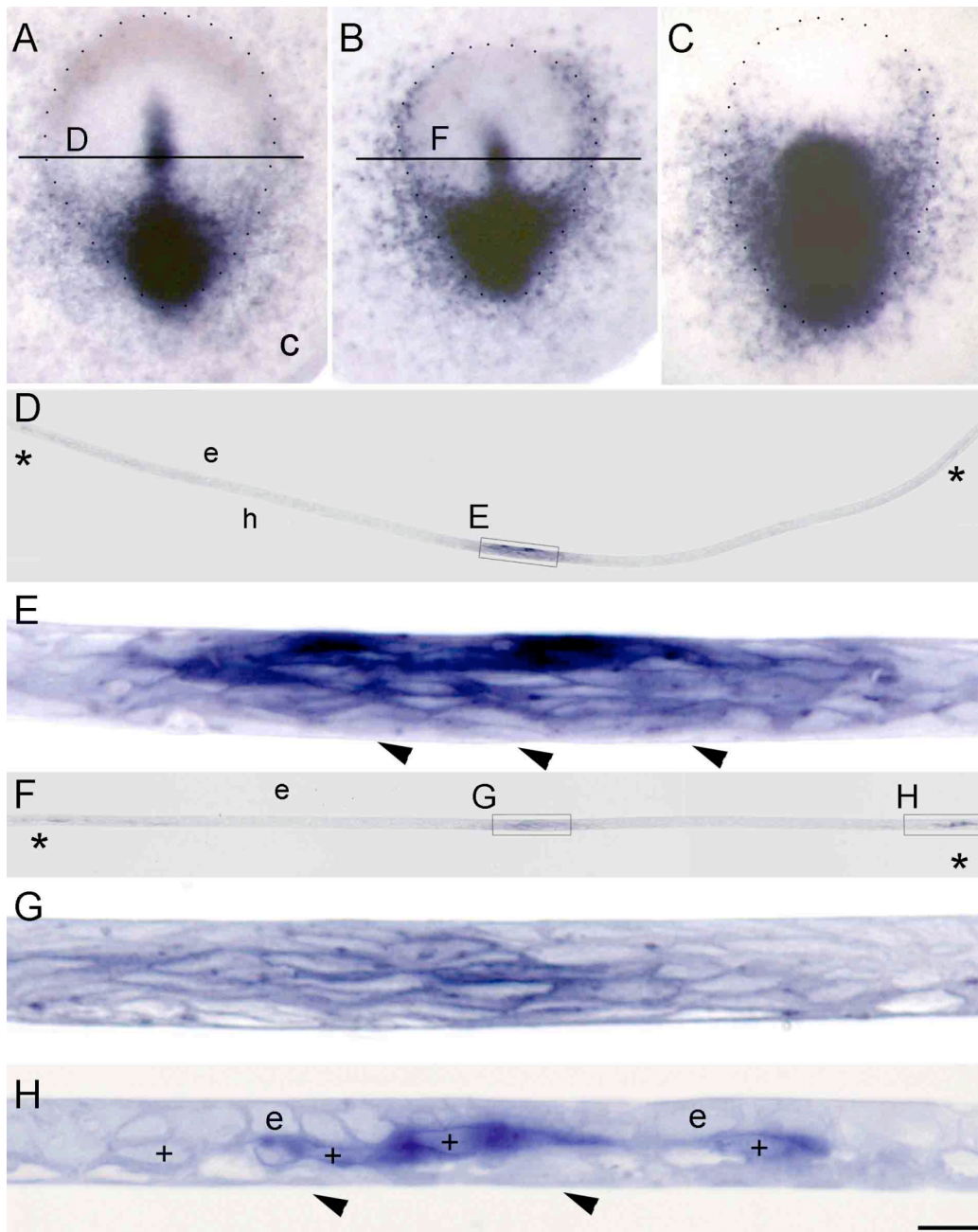


Abb. 8: *Brachyury* Expression in kultivierten Keimscheiben (Stadium 3 zu Beginn der Inkubation): Aufsichten von Keimscheiben ohne (A, Kontrolle) und mit totaler Hypoblastresektion (B und C). Buchstaben und Linien deuten die Position der Schnitte in D-H an, Rechtecke umranden den Bereich der Ausschnittvergrößerungen. Sternchen befinden sich am Keimscheibenrand. E: Epiblast; h und schwarze Pfeilköpfe: Hypoblast; +: Mesodermzellen. Maßstabsbalken: 200µm in A-C; 50µm in D und F; 20µm in E, G und H.

Die Morphologie des Primitivknotens unterschied sich sowohl makro- als auch mikroskopisch nicht zwischen den Kontrollen und den Embryonen mit entferntem Hypoblasten (s. Abb. 8 A, B und D-G). Zwischen dem Primitivknoten bzw. dem sich in Kultur entwickeltem Chordafortsatz und der ektopen Expressionsdomäne fand sich keine *Brachyury*expression im paraxialen Mesoderm. Die orthotope Domäne hatte sich in Keimscheiben nach lateral, aber nicht nach anterior vergrößert. Die Domäne war schmal (bestehend aus 2-6 nebeneinander liegenden Mesodermzellen) und im Vergleich zur ektopen Domäne im Stadium 2 meist schmaler und kürzer. Die Zellen dieser Domäne waren regelmäßig geschichtet mit apikal gelegenen kubischen Epiblastzellen und einer diskreten Schicht von basal gelegenen Hypoblast- oder Endodermzellen (s. Abb. 8 H).

## 3.2 Isolierung, Charakterisierung und Expression von Connexin 32 (Cx32) und Connexin 43 (Cx43)

### 3.2.1 cDNA und Aminosäuresequenzen

Mit den für Cx32 ausgewählten Primern wurden in der PCR zwei sich überlappende Bereiche, die den Großteil des offenen Leserasters (ORF) und den kompletten 3'-Bereich umfassen, amplifiziert. Im Fall von Cx43 umfasst die amplifizierte cDNA einen großen Bereich innerhalb des ORF (s. Abb. 9). Die Gensequenzen sind in der Genbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) archiviert (Cx32 Accession Number: AY576038; Cx43 Accession Number: AY576039).

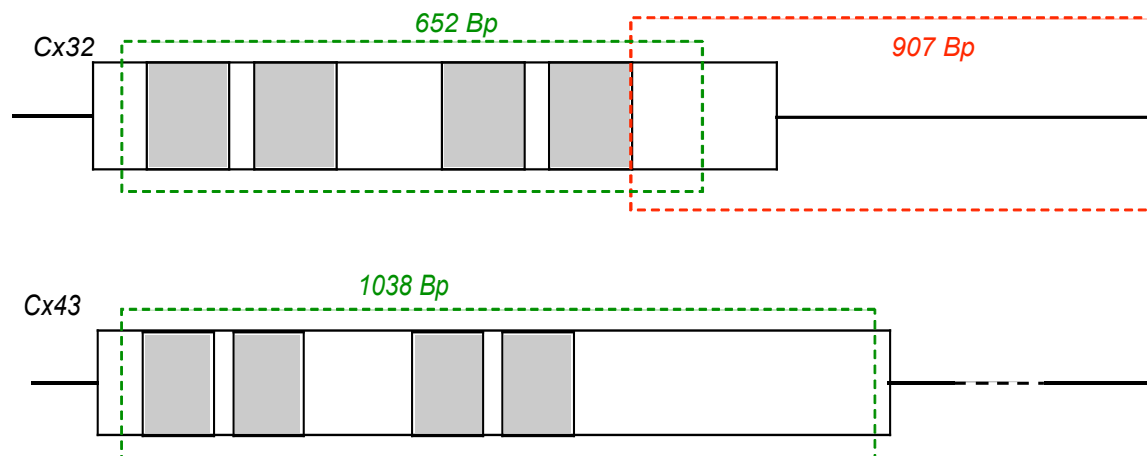


Abb. 9: Schematische Darstellung der cDNA von Cx32 (oben) und Cx43 (unten). Der ORF ist durch ein Rechteck dargestellt, der 5' und 3' UTR als schmale Linien. Als graue Blöcke sind die Bereiche hervorgehoben, die vier transmembranäre Domänen der Connexin-Proteine kodieren. Die klonierten Abschnitte sind grün (interne Sequenz) bzw. rot (interne Sequenz und 3'UTR) umrandet.

Die amplifizierte interne Sequenz der Cx32-cDNA vom Kaninchen umfasst 652 Bp (217 AS); dies entspricht 76 % des ORF der Konsensussequenz von Maus, Mensch und Huhn. Die Sequenz, welche den 3'UTR beinhaltet, umfasst 907 Bp. Durch einen Vergleich dieser beiden Abschnitte wurde eine 1406 Bp lange Sequenz ermittelt, die 750 Bp (250 As) des ORF (87% des ORF der Konsensussequenz) und den gesamten 3'UTR mit 656 Bp beinhaltet. Die klonierte interne Sequenz von Cx43 ist 1038 Bp (346 Aminosäuren) lang und umfasst 91% des ORF der Konsensussequenz. Die cDNA-Sequenzen und die daraus abgeleiteten Proteinsequenzen der amplifizierten cDNA-Fragmente von Cx32 und Cx43 sind stark homolog zu den bekannten Sequenzen von Maus, Mensch und Huhn (s. Tabelle 5).

cDNA ORF (+ 3'UTR) Protein	Cx32			Cx43		
	hs	mm	gg	hs	mm	gg
OC	92,9% (86,2%)	90,7% (86,2%)	80,1% (74,4%)	93,4%	89,7%	81,7%
	<b>97,6%</b>	<b>98,4 %</b>	<b>73,9%</b>	<b>97,9%</b>	<b>98,5%</b>	<b>93,1%</b>

Tabelle 5: Homologievergleiche der cDNA- und Aminosäuresequenzen von Cx32 und Cx43 verschiedener Spezies. Beim Vergleich wurden die Sequenzen auf die Länge der Kaninchensequenz gekürzt. Bei den cDNA-Sequenzen von Cx32 sind in Klammern zusätzlich die Homologien des 3'UTR mit angegeben. oc: *oryctolagus cuniculus* (Kaninchen), hs: *homo sapiens* (Accession Number Cx32: NM\_000166 Cx43: NM\_000165), mm: *mus musculus* (Accession Number Cx32: NM\_008124 Cx43: BC006894), gg: *gallus gallus* (Accession Number Cx32: NM\_204371 Cx43: NM\_204586).

### 3.2.2 Expressionsmuster von *Connexin 32*

In einer ersten *in situ* Hybridisierungsserie ergaben die cRNA-Sonden von beiden oben beschriebenen Cx32-Fragmenten in verschiedenen Stadien jeweils identische Ergebnisse. Dabei zeigte die cRNA-Sonde, welche den 3'UTR beinhaltet („Cx32 3'“), eine schnellere Farbreaktion in der Substratlösung „BM-Purple“ (vgl. Abschnitt 2.10). Die Farbreaktion dauerte bei Verwendung von „Cx32 3'“ bis zur endgültigen Färbung des Präparates bei einem Stadium-2-Embryo etwa 4-6 Stunden, während die Sonde des internen Fragmentes („Cx32 int.“) dafür etwa 12 bis 16 Stunden brauchte. Für die Beschreibung der Expression in einer vollständigen Serie von Entwicklungsstadien wurde deshalb nur noch die „Cx32 3'“-Sonde verwendet.

In den jüngsten hier untersuchten Stadien ist die Expression der Cx32-mRNA, im mikroskopischen Hellfeld erkennbar an einer dunkelblauen Markierung auf einer hellblauen Hintergrundfärbung, zunächst gleichmäßig-flächig mit einzelnen stärker gefärbten Zellen und nahezu vollständig auf den Bereich der Keimscheibe beschränkt (s. Abb. 10 A-C).

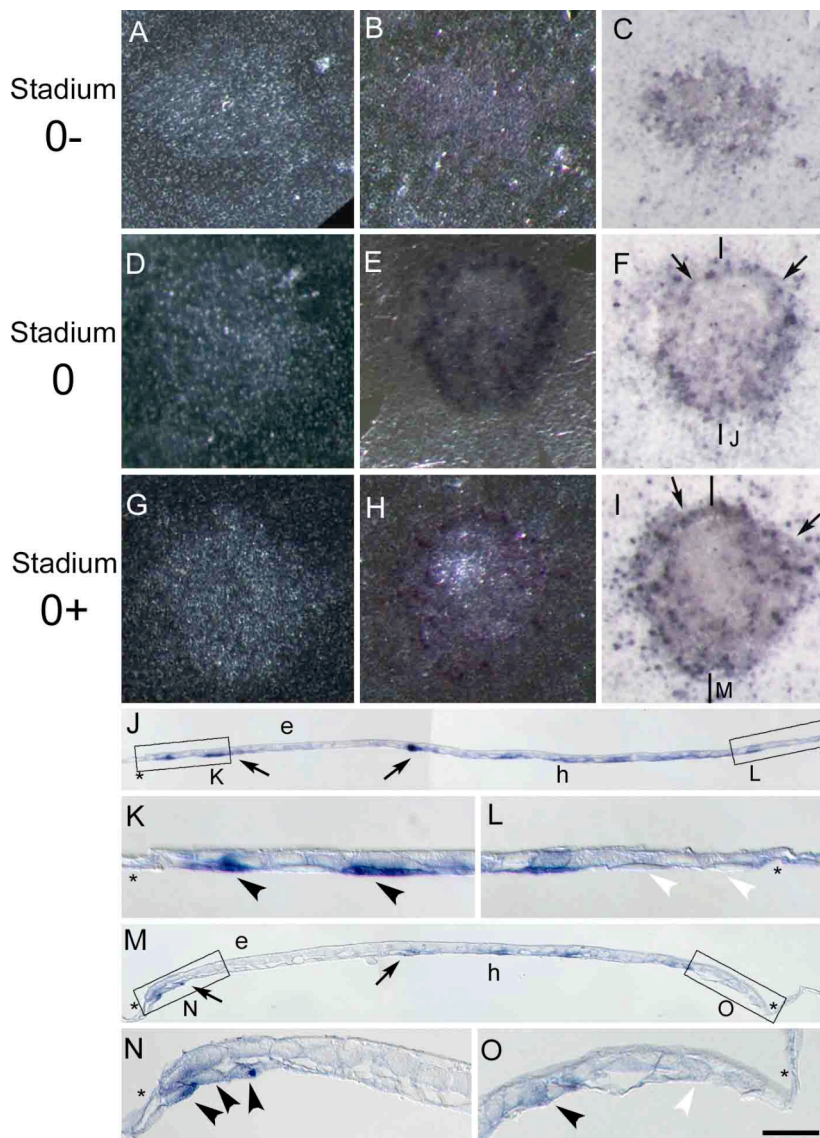


Abb. 10: Expression von Cx32 im Stadium 0. A-I zeigen dorsale Aufsichten. Den Hellfeldaufnahmen (C, F und I) sind zur Beurteilung der Morphologie die Dunkelfeldaufnahmen (B, E und H) und Aufnahmen der Keimscheiben unmittelbar vor der Fixierung (A, D und G) gegenübergestellt. Bei A-C handelt es sich um ein frühes, bei G-I um ein spätes Stadium 0. Die Keimscheiben in D-F und G-I wurden nach *in situ* Hybridisierung sagittal geschnitten; median gelegene Schnitte sind in J und M gezeigt. K und L bzw. N und O zeigen Ausschnittvergrößerungen des anterioren bzw. posterioren Randes, angedeutet durch die Umrandungen in J und M. Die Sternchen markieren die Begrenzung der Keimscheibe; schwarze Pfeilköpfe deuten auf Cx32 exprimierende Hypoblastzellen, weiße auf ungefärbte Hypoblastzellen. e: Epiblast; h: Hypoblast. Maßstabsbalken: 180  $\mu$ m in A-I, 45  $\mu$ m in J und M, 9  $\mu$ m in K, L, N und O.

In Embryonen des Stadiums 0, die bereits einen etwas größeren Keimscheibendurchmesser als diese jüngsten

untersuchten Stadien haben, ragt die Expressionsdomäne geringfügig über den Rand der Keimscheibe in den extraembryonalen Bereich und bildet einen Ring mit ungleichmäßig stark

markierten Zellen, der um einen exzentrisch gelegenen zentralen Bereich mit nur wenigen schwach markierten oder nicht markierten Zellen angeordnet ist (s. Abb. 10 F).

Der exzentrischen Lage dieses zentralen Bereiches entspricht, dass der Ring mit stärker markierten Zellen einseitig breiter und an der anderen, diesem breiteren Bereich gegenüberliegenden Seite, schmaler ist (zwischen den Pfeilen in Abb. 10 F). Der gegenüberliegende breite Teil des Ringes nimmt dabei etwa die Hälfte der Keimscheibenlänge ein (s. Abb. 10 E und F). Die eindeutige Zuordnung dieser Expressionsmuster, besonders die exzentrische Lage des beschriebenen zentralen Bereiches, zur Morphologie der Keimscheibe gelingt durch den Vergleich des Hellfeldbildes (s. Abb. 10 linke Spalte) mit dem Dunkelfeldbild derselben Keimscheibe nach der *in situ* Hybridisierung (s. Abb. 10 mittlere Spalte). Dass die Keimscheiben des Stadiums 0 in der Aufsicht tatsächlich keine morphologisch definierbare Achsendifferenzierung haben und deshalb zum Stadium 0 gerechnet werden müssen, ist an den zu untersuchenden Keimscheiben unmittelbar vor der Fixierung stereomikroskopisch festzustellen (s. Abb. 10 rechte Spalte).

Die unsymmetrische Ringform der Cx32 exprimierenden Domäne, besonders der schmale anteriore Saum (zwischen den Pfeilen in Abb. 10 I) und das zentral eingeschlossene Cx32-freie, nun längsovale Areal zeichnen sich im späten Stadium 0 (Stadium 0+) deutlicher ab (s. Abb. 10 I). In späteren Stadien, die eine axiale Zuordnung erlauben, findet sich dieses Cx32-freie Areal im anterioren Bereich des Embryos (s.u., s. Abb. 11); deswegen kann dieser Bereich fehlender oder reduzierter Cx32-Expression bereits im Stadium 0 als anterior bezeichnet werden.

Histologische Schnitte zeigen, in welcher Schicht der Blastozyste die markierten Zellen liegen: Cx32 wird im Bereich der Keimscheibe von Zellen des Hypoblasten und außerhalb der Keimscheibe von Dottersackepithelzellen exprimiert (s. Abb. 10 J-O), wobei die Expressionsintensität im Hypoblasten deutlich stärker ist. Mediane Semidünnschnitte zeigen Cx32 exprimierende Hypoblastzellen, die mit dem Keimscheibenrand des anterioren Pols abschließen. Die Domäne mit reduzierter Cx32-Expression schließt sich direkt den Cx32 exprimierenden Zellen des anterioren Pols an und umfasst im Stadium 0 etwa sechs bis neun Hypoblastzellreihen (zwischen den Pfeilen in Abb. 10 J und M). Während sich die Cx32 exprimierenden Hypoblastzellen im „glatten“ Stadium 0 innerhalb der Keimscheibe morphologisch nicht voneinander unterscheiden und im Gegensatz zu den kubischen Epiblastzellen eine flache Zellform aufweisen (s. Abb. 10 J, K, L), zeigen im Stadium 0+ die Hypoblastzellen unterschiedliche Formen: Die Zellen des anterioren Pols zeigen eine gewölbte, spindelförmige Morphologie und unterscheiden sich darin von den eher flachen Hypoblastzellen des Keimscheibenzentrums oder des posterioren Keimscheibenrandes (s. Abb. 10 M, N und O).

Im Stadium 1, das durch die Ausbildung des Vorderen Randbogens (VRB) charakterisiert ist (s. Abb. 2 in Abschnitt 1.1.3), lässt sich der schmale Saum der ringförmigen Expressionsdomäne dem anterioren, im Dunkelfeld peripher schärfer gezeichneten Pol der Keimscheibe eindeutig zuordnen und nimmt etwa ein Drittel des Keimscheibenumfanges ein (s. Abb. 11 A und F). Die exzentrische Domäne mit reduzierter Cx32-Expression findet sich wie im Stadium 0 in anterioren Bereichen der Keimscheibe; dabei finden sich hier im Vergleich zum Stadium 0 weniger Cx32

exprimierende Zellen, wodurch sich dieser Bereich schärfer vom anterioren Saum starker Cx32-Expression abgrenzt (s. Abb. 11 F).

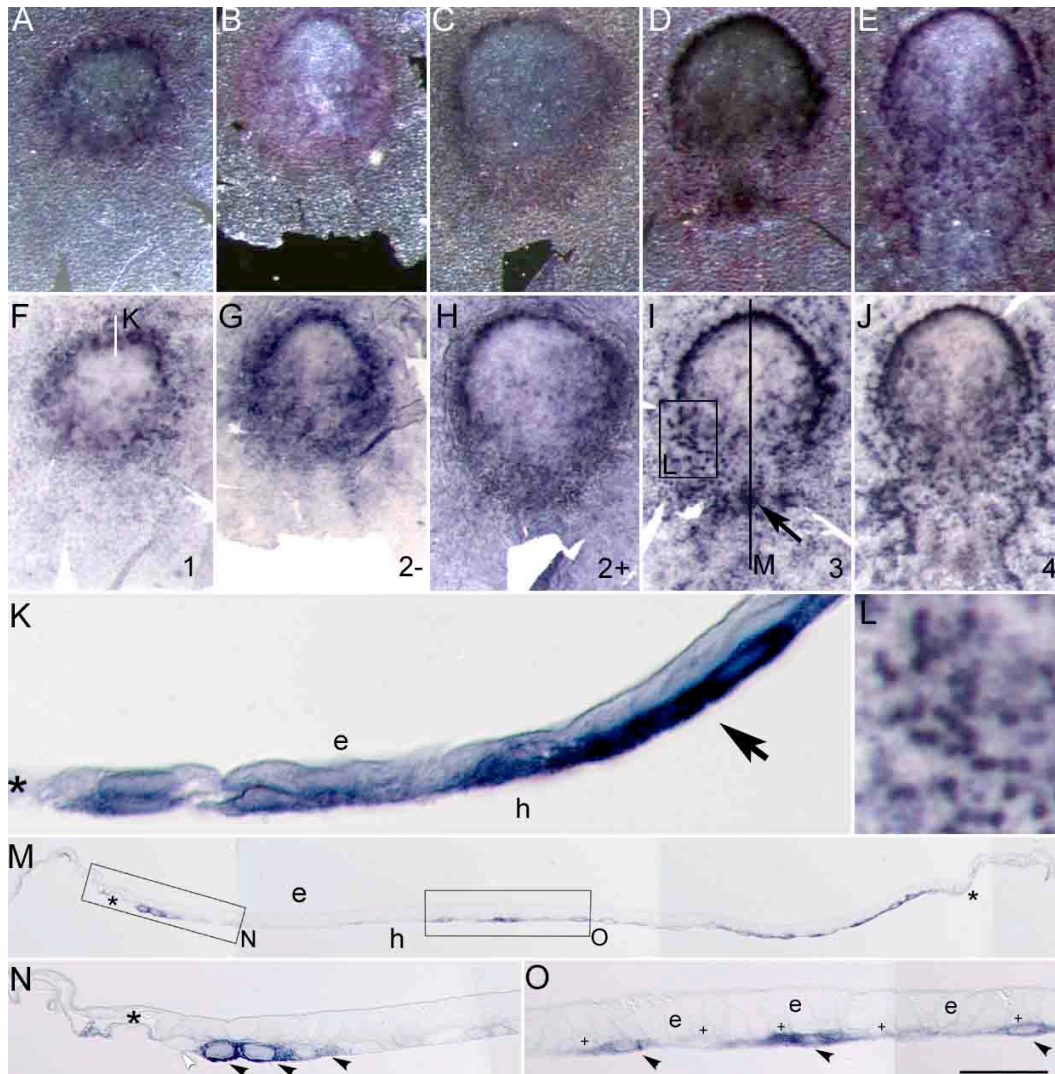


Abb. 11: Expression von Cx32 in den Stadien 1 bis 4, jeweils im Dunkelfeld (A-E) und im Hellfeld (F-J) von dorsal aufgenommen. K zeigt einen Semidünnschnitt durch den Vorderen Randbogen der Keimscheibe in A/F (durch die weiße Linie in F angedeutet). L zeigt eine Ausschnittvergrößerung aus I (innerhalb des schwarzen Kastens in I). Die Keimscheibe in D bzw. I wurde sagittal geschnitten (M-O); die Schnittebene ist durch die schwarze Linie in I angedeutet. Alle Semidünnschnitte sind mit dem Epiblasten nach oben und dem vorderen Rand nach links orientiert gezeigt; M und N zeigen Ausschnittvergrößerungen aus L (angedeutet durch die schwarzen Rechtecke). Sternchen deuten auf die Begrenzung der Keimscheibe; schwarze Pfeilspitzen deuten auf Cx32 exprimierende Hypoblastzellen, weiße auf Hypoblastzellen des Vorderen Randbogens ohne Cx32-Expression. h: Hypoblast; e: Epiblast. Maßstab: A-J 400  $\mu$ m, K 20  $\mu$ m, L 80  $\mu$ m, M 100  $\mu$ m, N-O 20  $\mu$ m.

Die Expressionsintensität des anterioren Saumes der ringförmigen Expressionsdomäne ist im Vergleich zum breiten posterioren Saum stärker. Die Cx32-Expression ist im Stadium 1 nicht auf die Keimscheibe begrenzt, wobei sich der Keimscheibenrand unscharf demarkiert (s. Abb. 11 A und F). In sagittalen Semidünnschnitten durch den anterioren Pol der Keimscheibe findet man 6-10 nebeneinander liegende Cx32 exprimierende Hypoblastzellreihen, die bis an den Keimscheibenrand heranreichen. Hier finden sich Unterschiede der Expressionsstärke, wobei Hypoblastzellen, die an das Dottersackepithel angrenzen, schwächer Cx32 exprimieren als zentral gelegene Hypoblastzellen (schwarzer Pfeil Abb. 11 K). Mit der weiteren embryonalen Entwicklung im Stadium 2, in welchem der posteriore Teil der Keimscheibe länger wird und sich eine sichelförmige Zone geringer Zelldichte herausbildet (Posteriore Gastrulaextension, PGE; s.

Abb. 2), wird der anteriore Teil des Ringes Cx32 exprimierender Hypoblastzellen erneut schmaler und weitet sich auf über die Hälfte des Keimscheibenumfanges aus (s. Abb. 11 B, C und G, H). Die Cx32-freie Zone grenzt sich nun durch einen besonders glatten Verlauf der Trennlinie zwischen dem (anterioren) positiven Bereich und dem (zentralen) negativen Bereich noch deutlicher ab als im Stadium 1. Auch im Stadium 2 ist die Expressionsintensität im breiten Teil der ringförmigen Domäne schwächer als im schmalen Saum des anterioren Randes. Die Expression erstreckt sich auch in extraembryonale Bereiche und ist auch (weniger intensiv) im Dottersackepithel zu finden (Schnitte nicht gezeigt). Im späten Stadium 2 schwächt sich im posterioren Teil der Keimscheibe die Expressionsintensität im Vergleich zur kompakten Anordnung stark Cx32 exprimierender Zellen entlang des anterioren Randes weiter ab: Die Kontinuität der ringförmigen Expressionsdomäne schwindet posterior, während sie sich anterior verstärkt (s. Abb. 11 C und H). Die exzentrisch liegende Domäne mit schwacher Expression grenzt sich nun noch deutlicher am anterioren Rand der Keimscheibe ab und wird posterior von den verstreut liegenden schwach Cx32 exprimierenden Hypoblastzellen durchsetzt.

Zu Beginn des Primitivstreifenstadiums (Stadium 3) wird die Ringstruktur des Expressionsmusters im posterioren Bereich aufgebrochen, in welchem die Cx32 exprimierenden Zellen unregelmäßig verteilt zwischen ungefärbten Zellen liegen (s. Abb. 11 D und I). Von medial gelegenen Bereichen ausgehend vom Primitivstreifen bilden sich ferner einreihige Ketten von Zellen, die sich zentrifugal ausbreiten (s. Abb. 11 I und Ausschnittvergrößerung in L); diese Zellreihen setzen sich im extraembryonalen Gewebe fort. Die exzentrisch liegende Domäne grenzt sich anterior weiterhin scharf vom stark gefärbten Randsaum ab und wird posterior von den Ketten Cx32 exprimierender Zellen durchzogen (s. Abb. 11 I). Ferner findet man im Stadium 3 im Bereich des posterioren Primitivstreifens eine Anhäufung stark Cx32 exprimierender Hypoblastzellen (schwarzer Pfeil in Abb. 11 I). In Semidünnschnitten erkennt man die kubischen, stark angefärbten Hypoblastzellen des Vorderen Randbogens, die zwei bis drei Zellreihen umfassen und vom Keimscheibenrand durch ein bis zwei Reihen Hypoblastzellen getrennt sind, die kein Cx32 exprimieren (weißer Pfeil in Abb. 11 N). Die Expression von Cx32 ist auf den Hypoblasten und das Dottersackepithel beschränkt; Zellen mit starker Expression treten lückenhaft auf und liegen in unmittelbarer Nachbarschaft von ungefärbten Zellen (s. Abb. 11 M und O). Im Stadium 4 (Ausbildung des Primitivknotens) zeigt sich keine wesentliche Änderung des Expressionsmusters, wobei sich im Vergleich zum Stadium 3 keine lokale Anhäufung Cx32 exprimierender Zellen im Bereich des Primitivstreifens findet (s. Abb. 11 E und J).

### 3.2.3 Expressionsmuster von *Connexin 43*

Bereits im frühen Stadium 0 wird Cx43 innerhalb der gesamten Keimscheibe exprimiert, wobei sich ein aufgelockertes, lückenhaftes Expressionsmuster findet; im extraembryonalen Gewebe wird kein Cx43 exprimiert (s. Abb. 12 A und G). Die Expression der Cx43-mRNA ist auf den Epiblasten beschränkt (Semidünnschnitte nicht gezeigt). Im Stadium 1 findet sich bei für dieses Stadium typischer regelmäßiger Randkontur eine lückenlose Expression von Cx43 innerhalb der Keimscheibe (s. Abb. 12 B und H).



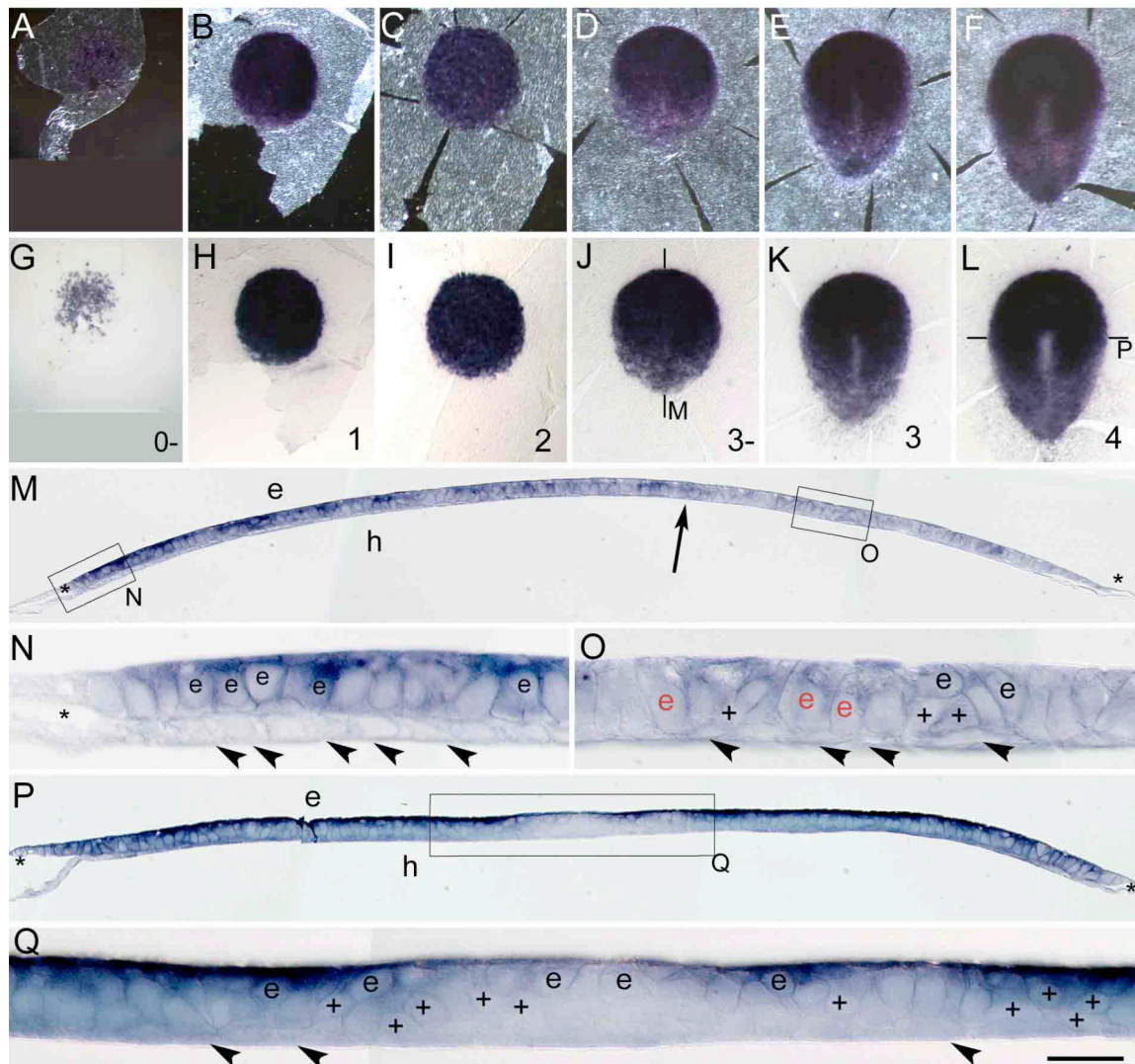


Abb. 12: Dorsale Aufsichten von Kaninchenkeimscheiben der Stadien 0 bis 4 nach *in situ* Hybridisierung mit Cx43 im Hellfeld (A-F) und Dunkelfeld (G-L). Die Keimscheiben in D/J und F/L wurden sagittal bzw. transversal geschnitten (Linie in J und L) und in M-O mit dem anterioren Pol nach links orientiert gezeigt. N, O und Q zeigen Ausschnittvergrößerungen aus M und P (durch die schwarzen Rechtecke angedeutet). Sternchen markieren den Keimscheibenrand. Die Pfeilspitzen zeigen auf Hypoblastzellen. e: Epiblast; e: flaschenförmige Epiblastzellen während mesenchymaler Transformation; +: Mesodermzellen; h: Hypoblast. Maßstabsbalken: A-J 400  $\mu$ m, M und P: 90  $\mu$ m, N, O und Q: 20  $\mu$ m.

Ab dem Stadium 2 schwächt sich am posterioren Rand des Embryos in einem Bereich, welcher der PGE entspricht, die Expressionsintensität ab (s. Abb. 12 I). Auch in den späteren untersuchten Stadien wird Cx43 in diesem Bereich schwächer exprimiert. Wie sich auch bei der morphologischen Betrachtung die PGE vom anterioren Teil der Keimscheibe hervorhebt, grenzt sich dieser Bereich unscharf von dem anterior gelegenen Bereich dichter Cx43-Expression ab. Somit entstehen innerhalb des Epiblasten zwei Areale unterschiedlicher Expressionsintensität, wobei das anteriore Areal dichter Cx43-Expression eine kreisrunde bis leicht querovale Kontur beibehält (s. Abb. 12 C-F und I-L). Semidünnschnitte zeigen, dass die Färbung auch in diesen Stadien auf den Epiblasten beschränkt bleibt und im apikalen Bereich der Zellen zu finden ist. Im anterioren Areal ist die Cx43-Expression stärker als in Epiblastzellen des posterioren Areals. Mesodermzellen zeigen ebenfalls eine schwache Expressionsintensität (s. Abb. 12 C und I, M und N, O). Ausschnittvergrößerungen des anterioren Pols zeigen stark gefärbte Epiblastzellen

bei fehlender Expression der spindelförmigen Hypoblastzellen des Vorderen Randbogens (s. Abb. 12 N).

Im späteren Stadium 3 tritt der nach anterior verlängerte Primitivstreifen aufgrund einer schwachen Expressionsintensität innerhalb des anterioren Areals hoher Expressionsintensität hervor (s. Abb. 12 K). Im Stadium 4 finden sich innerhalb des voll ausgebildeten Primitivstreifens Unterschiede der Expressionsintensität (s. Abb. 12 L): Im anterioren Teil des Primitivstreifens, der sich innerhalb des Areals starker *Cx43*-Expression befindet, erscheint die Expressionsintensität schwächer als im posterioren Teil, der sich in den Bereich schwächerer Expression in der PGE erstreckt. Epiblastzellen des Primitivknotens exprimieren kein *Cx43* oder nur schwach im apikalen Kompartiment (s. Abb. 12 P und Q). Die im Primitivstreifen entstehenden nach lateral auswandernden Mesodermzellen zeigen ebenfalls keine *Cx43*-Expression. Die den Primitivknoten umgebenden Epiblastzellen sind dagegen stark apikal gefärbt (s. Abb. 12 P und Q).

### 3.3 Isolierung, Charakterisierung und Expression von *Wnt3*, $\beta$ -*Catenin* und *Lymphoid enhancer binding factor 1 (Lef1)*

#### 3.3.1 Klonierung verschiedener *Wnt*-cDNAs

Mittels der degenerierten Primer, die nach der Methode von Gavin et al. (1990) aus hochkonservierten Sequenzabschnitten von *Wnt*-Molekülen abgeleitet waren (vgl. Abschnitt 2.9.6), wurden insgesamt 42 partielle cDNA-Abschnitte von den in Tabelle 6 dargestellten sechs verschiedenen *Wnt*-Proteinen des Kaninchens kloniert. Da unter diesen *Wnt*-cDNAs *Wnt3* das einzige Molekül ist, von dem bei einem Säuger bekannt ist, dass es eine unmittelbare Rolle im Gastrulationsprozess und bei der Achsenbildung spielt (Liu et al. 1999), wurde die Sequenz von *Wnt3* genauer analysiert und das Expressionsmuster dieses Gens an den für diese Untersuchung ausgewählten Stadien 0 bis 4 der Gastrulation des Kaninchens untersucht.

<b>Wnt-cDNA</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Plasmid aus Klon #</b>
Wnt2	14	1, 2, 4, 10, 11, 12, 13, 14, 19, 23, 24, 36, 59, 62
Wnt2b	10	3, 15, 29, 32, 39, 41, 42, 43, 53, 55
Wnt3	2	18, 51
Wnt5a	7	44, 46, 52, 54, 56, 57, 58
Wnt5b	5	33, 37, 48, 49, 63
Wnt7a	4	6, 21, 26, 50

Tabelle 6 : Zusammenstellung der im Kaninchen gefundenen *Wnt*-cDNAs.

#### 3.3.2 cDNA, Aminosäuresequenz und Expressionsmuster von *Wnt3*

Der klonierte Bereich von *Wnt3* ist 372 Bp (124 AS) lang, was 35 % des offenen Leserasters der Konsensus-cDNA von Maus, Mensch und Huhn entspricht. Er befindet sich in der für alle *Wnt*-Proteine charakteristischen Cysteinreichen Domäne (CRD), in der 23 bis 24 Cysteine hochkonserviert sind, wovon er neun konservierte Cystein-Residuen enthält, und sich zwischen AS 214 bis AS 336 der Konsensusproteinsequenz befindet (s. Abb. 13; NCBI Accession Number DQ786778).

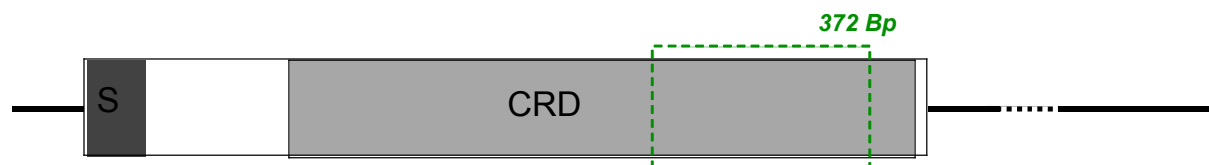


Abb. 13: Schematische Darstellung der *Wnt3*-cDNA; der kodierende Bereich ist als Rechteck, die untranslatierten Bereiche als waagerechte Linien dargestellt. Die cysteinreiche Domäne (CRD) ist hellgrau, die Signalsequenz (S) dunkelgrau hervorgehoben. Der klonierte cDNA-Abschnitt des Kaninchens umfasst 372 Bp und befindet sich innerhalb des grün markierten Bereiches.

Das klonierte cDNA-Fragment und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von *Wnt3* zeigt starke Homologien zu den bekannten Sequenzen von Mensch, Maus und Huhn (s. Tabelle 8)

cDNA Protein	hs	mm	gg	xl
OC	<b>91,9%</b> 98,3%	<b>93,2%</b> 99,1%	<b>85,7%</b> 98,3%	<b>74,8%</b> 90,2%

Tabelle 7: Homologien der cDNA- und daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Wnt3* des Kaninchens zu denen unterschiedlicher Spezies. oc: *oryctolagus cuniculus* (Kaninchen), hs: *homo sapiens* (Mensch), mm: *mus musculus* (Maus), gg: *gallus gallus* (Huhn), xl: *Xenopus laevis* (Krallenfrosch).

Im Stadium 1 zeigt sich eine gleichmäßige, flächige Expression von *Wnt3* ohne Intensitätsunterschiede innerhalb der gesamten Keimscheibe; im extraembryonalen Gewebe sind nur einige wenige einzeln liegende Zellen gefärbt, so dass die Begrenzung des Keimscheibenrandes deutlich erkannt wird (s. Abb. 14 A und G). Diese homogene, intensive *Wnt3*-Expression wurde neben dem in Abb. 14 A und G gezeigten Präparat noch in zwei weiteren Embryonen des Stadium 1 beobachtet (nicht gezeigt). Im Stadium 2 zeigt sich in einem posterioren sichelförmigen Areal des Embryos eine starke *Wnt3*-Expression, während *Wnt3* in zentralen Bereichen nicht mehr exprimiert wird (s. Abb. 14 B und H). Die posteriore Expressionsdomäne setzt sich entlang der Keimscheibenränder nach anterior fort und bildet am Rand der Keimscheibe zwei Ausläufer, welche die zentrale expressionsfreie Domäne zu etwa drei Viertel umranden (s. Abb. 14 I). Im späten Stadium 2 vergrößert sich die posteriore Expressionsdomäne und es finden sich *Wnt3*-mRNA Transkripte in der gesamten posterioren Hälfte der Keimscheibe, wobei die Expressionsintensität am posterioren Rand am stärksten ist und mit reduzierter Intensität bis etwa zur Mitte der Keimscheibe reicht. Die lateralen Spangen dieser Expressionsdomäne erstrecken sich nun mit abnehmender Expressionsintensität entlang des antero-lateralen Keimscheibenrandes, ohne jedoch den anterioren Pol ganz zu erreichen. Dabei umfassen sie nahezu vollständig das Areal *Wnt3*-freier Expression, das nun in der anterioren Keimscheibenhälfte liegt (s. Abb. 14 C und I). In Semidünnschnitten zeigt sich, dass Epiblast- und Hypoblastzellen in der posterioren Keimscheibenhälfte *Wnt3* exprimieren (s. Abb. 14 M und N). Die Expressionsintensität ist im posterioren Drittel des Embryos am stärksten und schwächt sich nach anterior bis etwa zur Mitte der Keimscheibe gleichmäßig ab (Klammer in Abb. 14 M). Das Zytoplasma der Epiblast- und Hypoblastzellen ist gleichmäßig gefärbt (s. Abb. 14 N). Im Stadium 3 findet sich eine verstärkte *Wnt3*-Expression im Bereich des Primitivstreifens mit einer Verbreiterung der Expressionsdomäne am posterioren Rand der Keimscheibe. Im Vergleich zum Stadium 2+ ist das Areal starker Expressionsintensität innerhalb der *Wnt3*-Domäne im

Stadium 3 allerdings weniger flächig und auf ein rautenförmiges Areal des posterioren Primitivstreifens beschränkt (s. Abb. 14 D und J).

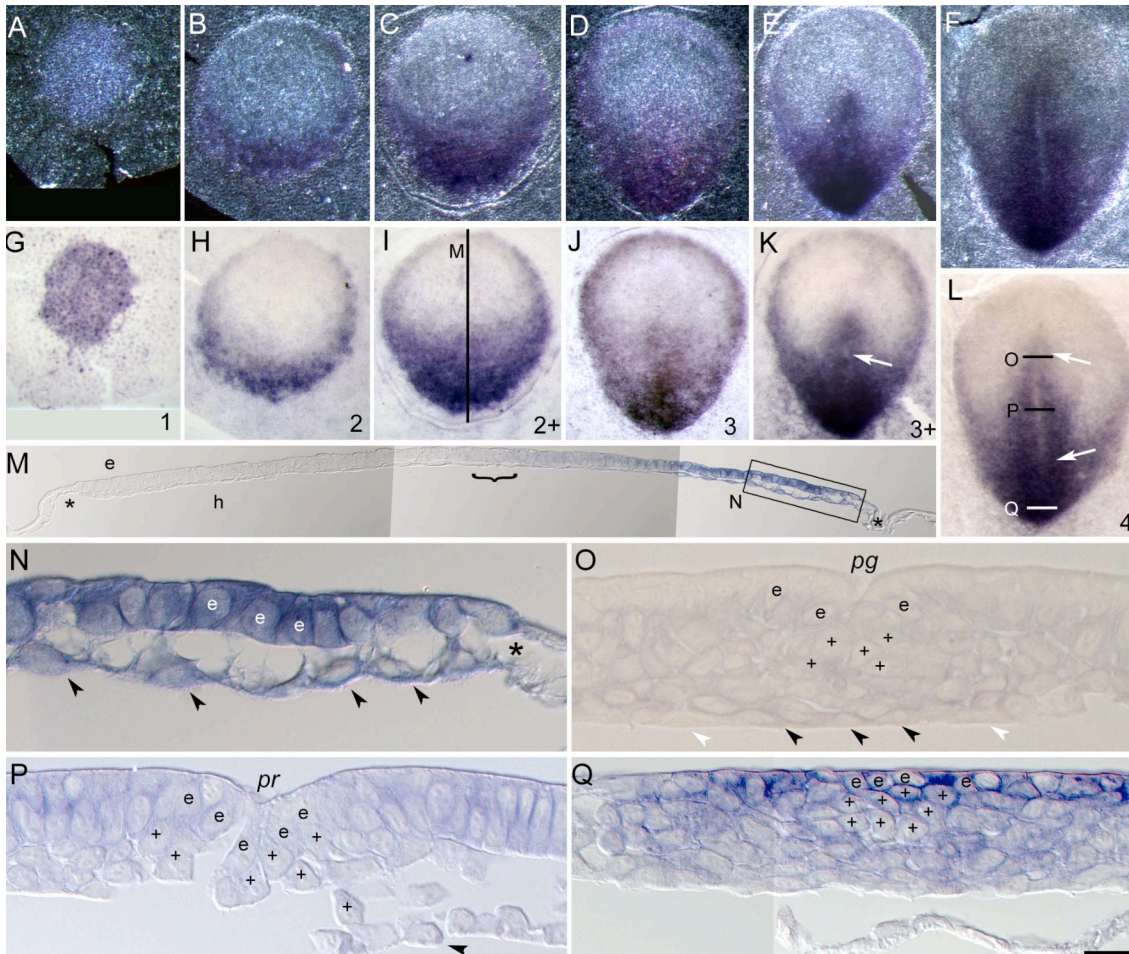


Abb. 14: Expressionsmuster von *Wnt3* in den Stadien 1 bis 4. Aufsichten von dorsal im Dunkelfeld (A-F) und Hellfeld (G-L). M zeigt einen medianen Sagittalschnitt durch die Keimscheibe in I (schwarze Linie). Der Schnitt ist mit dem anterioren Pol zur linken Seite orientiert gezeigt; Sternchen markieren den Keimscheibenrand. Die Klammer in M deutet auf die anteriore Begrenzung der *Wnt3*-Expressionsdomäne. Eine Ausschnittvergrößerung aus M (schwarze Umrandung) ist in N gezeigt. O bis Q zeigen drei Transversalschnitte durch die Keimscheibe in F/L; die Lage der Schnitte ist durch die waagerechten Linien in L angedeutet. e: Epiblast, h: Hypoblast, +: Mesoderm; pg: Primitivgrube; pr: Primitivrinne. Pfeilspitzen deuten auf Hypoblastzellen (schwarz: mit *Wnt3*-Expression; weiß: ohne *Wnt3*-Expression). Maßstabsbalken: A bis L 240  $\mu$ m, M 50  $\mu$ m, N 10 $\mu$ m, O-Q 15 $\mu$ m.

Der anteriore Teil des Primitivstreifens, der in diesem Stadium fast die Mitte der Keimscheibe erreicht, exprimiert weniger stark *Wnt3*, und es zeigt sich eine gleichmäßige Abschwächung der *Wnt3*-Expressionsintensität von posterior nach anterior. Die *Wnt3*-exprimierenden Zellen entlang des Keimscheibenrandes bilden im Stadium 3 einen geschlossenen Ring, der in diesem Stadium kurzzeitig bis an den anterioren Pol der Keimscheibe heranreicht (s. Abb. 14 D und J). Allerdings ist dieser Ring nicht in allen untersuchten Embryonen des Stadiums 3 vollständig geschlossen wie in der Keimscheibe in Abb. 14 D/J. Auch in den Stadien 3+ und 4 wird *Wnt3* stark im posterioren und schwächer im anterioren Abschnitt des Primitivstreifens exprimiert, wobei sich das rautenförmige posteriore Areal starker Expression durch eine leichte Verbreiterung entlang des Keimscheibenrandes hervorhebt (s. Abb. 14 E, F und K, L). Im mittleren Drittel des anterioren Primitivstreifens wird *Wnt3* zunächst in einem kleinen Bereich schwächer exprimiert (weißer Pfeil in Abb. 14 K). Im Stadium 4 weitert sich dieser Bereich aus und markiert die Primitivrinne (zwischen den weißen Pfeilen in Abb. 14 L). Während sich im Stadium 3 *Wnt3*-mRNA teilweise entlang des gesamten Keimscheibenrandes findet (s. Abb. 14 K), wird im Stadium 3+ entlang des

anterioren Randes weniger *Wnt3* exprimiert und im Stadium 4 nur noch in zwei kurzen Ausläufern am Keimscheibenrand in der posterioren Hälfte der Keimscheibe (s. Abb. 14 L).

Im Bereich des Primitivknotens exprimieren medial gelegene Epiblastzellen schwach *Wnt3* in basalen Zellkompartimenten (s. Abb. 14 O). Apikal sowie in Epiblastzellen lateral des Primitivknotens findet sich keine *Wnt3*-Expression. Mesodermzellen exprimieren *Wnt3* im gesamten Zellkompartiment. Wie der Epiblast zeigt die in diesem Bereich ventral liegende Zellschicht, wobei es sich schon um definitive Endodermzellen handeln könnte, in medialen Bereichen eine schwache *Wnt3* Expression (schwarze Pfeilspitzen in Abb. 14 O). Lateral davon gelegene Zellen exprimieren kein *Wnt3* (weiße Pfeilspitzen in Abb. 14 O). Im anterioren Teil des Primitivstreifens findet sich *Wnt3* im gesamten Zellkompartiment von Epiblastzellen, wobei 2-3 medial gelegene Epiblastzellreihen, welche die Primitivrinne umgeben (s. Abb. 14 P), schwächer *Wnt3* exprimieren als laterale Epiblastzellen. Mesodermzellen (+) sowie die ventrale Zellschicht (schwarze Pfeilspitze in Abb. 14 P) exprimieren schwach *Wnt3*. Im posterioren Teil des Primitivstreifens exprimieren ebenfalls alle drei Zellschichten *Wnt3*, wobei die Expressionsintensität insgesamt stärker ist als im anterioren Teil (s. Abb. 14 Q). Epiblastzellen sind dabei stärker gefärbt als Mesodermzellen oder die Zellen der am weitesten ventral liegenden Schicht.

### 3.3.3 cDNA, Aminosäuresequenz und Expressionsmuster von $\beta$ -Catenin

Mit Hilfe der degenerierten Primer (vgl. Abschnitt 2.3.3) wurde ein 1451 Bp langes Fragment kloniert, welches der zu erwartenden Fragmentgröße der eingesetzten Primerkombination „ $\beta$ Cat +/- 01“ in der nested-PCR entspricht. Das Fragment und die daraus abgeleitete Proteinsequenz zeigt starke Homologien zu den Sequenzen von Mensch, Maus, Huhn und Frosch (s. Tabelle 8; NCBI Accession Number: DQ786778).

cDNA Protein	hs	mm	gg	xl
OC	94% 99,5%	88,9% 99,5%	83,3% 99,3%	81,2% 98,5%

Tabelle 8: Homologien des im Kaninchen amplifizierten cDNA-Fragmentes von  $\beta$ -Catenin und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen zu Sequenzen unterschiedlicher Spezies. oc: *oryctolagus cuniculus* (Kaninchen), hs: *homo sapiens* (Mensch), mm: *mus musculus* (Maus), gg: *gallus gallus* (Huhn); xl: *xenopus laevis* (Krallenfrosch). Accession Numbers: *mus musculus* NM\_007614, *homo sapiens* X87838, *gallus gallus* NM\_225081, *xenopus laevis* M77013

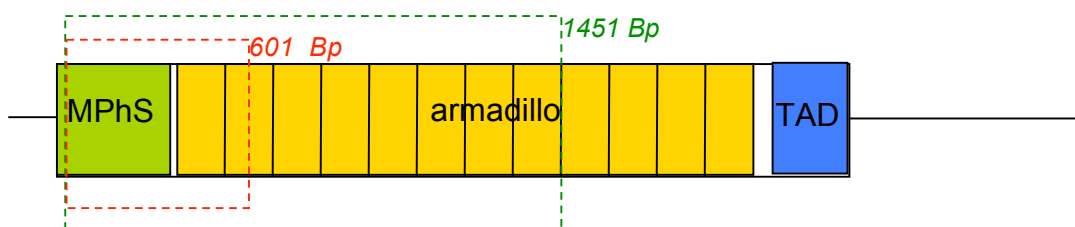


Abb. 15: Schematische Darstellung der cDNA von  $\beta$ -Catenin. Der kodierende Bereich ist als Rechteck dargestellt, die untranslatierten Bereiche der 5'- und 3'-Region als waagerechte Linien. Der Bereich des offenen Leserasters der für eine „Multiple Phosphorylation Site“ (MPhS) kodiert, ist grün, der für die zwölf Armadillo-Motive (arm) kodiert gelb und derjenige, der für eine Transkriptionsaktivierungsdomäne kodiert (TAD), blau hervorgehoben. Die 1451 Bp umfassende klonierte Sequenz des Kaninchen ist mit dem grün gestrichelten Kasten umrandet. Das 601 Bp lange Fragment (rote Umrandung) wurde zur Generierung der cRNA-Sonde für die *in situ* Hybridisierung verwendet.

Initiale *in situ* Hybridisierungsexperimente mit einer cRNA-Sonde, die aus der gesamten im Kaninchen amplifizierten  $\beta$ -Catenin-Sequenz transkribiert wurde, zeigte auch bei sehr langen Inkubationszeiten in der Substratlösung nur sehr schwache Farbreaktionen. In der Annahme, dass diese Sonde mit 1450 Bp zu lang sein könnte, um die Membranbarriere zu überwinden und in das Zytoplasma der Zellen zu gelangen, wurde mit Hilfe eines genspezifischen Primers („ $\beta$ Cat short“, vgl. Abschnitt 2.3.3) eine cRNA-Sonde generiert, die mit 601 Bp um mehr als die Hälfte kürzer ist (s. roter Kasten in Abb. 15). *In situ* Experimente mit dieser cRNA-Sonde zeigten nach wenigen Stunden eine ausreichende Farbreaktion und so wurde diese Sonde zur Aufklärung des  $\beta$ -Catenin-Expressionsmuster eingesetzt.

Im Stadium 0 finden sich  $\beta$ -Catenin-Transkripte innerhalb der gesamten Keimscheibe und eine schwache Expression im extraembryonalen Gewebe. Die Keimscheibe grenzt sich dadurch in der Hellfeldbetrachtung mit einer für das frühe Stadium 0 charakteristischen unregelmäßigen Randkontur scharf ab (s. Abb. 16 A und G).

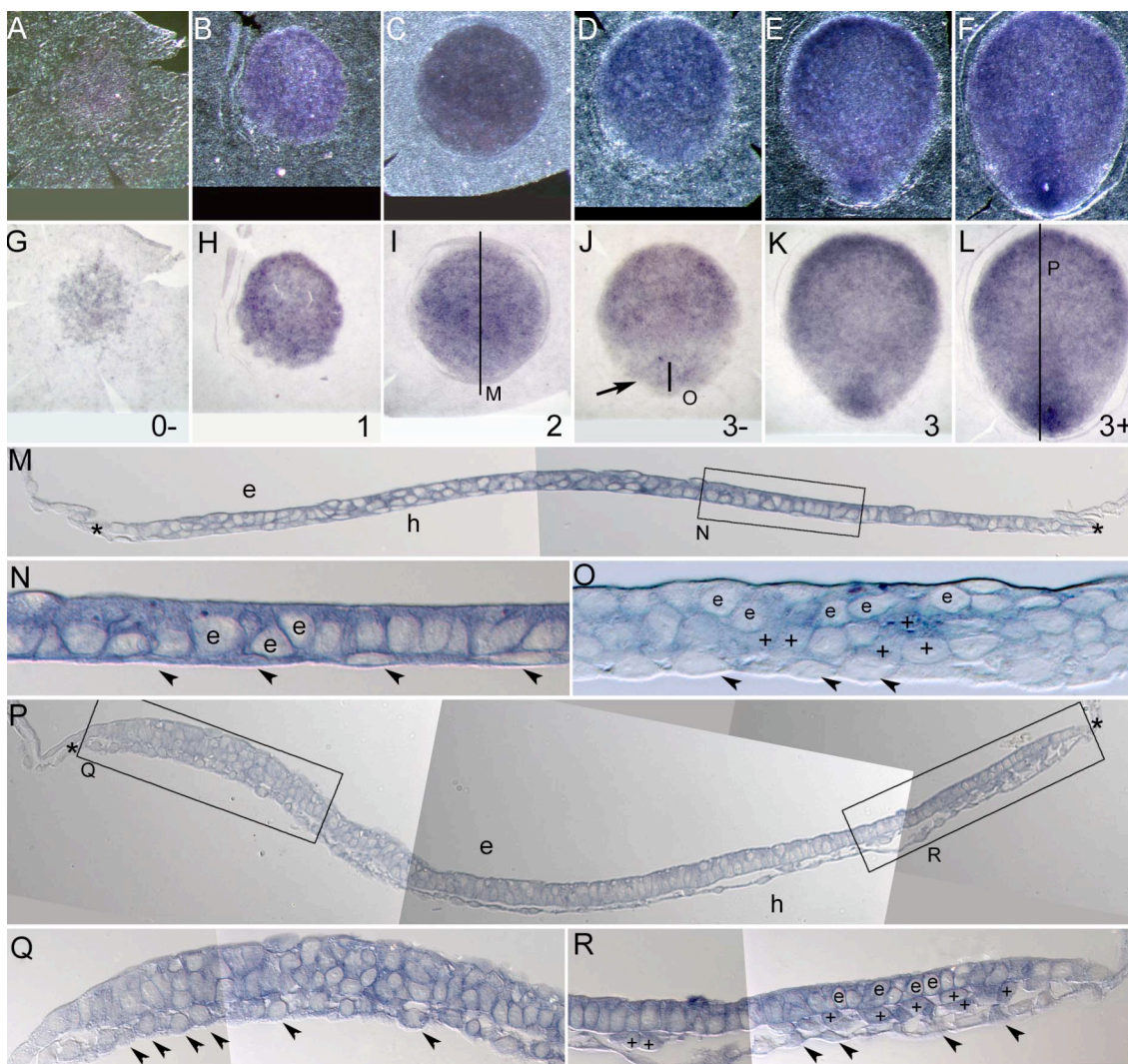


Abb. 16: Expression von  $\beta$ -Catenin in den Stadien 0 bis 3+. Aufsichten von dorsal im Dunkelfeld (A-F) und Hellfeld (G-L). M, O und P zeigen sagittale Semidünnschnitte der Keimscheiben in I, J und L (durch die schwarzen Linien angedeutet). In N, Q und R sind Ausschnittvergrößerungen aus M und P gezeigt (im Bereich der schwarzen Umrandungen). Der Pfeil in J deutet auf eine Zunahme der Expressionsintensität in einem längs-ovalen Areal des sich bildenden Primitivstreifens. e: Epiblast, h: Hypoblast, +: Mesoderm; Pfeilspitzen:  $\beta$ -Catenin exprimierende Hypoblastzellen. Maßstabsbalken: 300  $\mu$ m in A-L, 40  $\mu$ m in M, 12  $\mu$ m in N und O, 50  $\mu$ m in P und 20  $\mu$ m in Q und R.

Das Expressionsmuster ist lückenhaft und inhomogen, wobei sich nur wenige stark  $\beta$ -Catenin exprimierende Zellen finden lassen. Die Expressionsintensität ist insgesamt im Vergleich zu späteren Stadien geringer. Im Stadium 1 findet sich ringförmig eine stärkere  $\beta$ -Catenin-Expression mit etwas intensiverer Färbung entlang des antero-lateralen Keimscheibenrandes und in der posterioren Keimscheibenhälfte (s. Abb. 16 B und H). Im Zentrum der Keimscheibe hebt sich dadurch ein Bereich mit geringerer Expressionsintensität ab, der von diesem Ring stärkerer Expression umgeben ist. Dieses Muster bleibt im Stadium 2 erhalten, allerdings nimmt der Ring nun eine querovale Form an und liegt im anterioren Drittel der Keimscheibe (s. Abb. 16 C und I). In einem am posterioren Rand gelegenen sichelförmigen Areal wird  $\beta$ -Catenin schwächer exprimiert. In Semidünnschnitten zeigen sich Epiblast- und Hypoblastzellen, die  $\beta$ -Catenin exprimieren. Die Expressionsintensität ist in beiden Zellschichten gleich stark (s. Abb. 16 M und N). Extraembryonal ist im Trophoblasten und Dottersackepithel nur eine geringe  $\beta$ -Catenin Expression nachweisbar (nicht gezeigt).

Im frühen Stadium 3 exprimieren wenige Zellen innerhalb des posterioren Areals schwacher Expressionsintensität verstärkt  $\beta$ -Catenin. Diese befinden sich in einer medial gelegenen quer-ovalen Domäne am posterioren Keimscheibenrand (s. schwarzer Pfeil in Abb. 16 J). Semidünnschnitte dieser Region zeigen neben einer schwachen Expressionsintensität im Epi- und Hypoblasten eine zum Teil verstärkte Expression auch in Mesodermzellen (s. Abb. 16 O). Diese Domäne verstärkter  $\beta$ -Catenin-Expression vergrößert sich mit der Verlängerung des Primitivstreifens im Stadium 3 (s. Abb. 16 E und K). Im späten Stadium 3 reicht die Domäne mit verstärkter  $\beta$ -Catenin-Expression bis in zentrale Bereiche der Keimscheibe, wobei die Expressionsintensität in der Nähe des posterioren Randes am stärksten ist und sich nach anterior abschwächt. Weiterhin findet sich eine starke Expression entlang des vorderen Keimscheibenrandes mit reduzierter Expression im Zentrum der anterioren Keimscheibenhälfte (s. Abb. 16 E/F und K/L). In Semidünnschnitten finden sich  $\beta$ -Catenin-mRNA-Transkripte in Epiblast-, Mesoderm- und Hypoblastzellen (s. Abb. 16 P-Q) sowie in geringerem Umfang auch im Dottersackepithel und Trophoblastzellen (nicht gezeigt), wobei  $\beta$ -Catenin in den drei Zellschichten der Keimscheibe gleich intensiv exprimiert wird. In den ebenfalls untersuchten Stadien 4 und 5 zeigt sich keine wesentliche Abweichung von diesem Muster; Zellen des Primitivknotens und des Chordafortsatzes zeigen eine schwache  $\beta$ -Catenin-Expression und damit keinen Unterschied der Expressionsintensität im Vergleich zu den umliegenden Zellen (nicht gezeigt).

### 3.3.4 cDNA, Aminosäuresequenz und Expressionsmuster von *Lef1*

Mit Hilfe degenerierter Primer (vgl. Abschnitt 2.3.3) wurde ein Fragment innerhalb des ORF von *Lef1* und ein zweites Fragment, das den Anfang des 3'UTR beinhaltet, amplifiziert.

Das interne Fragment ist 929 Bp (309 As) lang (s. grünes Rechteck in Abb. 17); das Fragment, das auch den 3'UTR beinhaltet, ist 354 Bp lang und umfasst 125 Bp des ORF und die ersten 129 Bp des 3'UTR (s. rot umrandeter Bereich in Abb. 17). Durch einen Vergleich der beiden cDNA-Sequenzen ergibt sich eine 1264 Bp lange Konsensussequenz (NCBI Accession Number: DQ786779). Die Sequenz umfasst über 90% des ORF und ist stark homolog zu den Sequenzen

von Mensch, Maus und Huhn (Accession Number: *homo sapiens* NM\_016269; *mus musculus* BC057543; *gallus gallus* NM\_205013).

cDNA Protein	hs	mm	gg
oc	94,8%	90,9%	78,8%
	<b>98,1%</b>	<b>96,5%</b>	<b>87,0%</b>

Tabelle 9: Homologien der cDNA- und daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Lef1* des Kaninchens zu denen unterschiedlicher Spezies. Beim Vergleich der Kaninchensequenzen mit denen anderer Spezies wurden die Sequenzen auf die Länge der Kaninchensequenz gekürzt. oc: *oryctolagus cuniculus* (Kaninchen), hs: *homo sapiens* (Mensch), mm: *mus musculus* (Maus), gg: *gallus gallus* (Huhn)

Ein detaillierter Vergleich der oben genannten cDNAs zeigt, dass das klonierte Fragment des Kaninchens eine Lücke von 84 Bp aufweist und dies exakt dem Exon 6 der genomischen Sequenz des menschlichen *Lef1* Gens entspricht (Hovanes et al. 2000). Die Lücke beginnt nach dem 576igsten Basenpaar (AS 192) der klonierten Kaninchensequenz und erstreckt sich von Bp 651 bis 734 (AS 214 bis 241) der *Lef1*-Sequenz des Menschen, zu welcher die Sequenz die stärksten Homologien aufweist (vgl. Abschnitt 4.3.7). Dies sind typische Merkmale einer Spleißvariante des *Lef1* Gens.

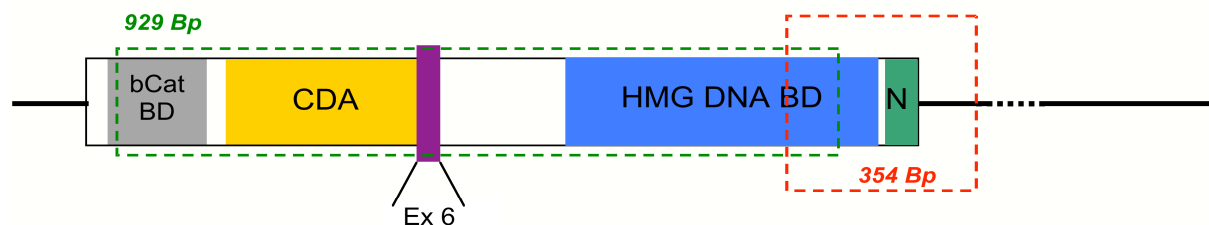


Abb. 17: Schematische Darstellung der cDNA von *Lef1*. Der kodierende Bereich ist als Box dargestellt, die untranslatierten Bereiche der 5'- und 3'-Region als waagerechte Linien. Die 929 Bp umfassende klonierte Sequenz des Kaninchens ist mit dem grün gestrichelten Kasten umrandet. Die farblich hervorgehobenen Bereiche kodieren für funktionelle Domänen des Proteins:  $\beta$ CatBD:  $\beta$ -Catenin Bindungsdomäne; CDA: Kontextabhängige Aktivierungsdomäne; HMG DNA BD: HMG („high mobility group“) DNA-Bindungsdomäne; N: N-Variante des carboxyterminalen Endes. Die Position des Exon 6 ist innerhalb des violetten Rechteckes markiert (vgl. Hovanes et al. 2000).

Um zu überprüfen ob diese Spleißvariante (nachfolgend als *Lef1* <sup>$\Delta$ Exon 6</sup> bezeichnet) auch in den untersuchten jüngeren Entwicklungsstadien des Kaninchens exprimiert wird, wurde die *Lef1* cDNA aus 6,2 Tage alten Kaninchenembryonen amplifiziert und auf einem Agarosegel analysiert (vgl. Abschnitt 2.9.3). Es wurde ein (+)Primer im Bereich des ersten Exons und ein (-)Primer am Ende des siebten Exons der genomischen Sequenz der cDNA gelegt (vgl. Primer in Abschnitt 2.3.3.). Nach der PCR (Standard PCR-Bedingungen, 35 Zyklen; vgl. Abschnitt 2.9.4) wurden zwei Amplifikate gefunden: eine breitere Bande, welche der Spleißvariante *Lef1* <sup>$\Delta$ Exon 6</sup> entspricht („2“ in Abbildung Abb. 18) und eine um ca. 50-100 Bp größere im Vergleich zu „2“ schmalere Bande, die der *Lef1* cDNA mit ungespleißtem Exon 6 entspricht („1“ in Abbildung Abb. 18).

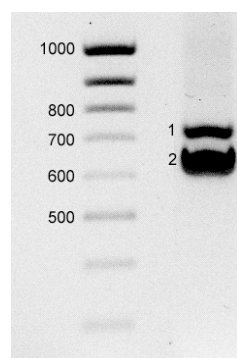


Abb. 18: Agarosegelelektrophorese zur Analyse der *Lef1* Spleißvarianten, die aus 100 ng Gesamt-cDNA eines 6,2 Tage alten Kaninchenembryos amplifiziert wurden. Ein Zehntel des PCR-Reaktionsansatzes wurde auf einem 1%igen TBE Agarosegel analysiert (rechte Bande). Es fanden sich zwei Fragmente: (1) *Lef1* mit Exon 6 (theoretisch erwartete Fragmentgröße von 720 Bp) und (2) *Lef1* <sup>$\Delta$ Exon 6</sup> (theoretisch erwartete Fragmentgröße von 640 Bp). Linke Bande: 100 Bp Marker (Fermentas).

Aus *Lef1* <sup>$\Delta$ Exon 6</sup> wurde Digoxigenin-markierte cRNA zur Aufklärung des Expressionsmusters transkribiert und das Expressionsmuster in den Stadien 1 bis 4 untersucht. Kontrollexperimente mit der ungespleißten Variante (*Lef1*) zeigten keinen Unterschied der Expressionsmuster, die mit der Sonde



von *Lef1*<sup>ΔExon 6</sup> durchgeführt wurden. Der Versuch eine Sonde zu generieren, die spezifisch an ungespleißte *Lef1*-Transkripte bindet, die das Exon 6 enthalten, gelang aufgrund der Kürze des alternativ gespleißten Exons (84 Bp) nicht.

Die Expression von *Lef1* beginnt erst kurz vor der Primitivstreifenbildung im Stadium 2; in früheren untersuchten Stadien (Stadium 0 und 1) konnte unter den hier angewandten Bedingungen keine *Lef1*-mRNA-Transkripte nachgewiesen werden (s. Abb. 19 A und F).

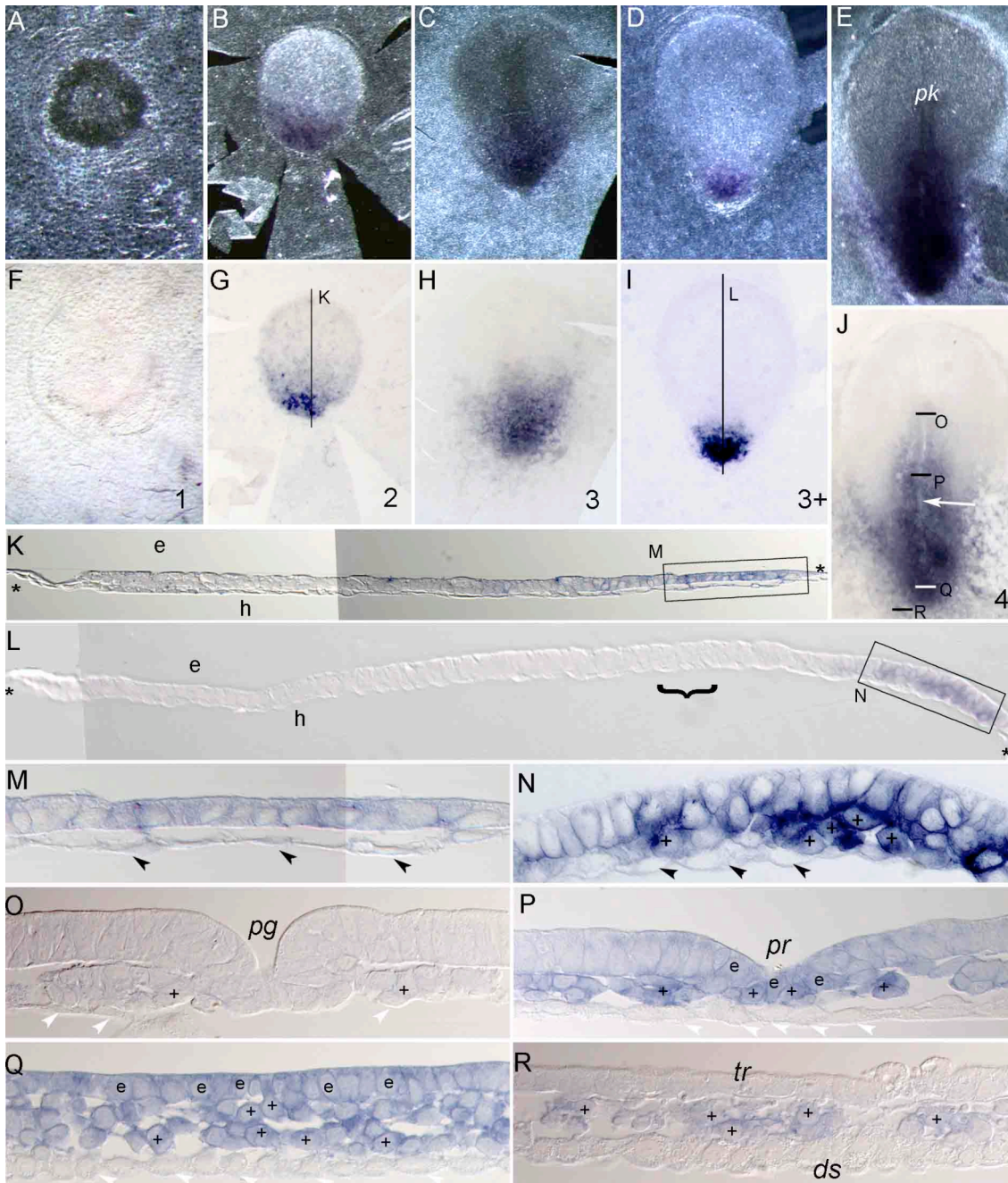


Abb. 19: Expression von *Lef1* in den Stadien 1 bis 4. Aufsichten von dorsal im Dunkelfeld (A-E) und Hellfeld (F-J). K und L zeigen sagittale Semidünnschnitte (5  $\mu$ m) der Keimscheiben in G und H (angedeutet durch die schwarzen Linien); die Schnitte sind mit dem anterioren Pol des Embryos nach links orientiert gezeigt, Sternchen markieren den Keimscheibenrand. M und N zeigen Ausschnittvergrößerungen aus K und L (angedeutet durch die schwarzen Rechtecke). O bis R zeigen transversale Schnitte der Keimscheibe in E/J; die Positionen der Schnitte sind durch die waagerechten Linien in J angedeutet: O: Primitivknoten; P: anteriorer Primitivstreifen; Q: posteriorer Primitivstreifen; R: extraembryonal am posterioren Keimscheibenpol. e: Epiblast; h: Hypoblast; +: Mesodermzellen; Pfeilköpfe: Hypoblastzellen (weiß: *Wnt3*-exprimierend; schwarz: ohne *Wnt3*-Expression); pk: Primitivknoten; pg: Primitivgrube; pr: Primitivrinne; tr: Trophoblast; ds: Dottersackepithel. Maßstabsbalken: A-J 350  $\mu$ m, K und L 50  $\mu$ m, M-R 15  $\mu$ m.

*Lef1* mRNA-Transkripte finden sich im Stadium 2 in der posterioren Hälfte der Keimscheibe (s. Abb. 19 B und G). Die Expressionsintensität ist in einem querovalen Areal am posterioren Keimscheibenrand am stärksten: hier liegen einzelne stark *Lef1* exprimierende Zellen innerhalb eines halbkreisförmigen Bereichs mit schwacher *Lef1*-Expressionsintensität, der etwa dem posterioren Drittel der KS entspricht. Die Expression in der anterioren Hälfte der Keimscheibe erscheint aufgelockert und ist von expressionsfreien Lücken durchzogen. Von posterior nach anterior schwächt sich die Expressionsintensität kontinuierlich ab (s. Abb. 19 B und G). In Semidünnschnitten findet sich die *Lef1* Expression in Epiblastzellen, wobei deren gesamtes Zytoplasma angefärbt ist; Hypoblastzellen in posterioren Bereichen der Keimscheibe exprimieren *Lef1* nur schwach (s. Abb. 19 K und M). Im frühen Stadium 3 vergrößert sich die posteriore Expressionsdomäne und es finden sich stark *Lef1* exprimierende Zellen innerhalb der gesamten PGE und entlang des sich bildenden Primitivstreifens (s. Abb. 19 C und H). Die Expressionsdomäne erscheint weniger lückenhaft als im Stadium 2 und bildet medial in der Verlängerung des Primitivstreifens und beidseits lateral entlang des Keimscheibenrandes kurze Ausläufer. In der anterioren Hälfte wird kein *Lef1* exprimiert. Im späten Stadium 3 finden sich *Lef1*-Transkripte in Zellen, welche die posteriore Hälfte des Primitivstreifens umgeben (s. Abb. 19 D und I). Die Expressionsdomäne ist kleiner als in den vorangehenden Stadien, die Intensität jedoch stärker mit weniger expressionsfreien Lücken. In Schnitten zeigen sich stark *Lef1* exprimierende Mesodermzellen und Epiblastzellen; in manchen Zellen ist im basalen Zellkompartiment *Lef1* stärker exprimiert als apikal; der Hypoblast exprimiert *Lef1* nur schwach oder überhaupt nicht (s. Abb. 19 L und N).

Im Stadium 4 exprimieren Zellen, welche den gesamten Primitivstreifen sowie den Primitivknoten lateral begrenzen, *Lef1* (s. Abb. 19 E und J). Innerhalb eines schmalen midsagittal gelegenen Bandes entlang der vorderen drei Viertel des Primitivstreifens, welches der Primitivrinne entspricht, findet sich eine reduzierte Expression von *Lef1* (s. weißer Pfeil in Abb. 19 J). Die Expressionsintensität ist am posterioren Pol des Embryos am stärksten und schwächt sich kontinuierlich nach anterior ab. Im Bereich des Primitivknotens findet sich eine sehr schwache *Lef1*-Expression. Entlang des Randes des posterioren Keimscheibendrittels finden sich ebenfalls *Lef1* exprimierende Zellen. Transversale Semidünnschnitte in verschiedenen Bereichen des Primitivstreifens zeigen *Lef1* exprimierende Epiblast- und Mesodermzellen; der Hypoblast exprimiert kein *Lef1* (s. Abb. 19 O-Q). Die Expressionsstärke ist in Epiblastzellen des Primitivknotens sowie in Mesodermzellen, die den Primitivknoten umgeben, sehr schwach (s. Abb. 19 O). Im Bereich des Primitivstreifens findet sich eine starke Expression von *Lef1* in medial gelegenen Epiblast- und Mesodermzellen. Im Bereich des anterioren Primitivstreifens umfasst die *Lef1*-Expressionsdomäne etwa ein Drittel bis die Hälfte der Keimscheibenbreite, während im posterioren Drittel des Primitivstreifens Zellen entlang der gesamten Keimscheibenbreite *Lef1* exprimieren. Schwache *Lef1*-Expression findet sich ebenfalls in extraembryonalen Mesodermzellen, welche die posteriore Keimscheibenhälfte umgeben (s. Abb. 19 J und R).

### 3.4 Isolierung, Charakterisierung und Expression von *Cerberus-related1 (Cer1)*

#### 3.4.1 cDNA, Aminosäuresequenz und Expressionsmuster

Durch einen Sequenzvergleich der bekannten *Cer1* cDNA-Sequenzen von Mensch und Maus wurden degenerierte Primer abgeleitet, mit denen ein 695 Bp umfassender Bereich innerhalb des ORF von *Cer1* aus dem Kaninchen amplifiziert wurde (s. Abb. 20; NCBI Accession Number AY570542).

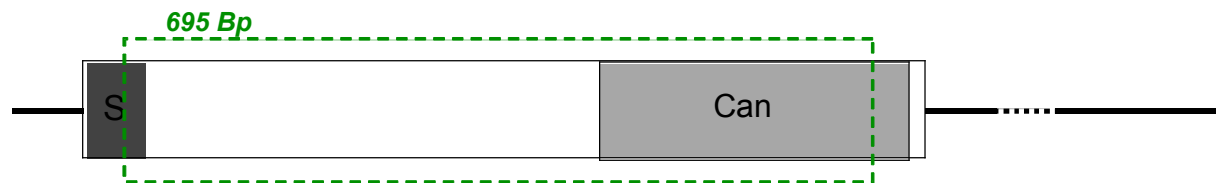


Abb. 20: Schematische Darstellung der cDNA von *Cer1*. Das offene Leseraster (ORF) ist als Kasten dargestellt, die untranslatierten Bereiche am 5'- bzw. 3'-Ende als dünne waagerechte Striche. Innerhalb des ORF ist der Bereich, der für die Signalsequenz (schwarz) und die cysteinreiche Region (Can-Domäne, grau) kodieren hervorgehoben. Der im Kaninchen klonierte 695 Bp umfassende Bereich ist grün umrandet.

Der klonierte Bereich von *Cer1* umfasst über 80% der Sequenzlänge des offenen Leserasters der Konsensus cDNA-Sequenz (ORF *mus musculus*: 816 Bp, *homo sapiens*: 804 Bp, *gallus gallus*: 816 Bp; *Cerberus xenopus laevis*: 810 Bp). Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist 231 Aminosäuren lang, wovon sich der C-terminale Teil innerhalb einer Region mit neun hochkonservierten Cysteinen befindet (die sogenannte Can-Domäne), von denen sieben Cysteine auch in der klonierten Sequenz des Kaninchens enthalten sind. Der amplifizierte cDNA-Abschnitt und die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt Homologien zu den bekannten *Cer1*-Sequenzen von Mensch und Maus, sowie zu den Cerberus-Sequenzen von Huhn und Frosch (s. Tabelle 10).

cDNA Protein	hs	mm	gg	xl
OC	83,0%	77,0%	49,7%	41,6%
	<b>76,4%</b>	<b>68,5%</b>	<b>38,0%</b>	<b>28,0%</b>

Tabelle 10: Übereinstimmungen der *Cer1*-Sequenz des Kaninchens auf cDNA und Proteinebene zu den *Cer1* bzw. Cerberus-Sequenzen verschiedener Spezies. Beim Vergleich wurden die Sequenzen auf die Kaninchensequenz gekürzt. Oc: *oryctolagus cuniculus* (Kaninchen), hs: *homo sapiens* (Mensch, Accession Number: NP\_005445;), mm: *mus musculus* (Maus Accession Number: NM\_009887), gg: *gallus gallus* (Huhn Accession Number: AF139721), xl: *xenopus laevis* (Frosch Accession Number: U64831).

Im frühen Stadium 0 exprimieren wenige einzeln liegende Zellen im Zentrum der Keimscheibe *Cer1* (s. Abb. 21 A und F). Im späten Stadium 0 bei größerem Durchmesser der Keimscheibe vergrößert sich die zentrale *Cer1* exprimierende Domäne auf etwa 20-30 Zellen; es zeigt sich keine polarisierte Struktur dieser Domäne oder besondere Verteilung der *Cer1* exprimierenden Zellen (s. Abb. 21 A/F, B/G). In allen untersuchten Stadien bildet die *Cer1*-Domäne kein flächig-homogenes, sondern ein aufgelockertes Muster mit expressionsfreien Lücken. Zu Beginn der morphologischen Differenzierung im Stadium 1 findet sich die Domäne in anterioren Bereichen der Keimscheibe zwischen Keimscheibenzentrum und vorderem Rand (s. Abb. 21 C und H). Mit Zunahme des Keimscheibendurchmessers vergrößert sich die Domäne und bildet ein pilzförmiges Muster, dessen Stiel mit dem Zentrum in Verbindung steht (s. Abb. 21 D-E, I-J). Die Pilzform entsteht durch zwei „Schultern“ nicht *Cer1* exprimierender Zellen und einem

stiefelförmigen Areal starker Expression. In Semidünnschnitten zeigt sich, dass ausschließlich Hypoblastzellen *Cer1* exprimieren (s. Abb. 21 K und L).

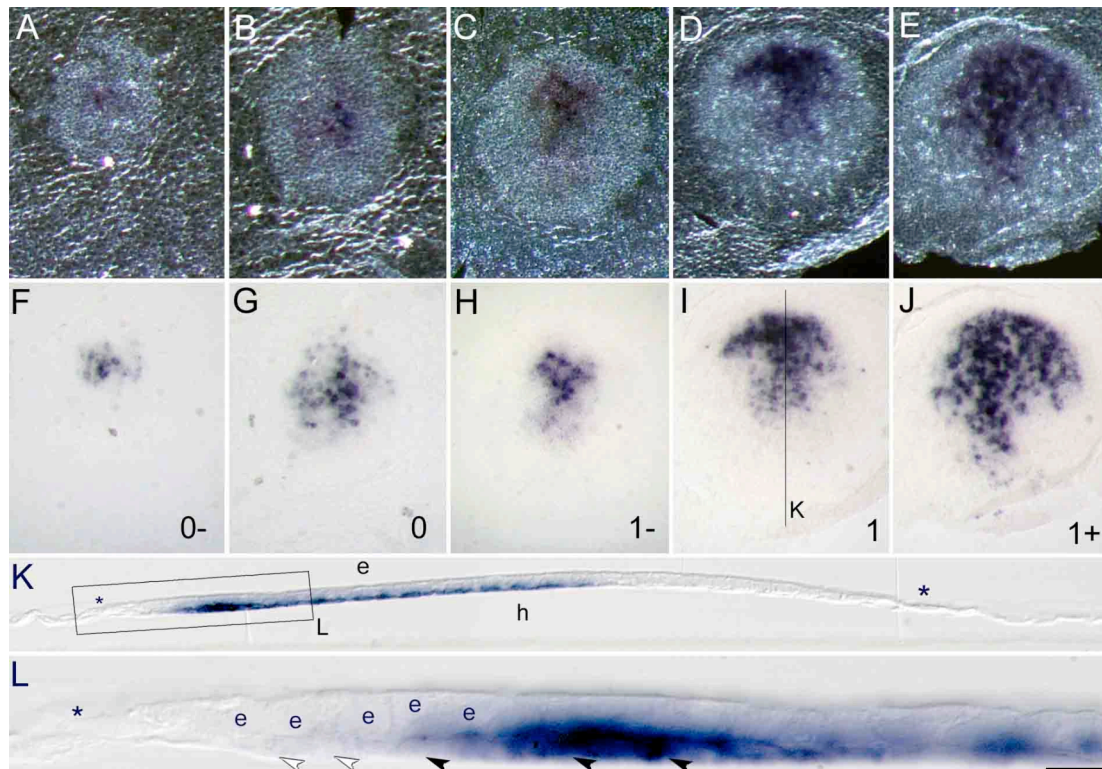


Abb. 21: Expression von *Cer1* in jungen Kaninchenkeimscheiben der Stadien 0 und 1; Aufsichten von dorsal im Dunkelfeld (A-E) und Hellfeld (F-J). Ein Semidünnschnitt des Eymbryos in I (angedeutet durch die Linie in I) ist in K gezeigt. Der vordere Rand dieses Schnittes ist in L vergrößert dargestellt (s. schwarze Umrandung in K). Sternchen markieren den Keimscheibenrand. In L sind mit e Epiblastzellen und mit Pfeilspitzen Hypoblastzellen gekennzeichnet, die zwischen der Expressionsdomäne und dem Keimscheibenrand liegen. Maßstabsbalken: A-J 200  $\mu$ m, K 80  $\mu$ m, L 20  $\mu$ m.

Die *Cer1*-Domäne im Hypoblasten reicht nicht ganz an den Keimscheibenrand heran und wird von ihm durch einen expressionsfreien Saum von 2-3 Hypoblastzellreihen getrennt (s. weiße Pfeile in Abb. 21 L). Sowohl die *Cer1* exprimierenden Zellen als auch die Zellen des expressionsfreien Saumes zeigen eine spindelförmige bis kubische Morphologie und entsprechen damit den Hypoblastzellen des Vorderen Randbogens (s. Abb. 21 L). In der Aufsicht wirken die Hypoblastzellen, welche die Expressionsdomäne nach anterior begrenzen, dichter gedrängt und bilden einen Bogen homogener *Cer1*-Expression innerhalb der aufgelockerten Domäne (s. Abb. 21 D+I).

Im späten Stadium 1 und im Stadium 2 bleibt diese Domäne, die in zentralen und anterioren Regionen der Keimscheibe zu finden ist, erhalten und nimmt an Größe zu (s. Abb. 22 A und F). Im Stadium 3 entsteht im anterioren Primitivstreifen eine neue Domäne *Cer1* exprimierender Zellen; die *Cer1*-Domäne des Hypoblasten findet sich nun ausschließlich in anterioren Bereichen der Keimscheibe und zeigt eine geringere Expressionsintensität (s. Abb. 22 B/C und G/H). Schon im späten Stadium 2, deutlicher aber im Primitivstreifenstadium zeigt sich eine links/rechts- asymmetrische Verteilung der *Cer1*-Expressionsdomäne im Hypoblasten (s. Abb. 22 G/H), wobei in den bislang untersuchten 13 Embryonen keine Präferenz für eine auf der rechten oder linken Seite stärkeren oder größeren Expression zu erkennen ist: in vier Embryonen ist die *Cer1*-Domäne links größer ausgeprägt, in sechs findet sich eine rechtslastige *Cer1*-Expression, wobei in drei Keimscheiben *Cer1*-Expressionsdomänen symmetrisch ausgebildet sind. In sagittalen

Semidünnschnitten finden sich *Cer1*-Transkripte in der Primitivstreifenregion sowohl in Epiblast- als auch in Mesodermzellen (s. Abb. 22 K und L). Die Expression ist in Mesodermzellen schwächer, jedoch stärker in apikalen Zellkompartimenten von Epiblastzellen, zwischen denen expressionsfreie Lücken auftreten (s. Abb. 22 L). Der Hypoblast exprimiert in diesem Bereich kein *Cer1* (weiße Pfeilspitzen in Abb. 22 L).

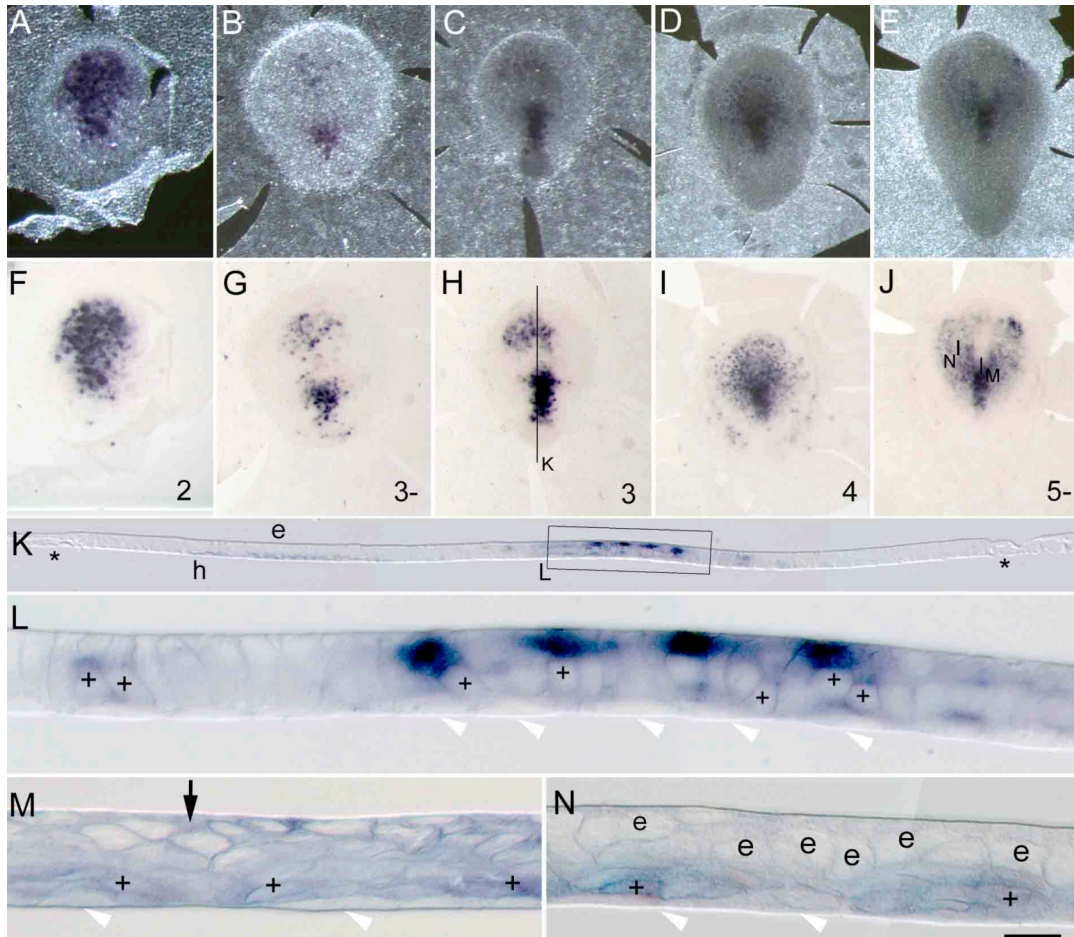


Abb. 22: *Cer1*-Expressionsmuster der Stadien 2 bis 5 in dorsalen Aufsichten (A-E Dunkelfeld, F-J Hellfeld). K zeigt einen Semidünnschnitt (5µm) durch die Keimscheibe in H (Schnittrichtung durch die Linie angedeutet), wovon der vordere Teil des Primitivstreifens in L vergrößert dargestellt ist (schwarze Umrandung in K). M und N zeigen Details aus der Keimscheibe in J mit Sagittalschnitten durch den Primitivknoten (M, der Pfeil deutet auf den Primitivknoten) und durch die anterior-laterale Expressionsdomäne (N); die Lage der Schnitte sind durch die schwarzen Linien in J angedeutet. Die Sternchen markieren den Keimscheibenrand; weiße Pfeilköpfe deuten auf Hypoblastzellen; mit Pluszeichen sind *Cer1* exprimierende Mesodermzellen gekennzeichnet. e: epiblast; h: hypoblast. Maßstab: A-J 200 µm, K 80 µm, L-N 20 µm.

Im Stadium 4 und 5 finden sich *Cer1* exprimierende Zellen in anterioren und lateralen Bereichen der Keimscheibe und bilden ein rund-ovales Expressionsmuster. Der vordere Abschnitt des Primitivstreifens tritt im Zentrum dieser neuen Domäne aufgrund der dichten Expressionsintensität hervor, während das Expressionsmuster in der Peripherie aufgelockert und inhomogen ist (s. Abb. 22 D/I und E/J). Im Stadium 5 exprimieren die Zellen des Chordafortsatzes kein *Cer1* und dieser setzt sich von den umliegenden *Cer1* exprimierenden Zellen ab (s. Abb. 22 E und J). In Semidünnschnitten der anterior-lateralen Expressionsdomäne exprimieren Mesodermzellen *Cer1* während Hypoblast und Epiblast kein *Cer1* exprimieren (s. Abb. 22 N). Im Sagittalschnitt durch den Primitivknoten findet sich keine *Cer1*-Expression in Epiblastzellen (Pfeil in Abb. 22 M) oder im Hypoblasten während Mesodermzellen *Cer1* schwach exprimieren.

## 4 DISKUSSION

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der globale Einfluss des Hypoblasten auf Musterungsprozesse im Epiblasten untersucht. Hypoblast-Resektionsexperimente an definierten Prägastrulationsstadien führten zu einer zeitlich und räumlich definierbaren ektopen Induktion des Mesodermmarkers *Brachyury* im Epiblasten: Epiblastzellen aus anterioren und zentralen Bereichen der Keimscheibe im Stadium 1, die nach Hypoblastresektion das *Brachyury*-Gen exprimieren, verlieren diese Kompetenz bereits im Stadium 2. Auch die orthotope *Brachyury*-Expression (im Primitivstreifen) wird mit zunehmendem Entwicklungsalter unabhängiger vom inhibierenden Einfluss des Hypoblasten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden individuelle Signalzentren anhand von Expressionsmustern solcher Gene definiert, die eine Rolle bei den Musterungsprozessen während der Gastrulation spielen: *Cx32* wird in frühen Stadien innerhalb eines zentral-anterioren Bereiches mit geringerer Stärke exprimiert als in Randbereichen der ventralen Schicht; die polarisierte Expression von *Cx32* geht damit der morphologischen (anterior-posterioren) Polarisierung des Embryos voraus. *Cx43* wird zunächst im gesamten Epiblasten, anschließend jedoch innerhalb der PGE und im sich bildenden Primitivstreifen mit geringerer Intensität exprimiert. Auch die *Wnt3*-Expression findet sich in frühen Stadien im gesamten Epiblasten, wird im Stadium 2 jedoch nur innerhalb der PGE und entlang des Randbereiches exprimiert, wobei ein zentral-anteriorer Bereich des Epiblasten ausgespart bleibt. Auch mRNA-Transkripte des Wnt-abhängigen Transkriptionsfaktors *Lef1* finden sich innerhalb der PGE und im Primitivstreifen, wobei die Expression erst im Stadium 2 beginnt. Die Expression von  $\beta$ -*Catenin* spiegelt zunächst das ubiquitäre Vorkommen dieses Proteins in seiner konstitutiven Eigenschaft in Zellkontakten zwischen Hypo- bzw. Epiblastzellen wider. Erst im Stadium 3 findet sich eine verstärkte Expressionsintensität in neu gebildeten Mesodermzellen, die auf die örtliche Verwendung von  $\beta$ -*Catenin* als intrazelluläres Signalmolekül zurückgeführt werden kann. Das Signalmolekül *Cer1* bildet eine Expressionsdomäne im Hypoblasten, die im Stadium 1 in zentral-anterioren Bereichen der Keimscheibe zu finden ist. Im Stadium 3 exprimieren ferner Epiblast- und Mesodermzellen des anterioren Primitivstreifens das *Cer1*-Gen.

### 4.1 Methodisches

#### 4.1.1 Modellorganismus

Viele Pioniere der Embryologie nutzten das Kaninchen seinerzeit als entwicklungsbiologischen Modellorganismus (z.B. Hensen 1876; Rauber 1876; van Beneden 1880; Kölliker 1882). Die Entdeckung des Primitivknotens durch Viktor Hensen in Kaninchenembryonen (Hensen 1876; Viebahn 2001) steuerte z.B. das morphologische Element für die Entdeckung des sogenannten Organisatorprinzips beim Säuger bei (Spemann und Mangold 1924; Waddington 1934), das zahlreiche Forscher bis in die heutige Zeit fasziniert (z.B. Blum et al. 1992; Niehrs 1999; Foley et al. 2000; Knoetgen et al. 2000). Seit dieser Zeit wurde das Kaninchen mehrere Male aufgrund seiner Vorteile bei Untersuchungen zur Gastrulation und Neurulation „wiederbelebt“ (Rabl 1915; Aasar 1931; Waterman 1943; Viebahn 1995; Viebahn et al. 1995a): In den Gastrulationsstadien ist der flache Kaninchenembryo dem becherförmigen Mausembryo hinsichtlich Übersichtlichkeit

und experimentellem Zugang überlegen. Die hier vorgestellten Untersuchungen belegen, dass im Kaninchen aufgrund der planen Morphologie die Domänen der Genexpressionen einfach bestimmt und morphologischen Strukturen der Keimscheibe zugeordnet werden können. Die Kulturexperimente zeigen, dass es möglich ist, die Keimscheiben in ähnlicher Weise wie beim Huhn zu kultivieren und aufgrund des leichten Zuganges Manipulationen vorzunehmen (vgl. auch Fischer et al. 2002). Die Blastozysten lassen sich durch Ausspülen der zuvor frei präparierten Uteri leicht gewinnen und sind zu Beginn der Gastrulation (etwa 6,5 *dpc*) noch nicht in die Gebärmutter Schleimhaut implantiert (Viebahn 1999). Die Ausbeute an Embryonen liegt pro Wurf bei etwa 6-15 und kann durch hormonelle Stimulation (Superovulation) deutlich erhöht werden (A. Navarette-Santos und C. Viebahn, pers. Mitteilung). Jedoch wurde in dieser Arbeit auf eine Superovulation verzichtet, da es dadurch in Folge der erzeugten hohen Anzahl an Blastozysten zu einer starken Abweichung der gewünschten Stadien kommen kann (C. Viebahn, pers. Mitteilung).

Ein weiterer Vorteil des Kaninchens ergibt sich aus der im Vergleich zu den Nagetieren höheren phylogenetischen Verwandtschaft der Lagomorpha, zu denen das Kaninchen gehört, zu den Primaten einschließlich des Menschen (Graur et al. 1996).

Die Nachteile sind verbunden mit den vergleichsweise teuren Haltungskosten in Folge der Größe der Tiere und dem dadurch benötigten Platz. Obwohl das Kaninchen schon in den 20iger und 30iger Jahren des letzten Jahrhunderts ein bevorzugtes Tier für genetische Untersuchungen war (Castle und Sawin 1941), sind aufgrund seiner im Vergleich zur Maus langen Generationsdauer (sechs Monate) moderne molekulargenetische Techniken wie die Generierung transgener Tiere erschwert. Ebenso sind viele molekularbiologische Methoden, wie sie in anderen Modellorganismen etwa der Maus, dem Krallenfrosch oder dem Zebrafisch angewendet werden (z.B. *in vitro* Gewebe-Rekombinationsassays, RNA-Injektionen oder posttranskriptionelles „Gene-Silencing“ durch RNA-Interferenz) im Kaninchen noch nicht etabliert und können auch nicht ohne weiteres übertragen werden.

#### **4.1.2 Flachkulturtechnik**

Die in dieser Arbeit angewandte Technik zur Kultivierung der Embryonen basiert auf einer im Hühnchen entwickelten Methode (New 1955): der Embryo wird mit Hilfe eines Glasringes flach aufgespannt, welcher die Vitellinmembranen unter Spannung hält; der Glasring wird auf ein mit Albumen gefülltes Uhrglas gelegt und der Embryo so kultiviert (Flachkultur). Dadurch wurde es möglich, Embryonen außerhalb des Eies über einen längeren Zeitraum zu kultivieren und Manipulationen vorzunehmen (vgl. Chapman et al. 2001).

Diese Methode wurde stark modifiziert, um den Besonderheiten der in frühen Stadien kleineren und damit empfindlicheren Säugerembryonen gerecht zu werden (vgl. Abschnitt 2.7). Da es sich um unphysiologische Wachstumsbedingungen handelt (fehlender Blastozysteninnendruck, gasförmiges Umgebungsmedium im Inkubator mit hohem Sauerstoffpartialdruck, Kontakt des extraembryonalen Gewebes mit dem Kulturmedium an der Phasengrenze, fehlendes maternales Milieu), ist eine Abweichung von der normalen Entwicklung unter *in vivo* Bedingungen unvermeidbar. Allerdings zeigte sich in der Mehrzahl der inkubierten Embryonen ein korrektes Fortschreiten der embryonalen Entwicklung im Sinne der Ausbildung morphologischer

Entwicklungsmerkmale (vgl. Abschnitt 3.1.1): Nur selten wurde eine Degeneration der Keimscheibe oder ein asymmetrisches Wachstum im Sinne einer Fehlbildung beobachtet; vielmehr zeigten Epiblast und Hypoblast der Kontrollgruppe eine korrekte Schichtung und regelrechte Morphologie (s. Abb. 6 E und F). Allerdings erschienen die inkubierten Keimscheiben regelmäßig dicker und plumper als die von frisch gewonnenen und fixierten Blastozysten.

Aus den Kulturexperimenten geht hervor, dass (1) junge, morphologisch wenig differenzierte Stadien unter den Kulturbedingungen schlechter gedeihen; (2) die Resektion des Hypoblasten in diesen Stadien einen möglichen entwicklungsbeschleunigenden Effekt hat und (3) die Hypoblastresektion in Embryonen des Stadium 3 eher hemmend auf die weitere Differenzierung im Vergleich zu den Embryonen der Kontrollgruppe wirkt. In kultivierten Keimscheiben des Stadium 1 wurde allerdings in der Hälfte aller Fälle (14/27) eine orthotope *Brachyury*-Expressionsdomäne gefunden, wie sie physiologischerweise in der PGE auftritt. Dies deutet auf molekularer Ebene auf die Ausbildung dieser morphologisch definierten Struktur hin. Kaninchenembryonen in Neurulationsstadien, die über 4-24 Stunden unter den gleichen Bedingungen kultiviert worden waren, entwickelten sich ebenfalls gut und zeigten ein regelrechtes Fortschreiten der embryonalen Entwicklung (Fischer et al. 2002).

Wie in allen Kulturmodellen handelt es sich um den Versuch, die *in vivo* Bedingungen für die jeweiligen Zellen möglichst genau zu imitieren. Das hier vorgestellte Kulturmodell entspricht in folgenden Punkten nicht den physiologischen Gegebenheiten, wodurch wiederum eine Abweichung von der normalen embryonalen Entwicklung hervorgerufen werden könnte: (1) Keimscheiben der in dieser Arbeit untersuchten Stadien entwickeln sich unter *in vivo* Bedingungen in einer Blastozyste, welche dem Gewebe eine bestimmten Spannung verleiht sowie einen komplexen Stoffwechsel besitzt (Jung et al. 1987; Fischer 1988). (2) Blastozysten sind von einer Mukoproteinschicht umgeben, die Einfluss auf die embryonale Entwicklung nimmt (Kane 1974). (3) Maternale Faktoren (Uterusschleimhaut, Uterussekret, Hormone, Sauerstoffpartialdruck und Temperaturverhältnisse im Uterus; vgl. Fischer 1988) können in diesem Modell nicht genau imitiert werden. (4) Ferner wird den Blastozysten durch die Spülung aus dem Uterus, dem Transfer und die Manipulation Stress in Form von Temperaturschwankungen, Änderungen der Sauerstoff-/Kohlendioxidpartialdrücke sowie mechanische Irritation zugeführt. (6) Schließlich könnten aufgrund des Kontaktes der Epiblastzellen mit dem relativ festen Agarosesubstrat Zellwanderungsbewegungen in dieser Schicht gestört werden, die eine wichtige Rolle insbesondere während der Primitivstreifenbildung spielen (Viebahn et al. 2002).

Aufgrund des nur kurzen Inkubationszeitraumes (16h), der gewählten Zielgröße (Ort der *Brachyury*-Expression) sowie der zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung übersichtlichen Morphologie des Embryos reicht das Kulturmodell jedoch aus, die Fragestellung dieses Teils der Arbeit, nämlich den Effekt des Hypoblasten auf die Gen-Expression im Epiblasten, zu untersuchen (vgl. Abschnitt 1.4).



### 4.1.3 cDNA-Gewinnung, *in situ* Hybridisierung und Histologie

Die cDNAs der hier untersuchten Gene wurden aus gRNA amplifiziert, die entweder aus adultem Kaninchenhoden (*Cx32* und *Cx43*), aus 11,0 Tage alten (*Wnt3*, *β-Catenin*, *Lef1*<sup>Exon6</sup> und *Cer1*) oder aus 6,2 Tage alten Kaninchenembryonen (*Lef1*) stammt.

Ein 11,0 Tage alter Kaninchenembryo entspricht in seinem Entwicklungsstand etwa einem 9,5 Tage alten Embryo der Maus (vgl. Kaufmann 1992), bei dem zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung viele Entwicklungsgene auf Grund der zahlreichen parallel statt findenden Differenzierungsprozesse (z.B. Neurogenese, Myogenese, Extremitäten- und Organentwicklung) transkribiert werden, darunter z.B. auch die in dieser Arbeit untersuchten Vertreter der Wnt-Signalmolekülklasse (Gavin et al. 1990). Aufgrund der Größe eines 11,0 Tage alten Embryos im Vergleich zu den Entwicklungsstadien, die in dieser Arbeit untersucht wurden, bot sich dieses ältere Stadium zur Gewinnung ausreichender Mengen von gRNA an, da sonst sehr viele Embryonen früherer Stadien benötigt worden wären. Alle cDNAs der hier untersuchten Entwicklungsgene konnten so aus gRNA eines einzigen Embryos kloniert werden. Ausnahmen bildeten *Lef1*, da das Spliceverhalten in 6,2 *dpc* Keimscheiben überprüft werden sollte (vgl. Abschnitt 3.3.4), sowie die Connexin-Gene, die bekannterweise im Kaninchenhoden exprimiert werden (Risley et al. 1992).

Zur Aufklärung der Expressionsmuster wurden digoxigeninmarkierte cRNA-Sonden eingesetzt. Trotz einer größeren Gefahr der raschen Degradierung der RNA durch die ubiquitär vorkommenden RNAsen und höherer Kosten in der Herstellung durch die verhältnismäßig teure *in vitro* Transkription (vgl. Abschnitt 2.9.8), ist der Einsatz von RNA-Sonden aufgrund der spezifischeren und stabileren Bindung an mRNA-Transkripte im Vergleich zu DNA-Sonden im fixierten Gewebe von großem Vorteil. Dies ist besonders in frühembryonalen Entwicklungsstadien notwendig, da in sehr jungen Embryonen aufgrund weniger Zellen verhältnismäßig wenig mRNA vorliegt und die Embryonen molekular sowohl zellulär als auch subzellulär bereits stark differenziert sind. Zur Sichtbarmachung der Genexpressionen wurde ein nicht-radioaktives *in situ* Hybridisierungsverfahren für Häutchenpräparate (sog. whole-mounts) angewandt, das auf der Körbchen-Technik beruht („whole mount *in situ* hybridisation“, WMISH). Dieses Verfahren wurde zuerst für *in situ* Hybridisierungen in der Fruchtfliege entwickelt (Tautz und Pfeifle 1989) und den Gegebenheiten des Säugerembryos angepasst (Lowe und Kuehn 2000; Viebahn et al. 2002). Der entscheidende Schritt, die Hybridisierung selbst, wird in einem luftdicht verschlossenen Gefäß durchgeführt und dadurch bei hohen Hybridisierungstemperaturen (70°C) eine konstante Salz- und Formamidkonzentration der Hybridisierungslösung gewährleistet. Durch die hohen Hybridisierungstemperaturen werden unspezifische Bindungen der cRNA-Sonde minimiert. Das Protokoll erlaubt durch die Behandlung der Keimscheiben mit verschiedenen Detergenzien (Tween20, CHAPS und Proteinase K) vor und während der Hybridisierung ein tiefes Eindringen der Sonden in das Gewebe. Die Körbchen-Technik, bei der das Gewebe in einem mit einem Kunststoffnetz verschlossenem Kryoröhrchen durch die Reaktionslösungen geführt wird, erleichtert Handhabung und fördert die Gewebeschonung bei den zahlreichen Inkubationsschritten und wäre auch in automatischen Systemen einsetzbar (vgl. Plickert et al. 1997). Durch die Einbettung der gefärbten Keimscheiben in Technovit<sup>®</sup> und der sich

anschließenden Anfertigung von 5µm dicken Semidünnschnitten konnte eine Verteilung der Genexpression auch auf zellulärer und subzellulärer Ebene dargestellt werden.

## 4.2 Hypoblastresektionen

Die Ergebnisse der in Flachkulturtechnik inkubierten Keimscheiben bestätigen die vornehmlich in der Maus erbrachten Beobachtungen (vgl. Abschnitt 1.3), dass der Hypoblast eine wichtige regulatorische Funktion bei der Mesodermbildung im Kaninchenembryo einnimmt. Keimscheiben in den hier untersuchten Stadien mit intaktem Hypoblasten exprimieren *Brachyury* nicht in ektopen Bereichen: Der Hypoblast verhindert die Expression von *Brachyury* in anterioren Bereichen, während das Gen physiologischerweise im posterioren Teil des Epiblasten exprimiert wird. Die plane Morphologie der Kaninchenkeimscheiben und die Möglichkeit, zwei Stadien mit axialer Polarität vor der Primitivstreifenbildung zu unterscheiden, ermöglicht es, innerhalb des Epiblasten Kompartimente mit unterschiedlichem mesodermbildenden Potential ausfindig zu machen. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass Mesoderm innerhalb eines schmalen Zeitfensters induziert wird.

Zu Beginn der morphologischen Differenzierung im Stadium 1 sind prinzipiell alle Epiblastzellen in der Lage, sich zu Mesodermzellen zu differenzieren. Als eindrucklichstes Ergebnis nach reseziertem Hypoblasten exprimieren Embryonen dieses Stadiums das *Brachyury*-Gen innerhalb der gesamten Keimscheibe; es finden sich spindelförmige Zellen, welche der Morphologie nach Mesodermzellen entsprechen. Die Tatsache, dass nur 4 von 27 Keimscheiben mit entferntem Hypoblasten dieses Ergebnis zeigen, könnte methodische Gründe haben: (1) der Hypoblast könnte ungewollt nicht vollständig entfernt worden sein oder (2) von der Risskante zum Dottersackepithel während der Kultivierung nachgewachsen sein. (3) Ferner reagieren Keimscheiben junger Entwicklungsstadien im Kulturmodell anders im Vergleich zu älteren Embryonen. Da Hypoblastzellen ein gut ausgebildetes Zytoskelett von Intermediärfilamenten besitzen und untereinander mit starken desmosomartigen Interzellulärkontakten verbunden sind (Viebahn et al. 1995b), ist der Hypoblast ein kohärentes, leicht zu manipulierendes Gewebe, und so scheint die erste Möglichkeit als wenig wahrscheinlich. Ferner lässt sich die Vollständigkeit der Resektion stereomikroskopisch durch Betrachtung vor und nach der Operation leicht beurteilen. Die zweite Möglichkeit wird durch den histologischen Nachweis flacher Zellen der unteren Gewebsschicht gestützt (s. Abb. 6 I, Abb. 7 G-I, Abb. 8 H), allerdings verhindern diese Zellen nicht den Effekt des Fehlens des Hypoblasten unmittelbar nach der Resektion; wenn überhaupt könnte die Mesodermbildung, die sich unmittelbar der *Brachyury*-Expression anschließt, verzögert werden, was z.B. in der ektopen Domäne anterior des Primitivstreifens beobachtet wurde (s. Abb. 6 I).

Kaninchenembryonen junger Stadien entwickeln sich in diesem Kulturmodell morphologisch langsamer als ältere, insbesondere in der Kontrollgruppe (vgl. Abschnitt 3.1.1). Aus den *in situ* Hybridisierungen geht jedoch hervor, dass sich Epiblastzellen im Stadium 1 von Embryonen mit entferntem Hypoblasten weiterdifferenzieren und in 24 von 27 Fällen das *Brachyury*-Gen angeschaltet wird. Die Heterogenität des Genexpressionsmusters liegt weniger in den Kulturbedingungen begründet, da alle 27 Embryonen auf die gleiche Art und Weise kultiviert wurden und so die Voraussetzungen für die Epiblastzellen sich weiter zu differenzieren sehr

ähnlich sein müssten. Folglich sind wahrscheinlichere Gründe für die unterschiedliche Reaktion des Epiblasten nach Hypoblastresektion zum einen eine generell unterschiedliche Kompetenz innerhalb des Epiblasten (stärker im Zentrum und schwächer in der Peripherie) und zum anderen ein enges Zeitfenster der Mesoderminduzierbarkeit in Epiblastzellen: die kultivierten Keimscheiben waren möglicherweise, obwohl sie optisch alle einem Stadium 1 entsprachen, zum Zeitpunkt der Hypoblastresektion nicht exakt im gleichen Entwicklungsstadium. Der Übergang vom Stadium 1 bis zur Ausbildung der PGE im Stadium 2 ist eine transiente Entwicklung von etwa sechs Stunden Dauer. Die Ansprechbarkeit der Epiblastzellen könnte möglicherweise nur ein bis zwei Stunden dauern und Epiblastzellen im späten Stadium 1 ließen sich nicht mehr vollständig auf mesoderminduzierende Signale transformieren. Diese „Epiblastkompetenz“ könnte anhand eines Morphogengradienten ausgehend vom extraembryonalen Gewebe ( Dottersackepithel oder Trophoblast) kontrolliert werden, zumal die Ansprechbarkeit des Epiblasten auf mesoderminduzierende Signale in der Peripherie schwächer zu sein scheint als im Zentrum der Keimscheibe.

Kein Embryo der Kontrollgruppe und nur ein Embryo mit scheinoperiertem Hypoblasten entwickelte die orthotope *Brachyury*-Expressionsdomäne; folglich sind Keimscheiben *in vitro* mit Hypoblasten nicht in der Lage, *Brachyury* innerhalb der PGE zu exprimieren und das Mesodermprogramm zu starten. Das könnte ein Ausdruck einer gestörten Zellwanderung im Epiblasten sein, der sich im Kulturmodell auf dem Agarosesubstrat befindet. Vor Ausbildung der PGE wurden Zellwanderungen im Epiblasten aus anterioren und zentralen Bereichen nach posterior beobachtet (Viebahn et al. 2002). Als ein wichtiger Schritt der Mesodermformation im Säuger wird die Reduktion der Proliferationsrate in Epiblastzellen der PGE angesehen (Viebahn et al. 2002), ein möglicherweise konservierter Mechanismus, der auch der Gastrulation in der Fruchtfliege und im Krallenfrosch vorausgeht (Seher und Leptin 2000; Kurth 2005). Die Entfernung des Hypoblasten könnte die Proliferationsrate im Epiblasten vermindern und so das *Brachyury*-Gen, als den „Hauptschalter“ des Mesodermprogramms, induzieren. Die räumliche Verteilung der Kompetenz des Epiblasten, *Brachyury* zu induzieren, könnte die lokale Verteilung des Proliferationszustandes im Epiblasten zu Beginn der Kultur widerspiegeln.

In kultivierten Embryonen des Stadium 2 mit entferntem Hypoblasten entwickeln die meisten Keimscheiben eine vergrößerte orthotope *Brachyury*-Domäne mit vergrößertem Primitivstreifen. Desweiteren wird *Brachyury* von Mesodermzellen entlang des lateralen und anterioren Keimscheibenrandes exprimiert, die mit der posterioren orthotopen Domäne in Verbindung stehen. Dies könnte Ausdruck von Mesodermzellen sein, die nach anterior auswandern und das *Brachyury*-Gen nicht -wie unter physiologischen Bedingungen- „abschalten“. Im Stadium 2, in dem die Primitivstreifenentwicklung durch Ausbildung der PGE vorgegeben ist, scheint der Hypoblast folglich die EMT im Sinne einer Feinregulation zu modulieren.

Im Stadium 3 ist der Effekt der Hypoblastresektion auf die *Brachyury*-Expression geringer und die orthotope Domäne der Primitivstreifenregion ist im Vergleich zu den Kontrollen bzw. zu der Vergrößerung dieser Domäne der Keimscheiben des Stadium 2 mit entferntem Hypoblasten nicht wesentlich vergrößert. Die Kompetenz des Epiblasten im Primitivstreifenstadium schwindet; möglicherweise ist das Entwicklungsschicksal anteriorer Epiblastzellen zur weiteren Differenzierung in Neuroektoderm oder in epidermales Ektoderm festgelegt.

Der Effekt des Hypoblasten auf die Mesodermbildung wurde bislang auch in anderen entwicklungsbiologischen Modellorganismen (Huhn und Maus) untersucht. Dabei ergeben sich im Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede. Im Huhn induziert der Hypoblast nach Rotation um 90° einen zusätzlichen Primitivstreifen ausgehend von der neuen Position des posterioren Hypoblastabschnittes (Waddington 1933). Dabei beeinflusst der Hypoblast Zellwanderungen im Epiblasten und nicht das Schicksal der Epiblastzellen z.B. im Sinne einer direkten Änderung von Genexpressionen (Foley et al. 2000). Nach kompletter Entfernung des Hypoblasten in Stadien, in denen sich noch kein Primitivstreifen ausgebildet hat, entwickeln sich mehrere Primitivstreifen und folglich mehrere Achsen nach 24stündiger Inkubation. Die Antagonisierung von Nodal durch das Signalprotein Cerberus, das auch im Huhn im Hypoblasten exprimiert wird, verhindert die Ausbildung von zusätzlichen ektopen Primitivstreifen im Hühnerembryo; jedoch wurde weder eine ektopre Expression von Mesodermmarkern außerhalb der Primitivstreifenregion noch eine Vergrößerung der Primitivstreifendomänen mit einer überschüssigen Mesodermbildung beobachtet (Bertocchini und Stern 2002). Diese Unterschiede spiegeln die unterschiedliche Entwicklung des Hypoblasten beim Säuger und bei Vögeln wider (vgl. Abschnitt 1.1.2) und suggerieren, dass der Epiblast des Huhnes im wesentlichen durch Autoregulation seine Mesodermbildungskompetenz organisiert, während der Epiblast beim Säuger unter der direkten Kontrolle eines benachbarten, extraembryonalen Gewebsabschnittes, des Hypoblasten, steht.

Aufgrund der komplexen Morphologie des Eizylinders der Maus sind Manipulationen schwerer durchführbar als im Kaninchen oder Huhn; darüber hinaus ist eine zufriedenstellende Beurteilung der resultierenden Expressionsmuster erschwert (vgl. Abschnitt 1.3). Aus diesem Grund wurden Experimente durch Rekombinations-Assays durchgeführt, in denen das induktive Potential des Hypoblasten der Maus untersucht wurde (Kimura et al. 2000; Perea-Gomez et al. 2001b): Hypoblast-Explantate hemmen die Expression der Mesodermmarker *Brachyury* und *Cripto* im Epiblasten der Mausgastrula (Kimura et al. 2000). Die *Cer1<sup>-/-</sup>/Lefty<sup>-/-</sup>* Doppelmutante entwickelt ektople Primitivstreifen, so dass im Säuger *Nodal* zur Primitivstreifenbildung benötigt und durch *Cer1* und *Lefty1* antagonisiert wird; darüber hinaus ist die korrekte Expression von Primitivstreifengenen wie z.B. *Brachyury*, *Cripto* oder *gooseoid* in den Doppelmutanten gestört, so dass *Lefty1* und *Cer1* in der Maus eine regulatorische Funktion bei der Musterung des Primitivstreifens besitzen (Perea-Gomez et al. 2002). Nodal induziert im Hypoblasten der Maus nach anterior gerichtete Zellwanderungsbewegungen; dadurch wird anterior durch die Expression von *Lefty1* und *Cer1* im Hypoblasten die mesoderminduzierende Wirkung von Nodal gehemmt, jedoch posterior die Primitivstreifenbildung initiiert und schließlich die antero-posteriore Achse ausgebildet (Yamamoto et al. 2004). Ob diese Zellwanderungsbewegungen im Hypoblasten der Maus durch die Eizylinderform bedingt oder ein generelles Phänomen der Säugerentwicklung sind, wird die Analyse der Zellwanderungsbewegungen des Hypoblasten des Kaninchens zeigen. Nicht zuletzt kann man die Zellbewegungen dann auch mit denen der unteren Zellschicht im Hühnerembryo vergleichen (Bertocchini und Stern 2002).

Obwohl über die molekulare Natur der Primitivstreifenbildung in Huhn und Maus viel bekannt ist, ist die Lokalisation der Moleküle während der epithelio-mesenchymalen Transformation des Säugers noch weitgehend ungeklärt (Rivera-Perez et al. 2003; Perea-Gomez et al. 2004). Aus

den Ergebnissen der Hypoblastresektionen im Kaninchen geht nun hervor, dass mit der Ausbildung der PGE im Stadium 2 die Primitivstreifenbildung im posterioren Teil der Keimscheibe unwiderruflich festgelegt wird und die antero-posteriore Achse des Embryos feststeht. Im Stadium 1 sind dagegen prinzipiell noch alle Epiblastzellen in der Lage, zu Mesodermzellen transformiert zu werden; in diesem Stadium ist die antero-posteriore Achse durch den VRB zwar vorgegeben, muss jedoch noch (durch den Einfluss des Hypoblasten) fixiert werden.

### 4.3 Sequenzanalysen und Expressionsmuster

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene zeigen zum Teil sehr dynamische Expressionsmuster. Durch die flache Morphologie der Keimscheibe und die definierte Stadieneinteilung des Kaninchens lassen sich Genexpressionen in einem räumlichen und zeitlichen Muster beschreiben, indem die Genexpression bereits in der Aufsicht der Keimscheibe spezifischen Domänen und in der histologischen Analyse der jeweiligen Zellschicht zugeordnet werden konnte. Eine Übersicht der klonierten Gene mit Angabe der Sequenzhomologien und Zuordnung der Genexpressionen zu den Gewebsschichten ist in Tabelle 11 dargestellt.

Gen	Homologien hs; mm (%)	Stadium 0 (5,5 dpc)	Stadium 1 (6,0 dpc)	Stadium 2 (6,2 dpc)	Stadium 3 (6,5 dpc)	> Stadium 4 (7,0 dpc)
<b>Cx32</b>	92,9; 90,7	Hyp	Hyp	Hyp	Hyp	Hyp
<b>Cx43</b>	93,4; 89,7	Epi	Epi	Epi	Epi/Mes	Epi/Mes
<b>Wnt3</b>	96,2; 97,7	<i>n.u.</i>	Epi	Epi	Epi/Mes	Epi/Mes
<b><math>\beta</math>Cat</b>	95,3; 89,3	Epi/Hyp	Epi/Hyp	Epi/Hyp	Epi/Mes/Hyp	Epi/Mes/Hyp
<b>Lef1</b>	94,8; 90,9	—	—	Epi	Epi/Mes/Hyp	Epi/Mes/Hyp
<b>Cer1</b>	83,0; 77,0	Hyp	Hyp*	Hyp*	Hyp*/Epi/Mes	Hyp*/Epi/(Mes)

Tabelle 11: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Gene und deren stadienabhängige Expression in den Gewebsschichten der Keimscheibe. Die Homologien der jeweiligen cDNAs zur menschlichen (hs) und murinen (mm) Sequenz sind in der zweiten Spalte angegeben. Die grauschräffierten Felder geben an, ob eine Polarisierung entlang der anterior-posterioren Achse anhand des Expressionsmusters sichtbar ist. Epi: Epiblast, Hyp: Hypoblast; Mes: Mesoderm. *n.u.*: nicht untersucht. \*: nur in anterioren Abschnitten des Hypoblasten

Durch die Zuordnung der Gene zu den Gewebsschichten der Keimscheibe lassen sich zum einen Hypoblast und Epiblast im Hinblick auf Signalemission und -verarbeitung klar voneinander unterscheiden, zum anderen werden alle untersuchten Gene bereits vor der Primitivstreifenentwicklung polarisiert exprimiert. Die Expressionsmuster von *Cx32* und *Cer1* zeigen, dass der Hypoblast im Kaninchen eine frühe Polarisierung entlang der antero-posterioren Achse aufweist, welche der molekularen Musterung im Epiblasten und der morphologischen Differenzierung der gesamten Keimscheibe vorausgeht. Diese Ergebnisse stützen damit frühere Untersuchungen über differentielle Genexpressionen im Hypoblasten (Rosenquist und Martin 1995; Thomas und Beddington 1996; Weisheit 2002).

#### 4.3.1 Sequenzanalysen von *Connexin 32 (Cx32)* und *Connexin 43 (Cx43)*

Connexine sind an der Bildung und Regulation von Gap junctions beteiligt. Bis heute sind im Genom der Maus 20 und im Menschen 21 Connexine identifiziert worden (Sohl und Willecke 2003). Innerhalb verschiedener Spezies finden sich für die jeweiligen Connexine sowohl auf cDNA- als auch auf Proteinebene sehr starke Homologien (Beyer und Willecke 2000). Diese Beobachtungen haben sich auch für die im Kaninchen klonierten Connexine bestätigt (s. Tabelle

5). Die Rate identischer Nukleotide reichte bei Cx32 und Cx43 von 93% im Vergleich zur menschlichen cDNA bis etwa 80% im Vergleich zu der des Huhnes; auf Proteinebene zeigten sich bei beiden Connexinen Homologien bis zu 98% zu den Säugerspezies, jedoch ist Cx43 im Vergleich zum Huhn mit über 90% deutlich stärker konserviert, während die Homologien für Cx32 hier nur etwa 74% betragen. Dieser Unterschied zwischen den beiden Connexinen zeigt sich ebenfalls beim Vergleich der Maus- und Menschsequenz zum Huhn (nicht gezeigt). Die N-terminalen Bereiche unterschiedlicher Cx32-Proteinsequenzen verschiedener Spezies sind stark, während die (zytoplasmatischen) C-terminalen Domänen nur schwach konserviert sind (s. Abb. 23; vgl. auch Beyer und Willecke 2000).

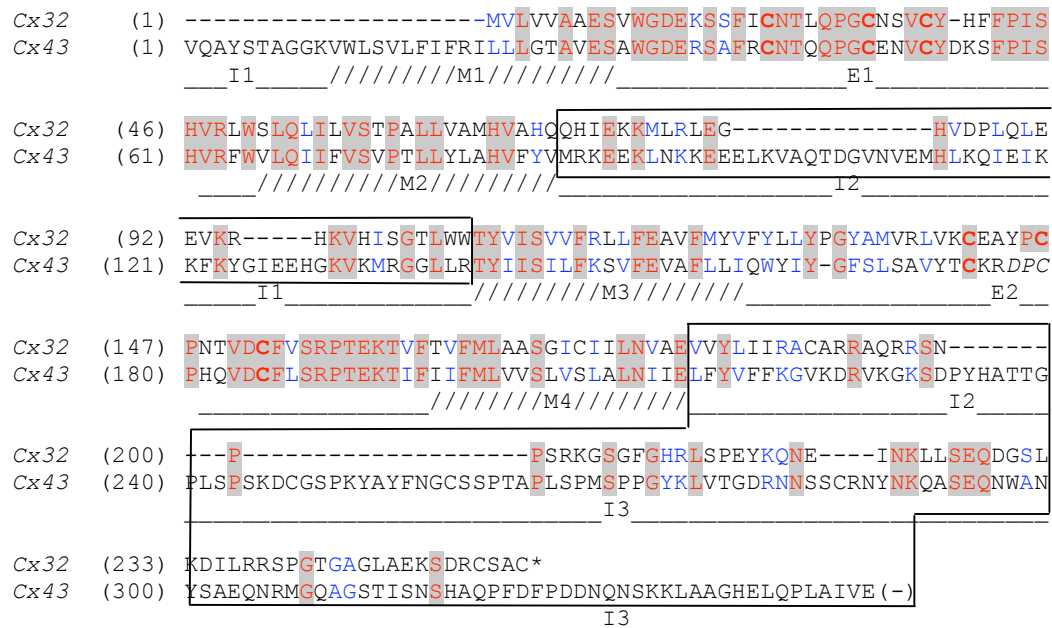


Abb. 23: Vergleich der von der cDNA abgeleiteten Proteinsequenzen von Cx32 und Cx43 im Kaninchen. Übereinstimmungen der Sequenzen sind rot, Ähnlichkeiten blau hervorgehoben. Innerhalb der beiden schwarzen Umrandungen liegen die Abschnitte der Sequenzen, welche die schwach konservierten intrazellulären Schleifen der Proteine bilden. M1-M4 bezeichnet die 4 Transmembrandomänen, I1 und I2 die intrazellulären Schleifen, E1 und E2 die extrazellulären Schleifen, in denen je 3 Cysteinresiduen (fett) hochkonserviert sind. \* = Stoppcodon.

Die Homologie der abgeleiteten Proteinsequenzen von Cx32 und Cx43 des Kaninchens zueinander beträgt 40%. Sie ist in den Bereichen am geringsten, die für die zytoplasmatischen Regionen kodieren (schwarze Umrandungen in Abb. 23). Hohe Homologien findet man hingegen innerhalb der transmembranären Domänen (M1-M4) und der extrazellulären Schleifen (E1 und E2), die wiederum jeweils drei hochkonservierte Cysteinresiduen enthalten, die an der Bildung von Gap junctions wesentlich beteiligt sind (Dahl et al. 1992). Man vermutet, dass die stark konservierten transmembranären und extrazellulären Bereiche für das Erkennen und Andocken an die gleichen Domänen ihrer Gegenspieler verantwortlich sind, während die schwach konservierten zytoplasmatischen Domänen die für die jeweiligen Connexine typischen regulativen Funktionen übernehmen. Dazu zählen z.B. Regulation der Leitfähigkeit der Kanäle über cAMP-abhängige Phosphorylierung (Saez et al. 1998) oder ein direkter Einfluss auf Zellproliferation unabhängig von der Kanalfunktion (Moorby und Patel 2001).

Anhand des Sequenzvergleichs von Cx32 und Cx43 wird ebenfalls deutlich, dass sich ihr unterschiedliches Molekulargewicht im Wesentlichen aus den verschieden langen zytoplasmatischen Domänen ergibt: So ist die Proteinsequenz von Cx32 in der ersten

zytoplasmatischen Schleife um 19 AS und in der C-terminalen Domäne um 57 AS kürzer als Cx43 (mit den in der Cx43 Kaninchensequenz nicht enthaltenen 23 AS ist Cx32 somit insgesamt um 80 AS kürzer).

#### 4.3.2 Expressionsmuster von *Connexin 32 (Cx32)* und *Connexin 43 (Cx43)*

Die mRNA-Expressionsmuster von Cx32 und Cx43 zeigen Gemeinsamkeiten mit der bekannten Proteinexpression und bestätigen die Beobachtung, dass Cx32 und Cx43 eigenständige Kommunikationskompartimente im Kaninchenembryo definieren (Liptau und Viebahn 1999). Da Gap junction-Semikanäle, die sich aus den Connexinen 32 und 43 aufbauen, sich *in vitro* nicht anlagern um einen vollständigen Kanal zu formen (Elfgang et al. 1995), kann man die Connexin-Kommunikationskompartimente im Epiblasten bzw. in der ventralen Zellschicht als funktionell getrennt betrachten. Innerhalb des Cx32- und Cx43-Hauptkompartimentes finden sich desweiteren Subkompartimente in Folge unterschiedlicher Expressionsintensitäten. Ein ringförmiges Subkompartiment mit stärkerer Cx32-Intensität findet sich in allen untersuchten Stadien entlang des Keimscheibenrandes, das einen zentral liegenden Bereich mit geringer oder fehlender Expression umschließt. Dieses ringförmige Subkompartiment ist entlang des vorderen Randes schmaler als posterior, wodurch sich der anteriore Pol der Keimscheibe anhand des Cx32-Expressionsmusters auch im Stadium 0, das noch keine morphologische Differenzierung zeigt, molekular definieren lässt. Die frühe Polarisierung der Cx32-Expression im Hypoblasten ergänzt molekulare Untersuchungen des Hypoblasten, bei denen eine differentielle Genexpression vor dem Auftreten einer morphologischen Differenzierung und vor einer molekularen Polarisierung im Epiblasten gefunden wurden (Weisheit 2002). Die intensive Expression von Cx32 entlang des anterioren Randes würde somit auf molekularer Ebene die sich ausbildende (morphologische) Differenzierung des VRB im Stadium 1 „ankündigen“, der durch eine glatte Begrenzung des anterioren Keimscheibenrandes gekennzeichnet ist (Liebke 1996; vgl. Einleitung). Das Stadium 0, dessen Kontur nach der morphologischen Stadieneinteilung unscharf mit dem extraembryonalen Gewebe verzahnt ist, würde somit durch die molekulare Differenzierung weiter unterteilt werden können, wobei die polarisierte mRNA-Expression des konstitutiven Proteins Cx32 einen ersten Schritt darstellen könnte.

Auf Proteinebene wurde entlang des Keimscheibenrandes im Hypoblasten ebenfalls ein ringförmiges Cx32-Subkompartiment beschrieben, wobei die Untersuchungen mit der morphologischen Differenzierung im Stadium 1 begannen und bis zu Primitivknotenstadien reichten. Allerdings überlappte die Proteinexpression den durch die Epiblast-Trophoblast-Grenze definierten Keimscheibenrand (Liptau und Viebahn 1999). Über die Prozession von Connexinen ist bekannt, dass diese sehr schnell transkribiert werden, das Protein jedoch nicht unmittelbar in die Plasmamembran eingebaut wird (De Sousa et al. 1993). Eine mögliche Erklärung dieser Unterschiede zwischen der Protein- und mRNA-Expression wäre somit durch die beobachteten zentripetalen Wanderungsbewegungen von Hypoblastzellen begründet (C. Viebahn, pers. Mitteilung), wobei über den Keimscheibenrand auswandernde Hypoblastzellen erst an ihrer definitiven Position das Cx32-Gen in die Plasmamembran integrieren und Gap-Junction-Kanäle aufbauen. Die Aufklärung des Cx32-Proteinexpressionsmusters in früheren Stadien würde die Lücke zwischen der polarisierten Cx32-mRNA-Expression (diese Arbeit) und der („endgültigen“)

morphologischen Differenzierung im Stadium 1 (Viebahn et al. 1995a; Liebke 1996) schließen und zeigen, in welcher Phase des Stadiums 0 die antero-posteriore Achse zum ersten Mal definiert wird.

Das ringförmige *Cx32*-Kommunikationskompartiment markiert eine Domäne geringerer *Cx32*-Expression im zentral-anterioren Bereich der Keimscheibe, die sich schon im Stadium 0 abzeichnet. Die Lage dieser Domäne „isolierter“ Hypoblastzellen unterlegt die Region des Epiblasten, aus der sich später Neuroektoderm und die Kopfanlage differenzieren. Die Lokalisation erinnert ferner an Expressionsmuster von Genen, die in die Kopfentwicklung des Säugers involviert sind und in frühen Entwicklungsstadien des Kaninchens (Stadium 0 und 1) differentiell exprimiert werden: Die Transkriptionsfaktoren *Otx2*, *Lim1* und *Anf* werden initial innerhalb eines querovalen Expressionsmusters im Hypoblasten exprimiert (Weisheit 2002). Ein solches quer-ovales Muster im anterioren Keimscheibendrittel ist jedoch nur bei Kaninchen bekannt und dagegen bei der Maus offensichtlich nicht eindeutig feststellbar (vgl. Perea-Gomez et al. 2001a). Auch die Signalmoleküle *Dkk1* (Weisheit 2002) und *Cer1* (Abschnitt 3.4.1) werden innerhalb des *Cx32*-freien Areals exprimiert. Gene der Wnt-Kaskade wie *Wnt3* oder  $\beta$ -Catenin, die direkt in die Primitivstreifenbildung eingebunden sind, werden allerdings nur schwach in der zentralen *Cx32*-freien Domäne exprimiert, finden sich allerdings wie *Cx32* mit stärkerer Expressionsintensität entlang des Keimscheibenrandes (vgl. Abschnitt 3.3).

Da Gap-Junction-Kanäle insbesondere bei der frühen Entwicklung und Kompaktion des Säugerembryos eine Rolle spielen (Becker und Davies 1995), wurden verschiedene Connexine und ihre Expression in frühen embryonalen Stadien charakterisiert. Dabei fand sich eine starke Expression von *Cx43* auf Protein- und cDNA-Ebene vom Zweizellstadium bis zur späten Blastozyste in Maus und Mensch (Maus: Dahl et al. 1996; Davies et al. 1996. Mensch: Hardy et al. 1996; Bloor et al. 2004). *Cx32* wurde auf mRNA-Ebene in beiden Spezies nicht nachgewiesen, allerdings gelegentlich in schwacher Intensität auf Proteinebene, so dass die Expression von *Cx32* in diesen Stadien maternal reguliert sein könnte (Barron et al. 1989; Hardy et al. 1996). In der Maus werden in Gastrulationsstadien die Connexine 31 und 43 exprimiert; *Cx32* Protein und mRNA konnten nicht nachgewiesen werden (Dahl et al. 1996), so dass die Expression von *Cx32* Protein im Kaninchen einen Unterschied zum Nager darstellt. Des Weiteren wird *Cx43* in der Maus in der inneren Zellmasse der Blastozyste und den sich daraus entwickelnden Geweben exprimiert (Ruangvoravat und Lo 1992; Dahl et al. 1996); somit exprimiert auch das viszerale Endoderm (VE) der Maus im Gegensatz zum Kaninchen *Cx43*. Es bildet sich so ein Kommunikationskompartiment aus *Cx43* basierenden Gap junction-Kanälen im gesamten Eizylinder der Maus. Dieser isoliert sich vom *Cx31* exprimierenden extraembryonalen Gewebe (Dahl et al. 1996). Während im Kaninchen die *Cx43* Expression nur auf den Epiblasten beschränkt bleibt, ist in der Maus somit der Hypoblast -als extraembryonales Gewebe- in das *Cx43*-vermittelte Kommunikationskompartiment einbezogen.

### 4.3.3 Sequenzanalyse von *Wnt3*

Die amplifizierte partielle *Wnt3*-cDNA-Sequenz des Kaninchens umfasst ca. 35% des kodierenden Bereiches der Konsensussequenz von Mensch und Maus. Die cDNA und die



abgeleitete Proteinsequenz zeigen starke Homologien zu den bekannten Sequenzen von Mensch, Maus, Huhn und Frosch.

Die hohe Konservierung von *Wnt3* mit Homologieraten über 90% zwischen Säuger und Amphibien auf Proteinebene (s. Tabelle 13) ist außergewöhnlich für ein Signalmolekül und stützt die Beobachtung, dass Wnt-Signale im evolutionären Kontext eine zentrale Rolle in der embryonalen Entwicklung von Vertebraten spielen (z.B. Wodarz und Nusse 1998).

cDNA Protein	hs	mm	gg*	xl*
oc*	91,9% 98,3%	93,2% 99,1%	85,7% 98,3%	74,8% 90,2%
hs		92,4% 98,8%	85,3% 98,6%	74,2% 91,7%
mm			83,8% 98,6%	76,8% 90,9%
gg*				76,3% 92,4%

Tabelle 12: Homologien der cDNA- und daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Wnt3* unterschiedlicher Spezies. oc: *oryctolagus cuniculus* (Kaninchen), hs: *homo sapiens* (Mensch), mm: *mus musculus* (Maus), gg: *gallus gallus* (Huhn), xl: *xenopus laevis* (Krallenfrosch). \*: da nur partielle cDNA Abschnitte bekannt sind, wurden beim Vergleich die anderen Sequenzen gekürzt.

Alle Signalproteine der Wnt-Familie besitzen eine ähnliche Molekülmasse (zwischen 39 kDa und 46 kDa) und zeigen ein hochkonserviertes Muster von 23 bis 24 Cysteinresiduen, die den gleichen Abstand zueinander aufweisen. Wegen der geringen Löslichkeit von Wnt-Proteinen ist bislang nur wenig über die Proteinstruktur bekannt: Die N-terminale Region bindet an den Rezeptor, die Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch die C-terminale Domäne des Proteins (Du et al. 1995; Hoppler et al. 1996).

#### 4.3.4 Expressionsmuster von *Wnt 3*

*Wnt3* wird in den frühen untersuchten Stadien innerhalb der gesamten Keimscheibe und ab dem Stadium 2 im posterioren Bereich des Embryos bzw. im Bereich des Primitivstreifens exprimiert (s. Abb. 14). Hypoblast-, Epiblast- und Mesodermzellen exprimieren *Wnt3*.

Verglichen mit dem *Wnt3*-Expressionsmuster der Maus (Liu et al. 1999) bestehen neben Gemeinsamkeiten auch deutliche Unterschiede:

(1) *Wnt3*-mRNA-Transkripte finden sich in der Maus etwa 6 Stunden vor der Primitivstreifenbildung (6,25 *dpc*) im Bereich des posterioren proximalen Epiblasten an der Grenze zum Trophoblasten des Eizylinders. Würde man den Eizylinder zu einer Scheibe ausbreiten (vgl. Yamaguchi 2001; Tam und Gad 2004) entspräche diese murine *Wnt3*-Expressionsdomäne dem sichelförmigen Areal der PGE des Stadium 2 im Kaninchen. In früheren Stadien der Maus fanden Liu und Mitarbeiter keine *Wnt3*-Expression in *in situ* Hybridisierungs-Experimenten (Liu et al. 1999); durch quantitative Methoden („real-time“-PCR) konnten in früheren Stadien nur geringe Mengen an *Wnt3*-mRNA im 5,5*dpc*-Embryo sowie in der Blastozyste nachgewiesen werden (Kemp et al. 2005). Die starke Expression von *Wnt3* im Stadium 1 des Kaninchens (s. Abb. 14 G) stellt somit einen Unterschied zur Maus dar. Die Polarisierung des Expressionsmusters im Stadium 2 ist Ausdruck der Spezifizierung unterschiedlicher Zellpopulationen innerhalb der Keimscheibe und weist auf einen Differenzierungsprozess des Epiblasten hin; auch andere Gene wie *Nodal* und sein Kofaktor

*Cripto* werden nach einer initialen Expression im gesamten Epiblasten und kurz vor Beginn der Primitivstreifenbildung posterior polarisiert exprimiert (Conlon et al. 1994). Ferner wird in einem der *Wnt3*-Expressionsdomäne ähnlichen Areal *Brachyury* exprimiert, ein Zielgen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (Arnold et al. 2000; Galceran et al. 2001). Die in der PGE exprimierten Gene, die eine zentrale Rolle bei der Mesoderminduktion einnehmen, weisen auf eine wichtige Rolle dieser Struktur hin, in dem die Primitivstreifenbildung vorbereitet wird (vgl. Viebahn et al., 2002).

Da sich in früheren Entwicklungsstadien der Maus keine oder nur sehr wenige *Wnt3*-Transkripte finden, könnten bei der großen Vielfalt der Wnt-Moleküle (19 murine *Wnt*-Gene) andere Vertreter der *Wnt*-Familie alternativ exprimiert werden. Ein möglicher Kandidat in der Maus wäre *Wnt3a*, das schon im Blastozystenstadium exprimiert wird (Kemp et al. 2005). Da es sich bei der *in situ* Hybridisierung um ein eher qualitatives Verfahren des mRNA-Nachweises handelt, könnten auch methodische Fehlerquellen vorliegen; die Menge der mRNA im Gewebe muss hierbei nicht mit der Intensität der Farbreaktion über die Zeit korrelieren. Neben dem Präparat in Abb. 14 G wurde eine starke, homogene Färbung der Keimscheibe jedoch noch in zwei weiteren Embryonen des Stadium 1 beobachtet (nicht gezeigt), die mit gleich langer Inkubationsdauer in der BM-Purple<sup>®</sup>-Lösung inkubiert wurden. Mit quantitativen Methoden (z.B. Real-Time-PCR) würde sich die *Wnt3*-mRNA-Konzentration zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten eindeutig bestimmen lassen können.

(2) Im Kaninchen wird *Wnt3* entlang des Keimscheibenrandes verstärkt exprimiert, so dass im Stadium 3 die gesamte Keimscheibe und insbesondere ein zentrales Areal ohne *Wnt3*-Expression umschlossen wird (s. Abb. 14 G-L). Innerhalb dieser antero-zentralen Domäne werden - wie bereits in Abschnitt 4.3.2 erwähnt - Signalmoleküle wie *Dkk1* (Weisheit 2002) oder *Cer1* (vgl. Abschnitt 3.4) exprimiert, die mesoderminduzierende Signale von Wnt- oder Nodal-Molekülen antagonisieren. Da sich die jeweiligen anterioren Expressionsdomänen von *Dkk1* und *Cer1* im Hypoblasten schon in frühen Entwicklungsstadien finden (*Dkk1*: St.0, *Cer1*: St.1), könnte die nach posterior verlagerte *Wnt3*-Expression im Epiblasten Folge der anterioren Etablierung der Expressionsdomänen der Antagonisten sein. Neben der bekannten Inhibierung der Nodal- und Wnt-Signale durch *Dkk1* und *Cer1* (Piccolo et al. 1999; Mao et al. 2001) konnte bislang nicht gezeigt werden, dass Wnt-Gene durch diese Signalmoleküle herunterreguliert werden.

Ein Kandidat für die Regulation des *Wnt3*-Gens („upstream“-Regulation) ist der Transkriptionsfaktor *Otx2*, der eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der anterior-posterioren Achse im Säuger spielt und im Kaninchen innerhalb der anterioren Keimscheibe exprimiert wird (Weisheit 2002): *Otx2*<sup>-/-</sup>-Mausmutanten entwickeln einen unpolarisierten Eizylinder mit distal verbliebenem AVE (Ang et al. 1996); *Dkk1* wird in den Mutanten nicht exprimiert, ist aber in der Lage, einen normalen Phänotyp wiederherzustellen (Kimura-Yoshida et al. 2005).

Eine fortsatzartige *Wnt3*-Expression entlang des Keimscheibenrandes lässt sich in den beschriebenen Expressionsmustern der Maus schwer erkennen (vgl. Liu et al. 1999). Im Kaninchen ist sie stadienabhängig unterschiedlich ausgebildet: Während die Fortsätze im Stadium 2 nur bis in das anteriore Drittel der Keimscheibe ragen, umschließen sie im Stadium 3 den gesamten Rand und bilden sich im späten Stadium 3 wieder zurück (s. Abb. 14 H-L). Diese stadienspezifische *Wnt3*-

Expression erinnert an die im Huhn beschriebenen zyklisch-oszillierenden Genexpressionen im Rahmen der Somitenbildung (z.B. Pourquie 2003; Maroto et al. 2005), wobei gezeigt werden konnte, dass kanonische Wnt-Signale eine zentrale Steuerungsfunktion in der Spezifizierung des präsomitischen Mesoderms im Rahmen der Somitogenese übernehmen (Aulehla et al. 2003).

(3) Während die Expression in der Maus auf den posterioren Teil des Primitivstreifens beschränkt bleibt (Liu et al. 1999), exprimieren im Kaninchen auch Zellen in anterioren Abschnitten des Primitivstreifens sowie im Primitivknoten *Wnt3* (s. Abb. 14 J-L). Die Expressionsintensität nimmt gradientenartig von posterior nach anterior ab. Die Etablierung eines solchen Wnt-Signalgradienten entlang des Primitivstreifens im Huhn ist im Rahmen der weiteren Spezialisierung mesodermaler Zellen insbesondere der Kardiogenese notwendig (Yamaguchi 2001): Ein starkes kanonisches Wnt-Signal induziert posterior die Differenzierung von paraxialen Mesodermzellen zu Blutzellen; bei abgeschwächtem Wnt-Signal werden im anterioren lateralen Mesoderm zusammen mit BMP-Signalmolekülen Herz-Vorläuferzellen gebildet. Eine Überexpression von *Wnt8c* – das als ein starkes Wnt-Signal angesehen wird (Hume und Dodd 1993) – hemmt die Kardiogenese (Popperl et al. 1997). Ferner wird im Huhn eine Feinregulation der Wnt-Aktivität durch im Hypoblasten sezernierte Antagonisten wie *Dkk1* oder *Crescent* vorgenommen (Marvin et al. 2001). Obwohl von *Crescent* im Säuger noch kein Äquivalent gefunden werden konnte, lässt die Expression von *Dkk1* im Kaninchen, deren Domäne im Hypoblasten sich spangenförmig über dem anterior-lateralen Mesoderm befindet (Weisheit 2002), auf einen ähnlichen Mechanismus schließen. Ferner wird *Dkk1* in der posterioren Hälfte des Primitivstreifens exprimiert, was auf einen modulierenden Einfluss während der Mesodermdifferenzierung, möglicherweise auch der Kardiogenese, hindeutet.

#### 4.3.5 Sequenzanalyse von $\beta$ -Catenin

Die Homologien der  $\beta$ -Cateninsequenzen innerhalb der verschiedenen Spezies sind sehr hoch, und die abgeleitete Kaninchen-Proteinsequenz weist zwischen 99,5% identische Aminosäuren zum Menschen und 98,5% identische Aminosäuren zum Frosch auf (s. Tabelle 8). Das Proteinprodukt des Segmentpolaritätsgens *Armadillo* der Fruchtfliege, dem Homolog zu  $\beta$ -Catenin, ist mit 76% identischer Aminosäuren ebenfalls stark konserviert. Insbesondere die *Armadillo*-Domänen, wovon in der abgeleiteten  $\beta$ -Catenin-Sequenz des Kaninchens die ersten acht von zwölf enthalten sind, zeigen ein stark konserviertes Muster aus 42 Aminosäuren. Funktionell interagieren die *Armadillo*-Domänen mit anderen Proteinen, z.B. mit E-Cadherin und Zytoskelettkomponenten wie Fascin oder Axin oder dem Tumorsuppressor APC, ebenfalls ein Protein der *Armadillo*-Superfamilie (Hulskan et al. 1994; Rubinfeld et al. 1995). Auch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie findet über die *Armadillo*-Motive von  $\beta$ -Catenin statt (Huber et al. 1997). *Armadillo*-Motive bilden eine kompakte Einheit und sind nicht perlenkettenartig angeordnet. Sie treten nicht einzeln sondern mindestens zu sechst auf. Eine *Armadillo*-Domäne mit 42 Aminosäuren besteht aus 3  $\alpha$ -Helices, die durch eine kurze Schleife verbunden sind und das Polypeptid um 90° drehen. Die Gesamtstruktur ist somit eine Serie von  $\alpha$ -Helices, die eine starre, rechtsgedrehte Superhelix bilden. Das  $\beta$ -Catenin-Protein ähnelt daher in seiner Gesamtstruktur einer Hantel, deren mittlere stabförmige *Armadillo*-Repeat-Domänen

jeweils von der carboxyterminalen Transaktivierungsdomäne und einer N-terminalen Phosphorylierungsdomäne flankiert werden (Huber et al. 1997; Willert und Nusse 1998). Die Phosphorylierungsdomäne, die mehrere phosphorylierbare Serin- und Threoninreste enthält, trägt wesentlich zur Stabilität des Moleküls bei: durch Phosphorylierung durch die Proteinkinasen Zw3/GSK3 und CK1 $\alpha$  im Wnt-Signalweg wird das Protein markiert und durch den Ubiquitin-Weg im Proteasom der Zelle abgebaut. Bei dieser zentralen Funktion des Armadillo-Motivs für  $\beta$ -Catenin ist die auch beim Kaninchen gefundene ausgeprägte Konservierung verständlich.

#### 4.3.6 Expressionsmuster von $\beta$ -Catenin

Aufgrund der dualen Funktion von  $\beta$ -Catenin zum einen als Strukturprotein, das beim Aufbau von Cadherin-basierten Zellkontakten beteiligt ist, und zum anderen als zytoplasmatisches Signalprotein im Wnt-Signalweg, ist seine Expression in vielen Zelltypen, insbesondere im epithelialen Zellverband, zu erwarten (Butz und Larue 1995; Huelsken et al. 2000). So spiegelt die Expressionsintensität von  $\beta$ -Catenin in den Aufsichtsbetrachtungen der Kaninchenkeimscheiben zunächst pauschal die morphologisch-anatomischen Strukturen der Embryonen gemäß ihrer Zelldichte wider. Desweiteren ähnelt jedoch das Expressionsmuster von  $\beta$ -Catenin den in Kaninchenkeimscheiben dieser Stadien beschriebenen lokalen Proliferationsmustern, wie sie durch BrdU-Inkorporation ermittelt wurden (Viebahn et al. 2002). Bei zunächst schwacher Expression im frühen Stadium 0 findet sich ab dem Stadium 1 eine erhöhte Expressionsintensität entlang des Keimscheibenrandes als Ausdruck der lokal erhöhten Zelldichte- und Zellproliferation im VRB (s. Abb. 16 B, H, P und Q). Dementsprechend ist im Stadium 2 die Expressionsintensität innerhalb der PGE bei entsprechend niedriger Zelldichte und geringerer Proliferation geringer (s. Abb. 16 C und I).

Im Gegensatz zu *Wnt3*, das im Stadium 2 wie *Brachyury* innerhalb der PGE exprimiert wird und zusammen mit  $\beta$ -Catenin zu den Mesoderm induzierenden Faktoren zählt (Huelsken et al. 2000), zeigt sich am posterioren Pol des Embryos überraschenderweise keine erhöhte  $\beta$ -Catenin-Expression vor der Primitivstreifenbildung. Es findet sich erst im frühen Stadium 3 eine lokale Zunahme der Expressionsintensität innerhalb der PGE, die mit der Vermehrung der einwandernden Mesodermzellen zusammenfällt (s. Abb. 16 J und O). Einige dieser Mesodermzellen der Transformationszone zeigen eine zum Teil stärkere Expressionsintensität als z.B. darüber liegende Epiblastzellen (s. Abb. 16 O). Hier könnte der Wnt-Signalweg trotzdem aktiviert sein, da in diesen Zellen aufgrund ihrer Loslösung aus dem epithelialen Zellverband kein  $\beta$ -Catenin zur Zell-Zell-Adhäsion gebildet werden muss. Auch im Eizylinder der Maus werden Catenine in neu generierten Mesodermzellen stark exprimiert, bei verminderter Expression von Cadherinen (Butz und Larue 1995).

Im Mausembryo wird sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene  $\beta$ -Catenin in allen embryonalen Keimblättern gleichmäßig exprimiert (Butz und Larue 1995; Huelsken et al. 2000). Mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen das nicht-phosphorylierte und somit Wnt-Signale vermittelnde  $\beta$ -Catenin-Moleküle gerichtet ist (van Noort et al. 2002), konnte wenige Stunden vor Beginn der Primitivstreifenbildung eine Akkumulation des nicht-phosphorylierten  $\beta$ -Catenins im

zukünftigen posterioren Bereich des Eizylinders nachgewiesen werden (Mohamed et al. 2004). Ähnliche Untersuchungen im Kaninchen mit Antikörpern, die zwischen zytoskelettassoziiertem und als Botenstoff fungierendem  $\beta$ -Catenin unterscheiden, wären sinnvoll, um in den definierten Stadien vor der Gastrulation kanonische Wnt-Aktivität nachzuweisen und somit Domänen zu benennen, in denen  $\beta$ -Catenin-Signale aktiv sind.

In der Maus spielt  $\beta$ -Catenin eine zentrale Rolle bei der Bildung des Primitivstreifens: die  $\beta$ -Catenin<sup>-/-</sup>-Mutante entwickelt kein Mesoderm oder Kopfstrukturen und entwickelt sich nicht über den siebten Tag nach der Befruchtung weiter (Huelsen et al. 2000). Das VE verbleibt am distalen Pol des Eizylinders im Gegensatz zur Wnt3<sup>-/-</sup>-Maus, bei der sich trotz ähnlich schwerer Gastrulationsdefekte das AVE ausbildet (Liu et al. 1999). Obwohl  $\beta$ -Catenin ein Zielgen von Wnt3 ist, scheint es möglicherweise über einen weiteren Signalweg und zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung ein  $\beta$ -Catenin abhängiges Signal zu geben, wodurch sich der AVE ausbildet. Mögliche Kandidaten wären die in der Maus in Gastrulationsstadien exprimierten kanonischen Wnt-Moleküle Wnt1, Wnt2b, Wnt6 und Wnt8a (Kemp et al. 2005). Die Knock-Out-Mutanten dieser Wnt-Moleküle zeigen allerdings keine Gastrulations- oder Achsendefekte, so dass hier von einer Redundanz ausgegangen werden muss. Hinsichtlich einer Aktivierung von  $\beta$ -Catenin von Molekülen außerhalb des kanonischen Wnt-Signalweges ist bislang noch nichts bekannt.

#### 4.3.7 Sequenzanalyse von *Lymphoid enhancer binding factor 1 (Lef1)*

Die amplifizierten cDNA Sequenzen des Transkriptionsfaktors *Lef1* umfassen insgesamt 95 % des kodierenden Bereiches (ORF) der Konsensussequenz von Mensch, Maus und Huhn, in dem der 3'-terminale Bereich des ORF enthalten ist. Die 3'-UTR ist aufgrund eines Abbruchs der Sequenzierungsreaktion 129 Bp nach dem Stopp-Kodon nicht vollständig sequenziert worden. Die aus der cDNA abgeleitete Proteinsequenz beginnt 22 Aminosäuren nach dem Startmethionin der Konsensussequenz und ihr Beginn liegt innerhalb der Proteinuntereinheit, an die  $\beta$ -Catenin zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors bindet (s. Abb. 17). Die stärksten Homologien zeigt *Lef1* zur menschlichen Sequenz, sowohl auf cDNA- als auch auf Proteinebene. Insgesamt ist das Gen innerhalb der Spezies Kaninchen, Mensch, Maus und Huhn (s. Tabelle 9) und auch zu anderen Säugern wie Nerz, Ratte oder Frettchen (vgl. Cordray und Satterwhite 2005) mit mehr als 95% identischen Aminosäuren innerhalb der Säugerspezies stark konserviert.

Bei der Sequenz des *Lef1*-Amplifikates aus 11,0 dpc Gesamt-cDNA handelt es sich um eine Splicevariante (*Lef1* <sup>$\Delta$ Exon 6</sup>). Alternatives Splicing und die Expression multipler Isoformen sind bei Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf-Familie und insbesondere von *Lef1* ein häufig beobachtetes Phänomen (Hovanes et al. 2000; Cordray und Satterwhite 2005). Die genomische Organisation des *Lef1*-Gens des Menschen umfasst 12 Exons und einen Bereich von 52 Kilobasen auf dem langen Arm von Chromosom 4. Durch ein Screening verschiedener menschlicher cDNA-Bibliotheken wurden *Lef1*-Isoformen gefunden, die im Bereich des 2., 3., 6. und 12. Exons alternativ gesplittet wurden (Hovanes et al. 2000). Die diesen Exons zu Grunde liegende Sequenz kodiert für Abschnitte der sogenannten CDA-Domäne („context dependent activation“; Exon 2, 3 und 6) sowie für das C-terminale Ende der Proteinsequenz (Exon 12; vgl. Hovanes et al. 2000



al. 2004). Die Expression von *Lef1* in Kaninchenkeimscheiben des Stadium 2 ist somit der bislang früheste Nachweis eines Transkriptionsfaktors der Lef/Tcf-Familie im Säuger.

Bislang konnte jedoch noch nicht gezeigt werden, dass Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf-Familie (neben *Lef1* sind noch Tcf1, Tcf3 und Tcf4 bekannt) im Säuger eine mesoderminduzierende Funktion haben. Die murine *Lef1*-Knock-Out-Mutante zeigt keine Defekte der Mesodermbildung, so dass von einer Redundanz ausgegangen werden muss (van Genderen et al. 1994). Auch die Mutanten von Tcf1, Tcf3 und Tcf4 zeigen zu Beginn der Gastrulation und zum Zeitpunkt der Mesoderminduktion einen unauffälligen Phänotyp (Verbeek et al. 1995; Korinek et al. 1998; Merrill et al. 2004). Die *Lef1*<sup>-/-</sup>Tcf1<sup>-/-</sup>-Doppelmutante allerdings zeigt Defekte des paraxialen Mesoderms und entwickelt mehrere Neuralrohre, was dem Phänotyp der *Wnt3a*-Knockout-Mutante ähnelt (Galceran et al. 1999). Durch Expressions- und Bindungsstudien konnte ferner gezeigt werden, dass *Lef1* in der Maus nicht zur Induktion, jedoch zur Aufrechterhaltung der Expression des Mesoderminduktors *Brachyury* benötigt wird (Galceran et al. 2001). Vor dem Hintergrund, dass in der *Wnt3*- und  $\beta$ -Catenin-Mutante kein Mesoderm gebildet wird (s.o.), wäre es möglich, dass  $\beta$ -Catenin (1) unabhängig von den Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie mesoderminduzierende Gene aktiviert oder (2) weitere Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie existieren, die noch nicht gefunden wurden (vgl. Merrill et al. 2004).

#### 4.3.9 Sequenzanalyse von *Cerberus-related-1 (Cer1)*

Die im Kaninchen klonierte cDNA-Sequenz des Signalmoleküls *Cer1* umfasst ca. 80 % des offenen Leserasters der Konsensussequenz von Mensch, Maus, Huhn und Frosch. Die daraus abgeleitete Proteinsequenz beginnt 10 AS nach dem Startmethionin und endet 3 AS vor dem Ende einer in allen Spezies hochkonservierten cystinreichen Domäne (CRD), die gleichzeitig charakteristisch für die sog. Can-Familie ist und auch Can-Domäne genannt wird (Pearce et al. 1999). Die Kaninchensequenz ist zu den Säugerspezies Mensch und Maus auf cDNA- und Proteinebene am stärksten homolog, wobei das Gen insgesamt nicht stark konserviert ist (s. Tabelle 10). Die höchsten Homologien zeigt es zu der menschlichen Sequenz, schwache zu der Cerberus-Sequenz von Huhn und Frosch, wobei der 80 AS umfassende Bereich der Can-Domäne deutlich höher konserviert ist (Kaninchen vs. Frosch: 58,4 %; Mensch vs. Frosch: 60,0%, s. Abb. 25).

```

oc C (X13) CEEVVLQNNLCFGKCGSVHFPEAVPHLHTFCSHCSPAKSTTMHLQLNCTGVPPVIKVVMQVEE---
hs C (X13) CEKVVVQNNLCFGKCGSVHFPGAAQHSHTSCSHCLPAKFITMHLPLNCTELSSVIKVVMLVEECQC
xl C (X13) CDRMVIQNNLCFGKCSLHVFNQ-QDRRNTCSHCLPSKFTLNHLTLNCTGSKNVVKVVMVVEECTC
con C (X13) CE-VV-QNNLCCFGKC-S-HFP-----HT-CSHCLP-KFTTMHL-LNCT-----V-KVVM-VEEC-C

```

Abb. 25: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Can-Domänen von Kaninchen und Mensch (*Cer1*) sowie vom Frosch (Cerberus). Die Position der Cysteine (in der Konsensussequenz unterstrichen) ist in allen Sequenzen hoch konserviert. Die beiden Cysteinemotive, die an der Bildung der Ringstruktur des Proteins beteiligt sind, sind fett hervorgehoben. Oc: *Oryctolagus cuniculus*, hs: *homo sapiens*, xl: *xenopus laevis*, con: Konsensussequenz.

In der Kaninchensequenz sind die ersten sieben der neun konservierten Cysteinresiduen enthalten, die den gleichen Abstand zueinander aufweisen und ein besonderes Merkmal der Can-Domäne sind (Belo et al. 1997; Pearce et al. 1999; s. Abb. 25). Das Cysteinemuster der Can-Domäne lautet: C-X<sub>13</sub>-C-X<sub>9/10</sub>-C-X-G-X-C-X<sub>n</sub>-C-X<sub>13</sub>-C-X<sub>n</sub>-C-X-C. Die Cerberus- bzw. *Cer1*-

Sequenzen besitzen darüber hinaus an Position 218 der Konsensussequenz ein weiteres Cystein, das nicht in allen Proteinen der Can-Familie zu finden ist. Die Cysteine dieser Domäne bilden ein sog. Cysteinknotenmotiv und geben den Proteinen der Can-Familie eine typische ringförmige Tertiärstruktur, wie sie auch in einigen Proteinen der TGF $\beta$ -Superfamilie, insbesondere der BMPs, gefunden werden (Avsian-Kretschmer und Hsueh 2004).

#### 4.3.10 Expressionsmuster von *Cerberus-related-1 (Cer1)*

In Entwicklungsstadien vor der Primitivstreifenbildung finden sich *Cer1*-Transkripte im Hypoblasten der Keimscheibe. Schon im frühen Stadium 0 exprimieren einzelne Hypoblastzellen *Cer1* im Zentrum der Keimscheibe. Diese Domäne, die initial nur wenige Zellen umfasst, weitet sich aus und findet sich zu Beginn der morphologischen Differenzierung in anterioren Bereichen des Embryos; sie bildet ein pilzförmiges Muster, das mit dem Keimscheibenzentrum in Verbindung steht (s. Abb. 21).

Die raschen Veränderungen des *Cer1*-Expressionsmusters der Stadien 0-1, wie in Abb. 21 dargestellt, suggerieren dynamische Prozesse im Hypoblasten, die am ehesten Zellwanderungen in dieser Gewebsschicht entsprechen könnten. Wie in der Maus finden sich die ersten *Cer1*-exprimierenden Hypoblastzellen innerhalb einer kleinen Zellpopulation im Zentrum der Keimscheibe; entsprechend der Architektur des Eizylinders sind diese dort distal gelegen (Belo et al. 1997; Shawlot et al. 1998; Stanley et al. 2000) und befänden sich bei einer Ausfaltung des Eizylinders im Zentrum des Embryos. Diese Zellen unterscheiden sich molekular (Beddington und Robertson 1999) und morphologisch (Rivera-Perez et al. 2003) von den übrigen Hypoblastzellen des frühen Mausembryos. Durch Farbstoff- (Thomas et al. 1998) und GFP-Markierung (Rivera-Perez et al. 2003) wurden nach anterior gerichtete Wanderungsbewegungen im Hypoblasten nachgewiesen, wodurch sich schließlich das sogenannte anteriore viszerale Endoderm (AVE) der Maus ausbildet (vgl. Abschnitt 1.3.1). Ähnliche Wanderungsbewegungen könnten im Hypoblasten des Kaninchens auch auftreten, um eine dem AVE entsprechende Hypoblastzellpopulation auszubilden. Ein hypothetisches Modell der morphogenetischen Prozesse im Hypoblasten ist in Abschnitt 4.4 dargestellt.

Ferner wird *Cer1* im Hypoblasten asymmetrisch exprimiert (s. z.B. Abb. 22 H). In den in dieser Arbeit untersuchten Expressionsmustern konnte jedoch keine Seitenlastigkeit der anterioren *Cer1*-Domäne gefunden werden, und so wären weitere Analysen im Hinblick auf eine funktionelle Rolle von *Cer1* im Rahmen der Ausbildung der Rechts-links-Achse in diesen frühen Stadien höchst interessant, zumal Cerberus im Huhn in späteren Entwicklungsstadien die Rechts-links-Asymmetrie von Kopf- und Herzstrukturen reguliert (Zhu et al. 1999).

Die Kontur der *Cer1*-Expressionsdomäne dieser Stadien markiert einen Bereich der Keimscheibe, aus dem sich später im Epiblasten Kopf- und Vorderhirnstrukturen ableiten und u.a. neurale Marker wie das Homeoboxgen *ANF* oder der Transkriptionsfaktor *Otx2* exprimiert werden (Weisheit 2002). Ferner zeigen die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Hypoblastresektionen, dass diese zentrale anteriore Expressionsdomäne unterhalb eines Bereiches des Epiblasten liegt, die nach Hypoblastresektion am frühesten einer epithelio-mesenchymalen Transformation nicht mehr zugänglich ist (vgl. Abschnitt 3.1.3). Obwohl der Phänotyp der *Cer1*<sup>-/-</sup> Mausmutante unauffällig ist und insbesondere während der Gastrulation



keine Defekte aufweist (Simpson et al. 1999; Shawlot et al. 2000), konnte in *Xenopus*-Essays gezeigt werden, dass *mCer1* Neuralmarker wie *N-CAM*, *Sox-2* und *Otx2* induziert (Belo et al. 1997). In der *Cer1<sup>-/-</sup>/Lefty1<sup>-/-</sup>* Doppelmutante, die neben ektopen Primitivstreifen und Achsenduplikationen auch eine verminderte Expression von *Otx2* zeigt, fand man in dem TGF- $\beta$ -Antagonisten *Lefty1* das zu *Cer1* redundante Gen (Perea-Gomez et al. 2002). Ein weiterer Faktor, der innerhalb der anterioren Keimscheibenhälfte von Hypoblastzellen des Kaninchens exprimiert wird, aber ein zu *Cer1* komplementäres Expressionsmuster aufweist, ist der Wnt-Antagonist *Dkk1* (Glinka et al. 1998; Weisheit 2002): schon im Stadium 0 wird *Dkk1* innerhalb einer spangenförmigen, am anterioren und lateralen Keimscheibenrand gelegenen Domäne exprimiert, die die *Cer1*-exprimierenden Hypoblastzellen umschließt. Dabei finden sich in lateralen Bereichen Überschneidungen der Expressionsmuster und einige Zellen exprimieren sowohl *Dkk1* als auch *Cer1*. Diese Expressionsmuster suggerieren eine komplementäre Rolle von Hypoblastkompartimenten bei der Induktion von Kopfstrukturen bzw. Mesoderminhibition. Möglicherweise schirmt die spangenförmige *Dkk1*-Domäne die zentrale *Cer1*-Domäne von Signalen aus dem extraembryonalen Gewebe ab, welches in der Maus Quelle von Faktoren ist, die einen modulierenden Einfluss auf die Mesodermentwicklung haben (Rodriguez et al. 2005; Georgiades und Rossant 2006; Richardson et al. 2006; vgl. Abschnitt 4.4). Im Stadium 3 beginnt sich die anteriore *Cer1*-Domäne im Hypoblasten zurückzubilden und ist in Primitivknotenstadien nicht mehr zu finden (s. Abb. 22). Die mesoderminhibierende Wirkung von *Cer1* scheint zu Beginn der Gastrulation entbehrlich zu sein und die Epiblastzellen im Bereich der *Cer1*-Expressionsdomäne sind nicht mehr „anfällig“ für mesoderminduzierende Signale. Dies wird durch die Flachkulturexperimente dieser Arbeit gestützt. In kultivierten Keimscheiben des Stadium 3 mit reseziertem Hypoblasten wird in zentral-anterioren Bereichen des Embryos keine ektopye *Brachyury*-Expression mehr gefunden (vgl. Abschnitt 4.2). Das Zeitfenster, in dem *Cer1* seine Wirkung entfaltet und einen direkten Einfluss auf Musterungsprozesse im Epiblasten nimmt, ist demnach im Stadium 1 bzw. frühen Stadium 2 gelegen.

Die Expression von *Cerberus* im frühen Hühnerembryo ist vergleichbar mit den Expressionsmustern des Kaninchens, jedoch wird *Cerberus* initial im posterioren Teil des Hypoblasten exprimiert (Foley et al. 2000), was sicher auf die unterschiedliche Entwicklungsgeschichte des Hypoblasten bei Vögeln und bei Säugern zurückzuführen ist (vgl. Abschnitt 1.1.2). Die Verdrängung des Hypoblasten durch den Endoblasten im Huhn und damit die Verlegung der *Cerberus*-Expressionsdomäne nach anterior verhindert die Ausbildung zusätzlicher Primitivstreifen und ermöglicht die Entwicklung von Kopfstrukturen (Bertocchini und Stern 2002).

Zu Beginn der Mesodermbildung wird *Cer1* außerdem in den apikalen Zellkompartimenten von Epiblastzellen des vorderen Primitivstreifens exprimiert (s. Abb. 22). Eine solche *Cer1*-Expression im Primitivstreifen der Maus ist nicht beschrieben (Belo et al. 1997; Stanley et al. 2000), jedoch wird *Cerberus* auch im anterioren Primitivstreifen des Huhns exprimiert (Foley et al. 2000; Chapman et al. 2002). Trotz der zwischen Kaninchen und Maus engeren phylogenetischen Verwandtschaft scheint hier ein Mechanismus der Primitivstreifenmodulation konserviert zu sein, der sich auch im Huhn etabliert hat und auf den die Maus zu verzichten scheint. Dabei könnte es sich um einen autoinhibitorischen Mechanismus handeln, wodurch eine überschüssige

Mesodermbildung im anterioren Primitivstreifen supprimiert würde. Die im Eizylinder der Maus "beengte" Primitivstreifenbildung und die schnelle Embryonalentwicklung könnte in der Maus diesen autoinhibitorischen Mechanismus entbehrlich machen. Eine ähnliche Rolle im Sinne einer Feinregulation der Mesodermgenerierung scheint der Wnt-Inhibitor *Dkk1* zu spielen, der wie *Cer1* im Primitivstreifen von Kaninchen und Huhn jedoch nicht in der Maus exprimiert wird (Foley et al. 2000; Perea-Gomez et al. 2001a; Weisheit 2002). Wie im Kaninchen wird *Cer1* jedoch in der Maus stark in Mesodermzellen exprimiert die nach anterior aus dem Primitivstreifen auswandern und an der Bildung von Kopfmesoderm beteiligt sind (Stanley et al. 2000).

#### 4.4 Zusammenfassung: Signalzentren und Achsenbildung

Trägt man die in dieser Arbeit erhobenen Expressionsmuster zusammen und ergänzt die Daten mit weiteren bekannte Genexpressionen, lassen sich im frühen Säugerembryo Domänen topographisch beschreiben, die im Sinne von Signalzentren Musterungsprozesse steuern (s. Abb. 26).

Neben *Cer1* werden im Hypoblasten früherer Embryonalstadien des Kaninchens weitere Gene wie der Nodal-Antagonist *Lefty1*, der Transkriptionsfaktor *Hex* oder der Wnt-Antagonist *Dickkopf1* (*Dkk1*) polarisiert exprimiert (Weisheit 2002; J. Plitzner, Manuskript in Vorbereitung). Dabei etablieren sich die im Stadium 0 zentral liegenden Expressionsdomänen von *Cer1* und *Lefty1* im Laufe des Stadium 1 in anterioren Bereichen im Hypoblasten, während *Dkk1* schon im Stadium 0 in einem spangenförmigen, asymmetrischen Muster exprimiert wird (Weisheit 2002). Da es sich hierbei um inhibitorische Faktoren der Mesodermkaskade handelt (vgl. Abschnitt 1.3.2), dient das Expressionsareal dieser Gene als Ursprung von Signalen, die im Epiblasten Musterungsprozesse auslösen (vertikale Musterungsvermittlung). Da der Hypoblast entgegen alten Vorstellungen nicht zum Endoderm umgewandelt wird, sondern als extraembryonales, mit dem Dottersackepithel eng verwandtes Gewebe angesehen wird, kann dieses Areal als anteriores extraembryonales Signalzentrum (AXS) bezeichnet werden (s. Abb. 26). Aufgrund der im AXS exprimierten Gene entspricht es dem anterioren viszeralem Endoderm (AVE) der Maus (vgl. Abschnitt 1.3; Beddington und Robertson 1999).

Das AXS ist in der anterioren Keimscheibenhälfte gelegen, wobei der Rand der Keimscheibe nicht erreicht wird. Die einzelnen Expressionsmuster der im AXS exprimierten Gene markieren eigenständige Domänen und sind teilweise komplementär zueinander, so dass das AXS wiederum in weitere Subkompartimente unterteilt werden kann: Die zentral gelegenen Expressionsmuster von *Cer1*, *Lefty1* und *Hex* werden durch das spangenförmige Expressionsmuster von *Dkk1* umrandet (s. Abb. 26).

Vom AXS gehen Signale aus, welche die Mesodermbildung in anterioren Bereichen des Epiblasten unterdrücken und die Primitivstreifenbildung posterior ermöglichen (vgl. Abschnitt 3.1). Die Komplementarität der im AXS exprimierten Genexpressionsmuster suggeriert, dass das AXS neben seiner „globalen“, mesoderm-inhibierenden Funktion auch eine Feinabstimmung der anterioren Musterung des Epiblasten (z.B. für die Neuralinduktion) vornimmt. Auch wenn in frühen Gastrulationsstadien noch keine differentielle Genexpression im anterioren Epiblasten beobachtet wurde, zeigen sich lokale Unterschiede des Proliferationsmusters: die Proliferations-

rate ist im Epiblasten innerhalb eines ringförmigen, anterior gelegenen Areals höher als in zentralen Bereichen (Viebahn et al. 2002). Des Weiteren könnte die spangenförmige *Dkk1*-Domäne zentral-anteriore Bereiche des Epiblasten von mesoderminduzierenden Signalen, die aus dem extraembryonalen Gewebe stammen, abschirmen (vgl. Abschnitt 1.3.2 und Abb. 4).

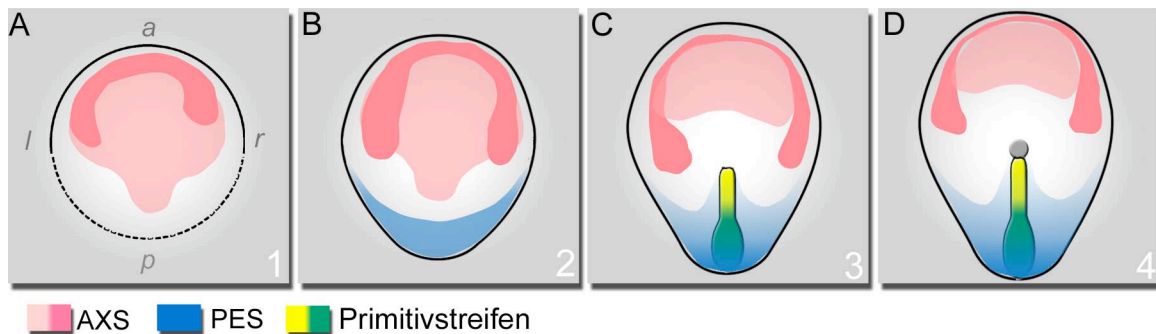


Abb. 26: Schematische Darstellung der Signalzentren während der frühen Embryonalentwicklung des Kaninchens. (A) Stadium 1, (B) Stadium 2, (C) Stadium 3, (D) Stadium 4. Die Kontur des AXS (anteriores extraembryonales Signalzentrum) wurde durch das Übereinanderlegen der bekannten Genexpressionen (*Cer1*, *Dkk1*, *Lefty1* und *Hex*) abgeleitet. Die Eigenständigkeit unterschiedlicher Domänen innerhalb des AXS ist anhand von *Dkk1* (*dunkelrosa*) gezeigt, dessen Expressionsmuster eine spangenförmige Domäne demarkiert. PES: posteriore embryonales Signalzentrum.

Die physikalische Ablation des AXS protrahiert die Expression des Mesodermmarkers *Brachyury* (vgl. Abschnitt 3.1). Der Mesoderm antagonisierende Effekt des AXS konnte dadurch eindeutig auch im Kaninchen gezeigt werden: *Brachyury* kann im Verlauf des Stadium 1 nicht mehr von allen Epiblastzellen nach Hypoblastresektion exprimiert werden bzw. anteriore Epiblastzellen nehmen in Folge vertikaler Musterungsvermittlung vor dem Stadium 2 unterschiedliche Entwicklungsschicksale ein. Ausdruck dieser unterschiedlichen Entwicklungsschicksale im Epiblasten ist die Bildung des VRB und der PGE sowie der damit einhergehenden differentiellen Genexpression: die mesoderminduzierenden Faktoren *Wnt3*, *Lef1* und (als Zielgen) *Brachyury* werden im Stadium 2 innerhalb der PGE exprimiert. Während die Expression von *Lef1* und *Brachyury* erst im Stadium 2 beginnt, wird die *Wnt3*-Expression nach posterior verlagert, vermutlich als Folge der Etablierung und Vergrößerung des AXS im anterioren Hypoblasten. Innerhalb der PGE bildet sich somit im Epiblasten des Stadium 2 ein weiteres Signalzentrum, das posteriore embryonale Signalzentrum (PES). Signale aus dem PES induzieren in Epiblastzellen den epithelio-mesenchymalen Transformationsprozess. Sie beeinflussen möglicherweise über das Stadium 3 hinaus die Musterung des Primitivstreifens entlang der antero-posterioren Achse, worauf die von posterior nach anterior abfallende Expressionsintensität der im PES exprimierten Gene hindeuten könnte (s. Abb. 14, Abb. 19). Epiblastzellen des anterioren Primitivstreifens exprimieren *Wnt3*, *Lef1* und *Brachyury* nur sehr schwach. Allerdings werden im anterioren Abschnitt des Primitivstreifens „Organisatorgene“ wie *Nodal* (Conlon et al. 1994), *gooseoid* (Blum et al. 1992) und *Cer1* (vgl. Abschnitt 3.4) exprimiert, so dass sich der Primitivstreifen in weitere (Signal-)Kompartimente einteilen lässt (Abb. 26 C und D). *Dkk1* hingegen wird im Stadium 3 innerhalb des posterioren Primitivstreifens exprimiert. Der Gradient der im PES exprimierten Gene suggeriert, dass Epiblastzellen des Primitivstreifens aufgrund des Morphogengradienten unterschiedliche Genexpressionen annehmen könnten.

Mit der Bildung des AXS und des PES ist der Embryo zu seiner vollen Polarität gelangt und die Körperachsen sind im Stadium 1 bereits angelegt. Die Aufgabe der Signalzentren ist die

Umsetzung der Polarität durch (vertikale) Musterungsvermittlung. Das eigentliche symmetriebrechende Ereignis, wodurch die Körperachsen *initial* spezifiziert werden, ist mit der Bildung des AXS verbunden und findet zeitlich zwischen dem Stadium 0 und dem Stadium 1 statt.

Im Folgenden soll dazu ein zum Teil auf den Ergebnissen dieser Arbeit begründetes, noch zu verifizierendes Modell vorgestellt werden, das die Entwicklung der axialen Polarität im Säugerembryo beschreibt, wodurch die Primitivstreifenentwicklung als erstes eindeutiges Zeichen einer Hauptkörperachse vorbereitet wird:

Im geometrischen Sinn kann das Stadium 0 als punktsymmetrisch betrachtet werden (s. Abb. 27 A): Die dorso-ventrale Achse ist aufgrund der Separierung der embryonalen Zellmasse während der Blastozystenbildung bereits angelegt, wobei der kreisförmige Embryo keine Polarisierung entlang der beiden anderen Körperachsen (anterior-posterior und rechts-links) aufweist. Im Stadium 1 bildet sich der VRB am anterioren Keimscheibenrand. Da die dorso-ventrale Achse fixiert ist, ist neben der nun sichtbaren anterior-posterioren Achse zwangsläufig die Rechts-links-Achse angelegt, allerdings nicht im Sinne einer morphologischen oder molekularen Differenzierung ausgestattet. Dass das extraembryonale Gewebe, insbesondere der Hypoblast, die Bildung der Körperachsen steuert, wird durch folgende Beobachtungen gleichfalls untermauert: (1) Hypoblastzellen der Maus wandern zielgerichtet zum prospektiven anterioren Pol des Embryos bevor sich der Primitivstreifen ausbildet (Thomas und Beddington 1996; Kimura et al. 2000; Rivera-Perez et al. 2003). (2) *Cx32* wird in einem ringförmigen, exzentrischen Muster und *Dkk1* spangenförmig und asymmetrisch im Stadium 0 des Hypoblasten im Kaninchens exprimiert (vgl. Abschnitt 3.2.2, Weisheit 2002). (3) der Trophoblast der Maus (das sog. extraembryonale Ektoderm) nimmt Einfluss auf die Achsenbildung durch Bildung sezernierter Wachstumsfaktoren (*BMP4*: Lawson et al. 1999; *Gdf3*: Chen et al. 2006; vgl. auch Rodriguez et al. 2005; Richardson et al. 2006).

Zellbewegungen im Hypoblasten, die zur Ausbildung des VRB führen, könnten im frühen Stadium 0 polonaiseartig beginnen, einer Form der Zellbewegung, wie sie ursprünglicherweise im Epiblasten von Hühnerembryonen beschrieben wurde (z.B. Gräper 1929; Pasteels 1943). Das *Dkk1*-Expressionsmuster sowie Zellmarkierungsuntersuchungen im Hypoblasten der Maus (Perea-Gomez et al. 2001a) suggerieren, dass eine Gruppe von Zellen mit einer zirkulären, konzentrischen Ausrichtung wandert, wobei die Zellen des Zentrums der Gruppe sich langsamer bewegen als die der Peripherie (s. Abb. 27 A).

Sobald das geometrische Zentrum dieser zirkulären Zellbewegung im Hypoblasten auch nur leicht in Richtung der Peripherie verschoben wird, kommen peripher liegende Zellen der „Polonaise“ in Kontakt mit extraembryonal produzierten Faktoren, deren Konzentration in der Peripherie höher ist als im Keimscheibenzentrum (s. Abb. 27 B). Als Folge nehmen die peripheren Zellen eine andere Genexpression an (z.B. *Dkk1*), bilden eine stärkere Zelladhäsion untereinander aus, verlangsamen sich und bleiben schließlich an ihrem Platz, wodurch die Genexpressionsmuster fixiert sind. Der „Aufstau“ durch die nachkommenden Hypoblastzellen bewirkt morphometrische Veränderungen wie erhöhte Zelldichte und eine gewölbt-kubische Zytomorphologie. Durch die Ausweitung der morphometrischen Veränderungen auf nachkommende Zellen entsteht schließlich die scharfe Begrenzung der Keimscheibe im Stadium 1 und die Struktur des VRB (s.

Abb. 27 C und D). Die Verlagerung des Keimscheibenzentrums in Richtung der Peripherie wäre demzufolge das eigentliche symmetriebrechende Ereignis (violetter Pfeil in Abb. 27 B). Dazu wären nur minimalste Kräfte erforderlich, und diese Verlagerung könnte zufällig stattfinden. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass Signale aus dem extraembryonalen Gewebe der Maus, dem sog. extraembryonalen Ektoderm, das dem Trophoblasten anderer Säuger entspricht, diesen (ersten) Polarisierungsschritt induzieren könnten (Rodriguez et al. 2005; Georgiades und Rossant 2006; Richardson et al. 2006). Das siegelringförmige Cx32-Expressionmuster im Hypoblasten, deren Cx32-freies Zentrum sich während des Stadium 0 herausbildet und nach anterior „verschoben“ ist, könnte ein Ausdruck dieses Ereignisses sein (s. Abb. 10). Damit die Begrenzung der Keimscheibe nach anterior durch den Aufstau der nachrückenden Hypoblastzellen nicht durchbrochen werden kann, ist die Ausbildung von funktionellen Interzellulärkontakten wie Gap junctions entlang des Keimscheibenrandes notwendig, was die randbetonte und sich früh ausbildende Cx32-Expression erklärt (s. Abb. 10 und Abb. 11).

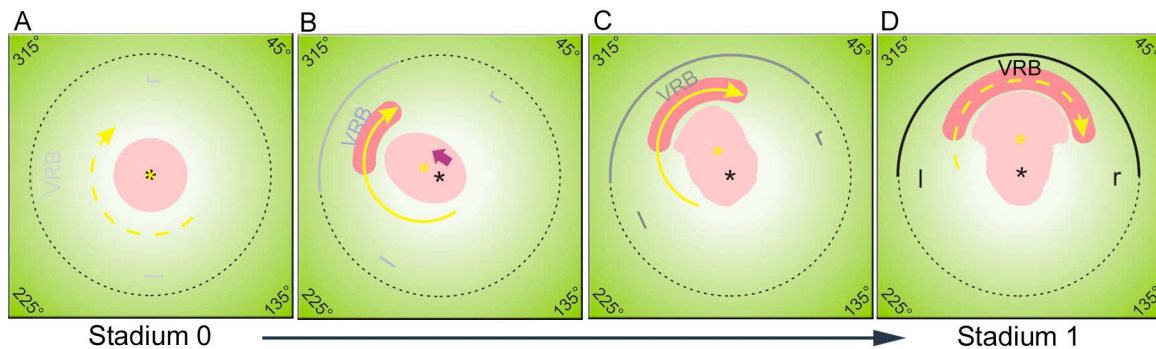


Abb. 27: Hypothetisches Modell, das die Mechanismen der Etablierung der anterior-posterioren Achse beschreibt. Das Modell basiert auf zirkulären Zellbewegungen von Hypoblastzellen (gelbe Pfeile) und einem von peripher nach zentral reichenden Morphogengradienten, der extraembryonal seinen Ursprung hat (grün). (A) Das Stadium der Punktsymmetrie wird durch die Verlagerung des geometrischen Zentrums (gelber Stern) in Richtung der Peripherie durchbrochen (violetter Pfeil). (B) Dadurch kommen periphere Hypoblastzellen in Kontakt mit unterschiedlichen Morphogengradienten, was (C) zu einer Zunahme und schließlich (D) zu einer breiten, spezifischen Genexpression führt (dunkelrosa). Diese Genexpression wird mit einer Zunahme der Zelladhäsion sowie einer Verlangsamung der Zellbewegungen begleitet, wodurch sich die morphologischen Eigenschaften von Hypoblastzellen anteriorer Regionen ändern. (D) Das Resultat dieser Ereignisse ist ein voll polarisierter Embryo im Stadium 1 mit scharfer anteriorer Begrenzung, der vollen Ausbildung des VRB und einer polarisierten Rechts-links-Achse. Das hellrosa Areal demarkiert ein zunächst zentral liegendes Areal spezifischer Genexpression im Hypoblasten, das durch die Zellbewegungen nach anterior verlegt wird; die Gesamtheit der anterior exprimierten Gene dieser Stadien kann im Hinblick auf ihre Funktion im Zusammenhang mit vertikaler Musterungsvermittlung als anteriores extraembryonales Signalzentrum (AXS) bezeichnet werden.

Mit der Verlagerung der zirkulären Zellbewegung wird gleichzeitig ein zentral liegendes Areal, etwa die *Cer1* exprimierende Domäne bzw. das Areal des AXS, das sich im Stadium 0 noch punktsymmetrisch im Keimscheibenzentrum befindet, exzentrisch verschoben. Die Zellen dieses Areals gelangen in den „Sog“ der Polonaisebewegung und das initial runde Kompartiment wird in Richtung des zukünftigen anterioren Poles gestreckt (s. Abb. 27 B). Das pilzförmige Muster der *Cer1*-Expressionsdomäne im Stadium 1 erklärt sich durch die in der Peripherie stärker wirkenden Scherkräfte der zirkulären Zellbewegungen. Die Dynamik der Zellwanderungen könnten die Form der zentralen Domäne insbesondere in der Peripherie auseinanderzerren, was die häufig beobachteten rechts- bzw. linkslastigen Expressionsmuster von *Cer1* erklären könnte.

Lange Zeit galt die Bildung des Primitivstreifens als das erste Zeichen einer Körperachse während der Säugerentwicklung und stellte den eigentlichen Beginn der Gastrulation dar. Die

Entdeckung morphologisch sichtbarer „Achsenorgane“ (VRB und PGE im Kaninchen, vgl. Viebahn et al. 2002) sowie polarisierte Genexpressionen im Hypoblasten (Kaninchen: Weisheit 2002 und diese Arbeit; Maus: Beddington und Robertson 1999) legen nahe, dass die Anlage der Körperachsen bereits deutlich vor Beginn der Primitivstreifenbildung erfolgt.

Anhand des vorgestellten Modells lassen sich drei Schritte der Achsenbildung unterscheiden:

(1) Im ersten Schritt, der auch *Achsenpezifizierung* genannt werden kann, wird die Punktsymmetrie der Keimscheibe aufgebrochen und der Embryo erhält - zufällig oder über bislang unbekannte Faktoren gesteuert - seine molekulare Polarität im Sinne einer asymmetrischen Genexpression im Hypoblasten durch die Etablierung des AXS.

(2) Durch die *Achsendeterminierung*, bei dem sich der VRB als erstes Zeichen der Körperachse ausbildet, erfolgt die morphologische Polarisierung. Die axiale Differenzierung der Epiblastzellen steht unter dem Einfluss des AXS und im Verlauf des Stadium 1 erhalten Epiblastzellen ein anteriores bzw. posteriores Entwicklungsschicksal.

(3) Schließlich erfolgt die Bildung weiterer Strukturen wie Primitivstreifen, Primitivknoten und Chordafortsatz als Ausdruck einer axialen *Musterung*, die über das Stadium 3 hinaus unter dem Einfluss des PES stehen könnte.

Vergleicht man einige entwicklungsbiologische Modellorganismen (vgl. Abschnitt 1.1), so scheinen die verschiedenen Mechanismen der Achsenbildung, des Gastrulationsgeschehens und der Ausbildung von Signalzentren in der unterschiedlichen Architektur der Embryonen begründet zu sein. Im Krallenfrosch müssen die Signalzentren anders angeordnet sein, weil das dem Hypoblast entsprechende Gewebe durch das Blastocoel vom Ektoderm (dem Äquivalent des Epiblasten) weit getrennt liegt und so vertikale Musterungsvermittlung wenig wahrscheinlich erscheint. Die Achsenbildung im Frosch wird initial von maternalen Faktoren und der Eintrittsstelle des Spermiums festgelegt (ein Mechanismus, der allerdings auch im Säuger eine Rolle spielen könnte und kontrovers diskutiert wird; vgl. Zernicka-Goetz 2002). Im Huhn werden die Körperachsen durch die Eirotation im Uterus festgelegt. Der Hypoblast selbst hat eine andere Entwicklungsgeschichte als der des Säugers (vgl. Abschnitt 1.1.2), und nur manche AXS-typische Gene werden auch im Hypoblasten des Huhnes exprimiert (vgl. Chapman et al. 2002). Der Eizylinder der Maus erschwert die Erfassung der hier für das Kaninchen beschriebenen räumlich-zeitlichen Komplementarität der Inhibitoren; vielmehr scheint es wahrscheinlich, dass die Musterungsprozesse bei der Maus modifiziert sind, da der posteriore und anteriore Pol des Mausembryos sich aufgrund der becherförmigen Morphologie näher kommen als bei allen Säugern, die nicht zu den Nagern zählen. Interessanterweise zeigt die Keimscheibe der Gastrulationsstadien beim Menschen wie die des Kaninchens die für die meisten Säuger typische flache Form und die gleiche Abfolge der frühen vorübergehenden Achsenorgane, so dass die molekularen und funktionellen Mechanismen der Achsenbildung beim Menschen den hier für das Kaninchen beschriebenen Verhältnissen sehr ähnlich sein dürften.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aasar, Y. H.: The history of the prechordal plate in the rabbit. *J. Anat.* 66 (1931) 14-45
2. Agius, E., Oelgeschlager, M., Wessely, O., Kemp, C., De Robertis, E. M.: Endodermal nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. *Development* 127 (2000) 1173-1183
3. Amaya, E., Stein, P. A., Musci, T. J., Kirschner, M. W.: FGF signalling in the early specification of mesoderm in *Xenopus*. *Development* 118 (1993) 477-487
4. Ang, S. L., Conlon, R. A., Jin, O., Rossant, J.: Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse *Otx2* in ectoderm explants. *Development* 120 (1994) 2979-2989
5. Ang, S. L., Jin, O., Rhinn, M., Daigle, N., Stevenson, L., Rossant, J.: A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* 122 (1996) 243-252
6. Arnold, S. J., Stappert, J., Bauer, A., Kispert, A., Herrmann, B. G., Kemler, R.: Brachyury is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mech Dev* 91 (2000) 249-258
7. Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B., Herrmann, B. G.: Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev Cell* 4 (2003) 395-406
8. Avsian-Kretschmer, O., Hsueh, A. J.: Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol* 18 (2004) 1-12
9. Barron, D. J., Valdimarsson, G., Paul, D. L., Kidder, G. M.: Connexin32, a gap junction protein, is a persistent oogenic product through preimplantation development of the mouse. *Dev Genet* 10 (1989) 318-323
10. Becker, D. L., Davies, C. S.: Role of gap junctions in the development of the preimplantation mouse embryo. *Microsc Res Tech* 31 (1995) 364-374
11. Beddington, R. S., Robertson, E. J.: Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96 (1999) 195-209
12. Belo, J. A., Bouwmeester, T., Leyns, L., Kertesz, N., Gallo, M., Follettie, M., De Robertis, E. M.: Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mech Dev* 68 (1997) 45-57
13. Belo, J. A., Bachiller, D., Agius, E., Kemp, C., Borges, A. C., Marques, S., Piccolo, S., De Robertis, E. M.: Cerberus-like is a secreted BMP and nodal antagonist not essential for mouse development. *Genesis* 26 (2000) 265-270
14. Bertocchini, F., Stern, C. D.: The hypoblast of the chick embryo positions the primitive streak by antagonizing nodal signaling. *Dev Cell* 3 (2002) 735-744
15. Beyer, E., Willecke, K.: Gap junction genes and their regulation. *Advances in Molecular and Cell Biology*. 30 (2000) 1-30 ISBN: 30-7623-0599-7621
16. Biben, C., Stanley, E., Fabri, L., Kotecha, S., Rhinn, M., Drinkwater, C., Lah, M., Wang, C. C., Nash, A., Hilton, D., Ang, S. L., Mohun, T., Harvey, R. P.: Murine cerberus homologue mCer-1: a candidate anterior patterning molecule. *Dev Biol* 194 (1998) 135-151
17. Bloor, D. J., Wilson, Y., Kibschull, M., Traub, O., Leese, H. J., Winterhager, E., Kimber, S. J.: Expression of connexins in human preimplantation embryos in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 2 (2004) 25
18. Blum, M., Gaunt, S. J., Cho, K. W., Steinbeisser, H., Blumberg, B., Bittner, D., De Robertis, E. M.: Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene *gooseoid*. *Cell* 69 (1992) 1097-1106
19. Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E. M.: Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382 (1996) 595-601
20. Butz, S., Larue, L.: Expression of catenins during mouse embryonic development and in adult tissues. *Cell Adhes Commun* 3 (1995) 337-352
21. Carlsson, P., Waterman, M. L., Jones, K. A.: The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells. *Genes Dev* 7 (1993) 2418-2430
22. Castle, W. E., Sawin, P. B.: Genetic linkage in the rabbit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 27 (1941) 519-523
23. Chapman, S. C., Collignon, J., Schoenwolf, G. C., Lumsden, A.: Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dyn* 220 (2001) 284-289
24. Chapman, S. C., Schubert, F. R., Schoenwolf, G. C., Lumsden, A.: Analysis of spatial and temporal gene expression patterns in blastula and gastrula stage chick embryos. *Dev Biol* 245 (2002) 187-199
25. Chen, C., Ware, S. M., Sato, A., Houston-Hawkins, D. E., Habas, R., Matzuk, M. M., Shen, M. M., Brown, C. W.: The Vg1-related protein *Gdf3* acts in a nodal signaling pathway in the pre-gastrulation mouse embryo. *Development* 133 (2006) 319-329
26. Cho, K. W., Morita, E. A., Wright, C. V., De Robertis, E. M.: Overexpression of a homeodomain protein confers axis-forming activity to uncommitted *Xenopus* embryonic cells. *Cell* 65 (1991) 55-64

27. Christian, J. L., Olson, D. J., Moon, R. T.: Xwnt-8 modifies the character of mesoderm induced by bFGF in isolated *Xenopus* ectoderm. *Embo J* 11 (1992) 33-41
28. Conlon, F. L., Lyons, K. M., Takaesu, N., Barth, K. S., Kispert, A., Herrmann, B., Robertson, E. J.: A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 120 (1994) 1919-1928
29. Cordray, P., Satterwhite, D. J.: TGF-beta induces novel Lef-1 splice variants through a Smad-independent signaling pathway. *Dev Dyn* 232 (2005) 969-978
30. Dahl, E., Winterhager, E., Reuss, B., Traub, O., Butterweck, A., Willecke, K.: Expression of the gap junction proteins connexin31 and connexin43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo, respectively. *J Cell Sci* 109 ( Pt 1) (1996) 191-197
31. Dahl, G., Werner, R., Levine, E., Rabadan-Diehl, C.: Mutational analysis of gap junction formation. *Biophys J* 62 (1992) 172-180; discussion 180-172
32. Davies, T. C., Barr, K. J., Jones, D. H., Zhu, D., Kidder, G. M.: Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. *Dev Genet* 18 (1996) 234-243
33. De Sousa, P. A., Valdimarsson, G., Nicholson, B. J., Kidder, G. M.: Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development* 117 (1993) 1355-1367
34. Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L., Moon, R. T.: Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* 15 (1995) 2625-2634
35. Elfång, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R. A., Hulser, D. F., Willecke, K.: Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129 (1995) 805-817
36. Fischer, A., Viebahn, C., Blum, M.: FGF8 acts as a right determinant during establishment of the left-right axis in the rabbit. *Curr Biol* 12 (2002) 1807-1816
37. Fischer, B.: Embryonalentwicklung in vivo und in vitro: Charakterisierung entwicklungspezif. Strukturen u. Lebensäußerungen von Präimplantationsembryonen in vitro und in vivo. *Enke-Copythek, Stuttgart* (1988) ISBN 3-432-97741-97747
38. Foley, A. C., Skromne, I., Stern, C. D.: Reconciling different models of forebrain induction and patterning: a dual role for the hypoblast. *Development* 127 (2000) 3839-3854
39. Galceran, J., Farinas, I., Depew, M. J., Clevers, H., Grosschedl, R.: Wnt3a<sup>-/-</sup>-like phenotype and limb deficiency in Lef1<sup>(-/-)</sup>Tcf1<sup>(-/-)</sup> mice. *Genes Dev* 13 (1999) 709-717
40. Galceran, J., Hsu, S. C., Grosschedl, R.: Rescue of a Wnt mutation by an activated form of LEF-1: regulation of maintenance but not initiation of Brachyury expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 8668-8673
41. Gardner, R. L., Rossant, J.: Investigation of the fate of 4.5 day post-coitum mouse inner cell mass by blastocyst injection. *J. Embryol. Exp. Morph.* 52 (1979) 141-152
42. Gavin, B. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P.: Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development. *Genes Dev* 4 (1990) 2319-2332
43. Georgiades, P., Rossant, J.: Ets2 is necessary in trophoblast for normal embryonic anteroposterior axis development. *Development* 133 (2006) 1059-1068
44. Giese, K., Grosschedl, R.: LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites. *Embo J* 12 (1993) 4667-4676
45. Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C., Niehrs, C.: Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391 (1998) 357-362
46. Gräper, L.: Die Primitiventwicklung des Hühnchens nach stereokinematographischen Untersuchungen, kontrolliert durch vitale Farbmarkierungen und verglichen mit der Entwicklung anderer Wirbeltiere. *Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungsmech. Org.* 116 (1929) 382-429
47. Graur, D., Duret, L., Gouy, M.: Phylogenetic position of the order lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature* 379 (1996) 333-335
48. Haeckel, E.: Die Kalkschwämme. Eine Monographie. Bd.1. Biologie der Kalkschwämme (Calcispongae oder Grantien). *Georg Reimer, Berlin.* (1872)
49. Haeckel, E.: Die Gastreae-Theorie: Die phylogenetische Classification des Thierreichs und die Homologie der Keimblätter. *Jenaische Z. Naturwiss.* 8 (1874) 1-55
50. Hardy, K., Warner, A., Winston, R. M., Becker, D. L.: Expression of intercellular junctions during preimplantation development of the human embryo. *Mol Hum Reprod* 2 (1996) 621-632
51. Hensen, V.: Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kaninchens und des Meerschweinchens *Z. Anat. Entwickl. Gesch.* 1 (1876) 213-273; 353-432
52. Hoppler, S., Brown, J. D., Moon, R. T.: Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in *Xenopus* embryos. *Genes Dev* 10 (1996) 2805-2817



53. Hovanes, K., Li, T. W., Waterman, M. L.: The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 1994-2003
54. Huber, A. H., Nelson, W. J., Weis, W. I.: Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90 (1997) 871-882
55. Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C., Birchmeier, W.: Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* 148 (2000) 567-578
56. Hulsken, J., Birchmeier, W., Behrens, J.: E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 127 (1994) 2061-2069
57. Hume, C. R., Dodd, J.: Cwnt-8C: a novel Wnt gene with a potential role in primitive streak formation and hindbrain organization. *Development* 119 (1993) 1147-1160
58. Hyde, C. E., Old, R. W.: Regulation of the early expression of the Xenopus nodal-related 1 gene, Xnr1. *Development* 127 (2000) 1221-1229
59. Jung, T., Fischer, B., Beier, H. M.: Quantitative aspects of protein synthesis in non-cultured and cultured rabbit blastocysts. *Hum Reprod* 2 (1987) 23-27
60. Kane, M. T.: Proceedings: Influence of the mucin coat on rabbit blastocysts in culture. *J Physiol* 236 (1974) 30P-31P
61. Kaufmann, M. H.: The atlas of mouse development. *Acad Press, London* (1992) ISBN: 0124020356
62. Kemp, C., Willems, E., Abdo, S., Lambiv, L., Leyns, L.: Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Dev Dyn* 233 (2005) 1064-1075
63. Kimura, C., Yoshinaga, K., Tian, E., Suzuki, M., Aizawa, S., Matsuo, I.: Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. *Dev Biol* 225 (2000) 304-321
64. Kimura-Yoshida, C., Nakano, H., Okamura, D., Nakao, K., Yonemura, S., Belo, J. A., Aizawa, S., Matsui, Y., Matsuo, I.: Canonical Wnt signaling and its antagonist regulate anterior-posterior axis polarization by guiding cell migration in mouse visceral endoderm. *Dev Cell* 9 (2005) 639-650
65. Knoetgen, H., Viebahn, C., Kessel, M.: Head induction in the chick by primitive endoderm of mammalian, but not avian origin. *Development* 126 (1999) 815-825
66. Knoetgen, H., Teichmann, U., Wittler, L., Viebahn, C., Kessel, M.: Anterior neural induction by nodes from rabbits and mice. *Dev Biol* 225 (2000) 370-380
67. Kölliker, A.: Die Entwicklung der Keimblätter des Kaninchens. In: "Festschrift zur dritten Säcularfeier der Alma Mater Julia Maximiliana (Würzburg)" (1882) S. 1-51. Wilhelm Vogel, Leipzig.
68. Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J., Clevers, H.: Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19 (1998) 379-383
69. Kurth, T.: A cell cycle arrest is necessary for bottle cell formation in the early Xenopus gastrula: integrating cell shape change, local mitotic control and mesodermal patterning. *Mech Dev* 122 (2005) 1251-1265
70. Lawson, A., Colas, J. F., Schoenwolf, G. C.: Classification scheme for genes expressed during formation and progression of the avian primitive streak. *Anat Rec* 262 (2001) 221-226
71. Lawson, K. A., Meneses, J. J., Pedersen, R. A.: Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113 (1991) 891-911
72. Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P., Hogan, B. L.: Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13 (1999) 424-436
73. Liebke, M.: Histologische Untersuchungen zur Bildung des vorderen Randbogens im Embryo des Kaninchens. *Med. Dissertation Univ. Bonn* (1996)
74. Liptau, H., Viebahn, C.: Expression patterns of gap junctional proteins connexin 32 and 43 suggest new communication compartments in the gastrulating rabbit embryo. *Differentiation* 65 (1999) 209-219
75. Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M. J., Albrecht, U., Behringer, R. R., Bradley, A.: Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* 22 (1999) 361-365
76. Lowe, L. A., Kuehn, M. R.: Whole mount in situ hybridization to study gene expression during mouse development. *Meth Mol Biol* 137 (2000) 125-137
77. Lu, C. C., Brennan, J., Robertson, E. J.: From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 11 (2001) 384-392
78. Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stanek, P., Glinka, A., Niehrs, C.: LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411 (2001) 321-325
79. Maroto, M., Dale, J. K., Dequeant, M. L., Petit, A. C., Pourquie, O.: Synchronised cycling gene oscillations in presomitic mesoderm cells require cell-cell contact. *Int J Dev Biol* 49 (2005) 309-315
80. Marvin, M. J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S. M., Lassar, A. B.: Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* 15 (2001) 316-327

81. Merrill, B. J., Pasolli, H. A., Polak, L., Rendl, M., Garcia-Garcia, M. J., Anderson, K. V., Fuchs, E.: Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development* 131 (2004) 263-274
82. Mitrani, E., Ziv, T., Thomsen, G., Shimoni, Y., Melton, D. A., Bril, A.: Activin can induce the formation of axial structures and is expressed in the hypoblast of the chick. *Cell* 63 (1990) 495-501
83. Mohamed, O. A., Clarke, H. J., Dufort, D.: Beta-catenin signaling marks the prospective site of primitive streak formation in the mouse embryo. *Dev Dyn* 231 (2004) 416-424
84. Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V., Kaykas, A.: WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5 (2004) 691-701
85. Moorby, C., Patel, M.: Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res* 271 (2001) 238-248
86. Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D. W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S. P., Niehrs, C., Belmonte, J. C., Westphal, H.: Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* 1 (2001) 423-434
87. New, D. A. T.: A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *J Embryol Exp Morphol* 3 (1955) 320-331
88. Niehrs, C.: Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet* 15 (1999) 314-319
89. Northrop, J. L., Kimelman, D.: Dorsal-ventral differences in Xcad-3 expression in response to FGF-mediated induction in Xenopus. *Dev Biol* 161 (1994) 490-503
90. Oosterwegel, M., van de Wetering, M., Timmerman, J., Kruisbeek, A., Destree, O., Meijlink, F., Clevers, H.: Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development* 118 (1993) 439-448
91. Papaioannou, V. E., Silver, L. M.: The T-box gene family. *Bioessays* 20 (1998) 9-19
92. Pasteels, J.: Prolifération et croissance dans la gastrulation et la formation de la queue des vertébrés. *Arch Biol* 54 (1943) 1-51
93. Pearce, J. J., Penny, G., Rossant, J.: A mouse cerberus/Dan-related gene family. *Dev Biol* 209 (1999) 98-110
94. Pera, E. M., De Robertis, E. M.: A direct screen for secreted proteins in Xenopus embryos identifies distinct activities for the Wnt antagonists Crescent and Frzb-1. *Mech Dev* 96 (2000) 183-195
95. Perea-Gomez, A., Lawson, K. A., Rhinn, M., Zakin, L., Brulet, P., Mazan, S., Ang, S. L.: Otx2 is required for visceral endoderm movement and for the restriction of posterior signals in the epiblast of the mouse embryo. *Development* 128 (2001a) 753-765
96. Perea-Gomez, A., Rhinn, M., Ang, S. L.: Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. *Int J Dev Biol* 45 (2001b) 311-320
97. Perea-Gomez, A., Vella, F. D., Shawlot, W., Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Meno, C., Pfister, V., Chen, L., Robertson, E., Hamada, H., Behringer, R. R., Ang, S. L.: Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Dev Cell* 3 (2002) 745-756
98. Perea-Gomez, A., Camus, A., Moreau, A., Grieve, K., Moneron, G., Dubois, A., Cibert, C., Collignon, J.: Initiation of gastrulation in the mouse embryo is preceded by an apparent shift in the orientation of the anterior-posterior axis. *Curr Biol* 14 (2004) 197-207
99. Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E. M.: Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86 (1996) 589-598
100. Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., De Robertis, E. M.: The head inducer cerberus is a multifunctional antagonist of nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397 (1999) 707-710
101. Plickert, G., Gajewski, M., Gehrke, G., Gausepohl, H., Schlossherr, J., Ibrahim, H.: Automated in situ detection (AISD) of biomolecules. *Dev Genes Evol* 207 (1997) 362-367
102. Popperl, H., Schmidt, C., Wilson, V., Hume, C. R., Dodd, J., Krumlauf, R., Beddington, R. S.: Misexpression of Cwnt8C in the mouse induces an ectopic embryonic axis and causes a truncation of the anterior neuroectoderm. *Development* 124 (1997) 2997-3005
103. Pourquie, O.: The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. *Science* 301 (2003) 328-330
104. Rabl, C.: Edouard van Beneden und der gegenwärtige Stand der wichtigsten von ihm behandelten Probleme. *Arch. Mikrosk. Anat.* 88 (1915) 3-470
105. Rauber, A.: Primitivrinne und Urmund. Beitrag zur Entwicklungsgeschichte des Hühnchens. *Gegenbaurs Jb.* 2 (1876) 550-576
106. Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Le Meur, M., Ang, S. L.: Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* 125 (1998) 845-856
107. Richardson, L., Torres-Padilla, M. E., Zernicka-Goetz, M.: Regionalised signalling within the extraembryonic ectoderm regulates anterior visceral endoderm positioning in the mouse embryo. *Mech Dev* (2006)

108. Risley, M. S., Tan, I. P., Roy, C., Saez, J. C.: Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci* 103 ( Pt 1) (1992) 81-96
109. Rivera-Perez, J. A., Mager, J., Magnuson, T.: Dynamic morphogenetic events characterize the mouse visceral endoderm. *Dev Biol* 261 (2003) 470-487
110. Rodriguez, T. A., Srinivas, S., Clements, M. P., Smith, J. C., Beddington, R. S.: Induction and migration of the anterior visceral endoderm is regulated by the extra-embryonic ectoderm. *Development* 132 (2005) 2513-2520
111. Rosa, F., Roberts, A. B., Danielpour, D., Dart, L. L., Sporn, M. B., Dawid, I. B.: Mesoderm induction in amphibians: the role of TGF-beta 2-like factors. *Science* 239 (1988) 783-785
112. Rosenquist, T. A., Martin, G. R.: Visceral endoderm-1 (VE-1): an antigen marker that distinguishes anterior from posterior embryonic visceral endoderm in the early post-implantation mouse embryo. *Mech Dev* 49 (1995) 117-121
113. Ruangvoravat, C. P., Lo, C. W.: Connexin 43 expression in the mouse embryo: localization of transcripts within developmentally significant domains. *Dev Dyn* 194 (1992) 261-281
114. Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Munemitsu, S., Polakis, P.: The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem* 270 (1995) 5549-5555
115. Saez, J. C., Martinez, A. D., Branes, M. C., Gonzalez, H. E.: Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz J Med Biol Res* 31 (1998) 593-600
116. Seher, T. C., Leptin, M.: Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol* 10 (2000) 623-629
117. Seleiro, E. A., Connolly, D. J., Cooke, J.: Early developmental expression and experimental axis determination by the chicken Vg1 gene. *Curr Biol* 6 (1996) 1476-1486
118. Shawlot, W., Deng, J. M., Behringer, R. R.: Expression of the mouse cerberus-related gene, Cerr1, suggests a role in anterior neural induction and somitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 6198-6203
119. Shawlot, W., Min Deng, J., Wakamiya, M., Behringer, R. R.: The cerberus-related gene, Cerr1, is not essential for mouse head formation. *Genesis* 26 (2000) 253-258
120. Simpson, E. H., Johnson, D. K., Hunsicker, P., Suffolk, R., Jordan, S. A., Jackson, I. J.: The mouse Cer1 (Cerberus related or homologue) gene is not required for anterior pattern formation. *Dev Biol* 213 (1999) 202-206
121. Skromne, I., Stern, C. D.: Interactions between Wnt and Vg1 signalling pathways initiate primitive streak formation in the chick embryo. *Development* 128 (2001) 2915-2927
122. Slack, J. M., Darlington, B. G., Heath, J. K., Godsave, S. F.: Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* 326 (1987) 197-200
123. Sohl, G., Willecke, K.: An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 10 (2003) 173-180
124. Spemann, H., Mangold, H.: Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 100 (1924) 599-638
125. Standley, H. J., Zorn, A. M., Gurdon, J. B.: eFGF and its mode of action in the community effect during *Xenopus* myogenesis. *Development* 128 (2001) 1347-1357
126. Stanley, E. G., Biben, C., Allison, J., Hartley, L., Wicks, I. P., Campbell, I. K., McKinley, M., Barnett, L., Koentgen, F., Robb, L., Harvey, R. P.: Targeted insertion of a lacZ reporter gene into the mouse Cer1 locus reveals complex and dynamic expression during embryogenesis. *Genesis* 26 (2000) 259-264
127. Stern, C. D.: Conrad H. Waddington's contributions to avian and mammalian development, 1930-1940. *Int J Dev Biol* 44 (2000) 15-22
128. Tam, P., Gad, J. M.: Gastrulation in the mouse embryo. In: Stern C.D.S. (Ed.): *Gastrulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA pp. 233-262 (2004)
129. Tautz, D., Pfeifle, C.: A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98 (1989) 81-85
130. Thomas, P., Beddington, R.: Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr Biol* 6 (1996) 1487-1496
131. Thomas, P., Brown, A., Beddington, R. S.: Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* 125 (1998) 85-94
132. van Beneden, E.: Recherches sur l'embryologie des mammifères. La formation des feuilletts chez le lapin. *Arch. Biol.* 1 (1880) 137-224
133. van Genderen, C., Okamura, R. M., Farinas, I., Quo, R. G., Parslow, T. G., Bruhn, L., Grosschedl, R.: Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev* 8 (1994) 2691-2703

134. van Noort, M., Meeldijk, J., van der Zee, R., Destree, O., Clevers, H.: Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J Biol Chem* 277 (2002) 17901-17905
135. Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A., MacDonald, H. R., Clevers, H.: An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* 374 (1995) 70-74
136. Viebahn, C.: Epithelio-mesenchymal transformation during formation of the mesoderm in the mammalian embryo. *Acta Anat (Basel)* 154 (1995) 79-97
137. Viebahn, C., Mayer, B., Hrabe de Angelis, M.: Signs of the principle body axes prior to primitive streak formation in the rabbit embryo. *Anat Embryol (Berl)* 192 (1995a) 159-169
138. Viebahn, C., Mayer, B., Miething, A.: Morphology of incipient mesoderm formation in the rabbit embryo: a light- and retrospective electron-microscopic study. *Acta Anat (Basel)* 154 (1995b) 99-110
139. Viebahn, C.: The anterior margin of the mammalian gastrula: comparative and phylogenetic aspects of its role in axis formation and head induction. *Curr Top Dev Biol* 46 (1999) 63-103
140. Viebahn, C.: Hensen's node. *Genesis* 29 (2001) 96-103
141. Viebahn, C., Stortz, C., Mitchell, S. A., Blum, M.: Low proliferative and high migratory activity in the area of Brachyury expressing mesoderm progenitor cells in the gastrulating rabbit embryo. *Development* 129 (2002) 2355-2365
142. Viebahn, C.: Gastrulation in the rabbit. In: Stern C.D.S. (Ed.): *Gastrulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA* (2004) pp. 263-274
143. Waddington, C. H.: Induction by the endoderm in birds. *Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungsmech. Org.* 128 (1933) 502-521
144. Waddington, C. H.: Experiments on embryonic induction. Part III. A note on inductions by chick primitive streak transplanted to the rabbit embryo. *J. Exp. Biol.* 11 (1934) 224-229
145. Waterman, A. J.: Studies of normal development of the New Zealand white strain of rabbit. *Am. J. Anat.* 72 (1943) 473-515
146. Weisheit, G.: Molekulare Differenzierung und Musterbildung im Hypoblasten während der embryonalen Frühentwicklung des Kaninchens. *Math.-naturwiss. Dissertation Univ. Bonn* (2002)
147. Weisheit, G., Mertz, D., Schilling, K., Viebahn, C.: An efficient in situ hybridization protocol for multiple tissue sections and probes on miniaturized slides. *Dev Genes Evol* 212 (2002) 403-406
148. Wilkinson, D. G., Bhatt, S., Herrmann, B. G.: Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343 (1990) 657-659
149. Willert, K., Nusse, R.: Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8 (1998) 95-102
150. Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A., Hogan, B. L.: Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9 (1995) 2105-2116
151. Wodarz, A., Nusse, R.: Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14 (1998) 59-88
152. Yamaguchi, T. P.: Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol* 11 (2001) R713-724
153. Yamamoto, M., Saijoh, Y., Perea-Gomez, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Ang, S. L., Hamada, H., Meno, C.: Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo. *Nature* 428 (2004) 387-392
154. Zernicka-Goetz, M.: Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. *Development* 129 (2002) 815-829
155. Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B. L., Kuehn, M. R.: Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361 (1993) 543-547
156. Zhu, L., Marvin, M. J., Gardiner, A., Lassar, A. B., Mercola, M., Stern, C. D., Levin, M.: Cerberus regulates left-right asymmetry of the embryonic head and heart. *Curr Biol* 9 (1999) 931-938
157. Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., Harland, R. M.: The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86 (1996) 599-606

## 6 THESEN

1. Durch die flache Morphologie der Kaninchenkeimscheibe in frühen Entwicklungsstadien lassen sich Genexpressionen topographisch gut beurteilen und funktionelle Untersuchungen durch Manipulationen unter gut kontrollierbaren Bedingungen durchführen.
2. Die Möglichkeit, mehrere morphologisch begründete Entwicklungsstadien vor der Gastrulation im Kaninchen zu unterscheiden, erlaubt eine genaue Reihung sowie stadienspezifische Zuordnung von gastrulationsrelevanten Expressionsmustern und funktionellen Eigenschaften verschiedener Abschnitte des Keimes.
3. In einem an die Anforderungen des Kaninchenembryos angepassten Kulturmodell kann die normale Entwicklung am Anfang der Gastrulation über mehrere Stunden erfolgreich *in vitro* verfolgt werden.
4. Gastrulationsnahe Entwicklungsstadien entwickeln sich *in vitro* besser als jüngere Stadien; jedoch erlaubt das Kulturmodell, den Einfluss von Manipulationen auf Genexpressionen am Beginn der Gastrulation auch in den frühen Stadien zu bestimmen.
5. Die Ablation des Hypoblasten induziert im Epiblasten die Expression des Mesodermmarkers *Brachyury* in einem zeitabhängigen und topographisch definiertem Muster.
6. 24 Stunden vor der Primitivstreifenentwicklung sind alle Epiblastzellen in der Lage, *Brachyury* zu exprimieren, wenn zuvor der Hypoblast reseziert wurde.
7. In älteren Stadien exprimieren anterior gelegene Epiblastzellen nach Hypoblastresektion kein *Brachyury*, allerdings ist die posteriore, orthotope Expressionsdomäne vergrößert.
8. Vom Hypoblasten sezernierte Signale unterdrücken im anterioren Bereich der Keimscheibe die Mesoderminduktion.
9. Nach einer Phase, in welcher das Entwicklungsschicksal der Epiblastzellen hinsichtlich der Mesodermdifferentierung unter dem Einfluss des Hypoblasten festgelegt worden ist, modulieren Signale des Hypoblasten die Mesodermbildung im Primitivstreifen.
10. Die mRNA-Expressionsmuster unterschiedlicher Entwicklungsgene zeigen verschiedene topographisch definierte Signalzentren im Kaninchenembryo auf.
11. Die mRNA der Gap junction-Proteine *Connexin 32* und *Connexin 43* werden spezifisch in der ventralen oder der dorsalen Gewebsschicht exprimiert und spiegeln damit konstitutive Eigenschaften der Keimscheibe für die horizontale Signalausbreitung wider.
12. *Connexin 32*-mRNA wird in frühen Stadien polarisiert im Hypoblasten exprimiert; eine molekulare Unterteilung von morphologisch undifferenzierten Stadien ist dadurch möglich.
13. mRNA von *Wnt3* und *Lef1*, Faktoren des Wnt-Signalweges, werden sechs Stunden vor Beginn der Primitivstreifenbildung im posterioren Epiblasten exprimiert und leiten damit die Mesodermentwicklung ein.

14. mRNA für *β-Catenin*, das Wnt-Signale in den Zellkern weiterleitet, spiegelt zunächst die konstitutiven Zelleigenschaften in der Keimscheibe wider; erst in Mesodermzellen findet sich eine vermehrte Expression.
15. Der multivalente Antagonist Cerberus-related 1 ist ein direkter Kandidat für die Supprimierung mesoderminduzierender Signale im Epiblasten, da seine mRNA etwa 12 Stunden vor der Primitivstreifenbildung im anterioren Hypoblasten exprimiert wird.
16. Die Genexpressionsmuster im Hypoblasten markieren ein Areal, das im Hinblick auf Musterungsprozesse, die im Hypoblasten ihren Ursprung nehmen, als anteriores extraembryonales Signalzentrum (AXS) bezeichnet werden kann.
17. Im posterioren Teil der Keimscheibe exprimierte Entwicklungsgene bilden im Hinblick auf ihre mesoderminduzierende Funktion das posteriore embryonale Signalzentrum (PES), das sich wenige Stunden vor der Primitivstreifenbildung etabliert und im weiteren Verlauf die Bildung und Musterung des Primitivstreifens steuert.
18. Die Bildung des PES steht unter dem Einfluss des AXS.
19. Unter der Annahme, dass zirkuläre Zellbewegungen im Hypoblasten auftreten und extraembryonale Signale auf die Keimscheibe Einfluss nehmen, könnte die Punktsymmetrie der Keimscheibe durch minimale, zufällige exzentrische Bewegungen gebrochen werden und sich daraufhin das AXS ausbilden.
20. Das AXS und das PES vermitteln die Etablierung der Körperachsen im Embryo im Sinne der Achsendeterminierung und einer nachfolgenden axialen Musterung.
21. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeiten zwischen Keimscheiben des Kaninchens und des Menschen, könnten die hier beschriebenen Verhältnisse auch auf den Menschen übertragen werden.

## Tabellarischer Lebenslauf

1977	geboren am 8. Juli in Wolfenbüttel als Sohn der Eheleute Astrid Idkowiak, geb. Paul und Günther Idkowiak
1983-1987	Grundschule in Cramme
1987-1989	Orientierungsstufe Ravensbergerstraße in Wolfenbüttel
1989-1996	Gymnasium im Schloß in Wolfenbüttel mit Abschluss allgemeine Hochschulreife
1996-1997	Zivildienst in der Krankenpflege auf einer internistischen Station im Städtischen Krankenhaus Wolfenbüttel
1997-2005	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1999	Ärztliche Vorprüfung
2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002	Beginn der Ausarbeitung der Promotionsarbeit bei Prof. Dr. Christoph Viebahn
2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004/05	Praktisches Jahr in Halle, Lutherstadt Wittenberg und Dresden
2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt
seit 2005	Assistenzarzt an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum „Carl-Gustav-Carus“ der Technischen Universität Dresden

## **Selbständigkeitserklärung**

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erkläre ich hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

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

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

Dresden, den 10. September 2006

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erkläre ich hiermit, dass ich außer der vorliegenden Arbeit keine weiteren Promotionsversuche durchgeführt habe.

Dresden, den 10. September 2006



## Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

Idkowiak, J., Weisheit, G., Plitzner, J., und Viebahn, C. (2004) Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo. *Development, Genes and Evolution*. **214**: 591-605

Idkowiak, J., Weisheit, G., Viebahn, C. (2004) Polarity in the rabbit embryo. (Review) *Seminars in Cell and Developmental Biology* **15**: 607-617

### Buchbeitrag

Idkowiak, J. „Naturwissenschaftliches Glossar“ in Damschen, G., Schönecker, D. (Hrsg.) (2002) Der moralische Status menschlicher Embryonen. *de Gruyter Studienbuch ISBN 3-11-017365-4*

### Vorträge mit publiziertem Abstract

Idkowiak, J., Weisheit, G., Plitzner, J., und Viebahn, C. (2005) Gap junctional communication, Wnt signalling and mesoderm generation in the gastrulating rabbit embryo. *Annals of Anatomy Suppl.* **187**: 44  
(100. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft in Leipzig)

Idkowiak, J., Weisheit, G., Viebahn, C. (2003) The hypoblast inhibits mesoderm formation in the anterior part of the embryonic disc in the gastrulating rabbit embryo. *Annals of Anatomy Suppl.* **185**: 163-164  
(98. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft in Dresden)

### Posterbeiträge mit publiziertem Abstract

Idkowiak, J., Weisheit, G., Viebahn, C. (2003) The hypoblast inhibits mesoderm formation in the anterior part of the embryonic disc in the gastrulating rabbit embryo. *European Journal of Cell Biology Suppl.* **53** (Vol.82): 125

Plitzner, J., Idkowiak, J., Weisheit, G., Blum, M., Viebahn, C. (2005) Functional analysis of individual genes expressed in the hypoblast during mesoderm formation in the rabbit embryo. *Annals of Anatomy Suppl.* **187**: 157

Weisheit, G., Idkowiak, J., Mitchell, S., Blum, M., Viebahn, C. (2005) Differential gene expression in the hypoblast precedes morphologically distinguishable polarity in the gastrulating rabbit embryo. *Annals of Anatomy Suppl.* **187**: 190-191

Weisheit, G., Idkowiak, J., Viebahn, C. (2003) The hypoblast of the rabbit embryo – an inductive tissue patterning the mammalian embryo at the onset of gastrulation. *European Journal of Cell Biology Suppl.* **53** (Vol.82): 132

### Posterbeiträge auf internationalen wissenschaftlichen Tagungen

Idkowiak, J., Weisheit, G., Fischer, A., Blum, M., Viebahn, C. (2002) Gap junctions and molecular left/right differentiation in the gastrulating rabbit embryo. CSHL Spring Meeting: Evolution of Developmental Diversity, Cold Spring Harbour, New York, USA

## Danksagung

Diese Arbeit ist über einem langem Zeitraum entstanden, und die Experimente wurden neben dem „Stützpunkt“ der Anatomie in Halle in den Anatomischen Instituten in Bonn und Göttingen durchgeführt. Somit bin ich mit vielen Menschen in Kontakt gekommen, die zu erwähnen den Rahmen sprengen würde, denen ich aber allen meinen tiefsten Dank schulde; sei es durch gute Ratschläge, ermutigende Worte oder kritische Kommentare.

Herrn Prof. Dr. Christoph Viebahn danke ich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung. Er ist für mich ein Vorbild an Freundlichkeit, Gründlichkeit und Beharrlichkeit; neben den tiefen Einblicken in die Entwicklungsbiologie, die ich durch ihn erlangen konnte, hat er in mir die Neugier an der Wissenschaft geweckt und mich sehr ermutigt, auch weiterhin wissenschaftlich zu arbeiten. Insbesondere für seine immerwährende Bereitschaft, sich jederzeit für Fragen, Probleme und Diskussionen Zeit zu nehmen, bin ich besonders dankbar.

Die freundliche, familiäre Atmosphäre der Hallenser Anatomie war ein wunderbares Arbeitsumfeld. Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer danke ich sehr für die großzügige Bereitstellung der Räumlichkeiten und der Ressourcen in seinem Institut. Der hervorragenden technischen Unterstützung von Elke Bernhardt und Rosemarie Rappold sei herzlich gedankt. Ebenso Frau Elisabeth George, Frau Evelyn Axmann und Frau Marlis Böttcher für die perfekte administrative Hilfe. Für die vielen kollegialen Ratschläge von Dr. Rudi Blume, Dr. Anne Navarette-Santos, Prof. Dr. Thomas Klonisch, PD Dr. Sabine Hombach-Klonisch und Prof. Dr. Rüdiger Schultka bin ich sehr dankbar.

In Bonn gilt mein größter Dank Dr. Gunnar Weisheit, von dem ich den Großteil der molekularbiologischen Methoden erlernt habe und der mir stets mit großem Eifer zu jeder Tages- und Nachtzeit zur Seite stand. Herrn Prof. Dr. Karl Schilling danke ich für die Möglichkeit, mehrere Wochen in seinem Labor zu arbeiten.

Herrn Dr. Bernd Püschel danke ich für die vielen Tipps und Tricks im Labor, die spannenden Diskussionen und nicht zu Letzt dafür, dass ich während diverser Aufenthalte in Göttingen bei ihm wohnen durfte. Den anderen Mitarbeitern der Göttinger Anatomie sei herzlich gedankt, insbesondere Irmgard Weiß, Heike Faust, Kirsten Falk-Stietenroth, Barbara Hallmann für perfekte technische Unterstützung, Heike Altmann, Gabriele Schmidt und Anja Aue für unkomplizierte Hilfe in bürokratischen Dingen und Hans-Georg Sydow für EDV-technische Beratung. Juliane Pnitzner danke ich für die Hilfe bei diversen Experimenten und für die gute Stimmung im Labor, Herrn Dr. Peter Schwarz für interessante Diskussionen und Einblicke in die Elektronenmikroskopie.

Für das Korrekturlesen des Textes möchte ich mich bei Lena Schneider und Anke Ruland herzlich bedanken.

Mein größter Dank gilt der immerwährenden Unterstützung meiner Familie.