

# **Variabilität molekularer axialer Differenzierung am Beginn der Gastrulation beim Kaninchen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Juliane Plitzner  
geboren in Georgsmarienhütte

Göttingen 2008

Anleiter: Prof. Dr. C. Viebahn

Referent: Prof. Dr. E. Wimmer

Koreferent: Prof. Dr. T. Pieler

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Beginn aller Wissenschaften  
ist das Erstaunen,  
dass die Dinge sind wie sie sind.

Aristoteles

**Für meine Liebsten**

# I Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Entwicklung des Körperbauplans.....	1
1.2	Gastrulation und Bildung des Körperbauplans .....	2
1.3	Entwicklung der Körperachsen .....	3
1.3.1	Modellorganismen der Achsenentwicklung.....	3
1.3.1.1	Der Krallenfrosch ( <i>Xenopus laevis</i> ) .....	3
1.3.1.2	Das Huhn ( <i>Gallus gallus</i> ).....	4
1.3.1.3	Die Maus ( <i>Mus musculus</i> ).....	4
1.3.1.4	Kaninchen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ).....	5
1.3.2	Anterior-posteriore Achse .....	5
1.3.3	Die transversale Achse .....	6
<b>1.4</b>	<b>Markergene der frühen Achsenentwicklung .....</b>	<b>7</b>
1.4.1	Dickkopf 1 .....	7
1.4.2	Cerberus1 (Cer1) .....	7
1.4.3	Lefty 1 .....	8
1.4.4	Hex .....	8
1.4.5	Die Rolle von Sauerstoff während der frühen Embryonalentwicklung .....	9
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>13</b>
2.1.1	Geräte .....	13
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	14
2.1.3	Allgemeine Laborchemikalien .....	14
2.1.4	Nährmedien .....	15
2.1.4.1	Für Bakterien.....	15
2.1.4.2	Für Zellkultur mit CHO Zellen .....	16
2.1.4.3	Für die Embryonenkultur .....	16
2.1.5	Molekularbiologische Kits .....	16
2.1.6	Betäubungsmittel.....	16
2.1.7	Mittel zur Steigerung der Ovulation.....	16
2.1.8	Puffer für die in situ-Hybridisierung.....	17
2.1.9	Verwendeter Vektor .....	17
2.1.10	Verwendete Primer .....	18
2.1.11	Enzyme.....	18
2.1.12	Primer für die Klonierung .....	18
2.1.13	Restriktionsenzyme .....	19
2.1.14	Verwendete Tierstämme .....	19
2.1.14.1	Kaninchen .....	19
2.1.15	Verwendeter Bakterienstamm .....	19
2.1.16	Verwendete Zelllinie .....	20
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.2.1	Sicherheitsbestimmungen.....	20
2.2.2	Gewebepreparation.....	20
2.2.2.1	Superovulation .....	20
2.2.3	Gewinnung von Kaninchenembryonen.....	20
2.2.4	Entwicklungsstadien des Kaninchenembryos .....	21

2.2.5	Fixierung .....	22
2.2.6	Embryonenkultur.....	22
2.2.6.1	Flachkultur .....	22
2.2.6.1.1	Manipulationen an der Flachkultur .....	23
2.2.6.2	Flachkultur mit halbierte Keimscheibe.....	23
2.2.6.3	Suspensionskultur .....	24
2.2.6.4	Suspensionskultur unter strikt hypoxischen Bedingung ("absolute Hypoxie") .....	24
2.2.6.5	Suspensionskultur unter hypoxischen Bedingung .....	25
2.2.7	Kompetente Zellen zur Vermehrung von Plasmiden .....	25
2.2.8	Isolierung von gesamt RNA aus tierischem Gewebe.....	26
2.2.9	Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA .....	26
2.2.10	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction PCR).....	27
2.2.10.1	Konstruktion der Primer.....	27
2.2.10.2	Standard PCR Ansatz.....	28
2.2.10.3	Standard PCR Bedingungen:.....	28
2.2.10.4	Gel Extraktion .....	29
2.2.10.5	Phenol-Isoamylalkohol-Chloroform (PIC)-Extraktion .....	29
2.2.10.6	Ethanol-fällung.....	29
2.2.10.7	Ligation .....	30
2.2.10.8	Transformation.....	30
2.2.11	Isolierung von Plasmid DNA aus Bakteriensuspension.....	30
2.2.11.1	Mini-Präparation .....	31
2.2.11.2	Midi-Präparation .....	31
2.2.12	Sequenzierung .....	32
2.2.13	Restriktionsverdau.....	32
2.2.14	Gelelektrophorese.....	33
2.2.15	Whole mount <i>In Situ</i> -Hybridisierung (WISH) .....	34
2.2.16	<i>In situ</i> -Hybridisierung (ISH) mit Digoxigenin (DIG) –Sonden .....	34
2.2.16.1	Sondenherstellung: In vitro Transkription .....	34
2.2.16.2	Ablauf der ISH .....	35
2.2.16.3	Eindecken.....	37
2.2.16.4	Technovit-Einbettung von jungen Keimscheiben (KS) nach WISH .....	37
2.2.17	Zellkultur .....	38
2.2.17.1	Transfektion von Säugerzellen.....	38
2.2.17.2	Kultur von Hypoblastzellen .....	39
2.2.18	Western-blotting.....	39
2.2.19	SDS PAGE (Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese) .....	39
2.2.19.1	1.2.4 Blotting.....	40
2.2.19.1.1	Blotaufbau .....	40
2.2.19.1.2	Lumi Light <sup>plus</sup> Western Blotting (Kit für Mouse/Rabbit von Roche) ..	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Entwicklung und Variabilität von mRNA-Expressionsdomänen am Beginn der Gastrulation .....</b>	<b>43</b>
3.1.1	mRNA-Expression des Signalmolekül-Gens <i>Dkk1</i> .....	43
3.1.1.1	Häufigkeit der asymmetrischen <i>Dkk1</i> -Expression .....	47
3.1.2	mRNA-Expression des Signalmolekül-Gens <i>Cer1</i> .....	48
3.1.3	mRNA-Expression des Signalmolekül-Gens <i>Lefty1</i> .....	51
3.1.4	mRNA-Expression des Homöobox-Gens <i>Hex</i> .....	53
3.1.5	Suspensionskultur.....	56
3.1.5.1	Normoxie ("Konventionelle" Kultur-Bedingungen).....	57

3.1.5.2	Hypoxie .....	57
3.1.5.2.1	Chemisch induzierte zelluläre Hypoxie .....	57
3.1.5.2.2	„Absolute“ Hypoxie (1% Sauerstoff) .....	58
3.1.5.2.3	„Relative“ Hypoxie (4% oder 5% Sauerstoffkonzentration) .....	61
3.1.6	in-vitro-Kultur isolierter Keimscheiben auf Agarose ("Flachkultur ") .....	63
3.1.7	Dkk1-CHO-Zellen .....	66
3.1.8	Kultur von Hypoblastzellen .....	67
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
<b>4.1</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>69</b>
4.1.1	Modellorganismus Kaninchen.....	69
4.1.2	Embryonenkultur.....	70
4.1.2.1	Suspensionskultur .....	70
4.1.2.1.1	Hypoxie .....	71
4.1.2.1.2	Suspensionskultur mit DMOG .....	71
4.1.2.1.3	Suspensionskultur unter strikter Hypoxie (1% Sauerstoffgehalt) .....	72
4.1.2.1.4	Suspensionskultur unter relativer Hypoxie (4-5% Sauerstoffgehalt).....	73
4.1.2.2	Flachkultur .....	73
4.1.3	Zellkultur .....	75
4.1.3.1	CHO Zellen .....	75
4.1.3.2	Hypoblastzellen.....	75
<b>4.2</b>	<b>Variabilität und Stabilität embryonaler Gen-Expressionsmuster.....</b>	<b>76</b>
4.2.1	<i>Dkk1</i> .....	76
4.2.2	<i>Cer1</i> .....	78
4.2.3	<i>Lefty1</i> .....	79
4.2.4	<i>Hex</i> .....	80
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>82</b>

## II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	mRNA	Messenger RNA
Amp	Ampicillin	OD	Optische Dichte
Bidest.	bidestiliert	PBS	Phosphate buffered saline
Bp	Basenpaare	Pen	Penicillin
cDNA	Komplementäre DNA	PFA	Paraformaldehyd
CHO	Chinese hamster ovarian Zellen	PGE	Posteriore Gastrulaextension
DEPC	Diethylpyrocarbonat	RNA	Ribonukleinsäure
DIG	Digoxigenin	RNase	Ribonuklease
DMF	Dimethylformamid	Rpm	Umdrehungen pro Minute
DMOG	Dimethyl	RT	Raumtemperatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Sodiumdodecylsulfat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	Strp	Streptomycin
dpc	dies post conceptionem	U	Weiss Unit
FCS	Fötales Kälberserum	UV	Ultraviolettes Licht
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid	Vgl	Vergleiche
ISH	In-situ-Hybridisierung	VRB	Vorderer Randbogen
MeOH	Methanol		

### Abkürzungen für Nukleotidbasen:

A	Adenosin	C	Cytosin
T	Thymin	G	Guanin

### Abkürzungen für Nukleotidbasenkombinationen:

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



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Entwicklung des Körperbauplans

Der Bauplan des adulten tierischen Organismus orientiert sich grundlegend an drei senkrecht zu einander stehender Körperachsen: An der sagittalen, dorsal-ventralen Achse, an der longitudinalen, anterior-posterioren (oder kranial-kaudalen) Achse und an der transversalen, rechts-links-Achse. Ausgehend von einer bei höheren Wirbeltieren als radialsymmetrisch angesehenen Eizelle werden diese Hauptkörperachsen in mehreren Einzelschritten festgelegt (Hiiragi et al., 2005; Schier et al., 2005). Beim Säuger erstrecken sich die Schritte häufig bis in die späte Präimplantationsphase, wobei zunächst nur die dorsal-ventrale Achse festgelegt wird und dann über einen längeren Entwicklungszeitraum als einzige Körperachse offensichtlich ist. Erst während der sogenannten Gastrulationsphase, deren Hauptaufgabe es ist, das innere Milieu des Embryos in Form der Keimblätter zu etablieren, zeigt der Embryo im Primitivstreifen, dem Ort der Mesodermentwicklung, Lage und Ausrichtung der anterior-posterioren Achse und gleichzeitig zumindest die Lage der transversalen Körperachse an (Tam und Behringer, 1997; Viebahn, 2004). Die Entwicklung der Körperachsen ist damit der entscheidende Schritt in der Ausprägung des späteren Körperbauplans. Der morphologischen Präsenz der Körperachsen gehen notwendigerweise einige Schritte auf molekularer Ebene voraus, wie aus der Aktivität der vielen, in die Achsenentwicklung involvierten Gene abgelesen werden kann (Akam et al., 1995; Ang, et al. 2004). So ist das erste Anzeichen für die Entwicklung der anterior-posterioren Achse die Ausprägung einer molekular definierten anterioren Identität im Embryoblasten (der "Inneren Zellmasse" der Blastozyste) in der späten Präimplantationsphase des Säugers (Beddington und Robertson, 1999) bevor die Achse in einem zweiten Schritt durch Ausbildung des morphologisch sichtbaren "vorderen Randbogens" und danach durch die Mesodermbildung im posterior gelegenen Primitivstreifen, unwiderruflich festgelegt wird (Knoetgen et al., 1999). Während die morphologischen Merkmale dieser Prozesse zum großen Teil gut beschrieben sind, ist die zugrunde liegende Steuerung auf molekularer Ebene, insbesondere das topographische Zusammenspiel von den Genen der beteiligten Signalkaskaden vielfach noch unklar (Stern et al., 2006). Kompliziert wird die Situation besonders dadurch, dass die morphologischen Veränderungen neben der molekularen anterioren Identität bereits durch eine komplexe molekulare „Blaupause“, d.h. durch spezifische topographische Verteilungsmuster einer Vielzahl von Genen im Prinzip vorgezeichnet werden. Als Expressionsort dieser Blaupause konnte beim Säuger die sog. Hypoblastschicht des Embryoblasten identifiziert und ein

steuernder Einfluss dieser Zellschicht experimentell nachgewiesen werden (Perea-Gomez et al., 2002; Idkowiak et al., 2004). Als extraembryonales Gewebe, das selbst nicht in den Körper des Embryos aufgenommen wird, ist der Hypoblast geradezu dafür prädestiniert, die Ausbildung der Achsen und Keimblätter in der embryonalen Anlage, die sich später zum eigentlichen Embryo entwickelt, sozusagen "von außen" zu steuern.. Bevor nun im Folgenden die spezifische Fragestellung der vorliegenden Arbeit als Funktionsanalyse der Hypoblastschicht und des Botenstoffes *Dkk1*, eines besonderen vom Hypoblasten produzierten Signalmoleküls formuliert wird, sollen zunächst einige morphologische, molekulare und metabolische Grundlagen der Gastrulationsphase als der für den Körperbauplan entscheidenden Entwicklungsphase des Säugers erläutert werden.

## 1.2 Gastrulation und Bildung des Körperbauplans

Der Begriff Gastrulation (griech. Gaster = Magen) wurde geprägt von Ernst Haeckel, der bereits Mitte des 19. Jahrhunderts (1874) durch Experimente mit Seeigeln die Bildung einer doppelwandigen Hohlkugel als Beginn der Entstehung des Urdarms (Archenteron) erkannt hatte. Dieses allgemeine Prinzip der Bildung eines „inneren Milieus“ findet sich auch im Laufe der Entwicklung höherer Organismen, wie Wirbeltieren. Während der Gastrulation erfolgt durch zwei zentrale Mechanismen, die Umlagerung kompletter Zellverbände, oder die Bewegung einzelner Zellen die wesentliche Grundorganisation des Embryos:

1. Anhand der Körperachsen wird der zukünftige Körperbauplan sichtbar. Bei Amnioten (Vögel und Säuger) wird eine durch die Zweischichtigkeit des Embryos bereits vorgegebene dorso-ventrale (Rücken-Bauch) Achse spätestens durch die Ausbildung des Primitivstreifens um die anterior-posterioren (Kopf-Schwanz) Achse ergänzt; daraus resultierend wird auch die Rechts-Links-Achse festgelegt (Idkowiak et al., 2004).
2. Die Anordnung der zukünftigen Organanlagen wird durch die Bildung der Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm festgelegt. Hierzu entwickelt sich aus der aus zwei Keimschichten (Hypoblast und Epiblast) bestehenden radiärsymmetrischen Keimscheibe ein dreiblättriger bilateral symmetrischer Embryo: Im Primitivstreifen entwickeln sich aus Progenitorzellen des Epiblasten zunächst die Zellen des Mesoderms und wachsen als mittleres Keimblatt in den Raum zwischen Hypoblast und Epiblast vor (Ben-Haim et al., 2006). Als nächstes entsteht das Endoderm (=Endoderm, inneres Keimblatt), ebenfalls aus Progenitorzellen des Epiblasten und breitet sich durch Verdrängung in der Ebene Hypoblasten aus (Tam et al., 2003; Grapin-Botton und Constam, 2007). Das äußere Keimblatt, das Ektoderm bildet sich aus den verbliebenen Epiblastzellen. Aus den Zellen der Keimblätter

differenzieren sich dann die verschiedenen Organanlagen: Aus dem Mesoderm entstehen Muskulatur und Skelett, das Gefäßsystem, sowie der Urogenitaltrakt. Das Endoderm bildet die innere Oberfläche und Drüsenepithelien von Atem- und Darmtrakt. Aus den Zellen des Ektoderms differenzieren sich die Epidermis und ihre Derivate, das Nervensystem und Sinnesepithelien.

### 1.3 Entwicklung der Körperachsen

#### 1.3.1 Modellorganismen der Achsenentwicklung

Um bedeutende Entwicklungsprinzipien zu erforschen, bedarf es einer Reihe von Modellorganismen, die exemplarisch Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Embryonalentwicklung zeigen. So können alle wichtigen Aspekte der Entwicklung untersucht und allgemeingültige konservierte Abläufe abgeleitet werden. Anhand einiger bedeutender Modellorganismen sollen hier wesentliche Entwicklungsprinzipien während der Gastrulation veranschaulicht werden.

##### 1.3.1.1 Der Krallenfrosch (*Xenopus laevis*)

Die Vertebraten zeigen innerhalb der phylogenetischen Gruppe einige entwicklungsbiologische Gemeinsamkeiten, die am Krallenfrosch bereits gut untersucht sind. Dennoch lassen Unterschiede zu anderen Vertebratenembryo eine einfache Übertragung nicht in allen Bereichen zu: Als archetypisches Modell der Wirbeltierentwicklung ist der Krallenfrosch *Xenopus laevis* ein häufig eingesetzter Referenzorganismus (Wolpert, 1999; Stern, 2004). Zu Beginn der Gastrulation liegt der Froschembryo als Blastula vor. Durch einen dunkel pigmentierten animalen und hellen vegetativen Pol lässt diese Hohlkugel bereits eine Radiär-Symmetrie erkennen. Komplexe morphogenetische Prozesse führen dazu, dass sie sich zu einer dreischichtigen Gastrula mit eindeutiger Körperachsenzuordnung: anterior-posterior und dorsal-ventral entwickelt.

Die Gastrulation beginnt am sogenannten Urmund oder Blastoporus. Diese schlitzförmige Einfaltung bildet sich dorsolateral an der Blastula, zwischen der äquatorialen Zone des zukünftigen Mesoderms (Marginalzone) und dem vegetativem Pol. Die Zellen der Marginalzone stülpen sich um den Urmund herum in das Innere des Embryos und breiten sich im Inneren der Gastrula als blasenförmiger Urdarm(Archenteron) aus. Während sich die lateralen Mesodermanteile weiter Richtung ventral ausbreiten, dehnt sich das Ektoderm über den gesamten Embryo aus (Epibolie). Die Zellen des dorsalen Mesoderms kommen

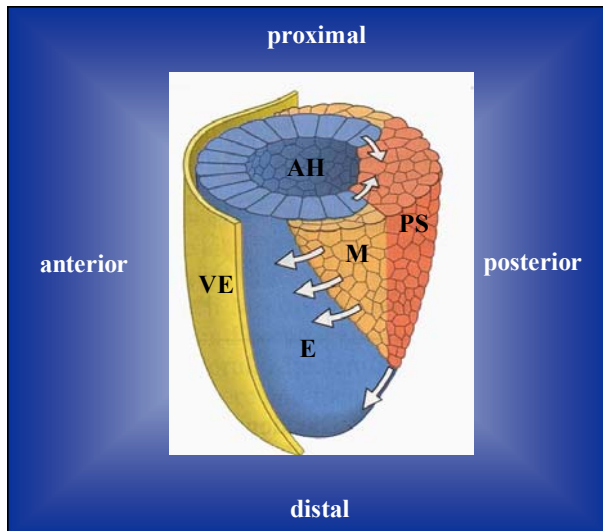
schließlich unter dem dorsalen Ektoderm zu liegen. Die innere Oberfläche des Archenterons ist vollständig mit Endoderm ausgekleidet.

#### 1.3.1.2 Das Huhn (*Gallus gallus*)

Das Huhn stellt ein in vieler Hinsicht günstigen Modellorganismus dar: Als Beispiel für die Entwicklung der Amnioten bietet das Huhn durch die Oviposition (Eiablage) den Vorteil einer leichten Zugänglichkeit zum Embryo. Die auf dem Dotter aufliegende Keimscheibe ermöglicht nicht nur leichte Beobachtung, sondern auch leichte Manipulierungen. Ein weiterer Vorteil ist die Größe der Keimscheibe, die zu Beginn der Gastrulation aus den zwei Schichten Epiblast und Hypoblast besteht. Die Hypoblastschicht wird von Zellen des Epiblasten gebildet, die anterior die Basalmembran überwinden und sich der Hauptmasse des Dotters auflagern (Harrison und Joslyn, 1991). Mit der Bildung des Primitivstreifens beginnt die Gastrulation des Huhns. In dieser stark proliferierenden Region wandern Zellen des Epiblasten aus und lagern sich zwischen Hypoblast und Epiblast an. Innerhalb des Streifens wandern sie nach vorne und bilden den Hensenschen Knoten (Primitivknoten), sowie Mesoderm und Endoderm, während das Ektoderm aus der Oberflächenschicht des Epiblasten hervorgeht. Der Hypoblast wird vom zukünftigen Endoderm verdrängt, das Mesoderm lagert sich zwischen Endoderm und Ektoderm an.

#### 1.3.1.3 Die Maus (*Mus musculus*)

Ein oft verwendetes Modell für die Säugerentwicklung ist die Maus. Gründe hierfür sind sicherlich nicht nur die kurze Zeitspanne des Lebenszyklus und die leichte Haltung und Vermehrung, sondern auch die Möglichkeit die Folgen genetischer Veränderungen direkt an Mausmutanten zu beobachten. Für die Untersuchung der frühen Achsendifferenzierung hingegen stellt der sehr kleine (100 µm), becherförmige Eizylinder der Maus ein eher kompliziertes Modell dar (Tam et al., 2004). Dieser besteht zu Beginn der Gastrulation aus dem primitiven Ektoderm oder Epiblasten, der die proamniotische Höhle einschließt und dem viszeralem Endoderm, das den Epiblasten umhüllt. Der Primitivstreifen bildet sich am zukünftigen posterioren Ende des Embryos und dehnt sich bis zur anterioren Seite des Eizylinders aus. Durch den Primitivstreifen wandernde Zellen bilden zwischen viszeralem Endoderm und Ektoderm eine Mesodermschicht. Das viszerale Endoderm wird schrittweise von Zellen des zukünftigen Ektoderms, die aus dem Epiblasten stammen ersetzt.



**Abb. 1** Eizylinder des Mausembryos zu Beginn der Gastrulation: Der Epiblast (E) umschließt die prämniotische Höhle (AH). Ihn umgibt das viszerale Endoderm (VE). Am posterioren Pol des Embryos entwickelt sich der Primitivstreifen (PS). Mesoderm (M) breitet sich zwischen Epiblast und Hypoblast nach distal und anterior aus. Aus: L. Wolpert, Entwicklungsbiologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 1999

#### 1.3.1.4 Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*)

Das Kaninchen eignet sich als Modellorganismus zur Untersuchung früher Phasen der Embryonalentwicklung besonders gut. Wegen der recht späten Implantation und der Größe der Keimscheibe ist die Gewinnung und Manipulation des Embryos vergleichsweise einfach. Außerdem bietet die dem Menschen ähnliche flache Keimscheibe einen besseren Überblick über die Lageentwicklung der Körperachsen, als es zum Beispiel im Mauszyylinder möglich ist. Sowohl auf morphologischer als auch auf molekularer Ebene sind die ersten Anzeichen für die Achsenentwicklung bereits *in vivo* leicht zu erkennen (Bertocchini et al., 2004).

### 1.3.2 Anterior-posteriore Achse

Ein frühes Element während der Ausbildung der anterior-posterioren Achse in Amnioten ist der Primitivstreifen. Dieser bildet sich ausgehend von einer posterior liegenden Verdickung, longitudinal Richtung Keimscheibenmitte aus: Der vormals aus zwei vorläufigen Keimblättern bestehende Embryo entwickelt in dieser transienten Struktur, durch Auswanderung aus dem Epiblasten zwischen Epiblast und Hypoblast das mittlere der drei definitiven Keimblätter, das Mesoderm. Während im Vogel die Achse bereits früher morphologisch sichtbar ist, galt im Säuger die Bildung des Primitivstreifens lange Zeit als Beginn der morphologisch sichtbaren Achsenentwicklung. Durch die planare Struktur des Kaninchenembryos, vergleichbar mit der des menschlichen Embryos früher Entwicklungsstufen, ist es möglich auch im Säugetierembryo zu einem früheren Zeitpunkt Merkmale einer anterior-posterioren Identität festzulegen: Der vordere Randbogen (VRB; engl. anterior marginal crescent (AMC)) ist eine im Osmium gefärbten Präparat deutlich

erkennbare, glattrandige Abgrenzung der Keimscheibe gegenüber dem extraembryonalen Gewebe. Diese sichelartige Zone verläuft entlang der anterioren Marginallinie der Keimscheibe und zeichnet sich durch eine höhere Zelldichte, sowohl im Epiblasten, als auch im Hypoblasten aus (Knoetgen et al., 1999). Ein weiteres, dem VRB zeitlich in der Entwicklung folgendes Merkmal ist die posteriore Gastrulations-Extension (PGE). Diese ist ein posterior gelegenes Areal mit geringer Zelldichte (Idkowiak et al., 2004). Die vormals kreisrunde Keimscheibe wird nach posterior oval (vgl. Abb.5).

### 1.3.3 Die transversale Achse

Die Definition der transversalen Achse erfolgt gleichzeitig mit der Festlegung der anterior-posterioren Achse und bereits vor der Gastrulation, da die anterior-posteriore Achse durch eine periphere Differenzierung in einem bereits dorsoventral polarisierten Embryo festgelegt wird und die transversale Achse senkrecht zu diesen beiden Achsen steht. Morphologisch erscheinen die beiden Körperhälften jedoch zu diesem Zeitpunkt noch gleichwertig. Die Frage zu welchem Zeitpunkt diese Symmetrie gebrochen wird, zugunsten eines Körperbaus mit lateralen (rechten und linken) Identitäten wird dann während der späten Gastrulation im 2-Somiten-Stadium entschieden (Levin et al., 2005; Tabin et al., 2006). Dies belegen Fälle von seitenverkehrten Achsenanlagen wie im teilweisen oder vollständigen situs inversus. Auf molekularer Ebene bestimmt die asymmetrische Aktivität von Signalmolekülen über die Zuordnung zur rechten oder linken Körperseite. Sonic hedgehog (Levin), Fgf8 (Fibroblast growth factor 8) oder Lefty (Fischer et al., 2002) exprimieren bereits zu Beginn der Somitenstadien nur in einer Körperhälfte, wobei diese Zuordnung Spezies abhängig ist. In Huhn und Kaninchen z.B. finden sich Fgf exprimierende Zellen ausschließlich auf der rechten Körperhälfte, in der Maus auf der linken Seite, für Shh ist die Situation umgekehrt. Nodal hingegen ist ein Faktor, der sowohl im Vogel, als auch im Säuger konserviert die linke Körperhälfte markiert. Seine Expression im linken Seitenplattenmesoderm manifestiert die rechts-links- Identität noch vor Beginn der Organentwicklung. Für diesen Entwicklungsschritt scheint Pitx2 die Mittlerfunktion von Nodalsignal bis zur Organentwicklung zu übernehmen. Dieses Homeoboxgen ist linksseitig aktiv während der Ausbildung der Organe. In Xenopus zum Beispiel führt die Fehlexpression von Pitx2 in der rechten Körperhälfte zur Inversion von Herz- und Darmanlage, was dessen Bedeutung für die korrekte Organorientierung unterstreicht (Campione et al. 1999).

## 1.4 Markergene der frühen Achsenentwicklung

Der initialen morphologischen Differenzierung der Körperachsen geht eine molekulare Entwicklung in Form einer sogenannten Blaupause voraus. Im Folgenden werden einige Schlüsselgene vorgestellt, die sich neben entscheidender funktioneller Einbindung in Achsenentwicklung verschiedener Wirbeltierklassen auch durch charakteristische topographische Verteilung ihrer Expression auszeichnen und deshalb für die vorliegenden Untersuchungen ausgewählt worden sind.

### 1.4.1 Dickkopf 1

Das Dickkopf 1 (*Dkk1*) Gen kodiert für ein sezerniertes Signalmolekül von ca. 30 kDa. *Dkk1* gehört zu einer Multigenfamilie, deren Mitglieder durch zwei hochkonservierte cysteinreiche Domänen, zur Interaktion mit anderen Proteinen befähigt sind.

*Dkk1* ist notwendig für die korrekte Entwicklung von Kopfstrukturen, was die *Dkk1*<sup>-/-</sup> Maus bestätigt: Ihr fehlen sämtliche Kopfstrukturen anterior des Mittelhirns.

Auf molekularer Ebene wird *Dkk1* wirksam als Inhibitor des *Wnt* Signalweges (Glinka et al., 1998): *Wnt* Glykoproteine spielen eine wichtige Rolle bei der frühen Achsenentwicklung während der Embryogenese und sind im Zusammenspiel mit ihren Antagonisten an der Musterbildung des Embryos beteiligt. *Dkk1* interagiert mit dem *Wnt*-Korezeptor LRP 6 (lipoproteine related proteine 6) (Mao et al., 2001) und verhindert so die Ausbildung eines ternären Komplexes zwischen *Wnt*, LRP6 und *frizzled*, der für die *Wnt*-Signalweiterleitung notwendig ist. Zusätzlich bindet *Dkk1* noch an den Rezeptor Kremen, was zu einer Reduktion von LRP an der Zelloberfläche führt (Mao et al., 2002) (vgl. Abb. 2). In der Maus wird *Dkk1* frühestens ab Embryonaltag 6,5 (E 6,5) exprimiert. Die Expression befindet sich im Bereich des anterioren viszeralen Endoderms (AVE), sowie in mesodermalen Zellen an der anterioren Grenze zwischen embryonalem und extraembryonalem Gewebe. Ab Tag E 7,5 sind diese Zellen eindeutig dem Kopfmesoderm zuzuordnen. In älteren Embryonen (E 8,5) findet man für *Dkk1* positive Zellen hauptsächlich in den sich entwickelnden Somiten.

### 1.4.2 Cerberus1 (Cer1)

*Cerberus1* (*Cer1*) ist ein TGFβ-Antagonist und gehört zur Can-Familie sezernierter Signalmoleküle (Pearce et al., 1999). Während die *Cer1*<sup>-/-</sup> Maus einen unauffälligen Phänotyp hat (Pearce et al., 1999) hat, ist die Doppelmutante *Cer1*<sup>-/-</sup>-*Lefty1*<sup>-/-</sup>-Maus letal. Sie zeigt in frühen embryonalen Stadien neben einer anterioren Vergrößerung des Primitivstreifens auch

zusätzliche ektope Primitivstreifen. Beide TGF $\beta$ -Antagonisten wirken synergistisch an der Inhibierung des Nodalsignals (Perea-Gomez et al., 2002), was zu einer Inhibierung der Mesodermentwicklung führt (vgl. Abb. 2).

### 1.4.3 Lefty 1

*Lefty1* ist ein sezerniertes Molekül der TGF- $\beta$  (Pearce et al., 1999)-Familie (Meno et al., 1996). Wegen der antagonistischen Wirkung auf die *Nodal*- Signalkaskade wird *Lefty1* eine wichtige Rolle im molekularen Programm der Achsenentwicklung des frühen Säugerembryos zugeschrieben. *Lefty1* inhibiert *Nodal* durch die Bindung an den Kofaktor EGF-CFC (Epidermal Growth Factor-Cripto/ FRL1/ Cryptic), den *Nodal* benötigt, um an den Activin Rezeptor (act RI/II) binden zu können (Juan et al., 2001; vgl. Abb. 2).

Einen Hinweis darauf liefert auch die *Lefty1*<sup>-/-</sup>-Maus (Meno et al., 1998), die bezüglich der rechts-links Achse und der Anordnung viszeraler Organe auffällig ist (links Isomerismus).

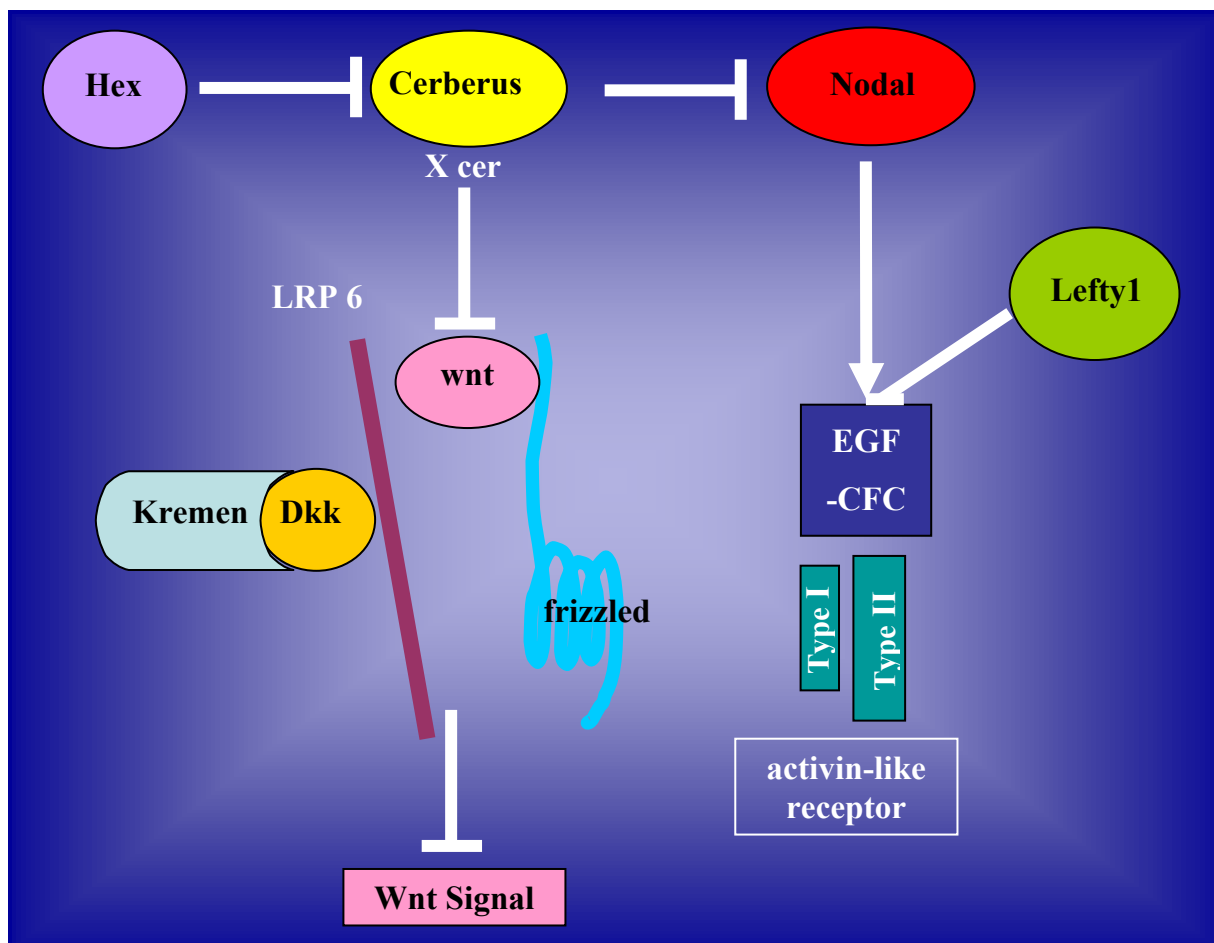
In Säugern sind zwei *Lefty* Gene bekannt: *Lefty1* und *Lefty2* (Meno et al., 1998). Schon früh in der Entwicklung ist *Lefty1* am anterioren Pol des Mauszyinders nachweisbar (Juan und Hamada, 2001). Sobald der Primitivstreifen proliferiert, finden sich auch in dessen anteriorem Areal *Lefty1*-positive Zellen. Später in der Entwicklung in der Maus sind Mitglieder der *Lefty* Subfamilie in der Chorda dorsalis und im Seitenplattenmesoderm exprimiert. *Lefty1*-positive Zellen kommen spezifisch im Hypoblasten, bzw. in dessen Maushomolog, dem viszeralem Endoderm vor. Hier beeinflusst *Lefty1* nicht nur die Ausprägung der rechts-links- Achse (Tabin, 2006), sondern durch Einfluss auf die Zellmigration im viszeralem Endoderm (VE) auch die der anterior-posteriore Achse.

### 1.4.4 Hex

Der Transkriptionsfaktor *Hex* (haematopoietically expressed homeobox gene 1) gehört zur Familie der Homöoboxgene (Bedford et al., 1993). Diese kodieren eine Gruppe von Proteinen, welche eine aus 60 Aminosäuren bestehende DNA Bindungsdomäne beinhalten. Diese hochkonservierte Sequenz findet sich in vielen verschiedenen Spezies, wie *Xenopus*, Zebrafisch, aber auch in Säugern, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen und Menschen. *Hex* kommt eine bedeutende Rolle in der Zelldifferenzierung und Morphogenese zu, die sich bereits früher zeigt, als die Expression des Transkriptionsfaktors in der sich entwickelnden Leber und in der Schilddrüse vermuten lässt (Bogue et al., 2000). In der Maus ist *Hex* mRNA bereits wenige



Tage nach der Konzeption nachzuweisen: Erste Anzeichen der Expression finden sich im primitiven Endoderm. Ab Tag 5,5 dpc (dies post conceptionem) wird *Hex* im viszeralem Endoderm, an der distalen Spitze des Eizylinders exprimiert. Im Laufe der Achsenentwicklung, noch bevor sich der Primitivstreifen, als morphologisches Zeichen der anterior-posterioren Achse gebildet hat, wandern diese *Hex*-positiven Zellen vom distalen Ende zum zukünftigen anterioren Pol des Embryos (Martinez-Barbera und Beddington, 2001). Somit kann *Hex* als ein sehr früher Marker für die anterior-posteriore Achse gelten.

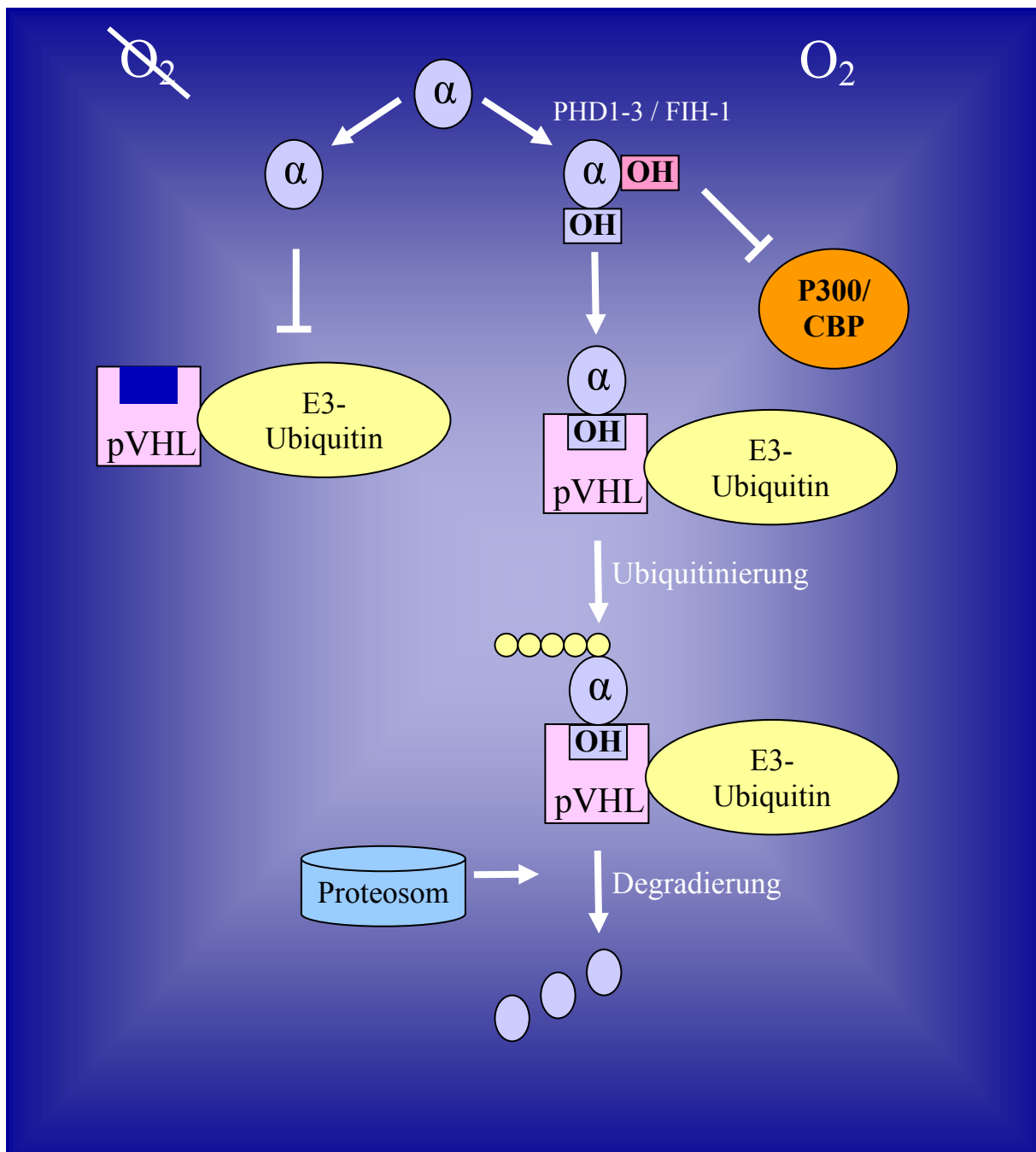


**Abb. 2** Signalwege: Stark vereinfachte schematische Darstellung der Funktion von *Hex*, *Cer1*, *Lefty1* und *Dkk1* im *Nodal*- bzw. *Wnt*-Signalweg. Nähere Erläuterungen im Text. (verändert nach: Juan und Hamada, 2001)

#### 1.4.5 Die Rolle von Sauerstoff während der frühen Embryonalentwicklung

Besonders für die Ausbildung der Neuralleiste oder des Kardiovaskulären Systems zeigen viele Studien eine bedeutende Rolle der Sauerstoffkonzentration (Iyer et al., 1998; Feil et al., 2006). Aber auch während der frühen Embryonalentwicklung ist die richtige Konzentration

dieses externen Milieufaktor als physiologischer Stimulus für die korrekte Anlage, Entwicklung und Funktion von Zellverbänden wichtig, wie die HIF-1 $\alpha^{-/-}$ -Maus nahe legt, die im Embryonalstadium letal ist (Lomb et al., 2007). Der Transkriptionsfaktor HIF-1 (**hypoxia inducible factor 1**) wird durch Hypoxie in physiologisch relevanter Intensität aktiviert. HIF-1 reguliert die Transkription von VEGF als Aktivator der Angiogenese und aktiviert transkriptionell das Erythropoietin (EPO), das für die Produktion neuer Erythrozyten verantwortlich ist. Aktives HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten HIF $\alpha$  und HIF $\beta$ . Unter normoxischen Bedingungen wird HIF $\alpha$  schnell degradiert (vgl. Abb. 3), während HIF $\beta$  konstitutiv und abundant präsent ist. In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff O<sub>2</sub> (**Normoxie**) werden definierte Prolin- und Asparaginreste der HIF $\alpha$ -Untereinheit durch Prolinhydroxylasen (PHD1-3) und eine Asparagylhydroxylase (FIH-1) hydroxyliert. Die Prolylhydroxylierung befähigt die E3-Ubiquitin-Ligase, deren Erkennungskomponente das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) ist, zur Bindung an HIF $\alpha$ , wodurch nach Ubiquitinierung eine proteosomale Degradation ermöglicht wird. Die Hydroxylierung des Asparagylrestes verhindert die Bindung des transkriptionellen Kofaktors p300/CBP und inhibiert dadurch die Transaktivierung. In Abwesenheit von Sauerstoff (**Hypoxie**) unterbleibt die Hydroxylierungsreaktion. Die HIF $\alpha$ -Untereinheit wird stabilisiert, akkumuliert und wird in den Zellkern transloziert. HIF $\alpha$  dimerisiert mit HIF $\beta$  und bindet anschließend unter Mitwirkung des transkriptionellen Kofaktors p300/CBP an das HRE der Zielgene. Umgekehrt kann man die Hypothese aufstellen, dass auch chemische HIF-1 Aktivierung hypoxieartige Bedingungen in der Zelle hervorruft. Deshalb kann in Suspensionskultursystemen das Hypoxieprogramm mit Hilfe von Dimethyloxaloylglycine (DMOG) induziert werden. DMOG ist ein Prolyl 4-hydroxylase Inhibitor und verhindert so den Abbau von HIF $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen (Asikainen et al., 2005). Diese Simulation hypoxischer Bedingungen ermöglicht auf einfache Weise die Variation der Kulturbedingungen im Sinne der zellulären Antwort auf Veränderungen der Sauerstoffkonzentration.



**Abb 3.** Regulation der HIF $\alpha$ -Untereinheit: Schematische Darstellung der Regulation von HIF unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen. Nähere Erläuterung siehe Text.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die molekularen Voraussetzungen zu untersuchen, die der morphologischen Achsenentwicklung vorausgehen. Ein Zugang zu dieser Fragestellung ist zunächst die Bestimmung von Gen-Expressionsmustern in-situ. Wegen der herausragenden

Bedeutung des Hypoblasten für die Achsenentwicklung (Perea-Gomez et al., 2002; Idkowiak et al., 2004) werden dazu Gene ausgewählt, die in dieser Gewebsschicht exprimiert werden und deren Rolle bei der Achsenentwicklung bei verschiedenen Vertebraten nachgewiesen wurden: *Dickkopf1*, *Cerberus1*, *Hex* und *Lefty1*. Angesichts von bekannten Unregelmäßigkeiten der Gen-Expressionsmuster im Hypoblasten insbesondere im Hinblick auf das Signalmolekül *Dkk1* (Idkowiak et al., 2004) soll untersucht werden, ob bereits früh eine rechts-links Asymmetrie auftritt. Hier stellt sich außerdem die Frage, ob eventuelle Asymmetrien stabil sind, d.h. ob sie bei der Festlegung der rechts-links Identität schon deutlich früher vor der Organentwicklung als bisher angenommen wirken können; dazu können Embryokulturen in vitro Hinweise geben. Untersuchungen an halbierten Keimscheiben sollen darüber hinaus zeigen, ob ein eventuelles vorhandenes unregelmäßiges *Dkk1*-Expressionsmuster in beiden Embryohälften gleichermaßen stabil ist und möglicherweise auf eine oszillierenden Gen-Aktivität wie im Falle der Somitogenese (Dale et al., 2006) zurückzuführen ist.

Im Hinblick auf die intrauterine Entwicklung des Säugers stellt sich als ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der Rolle des Sauerstoffes als einem der wichtigsten externen Milieufaktoren bei der Entwicklung von Blastozysten unmittelbar vor und nach Beginn der Gastrulationsphase. Hier soll zunächst geklärt werden, in welchem Maße herkömmliche Kulturbedingungen für Embryonen in der Peri- oder Präimplantationsphase valide Ergebnisse hervorbringen können, und insbesondere, ob Variationen in der umgebenden Sauerstoffkonzentration direkt in die korrekte Ausprägung der molekularen Achsenmerkmale eingreifen. Als Marker für eine korrekte Entwicklung zu einem Zeitpunkt kurz vor und während der frühen Gastrulation soll hier wie zuvor das Expressionsmuster von *Dkk1* herangezogen werden.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

<u>Agarosegelelektrophorese</u> Gelkammer	AGS GmbH
<u>Spannungsgeräte</u> Spannungsgerät Shandon Southern SAE2761	Vokam
Spannungsgerät Consort E21	AGS GmbH (Heidelberg)
<u>Heizgeräte/Inkubatoren</u> Blockthermostat	Grant Instruments (Cambridge, UK)
Brutschrank HeraCell 150 Tri-Gas Cell Culture Incubator	Heraeus (Hanau)
Brutschrank O <sub>2</sub> regulierbar	Labotect (Göttingen)
Incubatorshaker innova™ 4000	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Mikrowelle MD10482	Medion (Mühlheim)
Rotationsofen OV2	Biometra (Göttingen)
Schaukel	Barnstead/Thermolyne (Dubuque, USA), Vari-Mix
Wasserbad LAUDA A100	Lauda (Konigshofen)
<u>Messen/Wiegen/Auswerten</u>	
Bio-Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Dunkelkammer mit UV, Epichemi3 Darkroom	Intas (Göttingen)
Feinwaage Sartorius TE214 S	Sartorius
UV-Tisch und Kamera INTAS 302	INTAS GmbH
Waage Sartorius excellence	Sartorius (Göttingen)
<u>Schnittanfertigung</u> Knife Maker Type 7801 A	LKB
Microtom Jung RM 2065	Leica Bensheim
<u>Mikroskope und Kameras</u>	
Digitalkamera	Intas (Göttingen)
Digitalkamera	Visitron Systems Puchheim)
Mikroskop Axioplan2	Zeiss (Jena),
Stereolupe Stemi SV11	Zeiss (Jena)
<u>Sonstige Laborgeräte</u> Water Purification System SG	Schütt (Göttingen)
Hypoxiebank	
ISH Gerät, Biolane™ HTI	Hölle & Hüttner (Tübingen)
Sterilbank Hera Safe	Heraeus (Hanau)
Thermocycler PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym (Oldendorf)
<u>Zentrifugen</u> Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
Speed-Vac Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)

**2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark (Koblenz-Rheinhafen)
Küvetten	Eppendorf (Hamburg), UVette® (RNase-free)
Kryogefäße, Micro-Röhrchen, 2ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Multipette Combitips	Eppendorf (Hamburg)
Multiwell Kulturplatten	
Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Organkulturschalen	Becton, Dickinson & Co (Le Pont De Claix, Frankreich), Falcon®
Petrischalen (Ø 4cm, 6cm, 10cm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (mit Filter) 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Starlab (Ahrensburg)
Polypropylenröhrchen 20ml mit Deckel	Elkay (Hampshire, UK)
Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Skalpells	Aesculap (Tuttlingen)
Tablettenhüllen	Bayer (Leverkusen)
Reaktionsgefäße 0,5ml (für PCR), 1,5ml, 2ml	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugenröhrchen Eco 50ml	Roth (Karlsruhe), Rotilabo®
Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Skalpells	Kimberly-Clark (Koblenz-Rheinhafen)
Tablettenhüllen	Eppendorf (Hamburg), UVette® (RNase-free)
Reaktionsgefäße 0,5ml (für PCR), 1,5ml, 2ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen Eco 50ml	Eppendorf (Hamburg)

**2.1.3 Allgemeine Laborchemikalien**

3-((3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio)-1-Propane-Sulfonate (Chaps)	Biomol (Hamburg)
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Biomol (Hamburg)
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid (x-Gal)	
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Aqua bidest	
Cell dissociation solution	Roche (Mannheim)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma (München)
Dimethyloxaloylglycine (DMOG)	Biomol (Hamburg)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fluka (Neu-Ulm)
Ficoll®	Serva (Heidelberg)
Formamid	Fluka (Neu-Ulm)
Fötale Kälberserum (FCS) (Hybridomazell)	Biochrom (Berlin)
Glutaraldehyd	Serva (Heidelberg)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
HAM's F10 Medium (mit stabilem Glutamin)	Biochrom (Berlin)

Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Heparin	Sigma (München)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck (Darmstadt)
Levamisol (Levamisol Hydrochlorid)	Sigma (München)
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Roth (Karlsruhe)
Maleinsäure	Sigma (München)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mowiol 4-88	Hoechst (Frankfurt)
Natriumacetat (NaAc)	
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Normal goat serum (NGS) (Ziegenserum)	Sigma (München)
Orange-G	Sigma (München)
Para-Formaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin)
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween20)	Sigma (München)
Saline-sodium citrate buffer (SSC)	Sigma (München)
Salzsäure (HCl)	Roth (Karlsruhe)
SeaKem® LE Agarose	Cambrex (Rockland, USA)
SOC Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Technovit 8100®	Heraeus-Kulzer (Wehrheim)
Tris	Sigma (München)
Tris-EDTA	Sigma (München)
Tryptone	Roth (Karlsruhe)

## 2.1.4 Nährmedien

### 2.1.4.1 Für Bakterien

Das Wachstum der Bakterien erfolgt in Luria-Bertani (LB) Medium, beziehungsweise auf LB- Agar Platten.

(W/V)

LB-Medium (pH 7,0): 1 % Pepton  
0,5 % Hefeextrakt  
1,0 % NaCl

LB-Agar:  
1,0 % Pepton  
0,5 % Hefeextrakt  
1,0 % NaCl  
1,5 % Agar

Da alle verwendeten Plasmide das  $\beta$ -Lactamase-Gen für die Ampicillinresistenz enthalten, ist es möglich, die Positivselektion transformierter Bakterien über die Zugabe von 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin zu steuern. Das Antibiotikum wird den Medien erst zugesetzt, wenn sie nach dem Autoklavieren bei 120°C für 30 Minuten auf etwa 50°C abgekühlt sind.

Zur Blau-Weiß-Selektion werden außerdem noch 48  $\mu\text{g/ml}$  IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid) und 40  $\mu\text{g/ml}$  in DMF (Dimethylformamid) gelöstes XGal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) zugesetzt.

#### 2.1.4.2 Für Zellkultur mit CHO Zellen

Hams F10 Medium  
+ 10% FCS  
+ 0,1% Penicillin/Streptomycin

#### 2.1.4.3 Für die Embryonenkultur

Hams F10 Medium  
+ 20% FCS  
+ 0,1% Penicillin/Streptomycin

#### 2.1.5 Molekularbiologische Kits

NucleoSpin® Extract Kit	Macherey-Nagel (Düren)
pGem®-T Easy Vector System	Promega (Madison, USA)
Qiagen® Plasmid Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden)

#### 2.1.6 Betäubungsmittel

Narcoren® (Pentobarbital-Natrium)	Merial (Hallbergmoos)
-----------------------------------	-----------------------

#### 2.1.7 Mittel zur Steigerung der Ovulation

Intergonan® (Pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)	Intervet (Unterschleißheim)
Predalon 500® (Humanes Choriongonadotropin, HCG)	Organon (Oberschleißheim)



### 2.1.8 Puffer für die in situ-Hybridisierung

**PBT:** 0,1% Tween20 in PBS-DEPC

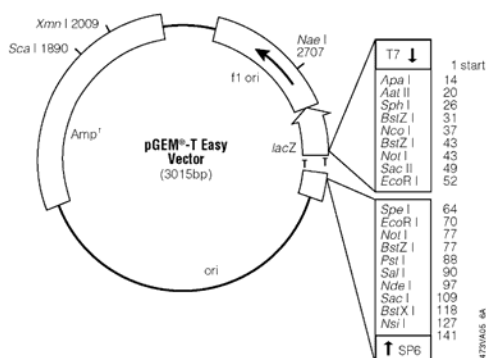
**Hybemix (50ml) :** 25 ml Formamid  
3,5 ml 20xSSC  
0,05 ml 0,5 M EDTA  
0,25 ml t-RNA (10mg/ml)  
0,1 ml Tween 20  
2,5 ml 10% Chaps  
0,05 ml Heparin (50mg/ml)  
18,6 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

**Maleinsäurepuffer (MABT):** 100mM Maleinsäure  
150mM NaCl  
10N NaOH  $\Rightarrow$  pH = 7,5  
0,1%Tween20

**NTMT Puffer:** 100mM TrisCl (pH = 9,5)  
+ 100mM NaCl  
+ 50mM MgCl<sub>2</sub>  
+ 2mM Levamisol  
+ 0,1% Tween 20  
in dd H<sub>2</sub>O lösen

### 2.1.9 Verwendeter Vektor

Die multiple cloning site, (MCS) des pGEM-T Easy Vektor der Firma Promega wird von einem T7- und einem SP6-Promotor flankiert. Zur Selektion in Prokaryonten dient das  $\beta$ -Lactamasegen (Ampicillin-Resistenz).



**Abb. 4 pGEM-T Easy Vektor:** Vektorkarte des Klonierungvektors

### 2.1.10 Verwendete Primer

Primer	Sequenz
SP6	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC 3'
T7	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA 3'

### 2.1.11 Enzyme

Reverse Transkriptase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Proteinase K	Roche (Mannheim)
SP6 RNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
T7 RNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)

### 2.1.12 Primer für die Klonierung

Primer	5' Sequenz 3'
<b><u>Hex</u></b>	
F1	GGCAAGCCCT TGCTCTGGAG C
R1	GTCCACCTCCTGGTCGAATCC
<b><u>cripto</u></b>	
F1	CTGCTGTGAGAACGGCGGCACC
R1	CACAGCGGCCGAGCGTCTGG
F2	TGCMRSAATGGCGGYACCTG
R2	GCACACTGTGGTGTAMKSAAGG
F3	GCCGCCACTGTGAGCACGACC
R3	GGTCGTGCTCACAGTGGCGGC
<b><u>BMP 2</u></b>	
F1	GCTSYCTYCTRGYGTGCTGCT
R1	GACACAGCAWGCCTTRGG
F2	CCTAYATGCTRGAYCTSTAYCGC
R2	GDGCMACRATCCAGTCATTCC
F3	GCCAACACYGTGYKCASSTTCC
R3	TCAYTGAAGTCCACRTACAAMGG
<b><u>Lefty</u></b>	
F1	GGCTGCCGCCCAACAGCGAGCTGGTGCAGG
R1	TCTGCACCCTCATGTTGGGCAGGCTGACCA

<b>Dkk1</b> (Weisheit 2002)	
F1	ATTCCAACGCTATCAARAAYYTNC
R1	TTGAGGCTTGRTGRTGRTCYTTYTG
F2	SMGGGCCCCAAYAARTAYCARAC
R2	TTAGTACAGGTTTACAGATYTTNSWCCA
<b>Cer1</b> (Idkowiak 2006)	
F1	CTTATTTCAGCTGYTKGTWYTYTKCC
R1	CCGTCTTCACYWTRCAYTGRCAYTC
F2	TTGTCTCTTGCCYTRGGRAARRC
R2	CACTGTCACTCYTCYACYWGCATNACC

### 2.1.13 Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme stammen von der Firma NEB.

Enzym	Restriktionsstelle	Spezifische Aktivität	Reaktionspuffer (NEB)
<b>EcoRI</b>	5' G <sup>^</sup> A A T T C 3'	20 U/μl	EcoRI-Puffer (10x)
<b>SpeI</b>	5' A <sup>^</sup> C T A G T 3'	10 U/μl	Puffer 4 (10x)
<b>SacII</b>	5' C C G C <sup>^</sup> G G 3'	20 U/μl	Puffer 2 (10x)
<b>Eco RV</b>	5' GAT <sup>^</sup> ATC3'	100 U/μl	Puffer 3 (10x)

### 2.1.14 Verwendete Tierstämme

#### 2.1.14.1 Kaninchen

Kaninchen der Rasse „New Zealand White“ (W.S. Preshaw, 1916) werden von Lammers (Euskirchen) bezogen. Tiere dieses Stammes sind Albinos. Sie zeigen gute Verpaarungseigenschaften mit mittlerer Wurfgröße (ohne Hyperovulation ca. 6-12 Junge pro Wurf).

### 2.1.15 Verwendeter Bakterienstamm

Alle molekularbiologischen Arbeiten werden in dem *Escherichia coli* Stamm dh5α (Invitrogen) durchgeführt. Die Zellen sind zur α-Komplementation fähig und erlauben somit „blue-white-screening“.

### **2.1.16 Verwendete Zelllinie**

Chinesische hamster ovarian Zellen (ATCC (American tissue culture collection)) wurden Anfang der sechziger Jahre als eine entwicklungsfähige Epithelzelllinie in die Forschung eingeführt. Sie enthalten zwei X Chromosomen und benötigen zum Überleben die externe Zuführung der Aminosäure Prolin.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Sicherheitsbestimmungen**

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Methoden fallen unter Sicherheitsstandards für die Sicherheitsstufe 1. Diese beinhalten grundsätzlich geeignete Schutzkleidung, wie Kittel und Handschuhe, gegebenenfalls auch verstärkte Nitrilhandschuhe (im Umgang mit kanzerogenen Stoffen) und Schutzbrille. Arbeiten mit gesundheitsschädlichen Chemikalien sind unter dem Abzug durchzuführen. Sämtliches genetisch verändertes Material, sowie Mikroorganismen müssen nach Beendigung der Arbeiten bei 121°C autoklaviert und damit inaktiviert werden (Gentechnikgesetz, 1993). Abfälle werden getrennt gesammelt und anschließend entsorgt.

### **2.2.2 Gewebepräparation**

#### **2.2.2.1 Superovulation**

Um die Ausbeute von Embryonen zu erhöhen, wurden die weiblichen Kaninchen vor der Konzeption hormonell behandelt. Menschliches Choriongonadotropin (hCG, human chorionic gonadotropin) wurde zuerst im Harn schwangerer Frauen gefunden (Aschheim und Zondek, 1927). Dieses Glycoprotein wird während der Schwangerschaft von der Placenta produziert und besteht aus einer  $\alpha$  Untereinheit, die weitestgehend mit der des luteinisierenden Hormons übereinstimmt und einer spezifischen  $\beta$ - Einheit. Da es auch in der biologischen Wirkung der von LH gleicht, ist es möglich durch die Injektion von hCG die Ovulation zu induzieren. Die vorherige Gabe von PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin), welches im Endometrium produziert wird, bewirkt verstärktes Follikelwachstum.

Die beiden Hormone werden den Tieren intraperitoneal im Abstand von 48 Stunden injiziert.

(Nach Whittingham (*J. Reprod. Fertil.Suppl.* 14, 7-21, 1971))

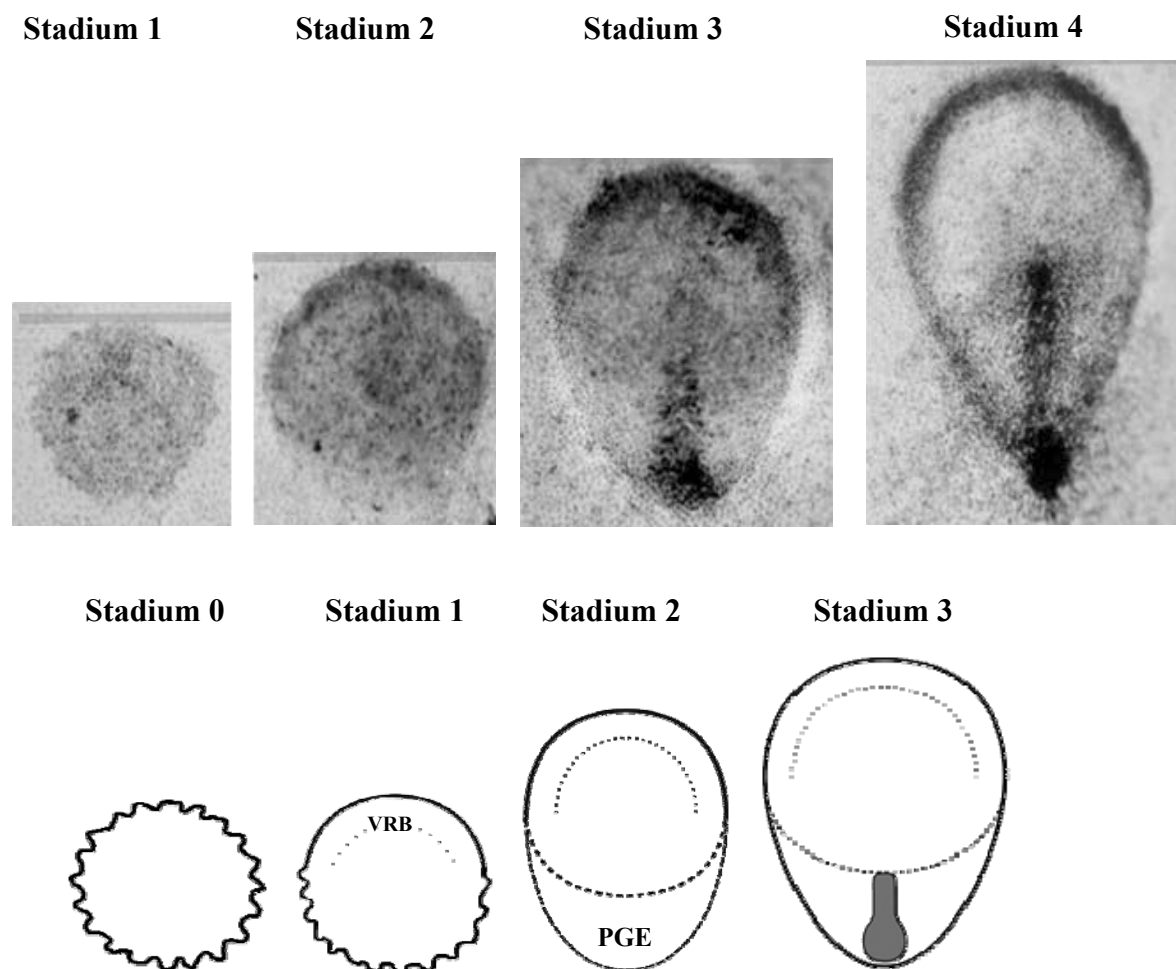
### **2.2.3 Gewinnung von Kaninchenembryonen**

Frühe Kaninchenembryonen können bis zum Tag 6,5 post conceptionem (dpc) direkt aus dem Uterus des Muttertiers gespült werden. Hierzu wird das Weibchen durch die intravenöse Gabe

einer Überdosis Narcoren® (320mg) getötet und der gesamte Uterus per Kaiserschnitt entnommen. In 37°C warmen PBS (phosphate-buffered saline) werden die Uterushörner getrennt und einzeln mit etwa 40 ml der Flüssigkeit durchspült. Die herausgespülten Blastozysten werden mehrmals in PBS gewaschen und anschließend die Keimscheiben mit Hilfe von Wolframnadel und Iridektomieschere ausgeschnitten. Keimscheiben, die für die ISH benutzt werden sollen, werden direkt in 4% PFA fixiert über eine Alkoholreihe entwässert, und anschließend bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

#### 2.2.4 Entwicklungsstadien des Kaninchenembryos

Die gewonnen Embryonen werden anhand morphologischer Entwicklungen stadiert. Diese Einteilung erfolgt nach einem an das System von Hamburger und Hamilton angelehnten Einteilung für Hühnerembryonen (Viebahn, 2004, s. Abb. 5 und Weisheit, 2002).



**Abb. 5 Entwicklungsstadien des Kaninchenembryos:** Stadium 0 zeigt noch keinerlei morphologische Anzeichen einer Achsenidentität. Der Rand der Keimscheibe ist unklar begrenzt. Im Stadium 1 zeigt sich erstmals eine Morphologie, die die Zuordnung des

anterioren Pol ermöglicht: der Vordere Randbogen (VRB). Dieser zeichnet sich durch eine glatte Begrenzung des vorderen Keimscheibenpols aus, die durch eine zunehmende Zahl von Zellen bedingt ist. Stadium 2 definiert sich über die posteriore Gastrulationsextension( PGE). Diese führt zu einer Verlängerung des Embryos, so dass die vormals rundliche Form zugunsten einer ovalen aufgegeben wird. Die PGE hat eine geringere Zelldichte, als die anterior liegenden Bestandteile der Keimscheibe. In Stadium 3 bildet sich innerhalb dieser PGE der so genannte Primitivstreifen (grau). Ausgehend von einem primären Punkt am posterioren Pol der PGE wächst dieser entlang der Mittellinie bis etwa zur Keimscheibenmitte. In Stadium 4 entsteht am anterioren Ende des Primitivstreifens der Primitivknoten.

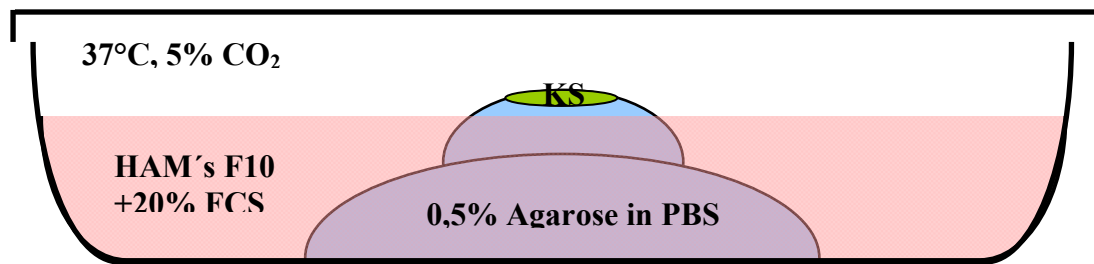
### **2.2.5 Fixierung**

Um die nach der Entnahme biologischen Materials auftretenden autolytischen Prozesse zu unterbinden, ist es notwendig, direkt nach der Präparation das Gewebe zu fixieren. Die rasche Fixierung mit 4% PFA-Lösung und eine kühle Lagerung (bei ca. 4°C) sollen dies gewährleisten. Die Bedingungen, zum Beispiel pH oder osmotischer Druck während dieses Vorgangs sollten weitestgehend den physiologischen gleichen, damit die Selbstauflösungsprozesse, keine Schäden am Präparat hinterlassen, die die mikroskopische Auswertung verhindern oder erschweren.

### **2.2.6 Embryonenkultur**

#### **2.2.6.1 Flachkultur**

Die ausgeschnittenen unfixierten Keimscheiben werden nach dem Modell der New-type-culture (New, 1955) inkubiert. Hierfür werden zwei übereinanderliegende Agarosehügelchen als Auflagefläche für die Keimscheibe genutzt, wobei die Keimscheibe nicht vom Medium bedeckt wird. Dieses System ermöglicht einerseits die natürliche Form der Keimscheibe, bedingt durch die Lage auf der Blastozyste zu erhalten und andererseits eine Manipulation des Hypoblasten durch Wolframnadeln.



**Abb. 6 Flachkultur nach New:** Bei der flach aufliegenden Keimscheibe kann entweder mit Hilfe von Wolframnadeln der Hypoblast entfernt werden oder auf den unbeschädigten Embryo transfizierte Zellen aufgespült bzw. Zellaggregate oder beads aufgesetzt werden.

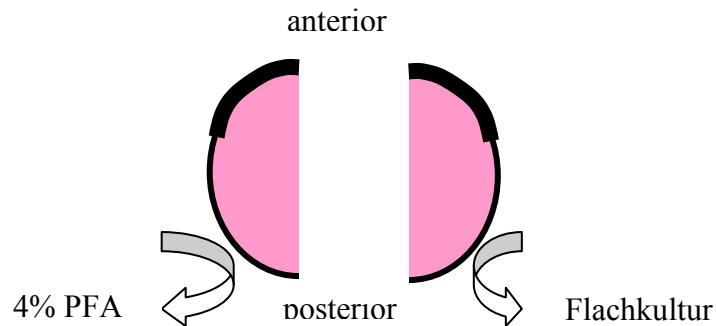
#### 2.2.6.1.1 Manipulationen an der Flachkultur

Hypoblastenresektion: Da der Hypoblast eine in sich zusammenhängende Struktur darstellt, ist es möglich, ihn mit Hilfe einer Wolframnadel komplett vom Embryo abzuheben, ohne den Epiblasten zu beschädigen (Idkowiak et al., 2004). Die auf diese Weise entnommenen Hypoblastenzellen wurden teilweise in Suspensionskultur genommen.

Aufbringen von transfizierten Säugerzellen (Schulte-Merker et al., 1997): Mit Dkk1 transfizierte CHO-Zellen (Weisheit, 2002) wurden bis zur Konfluenz kultiviert, mit einem Schaber zusammengeschoben, in einem minimalen Volumen (2 µl) Medium aufgenommen und in diesem Volumen mit einer Pipette auf Keimscheiben nach Hypoblastresektion aufgesetzt.

#### 2.2.6.2 Flachkultur mit halbierter Keimscheibe

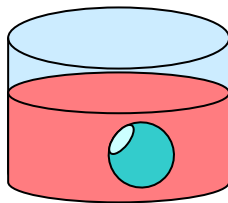
Die ausgeschnittene Keimscheibe wird mit einer Wolframnadel entlang der anterior-posterioren Achse geteilt. Als Orientierung und Ansatzpunkt dient hierbei der Mittelpunkt des vorderen Randbogens. Eine Hälfte wird direkt fixiert, die andere Hälfte zunächst für einen Zeitraum von 30 Minuten bis 4 Stunden als Flachkultur inkubiert.



**Abb. 7 Halbierung einer Keimscheibe:** Die Keimscheibe (rosa) wird entlang der antero-posterioren Achse geteilt. Ausgangspunkt ist die Mitte des vorderen Randbogens (dick schwarz)

#### 2.2.6.3 Suspensionskultur

Die gesamte Blastozyste wird in Standard-Nährmedium bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen kultiviert.

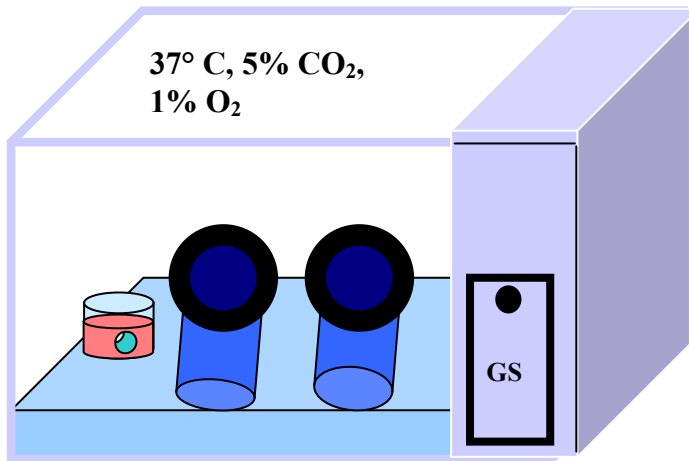


**Abb. 8 Suspensionskultur:** Blastozyste: grün, Keimscheibe: hellgrün; Medium: rot

#### 2.2.6.4 Suspensionskultur unter strikt hypoxischen Bedingung ("absolute Hypoxie")

Die Möglichkeit den Sauerstoffgehalt gleich zu Beginn und während des gesamten Versuches unterhalb des normalen Luftsauerstoffgehalts zu halten, bietet die Hypoxiesterilbank. Diese ist neben der Standardbelüftungseinheit mit einer zusätzlichen zur Reduktion des Sauerstoffs innerhalb der Kammer ausgestattet.





**Abb. 9 Sterilbank mit Sauerstoffkontrolle:** „Die Hypoxiebox“ gewährleistet steriles Arbeiten unter streng definierten Sauerstoffbedingungen. Durch eine Seitenkammer, die sogenannte Gasschleuse (GS) können Embryonen, sowie sämtliche Materialien, welche für den Versuch benötigt werden in die Hauptkammer eingebracht werden, ohne dass in deren Innern die  $O_2$  Konzentration verändert. Dicht am Arm abschließende Stulpen ermöglichen Arbeiten im Innenraum.

#### 2.2.6.5 Suspensionskultur unter hypoxischen Bedingung

Eine andere Möglichkeit hypoxische Kulturbedingungen zu schaffen, bietet ein Inkubator mit regulierbarer Sauerstoffkonzentration (s.o.). Bei diesem Gerät wird der Luftsauerstoff innerhalb des Gerätes durch  $N_2$  verdrängt und auf ein niedrigeres Niveau abgesenkt. Die Embryonen werden für diese Versuchsreihe unter normoxischen Bedingungen ausgespült und in bereits vorinkubiertem Medium kultiviert.

#### 2.2.7 Kompetente Zellen zur Vermehrung von Plasmiden

Die Herstellung der kompetenten Bakterienzellen erfolgt nach dem Protokoll von H. Inoue, H. Nojima und H. Okayama (Gene 96,1990, pp23-28). Hierfür werden Zellen einer Stock-Lösung auf einer LB Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei  $37^\circ C$  inkubiert. Zur Erstellung einer Vorkultur werden vereinzelt gewachsene Kolonien in einem Volumen von 2ml Medium über Nacht bei  $37^\circ C$  kultiviert. Die Zellen der Vorkultur lässt man in 150 ml LB Medium (in einem 1 Liter Kolben) unter ständigem Schütteln bei  $37^\circ C$  bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,4 wachsen. Ist diese erreicht, die Kultur 10 Minuten auf Eis stellen. In der Zentrifuge werden die Zellen bei einer Temperatur von  $4^\circ C$  und einer Umdrehung von 3000 rpm 10

Minuten lang pelletiert. Nach Resuspension des Pellets in 50 ml eiskaltem TB und 10 minütiger Inkubation auf Eis, wird die Zentrifugation wiederholt. Die Zellen werden nun in 12 ml kaltem TB resuspendiert, dem unter langsamen Schwenken bis zu einer Endkonzentration von 7 % DMSO hinzugefügt wird. Eine weitere Inkubation von 10 Minuten auf Eis folgt. Die kompetenten Zellen können in 1ml Aliquots in Eppendorf Reaktionsgefäße abgefüllt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### **2.2.8 Isolierung von gesamt RNA aus tierischem Gewebe**

nach „Rneasy Mini Protocol for Isolation of total RNA from animal tissues“

aus Rneasy Mini Handbook 05/99 -Protocol Animal Tissues

Gewebemengen bis zu einem Gewicht von 20 mg werden in 350  $\mu\text{l}$  Puffer RLT in einem Glaskolbenhomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wird bei 13 000 rpm 3 Minuten lang zentrifugiert, anschließend das Pellet verworfen und nur mit dem Überstand weitergearbeitet. Der Überstand wird mit 350  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol versetzt und gut gemischt. Die Lösung, inklusive eventuell gebildeter Präzipitate, wird auf eine „Rneasy mini spin“ Säule in 2ml Sammelgefäß pipettiert und bei 13 000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wird der Durchfluss entfernt, und die Säule bei gleichbleibenden Zentrifugationsbedingungen mit 700  $\mu\text{l}$  Puffer RW1 gewaschen. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Puffer RPE erfolgt eine erneute Zentrifugation bei 13 000 rpm für weitere 15 Sekunden. Um die Säulenmembran zu trocknen wird dieser Vorgang für 2 Minuten bei 13 000 rpm mit wiederum 500  $\mu\text{l}$  RPE wiederholt. Die Elution der total RNA in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß erfolgt durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser und Zentrifugation für 1 Minute bei 13 000 rpm.

### **2.2.9 Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA**

mit GIBCO BRL<sup>®</sup> ThermoScript<sup>™</sup> RT-PCR System (GIBCO BRL/Invitrogen)

Die Reverse Transkription wird mit einer modifizierten Variante der Moloney Murine Leukaemia Virus Reversen Transkriptase (MMLV-RT) durchgeführt, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Sie besitzt aufgrund einer Punktmutation in der RNase H Sequenz kaum mehr nachweisbare intrinsische RNase H Aktivität und ermöglicht so erheblich längere Transkripte. Die zuvor gewonnene Gesamt-RNA dient der Herstellung von cDNA als Matrize. 10 pg-5 $\mu\text{g}$  total RNA werden mit 1  $\mu\text{l}$  Oligo dT Primer versetzt, mit ddH<sub>2</sub>O DEPC auf 10  $\mu\text{l}$  Volumen gebracht und erst 5 Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$  denaturiert, dann kurz auf Eis inkubiert. Dem Ansatz werden 4 $\mu\text{l}$  5x Puffer, 2 $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (10 mM), 1 $\mu\text{l}$  DTT (0,1M), 0,5

$\mu\text{l}$  RNase out, 1,5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O DEPC und 1  $\mu\text{l}$  Thermoscript Reverse Transkriptase hinzugefügt. Im Folgenden wird jeweils für 20 Minuten bei 50°C, bei 55°C und bei 60°C und zum Schluss für 5 Minuten bei 85°C inkubiert. Die cDNA wird in 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O aufgenommen und kann bei -20°C gelagert werden.

### 2.2.10 Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine *in vitro*-Technik, die es gezielt ermöglicht, spezifische DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen, den Primern, eingerahmt werden zu vervielfältigen. Dies geschieht im Wesentlichen durch die Wiederholung dreier Schritte: 1. Denaturierung, also Auftrennung der Doppelstränge, 2. Anlagerung der Oligomerprimer, 3. DNA-Synthese. Diese Methode bedient sich einer thermostabilen DNA-Polymerase, der Taq-Polymerase. Dieses Enzym ermöglicht eine häufige Wiederholung der 3 temperaturunterschiedlichen Zyklen der PCR, ohne erneute Zugabe von Polymerase. Im Idealfall liegen die Amplikons genannten DNA Abschnitte nach x Zykluswiederholungen 2<sup>x</sup>-fach vor.

#### 2.2.10.1 Konstruktion der Primer

Bei der Suche nach Primern für die Amplifizierung eines bestimmten Genabschnitts des Kaninchengenoms, ist es nötig bereits bekannte Sequenzen anderer, möglichst artverwandter Spezies zu vergleichen. Dieser, Alignment genannte Vergleich ermöglicht die Suche nach möglichst homologen und damit wahrscheinlich hochkonservierten Bereichen der Sequenz. Da das Kaninchengenom noch nicht vollständig bekannt ist, wird bei der Suche der Primer davon ausgegangen, dass Bereiche, in denen sich andere unterschiedliche Spezies (z.B. Maus, Ratte, Huhn, etc) stark ähneln, auch beim Kaninchen ähnlich angelegt sein sollten. Sequenzen, die innerhalb eines Primers sich in den annealten Sequenzen unterscheiden, werden degeneriert, das heißt alternierend werden die unterschiedlichen Alternativen im Primergemisch angeboten. In diesen homologen Bereichen werden Primer nach folgenden Kriterien ausgewählt:

Das Verhältnis von GC: AT sollte 1:1 sein

Die letzte Base sollte C oder G sein, da die Verbindung stabiler ist als zu A bzw. T

Die Länge sollte 20 Basen nicht überschreiten

Die  $T_M$  für forward und revers Primer sollte ungefähr gleich sein

( $T_M$  = Schmelztemperatur; errechnet sich aus dem Anteil von C/G bzw. A/T: für jedes C bzw. G werden 4°C, für jedes A bzw. T 2°C berechnet)

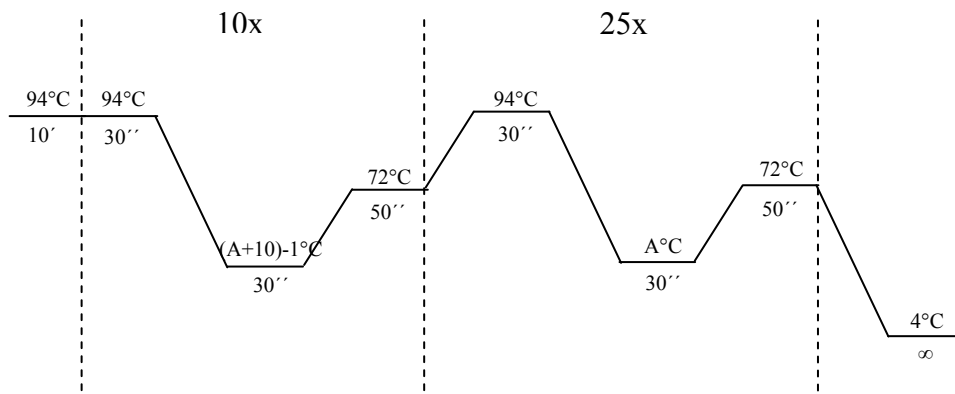
Längere Reihen von C/G vermeiden

#### 2.2.10.2 Standard PCR Ansatz

0,5-50 ng	DNA template
1,5 µl	Primer forward (10-50 pmol/µl)
1,5 µl	Primer revers (10-50 pmol/µl)
5 µl	10xPuffer
4 µl	MgCl <sub>2</sub>
5 µl	dNTP's (jeweils 2,5mM pro Nukleotid)
0,5 µl	Taq Polymerase
ad 50 µl dd H <sub>2</sub> O	

#### 2.2.10.3 Standard PCR Bedingungen:

Touch down PCR mit hot start



Der „hot start“ zu Beginn der PCR ermöglicht eine Auftrennung sämtlicher Doppestränge. Der touchdown ermöglicht ein Annähern an die ideale Annealingtemperatur, da die Berechnung für degenerierter Primer nicht eindeutig sein kann.

Die unterschiedlichen Annealingtemperaturen (A) liegen etwa 5 °C unter der für die Primer errechneten Schmelztemperatur.

Die PCR-Produkte können auf ihre richtige Größe in einem 1%igen Agarosegel kontrolliert werden. Daraufhin kann die Ausbeute in einer Reamplifikations-PCR vergrößert werden. Hierbei dient das 1. PCR Produkt als Matrize, wird aber in gleicher Menge wie zuvor die cDNA eingesetzt. Die Reaktion findet jetzt in größerem Endvolumen von zunächst 40 µl und dann 50 µl statt. Hierfür werden dNTP's, Primer und die Polymerase in doppelter Menge, der

Puffer entsprechend seiner Konzentration eingesetzt . Mit Wasser wird das Volumen aufgefüllt.

Auch diese Amplikons werden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und aus diesem extrahiert.

#### 2.2.10.4 Gel Extraktion

*Nach QIAquick GelExtraction Kit Protocol*

Die richtige Größe des gesuchten Amplikons wird auf einem Agarosegel durch Vergleich mit dem DNA Standard  $\lambda$  DNA Eco RI/Hind III abgeschätzt. Nach Angaben des Herstellers können diese gewünschten DNA Fragmente dann aus dem Gel extrahiert werden.

#### 2.2.10.5 Phenol-Isoamylalkohol-Chloroform (PIC)-Extraktion

Die *Phenol/Isoamylalkohol/Chloroform-(PIC-)Extraktion* entfernt Proteinverunreinigungen aus einer DNA-Lösung. Chloroform und Isoamylalkohol unterstützen die Ausbildung einer stabilen Phasengrenze., zwischen wässriger und phenolischer Phase.. Phenol hingegen führt zur Denaturierung der Proteine, die dann an dieser Phasengrenze ausfallen.

Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol werden im Verhältnis 25:24:1 gemischt und der zu reinigenden Probe wird im Volumenverhältnis 1:1 diese PIC-Lösung zugesetzt. Vor der Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13000 rpm, die zur Phasentrennung führt, muß das Gemisch gut geschüttelt werden.. Die Interphase enthält die Proteine, die wässrige obere Phase die DNA, die deshalb einfach mit einer Pipette abgenommen werden kann. Nach Zugabe eines etwas kleineren Volumens Wasser kann der Extraktionsschritt wiederholt werden. Mit einer anschließenden Ethanol-fällung werden verbleibende Phenolreste aus der Lösung entfernt.

#### 2.2.10.6 Ethanol-fällung

Die DNA haltige Lösung wird mit 1/10 Volumenanteil Natriumacetat (3 M, pH 5,5) und dem 2-3 fachen 100 % Ethanol versetzt. Nach 15 min bei -80°C wird das Präzipitat durch eine Zentrifugation (30 min, 4°C, 14000 rpm) abgetrennt. Es kann ein weiterer Waschschriff mit 70 % (v/v) Ethanol angeschlossen werden. Danach wird das Pellet im Wasserstrahlvakuum getrocknet und die gewonnene DNA in einem angemessenen Volumen deionisiertem Wasser aufgenommen.

#### 2.2.10.7 Ligation

Bei der Ligationsreaktion wird durch die DNA-Ligase zwischen dem 3'-OH und dem 5'-Phosphat zweier Nukleotide eine Phosphodiesterbindung ausgebildet. Während die E.coli-Ligase nur die Verknüpfung von Nukleotiden an kohäsiven komplementären Enden katalysieren kann, ist die aus dem Bakteriophagen T4 isolierte Ligase zusätzlich in der Lage zwei stumpfe Enden (blunt ends) zu ligieren.

Die Ligation der PCR Produkte erfolgt in einem Volumen von 10 µl mit 5 µl 2x Rapid Ligation Buffer (Promega), 1 µl T<sub>4</sub> Ligase [3U/µl] (Promega), 50 ng linearisiertem Vektor pGEM-T Easy (Promega) und 50 -100 ng Insert durch Inkubation für 1-3 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C.

#### 2.2.10.8 Transformation

Ansatz: 5 µl Plasmid DNA  
210 µl DH5α Zellen

Inkubation: 20 Minuten bei 4°C  
heat shock: 90 Sekunden bei 42°C

Inkubation: 1ml SOB Medium  
1 Minute bei 4°C (auf Eis)  
1 Stunde bei 37°C (liegend)

Zentrifugation: 20 sec. bei 13.000 rpm  
1 ml Überstand abnehmen und Pellet in restlichen Überstand resuspendieren  
Suspendat auf LB Amp Platten ausstreichen

Inkubation: Bei 37°C über Nacht

#### 2.2.11 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakteriensuspension

Puffer P1: 50 mM Tris-HCl (pH 8)  
10 mM EDTA  
100 µg/ml RNase A

Puffer P2: 200 mM NaOH  
1% SDS

Puffer P3: 3 M KOAc (pH 5,5)

Ein alkalischer pH-Wert bewirkt in Gegenwart von SDS die Denaturierung von Proteinen sowie der DNA. Dieses Prinzip der alkalischen Lyse wird zur Präparation von Plasmid DNA aus Bakteriensuspensionen genutzt. Eine anschließende Neutralisierung bewirkt dann die

unspezifische Rehybridisierung der chromosomalen DNA, die dann, ebenso wie bakterieller Zelldebris als Aggregat abzentrifugiert werden kann (Präzipitation mit Kalium). Die Plasmid-DNA, die kleiner und kovalent geschlossen ist, renaturiert und verbleibt in Lösung. So kann sie anschließend durch Ethanolfällung präzipitiert werden.

#### 2.2.11.1 Mini-Präparation

*Nach MN Plasmid DNA Purification User manual Nucleo Spin®Plasmid*

1. Übernachtskultur: 2,5ml LB-Amp.-Medium mit einer Bakterienkolonie animpfen und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubieren.
2. Übernachtskultur 30 Sekunden bei 11.000 g abzentrifugieren und das Medium entfernen
3. Bakterienpellet in 250 µl Puffer A1 resuspendieren
4. Lysieren der Zellen in 250 µl Puffer A2 → Nach Zugabe vorsichtig mischen (invertieren, nicht vortexen!) und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
5. Zugabe von 300 µl Puffer A3 → sofort vorsichtig mischen und 5-10 Minuten bei 11.000 g zentrifugieren
6. Überstand aus Schritt 5 auf das Säulchen geben
7. Zentrifugation für 1 Minute bei 11.000 g
8. Waschen der Silicamembran mit 600 µl Puffer A4
9. Zentrifugation für 1 Minute bei 11.000 g
10. Trocknen der Membran durch erneutes zentrifugieren für 2 Minuten bei 11.000 g
11. Säulchen in neues 1.5ml Eppi stellen
12. Eluieren der DNA durch Zugabe von 50 µl Puffer AE → nach Zugabe 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend für 1 Minute bei 11.000 g zentrifugieren.

#### 2.2.11.2 Midi-Präparation

*nach Qiagen Plasmid Midi Protocol*

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA werden 150 µl des Übernachtsansatzes der Mini-Präparation mit 150 ml LB-Medium<sub>Amp</sub> versetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator aufbewahrt.

Die Bakterienzellen werden für 10 Minuten bei 3500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 4 ml Puffer P1 aufgenommen. Lyse und anschließender Neutralisationsschritt erfolgen wie bei der Minipräparation, nur mit einer Menge von 4ml des jeweiligen Puffers. Die Zentrifugation wird bei einer Temperatur von 4°C und einer Geschwindigkeit von 5000 rpm durchgeführt. Der Überstand wird filtriert und über eine zuvor mit 4 ml QBT-Puffer equilibrierte QIAGEN 100-Säule laufen gelassen. Diese wird mit 2x 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Eluierung der DNA erfolgt durch Zugabe von 5ml Puffer QF. Präzipitiert wird die DNA durch Zusatz von 3,5 ml Isopropanol, nachfolgendes Mischen und Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 Minuten. Nach Waschen des Pellets mit 70% Ethanol für 10 Minuten bei gleicher Geschwindigkeit, erfolgt die Trocknung der DNA in der Speed Vac. Diese wird in 200 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.2.12 Sequenzierung**

Sequenzierungen werden bei der Firma MWG durchgeführt. Verwendet wird das Sequenzierverfahren nach Sanger (1977), welches auf der Kettenabbruchmethode beruht. Nach der Bindung eines spezifischen Oligonukleotid-Primers an die zu sequenzierende Matrizen-DNA, beginnt die Sequenase, eine modifizierte T7-DNA-Polymerase mit der Synthese des Komplementärstranges. Hierbei werden Desoxynucleotide (dNTPs) an das 3'-Ende des Primers angehängt. Die Synthese-Reaktion wird durch den Einbau von di-desoxy-Nukleotiden (ddNTPs), denen die für die weitere Kettenverlängerung notwendige 3'-OH-Gruppe fehlt terminiert. Es wird eine Population von teilweise synthetisierten DNA-Molekülen gebildet, die durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden können. Da jedes der terminierenden ddNTPs mit einem anderen Fluorophor verknüpft ist, kann anhand der Fluoreszenz-Farbe der jeweiligen Bande ein Nukleotid zugeordnet und somit die Abfolge der Nukleotide in der DNA-Sequenz ermittelt werden.

### **2.2.13 Restriktionsverdau**

Restriktionsendonucleasen erkennen je nach Spezifität vier bis acht Basenpaare in einem DNA-Strang. Unter den richtigen Pufferbedingungen schneiden sie nur genau an dieser Zielsequenz und spalten dort die DNA.

Durch diese charakteristische Erkennungssequenz ermöglichen sie die Nutzung des sequenzspezifischen Verdaus von DNA für analytische und präparative Zwecke.



Für den analytischen Restriktionsverdau setzt man etwa 0,2 bis 1 µg DNA ein, da die Nachweisgrenze für Ethidiumbromid im Agarosegel bei 10-20 ng liegt, größere Mengen DNA hingegen unklare Banden liefern. Die Enzymmenge liegt bei circa 1-2 U Enzym pro µg DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer und hängt von den Eigenschaften des Restriktionsenzym ab. 1 U ist die Menge Enzym, die 1 µg DNA (mit 1-2 Restriktionsstellen für das Enzym) bei der angegebenen Reaktionstemperatur (in der Regel 37°C) in 1 h spaltet. Wegen des im Lagerungspuffer enthaltenen Glycerins, das ein Volumen von 10 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten sollte, richtete sich auch das Volumen des Reaktionsansatzes nach der Menge eingesetzten Enzyms, liegt aber in Anbetracht des Fassungsvermögens der Gelfaschen bei etwa 20 µl.

#### 2.2.14 Gelelektrophorese

1x TBE Puffer:	90mM Tris/Borsäure (pH 8.0) 2mM EDTA (pH 8,0)
Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg/ml
6x Auftragspuffer:	0,25% Xylencyanol FF 0,25% Bromphenolblau 30% Glycerin
Längenstandard:	100 ng/µl λ DNA/Eco RI/Hind III (MBI Fermentas)

In einem 1 % Agarosegel erfolgt die Auftrennung der Restriktionsfragmente

Eine entsprechende Menge Agarose (1%) wird in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit 5 µl Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung versetzt. Die Lösung wird in den Träger der Elektrophoresekammer gegossen, wo sie erstarrt. Die Proben werden mit 6x Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Zur Größenbestimmung und Abschätzung von DNA-Konzentrationen werden 5 µl Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 80 V für ca. 3 Stunden.

Das Gel wird kurz mit Wasser gespült und dann 25 Minuten in Denaturierungslösung bei Raumtemperatur geschwenkt. Kurz in Wasser gespült, wird es anschließend für weitere 25 Minuten in der Renaturierungslösung auf dem Schüttler inkubiert.

### 2.2.15 Whole mount *In Situ*-Hybridisierung (WISH)

Die *In Situ*-Hybridisierung ermöglicht die Lokalisation sowohl von DNA-, als auch von RNA-Sequenzen direkt im biologischen Präparat.

Eine Nukleinsäuresequenz, die als Sonde dienen soll, wird durch den Einbau einer spezifischen Erkennungssequenz markiert. Damit die Nukleinsäuren einzelsträngig vorliegen, wird die Sonde vor Einsatz durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Während der anschließenden Hybridisierung binden Einzelstränge der Sonde an komplementäre Sequenzen des biologischen Materials. Diese Bindungen können in Abhängigkeit von unterschiedlichen Markierungsmöglichkeiten sichtbar gemacht werden. Neben der Digoxigeninmarkierung, welche in dieser Arbeit Anwendung gefunden hat, können die Sonden außerdem radioaktiv oder mit Fluoreszenz markiert werden. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden ganze Embryonen präpariert und in so genannten siebartigen „Körbchen“ durch die Reihe unterschiedlicher Lösungen geführt. Ein Korb besteht aus einem 1,5 ml Schraubdeckelröhrchen, dessen Boden durch ein Netz ersetzt wurde. (Weisheit, 2002)

### 2.2.16 *In situ*-Hybridisierung (ISH) mit Digoxigenin (DIG) –Sonden

Das pflanzliche Steroid Digoxigenin, wird an Nukleotide gekoppelt, enzymatisch (Digoxigenein-11-UTP beziehungsweise Digoxigenein-11-dUTP) in RNA oder DNA eingebaut. Der Nachweis erfolgt über ein Signal, welches an einen Anti-Digoxigenin-Antikörper gekoppelt ist.

#### 2.2.16.1 Sondenherstellung: In vitro Transkription

200 ng	cDNA
2µl	+ DIG-NTPs
2µl	+ 10xTranskriptionspuffer
2µl	+ Polymerase
ad 20µl DEPC H <sub>2</sub> O	

Inkubation: 2 Stunden bei 37°C

Nach 2 Stunden dem Ansatz hinzufügen:

1µl	DIG-NTPs
1µl	10xTranskriptionspuffer
1µl	Polymerase
ad 30µl DEPC- H <sub>2</sub> O	

Inkubation: 1 Stunde bei 37°C

Anschließend erfolgt eine Fällung der RNA

Transkriptionsprodukt  
 1,5µl EDTA 0,4M  
 3,75 µl LiCl 4M  
 mischen  
 100 µl 100% EtOH  
 Inkubation: über Nacht bei -20°C  
 Zentrifugation: 45 Minuten bei 13.000 rpm (4°C)  
 50µl DEPC-H<sub>2</sub>O  
 5µl LiCl (4M)  
 150 µl 100% EtOH  
 Inkubation : 1 Stunde bei -20°C  
 Zentrifugation: 30 Minuten bei 13.000rpm (4°C)  
 ⇒ Pellet in 25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O lösen

## 2.2.16.2 Ablauf der ISH

### 1.Tag

- in Organkulturschale
- Keimscheiben in kaltem 100% MeOH auswählen und in Korb überführen

#### Weitere Schritte durch Umsetzen des Korbes

- in 24 Well Platte
  - auf Eis
    - 5 min 70% MeOH/PBT
    - 5 min 70% MeOH/PBT
    - 2 x 5 min PBT
  - bei RT
    - Proteinase K/PBT 10µg/ml 5, 10 oder 20 min
    - 2 x 5 min PBT
    - 20 min 0,2% Glutaraldehyd/PBT (8µl 25% G./ml PBT)
    - 2 x 5 min PBT
    - 5 min PBT/Hybemix 1+1
    - 5 min Hybemix

- in Kunststoffgefäß mit Schraubdeckel ( z.B. Bibby Sterilin Gefäße)

### **Prähybridisierung**

- 70° C
- mind. 60 min Hybemix 900µl
  - nach ca. 60 min 100µl Hybemix + 1µl Sonde  
(ca. 0,4µg markierte RNA/µl) RNA 5 min bei 95°C in  
PCR - Maschine denaturieren)

### **Hybridisierung**

- Hybemix mit Sonde zu 900µl Hybemix geben und über Nacht  
inkubieren (Hybridisieren)

## **2.Tag**

### **Herauswaschen der freien RNA**

- in Schraubdeckelgefäß
- 70°C
- Hybemix vorwärmen auf 70°C
  - Gefäß mit Sonde bei -20°C lagern (für evtl. spätere Kontrolle)
- 2-3 x in Hybemix waschen
- 3 x 30 min Hybemix (je 2ml)
  - max. 15 min Hybemix/MABT 2ml+2ml

### **Blockieren und AK - Reaktion**

- in 24 Well-Platte auf Schaukel
- RT
- 3 x 10 sek MABT
  - 2 x 30 min MABT
  - 60 min MABT + 2% BBR (Boehringer Blocking Reagenz)
  - 60 min MABT + 2% BBR + 20% NGS (Ziegeneserum)
- 4°C
- über Nacht: MABT + 2% BBR + 20% NGS + AP-DIG 1:2000
  - mit Parafilm abdecken

### 3.Tag

#### Herauswaschen des freien Antikörpers und Farbreaktion

-80ml Trog auf Schaukel

- 3 x 10 sek in MABT

- 7 x 30 min in MABT

- 4 x 10 min in NTMT (pH 9,5)

-Petrischale (5cm)

- Korb in NTMT setzen und Keimscheiben in Petrischale

-Organkulturschale

- 60 min-7 Tage BM-Purple (dd H<sub>2</sub>O außen =  
feuchte Kammer)

RT

- im Dunkeln entwickeln

#### 2.2.16.3 Eindecken

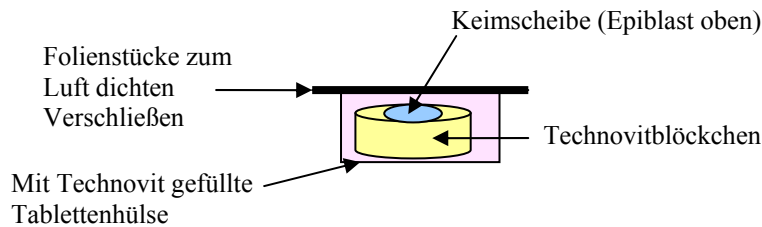
Zur Photodokumentation werden die Keimscheiben mit 1x Mowiol unter Deckgläschen fixiert. Dabei sollte eine Kompression vermieden werden, um die Auswertung anschließend folgender Schnitte zu erleichtern. Aus diesem Grund erfolgt nur eine kurzzeitige Lagerung in Mowiol, im Idealfalle eine direkte Einbettung.

#### 2.2.16.4 Technovit-Einbettung von jungen Keimscheiben (KS) nach WISH

1. Objektträger direkt in 90% Methanol legen
2. Deckglas vorsichtig (mit Präpariernadeln) anheben, so dass Alkohol langsam zum Präparat dringt
3. Nach evtl. Einwirkzeit Deckglas abheben
4. Keimscheibe 10-15 Minuten in 100% Methanol inkubieren (in 4er Well Platte)
5. Keimscheibe 1,5-2 Stunden in Technovit –Infiltrationslösung inkubieren
6. Metallblock im Eisbad dient als Unterlage für Tablettenhüllen
7. Vorbereitete Tiefziehfolie mit Einbettmedium füllen
8. KS hinzu pipettieren und auf dem Technovitblöckchen ausrichten
9. Tablettenhülle bis über den Rand füllen und mit Folienstücken luftdicht abdecken
10. Bei 4°C mind. über Nacht aushärten lassen (Eisbad im Kühlschrank)

Infiltrationslösung: 100ml Basislösung  
+0,6 g Härter I

Einbettmedium : 9ml Infiltrationsmedium  
+300 µg Härter II  
(Verhältnis 30:1)



**Abb. 10 Einbettung von Keimscheiben**

## 2.2.17 Zellkultur

### 2.2.17.1 Transfektion von Säugerzellen

Animpfen der Zellen für die Transfektion am Vortag:

In Standardmedium: HAM's F10 + 0,5% Pen/Strep + 10% FCS

1. CHO Zellen mit 4 ml Standardmedium waschen
2. Medium abnehmen
3. 1ml Cell Dissociation Solution auf die Zellen geben
4. Inkubation: 10 min. bei 37°C
5. Zellen vom Flaschenboden abklopfen
6. Zellen in 5 ml frischem Medium resuspendieren und durch häufiges Pipettieren mit der abgeflammt Glaspipette vereinzeln.
7. In 15ml Falconröhrchen 10 min bei 10000 rpm zentrifugieren
8. Zellen in der Neubauer Zählkammer auszählen
9.  $0,5-1 \times 10^5$  Zellen in 2ml Medium (pro well) ansetzen
10. Inkubation über Nacht bei 37°C; 5% CO<sub>2</sub>

### Transfektion:

Metafectene-Verdünnung: 2,5 µl Metafectene Stammlösung  
20 µl serumfreies HAM's F10 medium

DNA-Verdünnung: 0,5 µl DNA einsetzen

Komplexbildung: 20 µl Metafectene Verdünnung  
 20 µl DNA Verdünnung  
 → durch auf- und abpipettieren gut mischen  
Inkubation: 20 Minuten bei Raumtemperatur

1. Zellen mit frischem serumfreien Medium waschen
2. 40 µl der Transfektionslösung (Metafectene + entsprechende DNA) zu 2 ml Medium pipettieren.
3. Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.
4. Mediumwechsel (HAM's F10+ 10 % FCS) nach 3 Stunden
5. Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>;
6. Abnahme des Überstandes zur Kontrolle nach 24 bzw. 48 Stunden.

#### 2.2.17.2 Kultur von Hypoblastzellen

Hypoblastzellen werden direkt von der frischen Keimscheibe abgenommen (siehe Embryonenkultur) und zunächst in ca. 50 µl Tropfen des Standardmediums (Ham's F10+ 20% FCS) unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) über Nacht kultiviert. Sind die Zellen adhiert, kann der Tropfen vergrößert, bzw. die Schale mit Medium gefüllt werden.

#### 2.2.18 Western-blotting

Die genomischen DNA Fragmente können mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran übertragen (geblottet) werden.

Diese Methode ermöglicht es, DNA dauerhaft auf einer Membran zu fixieren und anschließend durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne Fragmente spezifisch nachweisen zu können.

#### 2.2.19 SDS PAGE (Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese)

(Harlow/Lane "Antibodies, a laboratory manual"1988)

Trenngel 10%ig

3,3 ml	30% Acrylamidlösung
2,5 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
0,1 ml	10% SDS
0,1 ml	10% APS (Gewichtsprozent in dd H <sub>2</sub> O)

0,004 ml	TEMED
ad 10 ml dd H <sub>2</sub> O	

### Sammelgel

1 ml	30% Acrylamidlösung
0,75 ml	1 M Tris (pH 6,8)
0,06 ml	10% SDS
0,06 ml	10% APS (Gewichtsprozent in dd H <sub>2</sub> O)
0,006 ml	TEMED
ad 6 ml dd H <sub>2</sub> O	

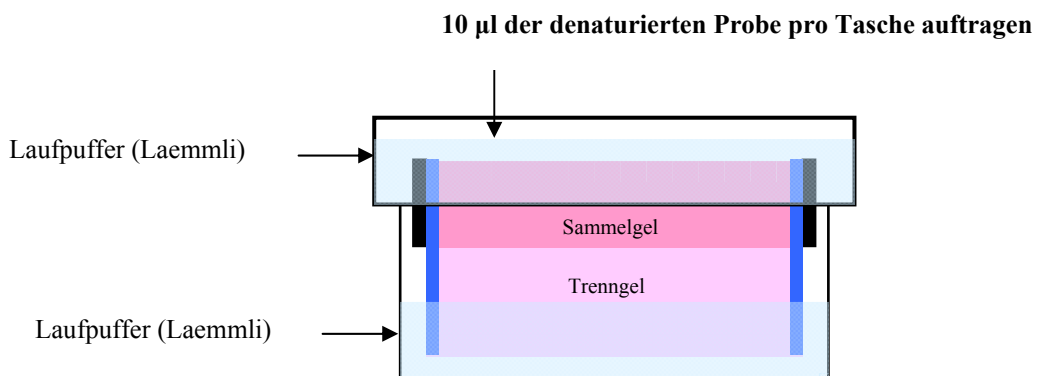
### Die Gelelektrophorese:

Denaturierung der Proben: Inkubation bei 70°C für 10 Minuten, anschließend kurz abzentrifugieren und 10 µl des Überstands auftragen.

Marker: Seeblue (Invitrogen)

Lauf: Sammelgel 80 V

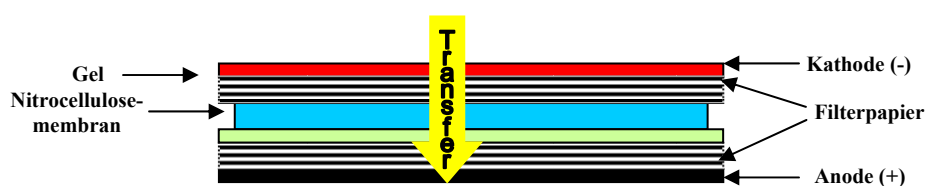
Trenngel 120 V



**Abb. 11 SDS Gel**

### 2.2.19.1 1.2.4 Blotting

#### 2.2.19.1.1 Blotaufbau



**Abb. 12 Aufbau des Blots**



Spannung 43 mA pro Gel

Blotdauer mind. 1 Stunde

Gelfärbung: Zur Kontrolle Gel 20 Minuten in Coomassie Blue färben, anschließend kurz in Entfärber und dann in Wasser entfärben (über Nacht).

Zur Aufbewahrung Gel in Folie trocknen.

Blotfärbung: Die Nitrocellulose zunächst über Nacht in PBS/Tween (0,05% Tween in DEPC PBS) inkubieren.

Kurz in 1x Ponceau Färbelösung schwenken (5-10 Minuten) und in H<sub>2</sub>O entfärben, bis die Banden gut zu erkennen sind.

Membran photographieren

Blot kann über Nacht in PBS bei 4°C gelagert werden.

#### 2.2.19.1.2 Lumi Light<sup>plus</sup> Western Blotting (Kit für Mouse/Rabbit von Roche)

Lösungen:

TBST: 50 mM TRIS  
150 mM NaCl  
0,05% TWEEN  
pH auf 7,5 einstellen

Blockierungslösung: 1g Blockingreagenz in 100ml TBST lösen

Kontrollen: Dot-Blot: (zur Kontrolle der Erst- und Zweitantikörperwirkung)

Verdünnungen (1:1000 in PBS) des Erst-, sowie Zweitantikörpers werden direkt auf einen Streifen Nitrocellulose getropft (ca. 5 µl)

Kontrollstreifen: Blotstreifen halbieren und jeweils einen mit dem entsprechenden und die andere Hälfte mit einem „falschen“ Antikörper behandeln.

1. Membranstreifen für ca. 1 Stunde unter Schütteln in 1% Western Blocking Lösung inkubieren.
2. Primäre Antikörperlösung in Blocking-Lösung verdünnen:

Anti-myc-Antikörper (für Dkk ):	1:2500 (6 µl in 15ml)
Anti-Flag-Antikörper (für M-cer-like):	1:1000 (10 µl in 10ml)
Anti-HA1-Antikörper (für cerberus):	1:1000 (10 µl in 10ml)

3. Membranstreifen in der entsprechenden Antikörperlösung 1 Stunde schüttelnd inkubieren.
4. Membran kurz mit TBST spülen, dann 4x jeweils 2 Minuten mit TBST waschen.
5. Sekundären Antikörper in Blocking Lösung verdünnen  
Anti mouse Ig-POD (= polyklonaler Antikörper vom Schaf, Fab-Fragment konjugiert mit Meerettichperoxidase (POD)): 1:1000
6. Membranstreifen in der entsprechenden Antikörperlösung 30 Minuten in der sekundären Antikörperlösung schüttelnd inkubieren.
7. Membran kurz mit TBST spülen, dann 4x jeweils 2 Minuten mit TBST waschen.
8. Färbelösung ansetzen: Lumi Light<sup>Plus</sup> und Peroxidase Lösung 1:1 mischen.
9. Überschüssige Flüssigkeit auf Filterpapier austreifen und Blotstreifen in Färbelösung inkubieren (in Petrischale, Streifen müssen bedeckt sein! → kein Austrocknen).
10. Membranen aus der Lösung nehmen und auf einer Glasplatte entsprechend der Blotreihenfolge anordnen.
11. Mit Folie überziehen.
12. Detektion des Signals über Kamera in Epi Chemi<sup>3</sup> Darkroom.

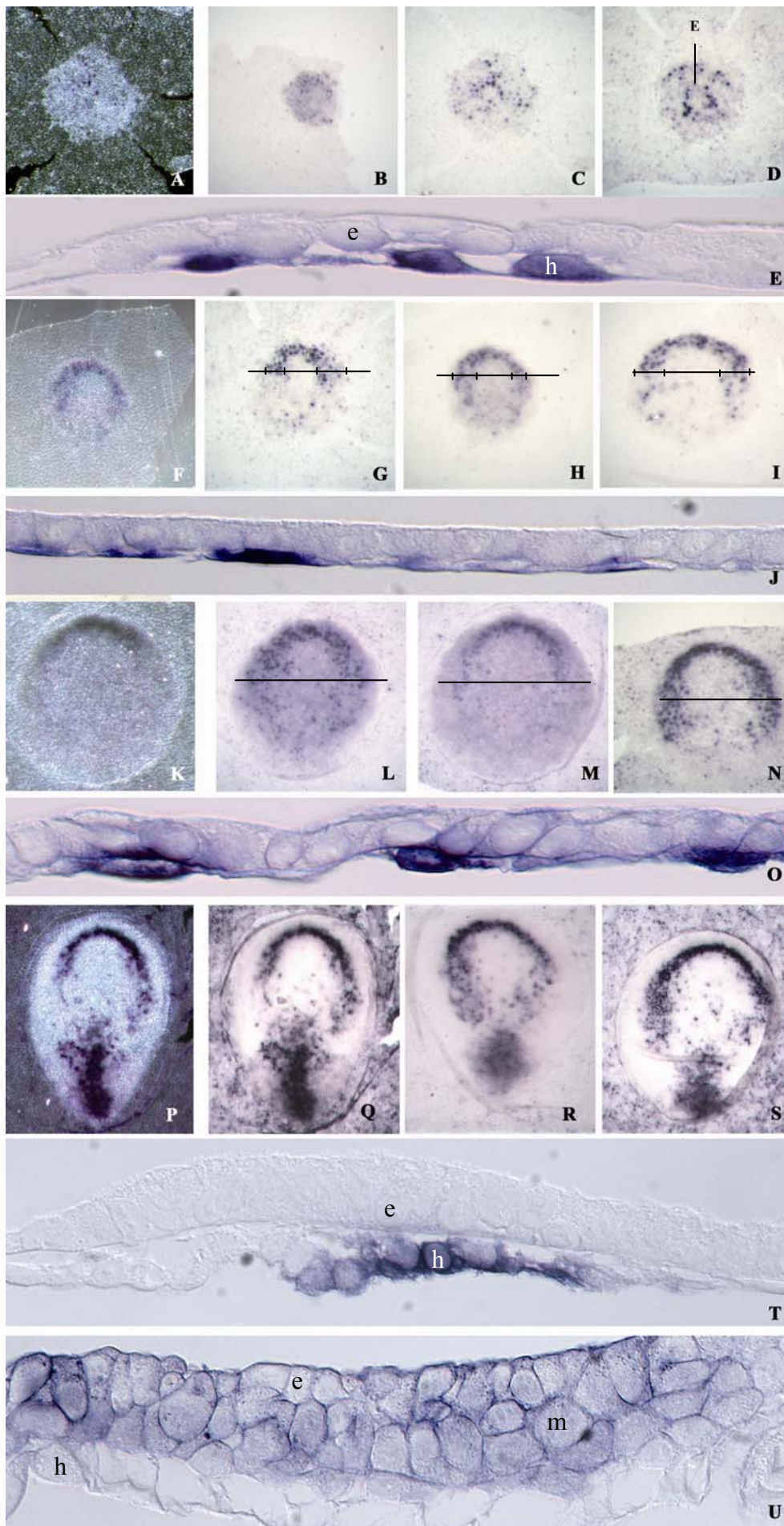
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung und Variabilität von mRNA-Expressionsdomänen am Beginn der Gastrulation

Um Entwicklung und Variabilität der Gen-Expressionsmuster am Beginn der Gastrulation im Verhältnis zu den sich entwickelnden Körperachsen möglichst umfassend beschreiben zu können, beginnt die Darstellung der Expressionmuster im Folgenden mit dem Stadium 0, d.h. in dem Stadium, in dem die morphologische Differenzierung der Körperachsen noch nicht zu erkennen ist, aber unmittelbar bevorsteht. Die Beschreibungen enden mit dem Stadium 3, in dem die Körperachsen durch die Entstehung der Mesodermzellen im Primitivstreifen unwiderruflich festgelegt sind. Im Sinne einer besseren Vergleichbarkeit von variablen Expressionsdomänen wurden die Embryonen eines Stadiums nach dem Grad des für das betreffende Stadium erreichten morphologischen Merkmals in "jüngere" und "ältere" Stadien sortiert. Einzige Ausnahme stellt die Sortierung der Entwicklungsreihe für die Expression des *Dkk1*-Gens dar, bei der auf die unterschiedliche laterale Ausprägung des Expressionsmusters Rücksicht genommen wurde: Im Stadium 1 und 2 werden dadurch Beispiele für asymmetrische und symmetrische Expressionsdomänen verdeutlicht (s.u.). Eine Dunkelfeldaufnahme zeigt bei jeder der 4 Entwicklungsreihen für jedes Stadium neben den verschiedenen Beispielen der Expressionsdomänen exemplarisch die morphologischen Merkmale eines jeden Stadiums.

#### 3.1.1 mRNA-Expression des Signalmolekül-Gens *Dkk1*

Im Stadium 0 beginnt die Expression von *Dkk1* in etwa 15 Zellen, die breit auf die Keimscheibe verteilt sind und somit eine nur unscharf abgrenzbare Expressionsdomäne bilden. In manchen Embryonen des Stadiums 0 sind auf diese Weise bereits 25 Zellen über die gesamte Keimscheibe verteilt (vgl. Abb.13 B-D); es entsteht ein mosaikartiges Bild von stark und weniger stark bzw. nicht gefärbten Zellen. Histologischen Schnitten zufolge beschränkt sich die *Dkk1*- Expression auf den Hypoblasten (vgl. Abb.13 E); die positiven Zellen zeigen innerhalb des Zellverbands des Hypoblasten unterschiedlich starke *Dkk1* Expression.



**Abb.13** Dickkopf 1 Expression in Keimscheiben des Kaninchens vor und während der frühen Gastrulation: Die ISH wurde an Embryonen der Stadien 0 (B-D), 1 (G-I), 2 (L-N) und 3 (Q-S) durchgeführt. Histologische Schnitte sagittal aus der Mitte der Keimscheibe (E, J, O, T und U) ermöglichen die Zuordnung der Genexpression zu Hypoblast, Epiblast oder Mesodermzellen des Primitivstreifens. e: Epiblastzelle; h: Hypoblastzelle; m: Mesodermzelle

Dorsale Aufsichten von Embryonen des Stadiums 1 unter Hellfeldbeleuchtung zeigen eine spangenförmige *Dkk1*-Expressionsdomäne entlang des anterioren Keimscheibenrandes, die größtenteils mit der Ausdehnung des vorderen Randbogens (vgl. Abb. 5) übereinstimmt (vgl. Abb.13 G-I). Mit zunehmender Größe der gesamten Keimscheibe steigt auch die Zahl der *Dkk1*-exprimierenden Zellen, sodass die spangenartige Expressionsdomäne ca. 35 Zellen umfasst. Die Expressionsdomäne *Dkk1*-positiver Zellen setzt sich an der anterioren Grenze zu extraembryonalen Zellen durch einen schmalen Zellsaum von *Dkk1*-negativen Zellen deutlich gegen das angrenzende extraembryonale Gewebe ab.

Zusätzlich zur Lage der *Dkk1*-positiven Zellen am morphologisch nachweisbaren anterioren Pol der Keimscheibe, fällt bei vielen Embryonen eine lateral unterschiedliche Ausprägung der Expressionsdomäne auf (vgl. Abb.13 G und H). Diese Rechts-links Asymmetrie kann an zwei Merkmalen erkannt werden, die im folgenden mit "unscharf begrenzt" und "breit" bezeichnet werden sollen: 1. Das Merkmal "unscharf begrenzt" ist dadurch definiert, dass die spangenartige Domäne an ihren beiden Enden unterschiedlich auslaufen kann, d.h. dass die Expressionsdomäne häufig an ihrem einen Ende eine scharfe Grenze zu einem laterokaudal angrenzenden, *Dkk1*-negativen Areal bildet (vgl. Abb.13 G, auf Höhe der waagerechten Linie rechts), während das andere Ende der Domäne durch zunehmend weiter verteilt liegende Zellen nur unscharf von dem laterokaudal angrenzenden *Dkk1*-negativen Areal abgegrenzt werden kann (vgl. Abb.13 G, auf Höhe der waagerechten Linie links). Das unscharf begrenzte Ende der spangenartigen Domäne ist in manchen Embryonen auf der rechten Seite der Keimscheibe (vgl. Abb.13 G), in anderen auf der linken Seite (vgl. Abb.13 H) und in wiederum anderen Embryonen auf beiden Seiten der Keimscheibe zu finden (vgl. Abb.13 I). Wie oft das unscharf begrenzte Ende der *Dkk1*-Domäne im Stadium 1 auf der linken und auf der rechten Seite der Keimscheibe auftritt, ist in absoluten Zahlen der hier untersuchten Embryonen unten zusammengefasst (Abb. 14 A). 2. Das Merkmal "breit" betrifft den mittleren Abschnitt der Expressionsdomäne, indem dieser Abschnitt in seinem Verlauf eine unterschiedliche anterior-posteriore Ausdehnung ("Breite") haben kann. Dabei fällt der in diesem Sinne als "breit" zu bezeichnende Teil des mittleren Abschnittes meist, aber nicht

immer mit der Seite der Expressionsdomäne zusammen, die nach kaudal eine unscharfe Begrenzung aufweist. Die Häufigkeit der asymmetrischen Ausrichtung des Merkmals "breit" wurde deshalb unabhängig vom Merkmal "unscharf begrenzt" bestimmt (Abb. 14 B).

Histologische Schnitte zeigen die Zuordnung aller in diesem Stadium beobachteten *Dkk1*-exprimierenden Zellen, unabhängig von ihrer asymmetrischen Verteilung in der Keimscheibe zur Schicht des Hypoblasten (vgl. Abb.13 J).

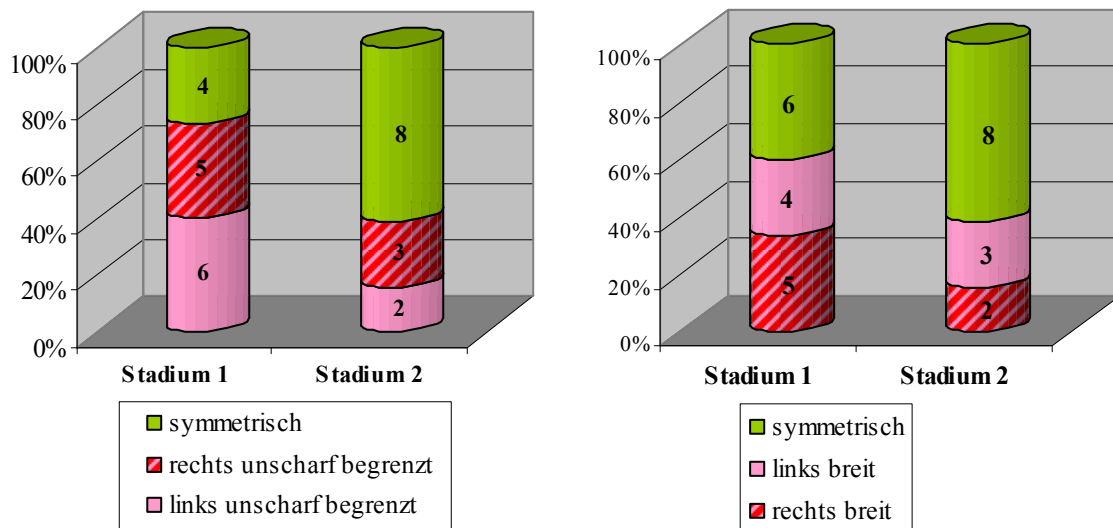
Auch in Stadium 2 ist die spangenförmige *Dkk1*-Expressionsdomäne, nun aus etwa 40 Zellen bestehend, entlang des vorderen Randbogens zu finden (vgl. Abb.13 K-N). In den meisten Embryonen ist das Expressionsareal so verbreitert, dass das zur Mitte der Keimscheibe liegende, von der Expressionsdomäne spangenartig umfasste Areal *Dkk1*-negativer Zellen kleiner ist als im Stadium 1 (vgl. Abb.13 N). Der anterior liegende *Dkk1* -negative Saum hingegen umfasst weiterhin etwa 1-3 Zellreihen. Auch im Stadium 2 tritt bei manchen Embryonen die für das Stadium 1 bereits beschriebene Asymmetrie in der spangenförmigen Expressionsdomäne auf (vgl. Abb.13 L und M), jedoch ist eine Lateralität seltener zu erkennen (Abb. 14 A, B). Histologische Schnitte zeigen auch in diesem Stadium 2 eine eindeutige Zuordnung der *Dkk1*-exprimierenden Zellen zu Schicht des Hypoblast. (vgl. Abb.13 O).

In Embryonen des Stadiums 3 ist die zuvor geschilderte spangenartige Expressionsdomäne in ihrem mittigen Abschnitt schmäler als in ihrer lateralen Ausdehnung (vgl. Abb.13 P-S). Beide Spangenenden zeigen nun eine Verbreiterung, die durch weiter verstreut liegende *Dkk1*-positive Zellen verursacht wird und so eine laterale Asymmetrie häufig nicht zu erkennen ist. Diese ursprüngliche, anteriore Expressionsdomäne wird in Embryonen des Stadiums 3 von einer weiteren, posterior liegenden Expressionsdomäne ergänzt, die auch im frühen Stadium 3, in dem der Primitivstreifen noch kurz ist, auf die posteriore Hälfte des Primitivstreifens beschränkt ist. In einigen Embryonen des Stadiums 3 ist diese Domäne eher schmal (vgl. Abb.13 Q), verbreitert sich in anderen jedoch mit zunehmendem Wachstum des Primitivstreifens. Histologischen Schnitten zufolge liegen die *Dkk1*-exprimierenden Zellen in der anterioren spangenförmigen Domäne ausschließlich im Hypoblasten (vgl. Abb.13 T); im posterioren Areal liegen sie in Epiblast und in den entstehenden Mesodermzellen (vgl. Abb.13 U)

### 3.1.1.1 Häufigkeit der asymmetrischen *Dkk1*-Expression

Embryonen der Stadien 0 und 3 zeigen keine wiederkehrende Asymmetrie der *Dkk1*-Domäne und werden deshalb in der quantitativen Auswertung nicht berücksichtigt. In Stadium 1 (n=15) und Stadium 2 (n=13) erfolgt die quantitative Auswertung der lateralen Asymmetrie anhand der beiden oben für die beiden Enden der Spangen-förmigen Expressionsdomäne beschriebenen Kriterien: das Merkmal „unscharf begrenzt“ und das Merkmal „breit“. In Embryonen des Stadiums 1 gibt es mehr Embryonen mit einer asymmetrischen *Dkk1*-Expressionsdomäne als mit einer symmetrischen Expressionsdomäne: Das Merkmal „unscharf begrenzt“ kommt insgesamt 11 mal vor, davon 6 mal auf der linken Seite und 5 mal auf der rechten Seite. Eine symmetrische Expression gibt es bei Anwendung dieses Kriteriums in 4 Embryonen. Unter Betrachtung des Merkmals „breit“ verhält sich bei Embryonen des Stadiums 1 das Verhältnis von asymmetrischer zu symmetrischer Expression ähnlich: 9 Keimscheiben zeigen eine Asymmetrie, 4 mal ist die Spangen-förmige Expressionsdomäne auf der linken Seite "breit" und 5 mal auf der rechten Seite; 6 Keimscheiben haben eine im Bezug auf das Merkmal "breit" symmetrische *Dkk1*-Expressionsdomäne. In 8 der asymmetrisch exprimierenden Embryonen treten die Merkmale „unscharf begrenzt“ und „breit“ auf derselben Seite auf.

Embryonen des Stadiums 2 haben häufiger eine symmetrisch als eine asymmetrisch angeordnete *Dkk1*-Expression. Das Merkmal „unscharf begrenzt“ tritt in 5 Embryonen asymmetrisch auf (2 mal links, 3 mal rechts), während 8 Keimscheiben dieses Kriterium symmetrisch ausbilden. Unter dem Gesichtspunkt „breit“ ist das Verhältnis von Asymmetrie zu Symmetrie das Gleiche: 3 mal erscheint dieses Merkmal auf der linken und 2 mal auf der rechten Seite, 8 Embryonen zeigen hier eine bilaterale Symmetrie. In 2 der untersuchten Embryonen mit asymmetrischer Expression treten beide Lateralitätsmerkmale auf derselben Seite auf.



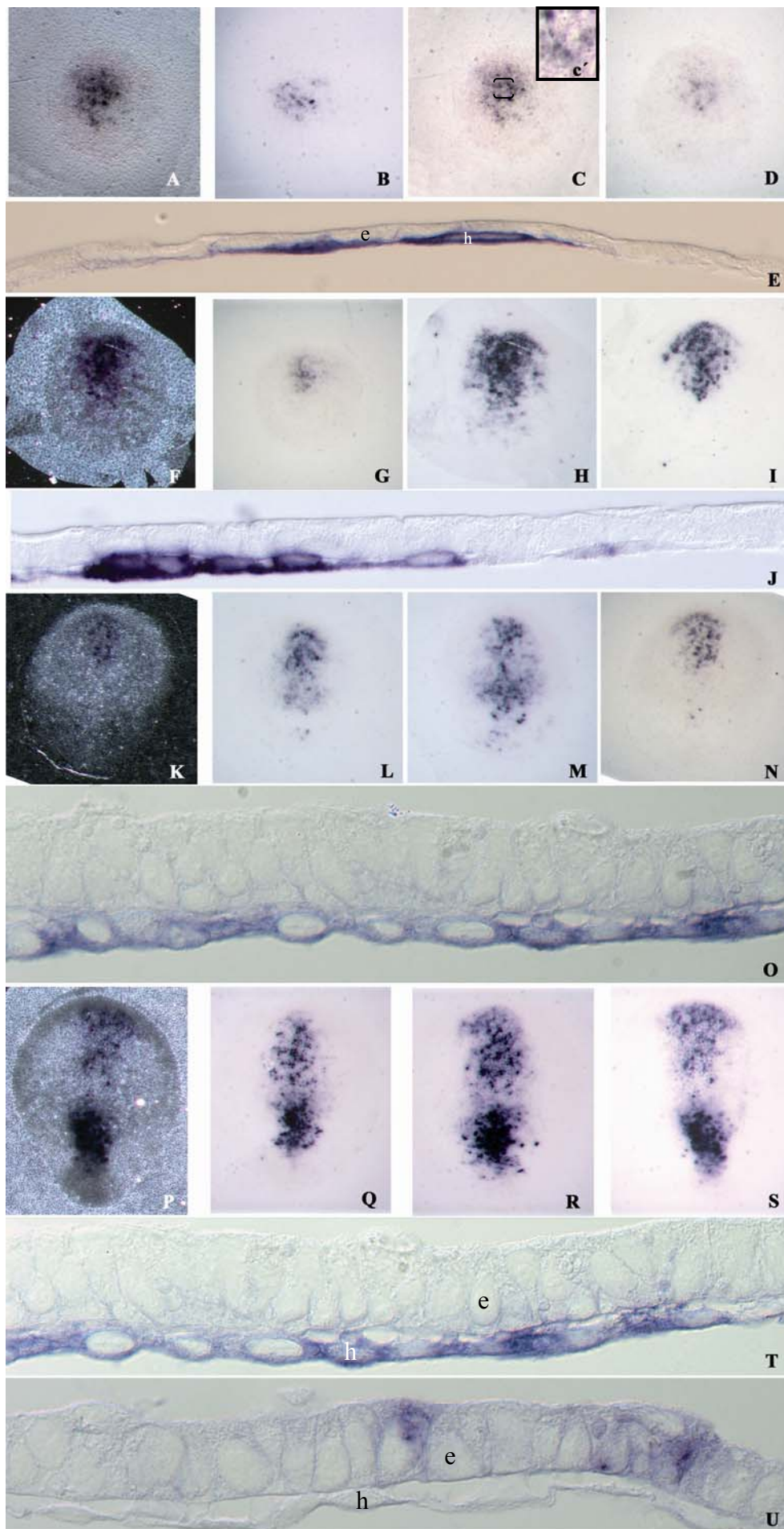
**Abb. 14** Variabilität der asymmetrischen Dkk 1 Expression: Dargestellt ist für Stadium 1 und 2 die Häufigkeit von symmetrischer (grün) oder asymmetrischer Dkk 1 Expression. Abbildung A zeigt die Zuordnung zur linken (links unscharf begrenzt; rot) oder rechten (rechts unscharf begrenzt; rosa) Körperseite des Merkmals unscharf begrenztes Spangenende. Abbildung B zeigt die Häufigkeit für das Asymmetriemerkmal breites Ende auf der linken (links breit; rosa), bzw. breites Ende auf der rechten Seite (rechts breit; rot).

### 3.1.2 mRNA-Expression des Signalmolekül-Gens *Cer1*

Die ersten Anzeichen einer *Cer1*-Expression finden sich wie bei den zuvor beschriebenen Genen bereits im frühen Stadium 0: Einige wenige Zellen im Zentrum der Keimscheibe liegend, bilden die Expressionsdomäne. Innerhalb des Entwicklungsverlaufs hin zu Stadium 1 steigt die Anzahl der *Cer1* exprimierenden Zellen auf etwa 15-20 Zellen an und die Expressionsdomäne nimmt eine exzentrische Position in der Keimscheibe ein (vgl. Dunkelfeldaufnahme in Abb. 15A mit Hellfeldaufnahme derselben Keimscheibe in Abb. 15C). Auffällig ist bereits in diesem Entwicklungsstadium die unterschiedlich starke Anfärbung der Zellen: Intensiv gefärbte Zellen liegen innerhalb des Expressionsmusters abwechselnd neben weniger stark *Cer1*-positiven oder negativen Zellen (vgl. Abb. 15 C'). Histologischen Schnitten zufolge liegen die *Cer1*- positiven Zellen im Hypoblasten (vgl. Abb. 15 E).

Im Stadium 1 hat die Zahl der *Cer1*-exprimierenden Zellen und damit auch die Fläche der Expressionsdomäne im Vergleich zu Stadium 0 meist stark zugenommen (vgl. Abb. 15 H, I); der Vergleich mit Dunkelfeldaufnahmen (vgl. Abb. 15 F) zeigt, dass die Expressionsdomäne nun am anterioren Pol der Keimscheibe liegt. Sie beschreibt dort, ausgehend von einem bogenförmigen anterioren Rand ein longitudinal ausgerichtetes, häufig unregelmäßig





**Abb.15** Cerberus Expressionsmuster in Keimscheiben des Kaninchens vor und während der frühen Gastrulation: Die ISH wurde an Embryonen der Stadien 0 (B-D), 1 (G-I), 2 (L-N) und 3 (Q-S) durchgeführt. C' zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des mosaikartigen Expressionsmusters (markiert in C durch die Klammer). Histologische Schnitte sagittal aus der Mitte der Keimscheibe (E, J, O, T), Schnitt U ist paramedian, seitlich des PS, ermöglichen die Zuordnung der Genexpression zu Hypoblast bzw. Epiblast. e: Epiblastzelle; h: Hypoblastzelle; m: Mesodermzelle

begrenztes Oval, das sich bis etwa zur Mitte der Keimscheibe ausdehnen kann. Zum anterior angrenzenden extraembryonalen Gewebe verbleibt wie bereits bei der *Hex*-Expression (s.u.) in Stadium 1 und 2 ein schmaler Saum von Zellen *Cer1*-negativen Zellen. Die Zellen im anterioren und zentralen Teil der Domäne sind häufig besonders intensiv gefärbt (vgl. Abb.15 H). Innerhalb der longitudinal orientierten Domäne *Cer1*-positiver Zellen, weisen einige Keimscheiben eine rechts-links Asymmetrie auf, die daran zu erkennen ist, dass die Expressionsdomäne entlang dem anterioren Rand der Keimscheibe entweder weiter nach rechts (vgl. Abb.15 H) oder weiter nach links (vgl. Abb.15 I) reicht als der zentrale Teil der Expressionsdomäne.

In Stadium 2 ist der Expressionsbereich weiterhin anterior gelegen: Dieser Bereich ist häufig schmaler und länger als in früheren Stadien, reicht dabei aber nicht ganz an den Keimscheibenrand heran (vgl. Abb.15 K, N). In vielen Zellen ist die Intensität der Expression geringer als in Stadien davor. In einigen Embryonen des Stadiums 2 reicht die Expressionsdomäne bis ins hintere Drittel der Keimscheibe (vgl. Abb.15 M). Histologische Schnitte zeigen auch in Stadium 2 die Zuordnung *Cer1*-positiver Zellen zum Hypoblasten (vgl. Abb.15 O).

In Stadium 3 wird die anteriore, weiterhin longitudinal ausgerichtete Expressionsdomäne regelmäßig von einer posterioren, im anterioren Teil des sich entwickelnden Primitivstreifen liegenden Domäne ergänzt (vgl. Abb.15 P-S). Diese Expressionsdomäne zeichnet sich durch besonders dicht aneinander liegende Zellen aus (vgl. Abb.15 R). Histologischen Schnitten zufolge liegen die *Cer1*-positiven Zellen im anterioren Bereich der Keimscheibe im Hypoblasten (vgl. Abb.15 T); in der posterioren Domäne ist die Expression auf die Mesodermzellen des sich entwickelnden Primitivstreifens beschränkt (vgl. Abb.15 U).

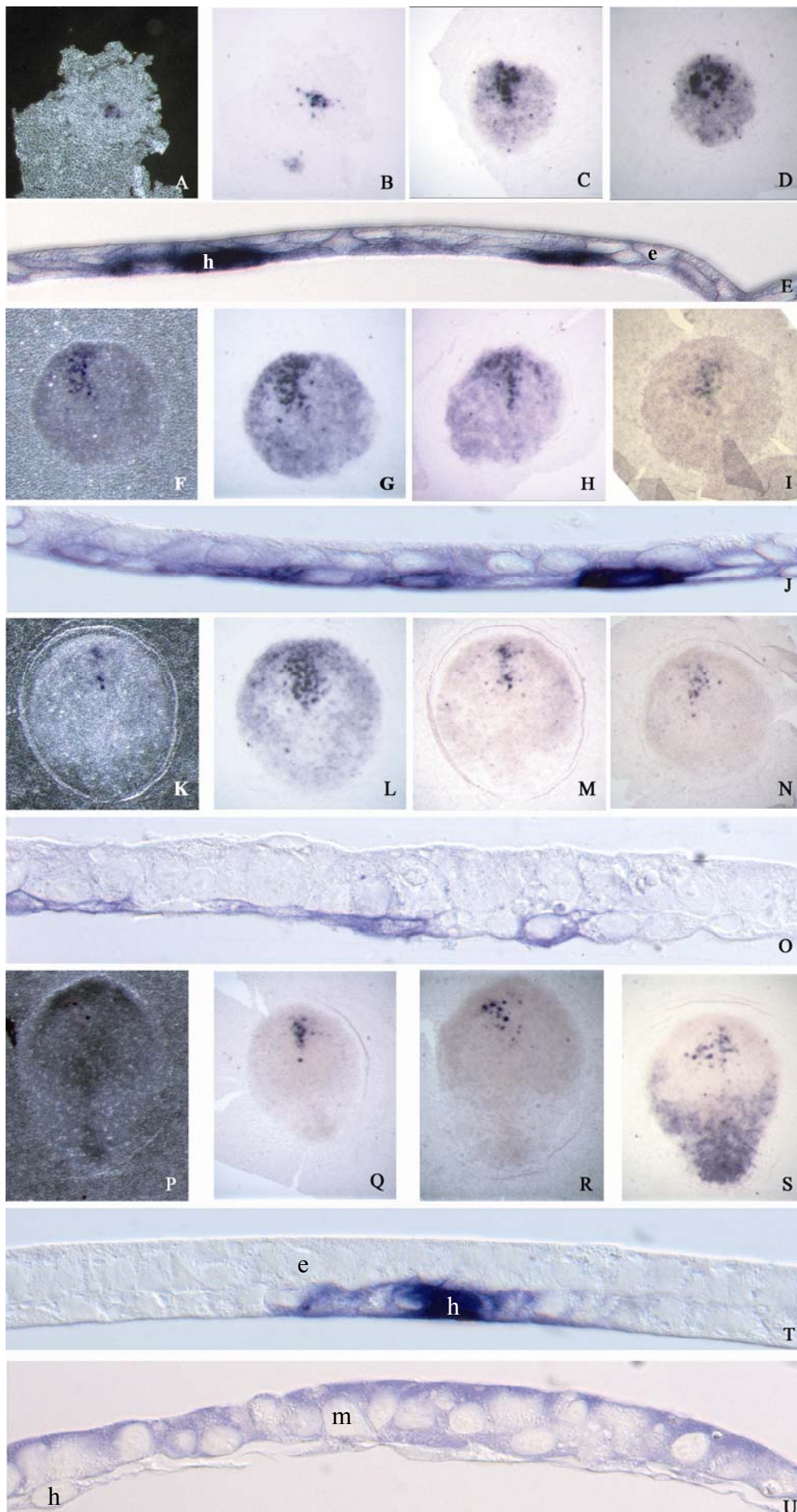
### 3.1.3 mRNA-Expression des Signalmolekül-Gens *Lefty1*

Auch *Lefty1* wird bereits in den frühesten hier untersuchten Entwicklungsstadien exprimiert (vgl. Abb. 16 A-D): Eine aus etwa 10 Zellen bestehende Expressionsdomäne liegt zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung in der Mitte der Keimscheibe. In anderen Embryonen des Stadiums 0, liegen die *Lefty1*-positive Zellen näher an einem Keimscheibenpol, der jedoch zu diesem Zeitpunkt morphologisch noch nicht eindeutig als anterior oder posterior identifiziert werden kann (vgl. Abb. 5). Diese frühe Expressionsdomäne umfasst etwa 15-20 Zellen, die auf der Fläche entweder eines radiär ausgerichteten Ovals (vgl. Abb. 16 D) oder eines schmalen longitudinalen Streifens (vgl. Abb. 16 C) in einem randständigen Drittel der Keimscheibe angesiedelt sind. In dorsalen Aufsichten von Embryonen des späten Stadiums 0 (vgl. Abb. 16 D) grenzen sich die *Lefty1*-positiven Zellen durch ihre intensive Färbung deutlich zu umgebenden Zellen ab. Histologischen Schnitten zufolge liegen *Lefty1*-positive Zellen im Hypoblasten (vgl. Abb. 16 E).

In Stadium 1 hat sich die Expressionsdomäne *Lefty1*-positiver Zellen zu einem longitudinal verlaufenden bis zur Mitte der Keimscheibe reichenden Streifen verlängert. Dieser Streifen umfasst etwa 25-30 Zellen, also kaum mehr als die rundliche Expressionsdomäne des späten Stadiums 0 (vgl. Abb. 16 D). Dieser Expressionsstreifen setzt sich von einem breiteren Areal, das direkt am anterioren Pol ansetzt, zur Mitte der Keimscheibe fort. Im frühen Stadium 1 noch recht breit (vgl. Abb. 16 G), verschmälert sich das Expressionsareal im Laufe der Entwicklung (vgl. Abb. 16 H, I), dabei nimmt der Streifen häufig eine gebogene Form an. Histologische Schnitte zeigen, dass die Expression von *Lefty1* wie im Stadium zuvor im Hypoblasten liegt (vgl. Abb. 16 J).

Im frühen Stadium 2 wird die Expressionsdomäne *Lefty1*-positiver Zellen zunehmend schmaler und lückenhafter. Bilden im frühen Stadium 2 noch etwa 30 Zellen die Expressionsdomäne (vgl. Abb. 16 L), reduziert sich deren Zahl in späten Embryonen des Stadium 2 auf etwa 10 Zellen (vgl. Abb. 16 M, N). Häufig sind die *Lefty1*-positiven Zellen dabei weniger stark gefärbt (vgl. Abb. 16 N). Histologische Schnitte zeigen ebenfalls diese verringerte Intensität der Reaktion der alkalischen Phosphatase. Dennoch ist eine eindeutige Zuordnung der positiven Zellen zum Hypoblasten möglich.

In Stadium 3 zeigt sich ein weiterer Rückgang der Zellzahl der *Lefty1*-Expressionsdomäne im vorderen Abschnitt der Keimscheibe (vgl. Abb. 16 Q, R). Die *Lefty1*-Expression entspricht in



**Abb16** *Lefty1* Expressionsmuster in Keimscheiben des Kaninchens vor und während der frühen Gastrulation: Die ISH wurde an Embryonen der Stadien 0 (B-D), 1 (G-I), 2 (L-N) und 3 (Q-S) durchgeführt. Expression in frühen prägastrulären Stadien des Kaninchenembryos. Histologische Schnitte sagittal aus der Mitte der Keimscheibe (E, J, O, T und U) ermöglichen die Zuordnung der Genexpression zu Hypoblast bzw. Epiblast. e: Epiblastzelle; h: Hypoblastzelle; m: Mesodermzelle

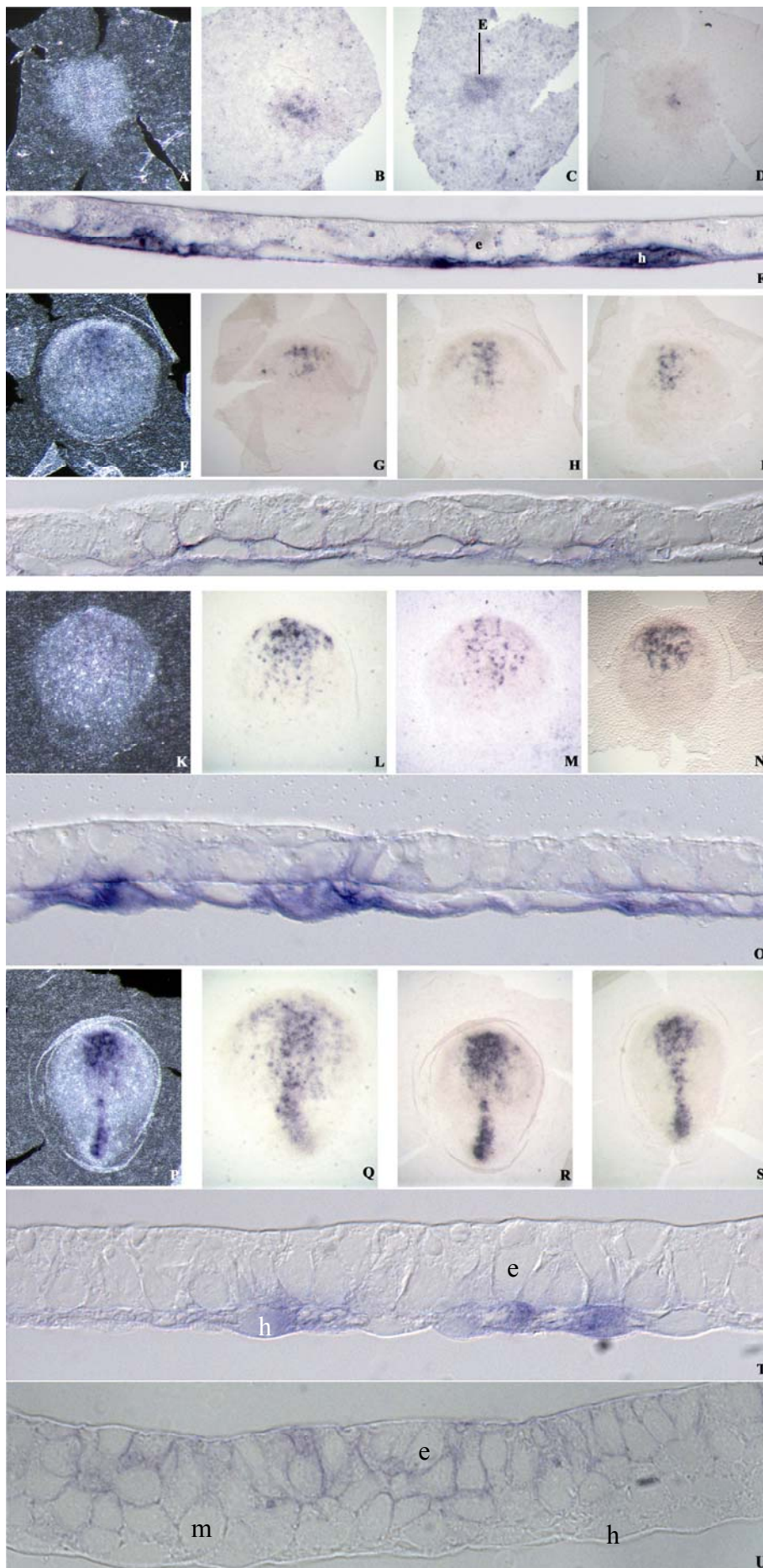
einigen Embryonen des Stadiums 3 noch weitestgehend einer lückenhaften Darstellung des Mittelstreifens, in anderen Embryonen ist sie auf einige vereinzelt liegende Zellen beschränkt. Ergänzt wird die anteriore Expressionsdomäne nun in manchen Embryonen von einem Areal *Lefty1*-positiver Zellen, das die gesamte posteriore Hälfte der Keimscheibe, also PGE und den Primitivstreifen (vgl. Abb. 5) umfasst (vgl. Abb. 16 S). Histologische Schnitte zeigen, dass diese *Lefty1*-exprimierenden Zellen den frühen Mesodermzellen des Primitivstreifens zugeordnet werden können (vgl. Abb. 16 U).

### 3.1.4 mRNA-Expression des Homöobox-Gens *Hex*

Die Expression des Homöobox-Gens *Hex* lässt sich bereits in den frühesten hier untersuchten Stadien nachweisen: Als erstes Zeichen der beginnenden Expression, sind in dorsalen Aufsichten der Keimscheiben im Stadium 0 etwa 10 *Hex*-positive Zellen zu erkennen. Diese liegen meist voneinander getrennt, d.h. sie sind zusammen mit *Hex*-negativen Zellen mosaikartig angeordnet und definieren so in der Mitte der Keimscheibe eine kleine, unregelmäßig begrenzte Expressionsdomäne (vgl. Abb. 17 C und c'). Andere Embryonen dieses Entwicklungsstadiums, bei denen in der dorsalen Aufsicht unter Dunkelfeldbeleuchtung ebenfalls noch keine Anzeichen der anterior-posterioren Achse zu erkennen sind (Abb. vgl. Abb. 17 A), haben bereits bis zu 20 exprimierende Zellen, die ebenfalls nicht alle Kontakt zueinander haben und daher breiter über die Keimscheibe verteilt sind (vgl. Abb. 17 C); eine bevorzugte Verteilung der *Hex*-positiven Zellen auf der einen oder anderen Seite der Keimscheibe ist in diesem Stadium nicht zu erkennen (vgl. Abb. 17 A-D). Den histologischen Schnitten zufolge ist die Expression von *Hex* auf Hypoblastzellen beschränkt (vgl. Abb. 17 E); innerhalb der Zellen ist die mRNA homogen verteilt.

In Keimscheiben des Stadiums 1 liegt die Expressionsdomäne *Hex*-positiver Zellen in der Nähe des anterioren Pols der Keimscheibe, der nun morphologisch durch die Differenzierung des vorderen Randbogens zu erkennen ist (vgl. Abb. 5). Innerhalb des vorderen Randbogens,





**Abb.17** Expressionsmuster des Gens *Hex* auf Transkriptionsebene: ISH wurde an Embryonen der Stadien 0 (B-D), 1 (G-I), 2 (L-N) und 3 (Q-S) durchgeführt. Histologische Schnitte (E, J, O, T und U) sagittal aus der Mitte der Keimscheibe (vgl. Markierung in C= Schnittebene von E) ermöglichen die Zuordnung der Genexpression zu Hypoblast bzw. Epiblast. e: Epiblastzelle; h: Hypoblastzelle; m: Mesodermzelle

an der Grenze zwischen extraembryonalen und embryonalen Gewebe liegen regelmäßig 2-3 Zelllagen, die keine *Hex*-Expression zeigen (vgl. Abb. 17 H). Dorsale Aufsichten zeigen außerdem, dass die *Hex*-positiven Zellen nun häufig dichter zusammen liegen und so eine homogene, intensiver gefärbte Expressionsdomäne als im Stadium 1 bilden (vgl. Abb. 17 H). Einige frühe Embryonen dieses Stadiums weisen mit etwa 20 *Hex*-positiven Zellen etwa die gleiche Zellzahl auf, die auch in weiter entwickelten Embryonen des Stadiums 0 zu finden ist. Bei anderen Embryonen nimmt die Zahl der *Hex* exprimierenden Zellen relativ zur Größenzunahme der Keimscheibe zu; sie steigt in weiter entwickelten Embryonen des Stadiums 1 auf etwa 25, häufig wieder locker gefügten Zellen an. Dadurch weitet sich das Expressionsmuster, ausgehend vom anterioren Pol und entlang der longitudinalen Achse der Keimscheibe, zu einem breiten Streifen etwa bis zum vorderen Ende des hinteren Drittels der Keimscheibe aus. In histologische Schnitten durch Embryonen des Stadiums 1 ist auch bei insgesamt schwacher Intensität der Färbung des Zytoplasmas eine Zuordnung der *Hex*-Zellen zum Hypoblasten möglich, da die Färbung im Hypoblasten stärker ist als im Epiblasten (vgl. Abb. 17 J).

In dorsalen Aufsichten der Keimscheiben im Stadium 2 (vgl. Abb. 17 K) erscheint das anteriore Feld *Hex*-exprimierender Zellen häufig als eine ovale Expressionsdomäne, deren Längsachse entlang dem vorderen Randbogen orientiert ist (vgl. Abb. 17 N): Fast in den gesamten vorderen 2 Dritteln der Keimscheibe sind nun *Hex*-positive Zellen zu finden. In manchen Embryonen zeigen nun auch die zuvor noch freien, anterior gelegenen Zelllagen eine Expression. Die Intensität der Anfärbung ist im Vergleich zwischen einzelnen Zellen stark unterschiedlich. Einige besonders stark gefärbte, liegen neben schwach positiven Zellen und bilden so erneut eine mosaikartige Expressionsdomäne. Dies wird auch in den histologischen Schnitten innerhalb des Hypoblasten deutlich, der insgesamt deutlich von den *Hex*-negativen Zellen des Epiblasten abgegrenzt werden kann.

Keimscheiben des Stadiums 3 (vgl. Abb. 17 P-S) haben weiterhin eine anterior gelegene ovale Domäne; diese ist jedoch nun eher longitudinal orientiert (vgl. Abb. 17 R, S). Diese anteriore

Expressionsdomäne besteht aus etwa 50 Zellen und ist zur Keimscheibenmitte hin orientiert (vgl. Abb. 17). Die Zellen liegen dicht zusammen und nehmen fast die gesamte vordere Hälfte der Keimscheibe ein. Im Bereich des Primitivstreifens wird diese anteriore Expressionsdomäne nun durch ein zusätzliches Hex-positives Areal ergänzt: Diese „Primitivstreifendomäne“ reicht vom posterioren Pol der Keimscheibe bis an den hinteren Rand der vorderen Expressionsdomäne. Sie besteht aus ca. 20-30 Zellen, die sich zunächst im vorderen Part des Primitivstreifens (vgl. Abb. 17 Q) befinden, in älteren Embryonen des Stadiums 3 aber im gesamten Primitivstreifen verteilt sind (vgl. Abb. 17 R, S). Die Intensität der Färbung nimmt in beiden Expressionsdomänen im Laufe der Entwicklung zu. Sowohl am anterioren, als auch am posterioren Ende der Keimscheibe zeigt sich häufig wieder eine etwa 2-4 Zellreihen umfassende periphere Zone negativer Zellen: Die anteriore Domäne wird dadurch in Richtung des vorderen Randbogens, die posteriore Expressionsdomäne in Richtung des Hinterrandes der posterioren Gastrulaextension (PGE) begrenzt (vgl. Abb. 17 R). Histologische Schnitte von Embryonen des Stadiums 3 zeigen im anterioren Abschnitt die bereits in jüngeren Stadien vorhandene Beschränkung der Hex-Expression auf die Hypoblastzellen (vgl. Abb. 17 T). Im posterioren Abschnitt der Keimscheibe wird dagegen *Hex* nur in den Epiblastzellen exprimiert (vgl. Abb. 17 U).

## 2.2 Stabilität der *Dkk1*-Expressionsdomäne in-vitro

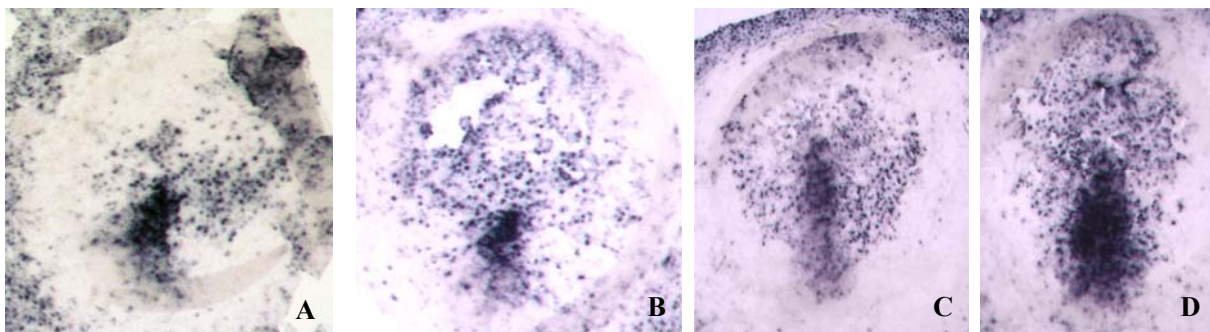
### 3.1.5 Suspensionskultur

Bei den nachfolgend beschriebenen Ergebnissen zur Entwicklung des Expressionsmusters für das Signalmolekül *Dkk1* in vitro werden zunächst die Untersuchungen mit den derzeit für die meisten eukaryoten Kultursysteme verwendeten, normoxischen Standardbedingungen, d.h. unter 20% O<sub>2</sub> (atmosphärische Luft-Sauerstoffkonzentration), 5% CO<sub>2</sub> (in Verbindung mit einem Bikarbonat-Puffersystem) und bei einer Temperatur von 37°C dargestellt. Danach werden die Ergebnissen der Untersuchungen bei unterschiedlichen hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen, die entweder die endogene zelluläre Hypoxie-Antwort induziert (1% O<sub>2</sub>) oder nachempfunden (DMOG) oder dem intrauterinen Milieu ähnlich sind (4% und 5%), beschrieben und dabei zu den Expressionsmustern nach Kultur unter Normoxie in Beziehung gesetzt.



### 3.1.5.1 Normoxie ("Konventionelle" Kultur-Bedingungen)

In Suspensionskultur über Nacht in Standardmedium unter Standardbedingungen entwickeln sich Blastozysten im Bereich der Keimscheibe morphologisch unauffällig: Beginnend mit Stadium 2 wachsen die meisten dieser Embryonen weiter zu einem frühen oder auch voll entwickelten Primitivstreifenstadium 3 (vgl. Abb. 18A). Bis zu etwa einem Drittel der untersuchten Blastozysten zeigt jedoch auch eine erhöhte Neigung zu schrumpfen oder sind in ihrer Entwicklung morphologisch nicht zu beurteilen, da sie während der Kultur stark an Größen zunehmen und schließlich auseinander platzen. Die morphologisch normal entwickelten Blastozysten zeigen meist ein stark verändertes Expressionsmuster von *Dkk1*-mRNA (vgl. Abb. 18 A-D.): Die anteriore spangenartige, nach anterior und posterior scharf begrenzte Domäne fehlt, stattdessen sind über die gesamte Keimscheibe ohne ein erkennbares regelmäßiges Muster einzelne *Dkk1*-positive Zellen verteilt (vgl. Abb. 18 A-D). Auch in der posterioren Keimscheibenhälfte stellt sich im Vergleich zu in vivo entwickelten Blastozysten ein anderes Muster ein: Die Expressionsdomäne entwickelt sich nicht im posterioren sondern im anterioren Abschnitt des Primitivstreifens (vgl. Abb. 18 B, C). Auch außerhalb der Keimscheibe zeigen die meisten Präparate eine Färbung in einzelnen Zellen des extraembryonalen Gewebes, die nach Entwicklung in vivo nicht auftritt (vgl. Abb. 18)

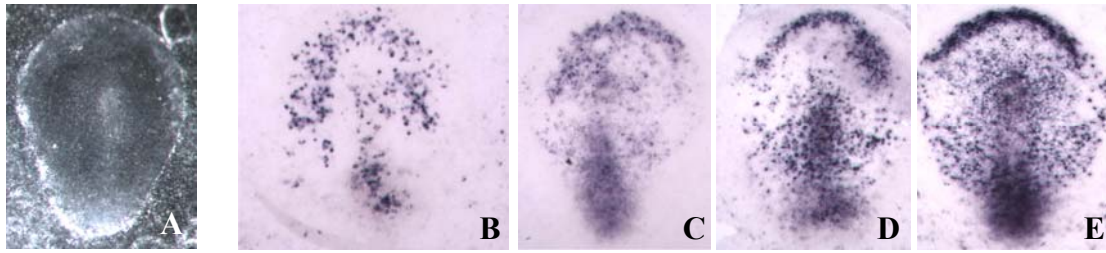


**Abb.18** Suspensionskultur unter Standardbedingungen: Kaninchenkeimscheiben nach Suspensionskultur über Nacht unter Standardbedingungen: HAM's F10-Medium mit 20% FCS, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> und anschließender ISH für *Dkk1*.

### 3.1.5.2 Hypoxie

#### 3.1.5.2.1 Chemisch induzierte zelluläre Hypoxie

Suspensionskulturen mit Dimethyloxaloylglycin (DMOG) im Standardmedium sind nach Beendigung der Kultur über Nacht in den meisten Fällen im Bereich der Keimscheibe morphologisch normal entwickelt. Die Entwicklung entspricht in der Regel einer zeitlich etwas verzögerten natürlichen Entwicklung in vivo. Auch hier ist auffällig, dass etwa ein Drittel der untersuchten Blastozysten eine erhöhte Neigung zu schrumpfen oder zu platzen



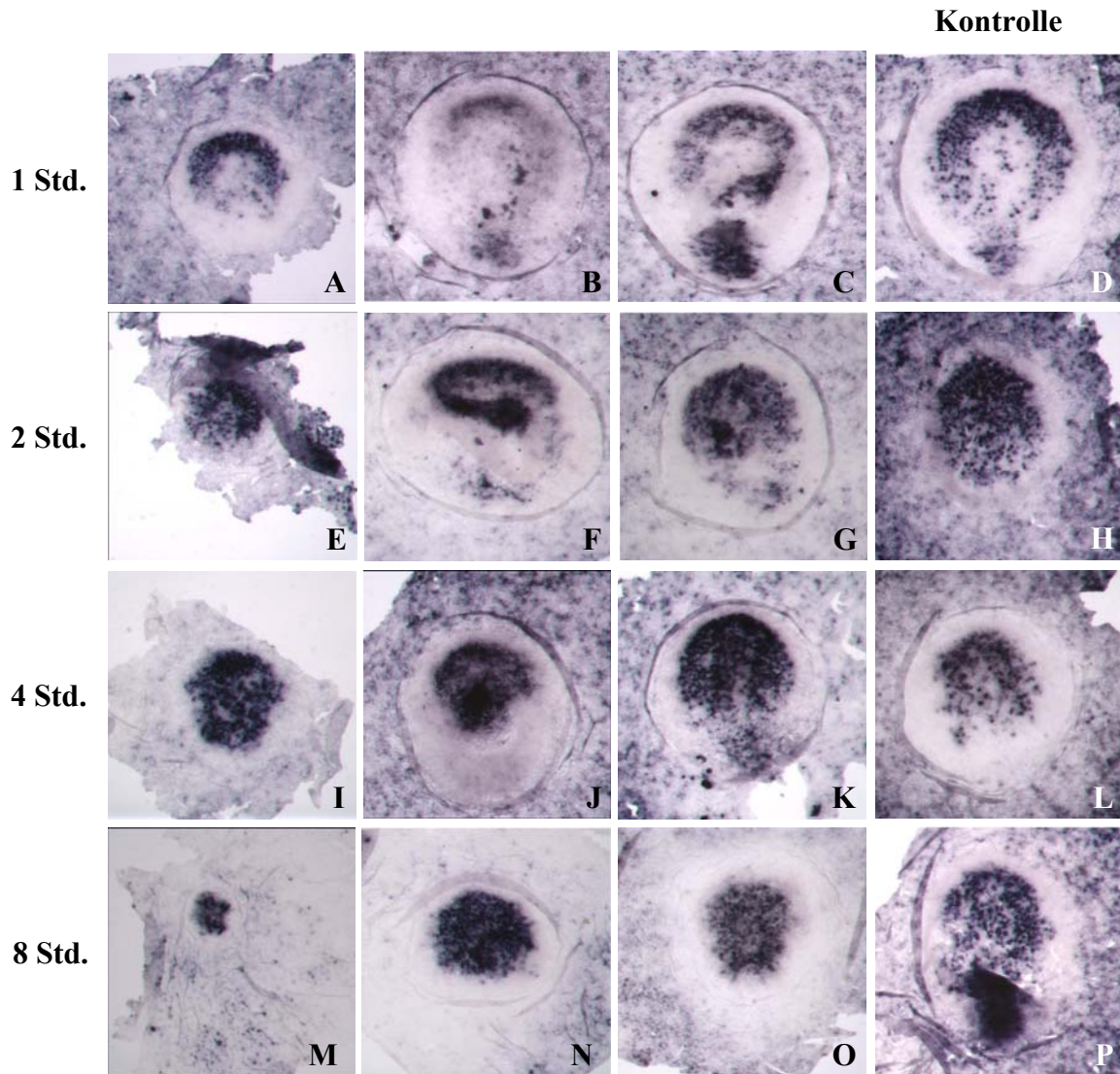
**Abb.19** Suspensionskultur mit DMOG: Kaninchenkeimscheiben nach Suspensionskultur über Nacht: Zusätzlich zu den Standardkulturbedingungen ist das Medium mit 1mM DMOG versetzt. Anschließend erfolgte die ISH für *Dkk1*.

A: Morphologie nach Suspensionskultur mit DMOG: Keimscheibe unter Dunkelfeldbeleuchtung

zeigt. Embryonen im Stadium 2 zu Beginn der Kultur nehmen in der Größe zu und entwickeln sich innerhalb von 16-18 Stunden weiter zu Stadium 3 mit einem physiologisch erscheinenden Primitivstreifen, in einigen wenigen Fällen sogar bis zu einem frühen Stadium 4 (vgl. Abb. 19 A). *In situ*-Hybridisierungen der mit DMOG kultivierten Blastozysten zeigen an Keimscheiben im Stadium 3 wie bei natürlich entwickelten Embryonen eine schmale spangenartige, meist anterior und posterior scharf begrenzte Expression im Bereich des vorderen Randbogens. Wie nach Entwicklung *in vivo* begrenzt diese anteriore Expressionsdomäne innerhalb des vorderen Randbogens einige ungefärbte an der Grenze zum Extraembryonalen liegende Zellreihen. Anders als bei der physiologischen Expressionsdomäne (vgl. Abb. 14) erscheint die kaudale Verlängerung der beiden Spangenende häufig verbreitert. Im Primitivstreifen erscheint meist die auch physiologisch auftretende posteriore Expressionsdomäne, zusätzlich findet sich jedoch in manchen Fällen eine abnorme Expressionsdomäne im anterioren Abschnitt des Primitivstreifens, und diese ist dann außerdem von einzeln liegenden *Dkk1*-positive Zellen umgeben, die in einigen Fällen fast die gesamte PGE einnehmen (vgl. Abb. 19 D). Die bis zum Stadium 4 entwickelten Embryonen besitzen eine zusätzlich Expression im sich entwickelnden Primitivknoten (vgl. Abb. 19 E).

#### 3.1.5.2.2 „Absolute“ Hypoxie (1% Sauerstoff)

Die in diesem Versuch kultivierten Embryonen konnten vor Versuchsbeginn nicht nach den bekannten Stadien eingeteilt werden; da die Entnahme aus dem Uterus und der Kulturbeginn in der Hypoxiekammer durchgeführt werden mussten, um die strikte Hypoxie von Anfang an zu gewährleisten, war die visuelle Beurteilung der Keimscheiben vor Kulturbeginn nicht möglich. Der Entwicklungsstatus der Blastozysten konnte jedoch anhand des



**Abb. 20** Suspensionskultur unter absolut hypoxischen Bedingungen (1% Sauerstoff)

Blastozystendurchmesser (in mm) grob bestimmt werden, sodass für jedes der zu untersuchenden Zeitintervalle 3 unterschiedlich große Blastozysten ausgewählt werden konnten. Bei der Abbildung der entsprechenden Ergebnisse wurden die jeweils jüngsten erreichten Stadien auf der linken Bildhälfte, die am weitest entwickelten Embryonen auf der rechten Bildhälfte angeordnet (vgl. Abb. 20).

Nach der Kultur mit auf 1% verringertem Sauerstoffgehalt zeigen etwa zwei Drittel der untersuchten Blastozysten eine leicht retardierte, jedoch morphologisch weitestgehend normale Entwicklung der Keimscheibe; bereits nach 4 Stunden Kulturdauer sind etwa ein Drittel der Blastozysten geschrumpft. Bei wenigen der länger als 4 Stunden inkubierten Blastozysten entstehen blasige Auswüchse am Rand der Keimscheibe, die jedoch in den

meisten Fällen trotzdem eine Auswertung zulassen, da die Keimscheibe des Embryos in Größe und Entwicklungsgrad einer morphologisch unauffällig entwickelten Keimscheibe ähnelt. Eine Kulturdauer kürzer als 4 Stunden bewirkte in keinem der untersuchten Embryonen solche Auswüchse.

Alle unter "absolut hypoxischen" Bedingungen (1% Sauerstoff) kultivierten Blastozysten, die nicht geschrumpft oder geplatzt sind, zeigen nach *in situ*-Hybridisierungen eine starke Expression von *Dkk1*. Alle Präparate sind jedoch abgesehen vom Keimscheibenbereich auch im extraembryonalen Gewebe gefärbt. Diese Färbung ist weitestgehend homogen über den gesamten extraembryonalen Ausschnitt verteilt und wird nur von einigen wenigen schwach gefärbten Zellen unterbrochen. Mit zunehmender Kulturdauer vermindert sich die Intensität der Färbung im extraembryonalen Gewebe: Bis etwa 4 Stunden Kulturdauer sind viele extraembryonale Zellen stark gefärbt, ab 8 Stunden Kulturdauer sind die meisten Zellen wesentlich heller gefärbt.

Abhängig von der Kulturdauer ergeben sich im Einzelnen folgende Expressionsdomänen:

#### 1 Stunde Inkubation

*Dkk1* Expression zeigt sich in der normalen spangenartigen Domäne im Bereich des vorderen Randbogens (vgl. Abb. 20 A-C). Wie nach Entwicklung *in vivo* umschließt diese Spange einen in der Mitte der Keimscheibe liegenden Bereich, der nicht oder nur schwach gefärbte und vereinzelt liegende Zellen enthält, und im anterioren Rand des vorderen Randbogen verbleibt eine schmale periphere Zone von Zellen ungefärbt. Embryonen des Stadiums 3 weisen ergänzend eine Expression im sich entwickelnden Primitivstreifen auf. Damit unterscheiden sich diese Expressionsdomänen nur unwesentlich von den normoxisch kultivierten Kontrollen (vgl. Abb. 20 D).

#### 2 Stunden Inkubation

Die *Dkk1* Expressionsdomäne füllt den gesamten vorderen Bereich bis etwa zur Mitte der Keimscheibe weitgehend aus. Die Zellen innerhalb dieses Bereiches bilden eine mosaikartige Fläche bedingt durch unregelmäßige Anordnung von Bereichen mit unterschiedlich stark angefärbten Zellen (vgl. Abb. 20 E-G). Im posterioren Keimscheibenbereich sind einige wenige schwach gefärbte Zellen zu finden. Die normoxisch kultivierten Kontrollembryonen weisen eine insgesamt stärkere Färbung im vorderen Drittel der Keimscheibe auf (vgl. Abb.

20 H). Die sich über die gesamte Keimscheibe verteilende Expression wird posterior von wenigen nicht gefärbten Zellen unterbrochen.

#### 4 Stunden Inkubation

Die Expression von *Dkk1* ist nach 4 Stunden Kultur innerhalb der Gruppe der untersuchten Embryonen sehr unterschiedlich verteilt. Es tritt sowohl eine Expressionsdomäne auf, die sich über die gesamte Keimscheibe erstreckt (vgl. Abb. 20 I), als auch eine, die auf das vordere Drittel beschränkt ist (vgl. Abb. 20 J). Ebenso tritt bei weiter entwickelten Embryonen eine charakteristische Färbung im Primitivstreifen auf (vgl. Abb. 20 K). Allen diesen Expressionsdomänen gemein ist eine mosaikartige Ausprägung, bedingt durch die unterschiedliche Färbung der Zellen innerhalb der Domäne. Normoxisch inkubierte Embryonen zeigen eine lockere Anordnung von positiven Zellen, unterbrochen von einigen *Dkk1*-negativen Zellen innerhalb der anterioren Keimscheibenhälfte (vgl. Abb. 20 L).

#### 8 Stunden Inkubation

Trotz 8 Stunden Kultur sind die Keimscheiben insgesamt klein geblieben und haben sich nicht zum Stadium 3 weiterentwickelt (vgl. Abb. 20 M-O). Alle Embryonen weisen jedoch eine zusammenhängende mosaikartige Domäne unterschiedlich stark gefärbter Zellen auf, die nahezu die gesamte Keimscheibe umfasst und meist in der Nähe des vorderen Keimscheibenrandes liegt. Kontrollblastozysten haben sich nach 8-stündiger Kulturzeit bis zum Stadium 3 entwickelt und zeigen eine flächige anteriore *Dkk1*-Expressionsdomäne und eine Domäne starker *Dkk1*-Expression im hinteren Bereich des Primitivstreifens (vgl. Abb. 20 P).

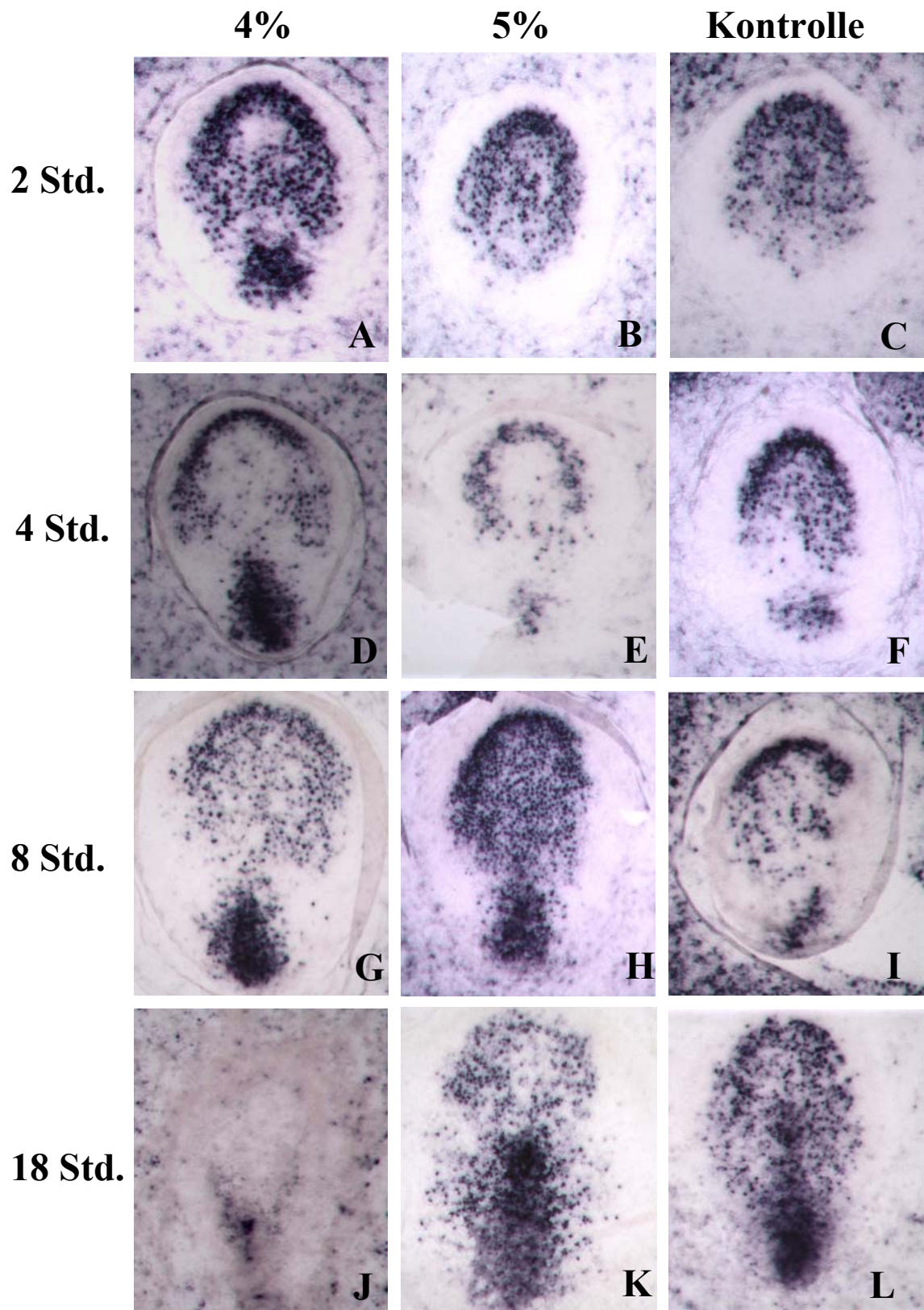
#### 18 stündige Inkubation

Die Inkubation über Nacht hat keine der untersuchten Blastozysten überlebt. Bereits zu einem früheren Zeitpunkt im Laufe der Kultur sind diese Embryonen geplatzt oder geschrumpft. Teile der Blastozyste verwachsen blasig und damit ist die Keimscheibe unauswertbar zerstört (ohne Abb.).

#### 3.1.5.2.3 „Relative“ Hypoxie (4% oder 5% Sauerstoffkonzentration)

Alle in diesem Versuch eingesetzten Blastozysten entsprechen zu Beginn der Kultur dem Entwicklungsstadium 2. Entsprechend der unterschiedlichen Kulturdauer entwickeln sich die Keimscheiben zu einem "späten" Stadium 2 (posteriore Verlängerung, jedoch ohne morphologisch sichtbaren Primitivstreifen), zum Stadium 3 (mit Primitivstreifen) oder bis zum Stadium 4 (mit Primitivknoten). *Dkk1*-mRNA-Transkripte finden sich bei allen





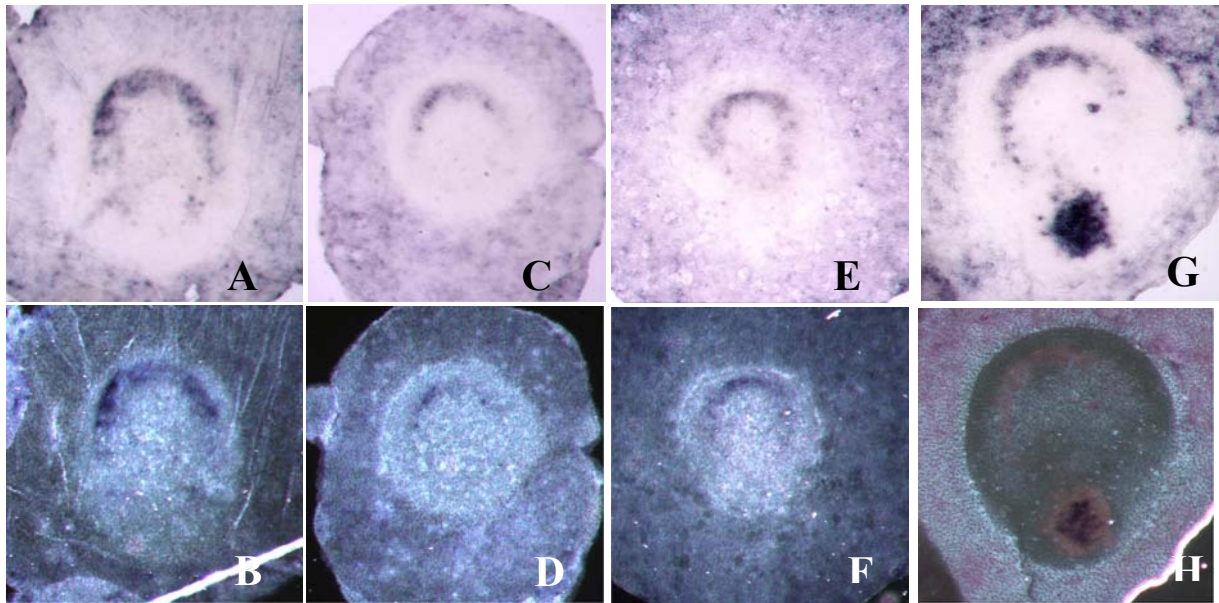
**Abb. 21** Suspensionskultur unter „relativ“ hypoxischen Bedingungen (4% Sauerstoff oder 5% Sauerstoff): Einsatz von 4% Sauerstoff (A, D, G, J) oder 5% Sauerstoff (B, E, H, K), Kontrolle mit 20% Sauerstoff (C, F, I, L)

untersuchten Embryonen, die unter hypoxischen Bedingungen mit 4% oder 5% Sauerstoff kultiviert worden sind; dabei weisen die Blastozysten neben der Färbung im Keimscheibenbereich auch eine Färbung des extraembryonalen Gewebes auf, die weitestgehend homogen über den gesamten extraembryonalen Abschnitt der Blastozyste verteilt und nur von einigen wenigen stärker gefärbten Zellen durchsetzt ist.

Die Verteilung der Dkk1-exprimierenden Zellen innerhalb der Keimscheibe weicht mit zunehmender Kulturdauer immer stärker von der physiologischen, nach normaler in vivo Entwicklung auftretenden Verteilung ab. Dabei treten im wesentlichen ähnliche Merkmale auf wie bei den kürzeren Inkubationszeiten unter 1% Sauerstoffkonzentration kultivierten Blastozysten (vgl. Abb. 21 A-T): In der anterioren Keimscheibenhälfte wird die Spangen-artige, im folgenden als "physiologisch" bezeichnete Domäne zunehmend von einer flächigen, durch stark und weniger stark gefärbte Zellen geprägten Mosaik-artigen, im folgenden als "pathologisch" bezeichneten Domäne ersetzt (vgl. Abb. 21 C, F). Zusätzlich kann die im Stadium 3 auftretende "physiologische" Expressionsdomäne im Bereich des Primitivstreifens seitlich von zwei "pathologischen" Domänen mit einer mehr oder weniger großen Zahl meist einzeln stehender stark Dkk1-exprimierenden Zellen flankiert werden (vgl. Abb. 21 I). In Abhängigkeit von Kulturdauer und Sauerstoffgehalt treten folgende Unterschiede in der Häufigkeit von pathologischen Expressionsdomänen auf: Nach 2 Stunden Kulturdauer haben 3 von insgesamt 5 (3/5) Blastozysten unter 4% Sauerstoff und 2/5 Blastozysten unter 5% Sauerstoffgehalt pathologische Expressionsdomänen, während bei den Kontrollen (20% Sauerstoffkonzentration) 7/9 Blastozysten pathologische Expressionsdomänen aufweisen (vgl. Abb. 23 A-C). Nach 4 Stunden Kulturdauer betragen die entsprechenden Zahlen 1/7, 5/8 und 7/11, während nach 8 Stunden bzw. 18 Stunden (über Nacht) die pathologischen Expressionsdomänen bei 6/7, 7/8 und 3/5 bzw. 4/4, 4/4 und 9/9 Blastozysten auftreten. Besonders auffällig ist bei diesen Experimenten also das Ergebnis nach 4-stündiger Kulturdauer, bei der unter Hypoxie im Vergleich zur Gesamtzahl der Blastozysten relativ weniger (zusammen 6 von insgesamt 15) Keimscheiben pathologische Expressionsdomänen aufweisen (vgl. Abb. 21 D-E) als unter Normoxie (7/11, vgl. Abb. 21 F).

### **3.1.6 in-vitro-Kultur isolierter Keimscheiben auf Agarose ("Flachkultur ")**

Für die im Folgenden zu beschreibenden Ergebnisse der Flachkultur kamen wie für die Suspensionskulturen unter relativer Hypoxie nur Blastozysten im Stadium 2 zum Einsatz.

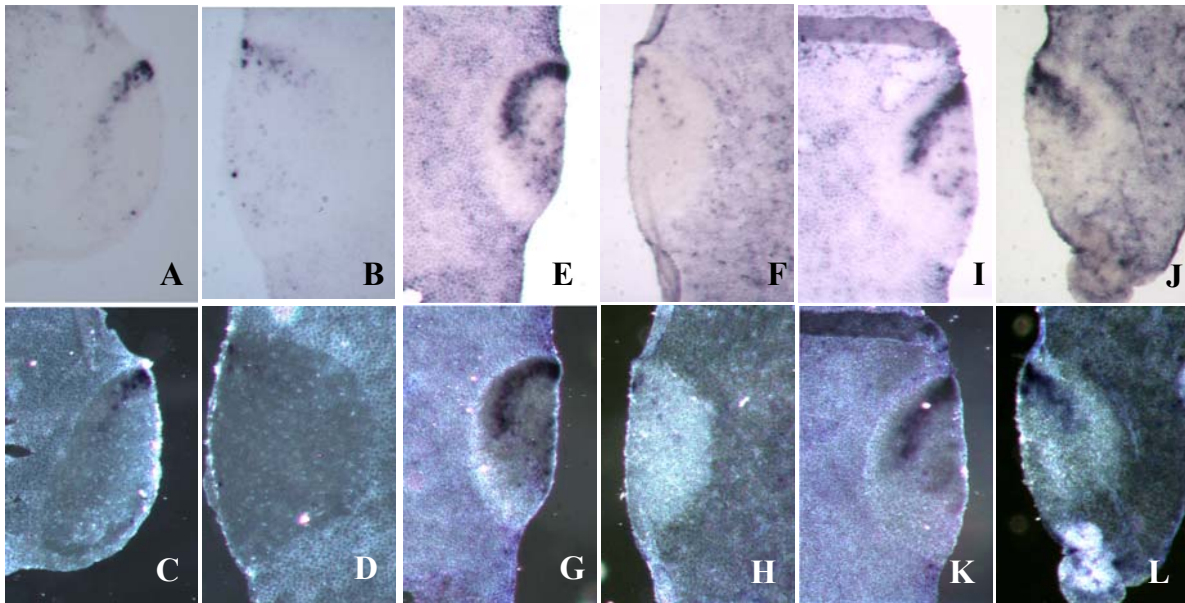


**Abb. 22** Flachkultur nach New: Die Hybridisierung mit Dkk 1 zeigt bei allen untersuchten Embryonen ein normales Expressionsmuster, vergleichbar mit in-vivo entwickelten Embryonen. Ein signifikanter Unterschied, abhängig von der Inkubationsdauer von 30 Minuten (A,B), 60 Minuten (C,D) oder 90 Minuten (E,F) oder über Nacht (G,H) ist nicht auszumachen.

Nach dem Aufbringen auf die Agarosehügel zeigen die isolierten Keimscheiben nur noch eine geringe morphologische Entwicklung, d.h. die Entwicklung eines Primitivstreifens wird nur selten erreicht. Unverändert stark im Vergleich mit der Entwicklung in vivo oder auch der Entwicklung in Suspensionskultur (vgl. Abb. 13) ist jedoch die Gen-Expression wie dies nach in situ Hybridisierung von Keimscheiben nach Flachkultur zu erkennen ist (vgl. Abb. 22). Während sich eine posteriore Expressionsdomäne entsprechend der fehlenden morphologischen Entwicklung eines Primitivstreifens nur selten entwickelt, ist insbesondere die Form der anterioren Expressionsdomänen nach Flachkulturen auch von längerer Dauer von der Form der Domäne nach Entwicklung in vivo kaum zu unterscheiden (vgl. Abb. 22 G). Embryonen, die in einer „Flachkultur nach New“ bis zu 18 Stunden kultiviert werden zeigen eine weitestgehend normale Entwicklung. Die anschließende Untersuchung der *Dkk1*-Expression bestätigt diese Einschätzung: Alle untersuchten Keimscheiben zeigen unabhängig von der Dauer der Kultur (30 Minuten: vgl. Abb. 22 A,B; 60 Minuten: vgl. Abb. 22 C, D; 90 Minuten (vgl. Abb. 22 E, F; oder 18 Stunden: vgl. Abb. 22 G, H) die spangenartige Expressionsdomäne entlang des vorderen Randbogens, vergleichbar mit in-vivo entwickelten Keimscheiben (vgl. Abb. 22).

Nach der Halbierung der Keimscheiben in der medianen anterior-posterior verlaufenden Achse zeigen die linken, als Kontrollen direkt fixierten Keimscheibenhälften in der





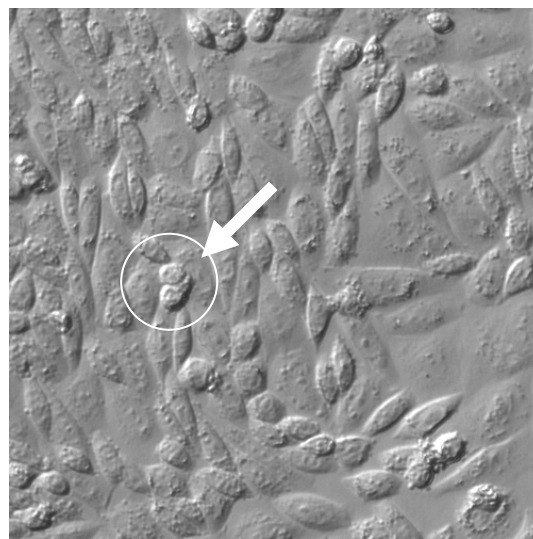
**Abb.23** Embryonenkultur nach Halbierung der Keimscheibe: Die linke Keimscheibenhälfte (A+C; E+G; I+K) ist direkt nach der Halbierung fixiert. Die rechte Hälfte ist für 30 Minuten (B+D), 60 Minuten (F+H) bzw. 90 Minuten (J+L) kultiviert. Die Abbildungen zeigen dass *Dkk1* Expressionsmuster nach ISH

anschließenden ISH für *Dkk1* eine bogenförmige Expression, die in etwa einer Hälfte des bekannten physiologischen Musters von in-vivo entwickelten Keimscheiben entspricht. In der Dunkelfeldaufnahmen (vgl. Abb. 23 C-H bzw. C-L) ist häufig ein schmaler Saum *Dkk1*-negativer Zellen entlang der Schnittkante zu erkennen. In den rechten Keimscheibenhälften ist nach 30 Minuten Kulturdauer eine spangenartige Anordnung der *Dkk1*-exprimierenden Zellen nur noch schwach ausgeprägt (vgl. Abb. 23 A). Die Spangenhälfte besteht aus sehr schwach reagierenden Zellen, die von wenigen stärker positiven begleitet werden. Die Orientierung ist trotz der schwachen Ausprägung als in der vorderen Keimscheibenhälfte lokalisiert auszumachen. Eine 60 minütige Inkubationsdauer bewirkt eine Reduktion der positiv reagierenden Zellen und eine verringerte Färbintensität der einzelnen Zellen. Die *Dkk1*-Expression beschränkt sich auf ein kleines Areal im anterior liegenden ersten Drittel der Keimscheibe und reicht bogenförmig von der medianen Schnittkante entlang dem vorderen Keimscheibenrand nach lateral. Die *Dkk1*-positiven Zellen werden immer wieder von negativen unterbrochen, so dass keine zusammenhängende Expressionsdomäne entsteht (vgl. Abb.23 C). Nach 90 Minuten Inkubation entspricht die *Dkk1* Expressionsdomäne in Größe und Intensität in etwa der zugehörigen linken Seite. Die *Dkk*-positiven Zellen verlaufen

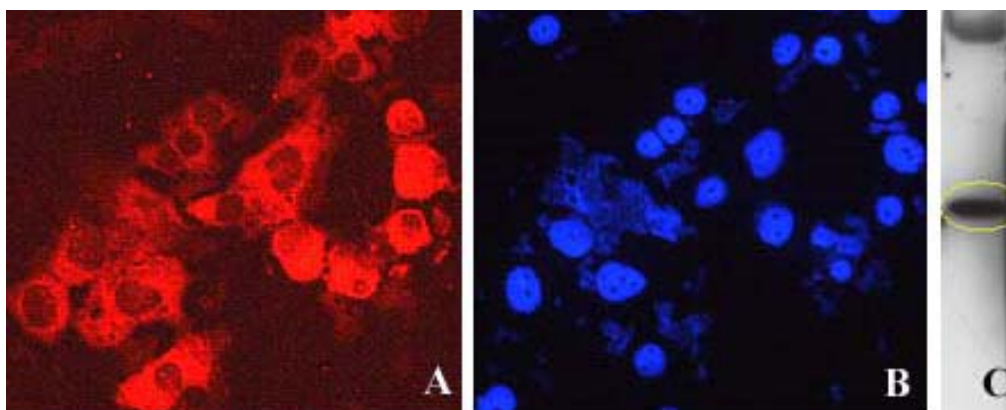
halbbogenförmig entlang dem vorderen Randbogen bis etwa zur mittleren Transversalebene der Keimscheibe (vgl. Abb. 23 E).

### 3.1.7 Dkk1-CHO-Zellen

Nach Einschleusung von Plasmid-DNA durch Lipofektion ist die Teilungsfähigkeit der Zellen nicht beeinträchtigt (vgl. Abb. 24). Das DNA-Plasmid wird nicht stabil in das Genom integriert, dennoch produzieren die transgenen Zellen *Dkk1* (vgl. Abb. 25 A) und sezernieren das Protein in das umgebende Medium (vgl. Abb. 25 C).



**Abb. 24** CHO-Zellen in Kultur: Die spindelförmigen Zellen adherieren am Boden des Kulturgefäßes. In Teilung begriffene Zellen nehmen eine kugelige Form an. (Pfeil und Kreis)



**Abb. 25** Transfizierte CHO-Zellen in Kultur: Die Aufnahme A zeigt die Fluoreszenz der das Insert translatierenden Zellen. Aufnahme B zeigt die Kernfärbung der gleichen Zellen mit DAPI. C: Western Blot mit Protein aus dem Überstand des Kulturmediums.

Nach der Resektion des Hypoblasten verbleibt nur der Epiblast, umgeben von extraembryonalem Trophoblast auf dem Agarosehügel. Der Versuch, die Keimscheiben nach Resektion des Hypoblasten mit transfektierten Zellen zu überspülen, führte jedoch in den meisten Fällen zum Auseinanderfließen der Keimscheiben und damit zur nahezu vollständigen Zerstörung des Epiblasten als dem empfindlichsten Teil des kultivierten Gewebes. Die Fortsetzung der Kultur und eine Analyse der Genexpression waren danach nicht mehr möglich.

In einem weiteren Versuch sollten statt einzelne Zellen aufzuspülen, stabile Zellaggregate mit Hilfe einer Wolframnadel aufgesetzt werden: Die aggregierten Zellen bildeten jedoch keinen stabilen Verband und ließen sich deshalb nur schlecht mit der Nadel aufnehmen; außerdem halten sie sich bedingt durch ihre Größe nicht auf dem Hügel und zerreißen beim Hinabgleiten auch den Epiblasten. Auch dem Versuch mit *Dkk1* beladene beads aufzusetzen hielt der Epiblast nicht stand (unveröffentlicht).

### **3.1.8 Kultur von Hypoblastzellen**

Einzelne Hypoblasten in Kultur zu nehmen resultierte nicht in einer weiteren Vermehrung der Zellen. Nach Ablauf von 18 Stunden hat keine Haftung an den Boden der Kulturschale stattgefunden und die eingesetzten Zellen ließen sich nicht weiter passagieren. Der Versuch, 4 komplette Hypoblasten gemeinsam in Kultur zu nehmen, führte zwar vorübergehend zur Adhierung der Zellen am Boden der Kulturschale nach 18 Stunden; ob zu diesem Zeitpunkt eine Zellvermehrung eingesetzt hatte, konnte noch nicht beurteilt werden, und nach etwa weiteren 12 Stunden in Kultur starben die Zellen ab und der gesamte Gewebeverband löste sich wieder vom Boden ab.

## 4 Diskussion

Die hier untersuchten im Hypoblast exprimierten Schlüsseldgene der frühen Achsenentwicklung (*Dkk1*, *Cer1*, *Lefty* und *Hex*) zeigen alle eine starke Variabilität in der Form und Ausdehnung ihres Expressionsmusters. Dabei zeigen *Dkk1*, *Cer1*, *Lefty* schon früh eine zuverlässige, der morphologischen anterior-posterioren Differenzierung der ersten Gastrulationsstadien vorangehende exzentrische Expression der Keimscheibe, während das Expressionsmuster von *Hex* erst zusammen mit dem Auftreten des Vorderen Randbogens im Stadium 1 eine nach anterior verlagerte, exzentrische Position innerhalb der Keimscheibe einnimmt. Entlang der transversalen Achse, die zusammen mit der anterior-posterioren Achse im Stadium 1 definiert wird, zeichnet sich unter den verschiedenen Erscheinungsformen der *Dkk1*-Expressionsdomäne – besonders auch im Vergleich mit der Variabilität der anderen hier untersuchten Expressionsdomänen – eine vorübergehende, in Stadium 1 häufiger als in Stadium 2 auftretende laterale Asymmetrie ab. Die quantitative Analyse dieser Asymmetrie lässt jedoch keine vermehrte Präferenz für eine Lateralität im Sinne der Asymmetrie des erwachsenen Organismus ("Situs solitus") erkennen. Form und Variabilität der spangenförmigen, lateral asymmetrischen *Dkk1*-Expression gehen schon nach wenigen Stunden der Kultur unter Standard-Bedingungen verloren. Simulation der hypoxischen Wachstumsbedingungen in utero durch Reduktion des Sauerstoffgehaltes während der Kultur oder durch chemisch induzierten Hypoxie (durch DMOG) kann die Stärke der *Dkk1*-Expression regelmäßig und die Spangenform vorübergehend (für etwa 4 Stunden) erhalten; die Asymmetrie der Expressionsdomäne geht jedoch regelmäßig verloren, auch wenn die kultivierten Embryonen sich morphologisch normal bis zum Stadium 3 oder 4 entwickeln. In der sog. Flachkultur bleibt die physiologische spangenförmige *Dkk1*-Expressionsdomäne regelmäßig erhalten, wobei die morphologische Entwicklung zu Stadium 3 oder 4 selten erreicht wird. Dies und die eindeutige Definition der anterior-posterioren Achse durch den Vorderen Randbogen an isolierten Keimscheiben vor Kulturbeginn im Stadium 2 ermöglichten die mediane Teilung von Keimscheiben in 2 Hälften, deren getrennte Analyse erste Hinweise auf eine oszillierende *Dkk1*-Expression als möglichen Grund für die Variabilität im *Dkk1*-Expressionsmuster lieferte. Der Versuch, die inhibierende Wirkung des Hypoblasten auf die Musterungsprozesse im Epiblasten durch Aufsetzen von *Dkk1*-transfizierten CHO-Zellen oder sog. Beads in der sog. Flachkultur zu imitieren, scheiterten an der Zerbrechlichkeit des Epiblastgewebe nach der für diesen Versuch notwendigen Resektion des Hypoblasten.

## 4.1 Methoden

### 4.1.1 Modellorganismus Kaninchen

Das Kaninchen erwies sich in den vorliegenden Untersuchungen als Modellorganismus für die Ausbildung der Körperachsen im Säugerembryo besonders gut geeignet: Die untersuchten Expressionsmuster der Hypoblastgene *Dkk1*, *Cer1*, *Lefty* und *Hex*, ließen sich erst durch die flache Struktur der Keimscheibe vollständig analysieren. Im Gegensatz zum becherförmigen Eizylinder der Maus (s. Abb. 1), der sich zur direkten Beobachtung der hier beschriebenen frühen Achsenentwicklung nicht eignet, lässt die Kaninchenkeimscheibe die Zuordnung der Expressionsmuster zur Morphologie des Embryos und auch die Analyse von Lagebeziehungen untereinander leicht zu. Auch für die Embryonenkulturen bietet das Kaninchen einen entscheidenden Vorteil: Die Blastozysten sind bis zum Beginn der Gastrulation (6,5dpc) noch nicht implantiert und lassen sich deshalb leicht aus dem Uterus ausspülen. Nicht wie bei Primaten, wo die Einnistung in die Uterusschleimhaut schon früher stattfindet. So sind sie ohne lange Verzögerungen schnell und einfach ins jeweilige System der Suspensionskultur oder Flachkultur zu überführen. Insbesondere im Flachkulturmodell, das ursprünglich am Huhn entwickelt wurde, lässt sich ausschließlich eine flache Keimscheibe, wie der Kaninchenembryo vergleichbar einsetzen.

Das Huhn ist zwar als Modellorganismus für die Entwicklung der Vertebraten nach der Gastrulation gut geeignet; für die frühe Achsenentwicklung ist es jedoch nicht das geeignete Modell, da die Bedeutung des Hypoblasten für die Anlage der anterior-posterioren Achse möglicherweise eine andere als im Säuger ist: Der Hypoblast wird beim Huhn erst relativ spät (unmittelbar vor der Mesodermbildung) gebildet (Stern, 2004), während der Hypoblast des Säugers bereits mehrere Tage vor Auftreten der ersten Anzeichen der Gastrulation gut ausgebildet ist. Die flache Form der Kaninchenkeimscheibe ermöglicht darüberhinaus vergleichsweise Manipulationen (s.u.): Der Hypoblast lässt sich mechanisch entfernen und die Keimscheibe kann entlang der anterior-posterioren Achse auch vor Einsetzen der Primitivstreifenbildung halbiert werden, was bei dem zylindrischen Embryo der Maus nicht möglich ist.

Die beschriebenen Vorteile wiegen dabei gewisse Nachteile beim Einsatz von Kaninchen auf, die in der aufwendigeren, teureren Tierhaltung und einer mit 6 Monaten deutlich längeren Generationsdauer als bei der Maus bestehen. Dementsprechend ergibt sich auch ein

erschwerter Zugang zu standardmäßigen gentechnischen Methoden, wie zum Beispiel der Herstellung transgener Tiere, wie sie bei der Maus etabliert sind.

#### 4.1.2 Embryonenkultur

##### 4.1.2.1 Suspensionskultur

Im System der Suspensionskultur ist die in-vitro Kultivierung von ganzen Kaninchenblastozysten möglich. Durch die einfache Handhabung während des Transfers der Blastozyste aus dem Uterus in die Kulturschale, wird der Embryo nur wenig mechanischer Belastung ausgesetzt. Die standardisierten Umgebungsbedingungen lassen auch in den meisten Fällen bei kurzer Inkubationsdauer (Knoetgen et al., 1999 ) eine morphologisch unauffällige Entwicklung zu. Für die molekulare Entwicklung trifft dieses jedoch nicht zu, wie die Abweichung des *Dkk1*-Expressionsmusters in Kultur vom in vivo entwickelten Embryo zeigt. Die fehlende Ausprägung einer anterior gelegenen Expressionsspanne könnte durch eine fehlende Zellwanderung im Hypoblasten in Richtung vorderem Randbogen begründet sein. Wie Studien an der Maus zeigen, gibt es Wanderungsbewegungen der Zellen des distalen viszeralen Endoderms (VE) in Richtung anterior (Yamamoto und Oelgeschlager), die zur Bildung des anterioren VE (AVE) führen (Rivera-Perez et al., 2003). Setzt man voraus, dass eine ähnliche Zellbewegung im Kaninchen zur Ausprägung des vorderen Randbogens und damit auch zur anterioren *Dkk1*-Expressionsdomäne führt, ist dieser Mechanismus im Kultursystem gestört. Grund für diese Störung kann einerseits ein negativer Faktor (z.B. hoher Sauerstoffpartialdruck) hervorgehend aus den unphysiologischen Umgebungsbedingungen oder die Wirkung fehlender Einflüsse (z.B. Uterusmilieu, intrauteriner Kontakt) auf die Entwicklung sein. Grundsätzlich entspricht auch die Statik der eingestellten Kulturbedingungen nicht den physiologisch notwendigen Änderungen im Laufe der unterschiedlichen Wachstumsphasen. Die schnellen Veränderungen im Embryo und seine Größenzunahme machen eine Anpassung des umgebenden Milieus nötig, auf die das herkömmliche Suspensionskulturmodell nicht reagieren kann. Welche Faktoren zwingend für eine korrekte Ausprägung der Keimscheibe einer ständigen Optimierung bedürfen, müssen in weiteren Studien geklärt werden, die dann auch dazu genutzt werden können, die Kulturbedingungen zu verbessern.

#### 4.1.2.1.1 Hypoxie

Ein wichtiger physiologischer Faktor während der intrauterinen Entwicklung ist der Sauerstoffgehalt. Die umgebende Konzentration von 20% Luftsauerstoff im Kultursystem entspricht zu keinem Zeitpunkt der frühen Embryonalentwicklung dem natürlichen Gehalt im Uterus. Zu diesem Zeitpunkt in der Entwicklung, da die Blastozyste noch nicht implantiert ist, wurden in vorherigen Studien 5% O<sub>2</sub> und zu Beginn der Implantation 3.5% O<sub>2</sub> im Uterus des Kaninchens gemessen (Fischer und Bavister, 1993). Diese Untersuchungen zeigen, dass die normale Entwicklung unter hypoxischen Bedingungen stattfindet. Auch Studien an Mausembryonen, die nach hypoxischer Behandlung im Blastozystenstadium in Trägartiere implantiert wurden und mit höherer Wahrscheinlichkeit die fötale Phase überlebten, bestätigen die Vorteile einer geringeren Sauerstoffkonzentration im in vitro Kultursystem (Feil et al., 2006).

#### 4.1.2.1.2 Suspensionskultur mit DMOG

Da die Etablierung einer konstanten Hypoxie im in vitro Kulturmodell nicht ganz unproblematisch ist, sollte in einer chemisch induzierten Hypoxie hervorgerufen durch den Einsatz von DMOG zunächst generelle Effekte getestet werden. Zu beachten ist allerdings auch bei dieser Kultur, dass physiologische Schwankungen des Sauerstoffgehalts nicht imitiert werden können. Die Bedingungen in diesem System entsprechen eher als in normaler Suspensionskultur einem an den Uterus-Sauerstoffpartialdruck angeglichenen. Diese Veränderungen führen tatsächlich zu einer Verbesserung der Inkubationsbedingungen: Sowohl morphologisch, als auch molekular durchlaufen die Embryonen eine normale Entwicklung. Die morphologische Unauffälligkeit entspricht dem Bild, das sich auch bei den normoxischen Kontrollembryonen bietet, ISH-Untersuchungen an den kultivierten Embryonen zeigen aber zusätzlich eine normale Ausprägung des *Dkk1*-Expressionsmusters: Die anteriore Domäne tritt spangenartig entlang des vorderen Randbogens auf, vergleichbar mit der Expression bei in vivo entwickelten Embryonen. Sollte durch diese Methode eine gestörte Zellwanderung wieder hergestellt werden können, stellt sich die Frage nach dem Effekt, den DMOG tatsächlich hervorruft: Als Inhibitor von Prolyl-4-hydroxylasen greift DMOG nicht nur in die Regulation von HIF ein, sondern könnte auch weitere biochemische Prozesse beeinflussen (Asikainen et al., 2005), die einen positiven Effekt auf die Expression und Anordnung der *Dkk1*-positiven Zellen haben. Um tatsächlich einen Hypoxieeffekt

nachweisen zu können, sind Untersuchungen mit definiertem Sauerstoffgehalt weit unter 20% nötig.

#### 4.1.2.1.3 Suspensionskultur unter strikter Hypoxie (1% Sauerstoffgehalt)

Die Inkubation von Embryonen in der Hypoxiekammer bietet den Vorteil einer strikt hypoxischen Umgebung direkt zu Beginn der Kultur, da auch das Ausspülen aus dem Uterus ohne Kontaminierung mit Luftsauerstoff durchgeführt werden kann. Der Nachteil ist die fehlende Anpassung der Sauerstoffkonzentration im Laufe der Entwicklung und dass die Kontrollembryonen zu während des Ausspülens und der Sortierung ebenfalls hypoxischen Bedingungen ausgesetzt werden müssen. Auffällig ist bei den mit 1% Sauerstoff kultivierten Embryonen auch eine sehr starke *Dkk1*-Expression, die allerdings in ihrer topographischen Verteilung nicht dem normalen Expressionsmuster entspricht: Zwar sind in den meisten Embryonen nur Zellen des vorderen Keimscheibenhälfte *Dkk1*-positiv, die bogenförmige Domäne bleibt aber nur bis zu einer einstündigen Inkubationsdauer erhalten. Alle anderen Embryonen zeigen ein unphysiologisches *Dkk1*-Muster. Der Grund hierfür könnte die bereits oben erwähnte eingeschränkte Zellwanderung zur Bildung der anterioren Strukturen sein, auf die die Hypoxie erst nach einer Stunde Einfluss hat. Auch morphologisch entspricht die Entwicklung nur in wenigen Fällen einer in vivo Entwicklung und stellt im Vergleich zur normoxischen Suspensionskultur eine Verschlechterung dar. Die Sauerstoffkonzentration von 1%, die auch nicht einem physiologischen Uterussauerstoffpartialdruck entspricht (Fischer und Bavister, 1993), hat offenbar einen negativeren Effekt auf die Entwicklung der Blastozyste, als die Luftsauerstoffkonzentration von 20%. Dies könnte auch der Grund sein, dass keine der untersuchten Blastozysten eine Inkubationsdauer von 18 Stunden überlebt hat. Bereits nach 8 Stunden sind die Blastozysten erheblich kleiner, als nach einer solchen Entwicklungszeit zu erwarten wäre, also hemmt die strikte Hypoxie nicht nur die Zellwanderung zur Bildung der vorderen *Dkk1*-Expressionsdomäne, sondern auch die normale Zellproliferation. Interessant ist die Beobachtung der normoxisch kultivierten Kontrollembryonen, die nach längerer Inkubationszeit wie erwartet (s.o.) ebenfalls ein unphysiologisches *Dkk1*-Expressionsmuster aufweisen, aber nach einstündiger Expression eine noch weitestgehend normal Entwicklung zeigen. Der Zeitraum von einer Stunde weist sich in diesem Experiment als kritische Phase aus, in der der Einfluss des umgebenden Milieus noch weitestgehend kompensiert werden kann.



#### 4.1.2.1.4 Suspensionskultur unter relativer Hypoxie (4-5% Sauerstoffgehalt)

Die Untersuchung im Sauerstoffinkubator ermöglicht zu Beginn des Versuchs die genaue mikroskopische Beurteilung der Keimscheibenmorphologie und die entsprechende Einteilung in Entwicklungsstadien; sie hat allerdings den Nachteil, dass die Blastozysten zunächst dem normalen Luftsauerstoff ausgesetzt werden. Gemäß den Ergebnissen der absoluten Hypoxie (s.o), der für eine Inkubationsdauer von bis zu einer Stunde keine Einschränkungen der Entwicklung zeigt, dürfte jedoch der Zeitraum während des Ausspülens und Sortierens der Blastozysten, da er weit unter einer Stunde liegt, keinen Einfluss auf den Erfolg der Kultur haben.

Die Kultivierung in relativer Hypoxie von 4% oder 5% Sauerstoffgehalt, stellt gegenüber dem absolut hypoxischen System eine Verbesserung dar: Die Blastozysten entwickeln sich bis zu einem Inkubationszeitraum von 4 Stunden weitestgehend normal und auch nach 8 Stunden in Kultur zeigen die meisten Embryonen noch eine weitestgehend physiologische Expression von *Dkk1* im Primitivstreifen. Doch auch in diesem Kultursystem ist nach einer Inkubationsdauer von 18 Stunden die Expression erheblich gestört, so dass die hypoxisch kultivierten Blastozysten keine verbesserte Entwicklung aufzeigen gegenüber den normoxischen Kontrollen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass zumindest bis zu einem Zeitraum von 4 Stunden, die Sauerstoffkonzentration von 4 bzw. 5% eine Verbesserung der Kulturbedingungen darstellt. Vielleicht wird die bis zu diesem Zeitpunkt konstante Sauerstoffkonzentration im physiologischen Uterusmilieu verändert, um sich den weiter entwickelten Embryonen anzupassen. In weiteren Versuchen könnte getestet werden, wie sich eine Änderung des Sauerstoffgehalts nach 4 Stunden auf die weitere morphologische und molekulare Entwicklung der Blastozysten auswirkt.

#### 4.1.2.2 Flachkultur

Die Flachkultur bietet methodisch die Möglichkeit Embryonen für einen bestimmten Zeitraum zu kultivieren und zu manipulieren. Die Ergebnisse der Standardkulturen zeigen, dass die Entwicklung der Embryonen als Flachkultur auf molekulare Ebene keine Einschränkungen erlebt: Das *Dkk1*-Expressionsmuster ist normal entlang des vorderen Randbogens angelegt. Auch die Bildung eines Primitivstreifens lässt sich nach 18 stündiger Kulturdauer beobachten. Diese stabile Expression im Kultursystem ermöglicht überhaupt erst die Untersuchung der normalen Entwicklung an einer isolierten Keimscheibenhälfte. Die

Expression in den linken direkt fixierten Keimscheibenhälften zeigt, dass die mechanische Reizung durch die Halbierung kaum Einfluss auf die *Dkk1* Expression hat. Die Expression der rechten kultivierten Hälfte fällt insgesamt etwas schwächer aus und zeigt keines der beiden Lateralitätsmerkmale („unscharf begrenzt“ und „breit“). Die „Spangenhälfte“ zeigt als Abweichungen vom normalen Expressionsmuster keine ausgeprägt lateralen Spangenenenden, vielmehr besteht sie aus dem schmalen anterioren Teil, der im vorderen Randbogen entsteht. Die schweifartige Endregion tritt also nicht auf. Vielleicht ist dies ein Indiz dafür, dass beide Keimscheibenhälften auf molekularer Ebene miteinander kommunizieren, um die korrekte Anlage einer lateralen Identität zu gewährleisten. Entfällt diese Verbindung, durch mechanische Trennung der beiden Keimscheibenhälften, kann die *Dkk1*-Expression, als Marker für die Lateralität sich nicht korrekt entwickeln. Wenn in weiteren Versuchen ausgeschlossen werden kann, dass systembedingte Einflüsse, beim Fehlen der lateralen Asymmetrie keine Rolle spielen, kann der Gedanke einer gegenseitigen Einflussnahme der rechten und linken Körperseite weiter verfolgt werden. Das Ergebnis, dass nach 90 Minuten Inkubation die Expressionsintensität stärker ist, als nach 30 und 60 Minuten gibt weitere Hinweise auf eine oszillierende Genexpression. Diese These müsste allerdings an einer größeren Anzahl von Embryonen verifiziert werden. Zunächst ist an dieser Stelle nur die Möglichkeit der gezielten medianen Halbierung und Kultivierung von Kaninchenembryonen vor Ausbildung des Primitivstreifens bewiesen.

Ein weiterer Vorteil der Flachkultur ist die Manipulation der Keimscheibenoberfläche. Wie vorangehende Studien zeigen (Weisheit, 2002), können transfizierte CHO-Zellen auf die Keimscheibe im Flachkultursystem aufgesetzt werden, und eine anschließende ISH ist möglich. Auch die Möglichkeit den inhibierenden Einfluss des Hypoblasten durch seine Entfernung zu unterbinden, besteht (Idkowiak et al., 2004). Die Kombination beider Methoden, um den direkten Einfluss des Hypoblastgens *Dkk1* auf den Epiblasten zu testen scheitert allerdings an methodischen Unzulänglichkeiten: Für die maximale Kulturdauer der Flachkultur ist dieser Zeitraum der Sezernierung aber ausreichend. Stattdessen sind beim Aufsetzen der Zellen auf die Hypoblast-resizierte Keimscheibe andere Probleme zu überwinden. Was bei nicht Hypoblast-resizierten Embryonen problemlos funktioniert (Weisheit, 2002) gestaltet sich durch die fragile Struktur des Epiblasten zum Problem: Das Aufspülen der Zellen in einem Tropfen Medium führt durch die Oberflächenspannung schon zum Reißen des Gewebes. Zusätzlich ist ein gezieltes Plazieren der Zellen auf diese Art nicht möglich.

Der Versuch stattdessen Zellaggregate mit Hilfe von Nadeln aufzusetzen scheitert an deren instabilen Struktur. Erst ab einer gewissen Größe haften die Zellen gut aneinander. Diese Größe übersteigt allerdings das Fassungsvermögen der Keimscheibe: Die Aggregate rutschen vom Hügel ab und reißen das Epiblastgewebe mit. Auch die Alternative beladene Beads zu benutzen, scheitert an deren Größe. Zusätzlich bieten sie nicht die Möglichkeit, einen ständig konstanten Spiegel von *Dkk1* aufrecht zu erhalten, da der Gehalt im Laufe der Kultur absinkt und nicht wie bei transfizierten CHO Zellen ständig neu gebildet wird. Grundsätzlich sind die Zellen als Trägermedium für *Dkk1* deshalb zu bevorzugen. Für dieses System müssen in weiteren Versuchen kleine, gut haftende Zellaggregate zugebildet werden oder alternative Möglichkeiten die inhibierende Wirkung des Hypoblasten zu simulieren entwickelt werden.

### 4.1.3 Zellkultur

#### 4.1.3.1 CHO Zellen

Die Kultur von CHO Zellen gestaltet sich unter Standardbedingungen problemlos. Da sie am Kulturflaschenboden anhaften, ist ein Wechseln des Mediums leicht möglich. Die Möglichkeit, diese Zellen einzufrieren und später wieder zu nutzen, schränkt weder ihre Teilungsrate noch ihre Adhäsion ein, macht sie aber zu einem leicht erschließ- und nutzbaren Zellsystem.

Auch die Lipofektion, um das Dkk-1-Plasmid einzuschleusen, beeinflusst die Zellen kaum. Leichte Einbussen der Teilungsrate nach der Behandlung fallen kaum ins Gewicht, angesichts der immer noch großen Zellmenge. Ein Großteil der Zellen integriert auch das Plasmid ins Genom (vgl. Abb. 25 A), produziert das Protein und sezernieren es in das umgebende Medium (vgl. Abb. 25 C). Diese Integration ist allerdings nicht von Dauer: Nach mehreren Teilungszyklen wird die fremde DNA aus dem Genom entfernt. Der Aufbau einer konstant Dkk-1 produzierenden CHO-Zelllinie bedarf einiger weiterer Integrationsversuche.

#### 4.1.3.2 Hypoblastzellen

Um die Wirkung des Hypoblasten auf den Epiblasten oder umgekehrt, sowie dessen Reaktion auf Manipulationen, wie zum Beispiel eine Änderung des umgebenden Milieus zu untersuchen stellt ein isoliertes Zellkultursystem eine gute Möglichkeit dar. Durch die Gewinnung der Hypoblastzellen, als Produkt der Resektion bietet sich diese Möglichkeit,

diese in Kultur zu nehmen an. Als Problem stellt sich allerdings die geringe Zellzahl, die von nur einer Keimscheibe gewonnen werden kann, heraus: Die einsetzbare Gewebemenge lässt es nicht zu, die Zellen durch Trypsinierung zu vereinzeln, da der Verlust durch anschließende Waschschriffe zu groß ist. Einzeln eingesetzte Hypoblasten wachsen in Kultur nicht an und sterben ab. Stattdessen können nur ganze Hypoblasten gesammelt (etwa 4) und zusammen in einem Tropfen Medium angesetzt werden. Der Einsatz eines einzelnen Tropfens, statt einer größeren Menge Medium ermöglicht es, die Hypoblastzellen im System stabil an einer Stelle zu halten und zu beobachten. Andererseits birgt diese Kulturmethode die Gefahr der Austrocknung und bedarf ständiger Kontrolle. Um diesem entgegen zu wirken, bietet es sich an, die Petrischale mit dem Tropfen in einer feuchten Kammer unterzubringen. Wenn die Idealbedingungen eingestellt werden können, adherieren die Zellen nach ca. 18 Stunden am Boden der Petrischale, so dass der Mediumspegel erhöht werden kann, ohne ein Abschwimmen der Zellen zu verursachen. Weitere 18 Stunden im Kultursystem hat bisher kein Hypoblastzellansatz überlebt; Die Zellen lösen die Bindung zum Schalenboden und sind im Medium nicht mehr auszumachen. Ursachen hierfür können zahlreich sein: Neben der Austrocknungsgefahr zu Beginn der Kultur kann im anschließenden „Fluten“ der adherierten Zellen ein Fehler liegen. Da das Medium nicht idealerweise für Hypoblastzellen entwickelt ist, sondern an eine breite Anzahl von Zellkulturen (zum Beispiel CHO- und Kaninchenembryonenkulturen) angepasst ist, können wichtige Faktoren für die Hypoblastzellen fehlen oder störende Faktoren im Medium deren Wachstum beeinflussen. Zusätzlich gestalten die standardisierten Umgebungsbedingungen, wie O<sub>2</sub> - und CO<sub>2</sub>-Gehalt, Temperatur und Luftfeuchtigkeit vielleicht kein ideales Klima für Hypoblastzellen. All diese Faktoren müssen in weiteren Untersuchungen überprüft werden, um eine konstante Hypoblastzelllinie etablieren zu können.

## 4.2 Variabilität und Stabilität embryonaler Gen-Expressionsmuster

### 4.2.1 *Dkk1*

In-situ Hybridisierungen ganzer Kaninchenkeimscheiben zeigen schon im Stadium 0 *Dkk1*-exprimierende Zellen. Die früheste Expression in der Maus ist erst ab 6,5 dpc nachgewiesen. Das *Dkk1* Expressionsmuster verläuft spangenartig entlang des vorderen Keimscheibenrandes. Diese spangenartige Expressionsdomäne ist auch in der Maus beschrieben (Perea-Gomez et al., 2004), hier tritt sie allerdings erst später, vor Beginn der

Gastrulation und nicht schon in einem mit dem Stadium 0+ des Kaninchens vergleichbaren frühen Stadium auf. Dieses frühe Auftreten von *Dkk1* exprimierenden Zellen ermöglicht zu diesem Zeitpunkt bereits die Zuordnung einer anterior-posterioren Achse. Histologische Untersuchungen zeigen eine Beschränkung der *Dkk1* positiven Zellen auf den Hypoblasten. Auch in Mausembryonen wird *Dkk1* im viszeralem Endoderm, Homolog des Hypoblasten exprimiert (Monaghan et al., 1999). Die Bedeutung von *Dkk1* für die korrekte Ausbildung der Kopfstrukturen beschränkt sich auf eine inhibitorische. Zwar zeigt die *Dkk1*-Mausmutante keine Kopfstrukturen oberhalb des Mittelhirns (Mukhopadaya et al., 2001), initiiert wird die Kopfentwicklung aber nicht von *Dkk1*, sondern von von *Dkk1* direkt oder indirekt kontrollierten Faktoren. Vielmehr scheint *Dkk1* für eine Art „Feinabstimmung“ der Abläufe während der Ausbildung der anterior-posterioren Achse zuständig zu sein, indem es inhibierend in die *wnt* Kaskade eingreift (Glinka et al., 1998; Niehrs et al., 1999). Hinweise auf die spezielle Funktion, gibt auch das lokal begrenzte Expressionsmuster: Die *Dkk1* Expressionsspanne lässt im Zentrum der Keimscheibe einen Bereich aus, der in etwa der Expression von *Cer1* entspricht. Dies könnte auf ein Zusammenspiel dieser beiden Gene, entweder durch direkte oder indirekte Inhibierung oder Aktivierung deuten.

Das Expressionsmuster weist zusätzlich zur anterior-posterioren Asymmetrie eine laterale Asymmetrie auf: Die beiden Asymmetriemerkmale „unscharf begrenzt“ und „breit“ (Erläuterung s.o.) beschreiben die *Dkk1*-Expressionsmuster auftretende seitlich unterschiedlich auftretende Ausprägung der Spangenenden. Die Vermutung, dass diese Asymmetrie in direktem Zusammenhang mit späterer Festlegung der lateralen Identität steht, konnten quantitative Auswertungen nicht bestätigen. Auffällig ist aber dennoch, dass die Asymmetrie nur in einem begrenzten entwicklungsbiologischen Zeitfenster auftritt: Embryonen des Stadiums 0 zeigen noch nicht das vollständig ausgebildete markante Spangennmuster entlang der anterioren Marginalgrenze, so dass hier keine Lateralität festgestellt werden kann. Erst ab Stadium 1 lässt sich in der vollständig entwickelten Expressionsdomäne die laterale Asymmetrie erkennen. Die deutliche links-rechts unterschiedlich ausgeprägte Expressionsspanne zeigt sich in der Mehrzahl der untersuchten Keimscheiben. Auch Keimscheiben des Stadiums 2 zeigen eine asymmetrische *Dkk1*-Expression, jedoch in weitaus geringerer Anzahl von Embryonen. Nur selten entspricht diese Asymmetrie den Kriterien beider festgelegter Lateralitätsmerkmale. In Stadium 3 geht die Bedeutung der anterioren Expressionsdomäne zurück zugunsten der Expression im Primitivstreifen. Deshalb ist die Zahl der asymmetrisch exprimierenden Keimscheiben deutlich geringer. Die Frage nach einer funktionellen Bedeutung dieser kurzen, aber

auffälligen Asymmetrie kann durch rein quantitative Auswertung nicht geklärt werden. Das Ergebnis, dass die Lateralitätsmerkmale („unscharf begrenzt“ und „breit“) wechselseitig links oder rechts auftreten können, also nicht konstant einer Körperseite zugeordnet werden können, lässt die Vermutung einer oszillierenden *Dkk1*-Genexpression aufkommen.

#### 4.2.2 *Cer1*

*Cer1*-positive Zellen sind im Stadium 0 des Kaninchenembryos häufig im Zentrum der Keimscheibe zu finden. Dies entspricht Befunden in der Maus, bei der distale *Cer1*-Expression in prägastrulären Stadien gefunden wurde (Belo et al., 1997), was unter Beachtung der zylindrischen Form des Mausedembryos der Mitte einer Keimscheibe entspricht. In einigen untersuchten Kaninchenembryonen (vgl. Abb 15 A, C) fällt aber auch in Stadium 0 schon die Verlagerung der *Cer1*-Expressionsdomäne in Richtung eines Keimscheibenpols, des zukünftigen anterioren auf. Damit ist auch *Cer1*, ähnlich wie *Hex* einer der frühesten Marker für die anterior-posteriore Achse, während in der Maus erst später in der Entwicklung die *Cer1*-Expression anterior nachweisbar ist. Die exklusive Expression im Hypoblasten des Kaninchens bestätigt sich auch für das Huhn (Foley et al., 2000) und die Maus, wo *Cer1*-Transkripte im AVE exprimieren (Belo et al., 1997). Allerdings ist zu Beginn der Entwicklung im Huhn *Cer1* im posterioren Hypoblasten exprimiert, was auf den unterschiedlichen Ursprung der Hypoblasten von Säuger und Vogel zurückzuführen ist (Foley et al., 2000.). *Cer1* inhibiert die Bildung des Primitivstreifens in Maus (Perea-Gomez, et al., 2002) und im Huhn (Bertocchini et al., 2002), ist aber nicht zwingend notwendig für die Kopfentwicklung. Dies bestätigen auch Untersuchungen der *Cer1* Mausmutante, die phänotypisch unauffällig ist (Shawlot et al., 2000 ; Simpson et al., 1999). Erst in Verbindung mit *Lefty* fallen in der Doppelmutante phänotypische Veränderungen auf: Die Embryonen bilden ektope Primitivstreifen und Achsendublikationen aus. *Cer1* ist also nur synergistisch mit *Lefty* in der Lage nodal vollständig zu inhibieren. *Nodal* trägt für die Wanderung der distalen VE Zellen, zur Bildung des AVE in der Maus Verantwortung, wie die nodal<sup>-/-</sup> Mausmutante (Conlon et al., 1994) zeigt, bei der diese Wanderungsbewegung unterbunden ist (Yamamoto und Oelgeschlager, 2004). Die Inhibition von nodal durch *Cer1* und *Lefty* verhindert also bis zu dem passenden Zeitpunkt während der Entwicklung die Wanderung der Zellen des VE, bzw. der Hypoblastzellen im Kaninchen, zu Ausbildung der Hypoblastzellen des vorderen Randbogens. Dieses genetische Zusammenspiel bedarf einer Feinabstimmung sowohl zeitlich, als auch räumlich, um zum richtigen Zeitpunkt und an der richtigen Stelle Schritte einzuleiten, die zur Festlegung einer anterior-posterioren Achse führt. Die Expressionsdomänen von *Cer1*

und *Lefty* zu Beginn der Gastrulation, die sich teilweise überlagern (mittig anterior) , an anderen Stellen aber unterschiedlich ausgeprägt sind (keine Primitivstreifendomäne in frühen PS Stadien bei *Lefty*, zusätzliche Domäne bei *Cer1*) können Hinweise darauf geben, zu welchen Zeitpunkt der Entwicklung eines der beiden Gene allein oder beide zusammen für die Weiterentwicklung der anteriore-posterioren Achse verantwortlich sind. Der Einfluss von *Cer1* für die anterior-posteriore Musterbildung wird also von den in dieser Arbeit vorgestellten Daten bestätigt. Unklar ist hingegen die Bedeutung der lateralen Asymmetrie des *Cer1*-Expressionsmusters, noch vor Beginn der Gastrulation. Die Verlagerung zu einer der beiden Körperseiten bei *Cer1*-exprimierenden Zellen konnte zu diesem frühen Zeitpunkt in anderen Spezies bisher noch nicht gezeigt werden. Im Huhn wird erst zum Zeitpunkt der Organogenese *Cer1* als beeinflussender Faktor für die laterale Asymmetrie des Herzens diskutiert (Zhu et al., 1990). Die Asymmetrie im Kaninchen zeigt sich leider äußerst inkonsistent, weshalb eine genaue Untersuchung der funktionellen Bedeutung von *Cer1* nicht weiter möglich ist. Interessant ist aber die Möglichkeit, dass *Cer1* schon zu diesem frühen Zeitpunkt einen Einfluss auf die spätere rechts-links Achse haben könnte. Als wichtiger Inhibitor von Nodal, das in späterer Entwicklung links-asymmetrisch exprimiert wird (Rodriguez-Esteban et al., 2004) ist eine frühzeitige laterale Expression von *Cer1* durchaus sinnvoll. Einen Hinweis auf eine spätere rechts-links Identität oder die Zugehörigkeit zu einer Körperseite kann jedoch noch nicht bestätigt werden, da die Verlagerung der *Cer1*-exprimierenden Zellen nicht konstant auftritt.

#### 4.2.3 *Lefty1*

*Lefty*-Expression kann schon sehr früh (Stadium 0) während der Entwicklung des Kaninchenembryos nachgewiesen werden. Auch in Studien an der Maus (Perea-Gomez et al., 2002); (Yamamoto et al., 2004) zeigt sich *lefty1* bereits früh, zu diesem Zeitpunkt noch nicht als Marker für eine laterale Asymmetrie, wie in Somitenstadien der Maus (Meno et al., 1998). Bereits im Stadium 1, ist das Expressionsmuster eindeutig anterior orientiert, in einer an der Mittellinie verlaufenden Expressionsdomäne. Diese mittige Expression von *Lefty1* konnte bisher nur am Kaninchen gezeigt werden. Während der Entwicklungsstadien 2 und 3 wird diese aber schwächer. Erst ab Stadium 4 gibt es ein starkes Signal in zwei seitlichen Expressionsdomänen, die ein *lefty1*-positives Areal im anterioren Primitivstreifen begleiten (nicht gezeigt). Diese zyklischen Änderungen der *Lefty1* Expression beschreiben auch Meno et al. in der Maus, was die Bedeutung von *Lefty1* nur für bestimmte Entwicklungsstufen

unterstreicht. Notwendige Schwankungen der *Lefty1*-Expression könnten auch mit der synergistischen Wirkung von *Lefty1* und *cer1* erklärt werden. Wie die Doppelmutante von *Cer1* und *Lefty1* zeigt, sind diese beiden Gene gemeinsam notwendig für die vollständige Nodalinhibierung, während der Verlust von *Lefty1* allein kaum Einfluss auf die normale Gastrulation bzw. Primitivstreifenbildung hat. Die geringe Expression von *Lefty1* während der Stadien 2 und 3 scheint die Primitivstreifenbildung vorzubereiten, bzw. zu begleiten. Die inhibierende Wirkung auf *nodal*, das eine essentielle Rolle bei der Mesodermentwicklung des Primitivstreifens spielt, muss zu Beginn der Gastrulation reduziert werden: Sowohl im Zebrafisch, als auch im Frosch, ebenso wie in der Maus führt das Fehlen von *nodal* zur Blockierung der Mesoderminduktion (Conlon et al., 1991; Zhou et al., 1993). Gleichzeitig aktiviert *nodal* selbst aus dem Epiblasten *nodal* und seine Antagonisten *Lefty1* und *Cer1* im viszerale Endoderm (Waldripetal et al., 1998; Brennan et al., 2001; Yamamoto et al., 2001). Zusätzlich nimmt dieser Reiz Einfluss auf die Wanderung von Zellen des VE zum anterioren Pol des Embryos (Ding et al., 1999; Yamamoto et al., 2004; Meno et al., 2001), so dass anterior ein Areal von *nodal*-Antagonisten entsteht, dass die Expression auf den posterioren Pol limitiert (Perea-Gomez et al., 2002). Die ausgesprochen starke *Lefty1*-Expression im Stadium 4 könnte ein Anzeichen dafür sein, dass nach Bildung des Primitivknotens, die *nodal*-Aktivität durch Inhibierung seitens *Lefty1* nun wieder reduziert werden muss. Interessant zur Klärung dieser komplexen molekularen Signalwege wäre ein direkter Vergleich der *Lefty1*-Expression mit der von *nodal* und *Cer1*, durch eine Mehrfachfärbung in der ISH.

#### 4.2.4 Hex

Bereits am 5. Tag nach der Konzeption, sind die ersten Anzeichen einer *Hex*-Expression im Kaninchenembryo zu erkennen: Im Stadium 0 wird *Hex* noch ohne polare Orientierung zu einer der beiden Keimscheibenseiten exprimiert. Embryonen des Stadiums 1 zeigen jedoch zeitgleich mit dem Auftreten des vorderen Randbogens, als erstes ‚morphologisches Anzeichen der anterior-posterioren Achse, eine anterior gelagerte *Hex*-Expression. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit Untersuchungen in der Maus, in denen *Hex* zunächst in der distalen Spitze des Eizylinders (Lu et al., 2001) und anschließend im anterioren viszerale Endoderm (AVE, homolog zum anterioren Hypoblasten des Kaninchens) (6,5 dpc) nachgewiesen wurde (Thomas et al., 1998). In der Maus stellt *Hex* einen der frühesten Marker für die anterior-posteriore Achsenbildung dar (Thomas et al., 1998), während die Darstellung in der flachen Keimscheibe des Kaninchens verdeutlichen



kann, dass andere Gene weitaus früher in der Entwicklung eine anterior-posteriore Polarität markieren. Die Verlagerung *Hex*-exprimierender Zellen nach anterior findet man nicht nur in Säugern, wie dem Kaninchen oder der Maus, sondern auch im *Xenopus*-Embryo, was dieses Expressionsmuster als konserviert innerhalb der Vertebratenentwicklung kennzeichnet (Jones et al., 1999). Die Rolle des anterioren Hypoblasten als Region mit Kopf-induzierender Aktivität zeigen mehrere Knock-out Modelle, wie *Hesx1*, *Otx2*, aber auch die *Hex*<sup>-/-</sup> Maus: Diese ist bereits embryonal letal und weist anteriore Defekte auf. Die maßgebliche Rolle von *Hex* für die Entwicklung einer korrekten Kopfanlage auch beim Kaninchen zeigt sich in der Übereinstimmung mit der Lage der positiven Zellen sowohl in Abhängigkeit von der Körperachse, als auch in der Zugehörigkeit zur Schicht des anterioren Hypoblasten, der wie das AVE (Beddington et al., 1999; Rivera-Perez et al., 2001) morphologisch und molekular unterscheidbare Zellen beinhaltet. Die relativ breite Expressionsdomäne von *Hex* im der anterioren Hälfte der Keimscheibe deutet auf einen großen inhibitorischen Einfluss von *Hex* im Säuger hin, wie auch in *Xenopus* gezeigt wurde, wo das Gen als transkriptioneller Repressor von indizierenden Einflüssen des Spemann-Organisators bestätigt wurde (Zamparini et al., 2006).

Zusammenfassend können die Expressionsmuster der hier beschriebenen Gene *Dkk1*, *Cer1*, *Lefty1* und *Hex* als wichtige Bestandteile der molekularen „Blaupause“ gesehen werden, die der morphologischen Entwicklung der frühen Körperachsen vorangeht. Die in Größe und Intensität variablen Expressionsmuster deuten auf eine flexible und nicht starr festgelegte Vorgabe für die embryonale Differenzierung. Auch die zeitlich unterschiedliche Expression in den verschiedenen Entwicklungsstadien deutet auf eine schrittweise Veränderung sowohl auf molekularer, als auch auf morphologischer Ebene hin. Die „Blaupause“ der frühen Achsenentwicklung darf also nicht als starre determinierende Vorlage eines kompletten zukünftigen Körperbaus gesehen werden, sondern vielmehr als dynamischer Prozess, der Signale abgibt und auf Signale reagiert.

## 5 Zusammenfassung

Hintergrund der vorliegenden Arbeit sind molekulare Mechanismen, die an der Differenzierung der Körperachsen in der frühen Gastrulationsphase des Säugerembryos beteiligt sind. Variabilität und Stabilität der molekularen „Blaupause“, die der morphologischen Entwicklung zu Grunde liegt, wurden exemplarisch an im Hypoblast exprimierten Schlüsselgenen der frühen Achsenentwicklung *Dkk1*, *Cer1*, *Lefty* und *Hex* untersucht. Für die Untersuchungen wurde das Kaninchen als Modellorganismus ausgewählt, weil es mit seiner flachen Keimscheibe für den Säugerembryo in besonderer Weise repräsentativ und durch seine späte Implantation für die Embryokultur in vitro besonders geeignet ist. Bis auf *Hex* zeigen die ausgewählten Gene in Form und Größe zwar variable Expressionsmuster, die jedoch schon im Stadium 0, vor dem erstem Auftreten der morphologisch sichtbaren anterior-posterioren Differenzierung der Keimscheibe in einem axial polarisierten Muster auftreten. Die spangenförmig am vorderen Randbogen verlaufende *Dkk1*-Expressionsdomäne zeigt eine vorübergehende laterale Asymmetrie, die in Stadium 1 häufiger als in Stadium 2 auftritt. Quantitative Analysen dieser Asymmetrie lassen jedoch keine Präferenz für eine der beiden Körperseiten erkennen, so dass diese Lateralität keinen Hinweis auf eine frühe Festlegung der Rechts-links-Identität des embryonalen Körpers gibt. Das charakteristische spangenförmige *Dkk1*-Expressionsmuster wandelt sich in Kultur unter normoxischen Kulturbedingungen zu einer flächigen zentral angeordneten Domäne um, kann aber durch Reduktion des Sauerstoffgehaltes auf 4% oder 5% während der Kultur bis zu 4 Stunden und durch chemisch induzierte Hypoxie (DMOG im Kulturmedium) auch dauerhaft in seiner anterioren Lage erhalten werden; eine rechts-links Asymmetrie ist dann jedoch nicht mehr feststellbar. Der positive Hypoxie-Effekt kann durch eine nach anterior und zentrifugal ausgerichtete Wanderungsbewegung der Hypoblastzellen erklärt werden, die in vitro offensichtlich nur unter einer dem physiologischen Sauerstoffpartialdruck im Uterus angepassten Hypoxie annähernd normal abläuft. Die Hypothese der ausbleibenden Zellwanderung wird auch gestützt durch die Ergebnisse an sogenannten Flachkulturen, bei denen isolierte Keimscheiben auf eine Unterlage von 1% Agarose kultiviert werden; dabei ist eine Positionsveränderung der Hypoblastzellen offensichtlich stark eingeschränkt, sodass das spangenförmige Expressionsmuster erhalten bleiben kann. Bei getrennter Untersuchung isolierter median getrennter Keimscheibenhälften bleibt dieses Muster zwar erhalten, die Expressionsstärke variiert jedoch abhängig von der Kulturdauer. Die laterale Variabilität im *Dkk1*-Expressionsmuster könnte daher auch auf eine oszillierende Gen-Expression zurückgeführt werden.

### III Abbildungsverzeichnis:

- Abb. 1** Eizylinder des Mausembryos zu Beginn der Gastrulation
- Abb. 2** Signalwege
- Abb. 3** Regulation der HIF $\alpha$ -Untereinheit
- Abb. 4** pGEM-T Easy Vektor
- Abb. 5** Entwicklungsstadien des Kaninchenembryos
- Abb. 6** Flachkultur nach New (Querschnitt)
- Abb. 7** Halbierung einer Keimscheibe
- Abb. 8** Suspensionskultur
- Abb. 9** Sterilbank mit Sauerstoffkontrolle
- Abb.10** Einbettung von Keimscheiben
- Abb.11** SDS Gel
- Abb.12** Aufbau des Blots
- Abb.13** *Dkk1*-Expression in Keimscheiben des Kaninchens vor und während der frühen Gastrulation
- Abb.14** Variabilität der asymmetrischen *Dkk1* Expression
- Abb.15** *Cer1*-Expressionsmuster in Keimscheiben des Kaninchens vor und während der frühen Gastrulation
- Abb.16** *Lefty1* Expressionsmuster in Keimscheiben des Kaninchens vor und während der frühen Gastrulation
- Abb.17** Expressionsmuster des Gens *Hex* auf Transkriptionsebene
- Abb.18** Suspensionskultur unter Standardbedingungen
- Abb.19** Suspensionskultur mit DMOG
- Abb.20** Suspensionskultur unter „absolut“ hypoxischen Bedingungen (1% Sauerstoff)
- Abb. 21** Suspensionskultur unter „relativ“ hypoxischen Bedingungen (4% Sauerstoff oder 5% Sauerstoff)
- Abb.22** Flachkultur nach New
- Abb.23** Embryonenkultur nach Halbierung der Keimscheibe
- Abb. 24** CHO-Zellen in Kultur
- Abb. 25** Transfizierte CHO-Zellen in Kultur

## IV Literaturverzeichnis

- Asikainen, T. M., A. Ahmad, et al. (2005). "Effect of preterm birth on hypoxia-inducible factors and vascular endothelial growth factor in primate lungs." Pediatr Pulmonol **40**(6): 538-46.
- Beddington, R. S. and E. J. Robertson (1999). "Axis development and early asymmetry in mammals." Cell **96**(2): 195-209.
- Bedford, F. K., A. Ashworth, et al. (1993). "HEX: a novel homeobox gene expressed during haematopoiesis and conserved between mouse and human." Nucleic Acids Res **21**(5): 1245-9.
- Belo, J. A., T. Bouwmeester, et al. (1997). "Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula." Mech Dev **68**(1-2): 45-57.
- Bertocchini, F., I. Skromne, et al. (2004). "Determination of embryonic polarity in a regulative system: evidence for endogenous inhibitors acting sequentially during primitive streak formation in the chick embryo." Development **131**(14): 3381-90.
- Bogue, C. W., G. R. Ganea, et al. (2000). "Hex expression suggests a role in the development and function of organs derived from foregut endoderm." Dev Dyn **219**(1): 84-9.
- Campione, M., H. Steinbeisser, et al. (1999). "The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping." Development **126**(6): 1225-34.
- Conlon, F. L., K. M. Lyons, et al. (1994). "A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse." Development **120**(7): 1919-28.
- Dale, J. K., P. Malapert, et al. (2006). "Oscillations of the snail genes in the presomitic mesoderm coordinate segmental patterning and morphogenesis in vertebrate somitogenesis." Dev Cell **10**(3): 355-66.
- Ding, J., L. Yang, et al. (1998). "Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo." Nature **395**(6703): 702-7.
- Feil, D., M. Lane, et al. (2006). "Effect of culturing mouse embryos under different oxygen concentrations on subsequent fetal and placental development." J Physiol **572**(Pt 1): 87-96.
- Fischer, A., C. Viebahn, et al. (2002). "FGF8 acts as a right determinant during establishment of the left-right axis in the rabbit." Curr Biol **12**(21): 1807-16.
- Fischer, B. and B. D. Bavister (1993). "Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits." J Reprod Fertil **99**(2): 673-9.

- Foley, A. C., I. Skromne, et al. (2000). "Reconciling different models of forebrain induction and patterning: a dual role for the hypoblast." Development **127**(17): 3839-54.
- Glinka, A., W. Wu, et al. (1998). "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction." Nature **391**(6665): 357-62.
- Grapin-Botton, A. and D. Constam (2007). "Evolution of the mechanisms and molecular control of endoderm formation." Mech Dev **124**(4): 253-78.
- Harrison, H. H. and D. J. Joslyn (1991). "Gene expression patterns in the black blowfly (*Phormia regina*) as revealed by two-dimensional electrophoresis of proteins. I. Developmental stage-specific and sex-specific differences." Biochem Genet **29**(11-12): 559-76.
- Hiiragi T, S. D. Solter (2005). "Mechanism of first cleavage specification in the mouse egg: is our body plan set at day 0?" Cell Cycle **4**(5): 661-4.
- Idkowiak, J., G. Weisheit, et al. (2004). "Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo." Dev Genes Evol **214**(12): 591-605.
- Idkowiak, J., G. Weisheit, et al. (2004). "Polarity in the rabbit embryo." Semin Cell Dev Biol **15**(5): 607-17.
- Iyer, N. V., L. E. Kotch, et al. (1998). "Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ ." Genes Dev **12**(2): 149-62.
- Jones, C. M., J. Broadbent, et al. (1999). "An anterior signalling centre in *Xenopus* revealed by the homeobox gene XHex." Curr Biol **9**(17): 946-54.
- Juan, H. and H. Hamada (2001). "Roles of nodal-lefty regulatory loops in embryonic patterning of vertebrates." Genes Cells **6**(11): 923-30.
- Knoetgen, H., C. Viebahn, et al. (1999). "Head induction in the chick by primitive endoderm of mammalian, but not avian origin." Development **126**(4): 815-25.
- Levin, M. (2005). "Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review." Mech Dev **122**(1): 3-25.
- Lomb, D. J., J. A. Straub, et al. (2007). "Prolyl hydroxylase inhibitors delay neuronal cell death caused by trophic factor deprivation." J Neurochem **103**(5): 1897-906.
- Lu, C. C., J. Brennan, et al. (2001). "From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo." Curr Opin Genet Dev **11**(4): 384-92.
- Mao, B., W. Wu, et al. (2001). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." Nature **411**(6835): 321-5.

- Mao, B., W. Wu, et al. (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling." Nature **417**(6889): 664-7.
- Martinez-Barbera, J. P. and R. S. Beddington (2001). "Getting your head around Hex and Hesx1: forebrain formation in mouse." Int J Dev Biol **45**(1): 327-36.
- Meno, C., Y. Saijoh, et al. (1996). "Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member lefty in mouse embryos." Nature **381**(6578): 151-5.
- Meno, C., A. Shimono, et al. (1998). "lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal." Cell **94**(3): 287-97.
- Monaghan, A. P., P. Kioschis, et al. (1999). "Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages." Mech Dev **87**(1-2): 45-56.
- Niehrs, C. (1999). "Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer." Trends Genet **15**(8): 314-9.
- Pearce, J. J., G. Penny, et al. (1999). "A mouse cerberus/Dan-related gene family." Dev Biol **209**(1): 98-110.
- Perea-Gomez, A., A. Camus, et al. (2004). "Initiation of gastrulation in the mouse embryo is preceded by an apparent shift in the orientation of the anterior-posterior axis." Curr Biol **14**(3): 197-207.
- Perea-Gomez, A., F. D. Vella, et al. (2002). "Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks." Dev Cell **3**(5): 745-56.
- Rivera-Perez, J. A., J. Mager, et al. (2003). "Dynamic morphogenetic events characterize the mouse visceral endoderm." Dev Biol **261**(2): 470-87.
- Schier AF, T. W. Talbot(2005). "Molecular genetics of axis formation in zebrafish." Annu Rev Genet **39**: 561-613.
- Schulte-Merker, S., M. Hammerschmidt, et al. (1994). "Expression of zebrafish goosecoid and no tail gene products in wild-type and mutant no tail embryos." Development **120**(4): 843-52.
- Stern, C. D. (2004). "Gastrulation: From Cells to Embryo", Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stern, C. D., J. Charite, et al. (2006). "Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems?" Int J Dev Biol **50**(1): 3-15.
- Tabin, C. J. (2006). "The key to left-right asymmetry." Cell **127**(1): 27-32.

- Tam, P. P. (2004). "Embryonic axes: the long and short of it in the mouse." Curr Biol **14**(6): R239-41.
- Tam, P. P. and R. R. Behringer (1997). "Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan." Mech Dev **68**(1-2): 3-25.
- Tam, P. P., M. Kanai-Azuma, et al. (2003). "Early endoderm development in vertebrates: lineage differentiation and morphogenetic function." Curr Opin Genet Dev **13**(4): 393-400.
- Thomas, P. Q., A. Brown, et al. (1998). "Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors." Development **125**(1): 85-94.
- Weisheit (2002). "Molekulare Differenzierung und Musterbildung im Hypoblasten während der embryonalen Frühentwicklung des Kaninchens." Universität Bonn.
- Wolpert, L. (1999). "Entwicklungsbiologie". Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Yamamoto, M., C. Meno, et al. (2001). "The transcription factor FoxH1 (FAST) mediates Nodal signaling during anterior-posterior patterning and node formation in the mouse." Genes Dev **15**(10): 1242-56.
- Yamamoto, Y. and M. Oelgeschlager (2004). "Regulation of bone morphogenetic proteins in early embryonic development." Naturwissenschaften **91**(11): 519-34.
- Zamparini, A. L., T. Watts, et al. (2006). "Hex acts with beta-catenin to regulate anteroposterior patterning via a Groucho-related co-repressor and Nodal." Development **133**(18): 3709-22.
- Zhu, L., M. J. Marvin, et al. (1999). "Cerberus regulates left-right asymmetry of the embryonic head and heart." Curr Biol **9**(17): 931-8.

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

---

Name:	Juliane Plitzner
Anschrift:	Tonstr. 6 30449 Hannover
Telefon:	0511/2135351
Email:	JulianePlitzner@hotmail.com
Geboren:	06. Februar 1976
Geburtsort:	Georgsmarienhütte
Staatsangehörigkeit	deutsch

## **Bildungsweg**

---

1982-1986	Grundschule, Borgloh
1986-1988	Orientierungsstufe Dom, Osnabrück
1988-1996	Gymnasium Ursulaschule, Osnabrück
Oktober 1996	Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Osnabrück
Juli/August 1998	Vordiplom
August 2002	Beendigung der Diplomarbeit
Januar 2004-	Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Zentrums Anatomie,
Dezember 2007	Abteilung Anatomie und Embryologie, Georg-August-Universität Göttingen
März 2008	Meldung zur Promotion(Rigorosum)

Hannover, den 18. März 2008



## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation mit dem Titel: „Variabilität molekularer axialer Differenzierung am Beginn der Gastrulation beim Kaninchen“ selbständig und ohne Hilfe angefertigt wurde.

Hannover, den 18.März 2008

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich an keiner anderen Universität, weder im In-, noch im Ausland um einen Doktorgrad beworben habe.

Hannover, den 18.März 2008

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir während dieser Doktorarbeit zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. Christoph Viebahn danke ich in besonderem Maße für die Unterstützung dieser Arbeit, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten in seiner Arbeitsgruppe, sowie für das interessante Thema. Seine ausgezeichnete Betreuung und immerwährende Bereitschaft sich Zeit für Fragen und Probleme zu nehmen, haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit und meiner Freude daran beigetragen.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. E. Wimmer für das Interesse und die Bereitschaft das Referat für diese externe Doktorarbeit zu übernehmen, Herrn Prof. Dr. T. Pieler danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke meinen Kollegen und Kolleginnen aus der Arbeitsgruppe Anatomie und Embryologie für die gute Zusammenarbeit und die angenehme, familiäre Arbeitsatmosphäre. Hier habe ich einige besondere Menschen kennen gelernt, die mich freundlich und hilfsbereit unterstützt haben: Dr. Bernd Püschel danke ich herzlich, weil er mir bei der Lösung theoretischer und praktischer Probleme stets hilfreich zur Seite stand und nicht zuletzt dafür, dass er mir sein Notebook zur Verfügung gestellt hat. Das technische Personal ist das Rückgrat der professionellen Arbeit im Labor: Ein großes Dankeschön an Heike Faust, die mir sowohl fachlich auf hervorragende Art und Weise immer geholfen hat, als auch mit ihrer Fröhlichkeit und positiven Persönlichkeit schwere Tage erleichterte. Irmgard Weiß und Kirsten Falk-Stietenroth danke ich herzlich für den tollen Einsatz und die Bereitschaft jederzeit „Helfer in der Not“ zu sein. Hannes Sydow, der mich nicht zum Mac bekehren konnte, danke ich für die Lösung meiner EDV-Probleme. Heike Altmann, Anja Aue und Gabriele Schmidt, die mir nicht nur professionell, sondern immer auch mit einem Lächeln bei allen administrativen Fragen helfen konnten, danke ich herzlich.

Gunnar Weisheit und Jan Idkowiak danke ich für ihre hervorragende Vorarbeit und ihre Bereitschaft sich stets meinen vielen Fragen zu stellen.

Melanie und Arne Weiß danke ich für ihre Freundschaft.

Mein größter Dank gilt meiner Familie bei der ich mich immer bestärkt und geborgen fühle: Meinen Eltern, die mir beibrachten, Wissen stets als höchstes Gut zu betrachten und mich ermutigt haben, meinen eingeschlagenen Weg zu gehen, danke ich für ihre Liebe und ihre Anerkennung.

Meinen Schwestern und ihren Männern, die mir Vorbild sind und waren und für die ich auch manchmal Vorbild sein darf, danke ich für ihren Rat und ihre liebevolle Unterstützung.

Meiner geliebten Freundin Sandra danke ich für ihre Liebe und ihre Stärke. Sie ist für mich ein Vorbild an Herzlichkeit, Intelligenz, Fleiß und Kompetenz, war mir Ansporn und Hilfe nicht nur während dieser Arbeit.

Diesen Menschen, die ich liebe, widme ich diese Arbeit.

