

Aus der Abteilung Anatomie und Embryologie
(Prof. Dr. med. C. Viebahn)
im Zentrum Anatomie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Topographie molekularer Faktoren der Keimzellentwicklung während
der frühembryonalen Entwicklung des Kaninchens

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Clas Hopf

aus

Bremen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Viebahn

II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. T. Pieler

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. T. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1 Keimzellentwicklung durch Präformation	9
1.2 Keimzellentwicklung durch Epigenese	11
1.3 Ursprung und Identifikation der Keimbahn beim Säuger	11
1.3.1 Topographie	11
1.3.2 Signale	12
1.3.3 Molekulare Differenzierung an der Zelloberfläche.....	14
1.3.4 Regulation der Transkription	14
1.4 Fragestellung	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Sicherheitsbestimmungen.....	18
2.2. Material	18
2.2.1 Laborgeräte.....	18
2.2.2 Verbrauchsmaterial	19
2.2.3 Laborchemikalien.....	19
2.2.4 Molekularbiologische Substanzen.....	20
2.2.5 Enzyme.....	21
2.2.6 Primer für die Herstellung von RNA-Sonden und cRNA.....	21
2.2.7 Primer für die cDNA-Klonierung	21
2.2.8 Klonierung der <i>Bmp4</i> -cDNA	23
2.2.9 Molekularbiologische Kits	24
2.2.10 Pharmakologische Substanzen	24
2.2.11 Standardlösungen und Puffer	24
2.2.12 Nährmedien und Zusätze.....	26
2.2.13 Verwendeter Plasmid-Vektor	27
2.2.14 Verwendeter Bakterienstamm	27
2.2.15 Verwendeter Tierstamm.....	27
2.3 Methoden.....	27
2.3.1 Gewinnung von Embryonen und Gewebeprobe n	27

2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese	28
2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung	28
2.3.4 RNA-Präparation.....	28
2.3.5 Reverse Transkription	29
2.3.6 Verschachtelte PCR (Nested PCR)	30
2.3.6.1 Ableitung von degenerierten Primern für <i>Blimp1</i>	31
2.3.6.2 Ableitung von Primern für BMP2	32
2.3.6.3 Ableitung von Primern für <i>BMP8b</i>	33
2.3.7 Ligation, Transformation und Klonierung von cDNA-Fragmenten	34
2.3.8 Herstellung einer cRNA-Sonde.....	35
2.3.9 <i>In-situ</i> -Hybridisierung (ISH) an ganzen Keimscheiben.....	37
2.3.10 Präparation von Keimscheiben zur Aufsichtbetrachtung und ISH	39
2.3.11 Einbettung der Keimscheiben zur Aufsichtbetrachtung.....	40
2.3.12 Einbettung der Keimscheiben in Technovit® zur Anfertigung von Semidünnschnitten	40
2.3.13 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Schnittpräparate.....	41
2.3.14 Morphologische Stadierung der Embryonen.....	41
3. Ergebnisse	44
3.1. Isolierung, Charakterisierung und Expression von <i>Blimp1</i>	44
3.1.1 Klonierung der <i>Blimp1</i> -cDNA	44
3.1.2 Expressionsmuster von <i>Blimp1</i>	45
3.2 Isolierung, Charakterisierung und Expression von <i>BMP2</i>	50
3.2.1 Klonierung der <i>BMP2</i> -cDNA.....	50
3.2.2 Expressionsmuster von <i>BMP2</i>	51
3.3 Expressionsmuster von <i>BMP4</i>	53
3.4. Klonierung der <i>BMP8b</i> -cDNA.....	56
4. Diskussion	57
4.1 Methoden.....	58
4.1.1 Modellorganismus.....	58
4.1.2 Molekularbiologische und histologische Methoden	59
4.2 Expressionsmuster.....	61
4.2.1 Expressionsmuster von <i>Blimp1</i>	62
4.2.2 Expressionsmuster von <i>BMP2</i> und <i>BMP4</i>	64

4.2.3 Zeitliches und topographisches Zusammenspiel von Signalmolekülen und PGC-Vorläuferzellen.....	67
4.3 Nebenbefunde.....	69
4.4 Biologische Bedeutung der erhobenen Befunde	71
5. Zusammenfassung.....	73
Literaturverzeichnis.....	74

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bidest.	bidestilliert
Blimp1	B-Lymphocyte-Induced-Maturation-Protein-1
BMP	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CG%	prozentuale Anteil an Cytosin und Guanin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Differentialinterphasenkontrast
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dpc	dies post conceptionem
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ExE	Extraembryonales Ektoderm
gRNA	Gesamt-RNA
hCG	humanes Choriongonadotropin
i.m.	intramuskulär
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht (für engl. Molecular Weight)
nm	Nanometer
ORF	Open-reading-frame
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd

PGE	Posteriore Gastrulaextension
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (für engl. rounds per minute)
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Weiss Unit
UV	Ultraviolett
VE	Viszerales Endoderm
Vgl.	Vergleiche
VRB	Vorderer Randbogen
(W)ISH	(whole mount) in situ hybridisation
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-galactosid

1. Einleitung

Keimzellen bilden als besonders hochspezialisierte Zellen eines Organismus die Grundlage für die sexuelle Fortpflanzung und damit für die Vielfalt der Lebensformen auf der Erde. Die sexuelle Fortpflanzung führt zu neuen, individuellen Genotypen und trägt so zur genetischen Stabilität bestehender wie auch zur Entstehung neuer Arten bei (Paland und Lynch 2006; Goddard et al. 2005). Die erforderliche Vielfalt der Gene wird durch Mutation und Rekombination erzeugt, wobei Mutationen an einem bestimmten Genort so selten sind, dass ihr Beitrag zur genetischen Variabilität in einer großen Population von Generation zu Generation vernachlässigbar klein ist. Die Mitglieder einer Population verdanken vielmehr nahezu ihre gesamten genetischen Unterschiede der Neukombination der Gensequenzen, die jedes Individuum am Anfang seiner Entstehung aus dem Genpool der Elterngeneration bezieht (Campbell 1998). Diese Neukombination erfolgt bei der Vereinigung der reifen Gameten (Spermien oder Eizellen) im Rahmen der Befruchtung, aber auch schon bei ihrer eigenen Entstehung während der Meiose (Campbell 1998). Damit Keimzellen diese Funktionen erfüllen können, werden sie bereits früh in der embryonalen Entwicklung von den Zellen der übrigen Körperentwicklung, den sog. somatischen Zellen, abgesondert. Diese Trennung und die nachfolgende Entwicklung von den Urkeimzellen bis zum Gameten (Spermium oder Eizelle) wird unter dem Begriff „Keimbahn“ zusammengefasst und der Entwicklung der somatischen Zellen des Organismus gegenübergestellt.

Spermien und Eizellen differenzieren sich auf höchst unterschiedliche Weise während der sog. Spermato- bzw. Oogenese. Beide Vorgänge sind bereits in vielen Spezies Gegenstand intensiver Forschung gewesen, sodass die beteiligten Mechanismen detailliert bekannt sind (vgl. Toshimori 2009; De Felici et al. 2005). Im Vergleich dazu ist der Ursprung der Keimzelllinie, also die Entstehung und das Schicksal der ersten, als primordial bezeichneten Keimzellen (PGC für engl. „primordial germ cell“) während der embryonalen Entwicklung bis heute weniger gut verstanden. Gründe dafür sind vor allem in den technischen Schwierigkeiten zu sehen, diese Phase der Keimzellentwicklung näher zu untersuchen, denn die PGCs entstehen bereits während der embryonalen Frühentwicklung. Die moderne Entwicklungsbiologie geht dabei von einem hochkonservierten und hochkomplex organisierten Schlüsselmechanismus für die Entstehung der Keimzellen aus: der Repression des auf der DNA verankerten, für die allgemeine Körperentwicklung zuständigen, sog. somatischen Entwicklungsprogramms. Annähernd gleichzeitig beginnt außerdem die Vorbereitung auf die Meiose als erstes Element der sexuellen Fortpflanzung und auf die

zytologische Differenzierung als Voraussetzung für den Befruchtungsvorgang, d.h. der Vereinigung von Spermium und Eizelle am Beginn der embryonalen Entwicklung.

Die Repression des somatischen Entwicklungsprogramms tritt in zwei verschiedenen „Spielarten“ auf:

1. Bei der sog. Präformation bilden sich die PGCs durch die Vererbung keimzellbestimmender Faktoren, die die Transkription somatischer Gene herunter regulieren. Diese Faktoren liegen bereits maternal in der Eizelle vor; ihre asymmetrische Verteilung auf einzelne Blastomeren während der ersten Furchungsteilungen bestimmt, ob eine Zelle zur Keimzelllinie gehört oder einen somatischen Differenzierungsweg einschlägt.
2. Bei der sog. Epigenese entstehen die PGCs als Antwort auf induktive Signale aus den umgebenden Geweben. Die Repression der somatischen Differenzierung ist Folge eines komplexen molekularen Entwicklungsprogramms, dessen einzelne „Schalter“ zu verschiedenen Zeitpunkten aktiviert oder deaktiviert werden.

1.1 Keimzellentwicklung durch Präformation

Keimzellentwicklung durch Präformation findet sich bei vielen klassischen entwicklungsbiologischen Modellorganismen, und zwar vor allem bei Nicht-Säugetern. Bereits zwischen 1887 und 1910 wies der deutsche Biologe und Mitbegründer der Chromosomentheorie der Vererbung Theodor Boveri (1862-1915) in einer Reihe mikroskopischer Untersuchungen am Nematoden *Ascaris* nach, dass sich die Keimzelllinie bereits während der ersten Furchungsteilungen von den somatischen Zelllinien abgrenzen lässt. Das Chromatin der Keimzellvorläufer bleibt dabei stark kondensiert, während die somatischen Zellen eine Chromatinminderung erfahren, d.h. aus heutiger Sicht eine vermehrte transkriptionelle Aktivität aufweisen (Nieuwkoop und Sutasurya 1981).

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* liefert ein weiteres Beispiel für die Präformation. In seinen Eizellen liegen polare Granula (sog. „P granules“), die während der ersten vier Furchungsteilungen asymmetrisch an die Tochterzellen weitergegeben werden und sich schließlich nur noch in den sog. P4-Zellen, den Vorläuferzellen der gesamten *C. elegans*-Keimzelllinie, finden lassen (Strome und Wood 1982). Ein wesentlicher Bestandteil dieser „P granules“ ist das Zinkfingerprotein Pie-1, das die Phosphorylierung der RNA-Polymerase II

am C-terminalen Ende inhibiert (Zhang et al. 2003) und dadurch die von der RNA-Polymerase-II abhängige Transkription in den P-Blastomeren der Keimzelllinie vollständig unterdrückt. Mutanten, in denen Pie-1 fehlt, exprimieren somatische Gene in der Keimzelllinie und entwickeln keine reifen Keimzellen (Seydoux und Dunn 1997; Seydoux et al. 1996).

Embryonen von *Drosophila melanogaster* bilden die sog. Polzellen aus, die die Ursprungspopulation der Keimzelllinie darstellen. Sie enthalten spezifisches Zytoplasma (sog. „pole plasm“), das die Keimzellentwicklung steuert: Injiziert man dieses Plasma in somatische Zellen des Prä-Blastoderms, so entwickeln diese typische Charakteristika primordialer Keimzellen (Illmensee und Mahowald 1974). Vor der Gastrulation betreiben die Polzellen keine nennenswerte RNA-Synthese (Zalokar 1976), außerdem finden sich in ihnen keine Poly-A-mRNAs (Lamb und Laird 1976), die als Matrize für die ribosomale Translation bei der Proteinbiosynthese benötigt werden. Tatsächlich werden in den Zellen der Keimzelllinie, im Gegensatz zu den anderen Blastomeren, zunächst keine RNA-Polymerase-II-abhängigen Gene transkribiert; sobald die Keimzellvorläufer aber mit einer eigenen Transkription beginnen, exprimieren sie den keimzellspezifischen Marker Vasa (Van Doren et al. 1998). Diese transkriptionelle Repression in den Polzellen wird durch das sog. „polar granule component“ (Pgc) gesteuert (Deshpande et al. 2004). Es transkribiert eine nichtkodierende RNA, die die Aktivierung der RNA-Polymerase-II durch Phosphorylierung am C-terminalen Ende inhibiert und zur Ausbildung einer repressiven Chromatinarchitektur beiträgt (Martinho et al. 2004). Die genauen Wirkmechanismen sind jedoch noch unbekannt.

Beim Leopardfrosch (*Rana pipiens*) treten in befruchteten Eiern Aggregate von Mitochondrien, Proteinen und RNA im Zytoplasma des vegetativen Pols der Zelle auf, die bereits im unbefruchteten Ei nachgewiesen werden können. Aus diesen Aggregaten gehen die Keimzellen direkt hervor, weshalb sie mit dem Begriff „Keimplasma“ (engl. „germ plasm“) belegt wurden (Mahowald und Hennen 1971). Auch in anderen Modellorganismen der Vertebraten, wie z.B. dem Zebrafisch (*Danio rerio*) und dem Huhn (*Gallus gallus*), wird die PGC-Entwicklung durch Präformation gesteuert. In beiden Spezies konnte die Keimzellentwicklung vom Zweizellstadium an mit Hilfe des Keimzellmarkers Vasa untersucht und verfolgt werden, wobei im Fall des Zebrafisches die *vasa*-mRNA (Knaut et al. 2000), beim Huhn dagegen das Vasa-Protein essentieller Bestandteil des Keimplasmas ist

(Tsunekawa et al. 2000). Der genaue Mechanismus, über den Vasa die Keimzellentwicklung steuert, ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

1.2 Keimzellentwicklung durch Epigenese

Dies ist neben der Präformation der andere, unter den Metazoa verbreitete Modus der Keimzellentwicklung. Er findet sich u.a. bei den meisten Reptilien (Urodelen; Wakahara 1996) und bei den im Fokus dieser Arbeit stehenden Säugern. Im Mausembryo – dem gängigen Säugermodell in der Entwicklungsbiologie – lassen sich weder im Stadium der Furchungsteilungen (Kelly 1977) noch im späten Blastozystenstadium (Gardner 1977) Zellen identifizieren, die ausschließlich der Keimzelllinie angehören. Darüber hinaus lässt sich selbst mit Hilfe der Elektronenmikroskopie kein Äquivalent für das bei *Drosophila* und Frosch (s.o.) beschriebene Keimplasma in der Eizelle oder in frühen Stadien des sich entwickelnden Mausembryos nachweisen (Eddy und Hahnel 1983). Aus zahlreichen Befunden (s.u.) entwickelte sich daher die heute z.B. für die Maus gültige Vorstellung, dass die Keimzelllinie zu Beginn der Gastrulationsphase noch nicht als geschlossene Zelllinie vorliegt. Alle Mechanismen, die zu einer Segregation der PGC-Vorläufer von den somatischen Zelllinien führen, werden erst später wirksam; bei der Maus in einem schmalen Zeitfenster etwa zwischen 6,5 und 7,2 dies post coitum (dpc).

1.3 Ursprung und Identifikation der Keimbahn beim Säuger

Die definitiven PGCs sind durch ihre starke Expression von gewebeunspezifischer alkalischer Phosphatase (*TNAP*, engl. *Tissue non-specific alkaline phosphatase*) relativ einfach zu identifizieren (Chiquoine 1954). Unmittelbar nach ihrer Determination, zum Zeitpunkt 7,2 dpc, imponieren sie als ein ca. 45 Zellen umfassendes *TNAP*-positives Cluster im Mesoderm der Allantois (Ginsburg et al. 1990). Die Expression von *TNAP* ist zwar für das Überleben der PGCs nicht essentiell (MacGregor et al. 1995), hat sich aber als außerordentlich wertvoller Marker entpuppt, mit dessen Hilfe sich die Migration der Maus-PGCs von der Basis der Allantois bis in die Gonadenanlagen verfolgen lässt (Mintz und Russel 1957).

1.3.1 Topographie

In den Stadien unmittelbar vor der Bildung der PGCs besteht die Blastozyste aus einer Handvoll morphologisch unterscheidbarer Gewebe, deren Zellen zum Teil als pluripotent

betrachtet werden. Die Zellen des *TNAP*-positiven PGC-Clusters entstammen, wie Transplantationsexperimente zeigen konnten, der Schicht des Epiblasten (Gardner und Rossant 1979) am posterioren Ende des Primitivstreifens und wandern in die Basis der sich entwickelnden Allantois ein (Snow 1981). Unmittelbar davor entwickeln sich die PGCs aus sog. proximalen Epiblastzellen, die dem extraembryonalen Ektoderm (ExE, auch als Trophoblast bezeichnet) anliegen und sich während der Gastrulation durch den posterioren Abschnitt des Primitivstreifens zum extraembryonalen Mesoderm bewegen (Lawson und Hage 1994). Die in diesem Experiment von Lawson und Hage (1994) durch einen Farbstoff klonal markierten proximalen Epiblastzellen waren dabei häufig – aber nie ausschließlich – Vorläuferzellen von PGCs. Distale Epiblastzellen von 6,5 Tage alten Embryonen können sich auch zu PGCs entwickeln, aber nur, wenn sie in die proximal-posteriore Region des Epiblasten transplantiert werden. Umgekehrt können sich jedoch proximal-posteriore Epiblastzellen, die in distale Abschnitte des Epiblasten übertragen werden, nur noch zu somatischen Zellen differenzieren (Tam und Zhou 1996). Die Experimente von Lawson und Hage (1994) und Tam und Zhou (1996) belegen, dass die Keimzelllinie zum Zeitpunkt 6,5 dpc tatsächlich noch nicht als geschlossene Zelllinie vorliegt, und dass der posteriore proximale Epiblast eine besondere topographisch definierte Nische der Keimzellspezifizierung ist.

1.3.2 Signale

Die Determinierung der PGCs erfolgt durch induktive, parakrine Signalmoleküle aus der Gruppe der „Bone morphogenetic proteins“ (BMP2, BMP4, BMP8b). Ohne die BMP-Signale, die die Abgrenzung der Keimbahn von den somatischen Zelllinien des Embryos steuern, ist die molekulare Differenzierung der PGC-Gründerpopulation (erkennbar z.B. an den molekularen Markern *fragilis*, *stella*, *Blimp1*) im entstehenden Mesoderm massiv gestört (Ying und Zhao 2001; Ying et al. 2000; Lawson et al. 1999). Quellen dieser Signale sind das ExE (Yoshimizu et al. 2001) und das viszerale Endoderm (VE; de Sousa Lopes et al. 2004), zwei Gewebeschichten, die den Epiblasten des Eizylinders direkt umgeben und offensichtlich essentiell für den Erwerb der Keimzell-Kompetenz der PGC-Vorläuferzellen sind.

Das BMP4-Signal stammt aus dem ExE und ist für die Bildung der PGCs essentiell; homozygote Nullmutanten bilden keine PGCs aus, in heterozygoten Mutanten ist die Anzahl der PGCs drastisch reduziert (um 62%). Diese Befunde legen nahe, dass die Größe der PGC-Ausgangspopulation direkt abhängig von der Stärke des BMP4-Signals ist (Lawson et al.

1999). Mittels in situ-Hybridisierung an sog. Whole mounts (Häutchenpräparaten) ist *BMP4*-mRNA frühestens zwischen 5,5 und 6,5 dpc in der proximalen Region des ExE, in unmittelbarer Nachbarschaft zum Epiblast nachweisbar. Ab dem Zeitpunkt 7,5 dpc wird *BMP4* nicht mehr nur im ExE und im sich entwickelnden Chorion, sondern auch in den Derivaten des extraembryonalen Mesoderms, wie Amnion, Dottersack-Mesoderm und Allantois exprimiert, nicht aber in den PGCs selbst (Ying et al. 2000)

Auch das *BMP8b*-Signal hat einen direkten Einfluss auf die PGC-Bildung: Sowohl in homo- als auch in heterozygoten *BMP8b*-Nullmutanten ist die Anzahl der PGCs reduziert (Ying et al. 2000). Versuche mit kombinierten *BMP4/BMP8b*-Mutanten legen nahe, dass beide Moleküle nicht additiv, sondern als Homo- oder Heterodimere wirken (Ying et al. 2000). Ein schwaches *BMP8b*-Signal kann mittels in situ-Hybridisierung an Whole mounts schon zum Zeitpunkt 5,5 dpc im ExE nachgewiesen werden. Eine starke Expression im gesamten ExE findet sich aber erst im Zeitraum zwischen 6,0 und 7,5 dpc. VE und extraembryonales Mesoderm exprimieren kein *BMP8b* (Ying et al. 2000).

Auch das *BMP2*-Signal, das aus dem VE stammt, hat einen direkten Einfluss auf die Größe der PGC-Ausgangspopulation: Knock-out-Experimente mit *BMP2-loss-of-function*-Mutanten konnten zeigen, dass sowohl die homozygote als auch die heterozygote Mutation zu einer Reduktion der Anzahl von PGCs im Embryo führt. In Kombinationsexperimenten hat der Verlust je eines Allels für *BMP2* und *BMP4* einen additiven Effekt auf die Reduktion der PGC-Zahl, die Effekte eines kombinierten Allelverlustes von *BMP2* und *BMP8b* addieren sich jedoch nicht (Ying und Zhao 2001). Mittels in-situ-Hybridisierung an Whole mounts kann *BMP2*-mRNA im VE von Mausembryonen zwischen 6,0 und 6,5 dpc nachgewiesen werden und bleibt dort bis ca. 7,5 dpc nachweisbar. Die endodermale Expression von *BMP2* fällt in der Mitte des Embryos stärker aus und überspannt das Übergangsgebiet von Epiblast und extraembryonalem Ektoderm. Darüber hinaus ist das stärkste *BMP2*-Signal kolokalisiert mit der Region, in der sich der Primitivstreifen bildet, unmittelbar an der Grenze zwischen ExE und Epiblast (Ying und Zhao 2001).

Alle BMP-Signale lösen die Phosphorylierung nachgeschalteter intrazellulärer Signalmoleküle (*Smad1* und *Smad5*) aus, die zusammen mit dem Mediator *Smad4* in den Zellkern gelangen und dort ihre Signalwirkung entfalten; entsprechend führt der Verlust von *Smad1* und *Smad5* zu einer deutlichen Reduktion der PGC-Zahl (Chang und Matzuk 2001;

Hayashi et al. 2002). Ähnliches gilt auch für den Verlust von *Smad4*, wodurch jedoch auch andere, BMP-gesteuerte Prozesse in der embryonalen Frühentwicklung massiv beeinträchtigt werden (Chu et al. 2004).

1.3.3 Molekulare Differenzierung an der Zelloberfläche

Der „Cocktail“ aus Wachstumsfaktoren (BMPs) und Mediatoren (SMADs) scheint eine Umgebung zu schaffen, in der PGC-Vorläuferzellen von somatischen Zellen abgegrenzt werden können. Die pluripotenten proximalen Epiblastzellen reagieren auf die Signale aus den angrenzenden extraembryonalen Geweben und beginnen das Membranprotein *fragilis* zu exprimieren (Saitou et al. 2002). *Fragilis* (identisch mit dem Gen *Ifitm3*, engl. *Interferon-induced-transmembrane-protein-3*) hat in der frühen PGC-Entwicklung einen modulierenden Einfluss auf die Differenzierung und Adhäsionseigenschaften der Zellen und steuert später, während der Migration der PGCs zu den Gonadenleisten, das sog. „Homing“ der PGCs (Tanaka et al. 2005). In seiner Eigenschaft als Oberflächenmarker vermittelt *fragilis* den proximalen Epiblastzellen die Fähigkeit, sich zu PGCs zu entwickeln – obwohl nur eine kleine Anzahl der *fragilis*-exprimierenden Zellen tatsächlich zu Keimzellen wird (Tanaka und Matsui 2002).

1.3.4 Regulation der Transkription

Innerhalb der *fragilis*-positiven Zellfraktion beginnen zum Zeitpunkt 6,25 dpc etwa sechs Zellen des späteren posterioren, proximalen Anteils des Embryos, die in direktem Kontakt zum angrenzenden ExE stehen, mit der Expression von *Blimp1* (B-lymphocyte-induced-maturation-protein-1; identisch mit *Prdrm1*). *Blimp1* ist ein transkriptioneller Repressor mit Zinkfingern vom „Krüppel“-Typ, der ursprünglich für seine Funktion in der Differenzierung Immunglobulin-produzierender Plasmazellen bekannt geworden ist (Turner et al. 1994). Das Gen spielt aber offensichtlich auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der PGCs der Maus: Bereits in 6,25 Tage alten Embryonen wird es isoliert in einigen Epiblastzellen exprimiert, die evtl. eine proximal-posteriore Position einnehmen werden. Die Anzahl dieser Epiblastzellen steigt zwischen 6,25 und 6,5 dpc von sechs auf 16 an, wobei alle *Blimp1*-positiven Zellen, die im proximalen Epiblast entstehen, tatsächlich PGC-Vorläuferzellen sind (Ohinata et al. 2005). Die *Blimp1*-Expression weicht damit von der Expression des *fragilis*-Gens ab, das in diesem Stadium im gesamten Epiblasten exprimiert wird und daher nicht nur Keimzellvorläufer markiert. Einen Tag später finden sich 20-25 *Blimp1*-positive Zellen

innerhalb der *fragilis*-positiven Zellfraktion und einige von ihnen beginnen, den PGC-Marker *stella* zu exprimieren (Ohinata et al. 2005).

Tracing-Experimente konnten zeigen, dass die *Blimp1*-positiven Zellen tatsächlich zu der sich entwickelnden Keimzelllinie zu zählen sind, was *Blimp1* zum frühesten Marker der PGC-Vorläuferzellen macht (Ohinata et al. 2005).

Homozygote *Blimp1*-Nullmutanten entwickeln entweder keine PGCs, oder die Anzahl der PGCs ist drastisch reduziert (bis max. 5 PGCs konnten nachgewiesen werden, was einer Reduktion um über 90% entspricht). Stattdessen bildet sich in Abwesenheit von *Blimp1* ein kompaktes PGC-artiges Zellcluster aus, in dem es aber weder zur Proliferation noch zur Migration der Zellen kommt (Ohinata et al. 2005; Vincent et al. 2005). Darüber hinaus zeigen diese Mutanten diverse Defekte, wie z.B. vermehrte Apoptose, anormale Gefäßentwicklung und eine defekte Morphologie der Pharyngealbögen, die zum Tod des Embryos führen (Vincent et al. 2005). In heterozygoten Nullmutanten findet sich lediglich eine Reduktion der Zellzahl in der PGC-Gründerpopulation (um bis zu 78%), Proliferation und Migration der Zellen sind jedoch nicht beeinträchtigt, was die Vermutung nahe legt, dass *Blimp1* für die Entstehung der Gründer-PGCs eine entscheidende Rolle spielt, die Bedeutung des Gens für ihre weitere Entwicklung jedoch zu vernachlässigen ist (Ohinata et al. 2005; Vincent et al. 2005).

Die frühen *Blimp1*-positiven Zellen des proximalen Epiblasten zeigen noch eine Expression von *Hox1b* und anderen typisch mesodermalen Genen (z.B. *T*, *Fgf8* und *Snail*; vgl. Ancelin et al. 2006). Während diese Gene aber in den benachbarten somatischen Zellen hochreguliert werden, erfahren sie in den *Blimp1*-positiven Zellen eine Repression, die einhergeht mit zunehmender Keimzellspezifizierung und der Reaktivierung diverser Pluripotenz-assoziiierter Gene, wie z.B. *Sox2* (Yabuta et al. 2006) und *Nanog* (Yamaguchi et al. 2005). Die Rolle von *Blimp1* für die Repression von somatischen Genen wird deutlich, wenn man die Expressionsmuster in den PGC-artigen (*Blimp1*-negativen, *stella*-positiven) Zellen der Knock-out-Mutanten näher betrachtet: In ihnen finden sich inkonsistente Genexpressionsmuster. Die Zellen zeigen eine uneinheitliche Repression von *Hox1a* und *Hox1b*, einem Kennzeichen der PGC-Spezifikation, außerdem findet sich eine fehlerhafte Expression typischer PGC-Marker wie *stella*, *Sox2* und *Nanos3*. Manchmal kommt es auch zur Koexpression von Hoxgenen und PGC-Markern (Ohinata et al. 2005).

Die Expression von *Blimp1* steuert also - ähnlich der Aktivität der P-granules der Präformation - die Repression somatischer und die Reaktivierung Totipotenz-assoziiierter Gene in den PGC-Vorläuferzellen und damit einen der wichtigsten Schritte in der frühen Keimzellentwicklung; der Beginn der *Blimp1*-Expression wird deshalb auch als „Blipping“ bezeichnet (Chuva de Sousa Lopes und Roelen 2008). Neuere Arbeiten konnten jedoch auch zeigen, dass *Blimp1* diesen Mechanismus nicht alleine kontrolliert, denn mit dem *Prdm14*, einem mit *Blimp1* eng verwandten Gen, ist vor kurzem zumindest ein weiterer Regulator der somatischen Repression bekannt geworden, der über einen eigenen, *Blimp1*-unabhängigen Mechanismus wirken soll (Yamaji et al. 2008).

1.4 Fragestellung

Die Maus ist der bislang einzige Säuger, an dem molekulare Mechanismen der Keimzell determinierung beschrieben wurden. Allerdings weist der zylinderförmige Mausembryo eine für Säuger außergewöhnliche Morphologie auf; insbesondere die Nachbarschaftsverhältnisse zwischen den für die PGC-Bildung beschriebenen Epiblastabschnitten (distal-proximal, extraembryonales Ektoderm) gelten spezifisch für die Maus und lassen sich nicht ohne weiteres auf die flachen Keimscheiben anderer Säuger einschließlich des Menschen übertragen.

Im Hintergrund dieser Arbeit steht daher die Frage, ob die am Mausmodell beschriebenen Mechanismen der PGC-Entwicklung, z.B. die additive Wirkung der BMPs, die Redundanz von *fragilis* und *stella*, oder die Notwendigkeit von *Blimp1*, als für Säuger allgemeingültig angesehen werden können. Dazu soll das Kaninchen mit seiner säugertypischen flachen Keimscheibe als ein neuer Modellorganismus für die Keimzell determinierung herangezogen werden, denn zum einen ermöglicht die plane Morphologie des frühen Kaninchenembryos die eindeutige und unaufwendige Zuordnung aller Zellen zu den jeweiligen Gewebeschichten und Körperachsen des Embryos, und zum anderen entspricht der Kaninchenembryo während des Gastrulationsprozesses, also zum Zeitpunkt der PGC-Differenzierung, morphologisch den meisten anderen Säugern, wie z.B. Mensch, Schwein, Rind und Hund, deren Embryonen nicht becherförmig sondern als flache Keimscheibe vorliegen (Eakin und Behringer 2004). Das Kaninchen bietet darüber hinaus gute experimentelle Voraussetzungen, da die Implantation

der Embryonen in die Gebärmutterschleimhaut relativ spät stattfindet und die Gastrulationsstadien dadurch relativ einfach zu gewinnen sind.

Das oben beschriebene grundlegende Problem der vergleichenden Embryologie der Keimbahn soll in der vorliegenden Arbeit anhand der folgenden drei Teilfragen bearbeitet werden:

1. Werden während der PGC-Entwicklung des Kaninchens dieselben Gene (z.B. *BMPs* und *Blimp1*) benutzt wie bei der Maus?
2. Wenn dies zutrifft, zu welchem Zeitpunkt der PGC-Entwicklung sind BMP-Signale und *Blimp1* von Bedeutung? D.h. können sie im Zeitrahmen ihres Auftretens einen Einfluss auf die „Rekrutierung“ der Gründer-PGCs haben, oder werden sie erst später, also nach dem Beginn der molekularen Identifizierung der PGCs, wirksam?
3. Stehen die BMP-Signale, die die Keimzellentwicklung steuern sollen, auch beim Kaninchen topographisch in einem so engen Verhältnis zu den PGC-Vorläuferzellen, dass sie für deren Entwicklung eine entscheidende Rolle spielen können?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde in einem ersten Schritt eine cDNA des *Blimp1*-Gens, als bislang wichtigstem bekannten Marker für die sich entwickelnden PGC des Säugers (s.o.), des Kaninchens kloniert und mittels *in-situ*-Hybridisierung das Expressionsmuster vor und während der Gastrulation untersucht, um danach einen Vergleich mit den von der Maus bekannten Daten herzustellen.

In einem zweiten Schritt wurden mehrere Vertreter der Signalmoleküle untersucht, die die Segregation der primordialen Keimzellen von den somatischen Zelllinien steuern; namentlich *BMP2*, *BMP4* und *BMP8b* (s.o.).

2. Material und Methoden

2.1 Sicherheitsbestimmungen

Alle in dieser Arbeit durchgeführten gentechnischen Arbeiten fallen unter den Sicherheitsstandard für die Sicherheitsstufe 1 gemäß dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz, GenTG) vom 20.06.1990. Für die übrigen Arbeiten wurden alle laborüblichen Sicherheitsbestimmungen der Universität Göttingen eingehalten.

2.2. Material

2.2.1 Laborgeräte

Arbeitsbank (steril) , Hera Safe	Heraeus (Hanau)
Brutschrank, HeraCell 150 Tri-Gas Cell Culture Incubator	Heraeus (Hanau)
Elektrophoresekammer	AGS GmbH (Heidelberg)
Feinwaage Sartorius TE214S	Sartorius (Göttingen)
ISH Gerät, Biolane™ HTI	Hölle & Hüttner (Tübingen)
KnifeMaker Type 7801A	LKB
Mikroskop, Axioplan2 mit Digitalkamera	Zeiss (Jena)
Mikrotom Jung RM2065	Intas (Göttingen)
Mikrowelle, MD10482	Leica (Bensheim)
Photometer, BioPhotometer	Medion (Mühlheim)
Schüttel-Inkubator, innova™ 4000 Incubator Shaker	Eppendorf (Hamburg)
Spannungsgerät Shandon Southern SAE2761	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Spannungsgerät Consort E21	Vokam (Manchester, GB)
Speed-Vac Concentrator5301	AGS GmbH (Heidelberg)
Stereolupe Stemi SV11 mit Digitalkamera	Eppendorf (Hamburg)
Thermoblock	Zeiss (Jena)
Thermocycler, PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Visitron Systems (Puchheim)
Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Grant Instruments (Cambridge, UK)
	Biozym (Oldendorf)
	Eppendorf (Hamburg)

UV Tisch Epichemi3 Darkroom und Kamera INTAS302	Intas (Göttingen)
Waage Sartorius excellence	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad LAUDA A100	Lauda (Königshofen)
Wippe (elektrisch), Vari-Mix	Barnstead/Thermolyne (Dubuque, USA)
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)

2.2.2 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark (Koblenz-Rheinhafen)
Küvetten, UVette® (RNase-free)	Eppendorf (Hamburg)
Kryogefäße, Micro-Röhrchen, 2ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Multipette Combitips	Eppendorf (Hamburg)
Multiwell Kulturplatten	
Objekträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Organkulturschalen, Falcon®	Becton, Dickinson & Co (Le Pont De Claix, Frankreich)
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)
Skalpellklingen	Aesculap (Tuttlingen)
Tablettenhüllen	Bayer (Leverkusen)
Reaktionsgefäße 0,5ml (für PCR), 1,5ml, 2ml	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugenröhrchen Eco 50ml, Rotilabo®	Roth (Karlsruhe)

2.2.3 Laborchemikalien

3-((3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio)-1- Propan-Sulfonat (Chaps)	Biomol (Hamburg)
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Biomol (Hamburg)
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid (x-Gal)	Sigma (München)

Ampicillin	Roche (Mannheim)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma (München)
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fluka (Neu-Ulm)
Ficoll®	Serva (Heidelberg)
Formamid	Fluka (Neu-Ulm)
Glutaraldehyd	Serva (Heidelberg)
Heparin	Sigma (München)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
Levamisol (Levamisol Hydrochlorid)	Sigma (München)
Mowiol 4-88	Hoechst (Frankfurt)
Normal goat serum (NGS) (Ziegen Serum)	Sigma (München)
Orange-G	Sigma (München)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin)
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween20)	Sigma (München)
Saline-sodium citrate buffer (SSC)	Sigma (München)
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)

Alle übrigen Standardlaborchemikalien wurden in p.a. Qualität von Roth, Merck oder Sigma bezogen.

2.2.4 Molekularbiologische Substanzen

5x Reverse Transkriptase Reaktionspuffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
6x Loading Dye Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
10x Taq Buffer + KCl (- MgCl ₂)	Fermentas (St. Leon-Rot)
10x Taq Buffer + (NH ₄) ₂ SO ₄ (- MgCl ₂)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	Roche (Mannheim)
BM-Purple AP-Substrat	Roche (Mannheim)
Desoxyribonukleosid-Triphosphate Set, PCR Grade	Roche (Mannheim)
DIG RNA Labeling Mix 10x	Roche (Mannheim)

(kompetente) E.coli Zellen (Stamm „DH5-alpha“)	Laborbestand
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
MgCl ₂ 25mM	Fermentas (St. Leon-Rot)
Molecular Weightmarker III	Fermentas (St. Leon-Rot)
t-RNA	Sigma (München)
Tango Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.2.5 Enzyme

EcoR1 Restriktions Endonuklease	Fermentas (St. Leon-Rot)
Proteinase K	Roche (Mannheim)
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse	Fermentas (St. Leon-Rot)
Transkriptase	
SP6 RNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
T7 RNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.2.6 Primer für die Herstellung von RNA-Sonden und cRNA

CDS IIA	Oligo-dT-Primer	Biomers.net (Ulm)
SP6	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC 3'	Biomers.net (Ulm)
T7	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA 3'	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.2.7 Primer für die cDNA-Klonierung

Sämtliche Primer wurden von der Firma biomers.net (Ulm) hergestellt. Die Amplifikation von *Blimp1*-Fragmenten gelang mit den folgenden Primern:

Blimp A+	5'-TGGACATGGAGGAYGCDGAYATGAC-3'	
	$T_m = 57,9^\circ\text{C}$, CG% = 53, MW = 7801D	
Blimp -3	5'-GGCAGCAGGAACCTGGGRTARTGNGC-3'	
	$T_m = 61,3^\circ\text{C}$, CG% = 59, MW = 8097D	
Blimp +1	5'-CGGCACCTCCGTGCARGCNGARGC-3'	
	$T_m = 65,0^\circ\text{C}$, CG% = 73, MW = 7320D	
Blimp B+	5'-CAGGGAGGCCTTCAGGAARTCYTCNGG-3'	
	$T_m = 61,7^\circ\text{C}$, CG% = 61, MW = 8346D	

Blimp C2+ 5'-CGGGAGGTGCTGGTCCCNGCNCCNCA-3'
 $T_m = 66,3^\circ\text{C}$, CG% = 75, MW = 7970D

Blimp C- 5'-GCACCACGGCCAGGATYTCNTTYTC-3'
 $T_m = 61,4^\circ\text{C}$, CG% = 58 MW = 7598D

Blimp D+ 5'-CCTGATCAAGAACAAGCGGAAYATGACNNGG-3'
 $T_m = 60,9^\circ\text{C}$, CG% = 50, MW = 9283D

Blimp -1 5'-TGGCACTGGGCGCAYTTRTGNGG-3'
 $T_m = 62,7^\circ\text{C}$, CG% = 63, MW = 7132D

Die Amplifikation eines *BMP2*-Fragmentes gelang mit folgenden Primern:

BMP2 +1 5'-CTGTCTTCTAGCGTTGCTGC-3'
 $T_m = 50^\circ\text{C}$, CG% = 55, MW = 6074g/mol

BMP2 -1 5'-CCTCCACAACCATGTCCTGA-3'
 $T_m = 53^\circ\text{C}$, CG% = 55, MW = 5983g/mol

BMP2 +3 5'-CGAGTTCGAGTTGCGGTTGC-3'
 $T_m = 58^\circ\text{C}$, CG% = 60, MW = 6186g/mol

BMP2 -2 5'-CATGGTTAGTGGAGTTCAGG-3'
 $T_m = 47^\circ\text{C}$, CG% = 50, MW = 6234g/mol

Für *BMP8b* wurden die folgenden Primer verwendet, wobei die Amplifikation eines spezifischen cDNA-Fragments nicht gelang:

Bmp8bA 5'-CCGCTCTTCATGCTGGACCTGTAC-3'
 $T_m = 64^\circ\text{C}$, CG% = 60, MW = 7553g/mol

Bmp8bB 5'-GGTGGTCCAGGAGCASTCCAACAGG-3'
 $T_m = -^\circ\text{C}$, CG% = 64, MW = 7757g/mol

Bmp8bC 5'-TTGCTGAAGCGTCACAAGGACCTRG-3'
 $T_m = -^\circ\text{C}$, CG% = 54, MW = 7696g/mol

Bmp8bD 5'-GTTGGTGGCATTTCATRCASGARTCC-3'
 $T_m = -^\circ\text{C}$, CG% = 52, MW = 7718g/mol

Bmp8bE 5'-TGTCATAGTAGAGCACRGARRTGGC-3'
 $T_m = -^\circ\text{C}$, CG% = 50%, MW = 7770g/mol

Bmp8bF 5'-ACACTGCCGGATGATTGAGRYCAC-3'
 $T_m = -^\circ\text{C}$, CG% = 52, MW = 7633g/mol

Bmp8b_1f	5'-TCGACTAGGAGTACGCGAGC-3' T _m = 52°C, CG% = 60, MW = 6181g/mol
Bmp8b_1r	5'-GGCCTGGACTACCATGTTGC-3' T _m = 54°C, CG% = 60, MW = 6123g/mol
Bmp8b_2f	5'-TGTCACAGCTGCTGAGTTCC-3' T _m = 51°C, CG% = 55, MW = 6095g/mol
Bmp8b_2r	5'-ACAGTAATAGGCGGAGTAGC-3' T _m = 46°C, CG% = 50, MW = 6223g/mol
Bmp8b_3f	5'-CAAGGCTGAGAAGATGGTCC-3' T _m = 51°C, CG% = 55, MW = 6199g/mol
Bmp8b_3r	5'-GGAGGTAGGTTGGAGCTTGG-3' T _m = 53°C, CG% = 60, MW = 6319g/mol
Bmp8b_4f	5'-TGCAGACATGACCACACTCC-3' T _m = 51°C, CG% = 55, MW = 6042g/mol
Bmp8b_4r	5'-CTTACCTGAGGACTGCCTGG-3' T _m = 51°C, CG% = 60, MW = 6125g/mol
BMP8b_5f	5'-ATGTTGGACCTGTACCGTGC-3' T _m = 52°C, CG% = 55, MW = 6135g/mol
BMP8b_6f	5'-CCTCCACATCAGCATGTTTCG-3' T _m = 54°C, CG% = 55, MW = 6022g/mol
BMP8b_7f	5'-TACTCCGCCTATTACTGTGC-3' T _m = 47°C, CG% = 50, MW = 6027g/mol
BMP8b_8r	5'-ACZAGGACCATCTTCTCAGC-3' T _m = 45°C, CG% = 50, MW = 6043g/mol
BMP8b_9r	5'-AGAGACAGGCTATGGAGTGC-3' T _m = 48°C, CG% = 55, MW = 6243g/mol
BMP8b_10r	5'-AGCATAGCTCTGGAGCCAGG-3' T _m = 54°C, CG% = 60, MW = 6175g/mol

2.2.8 Klonierung der *Bmp4*-cDNA

Das zur Herstellung der Sonde verwendete, ca. 800 Basen umfassende Fragment des Kaninchen-BMP4 wurde von Frau Christina Karcher (Forschungszentrum Karlsruhe, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen) isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.9 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)

2.2.10 Pharmakologische Substanzen

Sämtliche Substanzen wurden von der Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte (e.G.) bezogen.

Predalon 500® (Humanes Choriongonadotropin, hCG)	Organon (Oberschleißheim)
Narcoren® (Phentobarbital-Natrium)	Merial (Hallbergmoos)
Intergonan® (Pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)	Intervet (Unterschleißheim)

2.2.11 Standardlösungen und Puffer

DEPC H₂O: 1000ml H₂O bidest
+ 1000µl Diethylpyrocarbonat
2h bei RT unter dem Abzug, autoklavieren (40Min. bei 121°C)

PFA (4%): Paraformaldehyd 4%ig in DEPC-PBS lösen, auf pH = 7,4 einstellen.

PBS (10x): 10mM KH₂PO₄
+ 0,1M NaH₂PO₄
+ 1,37M NaCl
+ 27mM KCl
in H₂O bidest lösen.

PBT: 0,1% Tween20 in PBS-DEPC

NTMT Puffer: 100mM TrisCl (pH = 9,5)
+ 100mM NaCl
+ 50mM MgCl₂
+ 2mM Levamisol

+ 0,1% Tween 20
in H₂O bidest lösen.

Proteinase K: 100mg Proteinase K (lyophilisiert in Originalgefäß)
+10ml DEPC-H₂O
Lagerung bei -20°C

Hybemix: 25ml Formamid
+ 3,5ml 20x SSC (vor Gebrauch auf pH = 4,5 einstellen)
+ 0,05ml 0,5M EDTA
+ 0,05ml t-RNA (10mg/ml)
+ 0,1ml Tween20
+ 2,5ml 10% Chaps
+ 0,05ml Heparin (50mg/ml)
+ 18,6ml DEPC-H₂O

MAB: 100mM Maleinsäure
+ 150mM NaCl
mit 10N NaOH auf pH = 7,5 einstellen

MABT: MAB + 0,1% Tween20

BBR: 5g BBR
(Boehringer Blocking + 50ml MAB (pH = 7,5)
Reagenz) 30Min bei 70°C lösen,
gut mischen und bei -20°C lagern

Chaps: 0,1g/ml in DEPC-H₂O lösen

50x TAE-Puffer: 2M Tris
+ 1M Essigsäure
+ 0,1M EDTA
Auf pH 8,3 einstellen

RNA-Probenpuffer: 10% 10x MOPS
50% Formamid (deionisiert)
40% DEPC-H₂O

10x MOPS: 4,185g MOPS
+ 0,68g Natriumazetat
+ 2ml 0,5M EDTA
Auf pH 7,0 einstellen

Orange-G Ladepuffer 20% Ficoll®
1mg/ml Orange-G
10mM Tris/HCl (pH = 7,5)

2.2.12 Nährmedien und Zusätze

LB-Flüssigmedium (für 1l): 10g NaCl
+ 5g Hefeextrakt
+ 10g Tryptone
in H₂O bidest ansetzen,
mit 4N NaOH auf pH = 7,5 einstellen,
mind. 30Min bei 120°C autoklavieren

LB-Agar: 250ml LB-Medium
+ 3,75g Agar-Agar (15g/l)
In der Mikrowelle erhitzen bis Gemisch klar und
schlierenfrei.
+ 0,5ml Ampicillin (50mg/ml)
Sobald der Ansatz auf ca. 60°C abgekühlt ist.

x-Gal Platten
(für Blau-Weiß-Screening): + 20µl x-Gal (50mg/ml in DMF)
+ 100µl IPTG (100mM in H₂O bidest)
Auf jede Platte pipettieren und gleichmäßig ausstreichen.

2.2.13 Verwendeter Plasmid-Vektor

Die Ligationen (s.2.3.7) erfolgten in den Vektor „pGEM-T Easy“ der Firma Promega. Die Multiple-Cloning-Site (MCS) dieses Vektors wird u.a. von einem T7- und einem SP6-Promotor flankiert. Zur Selektion in Prokaryonten dient das β -Lactamase-Gen, das verantwortlich für die Ampicillin-Resistenz ist.

2.2.14 Verwendeter Bakterienstamm

Für die Transformationen (s. 2.3.7) wurden *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5 α aus dem Laborbestand verwendet. Bakterien dieses Stammes sind zur α -Komplementation fähig und erlauben die Durchführung eines „blue-white-screening“ (s. 2.3.7).

2.2.15 Verwendeter Tierstamm

Alle untersuchten Embryonen stammen von ca. drei Monate alten Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ („New Zealand White“), die von der Firma Lammers (Euskirchen) bezogen wurden. Tiere dieses Stammes sind Albinos, die gute Verpaarungseigenschaften mit mittlerer Wurfgröße zeigen (ohne Hyperovulation ca. 6-12 Junge pro Wurf).

2.3 Methoden

2.3.1 Gewinnung von Embryonen und Gewebeproben

Um eine möglichst große Anzahl an Embryonen zu erhalten, wurden die weiblichen Kaninchen vor der Konzeption wie folgt hormonell behandelt: Unmittelbar nach Lieferung wurden 180 I.E. hCG (Predalon 500®) i.m. in den *Musculus quadriceps femoris* appliziert, um die Ovarialzyklen der Tiere einer Lieferung anzustoßen und zu synchronisieren. 72 Stunden vor der Verpaarung, aber frühestens 17 Tage nach Lieferung, wurden einmalig 100 I.E. PMSG i.m. injiziert, um ein verstärktes Follikelwachstum zu induzieren und dadurch die Konzeptionsrate zu verbessern. Am Tag der Verpaarung erfolgte eine zweite Injektion von 180 I.E. hCG (s.o.). Zur Entnahme der Embryonen wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren®) i.v. (Dosierung 200-400mg/kg KGW) entsprechend den Empfehlungen des Instituts für Veterinärpharmakologie der Universität Zürich (<http://www.vetpharm.uzh.ch>) getötet, der Abdominalsitus chirurgisch eröffnet und die graviden Uterushörner in toto reseziert. Für die vorliegende Arbeit wurden nur Embryonen in

Präimplantationsstadien verwendet; die Embryonen konnten deshalb mit etwa 10ml warmem PBS (37°C) aus den am proximalen Ende eröffneten Uterushörnern ausgespült werden.

2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden stets einprozentige Agarosegele (0,5g Agarose in 50ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt) verwendet, die vor dem Gelieren mit 0,5µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) versetzt wurden. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Alle Elektrophoresen wurden mit Spannungen von 50V durchgeführt. Die Arbeiten mit dem kanzerogenen Ethidiumbromid erfolgten gemäß den Sicherheitsbestimmungen (s. 2.1) unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen, an einem separaten, für die Arbeit mit Ethidiumbromid deklarierten Arbeitsplatz mit eigenen Geräten, Einwegmaterialien und Abwürfen sowie speziellen Entsorgungsbehältern für kontaminierte Abfälle. Bei allen Arbeitsschritten wurden Nitril-Handschuhe getragen. Für Agarose-Gelelektrophoresen von DNA-haltigen Proben wurden je 5µl der Probe mit 1µl 6x-Loading-Dye-Solution versetzt und auf das Gel aufgetragen. Für Agarose-Gelelektrophoresen von RNA-haltigen Proben wurde jeweils 1µl der zu untersuchenden RNA mit 9µl RNA-Probenpuffer versetzt, fünf Minuten bei 65°C inkubiert, anschließend zwei Minuten auf Eis gekühlt und mit 2µl Orange-G-Puffer auf das Gel aufgetragen.

2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmungen von DNA- und RNA-Proben erfolgten absorptionspektrometrisch gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz, wonach bei Einfall von monochromatischem Licht die Konzentration eines gelösten Stoffes direkt proportional zur Extinktion oder optischen Dichte (OD) der Lösung ist. Alle Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 260nm, dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren, und bei OD-Werten zwischen 0,1 und 1 durchgeführt, weil die Funktion nur in diesem Bereich streng linear verläuft. Zur Bestimmung des Nullwertes wurde stets eine Reinprobe des Lösungspuffers der jeweiligen Nukleinsäure herangezogen.

2.3.4 RNA-Präparation

Für die Gewinnung embryonaler RNA wurden jeweils fünf 6,2 Tage alte Blastozysten wie unter 2.3.1 beschrieben präpariert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C

gelagert. Die Auswahl von Embryonen der frühen Gastrulationsphase zur gRNA-Gewinnung erfolgte auf Grund der Annahme, dass auch beim Kaninchen der Zeitpunkt der PGC-Determinierung ungefähr in die frühe Gastrulationsphase fällt und die an diesem Vorgang beteiligten und im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden Gene zu diesem Zeitpunkt auch vermehrt transkribiert werden. Die Extraktion der RNA erfolgte gemäß Herstellerprotokoll mit dem „Rneasy® Mini-Kit“, wobei zur Ermittlung der benötigten Puffermenge das mit Hilfe einer Feinwaage ermittelte Gewicht der Blastozysten herangezogen wurde.

Bei Arbeiten mit RNA besteht generell die Gefahr, dass die RNA-Moleküle durch ubiquitär vorkommende RNasen (z.B. auf der Haut, in Schweiß oder Speichel) abgebaut werden. Alle Arbeitsschritte, bei denen RNA verwendet wurde, wurden deshalb an einem separaten Arbeitsplatz mit Geräten und Einwegmaterialien durchgeführt, die nur für den Umgang mit RNA bestimmt waren.

Zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der Ausbeute wurde die RNA-Konzentration photometrisch (s. 2.3.3) bestimmt und eine Kontrollelektrophorese (s. 2.3.2) durchgeführt.

2.3.5 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription (RT) der gRNA in cDNA wurde der Primer „CDS II A“ ausgewählt, ein Oligo-dT-Primer, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA Moleküle bindet, die dann von der reversen Transkriptase in den komplementären cDNA-Strang umgeschrieben werden. Für die RT-Reaktion wurde folgendes Protokoll angewendet:

Reverse Transkription: 5 µg gRNA

+ 1 µl CDS II A (40pmol/µl)

Auf 12 µl auffüllen mit DEPC H₂O

Ansatz für 5 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubieren,
anschließend Überführen der Proben auf Eis.

+ 4 µl 5x Reverse Transkriptase Reaktionspuffer

+ 1 µl Ribonuklease Inhibitor (20U/µl)

+ 2 µl 10mM dNTP Mix

Ansatz für 5 Minuten bei 37°C im Thermocycler inkubieren.

+ 1µl (200U) M-MuLV Reverse Transkriptase, so dass pro Ansatz ein Gesamtvolumen von 20µl erreicht wird.

Inkubation des Reaktionsansatzes im Thermo Cycler bei 42°C für 60 Min, anschließend Stoppen der Reaktion bei 70°C für 10 Min.

Die Reaktionsprodukte wurden bei -20°C gelagert und konnten ohne weitere Reinigungsschritte für PCR-Versuche (s. 2.3.6) verwendet werden.

2.3.6 Verschachtelte PCR (Nested PCR)

Bei dieser Technik wird die zu amplifizierende Sequenz, anstatt von einem, von bis zu drei Primer-Paaren flankiert, wobei sich die Größe des Sequenzabschnittes vom ersten zum dritten Paar verkleinert und diese ineinander verschachtelt liegen. Diese Methode eignet sich besonders für PCRs mit degenerierten Primern, bei denen eine spezifische Bindung an die Matrize unsicher und damit eine zuverlässige Amplifikation erschwert ist. Da sich die Schmelztemperatur nicht exakt berechnen lässt, wurde bei allen PCRs mit degenerierten Primern außerdem mit Temperaturgradienten gearbeitet und jede Reaktion in drei Ansätzen mit verschiedenen Schmelztemperaturen (55°C, 60°C und 65°C) durchgeführt. Als Matrize wurde jeweils 1µl cDNA aus dem Ansatz der RT-Reaktion (2.3.5) eingesetzt, wobei das in Tabelle 1 aufgeführte PCR-Protokoll befolgt wurde.

Tab. 1: Standard PCR-Protokoll

Denaturierung	95°C für 1 Min.
Denaturierung	95°C für 30Sek.
Annealing	55°C, bzw. 60°C, bzw. 65°C für 30Sek.
Elongation	68°C für 3Min.
Insgesamt 40 Zyklen	
Nachelongation	68°C für 7 Min.

Für die Reaktionen wurden stets 50µl eines PCR-Ansatzes eingesetzt.

50µl PCR Ansatz: 5µl 10x (NH₄)₂SO₄ Puffer

xµl dNTPs (f.c. 10mM)

50 pmol Primer 1

50 pmol Primer 2
4µl MgCl₂ (f.c. 2mM)
1µl cDNA
0,25µl Taq Polymerase (f.c. 1,25U/50µl)
Auffüllen mit H₂O bidest auf 50µl

Anschließend wurde in einer Kontrollelektrophorese mit 5µl der Versuchslösung die zu erwartende Fragmentgröße des PCR-Produktes überprüft (s. 2.3.2). Der PCR-Ansatz mit dem klarsten Bandenmuster, d.h. mit den wenigsten Verunreinigungen und einer hohen Anzahl von Amplifikaten derselben Größe, wurde mit dem „NucleoSpin® Extract-Kit“ gemäß dem Herstellerprotokoll von Macherey-Nagel gereinigt (45µl PCR Produkt + 5µl TE Puffer), die DNA in 30µl NE-Puffer gelöst und photometrisch die Konzentration bestimmt (s. 2.3.3). Jeweils 1µl dieser Lösung wurde als Matrize für die Reaktion mit dem nächsten Primer-Paar eingesetzt.

2.3.6.1 Ableitung von degenerierten Primern für *Blimp1*

Da die Sequenz des *Blimp1*-Gens vom Kaninchen nicht bekannt ist, wurde zunächst ein Sequenzvergleich (sog. Alignment) der cDNA-Sequenzen von Mensch (*Homo sapiens*, NCBI Ref. Nr. NM_001198), Maus (*Mus musculus*, NCBI Ref. Nr. NM_007548), Ratte (*Rattus norvegicus*, NCBI Ref. Nr. XM_001067357), Schimpanse (*Pan troglodytes*, NCBI Ref. Nr. XM_518658), Rhesus-Affe (*Macaca mulatta*, NCBI Ref. Nr. XM_001087708), Hund (*Canis familiaris*, NCBI Ref. Nr. XM_539068) und Rind (*Bos taurus*, NCBI Ref. Nr. XM_618588) durchgeführt. Als Quelle für die Sequenzen diente die Sequenzdatenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), die Alignments wurden mit dem Programm „SE Central[®]“ (Sci-Ed Software, Cary, USA) erstellt.

Aus Bereichen besonders hoher Homologie wurden sog. degenerierte Primer abgeleitet (s. 2.2.7). An ausgewählten Positionen, an denen die verglichenen Originalsequenzen verschiedener Spezies nicht übereinstimmten, wurde bei der Primer-Synthese vom Hersteller (biomers.net GmbH, Ulm) der Einbau verschiedener Basen – abhängig von den hier vorkommenden Variationen – ermöglicht. Dadurch entstehen Primer-Gemische, von denen jeweils ein Teil mit verschiedenen Sequenzvariationen der Matrize optimale Basenpaarungen ausbilden (vgl. Tab. 2).

Tab. 2: Abkürzungen für Nukleotidbasen und Basenkombinationen:

A: Adenin	C: Cytosin	G: Guanin	T: Thymin
K [G, T]	R [A, G]	W [A, T]	M [A, C]
S [G, C]	Y [C, T]	B [G, T, C]	D [G, A, T]
H [A, C, T]	V [G, A, C]	N [A, G, C]	

Auswahl und Design geeigneter Primer erfolgten mit Hilfe des Programms „Primer Designer[®] V2.2“ (Sci-Ed Software, Cary, USA). Um möglichst gute Ergebnisse zu erzielen, wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Primer-Gemische nicht höher als 64-fach degeneriert waren, d.h. dass sie nicht mehr als 64 verschiedene Sequenzvarianten enthielten. Für eine möglichst gute Ausbeute des gewünschten Produktes war auch wichtig, dass die Primer möglichst wenige Basenpaarungen mit sich selbst oder mit dem Gegenprimer ausbilden konnten.

Die unter 2.2.7 aufgelisteten Primer wurden nach dem folgenden Schema kombiniert, wobei in Tabelle 3 die erwarteten Amplifikatgrößen und -positionen bezogen auf die menschliche cDNA-Sequenz angegeben sind. Das Amplifikat der unterstrichenen Primerkombination wurde kloniert.

Tab. 3: Primerkombinationen für *Blimp1*

	Blimp A+	Blimp+1		Blimp C2+	Blimp D+
Blimp-3	1082 bp374– 1456		Blimp C-	798 bp1702–2500	
Blimp B+		<u>674</u> bp476–1150	Blimp-1		<u>383</u> bp1907–2290

2.3.6.2 Ableitung von Primern für BMP2

Da die Kaninchensequenz des *BMP2*-Gens bekannt ist (*Oryctolago cuniculus*, NCBI Ref. Nr. NM_001082650.1), konnte eine spezifische Sonde mit den unter 2.2.7 aufgeführten Primern hergestellt werden. Die Primer wurden nach dem folgenden Schema kombiniert, wobei in Tabelle 4 die erwarteten Amplifikatgrößen und -positionen bezogen auf die Kaninchen cDNA-Sequenz angegeben sind. Das Amplifikat der unterstrichenen Primerkombination wurde kloniert.

Tab. 4: Primerkombinationen für *Bmp2*

	BMP2 +1	BMP2 +3
BMP2 -1	1153 bp87-1240	
BMP2 -2		<u>877</u> bp219-1093

2.3.6.3 Ableitung von Primern für *BMP8b*

Da die Sequenz des *Bmp8b*-Gens des Kaninchens nicht bekannt ist, wurde auch hier, wie oben beschrieben (2.3.6.1), ein Alignment durchgeführt. Hierfür wurden die bekannten cDNA-Sequenzen von Mensch (*Homo sapiens*, NCBI Ref. Nr. NM_001720) und Maus (*Mus musculus*, NCBI Ref. Nr. NM_007559) verwendet. Es wurden sowohl degenerierte als auch nicht-degenerierte Primer aus allen sieben Exonen des *BMP8b*-Gens abgeleitet. Mit folgenden Kombinationen der unter 2.2.7 aufgeführten Primer wurden PCRs durchgeführt, wobei die Amplifikation eines Kaninchen-spezifischen cDNA-Abschnittes nicht gelang (s. Tab. 5 und 6).

Tab. 5: Kombinationen degenerierter Primer für *Bmp8b*

	Bmp8bA	Bmp8bB	Bmp8bC
Bmp8bD	X	X	X
Bmp8bE	X	X	X
Bmp8bF	X	X	X

Tab. 6: Kombinationen nicht-degenerierter Primer für *Bmp8b*

	Bmp8b_1f	Bmp8b_2f	Bmp8b_3f	Bmp8b_4f	Bmp8b_5f	Bmp8b_6f	Bmp8b_7f
Bmp8b_1r	X	X			X	X	
Bmp8b_2r	X	X			X	X	
Bmp8b_3r	X	X	X	X			
Bmp8b_4r		X	X	X	X		X
Bmp8b_8r					X	X	
Bmp8b_9r						X	X
Bmp8b_10r			X	X		X	X

2.3.7 Ligation, Transformation und Klonierung von cDNA-Fragmenten

Die Exzision der gewünschten Banden aus den angefertigten Agarosegelen (s. 2.3.1) erfolgte unter UV-Beleuchtung (Wellenlänge: 365nm) mit einem Skalpell. Zum Schutz des Gesichtes und der Augen wurde hierbei eine UV-Schutzmaske getragen, außerdem wurde darauf geachtet, dass Hände und Unterarme komplett bedeckt sind, um Verbrennungen zu vermeiden. Aufgrund der Kontamination des Gels mit Ethidiumbromid wurden auch hier bei allen Arbeitsschritten Nitril-Handschuhe getragen. Ausgeschnittene Gelstücke wurden einzeln in Eppendorfgefäße überführt und ihr Nettogewicht ermittelt. Die Extraktion der cDNA erfolgte mit dem „NucleoSpin® Extract-Kit“ gemäß dem Herstellerprotokoll für DNA-Geextraktionen. Die aufgereinigte cDNA wurde gemäß dem Herstellerprotokoll im Mengenverhältnis 3:1 (Insert : Vektor) in den Vektor „pGEM T-Easy“ (Promega) ligiert (s. 2.2.13).

Ligationsansatz: 5µl 2x Ligationspuffer
+ 1µl T-Easy Vektor (50ng)
+ 1µl T4-DNA-Ligase (3 Weiss units)
+ x µl DNA (so dass Insert und Vektor im Verhältnis 3:1 vorliegen)
mit H₂O bidest auf 10µl auffüllen
Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Die Transformation des Inserts in kompetente E.coli Zellen des Stammes DH5α (s. 2.2.14), die als 200µl Aliquots bei -80°C gelagert wurden, erfolgte nach folgendem Schema:

Transformation: 200µl Aliquot auf Eis auftauen lassen.
+ 5µl des Ligationsansatzes.
30 Minuten auf Eis inkubieren, dabei alle fünf Minuten vorsichtig schütteln.
90 Sekunden Hitzeschock bei 42°C im Thermoblock.
Ansätze für zwei Minuten auf Eis abkühlen.
Je Ansatz 1ml SOC Medium hinzu pipettieren, Inkubation für 60 Minuten bei 37°C.

Um die Bakterienkonzentration zu erhöhen, wurden die Ansätze anschließend für 20 Sekunden bei 5000G zentrifugiert, 1ml des Überstandes verworfen und das Sediment in den

verbleibenden 200µl resuspendiert, gleichmäßig ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle der Ligation wurde ein sog. Blau-Weiß-Screening auf x-Gal-Platten durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die Ligation des Inserts indirekt über die Beta-Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen: Durch die β -Galactosidase wird x-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Der Luftsauerstoff oxidiert das 5-Brom-4-chlor-indoxyl zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo. In der kodierenden Gensequenz der Beta-Galaktosidase liegt eine Multiple-Cloning-Site (MCS), die bei erfolgreicher Ligation das PCR Fragment enthält. Bakterien, die das Insert tragen, haben dadurch die Fähigkeit verloren, Beta-Galaktosidase herzustellen und x-Gal zu spalten; diese Kolonien färben sich deshalb nicht blau an.

In jeder Kulturschale wurden bis zu fünf positive (weiße) und eine negative (blaue) Kultur einzeln mit einem Zahnstocher in ein Röhrchen mit 2ml LB-Flüssigmedium (versetzt mit 50mg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator angezüchtet. Aus den eingetrübten Kulturen wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des „Qiagen® Plasmid Purification Kits“ gemäß Herstellerprotokoll extrahiert und die Konzentration der Ausbeute photometrisch (s. 2.3.3) bestimmt. Zur Kontrolle der Inserts wurde ein Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit der Endonuclease „EcoR1“ nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Restriktionsverdau: 2µl Plasmid DNA (1µg/µl)

+ 4µl Tango Puffer

+ 13µl H₂O bidest

+ 1µl EcoR1 (10U)

Inkubation im Thermo Cycler für 1h bei 37°C.

Nach der anschließenden Kontrollelektrophorese (s. 2.3.2) mit 10µl des Reaktionsproduktes sollten zwei Banden erkennbar sein, von denen eine der Größe des erwarteten Inserts entsprechen muss. Die zweite Bande kommt durch das abgetrennte Plasmid zustande. Bei korrekter Insertgröße wurden jeweils 2µg Plasmid-DNA in 20µl 5mM Tris-HCl (pH = 8-9) gelöst und zum Sequenzieren an die Firma MWG Biotech AG (Martinsried) geschickt.

2.3.8 Herstellung einer cRNA-Sonde

Anhand der cDNA-Sequenz konnten Position und Orientierung des Inserts im Plasmid festgestellt und geeignete Hybridprimer für eine PCR ermittelt werden, so dass neben der

genspezifischen Sequenz auch mögliche Promotorsequenzen (in diesem Fall für die T7- und SP6-RNA-Polymerase) für die nachfolgende In-Vitro-Transkription mit amplifiziert wurden. Die Amplifikation des Inserts gelang mit folgendem Ansatz und Protokoll:

PCR-Ansatz: 10µl 10x Puffer
+ 2µl dNTPs (f.c. 0,2mM)
+ 2µl SP6 Primer (10pM)
+ 2µl T7 Primer (10pM)
+ 8µl MgCl₂ (f.c.2mM)
+ 100ng Plasmid-DNA
+ 0,5µl Taq Polymerase (1,25 U)
mit H₂O bidest auf 100µl auffüllen

PCR-Protokoll: Denaturierung 95°C für 1 Min
Denaturierung 95°C für 15 Sek
Annealing 59°C für 30 Sek
Elongation 68°C für 1Min
Insgesamt 40 Zyklen
Nachelongation 68°C für 7 Min

Die Proben wurden gemäß dem Herstellerprotokoll mit dem „NucleoSpin® Extract-Kit“ gereinigt und die DNA-Konzentration photometrisch (s. 2.3.3) bestimmt. Bei der In-Vitro-Transkription wurde je nach Orientierung des Inserts entweder eine SP6- oder eine T7-RNA-Polymerase verwendet. Um die Ausbeute an RNA zu erhöhen, wurde die Reaktion in zwei Schritten mit Inkubationszeiten von zwei und einer Stunde Dauer durchgeführt, wobei folgendes Protokoll befolgt wurde:

In-Vitro-Transkription ca. 200ng cDNA (PCR-Amplifikat)

1. Schritt: +2µl DIG-RNA-Labeling-Mix
+2µl 10x Transkriptionspuffer
+2µl RNA-Polymerase (20 U/µl)
Auffüllen mit DEPC H₂O auf 20µl
Vortexen, sedimentieren und zwei Stunden bei 37°C im Thermo Cycler inkubieren.

In-Vitro-Transkription +7µl DEPC H₂O
2. Schritt: +1µl DIG-NTPs
+1µl 10x Transkriptionspuffer
+1µl RNA-Polymerase
Vortexen, sedimentieren und eine Stunde bei 37°C im Thermo
Cycler inkubieren.

Um die cRNA von überschüssigen Salzen zu reinigen und nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen, wurde sie anschließend nach folgendem Schema auf Eis ausgefällt:

Fällung: 30µl Transkriptionsprodukt
+1,5µl 0,4M EDTA
+3,75µl 4M LiCl
Ansatz vortexen
+100µl 100% Ethanol
Über Nacht bei -20°C lagern

45 Minuten in der Kühlzentrifuge (4°C) mit 15.000g zentrifugieren.
+50µl DEPC H₂O
+5µl 4M LiCl
+150µl 100% Ethanol
60 Minuten bei -20°C inkubieren.

30 Minuten in der Kühlzentrifuge (4°C) mit 15.000g zentrifugieren.
Das Pellet in 25µl DEPC H₂O lösen.

Die Größe der Sonden wurde durch Gelelektrophorese (s. 2.3.2) überprüft, und die Proben bei -20°C eingelagert.

2.3.9 *In-situ*-Hybridisierung (ISH) an ganzen Keimscheiben

Um die Genexpression zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen Frühentwicklung untersuchen zu können, wurden an den nach 2.3.1 präparierten Keimscheiben *in-situ*-Hybridisierungen unter Verwendung der sog. Körbchentechnik (Weisheit 2002) durchgeführt.

Insgesamt benötigen die Reaktionsschritte dieser Art der ISH mindestens drei Tage (vgl. Tab. 7); die wesentlichen Elemente dieser Methode lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Tab. 7: Protokoll für die *in-situ*-Hybridisierung

Tag 1		
75%, 50%, 25% Methanol/PBT	Je 5 Min.	Auf Eis
2x PBT waschen	Je 5 Min.	Bei Raumtemperatur (RT) auf Schaukel
10 mg/ml Proteinase K	2 - 10 Min.	
2x PBT waschen	Je 5 Min.	
0,2 % Glutaraldehyd in PBT (v/v)	20 Min.	
2x PBT waschen	Je 5 Min.	
50% Hybemix in PBT (v/v)	5 Min.	
100% Hybemix	5 Min.	
100% Hybemix	60 Min.	Bei 70°C im Heizblock
+0,4 µg DIG-cRNA-Sonde	Über Nacht	
Tag 2		
3x in Hybemix waschen	Je 30 Min.	Bei 70°C im Heizblock
50% Hybemix in MABT (v/v)	15 Min.	Bei RT auf Schaukel
3x MABT	Je 10 Sek.	
2x MABT	Je 30 Min.	
2% BBR in MABT (v/v)	60 Min.	
2% BBR, 20% NGS in MABT (v/v)	60 Min.	
2 % BBR, 20% NGS + Anti-DIG-AK 1:2000 in MABT	Über Nacht	Im Kühlschrank
Tag 3		
3 x MABT	Je 10 Sek.	Bei RT auf Schaukel
7 x in MABT	Je 60 Min.	
4x in NTMT	Je 10 Min.	
BM-Purple	3 Stunden bis 6 Tage	Bei RT unter Lichtausschluss

Die Keimscheiben wurden in Kunststoffkörbchen, hergestellt aus 2ml Kryogefäßen, deren Boden durch ein feinmaschiges Kunststoffnetz ersetzt worden war, zwischen den jeweiligen Wasch- und Inkubationslösungen umgesetzt.

Am ersten Tag wurde das fixierte Gewebe angedaut, nachfixiert und mit der Digoxigenin-markierten RNA-Sonde über Nacht bei 70°C hybridisiert.

Am zweiten Tag wurde die Sonde ausgewaschen, unspezifische Antikörperbindungsstellen mit BBR und NGS blockiert und das Präparat mit dem Alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Am dritten Tag wurden die nichtgebundenen Antikörper ausgewaschen und die Keimscheiben zum Start der Farbreaktion in 2ml der Färbelösung „BM-Purple[®]“ gelegt.

Je nach eingesetzter Sonde wurden die Präparate über einen Zeitraum von drei Stunden, bis hin zu sechs Tagen, unter Lichtausschluss in der BM-Purple[®]-Lösung inkubiert. Nach Beendigung der Farbreaktion wurden sie zweimal für je fünf Minuten in NTMT-Puffer gewaschen und wieder in PBS überführt.

Bei der ISH handelt es sich um ein eher qualitatives Verfahren des mRNA-Nachweises, d.h. die Menge der mRNA im Gewebe korreliert nicht zwangsläufig mit der Intensität der Färbung über die Zeit. Um trotzdem valide Daten zu erhalten, wurden pro Stadium und Gensonde mindestens drei Embryonen mit gleicher Inkubationszeit in der BM-Purple[®]-Lösung untersucht.

2.3.10 Präparation von Keimscheiben zur Aufsichtbetrachtung und ISH

Die frisch ausgespülten Blastozysten (s. 2.3.1) wurden mehrfach in PBS gewaschen, danach für eine Stunde in 4% PFA (in PBS) fixiert und anschließend wieder in PBS überführt. Unter der Stereolupe wurde die Zona pellucida (eine Proteinhülle, die die Blastozyste bis zur Implantation vollständig umgibt) mit einer abgeflamten Wolframnadel an zwei Stellen perforiert und mit einer Pinzette entfernt. Anschließend wurden die Blastozysten an dem der Keimscheibe gegenüberliegenden Pol mit Hilfe der Wolframnadel und einer spitzen Pinzette eröffnet, wobei darauf zu achten ist, dass die Keimscheibe nicht beschädigt wird. Mit einer Iridektomie-Schere wurden die Keimscheiben mit einem etwa 200µm breiten Randsaum extraembryonalen Gewebes kreisrund ausgeschnitten und anschließend in einer aufsteigenden

Ethanol-Reihe (25%, 50%, 75%, 100% in PBS) entwässert. Sollten die Präparate nicht sofort weiter verwendet werden, wurden sie bei -20°C in Methanol eingefroren und gelagert.

2.3.11 Einbettung der Keimscheiben zur Aufsichtbetrachtung

Um Intensität und Verteilung der Genexpression nach ISH ohne Überlagerungen durch extraembryonales Gewebe beurteilen und fotografieren zu können, wurden die Präparate auf Objektträgern in einer viskösen Lösung, die den Polyvinylalkohol „Mowiol 4-88“ enthält, eingedeckt und ausgebreitet. Hierfür wurden die einzelnen Keimscheiben mit einer stumpfen Glaspipette in einen etwa 50µl großen Tropfen Mowiol überführt, der zuvor in die Mitte eines Objektträgers platziert worden war. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig PBS übertragen wurde. Mit Wolframnadeln wurden die Keimscheiben mit dem Epiblast nach oben ausgerichtet und danach faltenfrei ausgebreitet (falls nötig zusätzlich beschnitten) und glatt gezogen. Anschließend wurde das Präparat mit einem Deckglas blasenfrei bedeckt und konnte nun unter der Stereolupe begutachtet und mit einer Digitalkamera fotografiert werden.

2.3.12 Einbettung der Keimscheiben in Technovit® zur Anfertigung von Semidünnschnitten

Um die Expressionsmuster den einzelnen Schichten des Embryos zuordnen zu können, wurden die Keimscheiben nach ISH (s. 2.3.9) in den Kunststoff „Technovit 8100®“ eingebettet und mit einem Ultramikrotom 5µm dicke Schnittpräparate angefertigt.

Um eine Faltung der Keimscheiben während der Einbettung so gering wie möglich zu halten, wurden die in Mowiol montierten Präparate zunächst für 60 Minuten in 90% Methanol untergetaucht, wenn nötig vom Deckglas befreit und mit Wolframnadeln aus dem Mowiol herausgelöst. Anschließend wurden sie mit einer Glaspipette zunächst für zwei Stunden in ein Infiltrationsmedium (50ml Technovit 8100® und 0,3g Härter I) und danach in Tablettenhüllen überführt, die randvoll mit einem Einbettungsmedium aus Infiltrationslösung und Härter II gefüllt waren, und mit Wolframnadeln ausgerichtet. Die Tablettenhüllen wurden mit einer durchsichtigen Folie luftblasenfrei abgedichtet und über Nacht auf einem Kälteblock bei 4°C inkubiert. Die ausgehärteten Blöcke konnten am nächsten Tag aus den Tablettenhüllen entnommen, mit Rasierklingen getrimmt und am Ultramikrotom geschnitten werden.

2.3.13 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Schnittpräparate

Die fertigen Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop mit und ohne differentiellen Interferenz Kontrast (DIC) untersucht.

Bei der Mikroskopie mit DIC werden Unterschiede in der optischen Dichte des betrachteten Objektes in pseudoplastische Kontrastunterschiede im mikroskopischen Bild umgewandelt. Diese Technik erleichtert dadurch die morphologische Begutachtung ungefärbter Präparate, erschwert jedoch, durch ihren Kontrasteffekt, die Unterscheidung von schwach gefärbten Abschnitten von ungefärbten Abschnitten eines Präparates.

Die Verwendung hochwertiger Plan-Objektive ermöglicht den Ausgleich der sphärischen Aberration, wodurch die Bildränder genauso scharf abgebildet werden wie die Bildmitte.

Die Fotos wurden mit der an das Mikroskop gekoppelten Digitalkamera und mit Hilfe des Computerprogramms „Image-Pro® Discovery“ (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) mit einer Auflösung von 2560x1920, einer Belichtungszeit von 1000ms und einem Leuchtdichtefaktor (Gain-Faktor) von 100 angefertigt.

2.3.14 Morphologische Stadierung der Embryonen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nutzen eine nach morphologischen Kriterien begründete Stadieneinteilung der frühen Gastrulationsphase (Viebahn 2004). In der Aufsichtbetrachtung bilden Keimscheiben des Kaninchens mehrere transiente axiale Strukturen, die sich besonders aufgrund der Zelldichte voneinander abgrenzen lassen. Dies gelingt besonders gut nach Glutaraldehyd- und Osmiumfixierung (Viebahn 1995); viele der im Folgenden beschriebenen Strukturen lassen sich jedoch auch an unfixierten Geweben im stereomikroskopischen Dunkelfeld eindeutig identifizieren und wurden deshalb zur Stadieneinteilung der Embryonen entweder unmittelbar nach dem Ausspülen aus dem Uterus oder nach der Fixierung, aber noch vor der Lagerung bei -20°C, herangezogen. In Zweifelsfällen konnte die Zelldichte (und Zellhöhe) an den nach der *in-situ*-Hybridisierung angefertigten histologischen Schnitten beurteilt und in ihrer Lage einem bestimmten Abschnitt des Embryos zugeordnet werden.

Vor Beginn der Gastrulation ist die Keimscheibe des Kaninchens, aus der in der Folge nahezu alle Gewebe des embryonalen Körpers entstehen, wie bei allen Säugerembryonen zunächst

zweischichtig: Sie besteht aus der oberflächlichen Zellschicht des Epiblasten und der darunter liegenden Zellschicht, dem Hypoblast. Das umgebende sog. extraembryonale Gewebe der Blastozyste ist mit dem oberflächlich liegenden Trophoblast und dem darunter liegenden, die Blastozystenöhle auskleidenden Dottersackepithel ebenfalls zweischichtig. Zusammengenommen sind jedoch die beiden extraembryonalen Epithelschichten nicht so hoch und zell dicht wie die beiden Zellschichten der Keimscheibe, sodass die Keimscheibe in der Aufsicht bereits im nativen oder ungefärbten Zustand durch eine höhere Gewebsdichte vom extraembryonalen Gewebe abgegrenzt werden kann (s. Abb. 1 A und B).

Im Stadium 0 ist der Embryo punktsymmetrisch und lässt noch keine anterior-posteriore Polarisierung erkennen. Der Rand der Keimscheibe ist unregelmäßig mit dem extraembryonalen Gewebe verzahnt.

Das Stadium 1 ist durch die Ausbildung des vorderen Randbogens (VRB) definiert: Der vordere Teil des Keimscheibenrandes ist zell dichter und glatter als zuvor und zeichnet sich scharf vom extraembryonalen Gewebe ab.

Wenige Stunden vor der Primitivstreifenbildung entwickelt sich gegenüber des VRB die zellärmere, sichelförmige posteriore Gastrulationsextension (PGE), die dann das Stadium 2 definiert.

Im Stadium 3 entwickelt sich innerhalb der PGE der Primitivstreifen, in dem Zellen des Epiblasten zur Mittellinie des Embryos wandern, die Basalmembran durchbrechen und als Mesodermzellen in die Schicht zwischen Epi- und Hypoblast einwandern und so das erste der drei definitiven Keimblätter bilden.

Nachdem der Primitivstreifen seine volle anterior-posteriore Ausdehnung erreicht hat, bildet sich an seiner vorderen Spitze ein kurzer, verdickter Abschnitt, der sog. Primitivknoten. Der Primitivknoten ist das Hauptmerkmal des Stadiums 4; außerdem findet sich in diesem Stadium Mesoderm im Bereich unmittelbar anterior des Primitivknotens.

Das Stadium 5 ist gekennzeichnet durch die Ausbildung des Chordafortsatzes, einer epithelialen Struktur hoher Zelldichte, die sich nach anterior an den Primitivknoten anschließt; der Chordafortsatz ist von entscheidender Bedeutung für die Induktion der

Neuralplatte. Das Mesoderm erstreckt sich nun über die volle Länge der Keimscheibe, und zwar intraembryonal zwischen Epiblast und Hypoblast und extraembryonal zwischen Trophoblast und Dottersackepithel; auch anterior reicht das Mesoderm bereits über den Rand der Keimscheibe hinaus.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung, Charakterisierung und Expression von *Blimp1*

3.1.1 Klonierung der *Blimp1*-cDNA

Mit den in Kapitel 2.2.7 aufgeführten Primern gelang die Isolierung von zwei Fragmenten des Kaninchen-*Blimp1*, die zur Herstellung von cRNA-Sonden herangezogen werden konnten. Das Fragment A7 liegt auf der cDNA weiter "upstream" und hat eine Länge von 722 Basen, das Fragment C10 liegt weiter "downstream" als das Fragment A7 und ist 436 Basen lang (vgl. Tab. 2). Nach der Sequenzdatenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Accession Number: NM_001198) liegen beide Fragmente im Open-reading-frame (ORF) des *Blimp1*-Gens, innerhalb des Abschnittes, der für die sog. PR-Domäne kodiert. Beide Fragmente erstrecken sich über mehrere Exone. In Tabelle 8 sind die Homologien der Fragmente zu den *Blimp1*-cDNA-Sequenzen anderer Säuger aufgelistet.

Tab. 8: Prozentuale Homologie der *Blimp1*-cDNA des Kaninchens im Vergleich mit verschiedenen Säugern

	Fragment A7	Fragment C10
Mensch	86%	91%
Maus	85%	86%
Ratte	85%	88%
Schimpanse	86%	91%
Rhesus-Affe	86%	90%
Hund	83%	91%
Rind	84%	90%

In einer ersten in situ Hybridisierungsreihe ergaben die cRNA-Sonden der beiden oben beschriebenen Fragmente in verschiedenen Stadien jeweils identische Ergebnisse, weshalb für die Analyse der Expression in einer vollständigen Serie von Entwicklungsstadien nur noch die Sonde C10 verwendet wurde.

3.1.2 Expressionsmuster von *Blimp1*

Bereits in Embryonen des Stadiums 0 ist die *Blimp1*-Expression im mikroskopischen Hellfeld an einer punktförmigen, im Wesentlichen auf die Keimscheibe beschränkten dunkelblauen Färbung auf hellblauem Hintergrund des intra- und extraembryonalen Gewebes erkennbar (Abb. 1E, F). *Blimp1*-exprimierende Zellen sind demnach über die gesamte Keimscheibe und angrenzende extraembryonale Abschnitte verteilt, treten jedoch gehäuft in einem leicht exzentrisch gelegenen Areal mit stärkerer Färbung auf. In wenig älteren Stadien, die anhand des VRB eine axiale Zuordnung der Farbreaktion erlauben, erkennt man, dass sich eine ähnlich geformte Domäne höherer Expressionsintensität in der anterioren Hälfte des Embryos befindet. Der bereits im Stadium 0 erkennbare exzentrische *Blimp1*-exprimierende Bereich markiert deshalb schon im Stadium 0 den anterioren Bereich der Keimscheibe. *Blimp1*-exprimierende Zellen außerhalb der Keimscheibe treten vor allem in jungen Embryonen dieses Stadiums auf (Stadium 0⁻; Abb. 1A, E). In den Schnittpräparaten haben Zellen des Epiblasten und des Hypoblasten eine mehr oder weniger starke Anfärbung mit dem blauen Reaktionsprodukt der in-situ-Hybridisierung (Abb. 1I, J); auf zellulärer Ebene ist die Färbung im Wesentlichen auf das Zytoplasma konzentriert, da sie im Zentrum einer Zelle, d.h. im Bereich des Zellkerns, im Vergleich mit den peripheren Abschnitten der Zelle meist reduziert ist. Im (anterioren) intensiver gefärbten Areal der Keimscheibe lässt sich die starke punktförmige Anfärbung einzelnen Hypoblastzellen zuordnen (Abb. 1L, schwarze Pfeilspitzen); die Intensität dieser Anfärbung dient im Übrigen als Beispiel für eine Farbintensität, die oben und in der folgenden Beschreibung mit „*Blimp1*-Expression“ gleichgesetzt wird. Blau gefärbte Zellen außerhalb der Keimscheibe (vorwiegend im Stadium 0⁻) liegen im Dottersackepithel und im Trophoblasten (Abb. 1I, K, schwarze Pfeilspitzen).

Im Stadium 1 tritt zusätzlich zu einem stärker gefärbten Bereich im Inneren der Keimscheibe eine intensive Färbung am anterioren Rand des Embryos auf. Diese Expressionsdomäne ist im Stadium 1⁻ noch diffus und mit zahlreichen Lücken durchsetzt, im Stadium 1⁺ ist sie dagegen homogen flächig und setzt sich zum Inneren der Keimscheibe hin in eine stark *Blimp1*-positive Domäne fort (Abb. 1G, H). Auch im posterioren Bereich des Embryos ist die *Blimp1*-Expression im Vergleich zum vorhergehenden Stadium stärker; sie ist jedoch insgesamt diffuser und weniger intensiv als im anterioren Bereich. In den histologischen Schnitten von Embryonen des Stadiums 1 ist das folgende Schichten- und Regionen-spezifisches Muster erkennbar: *Blimp1* wird intensiv in den Hypoblastzellen des VRB exprimiert, während im Epiblasten keine einer *Blimp1*-Expression entsprechende Färbung mehr auftritt (Abb. 1M, N).

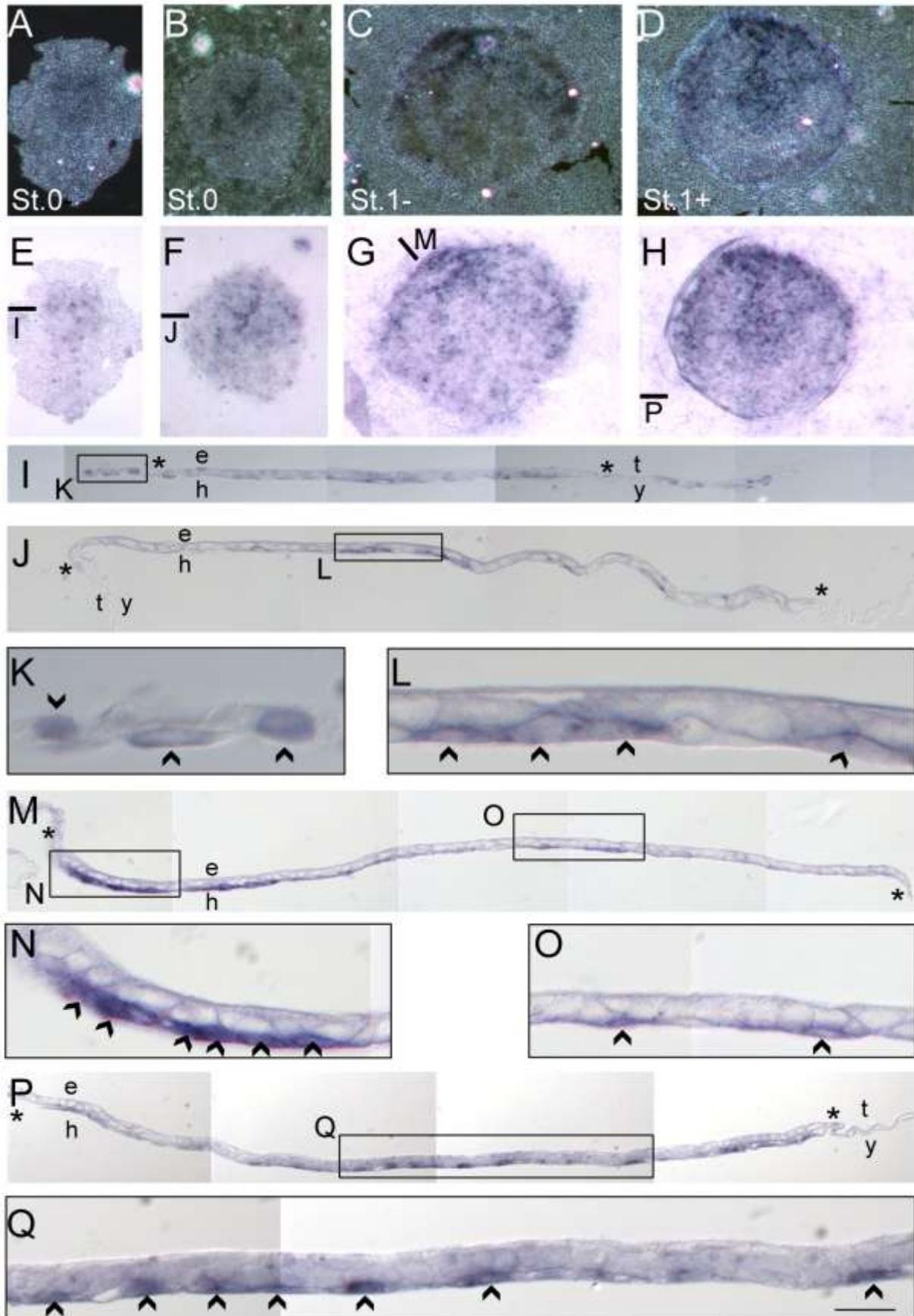


Abb. 1: *Blimp1*-Expression als früher axialer Marker im Hypoblast

Stadien 0 und 1 in dorsalen Aufsichten (A-D Dunkelfeld, E-H Hellfeld) und transversalen (I, J, P) oder schrägtransversalen (M) Technovit-Schnitten durch die Keimscheiben in E bis H (Schnittebenen und Position sind jeweils durch die schwarze Linie angedeutet) bei schwacher (I, J, M und P) und starker

(K, L, N, O und Q) Vergrößerung. Schwarze Pfeilspitzen deuten auf gefärbte Zellen im Trophoblasten und im Dottersackepithel; Sternchen markieren den Keimscheibenrand; e: Epiblast; h: Hypoblast; y: Dottersackepithel; t: Trophoblast. Maßstab: A-H: 250µm; I, J, M, P: 55µm; K, L, N, O, Q: 18µm.

In der Mitte und im posterioren Anteil der Keimscheibe treten zahlreich vereinzelte Hypoblastzellen auf, die ebenfalls – wenn auch deutlich schwächer als die des VRB – *Blimp1* exprimieren (Abb. 1M, O, schwarze Pfeile). Im späten Stadium 1 wird die Expressionsintensität dieser Hypoblastzellen genauso stark wie im VRB, außerdem tritt im posterioren Anteil des Embryos eine schwache Färbung im Epiblasten auf (Abb. 1P, Q).

Im Stadium 2 ist die *Blimp1*-Expression im Zentrum der Keimscheibe im Vergleich zum vorhergehenden Stadium schwächer (Abb. 2A bis F). Am anterioren und am posterioren Pol wird *Blimp1* jedoch in zwei spangenförmigen, häufig bilateral asymmetrischen Arealen mit hoher Intensität exprimiert, die über ihre schwächer gefärbten Ausläufer an den lateralen Rändern der Keimscheibe miteinander verbunden sind. Die anteriore Expressionsdomäne weist im Vergleich zur posterioren Domäne eine zusammenhängende flächige Expression auf. Schnitte durch die anteriore Spange zeigen eine intensive Färbung der Hypoblastzellen des VRB. In den meisten Abschnitten des Epiblasten ist weiterhin keine *Blimp1*-Expression erkennbar (Abb. 2G), nur im Bereich der oben beschriebenen posterioren Spange treten zum ersten Mal stark gefärbte, meist einzeln liegende Epiblastzellen auf (Abb. 2H). Ihre *Blimp1*-Expressionsintensität kommt derjenigen im Hypoblasten des VRB gleich, und in ihrer Lage an den lateralen Rändern der Keimscheibe stehen sie meist in enger räumlicher Beziehung zu den besonders intensiv gefärbten Zellen des Hypoblasten (Abb. 2I, J, schwarze Pfeilspitzen).

Im Stadium 3 ist die Expressionsintensität am anterioren Pol der Keimscheibe genau so schwach wie an den lateralen Rändern. Die Expressionsdomäne am posterioren Pol ist halbmondförmig und im Vergleich zum Stadium 2 deutlich verschmälert; auflichtmikroskopisch treten in diesem Bereich nur noch wenige intensiv blau gefärbte Zellen auf (Abb. 3A, E). Wie die histologischen Präparate zeigen, handelt es sich hier um einzelne Zellen des Epiblasten und des entstehenden Mesoderms, die stark *Blimp1* exprimieren (Abb. 3I, J, K, schwarze Pfeilspitzen). Die übrigen Zellen dieser Schichten, wie auch die des Hypoblasten weisen eine deutlich schwächere oder gar keine Färbung auf.

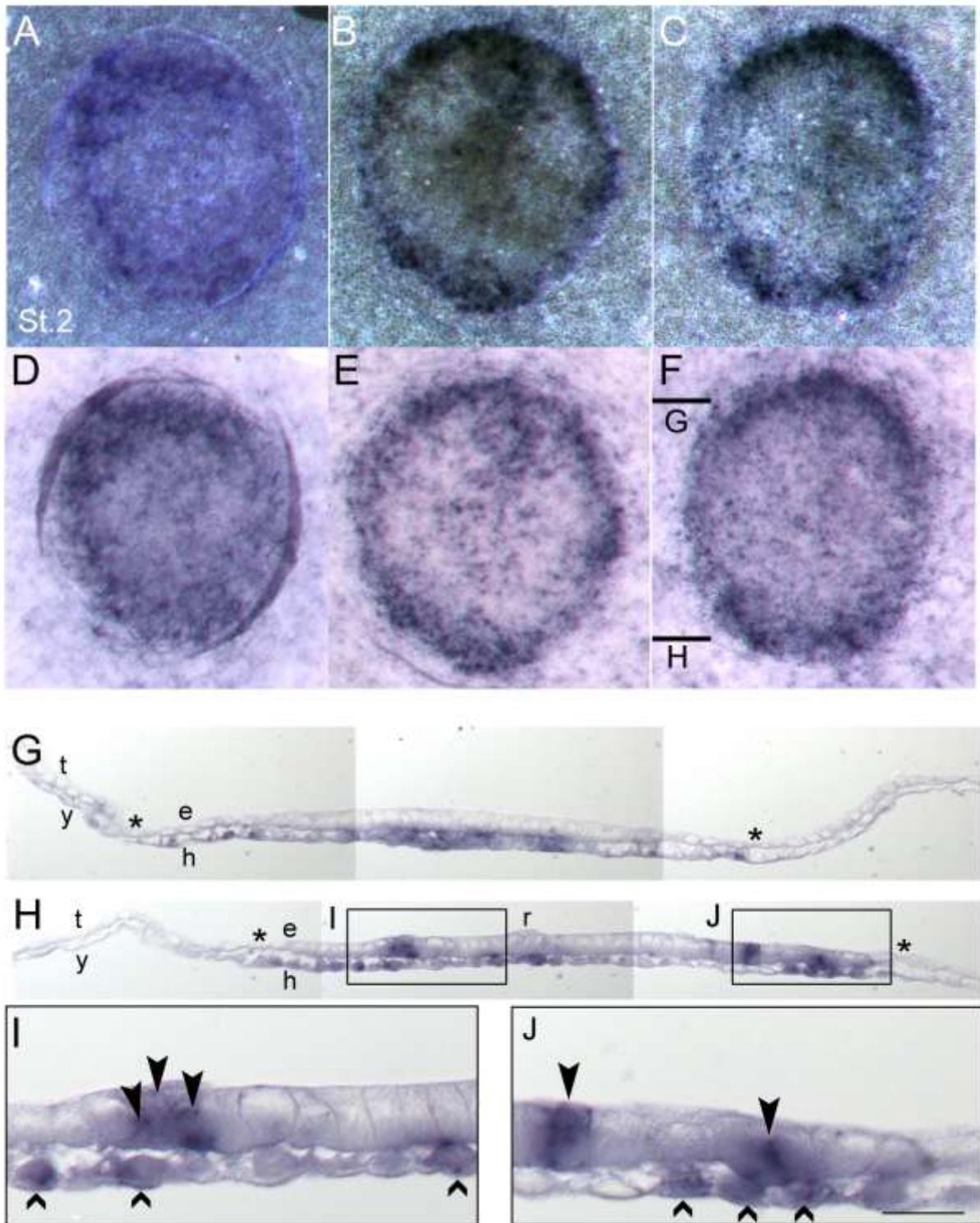


Abb. 2: *Blimp1*-Expression im posterioren Epiblasten im Stadium 2

Stadium 2 in dorsalen Aufsichten (A-C Dunkelfeld, D-F Hellfeld) und Technovit-Schnitten (G-J). G zeigt einen Schnitt durch den anterioren Bereich der Keimscheibe in F (Schnittebenen sind durch die schwarzen Linien angedeutet) mit starker *Blimp1*-Expression in den Hypoblastzellen des Vorderen Randbogens. H zeigt einen Transversalschnitt durch den posterioren Anteil derselben Keimscheibe. Die Vergrößerungen I und J zeigen neben einzelnen intensiv gefärbten Hypoblastzellen (kleine Pfeile)

die ersten stark Blimp1-exprimierenden Zellen im Epiblasten (große Pfeile). Die Sternchen markieren den Keimscheibenrand; e: Epiblast; h: Hypoblast; y: Dottersackepithel; t: Trophoblast; r: Rauber-Deckzellen. Maßstab: A - F: 200µm; G, H: 55µm; I, J: 18µm.

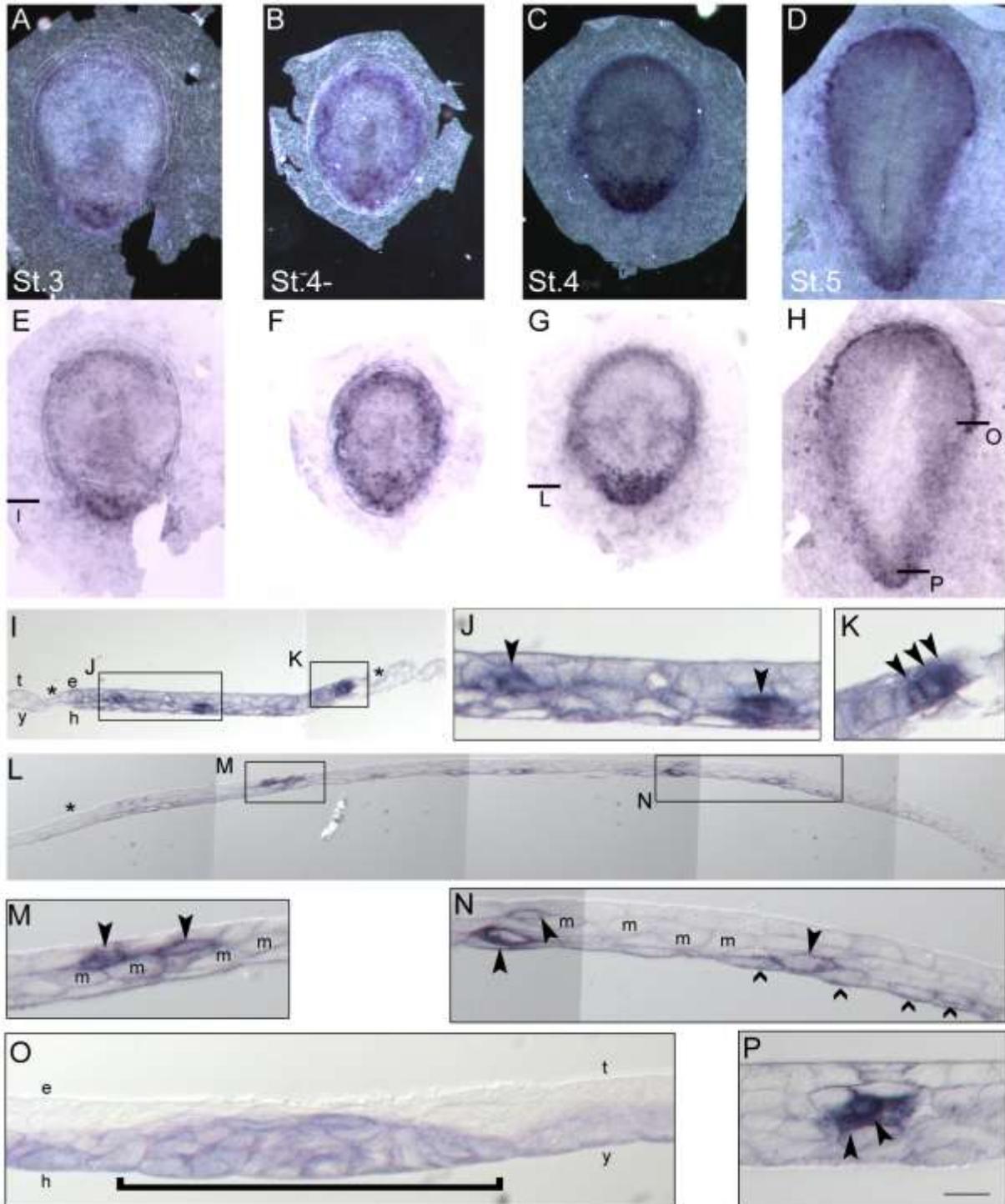


Abb. 3: Blimp1-Expressionsmuster der Stadien 3 bis 5

In dorsalen Aufsichten (A-D Dunkelfeld, E-H Hellfeld) und Technovit-Schnitten (I-P). I zeigt einen Schnitt durch die Keimscheibe in E (Schnittebenen sind jeweils durch die schwarze Linie angedeutet) aus dem die zwei Bereiche J und K mit intensiv Blimp1-exprimierenden Zellen im Epiblast und im entstehenden Mesoderm (schwarze Pfeile) vergrößert dargestellt sind. L zeigt einen Schnitt durch die

Expressionsdomäne in G. Die großen schwarzen Pfeile in den Vergrößerungen M und N markieren einzelne *Blimp1*-exprimierende Mesodermzellen, die kleinen Pfeile deuten auf gefärbte Zellen des Hypoblasten. O zeigt eine Vergrößerung der anterioren Expressionsdomäne in H, die eckige Klammer umfasst einen Bereich mit der typischen Morphologie der Blutinseln. Im Ausschnitt der posterioren Expressionsdomäne in Q deuten die schwarzen Pfeile auf stark *Blimp1*-exprimierende Mesodermzellen. Die Sternchen markieren den Keimscheibenrand; e: Epiblast; h: Hypoblast; m: Mesoderm; y: Dottersackepithel; t: Trophoblast. Maßstab: A-H: 250µm; I, L: 48µm; J, K, M - Q: 16µm.

Im Stadium 4 nimmt die Anzahl der gefärbten Zellen und damit die Ausdehnung der Expressionsdomäne am posterioren Pol im Vergleich zum vorangegangenen Stadium zu (Abb. 3B, C, F, G). *Blimp1* wird jedoch nur noch von einzeln liegenden Mesodermzellen intensiv exprimiert, während die übrigen Zellen dieser Schicht in den Schnittpräparaten keine Färbung aufweisen. Diese *Blimp1*-positiven Mesodermzellen liegen ausschließlich innerhalb der Keimscheibe, sind häufig groß und rund und liegen meist in unmittelbarem Kontakt zum Hypoblasten (Abb. 3L, M, N, große Pfeilspitzen). Im Epiblasten treten keine gefärbten Zellen mehr auf. Allerdings erkennt man nach wie vor eine schwache Färbung im Hypoblasten, die sich nach extraembryonal in das angrenzende Dottersackepithel fortsetzt (ohne Abb.).

In Embryonen des Stadiums 5 ist die *Blimp1*-Expression am posterioren Pol im Vergleich zum Stadium 4 vermindert, am anterioren Pol der Keimscheibe nimmt jedoch ein scharf begrenztes, halbkreisförmiges Areal intensiver Färbung Gestalt an (Abb. 3D, H). In der posterioren Expressionsdomäne gibt es nur noch wenige gefärbte Mesodermzellen (Abb. 3P). Ausschnitte aus der anterioren Expressionsdomäne zeigen *Blimp1*-Expression in Zellen des Hypoblasten und des Dottersackepithels. Außerdem sind Areale am Rand der Keimscheibe, die aufgrund ihrer Anordnung und Morphologie Regionen mit beginnender Vaskulogenese und Blutbildung (sog. Blutinseln) entsprechen, homogen angefärbt (Abb. 3O, eckige Klammer).

3.2 Isolierung, Charakterisierung und Expression von *BMP2*

3.2.1 Klonierung der *BMP2*-cDNA

Mit den in Kapitel 2.2.7 genannten Primern gelang die Isolierung eines 812 Basen umfassenden Fragmentes, das auf der Kaninchen-cDNA dem Abschnitt bp62 – bp873 entspricht (Übereinstimmung im Alignment: 99,6%), und zur Herstellung einer Gensonde herangezogen wurde. Nach der NCBI Datenbank (s.o.) liegt das cDNA-Fragment im Bereich

des ORF des Kaninchen-*BMP2*-Gens (Accession Number: NM_001082650.1), und umfasst den größten Teil des Gen-Abschnittes, der für das *BMP2*-Precursor-Protein kodiert.

3.2.2 Expressionsmuster von *BMP2*

In Embryonen des Stadiums 1, dem jüngsten im Rahmen dieser Arbeit auf *BMP2*-Expression hin untersuchten Stadium, wird *BMP2* in einem ringförmigen Areal am Rand Keimscheibe herum besonders stark exprimiert (Abb. 4A, F). Darüber hinaus treten einzelne *BMP2*-positive Zellen versprengt im extraembryonalen Gewebe auf, das sich direkt an die Keimscheibe anschließt. Histologische Schnittpräparate (ohne Abb.) zeigen, dass einzelne Zellen des Hypoblasten und des Dottersackepithels gefärbt sind, wobei die intensive Expression im Randbereich der Keimscheibe dem Hypoblasten zuzuordnen ist, da sie innerhalb des durch den Übergang von Epiblast zu Trophoblast definierten Keimscheibenrandes liegt.

Im Stadium 2 wird die Keimscheibe durch die ringförmige Expressionsdomäne etwas schärfer begrenzt, als im vorangegangenen Stadium. Im Bereich des posterioren Pols ist der Ring etwas aufgelockert und weniger intensiv gefärbt; die Begrenzung ist deshalb dort unschärfer als anterior (Abb. 4B, G). Histologische Schnitte zeigen, in welcher Schicht der Blastozyste die markierten Zellen liegen: Die ringförmige Expressionsdomäne wird anterior von 8 – 10 und posterior von 4 – 6 direkt am Rand der Keimscheibe gelegenen Zellen gebildet, die morphologisch dem Hypoblasten, und damit den intraembryonalen Geweben, zuzuordnen sind (Abb. 4K). Am posterioren Pol der Keimscheibe sind diese Hypoblastzellen flach, am anterioren Pol dagegen bilden sie ein kubisches Epithel aus, was den morphologischen Kriterien des VRB entspricht (Abb. 4K, Ausschnittvergrößerungen). In den extraembryonalen Bereichen gibt es vereinzelte Dottersackepithelzellen, die ebenfalls *BMP2* exprimieren.

Im Stadium 3 ist der *BMP2*-exprimierende Randsaum der Keimscheibe am posterioren Pol und an den lateralen Rändern im Vergleich zum vorigen Stadium verbreitert, die Expression im extraembryonalen Gewebe nimmt zu. Im Inneren der Keimscheibe gibt es vereinzelte Zellen, die mit unterschiedlich starker Intensität *BMP2* exprimieren (Abb. 4C, H). Histologisch zeigt sich ein im Vergleich zu Stadium 2 unverändertes Bild: Die Expression beschränkt sich auf Zellen des Hypoblasten und des Dottersackepithels, auch die *BMP2*-

positiven Zellen im Inneren der Keimscheibe sind der Schicht des Hypoblasten zuzuordnen (ohne Abb.).

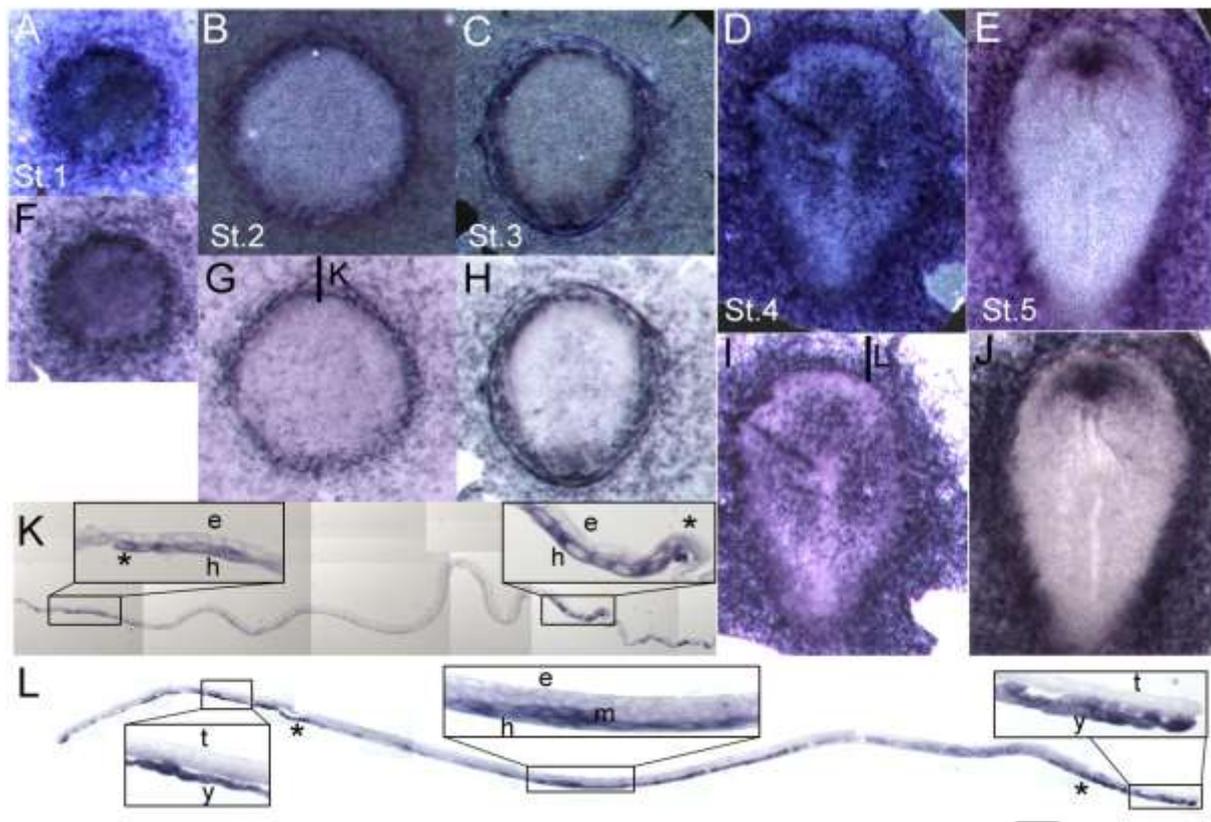


Abb. 4: *BMP2*-Expressionsmuster der Stadien 1 bis 5

In dorsalen Aufsichten (A-E Dunkelfeld, F-J Hellfeld) und Technovit-Schnitten (K-Q). K zeigt einen Schnitt durch die Keimscheibe in G (Schnittebenen jeweils durch die schwarze Linie angedeutet). Die Ausschnittvergrößerung M zeigt die *BMP2*-exprimierenden Hypoblastzellen im Bereich des posterioren Keimscheibenrandes, N zeigt die Expression im Hypoblasten des vorderen Randbogens (VRB). L zeigt einen Schnitt durch die Keimscheibe I. Die Ausschnittvergrößerung O zeigt die Expression im Dottersackepithel des anterioren extraembryonalen Bereichs, P zeigt *BMP2*-exprimierende Hypoblast- und Mesodermzellen im Inneren der Keimscheibe und Q zeigt die Expression im Dottersackepithel und im extraembryonalen Mesoderm des posterioren extraembryonalen Bereichs. Die Sternchen markieren den Keimscheibenrand; e: Epiblast; h: Hypoblast; y: Dottersackepithel; t: Trophoblast; m: Mesoderm. Maßstab: A-J: 200µm; K, L: 50µm; Ausschnittvergrößerungen: 16,5µm.

Im Stadium 4 wird *BMP2* im Inneren der Keimscheibe intensiv in einem hufeisenförmigen Areal exprimiert, das den Primitivknoten und das anteriore Drittel des Primitivstreifens umschließt, die beide frei von *BMP2*-Expression sind. Die lateralen Ausläufer dieses Areals stehen in direktem Kontakt zum *BMP2*-positiven Rand der Keimscheibe. In den Bereichen lateral der posterioren Anteile des Primitivstreifens ist die Expressionsintensität deutlich

schwächer. In den extraembryonalen Bereichen nimmt die *BMP2*-Expression im Vergleich zum vorangegangenen Stadium deutlich zu (Abb. 4D, I). Im Bereich der hufeisenförmigen Expressionsdomäne wird *BMP2* von Zellen des Mesoderms intensiv exprimiert. Diese Mesodermzellen lagern sich eng an die darunter liegende Schicht des Hypoblasten an, in der sich ebenfalls eine schwache Färbung nachweisen lässt (Abb. 4L). Die Ränder der Keimscheibe werden nach wie vor von *BMP2*-positiven Hypoblastzellen markiert. Die Expression setzt sich nach extraembryonal ins Dottersackepithel fort, dass in diesem Stadium als Ganzes eine intensive *BMP2*-Expression aufweist. Die Zellen des extraembryonalen Mesoderms exprimieren *BMP2* in einer Intensität, die derjenigen in der hufeisenförmigen Expressionsdomäne gleichkommt (Abb. 4L).

Im Stadium 5 wird im Inneren der Keimscheibe mit Ausnahme eines scharf begrenzten Areals anterior des Chordafortsatzes, der der in diesem Stadium entstehenden Prächordalplatte entspricht, keine *BMP2* mehr exprimiert. In den extraembryonalen Bereichen ist die Expressionsintensität im Vergleich zum vorangegangenen Stadium unverändert. Schnittpräparate dieses Stadiums wurden nicht untersucht

3.3 Expressionsmuster von *BMP4*

In Embryonen des Stadiums 2, dem jüngsten im Rahmen dieser Arbeit auf *BMP4*-Expression hin untersuchten Stadium, sind auflichtmikroskopisch diffus gefärbte Zellen zu erkennen, die über die gesamte Keimscheibe und das umgebende extraembryonale Gewebe verteilt sind. Dabei liegt die höchste Dichte gefärbter Zellen in Bereichen am Keimscheibenrand (Abb. 5A, F). Die Schnittpräparate zeigen eine schwache Expression im Hypoblasten und – etwas stärker – im Epiblasten. Die Färbung im extraembryonalen Gewebe lässt sich nicht eindeutig dem Trophoblast oder Dottersackepithel zuordnen (Abb. 5K).

Im Stadium 3 ist die Keimscheibe von einem schmalen Streifen *BMP4*-exprimierender Zellen vollständig umgeben; am posterioren Pol des Embryos geht der Streifen in ein umschriebenes, sichelförmiges Areal intensiver Expression über (Abb. 5B, G). Die histologischen Schnittpräparate weisen die am anterioren Pol liegenden *BMP4*-exprimierenden Zellen als die zwei bis drei randständigen Reihen von Epiblast- und Hypoblastzellen aus, wobei die *BMP4*-Expression im Epiblast schwächer ist als im Hypoblast. Zusammen tragen diese Zellen zur scharfen Markierung des ansonsten nur durch die Zellhöhe in der oberflächlichen Schicht der

Blastozyste definierten Überganges zwischen der intra- und der extraembryonalen Region bei. Im angrenzenden Dottersackepithel gibt es vereinzelt Zellen, die ebenfalls eine schwache Blaufärbung aufweisen. In der posterioren Expressionsdomäne exprimieren Zellen des Epiblasten und des sich entwickelnden Mesoderms intensiv *BMP4*, wobei in beiden Schichten *BMP4*-positive und *BMP4*-negative Zellen unmittelbar nebeneinander liegen können. *BMP4*-Expression tritt auch im Hypoblast und im angrenzenden Dottersackepithel auf (Abb. 5L und Ausschnittvergrößerungen).

In Embryonen des Stadiums 4 ist die Expressionsdomäne am posterioren Pol im Vergleich zum vorangegangenen Stadium deutlich vergrößert, außerdem tritt in diesem Stadium eine intensive *BMP4*-Expression im extraembryonalen Gewebe auf: im frühen Stadium 4 liegen stark *BMP4*-positive Zellen im Bereich des posterioren Pols (ohne Abb.), im späteren Stadium 4 werden die hinteren zwei Drittel der Keimscheibe vollständig von einem breiten, Saum starker *BMP4*-Expression umgeben, dessen anteriore Begrenzung histologisch dem Rand des extraembryonalen Mesoderms entspricht (Abb. 5C, D, H, I). Histologisch zeigt sich eine intensive Expression vor allem im intra- und extraembryonalen Mesoderm. Diese ist jedoch keinesfalls gleichmäßig; eine intensive Expression findet sich in den Anteilen des Mesoderms, die nahe am Keimscheibenrand gelegen sind und setzt sich ins extraembryonale Mesoderm fort. Die Zellen des Mesoderms im inneren der Keimscheibe exprimieren *BMP4* nur schwach oder gar nicht, wodurch der Übergang von intra- zu extraembryonalem Mesoderm durch die unterschiedliche Intensität der *BMP4*-Expression scharf definiert wird (Abb. 5M, O, P). Im Bereich des posterioren Primitivstreifens gibt es *BMP4*-positive Epiblastzellen (Abb. 5N, Q). Der Rand der Keimscheibe wird nach wie vor von mehreren übereinander liegenden Epi- und Hypoblastzellen mit schwacher *BMP4*-Expression markiert. Auf Ebene des Hypoblasten setzt sich diese in das angrenzende Dottersackepithel fort, das als Ganzes eine schwache Färbung aufweist. Im Trophoblasten lässt sich keine *BMP4*-mRNA nachweisen. Innerhalb der posterioren Expressionsdomäne exprimieren die Zellen des Hypoblasten schwach *BMP4*; diese Expression setzt sich ins angrenzende Dottersackepithel fort (Abb. 5M, N).

Im Stadium 5 reicht die *BMP4*-Expression im extraembryonalen Gewebe bis an den vorderen Rand der Keimscheibe heran, ohne diesen jedoch vollständig zu umschließen, die Expressionsintensität sowohl intra- als auch extraembryonal ist im Vergleich zum Stadium 4 stärker (Abb. 5E, J). Histologisch zeigt sich, dass die Expression in diesem Stadium fast

ausschließlich auf das Mesoderm begrenzt ist. Mit Ausnahme des Keimscheibenrandes lässt sich keine *BMP4*-Expression mehr in den Zellen von Epiblast, Hypoblast, Amnion- und Dottersackepithel nachweisen (vgl. Abb. 5L).

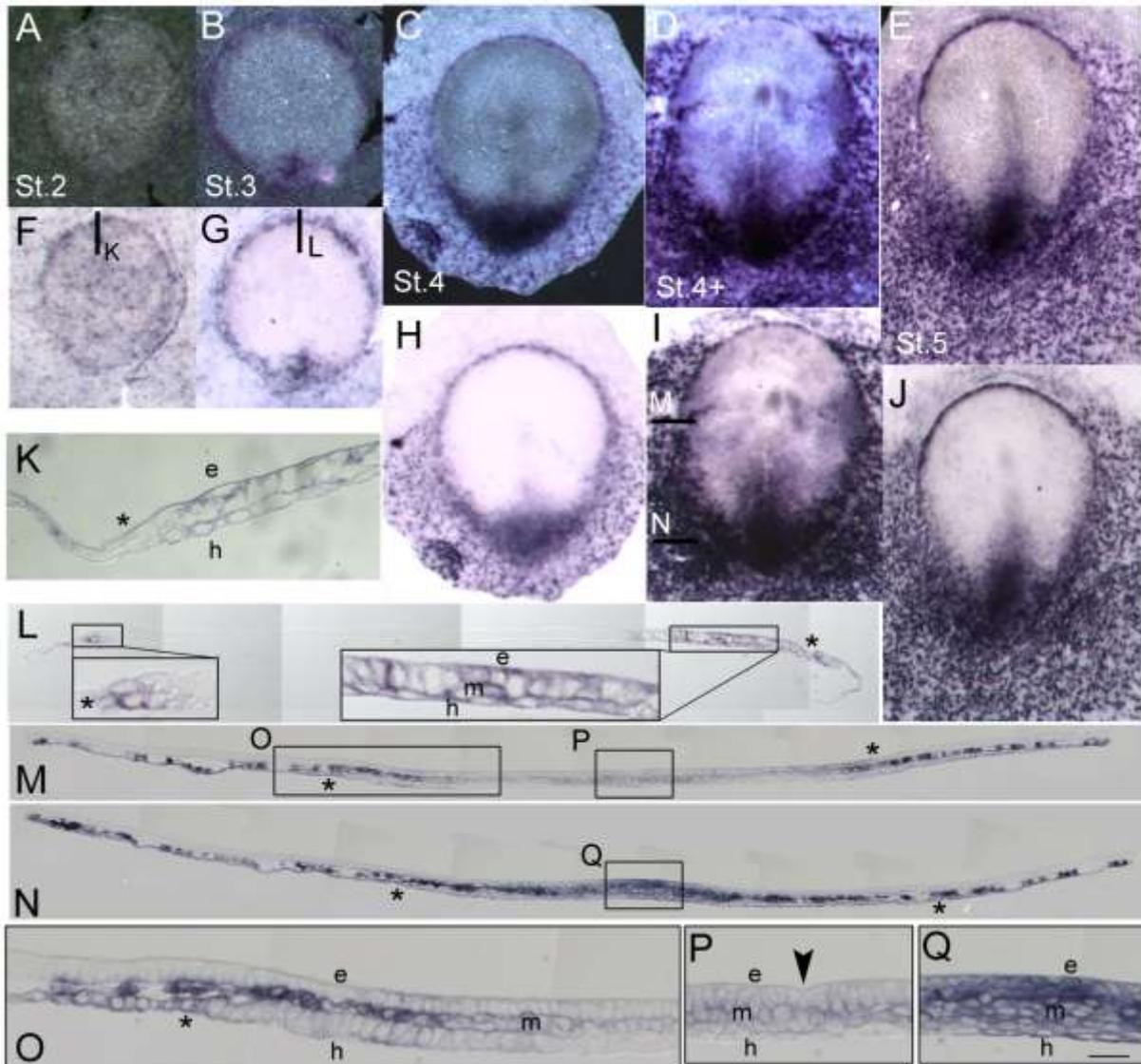


Abb. 5: *BMP4*-Expressionsmuster der Stadien 2 bis 5

In dorsalen Aufsichten (A-E Dunkelfeld, F-J Hellfeld) und Technovit-Schnitten (K-S). K zeigt einen Ausschnitt des vorderen Randbogens (VRB) der Keimscheibe F mit einer schwachen Blaufärbung in den Zellen des Epiblasten (Schnittebenen jeweils durch die schwarze Linie angedeutet). L zeigt einen Schnitt durch die Keimscheibe G mit Ausschnittvergrößerungen aus dem Bereich des anterioren Keimscheibenrandes (O) und der posterioren Expressionsdomäne (P). M und N zeigen Transversalschnitte durch die Keimscheibe I auf Höhe des Primitivknotens (M) und der posterioren Expressionsdomäne (N). Q ist eine Ausschnittvergrößerung des lateralen Keimscheibenrandes in M mit intensiver *BMP4*-Expression in den Zellen des intra- und extraembryonalen Mesoderms und einer schwächeren Expression im Dottersackepithel. R zeigt vergrößert den Bereich des Primitivknotens (schwarzer Pfeil) mit einer sehr schwachen Expression im Mesoderm. S zeigt eine Ausschnittvergrößerung durch den Bereich des posterioren Primitivstreifens in N mit intensiver *BMP4*-

Expression in Epiblast und Mesoderm. Die Sternchen markieren den Keimscheibenrand; e: Epiblast; h: Hypoblast; m: Mesoderm. Maßstab: A-J: 200µm; L: 36µm; Ausschnittvergrößerungen: 12µm; M,N: 50µm; K, O-Q,: 16,5µm.

3.4. Klonierung der *BMP8b*-cDNA

Mit den in Kapitel 2.2.7 genannten Primern gelang es trotz wiederholter Versuche und vielfältiger Kombinationen der unterschiedlichen Primer (vgl. 2.2.6.3) nicht, ein spezifisches cDNA-Fragment zu isolieren. Lediglich die Primer-Kombinationen 4f-4r und 4f-10r, die isoliert auf Exon7 des Mausgenes liegen, ergaben deutliche Banden; die Sequenzierung des Amplifikats ergab jedoch auch hier ein unspezifisches Ergebnis, so dass für das Kaninchen-*Bmp8b* keine funktionierende Sonde hergestellt werden konnte.

4. Diskussion

Auf der Suche nach Mechanismen der initialen Keimzellbildung, die für Säuger allgemeingültig sein könnten, wurden in der vorliegenden Arbeit die Expressionsmuster dreier Schlüssel-moleküle unmittelbar vor und während der Gastrulation beim Kaninchen untersucht. Der Vergleich von bis zu sechs morphologisch definierten Stadien (Stadium 0 bis 5) ergibt ein komplexes Bild des räumlichen und zeitlichen Zusammenspiels dieser „Akteure“, das nun mit den entsprechenden Daten der Maus als einzig anderem mit diesen Parametern bisher untersuchten Säuger korreliert werden kann.

Blimp1 ist als derzeit wichtigster funktioneller Marker von PGC-Vorläuferzellen in der Maus (Ohinata et al. 2005) beim Kaninchen relativ früh, nämlich deutlich vor Beginn der Gastrulation und dem bisher angenommenen Beginn der Keimzeldifferenzierung in Embryonen des Stadiums 0 nachweisbar. Ab dem Stadium 2 wird *Blimp1* in einzelnen Epiblastzellen, die als PGC-Vorläuferzellen betrachtet werden können, in einer bilateral symmetrischen Expressionsdomäne am posterioren Rand der Keimscheibe exprimiert und im Stadium 3 finden sich einzelne stark *Blimp1*-exprimierende, nun als definitiv zu bezeichnende PGCs auch im sich entwickelnden Mesoderm des posterioren Anteils des Primitivstreifens. Die Anzahl dieser auch als „geblimpt“ bezeichneten Zellen (Chuva de Sousa Lopes und Roelen 2008) nimmt vorübergehend, bis ins Stadium 4, deutlich zu; ab dem Stadium 5 lassen sich jedoch nur noch wenige *Blimp1*-exprimierende Zellen in den für eine hohe PGC-Zahl bekannten Bereichen des Kaninchenembryos nachweisen (Weckelmann et al. 2008)

Auch *BMP2* und *BMP4*, zwei aus dem Mausmodell bekannte, für die PGC-Entwicklung wichtige Signalmoleküle (Ying und Zhao 2001; Lawson et al. 1999), zeigen im Kaninchenembryo schon ab Stadium 1 bzw. Stadium 2 eine stabile Expression. Aufsichtsmikroskopisch weisen die beiden Expressionsmuster eine große Ähnlichkeit auf, den histologischen Untersuchungen zufolge müssen die BMP-Signale aber unterschiedlichen Schichten der Keimscheibe und der umgebenden extraembryonalen Areale zugeordnet werden: Das *BMP2*-Signal der ventralen Schicht (Hypoblast sowie Vorläufer und definitive Zellen des Dottersacks) und das *BMP4*-Signal sowohl der dorsalen (Epiblast und Trophoblast) als auch der ventralen Schicht des Embryos; dabei geht die *BMP2*-Expression der *BMP4*-Expression um etwa ein bis zwei Stadien (das entspricht ca. 6 Entwicklungsstunden) voraus. Beide Gene bilden zunächst eine ringförmige

Expressionsdomäne aus, die den Rand der Keimscheibe scharf begrenzt. In späteren Stadien findet sich für *BMP4* abgesehen von einer schmalen Domäne am vorderen und lateralen Rand der Keimscheibe eine flächige Expression im posterioren Anteil des Primitivstreifens und im angrenzenden extraembryonalen Mesoderm, topographisch also genau in dem für die frühe PGC-Entwicklung bekannten Bereich. *BMP2* bleibt in späteren Stadien im Wesentlichen auf den Rand der Keimscheibe und die extraembryonalen Abschnitte beschränkt und entwickelt intraembryonal eine mittige und anteriore Domäne, die möglicherweise mit der Region der definitiven Endoderm-Bildung zusammenfällt.

4.1 Methoden

4.1.1 Modellorganismus

Das Kaninchen erwies sich in den vorliegenden Untersuchungen als neuer Modellorganismus für die Entwicklung der Keimzellen vor allem aufgrund folgender Eigenschaften als besonders gut geeignet:

Die exakt definierte Stadieneinteilung des Kaninchenembryos nach morphologischen Gesichtspunkten (Viebahn 2004) ermöglichte ein weitaus genaueres Abbild des tatsächlichen Entwicklungsstadiums als die im Mausmodell übliche Einteilung nach dem Alter des Embryos (Theiler 1989) oder der grob morphologischen Merkmale des nur in lateralen Ansichten zu beurteilenden Eizylinders der Maus (Downs und Davis 1993). Vor allem für die Beurteilung des zeitlichen Ablaufs der Genexpression war diese genauere Form der Stadierung unerlässlich. Mit ihrer Hilfe ließ sich im Rahmen der Sensitivität der eingesetzten Hybridisierungs- und Nachweismethoden genau differenzieren, ab welchem Entwicklungsstadium, vor oder während des Beginns der Gastrulation, ein bestimmtes Gen an- oder abgeschaltet wird (z.B. *BMP2*-Expression im Hypoblast ab Stadium 1, *BMP4*-Expression im Epiblasten ab Stadium 3). In Arbeiten am Mausmodell wurden bislang nur ungefähre Zeiträume angegeben (z.B. Beginn der *BMP2*-Expression zwischen 6,0 dpc und 6,5 dpc: Ying und Zhao 2001; Beginn der *BMP4*-Expression zwischen 5,5 dpc und 6,5 dpc: Ying et al. 2000), was eine Beurteilung des zeitlichen Zusammenspiels verschiedener Genexpressionen bislang deutlich erschwert, bzw. unmöglich gemacht hat.

Aufgrund der flachen Morphologie der Keimscheibe war es möglich, die Domänen der Genexpression verhältnismäßig einfach zu bestimmen, d.h. ohne aufwendige Rekonstruktion

von Serienschnitten oder Projektion der Expressionsdomänen auf das plane Grundmodell von Gastrulationsstadien des Säugers (vgl. Behringer et al. 2000); auch konnte die Genexpression den morphologischen Strukturen und Abschnitten der Keimscheibe, wie z.B. den embryonal-extraembryonalen Grenzen und den Polen zugeordnet werden. Darüber hinaus ließen sich auch die topographischen Beziehungen der einzelnen Gewebeschichten zueinander eindeutig definieren.

In der vorliegenden Arbeit konnten alle drei für die PGC-Entwicklung als wichtige Kandidaten identifizierten Gene am Kaninchen molekular im zu erwartenden Zeitrahmen und mit einer plausiblen räumlichen Verteilung identifiziert werden. Das Kaninchen ist damit der zweite, auf funktionelle Parameter der Keimzellspezifizierung untersuchte Säuger und ermöglicht durch einen Vergleich mit den bekannten Mausdaten erstmals eine zumindest teilweise Überprüfung der bisher aufgestellten Hypothesen zur initialen Bildung der Keimbahn beim Säuger.

Die genannten Vorteile wurden durch einige Nachteile des Kaninchenmodells, wie z.B. die vergleichsweise teure Haltung (bedingt durch den Platzbedarf und die relativ lange Generationsdauer von ca. 6 Monaten) „erkauft“. Hier werden die Stärken des Mausmodells deutlich: Die kostengünstige Haltung der Tiere und die relativ kurze Generationsdauer ermöglichen es, wissenschaftliche Hypothesen mit Hilfe transgener Tiere im Rahmen von sog. Knock-out-Experimenten funktionell zu überprüfen. Außerdem sind eine Vielzahl anderer molekularbiologischer Methoden wie z.B. in-vitro-Gewebe-Rekombinations-Assays und RNA-Injektionen an sich entwickelnden Mausembryonen seit langem etablierte Verfahren, die differenzierte Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung biochemischer Signalmoleküle erlauben. Insgesamt erscheint der Aufwand aber gerechtfertigt, da das Kaninchenmodell das etablierte Mausmodell in wesentlichen Punkten ergänzt.

4.1.2 Molekularbiologische und histologische Methoden

Die cDNAs von zwei der hier untersuchten Gene (*Blimp1*, *BMP2*) konnten aus gRNA von 6,2 Tage alten Kaninchenembryonen erfolgreich amplifiziert werden, weil Embryonen dieses Alters offensichtlich auch im Kaninchen in etwa einer Gauß'schen Normalverteilung um das frühe Gastrulationsstadium (Stadium 2) folgen. Die erfolgreiche Klonierung der cDNA von für die PGC-Entwicklung wichtigen Genen aus Embryonen der frühen Gastrulationsphase, die offensichtlich auch beim Kaninchen dem Zeitfenster der PGC-Entwicklung entspricht,

stellte einen ersten internen Validierungsprozess dar. Die gRNA von fünf Embryonen enthielt mit 150 bis 220ng/μl eine ausreichend hohe mRNA-Konzentration der Kandidaten-Gene, um eine reverse Transkription für diese erfolgreich durchführen zu können. Der Nachweis, dass sich die Klonierungsprodukte über mehrere Exone erstrecken und die hohen Homologien zu den cDNA-Sequenzen anderer Säuger (vgl. Tab. 8) beweisen, dass tatsächlich die mRNA des gesuchten Gens kloniert wurde.

Zur Untersuchung der einzelnen Genexpressionsmuster wurden Digoxigenin-markierte cRNA-Sonden eingesetzt. Diese zeichnen sich im Vergleich zu DNA-Sonden durch eine spezifischere und stabilere Bindung an ihre Zielstrukturen, die mRNA-Transkripte im fixierten Gewebe aus. Dies war besonders für die Untersuchung der Genexpression in frühembryonalen Entwicklungsstadien von Vorteil, da hier auf Grund der geringen Zellzahl verhältnismäßig wenig mRNA vorliegt, die Embryonen aber offensichtlich molekular bereits stark differenziert sind. Der Vorteil der höheren Sensitivität wog dabei gewisse Nachteile der Methodik auf, die z.B. in der Gefahr der raschen Degradierung der Sonden durch die ubiquitär vorkommenden RNAsen bestanden.

Zur Sichtbarmachung der Genexpressionen wurde ein nicht-radioaktives *in-situ*-Hybridisierungsverfahren an Whole-mount-Präparaten angewandt, das auf der Körbchen-Technik beruht („whole-mount *in-situ*-Hybridisation“, WMISH). Es ermöglicht einen Reaktionsablauf bei hohen Hybridisierungstemperaturen (70°C) und konstanten Salz- und Formamidkonzentrationen in der Hybridisierungslösung, wodurch sich unspezifische Bindungen der Sonden minimieren lassen und die Sensitivität der Nachweismethode weiter erhöht wird. Dies erwies sich vor allem bei der Untersuchung der *Blimp1*-Expression als besonders wertvoll, weil hierbei die Anforderung an die Methode die eindeutige Detektion einzelner das Gen exprimierender Zellen, d.h. die klare Differenzierung zwischen positiv („geblimpete“ Zelle) und negativ (keine Farbreaktion in den umliegenden Zellen derselben Gewebeschicht) war.

Durch die Behandlung der Keimscheiben mit verschiedenen Detergenzien (Tween20, CHAPS) und Proteinase K (10mg/ml) vor und während der Hybridisierung wurde ein tiefes Eindringen der Sonden in das Gewebe gewährleistet. Dies erwies vor allem bei der Untersuchung der späteren Stadien (3 bis 5) als wichtig, weil die Embryonen in diesen Stadien nicht mehr zwei- sondern prinzipiell dreischichtig sind, und das entstehende

Mesoderm teilweise mehrere Zellschichten aufweist. In den besonders jungen Stadien (0 und 1) sind die Gewebe allerdings noch sehr zart und die einzelnen Zellschichten vergleichsweise locker miteinander verbunden, was sie anfällig gegenüber mechanischen Irritationen aller Art macht. Mit Hilfe eines Stadien-adaptierten Gewebeandaus mit Proteinase K zwischen zwei (Stadium 0) und 10 Minuten (Stadium 5) und durch die vergleichsweise bessere Gewebeschonung bei der eingesetzten Körbchen-Technik konnte eine für das jeweilige Stadium optimierte Vorbereitung der Präparate gewährleistet werden.

Trotz der Untersuchung von mindestens drei Embryonen pro Stadium und Gensonde mittels WMISH kann mit dieser qualitativen Nachweismethode bei einer quantitativen Betrachtungsweise bestenfalls eine Tendenz aufgezeigt werden. Mit anderen, quantitativen Nachweismethoden, wie z.B. der Real-Time-PCR, wäre eine eindeutige Bestimmung der mRNA-Konzentration zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten möglich, wobei dann eine topographische Auflösung nur unter großem Aufwand zu erreichen wäre (z.B. durch mikrochirurgische Präparation von definierten Keimscheibenabschnitten).

Die Einbettung der gefärbten Keimscheiben in Technovit® und die anschließende Anfertigung von 5µm dicken Dünnschnittpräparaten ermöglichten die einfache lichtmikroskopische Untersuchung der Genexpression auf zellulärer und subzellulärer Ebene, auf die sich die Ergebnisse dieser Arbeit stützen, allerdings ist auch unter Verwendung von Immersionsöl nur eine bis zu 1000-fache Vergrößerung sinnvoll möglich. Eine weitere Vergrößerung überschreitet das Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops und würde lediglich verschmolzene Bildpunkte hervorbringen. Die mögliche Vergrößerung reichte in den vorliegenden Untersuchungen jedoch aus, um den Zellkern klar vom zytoplasmatischen Raum abzugrenzen. Die Tatsache, dass die BM-Purple®-Reaktionsprodukte eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation einnehmen und das Karyoplasma nicht angefärbt wird, bestätigt eine spezifische Bindung der Sonden ausschließlich an die im Zytoplasma vorliegende mRNA.

4.2 Expressionsmuster

Im Folgenden Abschnitt sollen die Expressionsmuster der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene diskutiert werden. Dabei wird das Expressionsmuster von *Blimp1*, als funktionellem PGC-Marker, zunächst gesondert von den Expressionsmustern der PGC-

induzierenden Signalmoleküle *BMP2* und *BMP4* betrachtet, bevor alle drei Gene bezüglich eines möglichen zeitlichen und räumlichen Zusammenspiels in Relation gesetzt werden. In einem letzten Abschnitt werden einige auffällige Nebenbefunde diskutiert, die in keinem direkten Zusammenhang zur PGC-Entwicklung stehen, aber wesentliche Aspekte bzw. Vorgänge der embryonalen Frühentwicklung des Kaninchens berühren.

4.2.1 Expressionsmuster von *Blimp1*

Bezüglich des Expressionsmusters von *Blimp1* stellt sich zunächst die Frage: Handelt es sich bei den „geblimpten“ Epiblast- und Mesodermzellen, die ab dem Stadium 2 im posterioren Anteil der Keimscheibe auftreten tatsächlich um die PGCs des Kaninchens? Zur Beantwortung dieser Frage bietet sich ein Vergleich der *Blimp1*-Expression mit der Expression des sog. PG2-Epitops an: Der monoklonale Antikörper PG2 ist ein spezifischer Marker der primordialen Keimzellen des Kaninchens, mit dessen Hilfe zunächst die Migration der PGC vom Rand der Keimscheibe aus verfolgt werden konnte (Schäfer-Haas und Viebahn 2000). Er ist gegen ein Epitop an der äußeren Membran der Mitochondrien gerichtet, das im Stadium der Zygote und der Furchungsteilungen noch ubiquitär in allen Zellen, später aber, gerade in den auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten Prägastrulations- und Gastrulationsstadien, vor allem in den PGC stark exprimiert wird (Weckelmann et al. 2008). Ein Vergleich der Expression von PG2 und *Blimp1* während der Gastrulation zeigt mehrere Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Markern: Im Stadium 4 wird *Blimp1* von einer ähnlichen Anzahl Mesodermzellen in identischer Lokalisation und mit derselben PGC-typischen Zytomorphologie exprimiert wie das PG2-Epitop. Bei den „geblimpten“ Zellen des Epiblasten und des Mesoderms im Stadium 3 und 4 handelt es sich deshalb mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um die PGCs des Kaninchens, bzw. deren Vorläuferzellen.

Verglichen mit der *Blimp1*-Expression im Mausembryo wurden neben dieser prinzipiellen Gemeinsamkeit als PGC-Marker auch signifikante Unterschiede und neue Eigenschaften der Keimzellvorläufer entdeckt: Im Kaninchenembryo wird *Blimp1* zuerst im Hypoblast exprimiert. Bereits im Stadium 0 findet sich eine diffuse Expression innerhalb der Keimscheibe, die ab dem Stadium 1 in ein strukturierteres schichten- und regionenspezifisches Muster mit intensiver Expression v.a. in den Zellen des VRB aber auch in den posterioren Anteilen der Keimscheibe übergeht. Bezogen auf den frühen Beginn und die Gewebeschicht in der die Expression stattfindet, decken sich diese Befunde mit den Mausdaten. Im

Mausembryo tritt die *Blimp1*-Expression in einem Alter von 5,5 dpc zuerst im VE, einer extraembryonalen Gewebeschicht auf, die näherungsweise dem Hypoblast des Kaninchens entspricht. Ohinata et al. (2005) maßen dieser Expression jedoch keine Bedeutung für die PGC-Entwicklung bei, weshalb sie nicht näher untersucht wurde, obwohl sie in einem Abschnitt des VE auftritt, der dem proximalen Epiblasten (in dem später die ersten „geblimpten“ Epiblastzellen auftreten) direkt anliegt (Vincent et al. 2005). Im Kaninchenembryo ist nun auffällig, dass die Expression in den posterioren Anteilen des Hypoblasten bis ins Stadium 2 stetig zunimmt, und das *Blimp1* vor allem von solchen Hypoblastzellen intensiv exprimiert wird, die in direktem Kontakt zu den ersten „geblimpten“ Epiblastzellen stehen. Ein bisher nicht vermuteter, durch die *Blimp1*-Expression in den posterioren Anteilen des Hypoblasten bedingter Einfluss auf die PGC-Entwicklung im Epiblasten liegt aus histomorphologischer Sicht der beim Kaninchen erhobenen Daten also durchaus im Bereich des Möglichen.

Eine erste Expression im Epiblasten lässt sich – wenn auch nur schwach – in den posterioren Anteilen von Embryonen des späten Stadium 1 nachweisen. Die ersten stark *Blimp1*-exprimierenden, und damit tatsächlich „geblimpten“, Epiblastzellen treten im Stadium 2 in der posterioren spangenförmigen Expressionsdomäne auf; anterior und an den lateralen Rändern der Keimscheibe wird *Blimp1* weiterhin nur im Hypoblast exprimiert. Zeitlich und örtlich gesehen deckt sich das Auftreten dieser ersten „geblimpten“ Epiblastzellen unmittelbar mit den Mausdaten; dort gelingt der früheste Nachweis im Alter von 6,25 dpc (Ohinata et al. 2005). „Geblimpte“ Zellen finden sich im Mausembryo nur in der am weitesten proximal liegenden Schicht des Epiblasten. Dass diese Zellen ausschließlich in den späteren posterioren Anteilen des Embryos liegen ließ sich aufgrund der schwierigen morphologischen Verhältnisse der Maus bisher nicht mit letzter Sicherheit beurteilen. Außerdem kann man nun annehmen, dass diese Zellen auch bei der Maus in direktem Kontakt zum ExE (einer der Quellen von BMP-Signalen: Ying et al. 2000) stehen.

Während der Gastrulation des Kaninchenembryos treten „geblimpte“ Zellen innerhalb einer halbmondförmigen Domäne im posterioren Mesoderm auf, außerdem gibt es eine schwache Expression im Hypoblasten, die sich nach extraembryonal ins Dottersackepithel fortsetzt. Auch im gastrulierenden Mausembryo findet sich eine Expression im Mesoderm des posterioren Primitivstreifens; darüber hinaus zeigen sich in diesem Stadium aber gravierende Unterschiede zwischen Maus und Kaninchen: Ohinata et al. (2005) konnten keine Expression

im Mesoderm von Allantois (möglicherweise dem den PGCs am nächsten „verwandten“ somatischen Gewebe), im Mesoderm des Dottersacks oder in den Blutinseln nachweisen, wobei sie diese Untersuchungen nicht mehr mittels ISH sondern mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen *Blimp1* durchführten. Aus diesen Befunden ergab sich das Bild von *Blimp1* als hochspezifischem Marker für die PGCs der Maus. Für das Kaninchen müsste eine ähnliche Spezifität noch anhand von Doppelfärbungen mit mehreren Keimzellmarkern (z.B. PG2, TNAP) bestätigt werden, erscheint aber eher unwahrscheinlich, da sich zumindest in den Blutinseln des Kaninchens eine *Blimp1*-Expression nachweisen lässt, womit *Blimp1* im Kaninchenembryo nicht nur als exklusiver PGC-Marker fungiert.

Ein weiterer Unterschied zwischen Maus und Kaninchen liegt in der Aktivität der *Blimp1*-Expression ab der späten Gastrulationsphase. In der Maus wird *Blimp1* auch über das Alter 7,0 dpc, während Proliferation und Migration der PGCs entlang der Darmwand bis in die Gonadenanlagen, hinaus exprimiert (Vincent et al. 2005). Im Kaninchenembryo ist dagegen die *Blimp1*-Expression in den PGCs ab dem Stadium 5 deutlich vermindert. Man kann daher annehmen, dass *Blimp1*, als Repressor somatischer Entwicklungsstimuli, nicht mehr benötigt wird, sobald die PGCs die Keimscheibe, und damit den Wirkungsort der dort vorherrschenden Signalmoleküle verlassen und eine extraembryonale Lage eingenommen haben, oder dass es weitere bisher unbekannte Faktoren gibt, die bei der Determinierung und Rekrutierung der PGCs eine wichtige Rolle spielen.

4.2.2 Expressionsmuster von *BMP2* und *BMP4*

BMP2 wird bereits im Hypoblast von Kaninchenembryonen des Stadiums 1 in einer ringförmigen Domäne exprimiert, die den Rand der Keimscheibe scharf begrenzt. Die Expression setzt sich extraembryonal in einzelne Zellen des angrenzenden Dottersackepithels fort, in dem sich in den Folgestadien eine kontinuierliche Zunahme der *BMP2*-Expression findet. Im Stadium 2 beginnt der posteriore Anteil der Expressionsdomäne sich auszudehnen; der *BMP2*-exprimierende Randsaum der Keimscheibe ist deutlich verbreitert und reicht nach intraembryonal in die sich in diesem Stadium entwickelnde PGE hinein. Die Expression in den posterioren Anteilen des Embryos, die weiterhin ausschließlich dem Hypoblasten zuzuordnen ist, erreicht im Stadium 3 ihre maximale Ausdehnung und Intensität. Im Stadium 4 wird, mit Ausnahme der randständigen Hypoblastzellen, kein *BMP2* mehr in den posterioren Anteilen der Keimscheibe exprimiert. Dagegen findet sich eine intensive

Expression in dem von den anterioren zwei Dritteln des Primitivstreifens ausgehenden Mesoderm, sowie in den darunter gelegenen Abschnitten des Hypoblasten.

Auch *BMP4* bildet zunächst eine ringförmige Expressionsdomäne aus, die den Rand der Keimscheibe scharf markiert. Verglichen mit der Expression von *BMP2* nimmt dieser Ring aber erst später, nämlich im Stadium 3, deutliche Konturen an. Gebildet wird er von den randständigen zwei bis drei Zellen des Epiblasten und des darunter liegenden Hypoblasten, die den morphologischen Übergang zwischen intra- und extraembryonal scharf markieren. Genau wie beim *BMP2* bleibt dieser Ring über alle untersuchten Stadien hinweg erhalten. Im Stadium 3 wird *BMP4* außerdem in einem klar umschriebenen, rundlichen Areal im posterioren Anteil der Keimscheibe intensiv exprimiert. Aufsichtsmikroskopisch ähnelt dieser Bereich der *BMP2*-Expression in diesem Stadium, histologisch lässt sich die *BMP4*-Expression aber einer anderen Gewebeschicht zuordnen: Sie liegt in den Zellen des Epiblasten sowie in dem sich in diesem Stadium entwickelnden Mesoderm. Anders als beim *BMP2* nimmt die Expression von *BMP4* im posterioren Anteil des Embryos in den Folgestadien (Stadium 4 und 5) weiter zu. Die Epiblastzellen des posterioren Primitivstreifens, sowie die Anteile des Mesoderms, die vom hinteren Drittel des Primitivstreifens ausgehen, exprimieren intensiv *BMP4*, während in den anterioren zwei Dritteln der Keimscheibe keine Expression stattfindet.

Bezüglich der Quellen der BMP-Signale weisen Kaninchen und Maus viele Gemeinsamkeiten aber auch einige Unterschiede (v.a. im Fall des *BMP4*) auf. Ein Vergleich des „Timings“, also der zeitlichen Abfolge und des Zusammenspiels der einzelnen Signale gerade auch in Hinblick auf das Auftreten der ersten PGC-Vorläufer, fällt bei der vorliegenden Datenlage bei der Maus jedoch schwer: Das *BMP2*-Signal im Mausembryo entstammt dem VE (Coucouvanis und Martin 1999), der Gewebeschicht, die dem Hypoblasten des Kaninchenembryos entspricht. Es tritt irgendwann im Zeitraum zwischen 6,0 und 6,5 dpc auf und bleibt mindestens bis ins Alter von 7,5 dpc detektierbar (spätere Stadien wurden nicht untersucht). In den Prägastrulationsstadien hat das Signal seine stärkste Ausprägung in der Region der späteren Primitivstreifenbildung, im Bereich des Übergangs von proximalem Epiblast zu ExE, weshalb es als potenter Marker für das spätere posteriore Ende des gastrulierenden Embryos gewertet wird. Die *BMP2*-Expression ist flächig, von Beginn an asymmetrisch in der anterior-posterioren Ebene verteilt und fällt im Bereich der späteren PGC-Determinierung am stärksten aus (Lawson und Hage 1994). Hierin unterscheidet sich

die Maus vom Kaninchenembryo, in dem *BMP2* zunächst symmetrisch und die Keimscheibe ringförmig umgebend exprimiert wird und sich erst unmittelbar vor der Gastrulation, im späten Stadium 2 und im Stadium 3, eine ausgedehntere posteriore Expressionsdomäne ausbildet. Eine *BMP2*-Expression im Mesoderm des vorderen Primitivstreifenabschnittes ist für die Maus nicht beschrieben.

Das *BMP4*-Signal tritt im Mausembryo im Zeitraum zwischen 5,5 dpc und 6,5 dpc erstmalig auf und hat seinen Ursprung in der proximalen Region des ExE, in direkter Nachbarschaft zum Epiblasten (Ying und Zhao 2001). In den Prägastrulationsstadien wird *BMP4* ringförmig im extraembryonalen Ektoderm und ab dem Zeitpunkt 7,5 dpc auch in den Derivaten des extraembryonalen Mesoderms, wie Trophoblast, Dottersack-Mesoderm und Allantois exprimiert, nicht aber in den PGCs selbst (Ying et al. 2000). Die Gewebeschicht, aus der das *BMP4*-Signal stammt, hat bei Maus (ExE) und Kaninchen (Epiblast) eine ähnliche topographische Lage, d.h. sie gehört zur prinzipiell dorsalen Schicht der beiden in diesem Stadium vorhandenen (epithelialen) Zellschichten; das Signal ist jedoch bei der Maus dem extraembryonalen und beim Kaninchen dem intraembryonalen Abschnitt dieser Gewebeschicht zuzuordnen. Darin zeigt sich ein weiterer interessanter Unterschied: Stellt man sich den becherförmigen Mausembryo flach ausgebreitet vor, so würde *BMP4* – den Ergebnissen von Ying et al. (2000) zufolge – in einer symmetrischen, ringförmigen Expressionsdomäne, die die Keimscheibe vollständig umgibt, exprimiert werden. Diese zunächst symmetrische Expression entspricht eher dem *BMP2* im Kaninchenembryo, denn obwohl auch das *BMP4* einen Ring ausbildet, der die Keimscheibe in einem schmalen Streifen scharf begrenzt, entsteht hier zeitgleich eine ausgedehnte posteriore Expressionsdomäne, wodurch das *BMP4*-Expressionsmuster im Kaninchen primär anterior-posterior asymmetrisch erscheint. Eine solche Asymmetrie ist für die Maus nicht beschrieben; die Eizylinder-bedingte „Verkürzung“ des „Keimscheiben“-Umfanges bei der Maus macht eine solche a-p-Differenzierung möglicherweise entweder (physiologisch) unmöglich oder nicht erkennbar.

Bezüglich der zeitlichen Abfolge der BMP-Signale im Mausembryo lassen die vorliegenden Daten also keine klare Aussage zu (Ying et al. 2000). Es ist durchaus möglich, dass die *BMP2*-Expression der *BMP4*-Expression auch im Mausembryo zeitlich voraus geht. Die Angaben bezüglich des Beginns v.a. der *BMP4*-Expression – hier wird ein Zeitraum von 24h genannt (Ying et al 2000), in der embryonalen Frühentwicklung eine „Ewigkeit“ – lassen aber

auch eine umgekehrte Reihenfolge zu. Auf jeden Fall scheint eine Kooperation der BMPs und damit der als Signalquelle beteiligten Schichten bei der PGC-Determinierung wahrscheinlich.

4.2.3 Zeitliches und topographisches Zusammenspiel von Signalmolekülen und PGC-Vorläuferzellen

Trägt man die in dieser Arbeit erhobenen Daten zusammen und vergleicht die räumlichen und zeitlichen Aspekte der vorliegenden Expressionsmuster miteinander, so ergibt sich folgendes Gesamtbild (vgl. Abb. 6): Bei den „geblimpten“ Zellen, die im Stadium 2 im Epiblasten und in den Stadien 3 und 4 im posterioren Mesoderm auftreten, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die PGC-Vorläufer des Kaninchens. Das zeitliche und topographische Auftreten dieser Zellen deckt sich mit den aus der Maus bekannten Befunden, die flache Morphologie des Kaninchenembryos ermöglicht es jedoch eine Frage zu beantworten, die im Mausembryo bisher nicht eindeutig zu beurteilen war (Ohinata et al. 2005): Die „geblimpten“ PGC-Vorläuferzellen des Kaninchens stehen topographisch eindeutig in direktem Kontakt zu den Zellen der Gewebeschichten, die Quelle der BMP-Signale sind. Sie treten im Stadium 2 ausschließlich in den posterioren Randbereichen der Keimscheibe auf, was sich mit der Lokalisation der *BMP*-Expression deckt, die ebenfalls ringförmig den Rand der Keimscheibe markiert; in den späteren Stadien liegen die PGC-Vorläuferzellen eingebettet in den posterioren Expressionsdomänen der *BMPs*.

Betrachtet man den Aspekt des zeitlichen Zusammenspiels, so ist das BMP2-Signal schon vor dem Auftreten der ersten „geblimpten“ Epiblastzellen wirksam (nämlich schon im Stadium 1), und kommt deshalb nicht nur topographisch sondern auch zeitlich als Wegbereiter der PGC-Entwicklung in Frage. Das BMP4-Signal hingegen ist zum Zeitpunkt des Auftretens der ersten PGC-Vorläufer noch nicht wirksam, es kann also nicht initialer Wegbereiter der PGC-Differenzierung sein.

Die starke Zunahme der „geblimpten“ PGC-Vorläufer in den Gastrulationsstadien, die ab Stadium 3 nicht mehr nur am Rand sondern auch innerhalb der Keimscheibe auftreten, kann letztlich durch eine Zunahme der BMP-Signalstärke erklärt werden. Da die Wirkung der BMP-Signale, v.a. auf die Größe der PGC-Gründerpopulation, dosisabhängig ist (Lawson et al. 1999). Eine Zunahme der Signalstärke kann auch für den gastrulierenden Kaninchenembryo postuliert werden, denn erstens kommt mit dem Beginn der intensiven

BMP4-Expression im Stadium 3 ein zweites parakrines Signalmolekül hinzu, und zweitens bilden sich für beide *BMPs* in diesem Stadium die ausgedehnten posterioren Expressionsdomänen aus, die zu einer drastischen Konzentrationserhöhung der entsprechenden Signalmoleküle in diesem Abschnitt des Embryos führen müssen, zumal die beiden Moleküle als Heterodimere einen additiven Effekt auf die PGC-Entwicklung ausüben (vgl. 1.3.2).

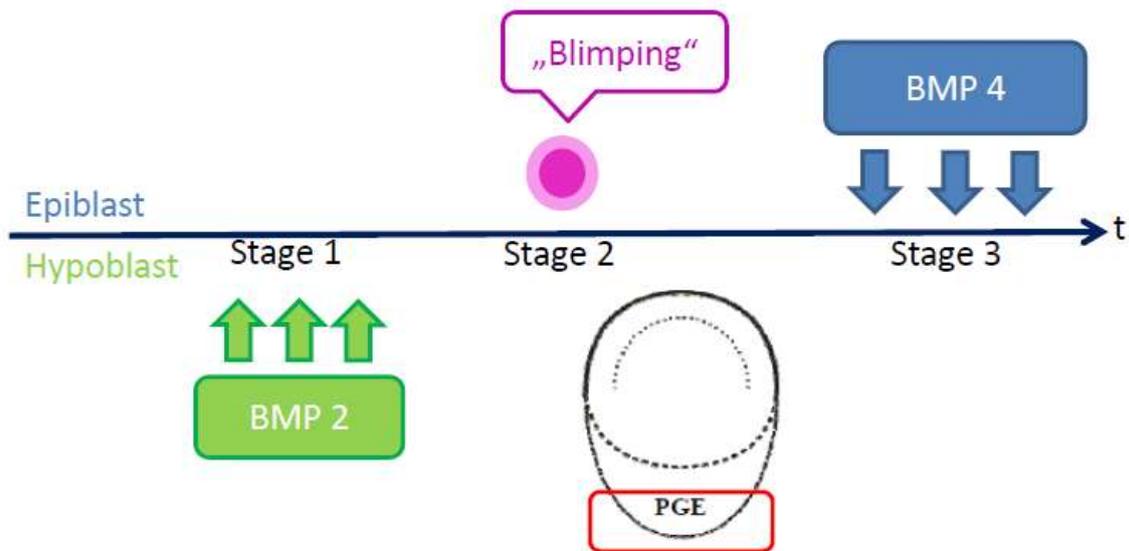


Abb. 6: Zeitliches und topographisches Zusammenspiel der untersuchten Moleküle

Das „Blimping“ als Schlüsselmechanismus der PGC-Entwicklung findet im Kaninchenembryo im morphologischen Stadium 2 in typischer Lokalisation im posterioren Epiblasten statt. Das BMP2-Signal stammt aus dem Hypoblast und ist bereits ab dem Stadium 1 (auch) am posterioren Keimscheibenrand wirksam; es kann demnach als Initiator des „Blimpings“ wirken. Das BMP4-Signal entstammt v.a. dem Epiblasten und dem sich entwickelnden Mesoderm. Da es erst ab dem Stadium 3 wirksam ist, kann es am initialen „Blimping“ nicht beteiligt sein, wohl aber für die starke Zunahme der PGCs während der Gastrulationsstadien verantwortlich sein.

Das herunter Regulieren der *Blimp1*-Expression in den PGCs ab dem Stadium 5 lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass *Blimp1* in seiner Funktion als Repressor somatischer Differenzierungsstimuli nicht mehr benötigt wird, sobald die PGCs eine extraembryonale Lage einnehmen und damit topographisch nicht mehr im Wirkungsbereich der für eine somatische Entwicklung verantwortlichen Signale liegen. Die bekannten Mausdaten sprechen zumindest teilweise dafür: In den PGCs des Mausembryos wird *Blimp1* zwar auch während der Proliferations- und Migrationsphase exprimiert, scheint aber keine entscheidende Funktion mehr zu haben, da in heterozygoten *Blimp1*-Knock-out-Mäusen die PGC-Population zwar verkleinert ist, Proliferation und Migration aber ungestört ablaufen (Vincent et al. 2005).

Mit *Blimp1*, *BMP2* und *BMP4* wurden im Rahmen dieser Arbeit zwar wesentliche Faktoren der Keimzellentwicklung des Kaninchens untersucht, es kann jedoch kein Anspruch auf ein vollständiges Abbild der PGC-Entwicklung des Kaninchens erhoben werden. Sehr wahrscheinlich ist, dass es noch eine Vielzahl weiterer Faktoren gibt, die die PGC-Entwicklung entscheidend beeinflussen. Mögliche Kandidaten sind das aus der Maus bekannte Signalmolekül *Bmp8b* (Ying et al. 2000) und der nahe mit *Blimp1* verwandte PGC-Marker *Prdm14*, der über einen *Blimp1*-unabhängigen Signalweg ebenfalls essentiell für die Rekrutierung der PGC-Vorläuferzellen sein soll (Yamaji et al. 2008). Dabei bleibt auch die Frage offen, warum die PGCs des Kaninchens (aber auch die der Maus) ausschließlich im posterioren Bereich des Embryos gebildet werden und nicht etwa, wie beispielsweise bei den Vögeln (Swift 1914), im anterioren. Das hier beschriebene BMP2-Signal, als möglicher Wegbereiter des „Blimpings“, ist in den frühen Entwicklungsstadien (Stadium 1 und 2) symmetrisch. Es gibt keinen nennenswerten Unterschied zwischen anterior und posterior, und damit bleibt offen, wieso die "geblimpten" Epiblastzellen asymmetrisch verteilt nur in der posterioren Hälfte des Embryos entstehen. An dieser Stelle müssen weitere Faktoren eine Rolle spielen, die entweder das "Blimping" im anterioren Epiblasten hemmen, oder es im posterioren fördern. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre das oben erwähnte *BMP8b*. Das Expressionsmuster von *BMP8b* müsste dafür allerdings zwei Anforderungen erfüllen: *BMP8b* müsste erstens deutlich vor *BMP4* exprimiert werden. Die Mausdaten sind diesbezüglich nicht klar beurteilbar. Ein schwaches Signal ist dort schon im Alter 5,5 dpc detektierbar, eine starke Expression findet sich jedoch erst ab 6,25 dpc (Ying und Zhao 2001). Zweitens müsste die Expression asymmetrisch, mit einem Schwerpunkt im posterioren Epiblasten, auftreten. In der Maus ist die frühe Expression (5,5 dpc) nicht eindeutig beschrieben (Ying und Zhao 2001), später (6,25 dpc) wird *BMP8b* scheinbar gleichmäßig im gesamten extraembryonalen Ektoderm exprimiert. Ein Einfluss von *BMP8b* an dieser Stelle erscheint durchaus möglich, aber auch die Existenz weiterer, bislang unbekannter Einflussgrößen ist wahrscheinlich, und sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

4.3 Nebenfunde

Bei der Untersuchung der drei in dieser Arbeit vorgestellten Genexpressionsmuster ergaben sich folgende Nebenfunde, die nicht in direktem Zusammenhang mit der PGC-Entwicklung stehen, aber dennoch erwähnenswert erscheinen:

Durch die frühe, asymmetrische Expression im Hypoblast lässt sich *Blimp1* als axialer Marker für die anterior-posterior Differenzierung des Kaninchenembryos verwenden. In Bezug auf diese Eigenschaft weist es Ähnlichkeiten mit dem Gap-junction-Protein Connexin32 (*Cx32*) auf, dass ebenfalls asymmetrisch in einer exzentrisch gelegenen Domäne im Hypoblasten von Embryonen des Stadiums 0 exprimiert wird (Idkowiak et al. 2004a). Neben dem *Cx32* ist *Blimp1* damit ein weiteres Beispiel dafür, dass die molekulare anterior-posterior Differenzierung der morphologischen Differenzierung vorausgeht, wobei diese Differenzierung in beiden Fällen derselben histologischen Schicht, nämlich dem Hypoblasten, zuzuordnen ist, was dem Konzept der „Blaupause im Hypoblast“ entspräche (Idkowiak et al. 2004b).

Auch das Expressionsmuster von *BMP2* weist Ähnlichkeiten mit demjenigen von *Cx32* auf. Die ringförmige Expression im Hypoblasten ab dem Stadium 1, die den Rand der Keimscheibe markiert und das Keimscheibeninnere ausspart, wobei der anteriore Rand stets etwas schärfer begrenzt ist, als der posteriore, entspricht ziemlich genau dem für das *Cx32* beschriebenen Expressionsmuster der Prägastrulationsstadien.

Ein weiterer Nebenbefund zeigt sich beim Expressionsmuster von *BMP4*, mit der differentiellen Expression im Mesoderm der späten Gastrulationsstadien (Stadium 4 und 5): Mit Ausnahme der Expressionsdomäne im posterioren Primitivstreifen wird im intraembryonalen Mesoderm kein *BMP4* exprimiert; im extraembryonalen Mesoderm sind dagegen nahezu alle Zellen *BMP4*-positiv. Durch das *BMP4* wird also innerhalb des Mesoderms auf molekularer Ebene zwischen intra- und extraembryonal scharf unterschieden. Man kann daher spekulieren, dass erstens die posterioren Abschnitte des Embryos, z.B. die posteriore Hälfte des Primitivstreifens und die diesen Abschnitt bilateral flankierenden Regionen, obwohl morphologisch betrachtet innerhalb der Keimscheibe gelegen, ihrer molekularen Differenzierung nach eher den extraembryonalen Strukturen zuzurechnen sind, und zweitens das Ektoderm auf Höhe des anterioren Primitivstreifenabschnittes Signale sezerniert (vgl. mehrere anterior/posterior differentiell exprimierte Gene, wie *Dkk1*, *Cerberus*: Idkowiak et al. 2004b), die *BMP4* im intraembryonalen Mesoderm unterdrücken.

4.4 Biologische Bedeutung der erhobenen Befunde

Die flache Morphologie und die definierte Stadieneinteilung des Kaninchenembryos ermöglichten es, ein vierdimensionales (räumliches und zeitliches) Abbild der Genexpression von drei Schlüsselgenen der Keimzellentwicklung zu entwerfen. Ausgehend von Mausdaten über die Bedeutung und das funktionelle Zusammenspiel verschiedener Gene, wie sie z.B. im Rahmen von Knock-out-Experimenten gewonnen werden konnten, ließ der topographische Vergleich der verschiedenen Expressionsmuster untereinander Rückschlüsse auf das Zusammenspiel verschiedener Gene im Kaninchenembryo zu. Die exakte histologische Zuordnung der Expression zu den einzelnen Gewebeschichten des Embryos in den Dünnschnittpräparaten ermöglichte es, die Quelle von Signalmolekülen genau zu lokalisieren.

Die erhobenen Befunde ergeben, verglichen mit den Mausdaten, ein in sich stimmiges Bild der PGC-Entwicklung beim Kaninchen. Die in der Einleitung formulierten Fragen lassen sich nach sorgfältiger Auswertung der Ergebnisse wie folgt beantworten:

1. Es erscheint wahrscheinlich, dass nicht nur der Mechanismus des „Blimpings“ für die Keimzellentwicklung bei den Säugern konserviert wurde, sondern auch die ihn steuernden Gene (*BMPs*) speziesübergreifend für zumindest zwei Säuger identisch sind. Kleinere Unterschiede zeigen sich möglicherweise lediglich beim zeitlichen „Arrangement“ der einzelnen Faktoren, wobei der Grund hierfür in den morphologischen Unterschieden der Embryonen verschiedener Spezies zu suchen sein könnte.
2. Das *BMP2*-Signal kommt durchaus als Initiator der PGC-Determinierung in Frage, während die Rolle des *BMP4* auf einen Einfluss auf die Zunahme der Zellzahl in der PGC-Gründerpopulation beschränkt bleibt. Aufgrund der räumlichen Nähe der beteiligten Zellpopulationen zueinander erscheinen neben einer Beeinflussung der PGC-Vorläufer auf parakrinem Weg auch direkte Zell-Zell-Interaktionen möglich.
3. Auch beim Kaninchen zeigt sich eindeutig eine enge topographische Beziehung zwischen den BMP-Signalen und dem Auftreten der ersten PGCs, bzw. deren Vorläuferzellen, wobei die primär asymmetrische Verteilung des *BMP4*-Signals im Vergleich zu den aus der Maus bekannten Daten ein neuer Befund ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit fügen sich gut in das vorbestehende Bild der Keimzellentwicklung ein. Sie verdeutlichen einmal mehr die Komplexität der zugrunde liegenden Mechanismen, an denen eine (immer noch unüberschaubare) Vielzahl von Genen

direkt oder indirekt beteiligt ist; zeigen aber gleichzeitig, dass zumindest die Kernelemente dieses Prozesses speziessübergreifend hoch konserviert sind.

Der hohe Konservierungsgrad dieser „Eckpfeiler“ der Keimzellentwicklung stützt die These, dass die Keimzellentwicklung aus evolutionsbiologischer Sicht ein besonders wichtiger – vielleicht der wichtigste – Prozess in der embryonalen Entwicklung ist, denn trotz unterschiedlicher Morphologie während der embryonalen Entwicklung, die nicht zuletzt durch die Unterschiede und Vielfalt der adulten Lebensformen bedingt ist, sind alle höheren Lebewesen von einem Funktionieren der sexuellen Fortpflanzung als elementarem Mechanismus zur Erhaltung der Art abhängig. Diese Tatsache erklärt möglicherweise auch, weshalb - so unterschiedlich und mannigfaltig das Leben auf der Erde auch sein mag - beim Vergleich der Spezies am Ursprung der Keimbahn mehr Gemeinsamkeiten als Unterschiede zu Tage treten.

5. Zusammenfassung

Keimzellen sind das Instrument der sexuellen Fortpflanzung und damit eine wesentliche Grundlage für die Vielfalt der Lebensformen auf der Erde. Die Repression des somatischen Entwicklungsprogrammes durch Präformation oder Epigenese ist der Schlüsselmechanismus ihrer Entstehung in der embryonalen Frühentwicklung. Hintergrund der vorliegenden Arbeit sind molekulare Faktoren, die an der epigenetischen Steuerung der Keimzellentwicklung im Säugerembryo wesentlich beteiligt sind. Mittels Whole-mount-*in-situ*-Hybridisierung wurden exemplarisch die Expressionsmuster der Schlüssel-Gene *Blimp1*, *BMP2* und *BMP4* untersucht und mit aus dem Mausmodell bekannten Daten verglichen. Für die Untersuchungen wurde das Kaninchen als Modellorganismus ausgewählt, weil es mit seiner flachen Keimscheibe für den Säugerembryo besonders repräsentativ ist und aufgrund einer exakt definierten Stadieneinteilung nach morphologischen Gesichtspunkten eine differenzierte Beurteilung des räumlichen und zeitlichen Zusammenspiels einzelner Gene anhand ihres Expressionsmusters erlaubt. *Blimp1* wird bereits im Stadium 0 im Hypoblast exprimiert, erste "geblimperte" Epiblastzellen, die wahrscheinlichen PGC-Vorläufer, treten im Stadium 2 in der PGE auf, ihre Anzahl nimmt bis ins Stadium 4 zu, im Stadium 5 sind nur noch wenige nachweisbar. *BMP2* bildet im Stadium 1 eine ringförmige Expressionsdomäne aus, die den Rand der Keimscheibe scharf begrenzt und die über die Gastrulationsstadien hinaus bestehen bleibt. Die Expression ist der Schicht des Hypoblasten und, später, auch dem Mesoderm zuzuordnen. Auch *BMP4* wird zunächst ringförmig am Rand der Keimscheibe exprimiert, die Expression ist jedoch erst im Stadium 3 vollständig ausgeprägt und von Beginn an asymmetrisch, mit einer flächigen Expression in den posterioren Anteilen des Embryos; diese ist v.a. dem Epiblast und Anteilen des Mesoderms zuzuordnen, am Rand der Keimscheibe wird *BMP4* aber auch in einigen Hypoblastzellen exprimiert. Die Arbeit zeigt, dass es sich bei den "geblimperten" Epiblast- und Mesodermzellen der Prägastrulations- und Gastrulationsstadien mit hoher Wahrscheinlichkeit um die PGC-Vorläufer des Kaninchens handelt. Das BMP2-Signal kommt sowohl zeitlich als auch topographisch als Wegbereiter des "Blimpings" in Frage; dagegen steht das BMP4-Signal zeitlich nicht im Zusammenhang mit der initialen PGC-Differenzierung, könnte jedoch durchaus einen Einfluss auf die Zunahme der "geblimperten" PGC-Vorläufer in den Gastrulationsstadien haben.

Literaturverzeichnis

Ancelin K, Lange UC, Hajkova P, Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T, Surani MA (2006): Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat Cell Biol* 8(6), 623-30

Behringer RR, Wakamiya M, Tsang TE, Tam PP (2000): A flattened mouse embryo: leveling the playing field. *Genesis* 28(1), 23-30

Campbell NA: *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1997, 1. korrigierter Nachdruck 1998

Chang H, Matzuk MM (2001): Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech Dev* 104(1-2), 61-7

Chiquoine AD (1954): The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 118, 135–146

Chu CG, Dunn NR, Anderson DC, Oxburgh L, Robertson EJ (2004): Differential requirements for Smad4 in TGFbeta-dependent patterning of the early mouse embryo. *Development* 131(15), 3501-12

Chuva de Sousa Lopes SM, Roelen BA (2008): Primordial germ cell specification: the importance of being "blimped". *Histol Histopathol* 23(12), 1553-61

Coucouvani E, Martin GR (1999): BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development* 126(3), 535-46

De Felici M, Klinger FG, Farini D, Scaldaferrri ML, Iona S, Lubascio M (2005): Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. *Reprod Biomed Online* 10(2), 182-91

De Sousa Lopes SM, Roelen BA, Monteiro RM, Emmens R, Lin HY, Li E, Lawson KA, Mummery CL (2004): BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is

necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 18(15), 1838-49

Deshpande G, Calhoun G, Schedl P (2004): Overlapping mechanisms function to establish transcriptional quiescence in the embryonic *Drosophila* germline. *Development* 131, 1247-57

Downs K, Davies T (1993): Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* 118, 1255-1266

Eakin GS, Behringer RR (2004): Diversity of germ layer and axis formation among mammals. *Health Promot Int* 19(3), 281-8

Eddy EM, Hahnel AC: Establishment of the germ cell line in mammals. In: *Current Problems in Germ Cell Differentiation*; hrsg. v. McLaren A, Wylie C; (Brit Soc. Dev. Biol. Symp. 7), Cambridge University Press 1983, 41–69

Gardner RL: Developmental potency of normal and neoplastic cells of the early mouse embryo. In: *Birth Defects*; hrsg. v. Littlefield JW, de Grouchy J; (Excerpta Medica International Congress, Ser. 432), Excerpta Medica, Amsterdam 1977, 154–166

Gardner RL, Rossant J (1979): Investigation of the fate of 4.5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *J Embryol Exp Morphol* 52, 141–152

Ginsburg M, Snow MHL, McLaren A (1990): Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521–528

Goddard MR, Godfray HC, Burt A (2005): Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature* 434(7033), 636-40

Hayashi K, Kobayashi T, Umino T, Goitsuka R, Matsui Y, Kitamura D (2002): SMAD1 signaling is critical for initial commitment of germ cell lineage from mouse epiblast. *Mech Dev* 104(1-2), 61-7

Idkowiak J, Weisheit G, Viebahn C (2004a): Polarity in the rabbit embryo. *Sem Cell Dev Biol* 15(5), 607-17

Idkowiak J, Weisheit G, Plitzner J, Viebahn C (2004b): Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulation rabbit embryo. *Dev Genes Evol* 214, 591-605

Illmensee K, Mahowald AP (1974): Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(4), 1016-20

Kelly SJ (1977): Studies of the development potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J Exp Zool* 200, 365–376

Knaut H, Pelegri F, Bohmann K, Schwarz H, Nüsslein-Vollhard C (2000): Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J Cell Biol* 149(4), 875-88

Lamb MM, Laird CD (1976): Increase in nuclear poly(A)-containing RNA at syncytial blastoderm in *Drosophila melanogaster* embryos. *Dev Biol* 52, 31–42.

Lawson KA, Hage WJ: Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 182, 68–91

Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL (1999): Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13(4), 424-36

MacGregor GR, Zambrowicz BP, Soriano P (1995): Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development* 121, 1487–1496

Mahowald AP, Hennen S (1971): Ultrastructure of the "germ plasm" in eggs and embryos of *Rana pipiens*. *Dev Biol* 24(1), 37-53

Martinho RG, Kunwar PS, Casanova J, Lehmann R (2004): A noncoding RNA is required for the repression of RNAPolIII-dependent transcription in primordial germ cells. *Curr Biol* 14, 159-65

Mintz B, Russell ES (1957): Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J Exp Zool* 134, 207–237

Nieuwkoop PD, Sutasurya LA (1981): *Primordial Germ Cells in the Invertebrates*. Cambridge University Press, Cambridge 1981.

Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovsky A, et al. (2005): Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436(7048), 207-13

Paland S, Lynch M (2006): Transitions to asexuality result in excess amino acid substitutions. *Science* 311(5763), 990-2

Saitou M, Barton SC, Surani MA (2002): A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 2002 418(6895), 282-3

Schäfer-Haas A, Viebahn C (2000): The germ cell epitope PG-2 is expressed in primordial germ cells and in hypoblast cells of the gastrulating rabbit embryo. *Anat Embryol (Berl)* 202(1), 13-23

Seydoux G, Dunn MA (1997): Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Development* 124, 2191-201

Seydoux G, Mello CC, Pettitt J, Wood WB, Priess JR, Fire A (1996): Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* 382, 713-6

Snow MHL (1981): Autonomous development of parts isolated from primitive-streak-stage mouse embryos. Is development clonal. *J Embryol Exp Morphol* 65 (Suppl.), 269–287

Strome S, Wood WB (1982): Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(5), 1558-62

Swift C (1914): Origin an early history of the primordial germ-cells in the chick. *Am J Anat* 15, 483-516

Tam PP, Zhou SX (1996): The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev Biol* 178, 124–132

Tanaka SS, Matsui Y (2002): Developmentally regulated expression of mil-1 and mil-2, mouse interferon-induced transmembrane protein like genes, during formation and differentiation of primordial germ cells. *Mech Dev* 119 Suppl 1, S261-7

Tanaka SS, Yamaguchi YL, Tsoi B, Lickert H, Tam PP (2005): IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Dev Cell* 9(6), 745-56

Theiler K: *The house mouse: atlas of embryonic development*. Springer Verlag, New York 1989

Toshimori K (2009): Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 204, 5-94

Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, Nishida T, Noce T (2000): Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127(12), 2741-50

Turner CA, Mack DH, Davis MM (1994): Blimp-1, a novel zinc fingercontaining protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77, 297–306

Van Doren M, Williamson AL, Lehmann R (1998): Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr Biol* 8(4), 243-6

Viebahn C: Gastrulation in the rabbit. In: Gastrulation; hrsg. v. Stern CDS; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (New York) 2004, 263-274

Viebahn C, Mayer B, Hrabé de Angelis M (1995): Signs of the principle body axis prior to primitive streak formation in the rabbit embryo. *Anat Embryol (Berl)* 192(2), 159-69

Vincent SD, Dunn NR, Sciammas R, Shapiro-Shalef M, Davis MM, Calame K, Bikoff EK, Robertson EJ (2005). The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development* 132, 1315–1325

Wakahara M (1996): Primordial germ cell development: is the urodele pattern closer to mammals than to anurans? *Int J Dev Biol* 40(4), 653-9

Weckelmann A, Viebahn C, Püschel B (2008): Subcellular redistribution of the mitochondrial PG2 epitope during development from cleavage to primordial germ cell formation in the rabbit embryo. *Sex Dev* 2(1), 31-42

Weisheit G, Mertz D, Schilling K, Viebahn C (2002): An efficient in situ hybridization protocol for multiple tissue sections and probes on miniaturized slides. *Dev Genes Evol* 212, 403-6

Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, Seki Y, Saitou M (2006): Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod* 75(5), 705-16

Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T (2005): Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns* 5(5), 639-46

Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yusa M, Shigeta M, Yamanaka K, Ohinata Y, Saitou M (2008): Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet* 40(8), 1016-22

Ying Y, Zhao GQ (2001): Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 232(2), 484-92

Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ (2000): Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 14(7), 1053-63

Yoshimizu T, Obinata M, Matsui Y (2001): Stage-specific tissue and cell interactions play key roles in mouse germ cell specification. *Development* 128(4), 481-90

Zalokar, M (1976): Autoradiographic study of protein and RNA formation during early development of *Drosophila* eggs. *Dev Biol* 49, 425-437

Zhang F, Barboric M, Blackwell TK, Peterlin BM (2003): A model of repression: CTD analogs and PIE-1 inhibit transcriptional elongation by P-TEFb. *Genes Dev* 17, 748-58.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Leiter der Abteilung Anatomie und Embryologie am Zentrum Anatomie der Universitätsmedizin Göttingen Prof. Dr. med. Christoph Viebahn für die Überlassung dieses interessanten und aktuellen Forschungsthemas, sowie für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung und seine ausgezeichnete Betreuung.

Ebenso möchte ich nicht minder Herrn Dr. rer. nat. Bernd Püschel für seine hervorragende Betreuung bei der Planung, der experimentellen Durchführung und der Niederschrift dieser Arbeit danken. Beiden seien die unzähligen Stunden gedankt, die sie in meine Arbeit investiert und damit sehr zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Mein weiterer Dank gilt den Kolleginnen und Kollegen aus der Abteilung Anatomie und Embryologie für die tolle Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre. Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an die MTLAs Frau Kirsten Falk-Stietenroth, Frau Heike Faust und Frau Irmgard Weiss: Ohne ihre Mitarbeit und Hilfe wäre diese Arbeit niemals in der benötigten Zeit fertig geworden. Herrn Hannes Sydow sei herzlich gedankt für die stets schnelle und unkomplizierte Hilfe in EDV-Fragen sowie für den "Photoshop-Crashkurs", ohne den ich verzweifelt wäre. Frau Dr. rer. nat. Juliane Plitzner, von deren Wissen und Erfahrungsreichtum ich im Labor oft profitieren konnte, sei ebenfalls herzlich gedankt.

Herrn Dr. med. Peter Schwartz, Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Knabe, Herrn PD Dr. med. Jörg Männer sowie Herrn Dr. med. Wolfgang Seidl danke ich für die anregenden Diskussionen, die stets neue Denkanstöße brachten. Den Studentinnen der Molekularen Medizin Julia Siede und Stefanie Riesenberg sei für ihre Mitarbeit bei der Klonierung des BMP2 gedankt. Außerdem ein großes Dankeschön an Heike Altmann, Anja Aue und Gabriele Schmidt, die mir bei allen administrativen Fragen hilfreich zur Seite standen.

Schließlich gilt mein größter Dank meinen Eltern und meinem Bruder, die mir das Studium und diese Dissertation erst ermöglichten und mir stets den nötigen Rückhalt gaben beides erfolgreich abzuschließen.

Lebenslauf

Am 03.04.1983 wurde ich, Clas Hopf, als Sohn der Eheleute Karl-Hilmar Hopf und Ursula Hopf (geb. Schulz) in Bremen geboren.

Von 1989 bis 1993 besuchte ich die Grundschule Bümmerstede in Oldenburg. In den Jahren 1993 bis 1995 ging ich zunächst auf die Orientierungsstufe 1 in Nienburg an der Weser, später, ab Januar 1994, auf die Orientierungsstufe Bremer Straße in Wilhelmshaven.

Im Jahr 1995 kam ich auf das Käthe-Kollwitz-Gymnasium in Wilhelmshaven, welches ich bis 1999 besuchte. Von 1999 bis 2002 besuchte ich das Alte Gymnasium Oldenburg, wo ich im Mai 2002 die Allgemeine Hochschulreife erlangte.

Von Juni 2002 bis April 2003 absolvierte ich meinen Zivildienst im Evangelischen Krankenhaus Oldenburg.

Im Oktober 2003 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen auf, bestand im September 2005 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung und schloss das Studium im Mai 2010 mit dem 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung erfolgreich ab.

Seit Februar 2007 arbeite ich an der Fertigstellung der vorliegenden Dissertation.