

Aus dem Institut für Anatomie und Embryologie
(Prof. Dr. med. Christoph Viebahn)
im Zentrum Anatomie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Molekulare Marker der frühen anterior- posterioren Achsenbildung im Kaninchen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ruben Plöger

aus

Bückeburg

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. W. Brück
Referent: Prof. Dr. Christoph Viebahn
Ko-Referent: Prof. Dr. Rüdiger Behr
Drittreferent: Prof. Dr. Thomas Meyer
Datum der mündlichen Prüfung: 17.06.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel
„Molekulare Marker der frühen anterior-posterioren Achsenbildung
im Kaninchen“

eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir
angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Notwendigkeit einer normalen Achsenbildung.....	2
1.2 Ausgangslage für die a.-p. Achsenbildung	3
1.3 Morphologische Domänen der a.-p. Achsenbildung	4
1.3.1 Morphologische a.-p. Achsenbildung im Huhn.....	4
1.3.2 Morphologische a.-p. Achsenbildung im Kaninchen.....	5
1.3.3 Morphologische a.-p. Achsenbildung in der Maus.....	5
1.4 Molekulare Marker der a.-p. Achsenbildung	6
1.4.1 Frühe molekulare Marker der a.-p. Achse.....	7
1.4.2 Späte molekulare Marker der a.-p. Achse.....	8
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	8
2 Methoden.....	10
2.1 Gewinnung von Embryonen und Gewebeproben.....	10
2.2 Präparation von Keimscheiben	11
2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	11
2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben.....	11
2.4 RNA-Präparation.....	12
2.5 Reverse Transkription	12
2.6 Primer für die Amplifikation.....	12
2.7 PCR für die Amplifikation.....	14
2.8 Aufbereitung des Ergebnisses der PCR durch Elektrophorese	15
2.9 Ligation, Transformation und Klonierung von cDNA-Fragmenten	15
2.10 Herstellung einer cRNA-Sonde.....	17
2.11 <i>In-situ</i> -Hybridisierung (ISH) an ganzen Keimscheiben.....	18
2.12 Einbettung der Keimscheiben	19
2.13 Einbettung der Keimscheiben zur histologischen Untersuchung.....	20
2.14 Stadierung der Kaninchenembryonen.....	20
3 Ergebnisse	22
3.1 Amplifikation der entsprechenden Genabschnitte.....	22

3.2	Expressionsmuster der untersuchten Gene.....	23
3.2.1	<i>NODAL</i>	23
3.2.2	<i>EOMES</i>	27
3.2.3	<i>PITX2</i>	29
3.2.4	<i>ID3</i>	30
3.2.5	<i>SALL1</i>	33
3.2.6	<i>PKDCC</i>	35
3.2.7	<i>TBX6</i>	37
3.2.8	<i>ELK3</i>	39
3.2.9	<i>SPOCK3</i>	41
3.2.10	<i>DENND5B</i>	41
3.2.11	<i>LASS1</i>	41
3.2.12	<i>LITAF</i>	43
3.2.13	<i>LRP2</i>	43
4	Diskussion	44
4.1	Methodisches.....	44
4.1.1	Modellorganismus.....	44
4.1.2	Klonieren, <i>In-Situ</i> -Hybridisierung und Histologie	45
4.2	Expressionsmuster.....	46
4.2.1	<i>NODAL</i>	46
4.2.2	<i>EOMES</i>	47
4.2.3	<i>PITX2</i>	48
4.2.4	<i>ID3</i>	49
4.2.5	<i>SALL1</i>	49
4.2.6	<i>PKDCC</i>	50
4.2.7	<i>TBX6</i>	50
4.2.8	<i>ELK3</i>	51
4.2.9	<i>SPOCK3</i>	51
4.2.10	Untersuchte Gene ohne frühes achsenspezifisches Muster.....	51
4.3	Marker in der frühen Achsenbildung.....	52
4.4	Marker der späten Achsenbildung	54
4.5	Neue Domänen im Kaninchenembryo	54
4.5.1	Die anteriore Gastrulationsscheibe (AGP).....	54
4.5.2	Die Domäne des anterioren Primitivstreifens (ASD).....	55
4.6	Das Drei-Anker Modell	55
5	Zusammenfassung	57
6	Veröffentlichungen	58
6.1	Zeitschriftenartikel.....	58
6.1.1	Nutzungsrechte	58
6.2	Tagungsbeiträge	58
7	Anhang.....	60
7.1	Materialien.....	60

7.1.1	Laborgeräte	60
7.1.2	Mikroskopie	61
7.1.3	Verbrauchsmaterial.....	61
7.1.4	Allgemeine Laborchemikalien.....	62
7.1.5	Standardlösungen.....	62
7.1.6	Chemikalien für die Gelelektrophorese.....	63
7.1.7	Labortiere	63
7.1.8	Pharmakologische Substanzen.....	63
7.1.9	Substanzen für die Molekularbiologie (ink. Primer).....	63
7.1.10	Substanzen für die Bakteriologie	65
7.1.11	Nährmedien und Zusätze	66
7.1.12	Substanzen für den RNA-Sondenbau	66
7.1.13	Substanzen für die <i>In-Situ</i> -Hybridisierung.....	66
7.1.14	Lösungen für die <i>In-Situ</i> -Hybridisierung	67
7.1.15	Materialien für die histologische Aufbereitung.....	68
7.1.16	Software.....	68
8	Literaturverzeichnis.....	69
9	Danksagung	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell zur Entwicklung der Keimscheibe und des Keimzylinders	6
Abbildung 2: Expressionsmuster von <i>NODAL</i>	24
Abbildung 3: Expressionsmuster von <i>EOMES</i>	26
Abbildung 4: Expressionsmuster von <i>PITX2</i>	28
Abbildung 5: Expressionsmuster von <i>ID3</i>	32
Abbildung 6: Expressionsmuster von <i>SALL1</i>	34
Abbildung 7: Expressionsmuster von <i>PKDCC</i>	36
Abbildung 8: Expressionsmuster von <i>TBX6</i>	38
Abbildung 9: Expressionsmuster von <i>ELK3</i>	40
Abbildung 10: Expressionsmuster von <i>SPOCK3</i>	42
Abbildung 11: Modell zur Entwicklung des Kaninchenembryos bis zur Gastrulation	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Entwicklungsstadien mit entsprechender Dauer der Trächtigkeit	10
Tabelle 2: Standard PCR-Protokoll	14
Tabelle 3: Protokoll für die <i>In-Situ</i> -Hybridisierung	18
Tabelle 4: Übereinstimmungsrate der amplifizierten Gensequenzen	22

Abkürzungsverzeichnis

A	Symbol für die Base Adenin
Abb.	Abbildung
AGP	<i>anterior gastrula plate</i>
AMC	<i>anterior marginal crescent</i> (vorderer Randbogen)
a.-p.	<i>anterior-posterior</i>
ASD	<i>anterior streak domain</i>
BBR	Boehringer Blocking Reagenz
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
C	Symbol für die Base Cytosin
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyriboukleinsäure)
<i>DENND5B</i>	<i>DENN Domain Containing 5B</i>
DPEC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Differentialinterphasenkontrast
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dpc	<i>day post conception</i> (Tag nach Befruchtung)
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>ELK3</i>	ETS domain containing protein Elk-3, auch: Norepinephrine Transporter (NET) (NCBI 2020)
<i>EOMES</i>	Eomesodermin
<i>Fig.</i>	<i>Figure</i> (gleichbedeutend für Abbildung in internationalen Publikationen)
G	Symbol für die Base Guanin
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
hCG	humanes Choriongonadotropin

<i>ID3</i>	<i>inhibitor of DNA Binding 3</i>
i.v.	intravenös
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Symbol für die Basen mit Ketogruppen (G und T)
<i>LASS1</i>	auch CERS1 (<i>Ceramide Synthase 1</i>)
LB-Medium	<i>lysogeny-broth</i> -Medium
<i>LITAF</i>	<i>lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor</i>
<i>LRP2</i>	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> (Megalin)
M	Symbol für die Basen mit Aminogruppen (A und C)
MABT	<i>Maleic acid buffer containing tween 20</i>
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
n	number (Anzahl)
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NGS	<i>normal goat serum</i> (Ziegen Serum)
NTMT	Abkürzung für NaCl, Tris, MgCl ₂ und Tween
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PBT	Abkürzung für Tween und PBS Gemisch
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGE	posterior castrula extension
<i>PKDCC</i>	<i>protein kinase domain containing, cytoplasmic</i>
Pub. GS	publizierte Gensequenz
R	Symbol für die Basen der Purine (G und A)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuklease
<i>SALL1</i>	<i>spalt like transcription factor 1</i>
SCH	Schwein
SOB-Medium	<i>super-optimal-broth</i> -Medium
<i>SPOCK3</i>	<i>SPARC (Osteonectin), cwcv and kazal like domains proteoglycan 3</i>
SSC	<i>Saline-sodium citrate buffer</i>

T	Symbol für die Base Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Trishydroxymethyl-aminomethan(TRIS)-Acetat-EDTA
<i>TBX6</i>	<i>T-Box 6</i>
<i>TGF</i>	<i>Transforming growth factor</i> (Transformierender Wachstumsfaktor)
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Weiss Unit
USA	United States of America (Vereinigten Staaten von Amerika)
UV	Ultraviolett
<i>VG1</i>	Gen im <i>TGF</i> -Signalweg
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indosyl- β -galactosid
Y	Symbol für die Basen der Pyrimidine (C und T)

1 Einleitung

"It is not birth, marriage, or death, but Gastrulation which is truly the most important time in your life."

(Wolpert, 1991)¹

Dieses Zitat von dem Entwicklungsbiologen Lewis Wolpert deutet in Anlehnung an die Geburts-, Hochzeits- und Todesanzeigen der Londoner Tageszeitung „*The Times*“, wie z. B. in der Ausgabe unter dem Herausgeber von Haley am 19. April 1954 (Haley 1954), auf die zentrale Stellung der Gastrulation im Leben eines Menschen hin. Gastrulation (gaster, griechisch für Magen) ist die embryonale Phase, in der die drei Keimblätter, Ektoderm, Mesoderm und Endoderm entstehen und somit die Grundlage für die weitere Differenzierung in z. B. Epithelien des Magen gelegt wird. Mit der Bildung der anterior-posterioren (a.-p.) Achse zu Beginn der Gastrulation durch morphologische Strukturen sind die Körperachsen des Embryos definiert, so dass sich der Embryo achsenspezifisch weiterentwickeln und die Gastrulation erfolgreich durchlaufen kann.

Die Gastrulation findet in der frühen Embryogenese bei den meisten Metazoa statt und ließ Häckel sein Konzept der *Archigastrula* (Haeckel 1874) postulieren. Dennoch weisen die Klassen und sogar einzelne Arten an ihre jeweiligen Lebensbedingungen evolutionär angepasste Ausgangsformen des Keims und der Abläufe der Gastrulation auf. In der Klasse der Amphibien hat der Embryo zu Beginn der Gastrulation eine kugelige Form, die Blastula. Die Bildung der Keimblätter erfolgt durch die Einstülpung der Zellwand (*Invagination*) am Blastoporus (Krohn 1849; Johnson 1884; Keller und Shook 2004). Sowohl in der Klasse der Säugetiere als auch in der Klasse der Vögel liegt meistens eine flache, zweischichtige Keimscheibe, auch Blastodisc genannt, als Ausgangssituation der Gastrulation vor. Analog zum Blastoporus der Amphibien entstehen in der morphologischen Struktur des Primitivstreifens die drei Keimblätter durch Einwandern (*Ingression*) von Zellen (Stern 2004; Viebahn 2004; Wolpert et al. 2015). In der weiteren Entwicklung der Embryonen erweist sich der Primitivstreifen als Zeichen des posterioren Pols der a.-p. Körperachse. Bereits vor der Bildung des Primitivstreifens entwickeln Säugetiere und Vögel unterschiedliche morphologische Strukturen als frühe Zeichen der Achse. Während beim Vogel das erste morphologische Zeichen, die Koller-Sichel, posterior erscheint (Rauber, 1874, 1876), erscheint dieses, als vorderer Randbogen, (engl. *anterior marginal crescent*, AMC) beim Säuger anterior (Viebahn et al., 1995a; Hassoun et al., 2009; Moore et al., 2015). Trotz dieser im Vergleich

¹ „Es ist nicht Geburt, Hochzeit oder Tod, sondern die Gastrulation, die tatsächlich der wichtigste Zeitpunkt im Leben ist.“

invertierten Achsenbildung bildet sich in beiden Klassen der Primitivstreifen posterior, so dass komplexe molekulare Regulationsmechanismen angenommen werden müssen.

1.1 Notwendigkeit einer normalen Achsenbildung

Im Embryo entstehen fortlaufend Achsen, sowohl auf der zytologischen Ebene bei der Zellteilung zwischen den beiden Zentrosomen (Welsch et al. 2018) als auch auf der histologischen Ebene bei der Unterteilung einer Region in zwei sich unterschiedlich differenzierende Bereiche und Gewebe, sodass Differenzierung und somit Spezifizierung stattfinden kann (Wolpert et al. 2015). Diese Regionen können molekular durch unterschiedliche Genexpressionen oder morphologisch durch Strukturen eine Achse zwischen sich ausbilden. Unterteilungen von Regionen in immer weiter ausdifferenzierte Regionen und somit Bildung von Achsen ist für die Entwicklung von komplexen Körperbauplänen unabdingbar. Diese Achsen zwischen Zellen bzw. Regionen lassen sich als Vektoren der Körperachsen darstellen, die sich während der frühen embryonalen Phase gebildet haben. Die Entstehung der Körperachse kann somit durch die Orientierung der zahlreichen Zellteilungen oder durch die Entstehung molekular oder morphologisch definierter Regionen oder beides entstehen. Für die Entstehung durch molekular oder morphologisch definierte Regionen spricht, dass durch zusätzliche Expressionen multiple Achsen hervorgerufen werden können (Shah et al. 1997) oder dass durch die Verpflanzung bestimmter morphologisch definierte Regionen an eine andere Stelle dort ebenfalls eine Achse entstehen kann (Spemann und Mangold 1924; Waddington 1932). Dagegen zeigen Experimente mit Wirkstoffen, die die Zellteilung stören, wie z. B. Urethan oder Vincristin, ein gehäuftes Auftreten von doppelter Achsenbildung oder fehlerhafte Achsenbildung (Ferm 1963; Kaufman und O'Shea 1978).

Eine fehlende Ausbildung der Körperachsen führt zu einer tödlichen Entwicklung. Eine fehlerhafte Ausbildung der Körperachsen kann mit dem Leben, wenn auch in manchen Fällen nur kurz, vereinbar sein. Die Achsen können multipel angelegt sein, sodass eineiige Mehrlinge entstehen. Während beim Gürteltier normalerweise zwischen vier bis acht identische Mehrlinge geboren werden (Newmann und Patterson 1910; Loughry et al. 1998; Enders 2002), kommen eineiige Zwillinge in der Maus selten (Bodemann 1935), beim Menschen in 5:1000 Schwangerschaften (s. S. 198 im Uhl 2013) vor. Beim Menschen gehen eineiige, unter diesen vor allem die zu 1% vorkommenden monoamnialen Mehrlingschwangerschaften mit einer höheren Rate an Fehlgeburten und perinataler Mortalität einher (s. S. 932 im Schneider et al. 2014). Das Vertauschen der Achsenpole kann wie beim Tausch vom rechten und linken Pol der Transversalachse ohne Konsequenz bleiben. Eine von 10.000 Lebendgeburten wurden im Zeitraum von 1998-2007 in den Vereinigten Staa-

ten von Amerika als *situs inversus totalis* (Lin et al., 2014) ohne große Konsequenz für die Betroffenen diagnostiziert (Sutherland and Ware, 2009).

1.2 Ausgangslage für die a.-p. Achsenbildung

Vor der Bildung der a.-p. Achse sorgen Zellteilungen und Ausdifferenzierung zur Ausbildung von zum Teil persistierenden Achsen im Vogel- und Säugerembryo. Im Vogelembryo bildet sich durch meroblastische Furchung eine embryo-abembryonaler Achse, die später zur dorsal-ventralen Achse wird, heraus. Diese Furchung sorgt für eine scheibenförmige Zellansammlung mit kleineren Zellen im Zentrum als in der Peripherie (Bellairs et al. 1978), die somit anhand der Morphologie in die innere embryonale *Area pellucida* und in die äußere extraembryonale *Area opaca* unterteilt werden kann. Kurz vor der a.-p. Achsenbildung liegt also eine symmetrische Scheibe mit einer dorsal-ventralen Achse vor. Bei den Säugern wird, abgesehen von den Ursäufern, der Keim anstelle eines Vorratsdepots in Form des Dotters (*Ovoparie*) über die Gebärmutter mit Nährstoffen (*Viviparie*) versorgt (Stern 2004; Weyerstahl und Stauber 2013), so dass eine holoblastische Furchung stattfindet und somit eine kugelförmige Zellansammlung entsteht. Durch die Differenzierung der äußeren Zellen des kugelförmigen Keims zum Trophoblast, einem extraembryonalen Gewebe, und der inneren Zellen zum Embryoblast, einem embryonalen Gewebe, entstehen zentral-periphere Achsen. Erst durch die Brechung der Kugelsymmetrie bei der Entstehung der Blastozystenöhle (Gamow und Daniel 1970) bildet sich ein polarer Pol mit dem Embryoblast unter einer Schicht Trophoblasten aus und ein muraler Pol ohne Embryoblast. Somit bildet sich, wie beim Vogel, eine embryonal-abembryonale Achse heraus, die später als dorsal-ventrale Achse erhalten bleibt. Das embryonale Gewebe flacht von einem mehrschichtigen zu einem zweischichtigen Gewebe ab und nimmt dabei bei den meisten Säugern die Form einer Scheibe bzw. bei der Maus die eines Zylinders an. Dabei behält nur die obere Zellschicht der Scheibe bzw. des Zylinders, der Epiblast, die Fähigkeit sich zu embryonalem Gewebe zu entwickeln. Die untere Zellschicht, der im Kaninchen sogenannte Hypoblast und in der Maus sogenannte viszerale Endoderm, sowie beim Kaninchen der dem Embryoblast aufliegende Trophoblast stellen das extraembryonale Gewebe der Scheibe bzw. des Zylinders dar. Das extraembryonale Gewebe der Scheibe geht in das restliche extraembryonale Gewebe des Keims über: Beim Kaninchen besteht dies aus Trophoblast und Dottersackepithel, bei der Maus zusätzlich aus extraembryonalem Ektoderm und Endoderm, die entsprechend in das Dottersackepithel und Trophoblast übergehen. Als Ausgangslage für die a.-p. Achse finden wir somit beim Vogel und bei den meisten Säugern eine flache Keimscheibe mit bereits definierter dorsal-ventraler Achse vor. (Wolpert et al. 2015)

1.3 Morphologische Domänen der a.-p. Achsenbildung

Aus den im Prinzip ähnlichen Ausgangslagen mit einer bereits definierten Achse bilden sich unterschiedliche erste morphologische Domänen der a.-p. Achse in Säugern und im Vogel aus. Die jeweils ersten morphologischen Domänen werden bis zur Entstehung des ersten gemeinsamen Zeichens der a.-p. Achse, des Primitivstreifens, im Folgendem beschreiben: Die Entwicklungsschritte im Vogelembryo werden an dem gut erforschten Modellorganismus Huhn (Stern 2005) dargestellt. Die Kenntnis über die morphologischen Entwicklungsschritte im Huhn ermöglicht es, die molekularen Expressionsmuster zu deuten und somit die Auswahl der untersuchten Gene zu verstehen. Die im Vergleich komplexeren Entwicklungsschritte im Säuger mit einer anterioren Domäne können durch die gewählte Reihenfolge besser herausgearbeitet werden. Im Säuger stehen vor allem zwei gut erforschte Modellorganismen zur Verfügung: Das Kaninchen zeigt eine für Säuger typische morphologische Entwicklung (Hassoun et al. 2009; Fischer et al. 2012). Die Maus nimmt bei den Säugetieren in der frühen Embryonalphase morphologisch eine Sonderstellung ein. Anders als im Kaninchen können die Mausembryonen leichter molekular beeinflusst werden, sodass zahlreiche Daten zur molekularen Entwicklung in der Maus vorhanden sind. Um diese Daten verwerten zu können, wird die abweichende Morphologie des Mausembryos ebenfalls vorgestellt, nachdem zuvor die typischen morphologischen Entwicklungsschritte der Säuger mit Hilfe des Kaninchenembryos dargestellt wurden.

1.3.1 Morphologische a.-p. Achsenbildung im Huhn

Die flache, symmetrische Keimscheibe des Huhns besteht aus der zentralen, kreisrunden *Area pellucida* und der umgebenden, ringförmigen *Area opaca*. Histologisch kann der Bereich der *Area opaca* an weniger stark ausgeprägten prismatischen Zellen des sich über die ganze Keimscheibe erstreckenden Epiblasts (Bancroft und Bellairs 1974; Bellairs et al. 1978) und an einer darunter (ventral) liegenden mehrschichtigen Zellschicht aus Dotterzellen definiert werden. Unter dem Epiblast der *Area pellucida* bilden sich Hypoblast-Inseln, die wachsen und sich zu einer durchgehenden Zellschicht verbinden (Kochav et al. 1980; Fabian und Eyal-Giladi 1981; Eyal-Giladi 1984). Das Ausmaß der Fläche der Hypoblast-Inseln wird als Kriterium für die Klassifizierung der Entwicklung herangezogen: Das Erscheinen der ersten Hypoblast-Inseln definiert Stadium X. Im Stadium XIII liegt eine durchgehende Zellschicht von Hypoblast vor (Eyal-Giladi und Kochav 1976). Interessanterweise scheint dieser Prozess posterior zu beginnen und sich nach anterior fortzusetzen und kann somit als ein Hinweis für die a.-p. Achse verwendet werden (Vakaet 1962). Ebenfalls als Zeichen der a.-p. Achse kann die posterior entstehende Koller-Sichel - auch Rauber-Sichel genannt - verwendet werden, die sich histologisch an kleinen Zellen am Rand der *Area pellucida* definiert (Koller 1882; Callebaut und Van Nueten 1994) und in unmittelbarer Nachbarschaft zur molekular definierten *posterior marginal zone* liegt (Stern 1990). Im Stadium XIII beginnt die Verdrängung des Hypoblasts durch Endoblast von der Koller-Sichel aus. Kurz darauf entsteht der Primitivstreifen, der von posterior zum Zentrum der Keimscheibe zieht und

somit den Eintritt ins Hamburger und Hamilton-Stadium 2 (Hamburger und Hamilton 1951) markiert. Durch die Zellbewegungen im Rahmen der Einwanderung von zukünftigen Mesodermzellen am Primitivstreifen kommt es zu Polonaise Bewegungen - symmetrische Bewegungen von Ektodermzellen zuerst zum posterioren Pol und dann zum Primitivstreifen (Gräper 1929; Voiculescu et al. 2007). Im Hamburger und Hamilton-Stadium 3 ist der Primitivstreifen deutlich ausgeprägt. Die weitere Entwicklung des Hühnerembryos wird mit Hilfe von arabischen Zahlen klassifiziert.

1.3.2 Morphologische a.-p. Achsenbildung im Kaninchen

Die flache Keimscheibe liegt am muralen Pol der Blastozyste und besteht aus drei Zellschichten: Rauber Zellen bilden die oberste, der Epiblast bildet die mittlere und der Hypoblast die unterste Zellschicht. Die Rauber Zellen und der Hypoblast gehen an der Peripherie der Keimscheibe in den Trophoblast bzw. in das Dottersackepithel über. Zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung, der meist mit dem Stadium 0 gleichgesetzt wird (Weisheit 2002), ist die Grenze der embryonalen Keimscheibe ungleichmäßig mit dem extraembryonalen Gewebe verzahnt. Die Zelldichte ist im Zentrum der Keimscheibe besonders hoch. Während der weiteren Entwicklung nimmt die Zelldichte in einem äußeren Bereich der Keimscheibe durch eine Rotationsbewegung zu (Idkowiak et al. 2004b). Zeitgleich wird in diesem Bereich der Rand zum extraembryonalen Gewebe scharf abgrenzbar und histologisch sind kubische Hypoblastzellen erkennbar. Diese Veränderung wird als AMC beschrieben (Viebahn et al. 1995) und markiert das Stadium 1. Der AMC ist das erste morphologische Zeichen der a.-p. Achse (Viebahn 1999). Im Stadium 2 kommt es zur Proliferation und Migration von Zellen im zentralen Bereich der Keimscheibe, so dass diese nach posterior elongiert. Histologisch kann die Keimscheibe nun in zwei Bereiche unterteilt werden: Der durch die Elongation entstandene Bereich, der *posterior gastrula extension* (PGE), erkennbar durch kubische Epiblastzellen (Viebahn et al. 2002), und der dazu anterior liegende Bereich. Durch die Ingression und epithelial-mesenchymale Transition von Zellen, die in Folge von U- und L-förmigen Zellbewegungen (Halacheva et al. 2011) und Zellteilungen in den Medianen der Keimscheibe liegen, bildet sich der Primitivstreifen und definiert so das Stadium 3 (Viebahn 2004).

1.3.3 Morphologische a.-p. Achsenbildung in der Maus

Die Maus unterscheidet sich von den meisten Säugern durch ihren zweischichtigen Eizylinder, der durch die Elongation der oberen Zellschicht, des Epiblasts, entsteht. Die untere Zellschicht heißt Endoderm. Am distalen End des Zylinders ist das distale viszerale Endoderm zu finden, das zu einer Seite des Zylinders nach proximal wandert, kubische Zellen ausbildet und dann *anterior visceral endoderm* (AVE) genannt wird (Tam und Gad 2004). Für den Vergleich zwischen Maus, Kaninchen und Huhn kann der Eizylinder in einem theoretischen Modell zu einer flachen Keimscheibe ausgebreitet werden (Behringer et al. 2000). In diesem Modell würde das *distale viszerale Endoderm* in der Mitte der Keimscheibe liegen

und am Rand der Keimscheibe zum AVE werden. Auf der entgegengesetzten, posterioren Seite bildet sich wie im Kaninchen und Huhn der Primitivstreifen. Anstelle von Stadien wird die Zeit nach der Befruchtung zur Klassifikation der Entwicklung der Mausembryonen angegeben.

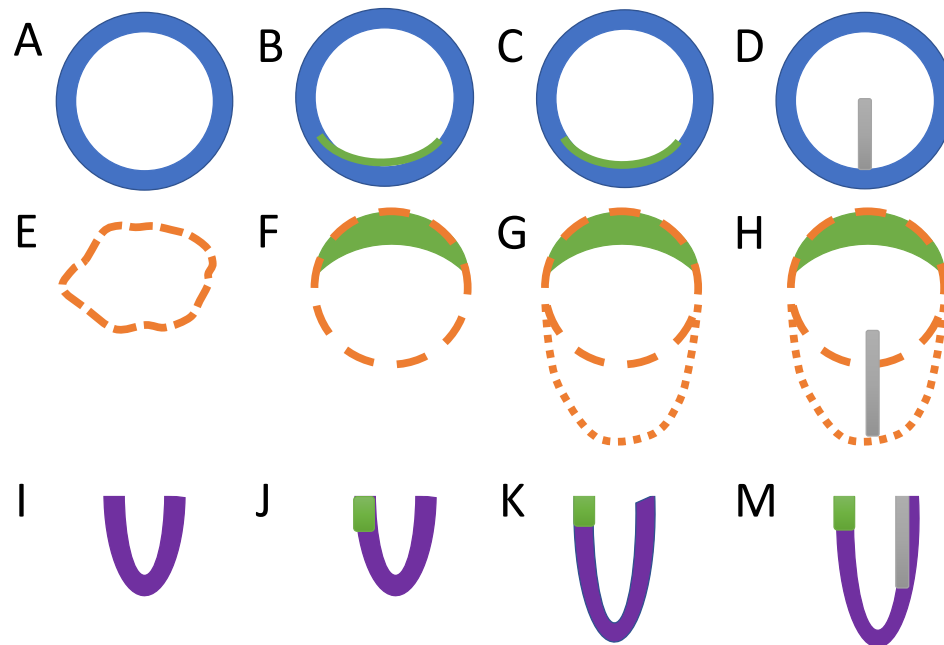


Abbildung 1: Modell zur Entwicklung der Keimscheibe und des Keimzylinders Entwicklung der Keimscheibe des Huhns (A-D) und des Kaninchens (E-H) bzw. des Keimzylinders der Maus (I-M). Die Keimscheiben bzw. Keimzylinder sind ihrer zeitlichen Abfolge nach von links nach rechts angeordnet. Die Keimscheiben vom Huhn und Kaninchen sind den en-face Aufnahmen von dorsal nachempfunden, während die Keimzylinder von der Maus mit Hilfe eines sagittalen Schnittes dargestellt werden. Grau zeigt den Primitivstreifen an (D,H,M). Das erste morphologische Zeichen der a.-p. Achse wird grün dargestellt und zeigt im Huhn die Koller-Sichel an (B,C), im Kaninchen den AMC (F,G,H) und in der Maus den AVE (J,K,M). Der blaue Kreis zeigt die *Area opaca* an, das Zentrum die *Area pellucida* (A-D). Die gestrichelte orange Linie stellt die Keimscheibe (E-F) und den Teil der Keimscheibe, der anterior vom PGE liegt und die Form der Keimscheibe beibehält, dar (G-H). Die Erweiterung der Keimscheibe, der PGE, wird durch die gepunktete orange Linie dargestellt (G-H). Die violette Farbe stellt den Keimzylinder dar (I-M). Basierend auf Stern 2004; Viebahn 2004 und Wolpert et al. 2015.

1.4 Molekulare Marker der a.-p. Achsenbildung

Manche Gene zeigen ein Expressionsmuster, das die morphologische Achsenentwicklung molekular vorwegnimmt. Während bei einigen dieser Gene bereits ein direkter Einfluss auf die Achsenbildung nachgewiesen werden konnte, korreliert das Expressionsmuster von anderen Genen mit der Achsenbildung.

1.4.1 Frühe molekulare Marker der a.-p. Achse

Im Huhn zeigt die Expression *VG1*, das als Protein ein Signalmolekül des *TGF*-Signalwegs darstellt, eine Region an, die als *posterior marginal zone* bezeichnet wird (Seleiro et al. 1996). In dieser Region entsteht die Koller-Sichel und später der Primitivstreifen (Seleiro et al. 1996; Shah et al. 1997; Skromne und Stern 2002), sodass *VG1* als früherer Marker des posterioren Pols der Keimscheibe gesehen wird. Auch *WNT* zeigt mit einem abnehmenden Gradienten von posterior nach anterior den posterioren Pol an (Skromne und Stern 2001). Als Mitglied des *TGF*-Signalwegs ist *PITX2* in der Lage *VG1* zu induzieren und ist somit ein früherer Indikator als *VG1* (Torlopp et al. 2014). Bei demselben Screen, in dem auch die Expression von *PITX2* am posterioren Pol entdeckt und darauf der Einfluss von *PITX2* auf *VG1* herausgearbeitet wurde, wurden weitere Gene als mögliche Marker für den posterioren Pol gesucht (Torlopp et al. 2014): Als weitere Kandidaten für einen molekularen Marker des posterioren Pol wie *PITX2* und *VG1* kamen der Transkriptionsfaktor *ELK3* und *EOMES*, die Proteinkinase *PKDCC*, der Nekrosefaktor *LITAF*, die T-Box Gene *TBX6* und *BRACHYURY* und das am Transportsystem beteiligte Protein *DENND5B* in Frage. Als mögliche Marker für den anterioren Pol wurden der Repressor *ID3*, das mit den Lipoproteinen verwandte Protein *LRP2* und das Calcium bindende Enzym *SPOCK3* bezeichnet. Als weiterer Marker des anterioren Pols gilt der Transkriptionsrepressor *SALL1* (persönliche Kommunikation mit C. Stern).

Im Säugetier gibt es zwei orthologe Gene für *VG1*, wobei zum Entstehungszeitpunkt dieser Arbeit eine sichere Aussage zur Unterscheidung dieser beiden Gene schwierig zu treffen ist (Chen et al. 2006; Andersson et al. 2007). Interessanterweise ist einer der beiden orthologen Gene bicistronisch, wird also zusammen mit dem Gen *LASS1/CERS1*, das als Membranprotein bei der Synthese von Ceramide eine Rolle spielt, in der Ratte transkribiert (Wang et al. 2007). Somit könnte das *LASS1* Expressionsmuster mit dem Expressionsmuster seines bicistronischen Partners im Säugetier identisch sein. Auch *PITX2* Expressionsmuster aus diesen frühen Entwicklungsstadien fehlen. In der Maus ist *WNT* – wie im Huhn – bereits früh in der späteren Region des Primitivstreifens exprimiert (Liu et al. 1999; Kemp et al. 2005; Rivera-Perez und Magnuson 2005). Im Kaninchen ist *WNT* im Stadium 1 in der ganzen Keimscheibe exprimiert, im Stadium 2 in einem posterioren sichelförmigen Areal und im Stadium 3 im Primitivstreifen (Idkowiak 2007). Als Marker für den anterioren Pol sind sowohl beim Kaninchen als auch bei der Maus Antagonisten wie *DICKKOPF* (Glinka et al. 1998; Fig. 3B in Pearce et al. 1999; Fig. 3B in Zakin et al. 2000; Weisheit 2002) und *CERBERUS* (Belo et al. 1997; Idkowiak et al. 2004a) von später posterior exprimierten Genen wie *WNT* und dem Signalmolekül *NODAL* (Yoshida et al. 2016) genannt. Eine genaue Untersuchung der Expressionsmuster von früh exprimierten Genen, die in der Achsenbildung involviert sein könnten, ist im Hinblick auf die invertierte Achsenbildung im Kaninchen also noch ausstehend. Von diesen Genen sind in der Maus die im anterior

und posterior Pol exprimierten Gene *EOMES* (Nowotschin et al. 2013), *PKDCC* (Fig. 2 in Imuta et al. 2009) und *SALL1* (Sousa-Nunes et al. 2003) sowie *TBX6* am posterioren Pol (Chapman et al. 1996) und das in der Peripherie des Keimzylinders exprimierte *ID3* (Jen et al. 1997) in der fortgeschrittenen Achsenbildung untersucht. Diese Daten zeigen, dass die im Huhn allein posterior exprimierten Gene auch anterior im der Maus exprimiert sind. Insofern könnte auch im Kaninchen eine Expression an beiden Polen als Anpassung an die invertierte Achse vorliegen: Schließlich sind im Huhn die Gene in der posterioren Region und damit sowohl im ersten morphologischen Zeichen der Achse als auch am Entstehungsort des Primitivstreifens exprimiert.

1.4.2 Späte molekulare Marker der a.-p. Achse

Das T-Box Gen *BRACHYURY* ist im PGE und im Primitivstreifen des Kaninchens (Viebahn et al. 2002), im Primitivstreifen der Maus (Beddington et al. 1992; Wilson et al. 1993; Kispert und Herrmann 1994; Arnold et al. 2008) sowie im Primitivstreifen des Huhns (Kispert et al. 1995) exprimiert. Ein Marker für die anteriore Spitze des Primitivstreifens ist das Signalmolekül *CHORDIN*: Im Kaninchen bildet sich bereits im Stadium 2 eine kreisförmige Expressionsdomäne im posterioren Teil des vorderen Dreiviertels der Keimscheibe aus (Weisheit 2002) und markiert somit die spätere anteriore Spitze des Primitivstreifens. Auch das Signalmolekül vom TGF-Signalweg, *NODAL*, ist im Primitivstreifen in der Maus (Fig. 3 und 4 in Conlon et al. 1994) und im Huhn (Levin et al. 1995; Chapman et al. 2002) exprimiert. Im Huhn wurde nachgewiesen, dass *NODAL* zusammen mit *CHORDIN* die *Ingression* von Zellen induzieren kann und somit die Entwicklung von Mesoderm, das wiederum von *BRACHYURY* angezeigt wird (Streit et al. 1998; Skromne und Stern 2002). Insofern ist *NODAL* einer der Marker, der die molekulare Achsenbildung in die Morphologie übersetzt. Die Expression von *NODAL* selbst wird von *VG1* und *WNT* induziert (Skromne und Stern 2001; Bertocchini und Stern 2002; Skromne und Stern 2002). Im Kaninchenembryo zeigt sich in den späten Stadien vor Primitivstreifenbildung ein sichelförmiges Muster (Yoshida et al. 2016).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, Gene, deren Expressionsmuster im Huhn auf eine Funktion in der frühen a.-p. Achsenbildung hinweisen, im Modellorganismus für Säuger mit flacher Keimscheibe auf ihre Expression zu untersuchen und mit den bekannten Expressionsmustern von Modellorganismen der Wirbeltiere zu vergleichen. Diese Untersuchung ist notwendig, weil über die frühe molekulare Achsenbildung besonders im Säuger mit einer flachen Keimscheibe im Gegensatz zur morphologischen Achsenbildung wenig bekannt ist. Mit der Untersuchung der Expressionsmuster entsteht für das Kaninchen eine molekulare Topographie, die die Grundlage für molekulare Forschung darstellt. Die Muster könnten Hinweise auf die Funktion der Gene in der a.-p. Achsenbildung geben und somit mög-

licherweise einen Beitrag zur Zuordnung der Gene in der Achsenbildung und in den Signalkaskaden leisten. Im Vergleich zum Vogel sind die Expressionsmuster interessant, um mögliche molekulare Anpassungen an die invertierte Achsenbildung aufzuzeigen. Im Vergleich zur Maus zeigen Säuger mit einer flachen Keimscheibe deutlich morphologische Gemeinsamkeiten zum Menschen, so dass die Ergebnisse dieser Arbeit wahrscheinlich auf den Menschen übertragen werden können und im Hinblick auf die Entstehung von multiplen a.-p. Achsen, also eineiigen Mehrlingen, auch für die Humanmedizin relevant sein könnten.

2 Methoden

Die Arbeiten für die vorliegende Doktorarbeit wurden zum größten Teil am Institut für Anatomie und Embryologie des Zentrums Anatomie der Georg-August-Universität Göttingen und teilweise im Labor vom Claudio Stern, JZ Young Chair of Anatomy, Cell & Developmental Biology, Division of Biosciences, University College London durchgeführt. An die Sicherheitsbestimmungen wurde sich entsprechend den laborüblichen Standards gehalten.

2.1 Gewinnung von Embryonen und Gewebeproben

Die untersuchten Embryonen wurden Muttertieren der Kaninchenrasse Weiße Neuseeländer (*New Zealand White*) aus den Stämmen der Firma Charles River (in Frankreich) entnommen. Diese Albino-Stämme wiesen gute Verpaarungseigenschaften mit einer Wurfgröße von durchschnittlich sechs bis zwölf Jungen auf.

Die Befruchtung des Muttertieres durch den Rammler fand auf natürlichem Wege statt. Abhängig von den benötigten Entwicklungsstadien der Embryonen verlängert sich die Dauer der Trächtigkeit (*days post conception*, dpc). Zur Entnahme der Embryonen wurde dem Muttertier eine Überdosis (200-400 mg pro kg Körpergewicht) Pentobarbital (Narcoren®) i. v. in einer der beiden Ohrvenen gespritzt. Nach der chirurgischen Eröffnung des Abdomens wurde der zweihornige Uterus präpariert und reseziert. Die Embryonen im Präimplantationsstadium konnten mit 10 ml einer 37°C-warmen phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) aus den am proximalen Ende eröffneten Uterus herausgespült werden.

Tabelle 1: Entwicklungsstadien mit entsprechender Dauer der Trächtigkeit

Entwicklungsstadium	Dauer der Trächtigkeit (angegeben in dpc)
Stadium 0	5,2
Stadium 1	6,0
Stadium 2	6,2
Stadium 3	6,5

2.2 Präparation von Keimscheiben

Die Embryonen wurden mit drei Waschschritten in PBS aufgereinigt, für eine Stunde in einer PBS-Lösung mit einem Anteil von 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und wieder mit zwei Waschschritten in PBS überführt. Mit Hilfe einer Wolframnadel und einer Pinzette wurde die *Zona pellucida* von den Blastozysten entfernt. Zur Ausbreitung der Blastozyste wurde der der Keimschreibe gegenüberliegende Pol der Blastozysten mit demselben Werkzeug eröffnet. Die Ausbreitung der Blastozysten erfolgte durch Einschneiden des extraembryonalen Gewebes an dem eröffneten Pol der Blastozyste in alle vier Himmelsrichtungen. Die ausgebreiteten Blastozysten durchliefen eine aufsteigende Ethanol-Reihe (25%, 50%, 75%, 100% in PBS). Die Präparate konnten direkt für *In-Situ*-Hybridisierung verwendet oder bei -20°C in Methanol zur Lagerung eingefroren werden. Alle Präparationsschritte fanden unter einer Stereolupe statt.

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines einprozentigen Agarosegels wurden 0,5 g Agarose in 50 ml 1x Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) erhitzt. Nach der Auflösung der Agarose und vor dem Gelieren wurde 0,5 µl kanzerogene Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) unter streng eingehaltenen Sicherheitsbestimmungen und Vorsichtsmaßnahmen hinzugegeben. Die 5 µl der Probe, die mit 1 µl 6x-Loading-Dye-Lösung versetzt sind, wurden auf das Gel in dem Laufpuffer 1xTAE aufgetragen. Die Elektrophorese kam durch das elektrische Feld von 50 V zustande. Anschließend wurde die Verteilung der Proben im Gel durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Mit Hilfe eines Komigrationsstandards kann die Länge der Fragmente der Probe geschätzt werden. Hierfür werden neben der Probe unterschiedlich lange RNA- oder DNA-Fragmente aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde zum Nachweis einer erfolgreichen RNA-Extraktion (2.4), einer erfolgreichen Amplifikation (2.7), eines korrekten Klonierens nach dem Restriktionsverdau (2.9) und der Sonde (2.10) durchgeführt.

2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben

Mit dem Photometer wurde die Konzentration von DNA- und RNA-Proben bestimmt. Auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes kann über die Ermittlung der Extinktion der Lösung bei Bekanntheit der Schichtdicke der Küvette und der molaren Extinktionskoeffizienten die Konzentration bestimmt werden. Die Messung bei Konzentrationsbestimmungen von DNA- und RNA-Proben muss bei monochromatischem Licht der Wellenlänge 260 nm erfolgen, dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren. Außerdem sollte die Verdünnung der Lösung so ausgewählt werden, dass die Extinktion zwischen 0,1 und 1 liegt, um die beste Funktionsfähigkeit der Formel zu erreichen. Zur Eichung des Photome-

ters und zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wurde eine Reinprobe des Lösungspuffers verwendet.

2.4 RNA-Präparation

Für die RNA-Extraktion wurden 20 Embryonen der Stadien 0 bis 3 ausgewählt. Die Daten aus den Hühner-Embryonen ließen vermuten, dass die untersuchten Gene während dieser Stadien im Kaninchenembryo deutlich exprimiert waren, entsprechend viel RNA von diesen Genen extrahiert und somit eine gute Grundlage für eine Amplifikation der Gene gelegt werden konnte. Mit der hohen Stückzahl von 20 Embryonen sollte der Einfluss von möglichen Pathologien minimiert werden. Das Protokoll des *Rneasy*® *Mini-Kit* zur Gewinnung der RNA aus den Zellen musste an das Gewicht des embryonalen Gewebes angepasst werden. Um den Abbau der RNA durch RNasen zu verhindern, war der Arbeitsplatz explizit von RNasen sauber zu halten, wie zum Beispiel durch Verwendung von Einmalmaterialien. Der Nachweis einer erfolgreichen RNA-Extraktion erfolgte quantitativ durch die Bestimmung der RNA-Konzentration mit Hilfe eines Photometers (s.2.1.4) und qualitativ durch die Kontroll-Elektrophorese (s.2.1.3).

2.5 Reverse Transkription

Die Umwandlung der RNA in cDNA ermöglichte eine sichere Lagerung und bessere Amplifikation der transkribierten Bestandteile des Kaninchengenoms für den Zeitraum des Klonierens. Für den ersten Schritt der reversen Transkription wurden 5 µg der RNA, der Oligo-dT-Primer CDSIIA und 12 µl *Diethylpyrocarbonat* (DPEC) H₂O für 5 Min. bei 70°C im *thermocycler* inkubiert. Der Primer band an den *Poly-A*-Schwanz der RNA-Ketten, so dass die *reverse* Transkriptase diese dann in den komplementären cDNA-Strang übersetzte. Während der Hinzugabe von 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl Ribonuklease Inhibitor (20 U/µl), 2 µl 10 mM Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP) Mix wurde der Ansatz auf Eis zwischengelagert. Nach einer Inkubation bei 37°C im *thermocycler* für 5 Min. wurde 1 µl (200 U) *reverse* Transkriptase hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde im *thermocycler* bei 42°C für 60 Min. inkubiert. Das Erhitzen auf 70°C für 10 Min. beendete die Reaktion. Bis zur Verwendung für die Polymerasekettenreaktion (englisch: *polymerase chain reaction*, PCR) wurde das Reaktionsprodukt bei -20°C gelagert.

2.6 Primer für die Amplifikation

Die Sequenz des zu amplifizierenden Gens wurde mit Hilfe der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.gov/gene/) in das Computerprogramm *A plasmid Editor* (ApE) übertragen und anschließend analysiert. So wurde zum Beispiel der offene Leserahmen (*open reading frame*) markiert. Außerdem sollten die Introns nicht übertragen werden. Bei Genen, von denen die Sequenzen noch nicht be-

kannt waren, wurde ein Alignment mit Hilfe der Anwendungen vom European Molecular Biology Laboratory und vom NCBI zwischen möglichst vielen und nah verwandten Tieren erstellt, Bereiche mit hohen Homologien erkannt und in dieser Region ein Primer entwickelt: Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren die Sequenzen von den Genen *LASS1* und *VG1* im Genom vom Kaninchen unbekannt. Bereits komplett sequenzierte Genome anderer Spezies ermöglichten ein Alignment der bekannten Gensequenzen von diesen Genen und somit die Untersuchung auf evolutionär konservierte Bereiche im offenem Leserahmen. Die Tiere, die zum Vergleich ausgewählt wurden, wurden nach dem Vorhanden-Sein des Genoms und der Klassen-Zugehörigkeit ausgewählt. Somit sollte durch die Auswahl von Arten aus unterschiedlichen Klassen ein konservierter Bereich der Gensequenz deutlich werden. Eine starke Gewichtung von Säugetieren sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass ein Abschnitt mit hoher Übereinstimmung zwischen den verglichenen Lebewesen auch dem Abschnitt des Kaninchens sehr ähnlich sein würde. Die für die Forschung beim Huhn benutzte Gensequenz war als Referenz gedacht. Die Abschnitte mit hoher Übereinstimmung sollten als Grundlage für das Entwerfen der Primer dienen. Dabei mussten die Anzahl der übereinstimmenden Nukleinbasen in den ausgewählten Arten und die phylogenetische Verwandtschaft der jeweiligen Arten mit dem Kaninchen bei der Entscheidung über die jeweiligen Nukleinbasen der Primer gegeneinander abgewogen oder berücksichtigt werden. Im Vergleich der *LASS1*-Gensequenzen von Eichhörnchen, Ratte, Beutelratte, Pferd, Rind, Meerschweinchen, Frosch und Huhn konnte ein hoch konservierter Bereich ausfindig gemacht werden und zwei *forward* Primer und ein *reverse* Primer konnten entwickelt werden. Zur Analyse der *VG1* Gensequenz wurden Maus, Wildschwein, Weißbüschelaffe, Dreizehnstreifen-Hörnchen, Beutelratte, Frosch und Huhn ausgewählt. Da sich in den Abschnitten mit hoher Übereinstimmung trotzdem einige Basen unterschieden, bot sich das Entwickeln von degenerierten Primern an. Unter degenerierten Primern ist ein Primer-Gemisch zu verstehen, das Primer mit unterschiedlichen Nukleinbasen beinhaltet. Somit werden verschiedene Varianten des Abschnittes mit hoher Übereinstimmung benutzt und die Wahrscheinlichkeit einer passenden Variante zur Sequenz im Kaninchen erhöht. Bei einer PCR mit einem degenerativen Primer-Paar werden also gleich mehrere mögliche Sequenzen als Bindungsstellen getestet. Durch weitere Primer (*nested* PCR, s.2.1.8) kann die Spezifität erhöht werden.

Der Abstand zwischen zwei Primern sollte nicht unter 200 Basenpaaren liegen, um den Bau einer guten Sonde zu ermöglichen. Ebenso sollte bei der Wahl der Primer-Sequenz eine möglichst spezifische Sequenz für das Gen gefunden werden. Zur Testung einer spezifischen Bindung der Primer während der später durchzuführenden PCR wurde ein Alignment mit dem bekannten Genom des Kaninchens durchgeführt. Dabei sollten die Primer nicht komplementär zu anderen Bereichen des Genoms sein, um keine unspezifischen Amplifikate zu produzieren. Die Sequenz zwischen den Primern wurde auch auf mögliche weitere Übereinstimmung mit anderen Sequenzen im Genom des Kaninchens getestet, um

unspezifische Bindungen der Sonde mit anderer mRNA während der *In-Situ*-Hybridisierung zu verhindern. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Primersequenz war der GC-Gehalt, der nicht zu hoch sein durfte. Auch musste die Länge der Primer beachtet werden. In Abhängigkeit zur Primer-Länge steigt die Schmelztemperatur der Primer. Damit die PCR gut funktioniert, sollte die Schmelztemperatur bis zu 20°C unter der Temperatur im Elongationszyklus liegen. Auch sollten die Schmelztemperaturen beider Primer in einer der PCR nicht mehr als 5°C abweichen. Mit der Wallace-Regel konnte die Schmelztemperatur (T_M) vorhergesagt werden $T_M = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (G+C)$.

2.7 PCR für die Amplifikation

Die PCR war ein Verfahren zur Amplifikation eines meistens durch ein Primer-Paar bestimmten Abschnittes der DNA. Die entworfenen und hergestellten Primer (7.1.9) wurden zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{Mol}/\mu\text{l}$ in autoklaviertem Wasser verdünnt. Von den jeweiligen Primern des Primer-Paares wurden 1 μl , von dem cDNA-Ansatz der *reverse* Transkription 1 μl , zur Stabilisierung der cDNA 25 mM MgCl₂ 1 μl , vom Puffer 5x (NH₄)₂SO₄ 5 μl und von der Polymerase Taq 0,25 μl mit H₂O bidest auf 25 μl aufgefüllt und gemischt. Es wurde auf Eis gearbeitet. Die Elongationsphase musste an die Länge des Amplifikats angepasst sein (30 Sekunden pro 500 Basen). Mit der *annealing* Temperatur kann die Spezifität der Primerbindung in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur beeinflusst werden. Je niedriger die Temperatur gewählt wurde, desto unspezifischer band der Primer an die cDNA. Dies konnte bei der verschachtelten PCR vorteilhaft sein. Wurde die Temperatur dagegen zu hoch gewählt, band der Primer nicht an die cDNA. Beide Primer sollten so ausgewählt werden, dass die perfekte *annealing* Temperatur (5-10°C unter der Schmelztemperatur) bei ihnen ähnlich ist.

Unter einer verschachtelten PCR (*nested* PCR) war eine Abwandlung des Standardverfahrens zu verstehen, bei dem mehrere, häufig degenerative Primer-Paare bei der Amplifikation zum Einsatz kommen und somit die Spezifität erhöhen. Der zu amplifizierende Bereich wurde durch ein äußeres und ein inneres Primer-Paar begrenzt. Die am weitesten außen liegenden Primer wurden für die erste PCR ausgewählt. Das Ergebnis nach Aufreinigung wurde für die nächste PCR mit dem nächstliegenden inneren Primer-Paar verwendet. Die nun gewonnen Amplifikate waren somit durch einen zweistufigen Prozess gelaufen und somit besonders spezifisch.

Tabelle 2: Standard PCR-Protokoll

Denaturierung	95°C für 1 Min.
Denaturierung	95°C für 30 Sek.

<i>Annealing</i>	60°C für 1 Min.
<i>Elongation</i> (insgesamt 40 Zyklen)	68°C für 3 Min.
Nachelongation	68°C für 7 Min.

Als Kontrolle der PCR wurde das *housekeeping* Gen *GAPDH*, ein Enzym für Glykolyse, jeweils mitamplifiziert. Als *housekeeping* gen war *GAPDH* definitionsgemäß in jedem Genom einer Zelle und dabei sogar wegen der hohen Syntheserate in einem transkribierten Zustand, sodass es aus der verwendeten cDNA Probe amplifizierbar sein sollte. Insofern eignete es sich sowohl zur Kontrolle der cDNA als auch zur Kontrolle der PCRs.

2.8 Aufbereitung des Ergebnisses der PCR durch Elektrophorese

Aufgrund unspezifischer Bindung der Primer und möglicher Kontaminationen wurde eine Agarose-Elektrophorese durchgeführt. In dem Agarosegel ordneten sich die cDNA-Fragmente aufgrund des elektrischen Feldes und der Beschaffenheit des Gels der Größe nach in Banden an, die durch UV-Strahlen sichtbar wurden. Bei der Übereinstimmung der Größe eines Fragments mit der theoretisch ermittelten Größe des gewünschten Amplifikats erfolgte dessen Exzision aus dem Gel mit Hilfe des Skalpells. Im Eppendorf-Gefäß wurde die cDNA extrahiert. Das Herstellerprotokoll für DNA-Gelextraktion des *Nucleo-Spin® Extract-Kit* wurde modifiziert in Abhängigkeit des Gewichts des mit dem Amplifikat zusammen herausgeschnittenen Gels. Deswegen wurde die Konzentration des gelösten Amplifikats ermittelt. Sowohl beim Kontakt mit dem UV-Licht als auch mit Ethidiumbromid wurden entsprechende Sicherheitsvorkehrungen eingehalten.

2.9 Ligation, Transformation und Klonierung von cDNA-Fragmenten

Zur Ligation des Amplifikats in das Plasmid *pGEM T-Easy* (Promega), das als Vektorsystem genutzt wurde, wurde folgender Ligationsansatz dem *ligationskit* entsprechend zusammengestellt:

5 µl 2x Ligationspuffer

1 µl *T-Easy Vektor* (50ng)

1 µl T4-DNA-Ligase (3 Weiss *units*)

150 ng vom Amplifikat (Insert 3:1 Vektor)

Auffüllung auf 10 µl mit H₂O bidestilliert

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Für eine erfolgreiche Transformation des Plasmids in die kompetenten *E. coli* Bakterium, die nach Douglas Hanahan benannten Stamm DH5 α , mussten die bei -80°C gelagerten, in 200 μ l Aliquots aufbereiteten Bakterien auf Eis aufgetaut werden. Hierfür wird *Super-Optimal-Broth*-Medium (SOB-Medium) verwendet. Nach Hinzugabe von 5 μ l des Ligationsansatzes erfolgte die 30-minütige Inkubation unter vorsichtigem, regelmäßigem Schütteln. Ein 90-Sekunden langer Hitzeschock bei 42°C ermöglichte eine bessere Aufnahme des Vektors, vermutlich durch Porenbildung der Membran. Im Anschluss erfolgte eine Kühlung auf Eis und dann eine Inkubation für 60 Min. bei 37°C. Die Zentrifugation bei 5000 G, das Abpipettieren des Überstandes und Resuspendieren des Sediments erhöhten die Konzentration der Bakterien.

Zur Überprüfung der Ligation des Amplifikats in den Vektor und der Transformation des Vektors in die kompetenten Bakterien wurde die Blau-Weiß-Selektion durchgeführt: Bei der Ligation des Amplifikats in das Plasmid wurde die Gensequenz der Beta-Galaktosidase unterbrochen, so dass keine Proteinbiosynthese der Beta-Galaktosidase nach der erfolgreichen Transformation des Plasmids in das Bakterium erfolgen konnte. Nach dem Auftragen der Bakterien auf eine Platte mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxly- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) konnte das X-Gal nicht zur Galaktose und zu 5-Brom-4-Chlor-Indoxl aufgrund der fehlenden Beta-Galaktosidase-Aktivität in den Bakterien abgebaut werden. Somit blieb auch die Färbung der Bakterienkolonie durch Oxidation von 5-Brom-4-Chlor-Indoxl zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo während der Inkubation bei 37°C über Nacht aus. Bakterienkolonien mit erfolgreicher Ligation und Transformation nahmen also keine Färbung an und waren als weiße Kolonien auf den Platten erkennbar. Von jeder Platte wurden jeweils bis zu sechs weiße Kolonien mit einer sterilisierten Nadel in mit 2 ml *lysogeny-broth*-Flüssigmedium (LB-Medium) versehene Röhrchen gesetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator angezüchtet. Die Plasmide wurden gemäß des Herstellerprotokolls des *Qiagen® Plasmid Purification Kits* extrahiert. Zur Ermittlung der späteren Einsendemenge für die Sequenzierungen an die Firma MWG Biotech AG (Martinsried) musste die Konzentration photometrisch ermittelt werden. Als eigene (Vor-)Kontrolle wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Hierfür wurde mit Hilfe einer passenden Endonuklease, meistens *EcoR1*, das Plasmid in Fragmente zerlegt. Die Endonukleasen setzten an einer bestimmten Erkennungssequenz an. Folglich konnten die Längen der Fragmente vorher theoretisch ermittelt werden. Bei zahlreichen oder zu kurzen Fragmenten aufgrund multiplexer Erkennungssequenzen im Plasmid sollte auf eine andere Endonuklease mit entsprechendem Herstellerprotokoll ausgewichen werden. Im Normalfall sollten nach dem Restriktionsverdau und der Kontrollelektrophorese zwei Banden, eine auf der Höhe der entsprechenden und erwarteten Insert-Größe und eine auf der Höhe der Größe des restlichen Plasmids zu finden sein. Die Restriktionsverdau war wie folgt durchzuführen:

2 µg Plasmid DNA
4 µg Tango Puffer
13 µl H₂O bidestilliert
1 µl *Eco*R1 (10U) bzw. eine andere Endonuklease
Inkubation im *thermocycler* für 1 h bei 37°C

2.10 Herstellung einer cRNA-Sonde

Die Sequenzierung bestimmte auch die Position und Orientierung des Inserts im Vektor und somit auch nachfolgend zusammen mit der für die In-Vitro-Transkription wichtigen Lage der Promotorsequenzen den geeigneten Primer für die PCR. Der PCR-Ansatz bestand aus 100 µl, die sich aus 10 µl 10x Puffer, 2 µl dNTPs (0,2mM), 2 µl SP6 Primer (10 pM) oder 2 µl T7 Primer (10pM), 8 µl MgCl₂ (2mM), 100 ng Plasmid-DNA, 0,5 µl Taq Polymerase (1,25 U) und H₂O bidest zusammensetzen. Die Abläufe der PCR waren wie folgt: Denaturierung (95°C für 1 Min.), 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°C für 15 Sek.), *annealing* (59°C für 30 Sek.), *elongation* (68°C für 1 Min.) und am Ende eine 7 minütige *elongation* bei 68°C. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin® Extract-Kit“. Zur Vorbereitung der *In-Vitro*-Transkription wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Je nach Lage des Inserts fand eine SP6- oder eine T7-RNA-Polymerase Verwendung, so dass das am Ende gewonnene RNA-Template komplementär zur mRNA der gewünschten Sequenz war. Die Herstellung der cRNA-Sonde umfasste zwei Schritte: Für den ersten Schritt wurden ca. 200 ng des PCR-Amplifikats, 2 µl *DIG-RNA-Labeling-Mix*, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 2 µl RNA-Polymerase (20U/µl) mit DEPC H₂O zu 20 µl pipettiert. Nach Vortexen, Sedimentieren und zwei Stunden Inkubation bei 37°C im *thermocycler* erfolgte durch Zugabe von 7 µl DEPC H₂O, 1 µl DIG-NTPs, 1 µl 10x Transkriptionspuffer, 1 µl RNA-Polymerase, Vortexen, Sedimentieren und eine Stunde Inkubation bei 37°C im *thermocycler* der zweite Schritt. Zur Reinigung des Produktes wurde dies auf Eis ausgefällt.

30 µl Transkriptionsprodukt
1,5 µl 0,4 M Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)
3,75 µl 4 M LiCl₂
Vortexen
100 µl 100% Ethanol
Lagerung über Nacht bei -20°C
45-minütige Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (4°C) mit 15000 G
Addition von 50 µl DEPC H₂O

Addition von 5 μ l 4 M LiCl₂

Addition von 150 μ l 100% Ethanol

60-minütige Inkubation bei -20°C

30-minütige Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (4°C) mit 15000g

Auflösung des Pellet in 25 μ l DEPC H₂O

Zur Überprüfung der RNA-Sonde wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt: Die Länge der Sonden korrelierte mit der Länge des Amplifikats, ebenso bestand eine Korrelation der Intensität der Bande mit der Konzentration der Sonde. Die Sonde wurde bis zur Verwendung bei -20°C eingelagert. Die Sonde für *PITX2* und *NODAL* wurde uns dankenswerterweise zur Verfügung gestellt (Fischer et al. 2002).

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

Die Methode der *In-Situ*-Hybridisierung ermöglichte die Darstellung von Genexpressionen. Für die Anwendung im embryonalen Gewebe des Kaninchens wurde das Protokoll entsprechend der Erfahrung im Institut modifiziert (Weisheit, 2002; Püschel and Jouneau, 2014). Das Protokoll der *In-Situ*-Hybridisierung umfasste drei Tage. Am ersten Tag erfolgte die Andauung, Nachfixation und die Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten RNA-Sonde bei 70°C über Nacht. Der folgende Tag umfasste das Auswaschen der Sonde, Blockierung der unspezifischen Antikörperbindungsstellen mit Böhlinger *Blocking* Reagenz (BBR) und Ziegen Serum (NGS) sowie die Inkubation des Präparats mit den mit der alkalischen Phosphatase gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörpern über Nacht. Am dritten Tag erfolgte das Auswaschen des nichtgebundenen Antikörpers und der Beginn der anschließenden Farbreaktion durch die Zugabe von 2 ml Färbelösung BM-Purple®. Die Farbreaktion konnte drei Stunden bis mehrere Tage dauern. Die Intensität der Färbung hing von verschiedenen Faktoren wie der Sonde, dem Gewebe und der Zeit ab, sodass Rückschlüsse auf die Menge der mRNA im Gewebe nicht gezogen werden konnten. Es handelte sich also um ein qualitatives Verfahren. Für jedes Stadium und jede Gen-Sonde wurden jeweils mindestens drei Embryonen in verschiedenen Durchläufen von *In-Situ*-Hybridisierung untersucht.

Tabelle 3: 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	20 Min.	
2x PBT waschen	je 5 Min.	
50% Hybemix in PBT	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 <i>Maleic acid buffer containing tween 20</i> (MABT)	15 Min.	bei RT auf Schaukel
3x MABT	je 10 Sek.	
2x MABT	je 30 Sek.	
2% BBR in MABT	60 Min.	
2% BBR, 20% NGS in MABT	60 Min.	
2% BBR, 20% NGS, Anti-DIG-AK 1:2000 in MABT	über Nacht	im Kühlschrank (6°C)
Tag 3		
3x MABT	je 10 Sek.	bei RT auf Schaukel
7x MABT	je 60 Sek.	
4x NaCl, Tris, MgCl, Tween (NTMT)	je 10 Min.	
BM-Purple	3 Stunden bis 6 Tage	bei RT unter Lichtabschluss

In-Situ-Hybridisierung von *NODAL* und *PITX2* waren bereits im Institut durchgeführt, so dass lediglich die Anzahl von Embryonen zur Erhöhung der Stückzahl vervollständigt und die histologischen Schnitte angefertigt werden mussten.

2.12 Einbettung der Keimscheiben

Nach der *In-Situ*-Hybridisierung wurden die Embryonen auf einem Objektträger ausgebreitet, um die Genexpression zu analysieren und zu fotografieren. Hierfür wurden die Embryonen aus dem PBS auf dem Objektträger in einen 50 µl großer Tropfen Mowiol 4-88 mit Hilfe einer stumpfen Glaspipette platziert. Die Ausbreitung und richtige Lagerung

konnten mit Wolframnadeln durchgeführt werden. Für die Fotografie und die Begutachtung unter der Stereolupe musste das Präparat noch blasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt werden. Die Objektträger mit ihrem Präparat sollten im Kühlschrank (6°C) nur kurz gelagert werden, damit sich die Präparate noch gut vom Träger lösen ließen und die Einbettung in Technovit® noch möglich wäre. Die Präparate konnten durch ein 60-minütiges Bad der Objektträger in 90% Methanol von ihrem Deckglas befreit und mit Hilfe von Wolframnadeln aus dem Mowiol herausgelöst werden.

2.13 Einbettung der Keimscheiben zur histologischen Untersuchung

Um die Genexpression histologisch beurteilen zu können, musste das Präparat zum Schneiden vorbereitet werden. Hierfür wurde das Präparat in den Kunststoff Technovit 8100® eingebettet. Dieses sollte möglichst direkt nach der Herauslösung aus dem Mowiol erfolgen, weil das Präparat bereits ausgebreitet ist und dies die nachfolgenden Schritte vereinfacht. Das Präparat wurde zuerst für zwei Stunden in ein Infiltrationsmedium (50 ml Technovit® und Härter I) und danach in das finale Einbettungsmedium aus Infiltrationslösung und Härter II überführt. Mit Wolframnadeln wurde das Präparat entsprechend ausgerichtet. Für die finale Einbettung wurde eine Tablettenhülle verwendet, die mit durchsichtigen Folien luftblasenfrei abgedichtet wurde. Über Nacht erfolgte die Inkubation auf einem Kälteblock bei 4°C. Am nächsten Tag wurde der ausgehärtete Block entsprechend der Schnittachse getrimmt. Hierfür wurden zuerst der Block von dem umgebenden Plastik der Tablettenhülle befreit und durch ein warmes Wasserbad wieder erwärmt, so dass leichter durch den Technovit® geschnitten werden konnte. Erst nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 6°C und somit weiteren Härtung des Technovit® konnte mit dem Schneiden begonnen werden. Die Lufttemperatur und -feuchtigkeit hatten Auswirkungen auf die Elastizität des Blockes und konnten somit das Schneiden beeinflussen, so wurde der Block härter, je länger er ungekühlt Berührung mit der Umgebungsluft hatte. Nach dem Schneiden war der Ausbreitung der Schnitte auf einem Objektträger besondere Aufmerksamkeit zu widmen: Mit Hilfe dünner Nadeln mussten die Schnitte faltenfrei auf dem Objektträger ausgebreitet werden. Anschließend wurden die Objektträger auf einen Wärmeblock gelegt, um das 25%ige Ethanol, in das die Schnitte zur Ausbreitung auf dem Objektträger gelegt werden, verdampfen zu lassen. Anschließend konnten die Schnitte unter dem Lichtmikroskop analysiert werden. Besonders deutlich konnten die Zellen mit Hilfe des Differentialinterphasenkontrastes dargestellt werden.

2.14 Stadierung der Kaninchenembryonen

Beim Kaninchenembryo erfolgte die Einteilung der Stadien an Hand morphologischer Zeichen (Viebahn, 2004). Für eine bessere Beurteilung der makroskopischen Kriterien war eine Beurteilung im stereomikroskopischen Dunkelfeld (Abb. 4 A-D) zu empfehlen. Die erste Stadierung erfolgte direkt nach der Entnahme der Embryonen aus dem Uterus. Der

histologische Beweis wurde zusammen mit der histologischen Analyse der Expressionsmuster erbracht. Das Fehlen einer morphologischen Polarität der a.-p. Achse definierte das Stadium 0. Der Rand der Keimscheibe war unregelmäßig und unscharf vom extraembryonalen Gewebe abgetrennt (Abb. 4A). Das Stadium 1 (Abb. 4B) war morphologisch durch einen scharf abgrenzbaren Rand der Keimscheibe zum extraembryonalen Gewebe definiert. Ebenso ließ sich eine höhere Dichte der Zellen in einem Drittel der Keimscheibe feststellen. In diesem Bereich lagen auch kubische Zellen im Hypoblast vor. Durch die Untersuchung nachfolgender Stadien ließ sich beweisen, dass diese Anzeichen für eine anteriore Differenzierung stehen. Dies Zeichen wurde AMC genannt (Viebahn, 1999, 2004). Im Stadium 2 (Abb. 4C) verlängerte sich die Keimscheibe am posterioren Pol. Dem AMC gegenüber entwickelte sich ein zellärmerer Bereich, der PGE genannt wurde und das Stadium 2 (Abb. 4C) definierte. Histologisch war der PGE durch kubische Epiblastzellen erkennbar. Stadium 3 (Abb. 4D) war definiert durch das Auftreten der ersten mesodermalen Zellen. Diese befanden sich hauptsächlich auf der medianen Sagittalachse im posterioren Teil der Keimscheibe. Die Bildung der Mesodermzellen erfolgte durch die epitheliale-mesenchymale Transition. Durch die Zellbewegungen im Rahmen der epitheliale-mesenchymalen Transition entstand makroskopisch das Bild eines Primitivstreifens. Im Stadium 4 erreichte der Primitivstreifen seine maximale Ausdehnung mit einer Verdickung an seiner anterioren Spitze, dem Primitivknoten.

3 Ergebnisse

Im Ergebnisteil werden zunächst die Ergebnisse von der Amplifikation von Genabschnitten aus den entsprechenden Genen präsentiert und dann die Expressionsmuster beschreiben.

3.1 Amplifikation der entsprechenden Genabschnitte

Erfolgreich amplifizierte Genabschnitte konnten aus den Genen von *DENND5B*, *ELK3*, *EOMES*, *GAPDH*, *ID3*, *LASS1*, *LITAF*, *LRP2*, *PKDCC*, *SALL1*, *SPOCK3* und *TBX6* gewonnen werden. Aufgrund der Amplifikation aus der cDNA vom Kaninchen der Stadien 0-3 müssen diese Gene in den frühen Stadien exprimiert seien. Da die Sonden für *NODAL* und *PITX2* dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurden (Fischer et al. 2002), musste der Nachweis einer Expression von diesen Genen zu diesem frühen Zeitpunkt durch die Durchführung von *In-Situ*-Hybridisierungen erfolgen. Ein Genabschnitt von *VG1* konnte nicht amplifiziert werden.

Tabelle 4: Übereinstimmungsrate der amplifizierten Gensequenzen

Gen	Variante	Übereinstimmungsrate mit der pub. GS (in %)	Amplifizierter Bereich aus der pub. GS (in bp)	Länge (in bp)	NCBI-Referenz
<i>DENND5B</i>		99	1623. – 2615.	992	XM_008259434.1
<i>ELK3</i>	1	99	269. – 1149.	880	XM_002711213.2
	2	99	269. – 1050.	781	XM_008256916.1
<i>EOMES</i>	1	99	31. – 980.	949	XR_518364.1
	2	99	20. – 921.	901	XM_008266083.1
	3	99	189. – 1138.	949	XM_008266084.1
	4	99	168. – 718.	550	XM_008266085.1
<i>ID3</i>		99	47. – 633.	586	XM_002715985.2
<i>LASS1</i>	1 Sch	84	583. – 985.	402	XM_003123535.5
	2 Sch	84	587. – 985.	398	XM_003123535.5
	3 Sch	84	857. – 1259.	402	XM_005652922.2
<i>LITAF</i>	1	97	87. – 765.	678	XM_008257723.1
	2	99	13. – 817.	804	XM_008257724.1
	3	97	316. – 993.	677	XM_002711751.2
<i>LRP2</i>		99	13051. – 14057.	1006	XM_008258707.1
<i>PKDCC</i>		99	233. – 1040.	817	XM_008254480.1
<i>SALL1</i>		99	50. – 3185	3135	XM_008257291.1
<i>SPOCK3</i>		99	688. – 1663.	975	XM_008249486.1
<i>TBX6</i>	1	99	2147.-2393.	246	XM_008257944.1
	2	99	2074. -2320.	246	XM_002711872.2

Die Tabelle 4 zeigt die erfolgreich amplifizierten Gene vom Kaninchen, ihre Übereinstimmungsrate mit den publizierten Gensequenzen (pub. GS) der jeweiligen Transkriptvarianten vom Kaninchen oder bei *LASS1* aufgrund der unbekanntenen Gensequenz vom Schwein (Sch), die mit ihren Referenzen vom Nationalen Zent-

rum für Biotechnologieinformation (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA) angegeben sind. Außerdem wird die Länge des übereinstimmenden Bereichs angegeben sowie der Abschnitt des amplifizierten Bereichs mit der vorderen und hinteren Basenposition.

3.2 Expressionsmuster der untersuchten Gene

Im Folgendem werden die Expressionsmuster von den untersuchten Genen beschrieben und gezeigt. Die Reihenfolge der Präsentation orientiert sich an dem frühesten Zeichen eines deutlichen achsenspezifischen Musters. Auf eine Darstellung der Gene *DENND5B*, *LASS1*, *LITAF* und *LRP2* wird aufgrund eines fehlenden achsenspezifischen Musters während der Achsenbildung verzichtet.

3.2.1 *NODAL*

Die Embryonen der Stadien 0 bis 3 weisen alle ein für sich typisches Expressionsmuster von *NODAL* auf (Abb.2). Im frühen Stadium 0 ($n=3$) weist die Keimschreibe ein an ein Mosaik erinnerndes Muster mit unterschiedlich starker Intensität auf (Abb. 2A und F). Die Schnitte zeigen eine Expression im polaren Trophoblast (Rauber Zellen), im Epiblast und Hypoblast (Abb. 2K). Stark gefärbte Epiblastzellen liegen neben fast negativ gefärbten Zellen (e und e', Abb. 2L). In der weiteren Entwicklung innerhalb des Stadiums 0 bildet sich ein etwas schwächerer und ein etwas stärker gefärbter Pol an der Keimschreibe aus, wobei das Muster weiterhin an ein Mosaik erinnert (Abb. 2B, G und M). Dabei hat das Expressionsmuster durch die stärkere Intensität der Expression am Rand als im Zentrum mit den unterschiedlich stark gefärbten Polen eine Assoziation mit einer zum schwächer gefärbten Pol hin offenen Sichel. In den Schnitten zeigt sich, dass der Epiblast und Hypoblast an einem Pol der Keimschreibe schwächer gefärbt ist (Abb. 2N) als am gegenüberliegenden Pol (Abb. 2O).

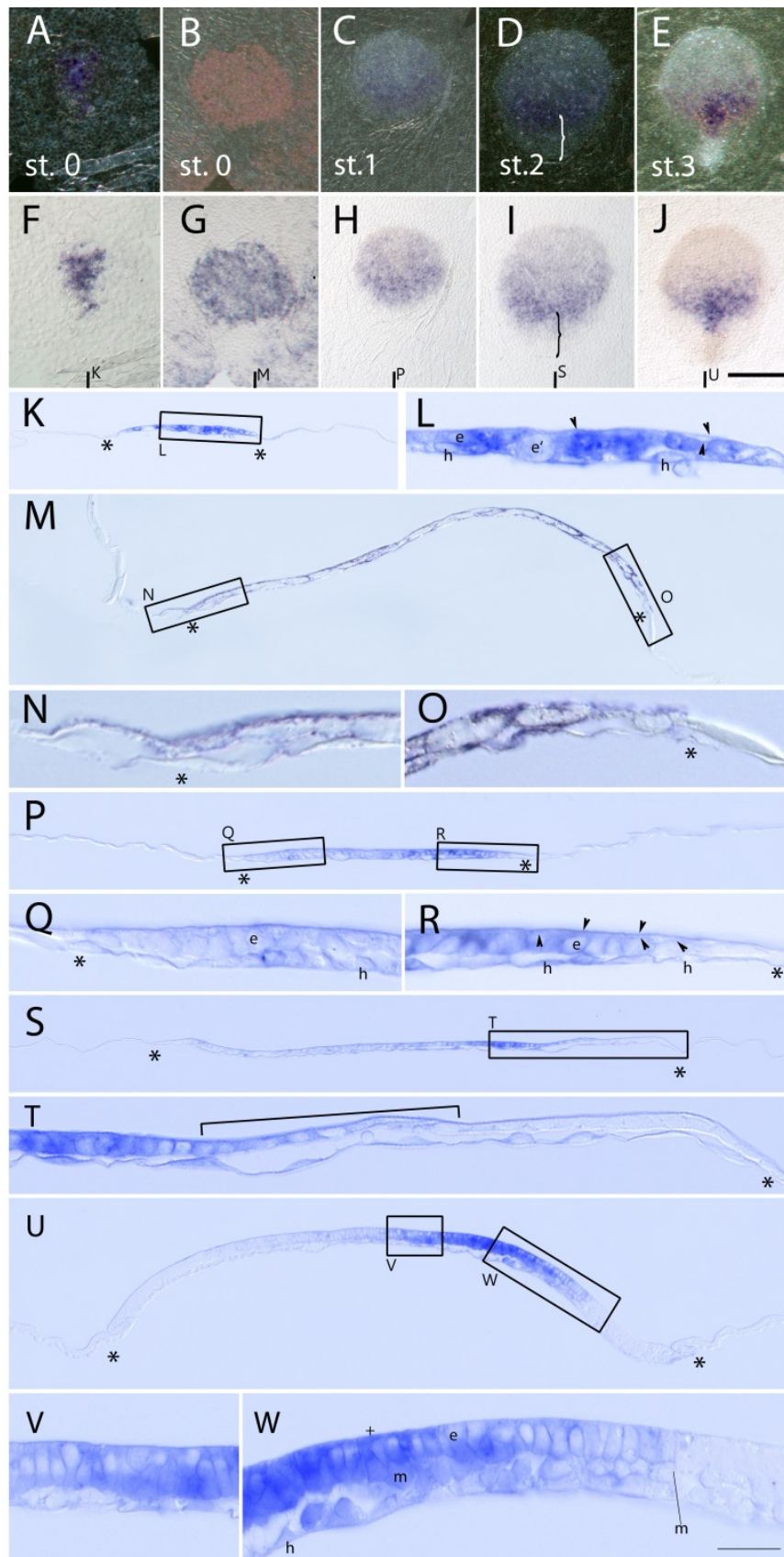
Abbildung 2: Expressionsmuster von *NODAL*

Abb. 2: *NODAL* Expression in den dorsalen Aufsichten (A-J) und in Technovit® Schnitten (K-W) der Keimscheiben und dem umgebenden extraembryonalem Gewebe des Kaninchens der Stadien 0-3 (5.2-6.5 dpf) nach *In-Situ*-Hybridisierung im Dunkelfeld (A-E) und im Hellfeld (F-W). Mit Buchstaben markierte Striche zeigen die Lage der sagittalen Schnitte innerhalb der gezeigten Keimscheibe (E-H). Die vergrößerten Bereiche der Schnitte sind durch Rechtecke markiert und durch Buchstaben zuzuordnen. Der anteriore Pol ist nach oben in den Aufsichten (A-J) oder zur linken Seite in den Schnitten (K-W) ausgerichtet. Die Stadien sind durch arabische Ziffern kenntlich gemacht. Die gebogene Klammer (D und I) zeigt in den Aufsichten, die eckige Kammer in den Schnitten (T) den PGE an. Die Rauber Zellen sind durch schwarze Pfeilköpfe (L und Q), die Flaschenzellen durch ein Plus (W) und die Grenzen der Keimscheiben durch einen Stern markiert (K, M-U). M: mesoderm, e: epiblast, e': schwach gefärbte Epiblastzelle, h: hypoblast. Der Schnitt in U ist von einem anderen Embryo ähnlich zu dem gezeigten (E und J). Maßstab (J) für die Aufsicht: 200 μm (A und F), 400 μm (B-D, G-I), 640 μm (E und J). Maßstab (W) für die Schnitte: 100 μm (P,S und U), 50 μm (K und M), 25 μm (Q-R, T, V-W), 12 (L, N und O). (Plöger und Viebahn 2018). Die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Elsevier®.

Auch im Stadium 1 (n=4) zeigt sich eine deutlichere ungleiche Verteilung der Färbung (Abb. 2Q) als im Stadium 0. Durch die Betrachtung der Dichte im Dunkelfeld, der Analyse des Keimscheibenrandes und der histologischen Untersuchung kann der anteriore Pol als der schwach gefärbte Pol bestimmt werden. Die *NODAL* Expression ist begrenzt auf eine breite sichelförmige Domäne in der posterioren Hälfte der Keimscheibe (Abb. 2C und H). Alle Schichten sind in dieser Domäne stark gefärbt (Abb. 2R), während nur vereinzelt Hypoblastzellen im AMC schwach gefärbt sind (Abb. 2Q).

Im Stadium 2 (n=4) zeigt die *NODAL* Expression ebenfalls eine Sichelform (Abb. 2I). Diese ist aber durch einen negativ gefärbten Bereich vom posterioren Rand der Keimscheibe getrennt. Histologisch zeigt sich eine zunehmende Färbung vom Zentrum der Keimscheibe zum sichelförmigen, stark gefärbten Bereich der Keimscheibe (Abb. 1S). Die kuboidalen Epiblastzellen, Merkmal des PGE, sind im posterioren Teil der Expressionsdomäne zu finden (Abb. 2T). Somit besteht die sichelförmige Domäne aus dem anterioren Teil des PGE und den posterioren Zellen des anterioren Teils der Keimscheibe.

Im Stadium 3 (n=4) hat die sichelförmige *NODAL* Domäne eine besonders starke Intensität in dem Bereich des vorderen Primitivstreifens angenommen. Durch die Elongation des PGE vergrößerte sich der Abstand zwischen der Expressionsdomäne und dem posterioren Rand der Keimscheibe. In einigen Embryonen zeigt sich eine Asymmetrie der Sichel: Sowohl auf der rechten als auch auf der linken Seite konnte eine schwächere Färbung als im Zentrum der Sichel und der entsprechenden anderen Seite – auch histologisch in transversalen Schnitten nachweisbar (hier nicht gezeigt) - festgestellt werden (Abb. 2E und J).

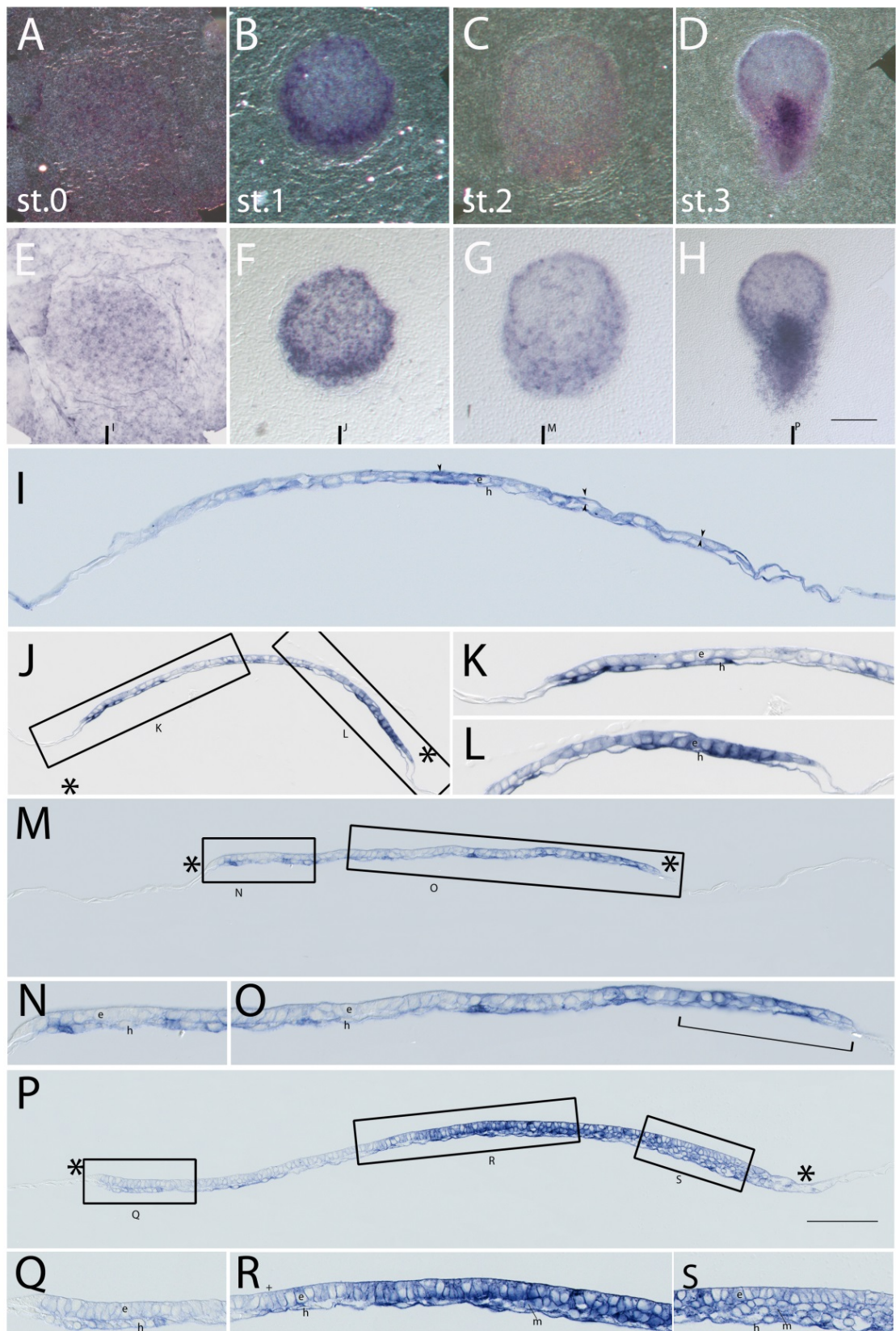
Abbildung 3: Expressionsmuster von *EOMES*

Abb. 3: *EOMES* Expression in den dorsalen Aufsichten (A-H) und im Technovit® Schnitten (I-S) im Dunkelfeld (A-D) und im Hellfeld (E-S). Die eckige Klammer (O) zeigt den PGE an. Sonstige Symbole und Hinweise zur Abbildung sind aus den Legenden (s. oben) zu entnehmen. Maßstab (H) für die Aufsicht: 150 μm (A und E); 330 μm (B-D, F-H). Maßstab (P) für die Schnitte: 100 μm (I, K-L, N-O, Q-S), 200 μm (J, M, P).

In den sagittalen Schnitten zeigte sich die positive Färbung von Epiblastzellen, Flaschenzellen und Mesodermzellen im Bereich der sichelförmigen Domäne (Abb. 2V und W). Wie bei Stadium 2 ist eine Expression mit einer schwachen Intensität ab dem Zentrum der Keimscheibe mit Zunahme bis zu Expressionsdomäne im Epiblast zu beobachten (Abb. 2U).

3.2.2 *EOMES*

Die Embryonen nach *In-Situ*-Hybridisation mit einer *EOMES* Sonde zeigen ebenso ein spezifisches Expressionsmuster. Im Stadium 0 (n=3) zeigt sich ein an ein Mosaik erinnerndes Expressionsmuster in der Keimscheibe (Abb. 3A und E). Diese Musterung ist auch im extraembryonalen Gewebe erkennbar. Alle drei Schichten der Keimscheiben variieren in der Intensität (Abb. 3I).

Im Stadium 1 (n=4) ist die Expression auf die Keimscheibe begrenzt. Das Expressionsmuster erinnert wie im Stadium 0 an ein Mosaik, wobei der Rand der Keimscheibe eine eher durchgehende Expression aufweist (Abb. 3B und F). Diese an einen Ring erinnernde Expression am Rand ist am posterioren Pol breiter als am anterioren. Im Schnitt zeigt sich eine starke Färbung der anterioren Hypoblastzellen (Abb. 3K). Im Zentrum der Keimscheibe (Abb. 3J) sind abwechselnd schwach und stark gefärbte Hypo- und Epiblastzellen verantwortlich für das Muster. Beide Zellschichten sind in der posterioren Bereich der Keimscheibe stark gefärbt (Abb. 3L).

Im Stadium 2 (n=4) zeigt sich die *EOMES* Expression wieder als ringförmiges Muster. Am posterioren Pol ist die Expressionsdomäne so breit, dass der ganze PGE eine Expression von *eomes* aufweist (Abb. 3C und G). Im Vergleich zu Stadium 1 ist das dem Mosaik ähnlichem Muster im Innenring einer Expression von einzelnen Hypoblastzellen gewichen (Abb. 3M). Die anteriore Teil des Rings kommt ebenfalls durch anteriore Hypoblastzellen zustande (Abb. 3N). Im PGE exprimieren Epiblast- und Hypoblastzellen deutlich *eomes* (Abb. 3O).

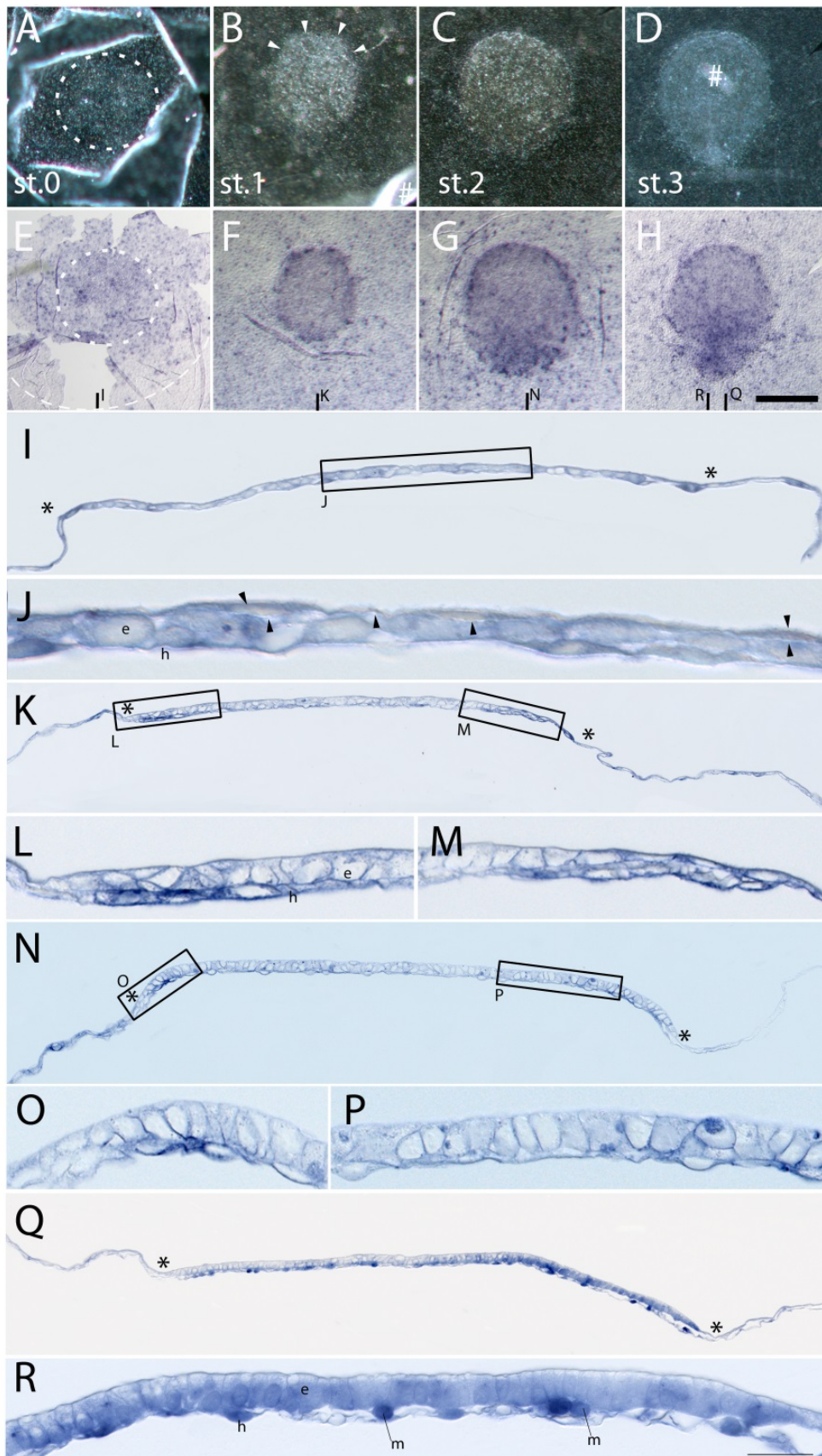
Abbildung 4: Expressionsmuster von *PITX2*

Abb.4: *PITX2* Expression in den dorsalen Aufsichten im Hellfeld (E-H), mit den entsprechenden Embryonen vor *In-Situ*-Hybridisierung im Dunkelfeld (A-D) und Technovit® Schnitten (I-R). Die gepunktete Linie (A und E) markiert konzentrisch die Keimscheibe im Stadium 0, die weiße gestrichelte Linie markiert den Äquator der ausgebreiteten Blastozyste unter dem Deckglas. Der scharfe, vordere Rand der Keimscheibe wird durch die Pfeilköpfe (B) angedeutet. Das Raute-Zeichen markiert Artefakte. Sonstige Symbole und Hinweise zur Abbildung sind aus der Legende von Abb. 2 zu entnehmen. Maßstab für die Aufsicht: 400 μm (A und E), 350 μm (B bis D und F bis H); 340 μm (C und G); 320 μm (D und H); Maßstab für die Schnitte: 50 μm (I); 12 μm (J); 100 μm (K,N and Q); 25 μm (L,M,O,P and R). (Plöger und Viebahn 2018). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier®.

Im Stadium 3 zeigt *EOMES* eine starke Expressionsdomäne, die an eine Y-Form mit Schwerpunkt auf der anterioren Spitze des Primitivstreifens erinnert. Der gesamte Primitivstreifen wie die lateralen Ränder der anterioren Keimscheibe zeigen eine starke Expression. Lateral des Primitivstreifens sowie im Zentrum des anterioren Teils der Keimscheibe findet sich ein gepunktetes Muster (Abb. 3D und H). Der anteriore Rand zeigt eine etwas stärkere Expression im Hypoblast als im Epiblast (Abb. 3P). Bereits mit den anteriorsten Flaschenzellen (Abb. 3Q) nimmt die Intensität von *EOMES* nach posterior zu und erreicht auf der Höhe der am weitesten anterior liegenden Mesodermzellen die höchste Intensität. Alle drei Zellschichten sind stark gefärbt (Abb. 3R). Im posterioren Teil des Primitivstreifens sind alle Zellschichten etwas schwächer gefärbt (Abb. 3S).

3.2.3 *PITX2*

PITX2 ist exprimiert in allen vier untersuchten Stadien (0-3) mit einem unterschiedlichen Muster (Abb.4): Im Stadium 0 (n=10) ist *PITX2* schwach in der gesamten Keimschreibe des Embryos und im extraembryonalen Gewebe bis zum Äquator der Blastozyste (Abb. 4E) exprimiert. Die Expression verdichtet sich von einem an ein Mosaik erinnerndes Muster auf Höhe des Äquators zu einer durchgängigen Färbung in der Nähe der Keimscheibe. Distal des Äquators ist keine Expression von *PITX2* erkennbar. Die Technovit® Schnitte zeigen eine Expression in allen Schichten der Keimschreibe wie auch in dem gefärbten Teil des extraembryonalen Gewebes. (Abb. 4I). Das einem Mosaik ähnliche Muster auf Höhe des Äquators kann auch histologisch durch abwechselnd gefärbte und ungefärbte Zellen nachgewiesen werden. Die Verteilung der Expression in den Zellschichten ist an dieser Stelle der Blastozyste unregelmäßig (nicht gezeigt).

Im Stadium 1 (n=11) zeigen Zellen, die in der Peripherie der Keimscheibe gelegen sind, eine stärkere Intensität der Expression als die zentral in der Keimschreibe belegenden Zellen, so dass das Muster die Form eines Ringes andeutet. Am anterioren Pol sind diese Intensitätsunterschiede am deutlichsten, so dass sich der anteriore Pol innerhalb des ringförmigen Musters hervorhebt. Der Wechsel zwischen besonders gefärbten Zellen und schwach gefärbten Zellen am anterioren Rand der Keimscheibe sorgt für die Assoziation einer gestrichelten Linie. Während der weiteren Entwicklung des Stadiums 1 nimmt auch

die Expression von *PITX2* in den bisher wenig exprimierenden Zellen zu, sodass sich eine durchgezogene Linie entwickelt (nicht gezeigt). Im extraembryonalen Gewebe ist die nahe Umgebung der Keimscheibe gefärbt (Abb. 4F). Technovit® Schnitte bestätigen die Beobachtungen: Alle Schichten der Keimscheibe sind gefärbt, besonders der anteriore und posteriore Pol sind stärker gefärbt als die Zellen im Zentrum der Keimscheibe (Abb. 4K). Dabei sind die für den AMC typischen kubischen Zellen des Hypoblastes besonders stark gefärbt, wobei die vordersten ein bis zwei Zellen des kubischen Hypoblastes nicht oder nur leicht gefärbt sind (Abb. 4L). Die Intensität der Expression der vorderen Hypoblastzellen ist in den benachbarten Schnitten unterschiedlich und erklärt somit das an eine gestrichelte Linie erinnernde Muster in der Aufsicht. Am posterioren Pol (Abb. 4M) sind alle Schichten stark gefärbt und sorgen somit für die Assoziation mit einem Ring in der Aufsicht.

Stadium 2 (n=5) zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie im Stadium 1: Der Rand der Keimscheibe zeigt wieder eine ringförmige Expression. Die Expression im AMC setzt sich deutlicher von der Expression in dem restlichen anterioren Teil der Keimscheibe ab als am posterioren Rand, auch weil im PGE eine stärkere Expression als in der anterioren Teil der Keimscheibe vorliegt (Abb. 4G). Die Hypoblastzellen in der Peripherie der Keimscheibe weisen eine deutliche Intensität der *PITX2* Expression (Abb. 4O) auf. Im PGE zeigen die Epiblastzellen eine etwas stärkere Expression als anterior auf (Abb. 4N).

Im Stadium 3 (n=5) ist die anteriore Expression erhalten. Während im Zentrum des vorderen Teils der Keimscheibe die Expression schwach ist, ist sie in dem posterioren Teil des anterioren Teils der Keimscheibe und im PGE deutlich ausgeprägt. Ebenso deutet die starke Färbung auf der Mittellinie des PGE auf eine Korrelation mit dem Primitivstreifen hin. Das einem Mosaik ähnelnde Muster im extraembryonalen Gewebe ist wie im Stadium 2 zu erkennen. (Abb. 4D und H). Die Schnitte bestätigen das Muster in der Aufsicht: Schwach gefärbt ist der Epiblast, der anterior zu der Expressionsdomäne im posterioren Teil des anterioren Teils der Keimscheibe und im PGE liegt. In der Expressionsdomäne ist der Epiblast dagegen stark gefärbt. Der Hypoblast weist eine unregelmäßige Färbung auf, wobei die anterioren Hypoblastzellen immer gefärbt sind (Abb. 4Q). Alle Mesodermzellen sind positiv (Abb. 4R).

3.2.4 *ID3*

ID3 weist ein ringförmliches Expressionsmuster in den Stadien 0 bis 3 auf: Im Stadium 0 (n=3) ist ein breiter Rand der Keimscheibe gefärbt. Doch einzelne, stärker als die Nachbarzellen gefärbte Zellen sorgen für ein gepunktetes Muster (Abb. 5A und E). Die Schnitte zeigen eine unterschiedlich starke Expression in den fünf bis sieben an der Peripherie der Keimscheibe liegenden Epiblastzellen (Abb. 5I). Vereinzelt sind die extraembryonalen Zel-

len in unmittelbarer Nähe zur Keimscheibe noch positiv. Ansonsten ist das extraembryonale Gewebe negativ.

Dagegen weist das extraembryonale Gewebe im Stadium 1 (n=5) ein gepunktetes Muster auf, wobei der abembryonale Pol der Blastozyste keine Expression aufweist. Die Keimscheibe hat einen breiten, anterior etwas stärker als posterior gefärbten Rand (Abb. 5B und F). Die Histologie bestätigt den Eindruck der unterschiedlichen Breiten des ringförmigen Expressionsmuster: Der anteriore Pol (Abb. 5K) weist einen schmaleren gefärbten Bereich auf als der posteriore Pol (Abb. 5L). Sowohl die Zellen des Hypoblasts als auch des Epiblasts sind in der ringförmigen Expressionsdomäne positiv. Dabei sind die Zellen des Epiblasts anterior schwächer als posterior gefärbt.

Auch im Stadium 2 (n=4) ist die ringförmige Domäne erkennbar, aber mit deutlicheren Unterschieden der Ringbreiten als im Stadium 1 (Abb. 5C und G): Anterior besteht die Expression aus drei bis fünf stark positiven Hypoblast- und einigen schwach positiven Epiblastzellen (Abb. 5N). Posterior sind bis zu 12 Zellen positiv, wobei die Epiblastzellen deutlich stärker gefärbt sind als die Hypoblastzellen. Interessanterweise sind die am weitesten in der Peripherie der Keimscheibe liegenden Zellen besonders stark gefärbt (Abb. 5R). Die Färbung im extraembryonalen Gewebe hat abgenommen.

Das Stadium 3 (n=3) weist eine starke Expression auf. Nur ein kreisförmiger Bereich im Zentrum des anterioren Teils der Keimscheibe ist negativ. Links und rechts neben dem posterioren Drittel der Keimscheibe sind einzelne Zellen im extraembryonalen Gewebe deutlich gefärbt (Abb. 5D und H). Hierfür zeigen sich histologisch *ID3* exprimierende, ins extraembryonale Gewebe ausgewanderte Mesodermzellen verantwortlich. Insgesamt ist das extraembryonale Gewebe leicht gefärbt. In den Schnitten zeigen sich die ersten Epiblast- und Hypoblastzellen im AMC positiv (Abb. 5Q). Im posterioren Teil der Keimscheibe sind Epiblast- und Mesodermzellen stark gefärbt (Abb. 5R), wobei die Färbung bei den weiter anterior gelegenen Mesodermzellen wie auch den umgebenden Epiblastzellen abnimmt (Abb. 5P).

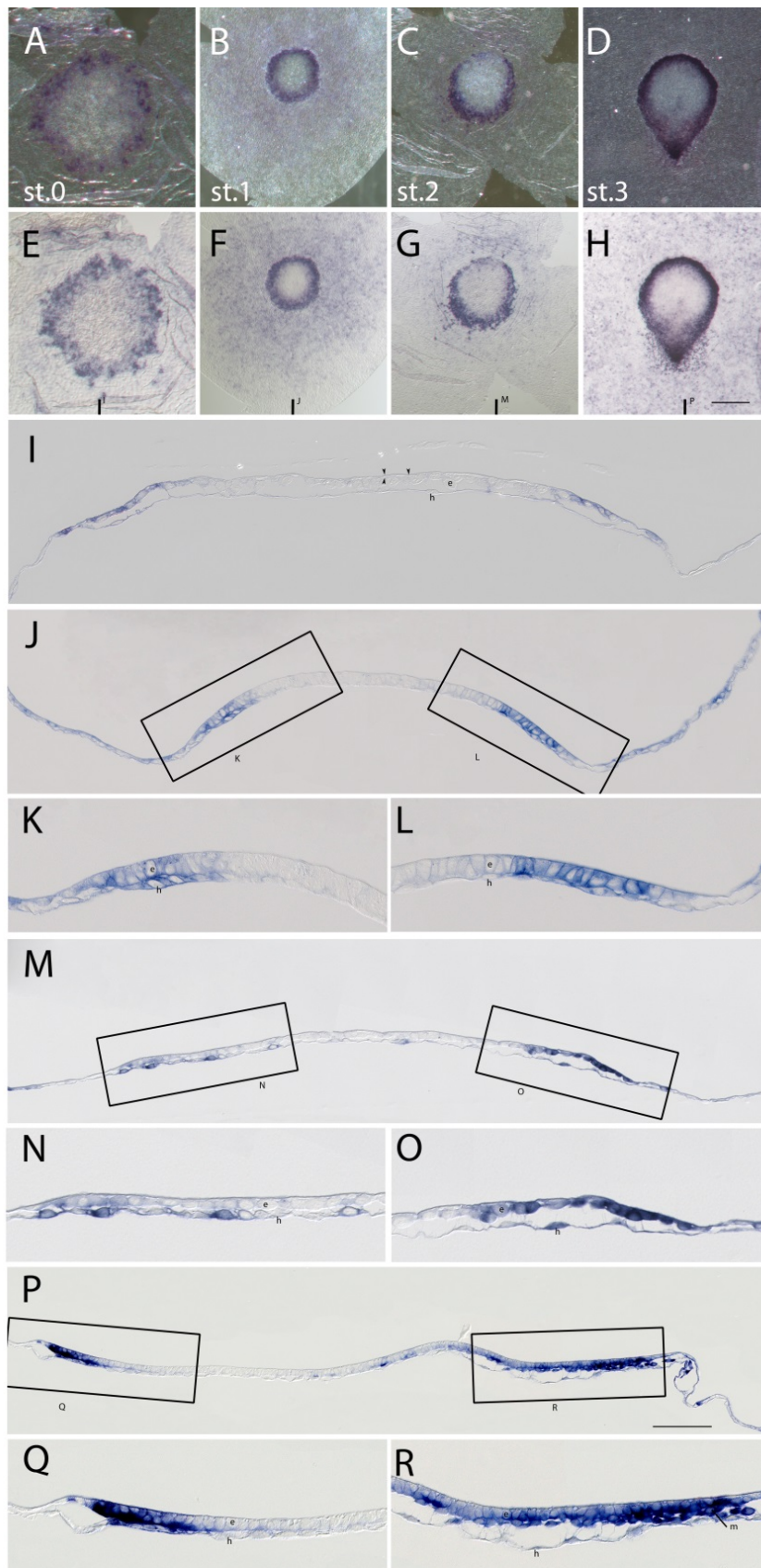
Abbildung 5: Expressionsmuster von *ID3*

Abb. 5: *ID3* Expression in den dorsalen Aufsichten (A-H) und in den Technovit® Schnitten (I-R) der Keimscheibe und im umgebenden extraembryonalem Gewebe des Kaninchens der Stadien 0-3 (5.2-6.5 dpc) nach *In-Situ*-Hybridisierung im Dunkelfeld (A-D) und im Hellfeld (E-R). Sonstige Symbole und Hinweise zur Abbildung sind aus den Legenden (s. oben) zu entnehmen. Maßstab (H) für die Aufsicht: 250 μm (A und E); 500 μm (B-D, F-H). Maßstab (P) für die Schnitte: 130 μm (I); 200 μm (J, P); 100 μm (K-L, Q-R), 160 μm (M), 80 μm (N-O).

3.2.5 *SALL1*

Das Expressionsmuster von *SALL1* ist auf die Keimscheibe begrenzt: Im Stadium 0 ($n=3$) liegt ein an ein Mosaik erinnerndes Muster vor (Abb. 6A und E), das sich durch die in unregelmäßigen Abständen vorkommenden einzeln positiven Hypoblastzellen erklären lässt (Abb. 6I).

Das Stadium 1 ($n=3$) weist ebenfalls ein Mosaik ähnliches Muster (Abb. 6B und F) auf. Am anterioren Rand der Keimscheibe verdichtet sich das Muster zu einer fast durchgehenden Linie, die durch größtenteils positive kubische Hypoblastzellen des AMC zustande kommt (Abb. 6K). Der Epiblast ist unterschiedlich stark gefärbt und ist ebenso wie der Hypoblast in einzelnen Zellen stark gefärbt (Abb. 6J und L).

Auch im Stadium 2 ($n=4$) ist ein an ein Mosaik erinnerndes Muster erkennbar. Durch eine Verdichtung des Musters bildet sich eine ringförmige, stark gefärbte Domäne innerhalb des anterioren Zweidrittels (Abb. 6C und G). In den Schnitten wird die starke Expression in beiden Zellschichten des AMC (Abb. 6N) und im posterioren Teil des Ringmusters, in der besonders der Epiblast stark gefärbt ist, deutlich (Abb. 6O). Dabei liegt die posteriore Domäne anterior zum PGE (Abb. 6O). Insofern begrenzt der Ring den Teil der Keimscheibe, der anterior des PGE liegt. Die Zellen des PGEs sind fast negativ.

Im Stadium 3 ($n=5$) heben sich eine ringförmige Verdichtung von dem generell vorhandenen, einem Mosaik ähnelnden Muster sowie eine deutliche, fast durchgehende Färbung des Primitivstreifens ab (Abb. 6D und H). Die Schnitte zeigen eine sehr starke Färbung der Zellen im AMC (Abb. 6Q), wobei die anteriorsten Zellen der Keimscheibe keine Färbung ausweisen. Posterior im AMC sind die Zellen in variierenden Intervallen unterschiedlich stark gefärbt. Die Mesodermzellen zeigen eine ähnliche Farbintensität wie die umliegenden Hypo- und Epiblastzellen (Abb. 6R und T). Das Ringmuster zeigt eine rechts-links Asymmetrie (Abb. 6U). Diese wird auch durch die transversalen Schnitte bestätigt (Abb. 6S).

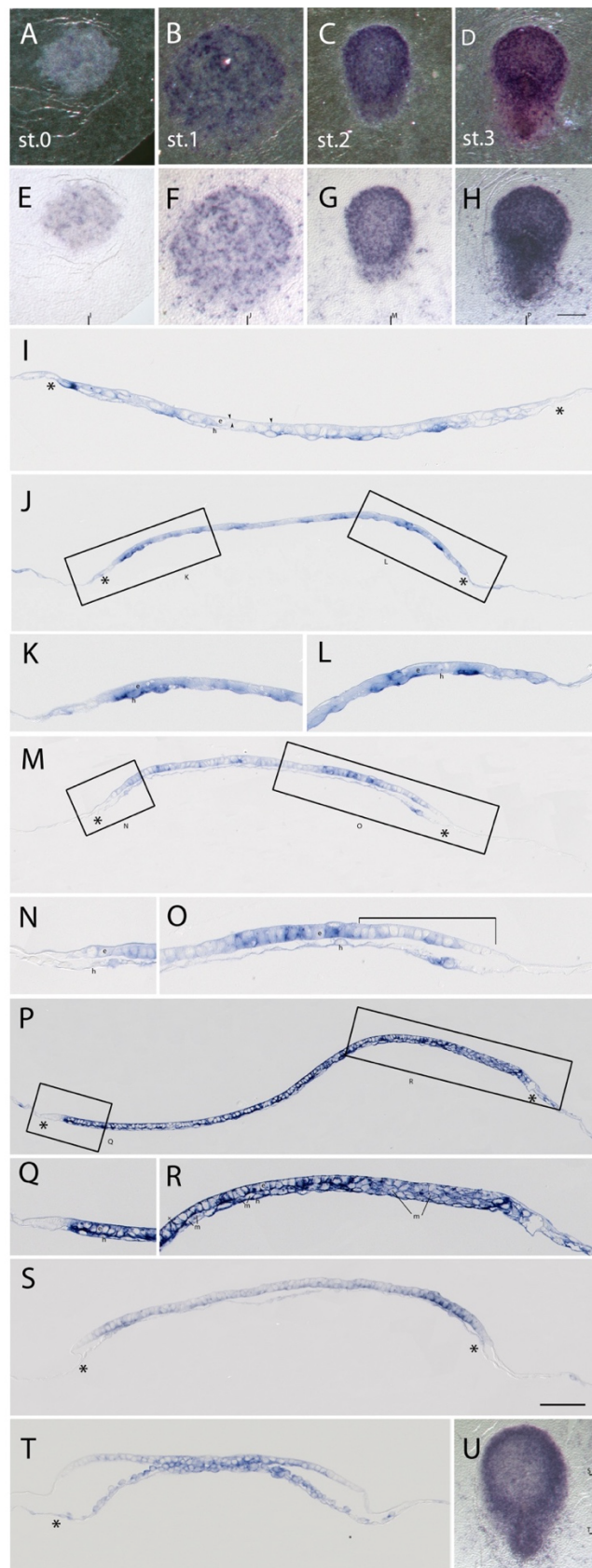
Abbildung 6: Expressionsmuster von *SALL1*

Abb. 6: *SALL1* Expression in den dorsalen Aufsichten (A-H, U) und in den Technovit® Schnitten (I-T) der Keimscheiben und dem umgebenden extraembryonalem Gewebe des Kaninchens der Stadien 0-3 (5.2-6.5 dpf) nach *In-Situ*-Hybridisierung im Dunkelfeld (A-D) und im Hellfeld (E-U). Sonstige Symbole und Hinweise zur Abbildung sind aus den Legenden (s. oben) zu entnehmen. Maßstab (H) für die Aufsicht: 250 μm (A-B, E-F); 330 μm (C-D, G-H, U). Maßstab (P) für die Schnitte: 100 μm (I, K-L, N-O, Q-R); 200 μm (J, M, P, S, T).

3.2.6 *PKDCC*

Die Expression *PKDCC* zeigt in den Stadien 1 bis 3 ein spezifisches Muster. Stadium 0 (n=3) zeigt eine sehr schwache Expression im Zentrum der Keimscheibe (Abb. 7A und E). Im Stadium 1 (n=4) zeigt sich ein gepunktetes Expressionsmuster mit einer leichten Polarität nach anterior (Abb. 7B und F). Das gepunktete Muster kann durch die Analyse der Schnitte auf unregelmäßig nebeneinanderliegende gefärbte Hypoblastzellen zurückgeführt werden (Abb. 7I und J). Im posterioren Teil der Keimscheibe zeigen einige Epiblastzellen eine schwache Färbung (Abb. 7K).

Das Expressionsmuster in Stadium 2 (n=3) besteht aus einem gepunkteten Teil im anterioren Drittel, einer ovalen Domäne in der Mitte und einem negativen posterioren Teil der Keimscheibe (Abb. 6C und G). Wie im Stadium 1 sind die Zellen des AMC negativ (Abb. 7M und I). Leichte Färbung im Hypoblast sind die Ursache für das gepunktete Muster (Abb. 7L und N). Die stark gefärbte, ovale Domäne besteht aus positiven Epiblast- und Hypoblastzellen und kann durch die Schnitte an der Grenze vom anterioren Teil der Keimscheibe zum PGE positioniert werden (Abb. 7N).

Das Expressionsmuster des Stadiums 3 (n=3) ähnelt dem des Stadium 2 sehr (Abb. 7D und H). Die Lage der Domäne ist aber unverändert an der Grenze zwischen anteriorem Teil der Keimscheibe und PGE (Abb. 7P). In spätem Stadium 3 umfasst die Domäne den Bereich des anterioren Primitivstreifens (nicht gezeigt). Das extraembryonale Gewebe ist in allen untersuchten Stadien negativ.

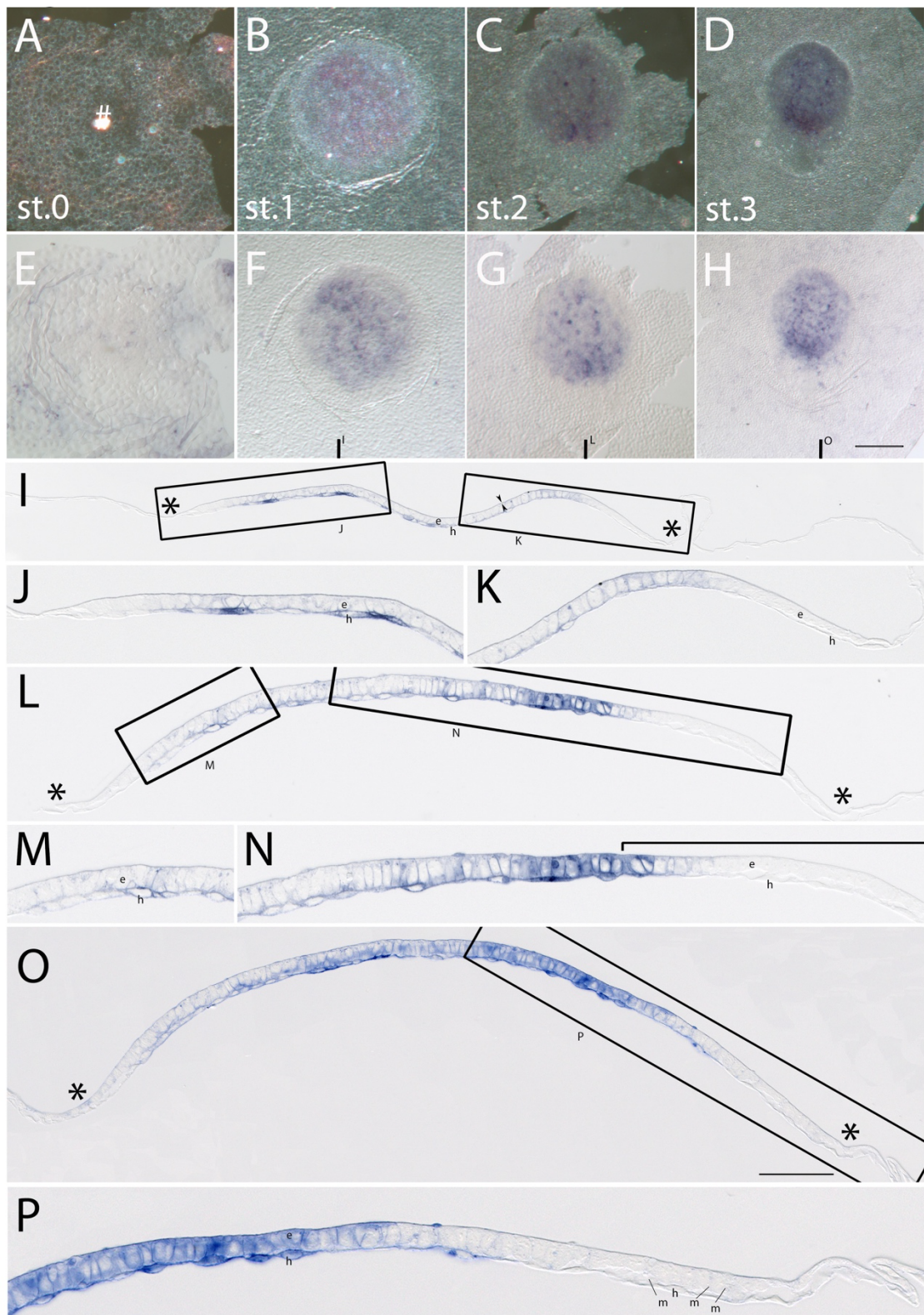
Abbildung 7: Expressionsmuster von *PKDCC*

Abb. 7: *PKDCC* Expression in den dorsalen Aufsichten (A-H) und in den Technovit® Schnitten (I-P) der Keimscheiben und dem umgebenden extraembryonalen Gewebe des Kaninchens der Stadien 0-3 (5.2-6.5 dpc) nach *In-Situ*-Hybridisierung im Dunkelfeld (A-D) und im Hellfeld (E-P). Sonstige Symbole und Hinweise zur Abbildung sind aus den Legenden (s. oben) zu entnehmen. Maßstab (H) für die Aufsicht: 150 μm (A und E); 500 μm (B-D, F-H). Maßstab (O) für die Schnitte: 200 μm (I, O); 200 μm (J-K, P); 150 μm (L), 110 μm (M-N).

3.2.7 *TBX6*

Die Expressionsmuster von *TBX6* unterscheiden sich in den untersuchten Stadien (0-3): Im Stadium 0 (n=3) zeigt sich eine gleichmäßige Färbung der Keimscheibe wie auch im extraembryonalen Gewebe (Abb. 8A und E). Die Schnitte zeigen eine gleichmäßige Expression von *TBX6* in allen Schichten (Abb. 8I).

Auch im Stadium 1 (n=3) ist das extraembryonale Gewebe gefärbt. Die Keimscheibe weist einen positiven Gradienten der Expressionsintensität nach anterior auf (Abb. 8B und F). Die Ursachen des Gradienten sind die deutlich stärker als die restlichen Hypoblastzellen gefärbten kubischen Hypoblastzellen des AMC (Abb. 8K) und die etwas stärker gefärbten anterioren Epiblastzellen im Vergleich zu den Epiblastzellen im posterioren Bereich der Keimscheibe (Abb. 5L).

Im Stadium 2 (n=5) ist *TBX6* weiterhin extraembryonal exprimiert und weist in der Keimscheibe - anstelle eines Gradienten - eher eine stufenförmige Abschwächung der Expressionsintensität zum PGE auf (Abb. 8C und G). Diese stufenförmige Abschwächung ist auch gut in den Schnitten zu erkennen (Abb. 8M): Der anteriore Teil der Keimscheibe (Abb. 8N) weist eine stärkere Intensität der Expression auf als der PGE (Abb. 8O).

Im Stadium 3 ist eine sichelförmige, anteriore, weit nach posterior ziehende Domäne erkennbar. Eine weitere Expressionsdomäne erinnert an ein an der Horizontalen gespiegeltes Dreieck, das mit seiner Spitze bis zum posterioren Rand der Keimscheibe zieht. Dieses Dreieck umgibt ein gepunktetes Expressionsmuster, das die Grenzen der Keimscheibe überschreitet und somit auch im extraembryonalen Gewebe vorliegt (Abb. 8D und H). In Schnitten zeigen sich positive Epiblast- und Hypoblastzellen im Bereich des AMC (Abb. 8Q). Im posterioren Bereich der Keimscheibe, in dem sich stark gefärbte Mesodermzellen finden, zeigen die Epiblast- und Hypoblastzellen eine stärkere Expression als anterior (Abb. 8R). Die Punkte im extraembryonalen Gewebe gehen auf ausgewanderte, *TBX6* exprimierende Mesodermzellen zurück (nicht gezeigt).

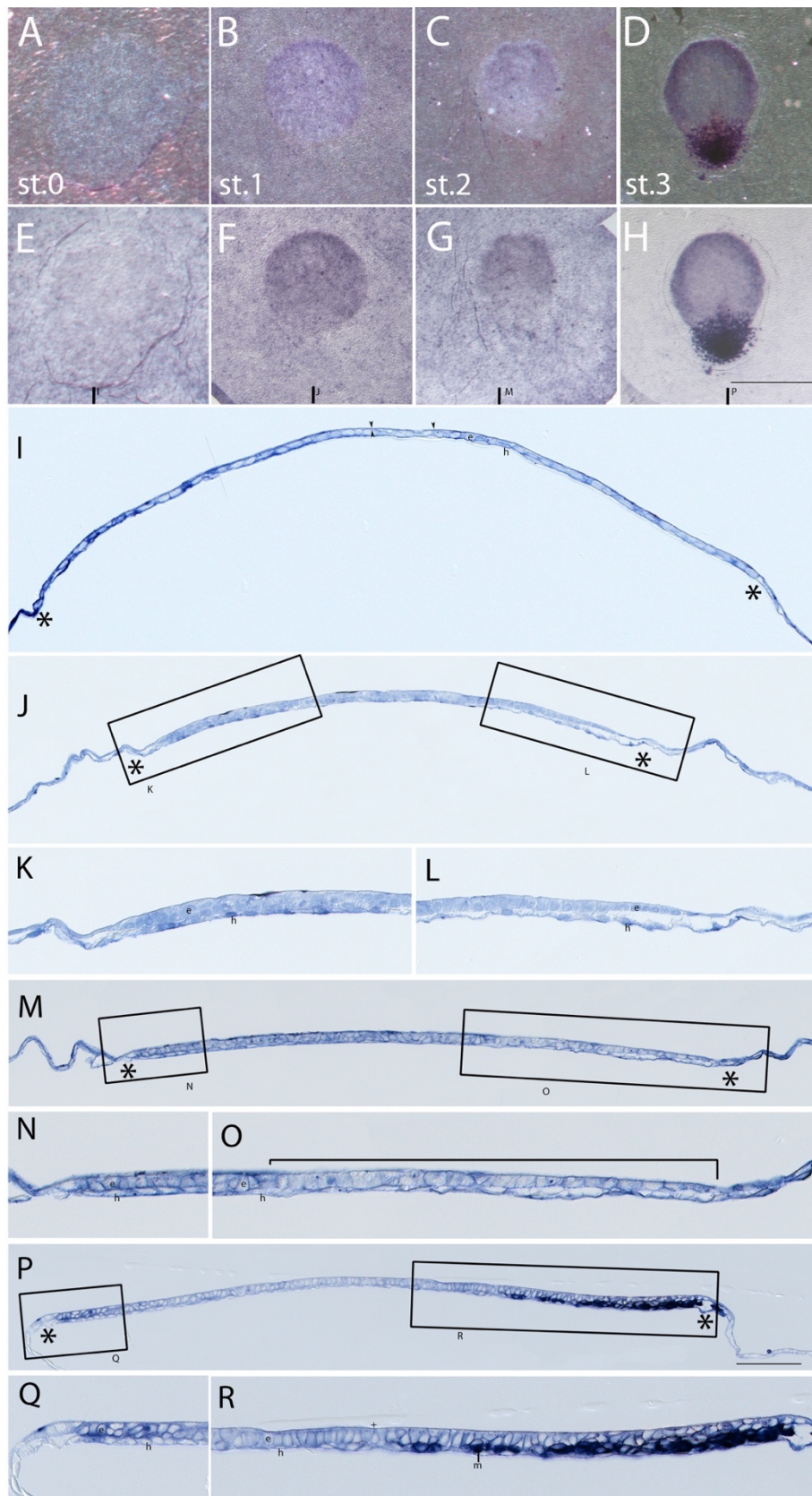
Abbildung 8: Expressionsmuster von *TBX6*

Abb. 8: *TBX6* Expression in den dorsalen Aufsichten (A-H) und in den Technovit® Schnitten (I-R) nach *In-Situ*-Hybridisierung im Dunkelfeld (A-D) und im Hellfeld (E-R). Sonstige Symbole und Hinweise zur Abbildung sind aus den Legenden (s. o.) zu entnehmen. Maßstab (H) für die Aufsicht: 500 μm (A und E); 770 μm (B-C, F-G); 830 μm (D,H). Maßstab (P) für die Schnitte: 110 μm (I); 200 μm (J, P); 100 μm (K-L, Q-R), 165 μm (M); 90 μm (N-O).

3.2.8 *ELK3*

ELK3 zeigt für die Stadien 0 bis 3 ein Gen-spezifisches Expressionsmuster auf: Im Stadium 0 (n=3) liegt eine unregelmäßige, fleckenförmige Expression sowohl im embryonalen als auch im extraembryonalen Gewebe vor (Abb. 9A und E). In den Schnitten wechseln sich Bereiche von stark gefärbten Zellen mit schwach gefärbten Bereichen in allen Zellschichten ab (Abb. 9I). Das Stadium 1 (n=3) weist eine gleichmäßige Expression innerhalb der Keimscheibe auf (Abb. 9F). Im Dunkelfeld (Abb. 5B) zeigt sich ein kreisrunder negativer Rand der Keimscheibe. Auch in der histologischen Analyse sind die ersten drei bis vier Zellen am Rand der Keimscheibe negativ (Abb. 9J). Intensitätsunterschiede zwischen dem anterioren (Abb. 9K) und posterioren Pol (Abb. 9L) der Keimscheibe existieren nicht. Das extraembryonale Gewebe weist keine Expression auf.

Im Stadium 2 (n=4) ist eine Polarität der Färbung erkennbar. Das anteriore Teil der Keimscheibe ist konzentrisch gefärbt, während der posteriore Teil nur schwach gefärbt ist (Abb. 9C und G). Im Dunkelfeld wird deutlich, dass der anteriore Rand negativ ist (Abb. 9C). Die Schnitte bestätigen den negativen Rand (Abb. 9N) und zeigen, dass der negative posteriore Teil mit dem PGE korreliert (Abb. 9O). In der Expressionsdomäne wechseln sich in beiden Zellschichten Bereiche von schwacher bis starker Intensität der *ELK3* Expression ab (Abb. 9M).

Im Stadium 3 (n=3) erinnert das *ELK3* Expressionsmuster mit seinem negativen Rand und seiner anterioren, konzentrischen Domäne an das Stadium 2. Zusätzlich ist der Bereich des Primitivstreifens stark gefärbt (Abb. 9D und H). In den Schnitten zeigen sich deutlich der negative Rand und positiv gefärbte Epiblastzellen in der anterioren Domäne (Abb. 9Q). Interessanterweise sind die posterioren Mesodermzellen schwächer gefärbt als die anterioren. Der Hypoblast ist im Bereich des Primitivstreifens auch positiv (Abb. 9R). Wie in den beiden früheren Stadien ist das extraembryonale Gewebe nicht gefärbt.

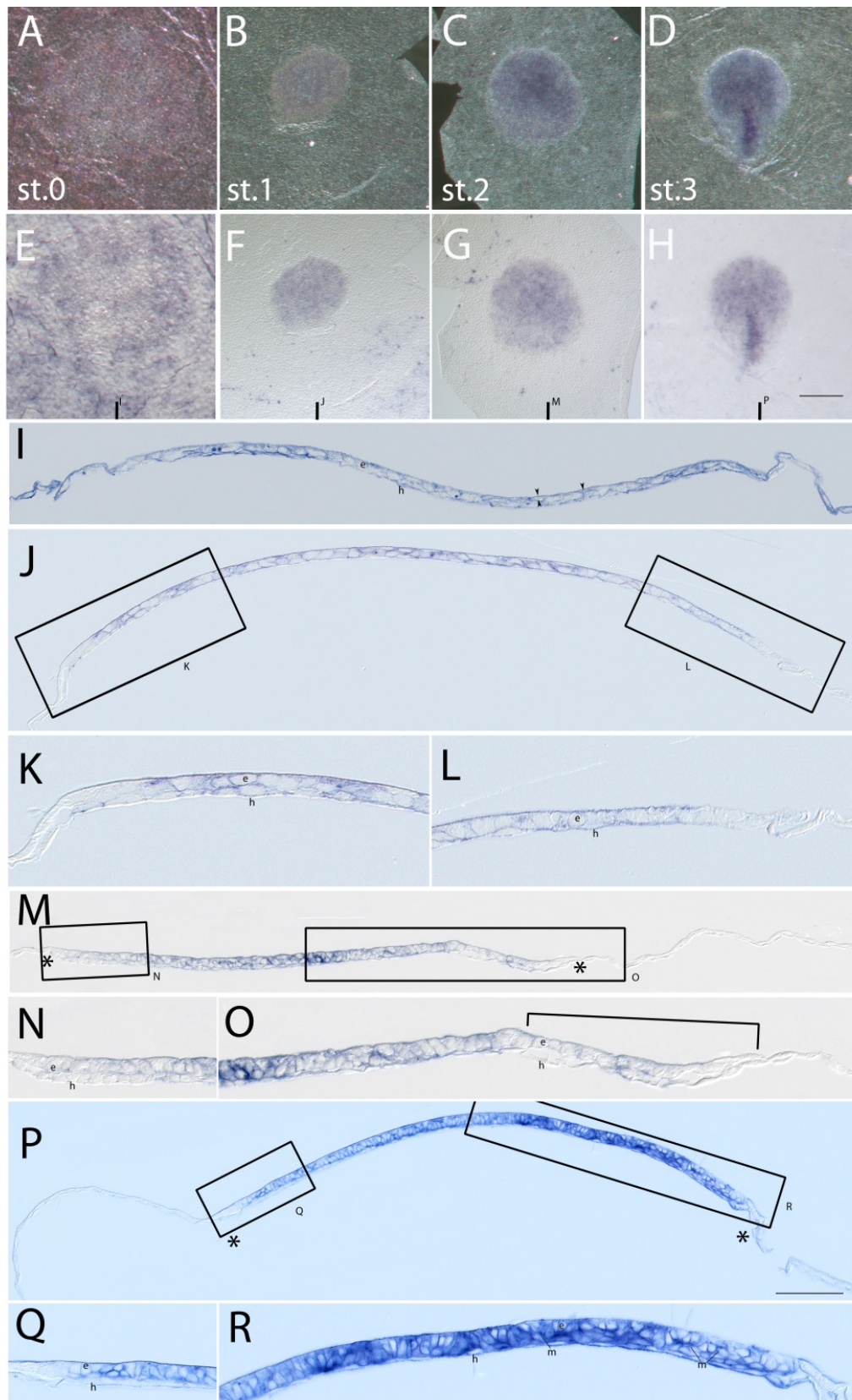
Abbildung 9: Expressionsmuster von *ELK3*

Abb. 9: *ELK3* Expression in den dorsalen Aufsichten (A-H) und in den Technovit® Schnitten (I-R) der Keimscheiben und dem umgebenden extraembryonalen Gewebe vom Kaninchen der Stadien 0-3 (5.2-6.5 dpc) nach *In-Situ*-Hybridisierung im Dunkelfeld (A-D) und im Hellfeld (E-R). Sonstige Symbole und Hinweise zur Abbildung sind aus den Legenden (s. oben) zu entnehmen. Maßstab (H) für die Aufsicht: 150 μm (A und E); 500 μm (B, F); 400 μm (C-D, G-H). Maßstab (P) für die Schnitte: 100 μm (I, N-O, Q-R); 110 μm (J); 70 μm (K-L), 200 μm (M, P).

3.2.9 *SPOCK3*

SPOCK3 weist ein für sich spezifisches Expressionsmuster auf: Im Stadium 0 (n=3) ist die Keimscheibe mit unterschiedlicher Intensität gefärbt (Abb. 10A und E). Dieses spiegelt sich auch in dem histologischen Befund wider: Die Zellen von allen Schichten weisen eine ungleichmäßige Färbung auf (Abb. 10I). Im extraembryonalen Gewebe sind vereinzelt Zellen gefärbt. Im Stadium 1 (n=3) weist *SPOCK3* eine schwache, gleichmäßige Expression in der gesamten Keimscheibe auf (Abb. 10B und F). Auch unter dem Mikroskop lässt sich keine Polarität in der Expression beschreiben (Abb. 10J, K und L). Im Stadium 2 (N=3) ist die Expressionsintensität zweistufig (Abb. 10C und G). Der schwächer gefärbte Bereich liegt in der PGE (Abb. 10N). Das Stadium 3 (n=3) weist eine kreisförmige Expression im anterioren Teil der Keimscheibe und eine Expressionsdomäne im posterioren Teil des Primitivstreifens (Abb. 10D und H) auf. Die Schnitte bestätigen eine im Epiblast vorliegende Expression, die lediglich die am weitesten anterior liegenden Zellen auslässt (Abb. 10P). Im posterioren Teil des Primitivstreifens sind die Mesodermzellen gefärbt (Abb. 10Q).

3.2.10 *DENND5B*

DENND5B weist keine extraembryonale Expression in den Stadien 0 bis 3 auf. Die Keimscheibe ist ab Stadium 1 (n=3) mit einem an ein Mosaik erinnerndes Muster gefärbt, welches sich zu einer flächigen Expression im Stadium 2 (n=3) verdichtet. Im Stadium 3 (n=3) kann eine leichte stärkere Expression am AMC und im Primitivstreifen als in dem restlichen Teil der Keimscheibe festgestellt werden. In den Schnitten kann die Expression den Zellen des Hypoblasts, des Mesoderms und des Epiblasts zugeordnet werden.

3.2.11 *LASS1*

LASS1 weist eine gleichmäßige Expression in der gesamten Keimscheibe während der Stadien 1 (n=3), 2 (n=3) und 3 (n=3) auf. Eine Expression während des Stadiums 0 (n=3) konnte nicht festgestellt werden.

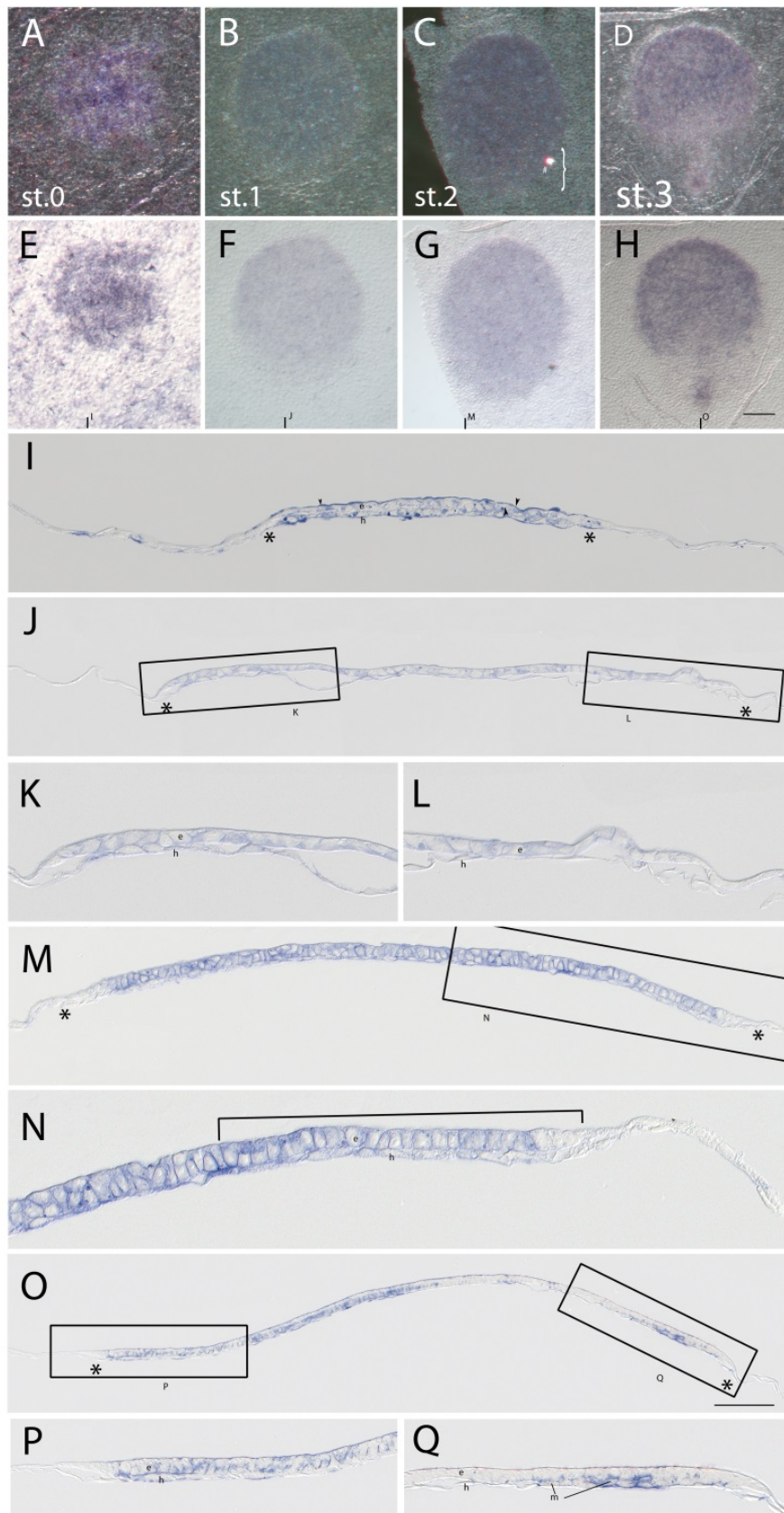
Abbildung 10: Expressionsmuster von *SPOCK3*

Abb. 10: *SPOCK3* Expression in den dorsalen Aufsichten (A-H) und in den Technovit® Schnitten (I-Q) der Keimscheiben und dem umgebenden extraembryonalem Gewebe des Kaninchens der Stadien 0-3 (5.2-6.5 dpf) nach *In-Situ*-Hybridisierung im Dunkelfeld (A-D) und im Hellfeld (E-R). Sonstige Symbole und Hinweise zur Abbildung sind aus den Legenden (s. oben) zu entnehmen. Maßstab (H) für die Aufsicht: 125 μm (A und E); 190 μm (B-C, F-G); 250 μm (D,H). Maßstab (O) für die Schnitte: 130 μm (I, J, M); 80 μm (K-L, N); 200 μm (O); 100 μm (P-Q).

3.2.12 *LITAF*

LITAF zeigt ein fein gepunktetes Muster in der Keimscheibe in Stadium 0 (n=3). Im Stadium 1 (n=3) und im Stadium 2 (n=3) ist *LITAF* flächig in der Keimscheibe exprimiert. Die Schnitte zeigen eine Färbung der Zellen im Epiblasten und Hypoblasten. Am anterioren und posterioren Rand der Keimscheibe ist histologisch eine Zunahme der Intensität im Epiblasten in den Embryonen des Stadiums 2 erkennbar, ohne dass ein achsenspezifisches Muster entsteht. Im Stadium 3 (n=3) ist die flächige Expression im anterioren Bereich der Keimscheibe von etwas stärkerer Intensität als der posteriore Bereich der Keimscheibe. Das extraembryonale Gewebe zeigt keine Expression während der untersuchten Entwicklungsstadien.

3.2.13 *LRP2*

LRP2 ist in beiden Schichten des extraembryonalen Gewebes während der Stadien 0 (n=3) und 1 (n=3) exprimiert. Im Stadium 2 (n=3) und Stadium 3 (n=3) zeigt das extraembryonale Gewebe keine Expression. Die Keimscheibe weist ein diffus gepunktetes Muster während der Stadien 0-3 auf. Durch die histologische Analyse kann die Expression dem Hypoblast zugeordnet werden. Die Expression an den beiden Pol ist unspezifisch.

4 Diskussion

Die Amplifikation der Gene aus der gesamten RNA von 20 Embryonen der Stadien 0-3 ist der erste Nachweis einer Expression dieser Gene in diesen Stadien. Als frühestes Gen von den untersuchten Genen zeigt *NODAL* eine achsenspezifische Expression noch vor dem ersten morphologischen Zeichen der Achse auf. Die Expressionsmuster von *EOMES*, *PITX2*, *ID3*, *SALL1*, *PKDCC* und *TBX6* weisen in abnehmender Deutlichkeit eine molekulare Achse zu einem ähnlichen Zeitpunkt auf wie die morphologische Achse, also im Stadium 1. *ELK3* und *SPOCK3* bilden erst mit der zweiten morphologischen Domäne der a.-p. Achse ein achsenspezifisches Muster aus. Die Gene *DENND5B*, *LASS1*, *LITAF* und *LRP2* zeigen ein jeweils spezifisches, aber kein achsenspezifisches Expressionsmuster während der Achsenbildung. Das achsenspezifische Muster kommt durch Intensitätsunterschiede sowie komplexere und multiple Expressionsdomänen zustande: Zum einen entwickeln *EOMES*, *PITX2*, *ID3* und *SALL1* zu einem Zeitpunkt während der Achsenbildung ein ringförmiges Muster mit unterschiedlich breiten Expressionsdomänen. Zum anderen weisen andere Gene wie *NODAL*, *TBX6*, *PKDCC*, *ELK3*, *SPOCK3* und nach Abschluss der Achsenbildung auch *LITAF* sowie *DENND5B* einen unterschiedlich starken Gradienten auf der a.-p. Achse in ihrer Expressionsintensität auf. *NODAL* und *PKDCC* zeigen zusätzlich eine deutliche Domäne in der Mitte der Keimscheibe auf.

4.1 Methodisches

Die Auswahl des Modellorganismus und die Methode soll zuerst diskutiert werden, sodass die erhobenen Daten auf ihre Qualität geprüft sind, bevor die einzelnen Expressionsmuster diskutiert werden.

4.1.1 Modellorganismus

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expressionsmuster mit Hilfe der Auflichtmikroskope gut erkennbar sind und gut analysiert werden können. Die Expressionsmuster können gut mit den Ergebnissen aus dem Huhn verglichen werden und erleichtern somit den Vergleich zwischen Huhn und Kaninchen. Hier zeigt sich ein großer Vorteil im Vergleich zum Eizylinder der Maus. Im Vergleich zu anderen Säugern ist das Kaninchen neben der Maus ein bereits gut etablierter Modellorganismus (Fischer et al. 2012). Die morphologische Entwicklung der Keimscheibe ist gut beschrieben, so dass die Expressionsdomänen den morphologischen Domänen der Keimscheibe zugeordnet und somit auf der a.-p. Achse eingeordnet werden können. Standardisierte Verfahren ermöglichen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Das zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht vollständige sequenzierte Genom des Kaninchens erschwert die molekulare Forschung am Kaninchen. Dennoch konnten die

Gene dieser Arbeit mit Ausnahme von *VG1* erfolgreich kloniert werden. Aufgrund der negativen Ergebnisse bei der Amplifikation mit Primern auf Grundlage eines *alignments* konnten die Expressionsmuster nicht präsentiert werden. Für die gewählte Methodik spricht, dass das Gene *LASS1* auf diesem Weg amplifiziert und bezüglich des Expressionsmusters untersucht werden konnten. Trotz der Daten in der Ratte, dass *LASS1* und eines der möglichen Orthologen von *VG1* bicistronisch verknüpft sind (Wang et al. 2007), ist eine Gleichsetzung der Expressionsmuster im Kaninchen beim jetzigen Stand der Forschung verfrüht. Die fehlenden experimentellen Möglichkeiten im Kaninchenembryo verhindern den Nachweis von der Kausalität zwischen Genexpression und Achsenbildung. Erst nach der Entwicklung der ersten Zeichen der Achsenbildung sind Kulturexperimente möglich (Idkowiak et al., 2004a; Idkowiak, 2007; Stankova et al., 2015). Das Herstellen transgener Kaninchenembryonen ist aufgrund der langen Generationsdauer erschwert und wurde trotz erster Anwendungen von transgenen Kaninchen in der Herzforschung (Brunner et al., 2008; Duranthon et al., 2012) noch nicht in der Erforschung der frühen Entwicklungsphase des Kaninchenembryos angewendet.

4.1.2 Klonieren, *In-Situ*-Hybridisierung und Histologie

Als zusätzliche Sicherung wurde das Klonieren des richtigen Genes nicht nur durch einen Restriktionsverdau, sondern auch durch das Einschicken der Plasmide zur Sequenzierung untersucht, so dass die korrekte Herstellung der Sonde zum gewünschten Gen garantiert werden kann. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse von *NODAL* mit den bereits publizierten Ergebnissen (Yoshida et al. 2016) spricht für die adäquate Durchführung der *In-Situ*-Hybridisierung. Die vorgestellten Ergebnisse sind qualitativ zu werten. Um eine Verallgemeinerung des Expressionsmusters zu ermöglichen, wurden mindestens drei hybridisierte Embryonen im gleichen Stadium miteinander verglichen. Für quantitative Aussagen wäre eine höhere Stückzahl notwendig.

Die Unterteilung der Keimscheibe in den AMC und den PGE beim Kaninchen erfordert eine histologische Untersuchung des Expressionsmusters, um dieses exakt der jeweiligen Domäne der Keimscheibe zuordnen zu können. Schließlich ist es relevant, ob das Gen molekular in dem AMC oder dem PGE markiert und somit als Marker für die jeweilige Domäne bezeichnet werden kann. Die Intensitätsunterschiede innerhalb eines gefärbten 5 μ m Semidünnschnitte ermöglichen eine quantitative Unterscheidung der Genexpression. Berücksichtigt werden muss dabei, dass die Dicke der Semidünnschnitte durch die klimatischen Bedingungen, wie z.B.: Luftfeuchtigkeit, beim Schneiden mitbeeinflusst werden kann. Bei breiteren Schnitten liegen mehrere Zellen aufeinander, die Expressionsintensität addiert sich entsprechend. Um die Bedingungen beim Schneiden konstant zu halten, wurde das jeweilige Präparat möglichst komplett geschnitten. Außerdem muss geklärt werden, zu

welcher Zellschicht sich die Expression zuordnen lässt. Mit semiquantitativen Verfahren wie eine Computer unterstützte Messung der Intensität oder *real-time*-PCR zur quantitativen Bestimmung der mRNA-Konzentration im anterioren und posterioren Pol könnte bei diffusen Expressionen wie *LRP2* ohne ein makroskopisch und mikroskopisch erkennbares achsenspezifisches Muster der endgültige Ausschluss eines achsenspezifischen Musters erfolgen. Mit Hilfe einer *real-time*-PCR könnte auch in einem *screen* eine Untersuchung zur Benennung von achsenspezifischen Genen im Kaninchen wie im Huhn (Torlopp et al. 2014) wiederholt werden. Das *screen* im Kaninchen hätte – möglicherweise – eine Vielzahl an möglichen Marker nachgewiesen, ohne zu beantworten, ob wirklich ein achsenspezifisches Muster vorliegt. Die Analyse der Expressionsmuster hätte diese Untersuchung nicht ersetzt. Die genaue Analyse der zahlreichen im Screen neu entdeckten Gene hätten einen hohen Verbrauch an Embryonen und somit Kaninchen verursacht. Ein gerichtetes Vorgehen von bereits untersuchten bzw. aktuell untersuchten Genen (in Absprache mit C. Stern und C. Viebahn) schien ethisch vertretbarer. Außerdem konnten die bereits bekannten Ergebnisse aus dem Huhn helfen die Funktion dieser Gene im Kaninchen zu verstehen.

4.2 Expressionsmuster

Die Expressionsmuster werden in der gleichen Reihenfolge wie bei der Vorstellung der Expressionsmuster diskutiert.

4.2.1 *NODAL*

Die histologische Analyse und die Gegenüberstellung der Hell- und Dunkelfeldaufnahmen zeigten einige Unterschiede zum bisher bekannten Muster (Yoshida et al. 2016): Bereits bevor sich das erste morphologische Zeichen der a.-p. Achse herausbildet, nimmt die Intensität der Expression von *NODAL* an einem Pol der Keimscheibe ab und kann somit als erstes Zeichen einer molekularen Achse gewertet werden. Die sichelförmige Expressionsdomäne besteht sowohl aus posteriorem Gewebe des anterioren Teils der Keimscheibe (Fig. 7a in Yoshida et al. 2016) als auch aus anterioren PGE (Abb. 1D, I, S, und T). Eine frühe rechts-links Asymmetrie ist durch eine unterschiedlich starke *NODAL* Expression erkennbar, aber erscheint randomisiert entweder auf der linken oder rechten Seite der Keimscheibe. Die identische Behandlung der beiden Seiten schließt einen methodischen Fehler aus. Auch die gut erforschte Beteiligung von *NODAL* an der Entstehung der rechts-links Asymmetrie während der späteren Entwicklung (Levin et al. 1995; Feistel und Blum 2008; Tsikolia et al. 2012; Schröder et al. 2016) spricht für eine weiterführende funktionale Untersuchung dieser frühen molekularen Asymmetrie.

Die Expressionsmuster der *NODAL* Inhibitoren wie *CERL1* sind komplementär zu dem Expressionsmuster von *NODAL*, so könnte die aufkommende Expression von *CERL1* (Idkowiak et al. 2004a) für die Reduktion von *NODAL* am späteren morphologisch defi-

nierten anterioren Pol zuständig sein. Während *NODAL* im anterioren Teil des Primitivstreifens exprimiert ist, markieren Inhibitoren den posterioren Teil des Streifens, so dass der Primitivstreifen, passend zu den unterschiedlichen Entwicklungen der Zellen im Primitivstreifen (u.a. beschrieben im Huhn, siehe Selleck und Stern 1991; Psychoyos und Stern 1996), durch molekulare Marker unterteilt werden kann. Die sichelförmige *NODAL* Domäne stimmt überein mit der Expressionsdomäne von *CHORDIN*, Marker für den später erscheinenden Knoten (Weisheit 2002). Auch die spätere Restriktion von *NODAL* in dem anterioren Teil des Primitivstreifens spricht für eine besondere Funktion dieser Expressionsdomäne.

In der flachen Keimscheibe des Huhns sind *NODAL* und seine Inhibitoren von inverser Reihenfolge und Muster im Vergleich zum Kaninchen: Die Inhibitoren sind exprimiert in dem Hypoblast der gesamten Keimscheibe und ziehen sich nach anterior zurück, so dass *NODAL* am posterioren Pol der Keimscheibe sichelförmig exprimiert wird und dort eine wesentliche Rolle in der Bildung des Primitivstreifens einnimmt (Bertocchini und Stern 2002; Chapman et al. 2002). Durch die Polonaise Bewegungen (Gräper 1929; Voiculescu et al. 2007) verbleibt die *NODAL* Domäne im Huhn zuerst posterior und dann im gesamten Primitivstreifen, bis *NODAL* nur noch im anterioren Teil von diesem exprimiert wird (Tsikolia et al. 2012). Im Kaninchen dagegen findet die Elongation nicht durch die Polonaise Bewegungen statt, sondern durch die Verlängerung der Keimscheibe am posterioren Pol, da wo die *NODAL* Domäne liegt. Die *NODAL* Domäne bleibt somit in der Mitte der Keimscheibe und der PS formiert sich von posterior zu der *NODAL* Domäne hin. Die Expression von *NODAL* weist in der Maus große Ähnlichkeiten mit der des Kaninchens auf. In dem theoretischen Modell (Behringer et al. 2000) einer flachen Keimscheibe des Mausembryos wäre zuerst in beiden Schichten der gesamten Keimscheibe und schließlich am posterioren Pol der Keimscheibe *NODAL* exprimiert (Conlon et al. 1994). Mausembryonen mit einer Funktionsverlust von dem Gen *NODAL* bilden keine a.-p. Achse aus (Varlet et al. 1997) und verdeutlichen somit die wichtige Bedeutung von dem Gen *NODAL* in der Achsenbildung. Somit passt das Expressionsmuster im Kaninchen zu den beschriebenen Expressionsmustern von *NODAL* in den anderen Modelorganismen. Das zum *TGF*-Signalweg gehörende Signalmolekül *NODAL* (Schier 2003) spielt somit eine wichtige Rolle bei dem Wachstum für die Elongation der Keimscheibe und bei der Differenzierung zu Mesodermzellen.

4.2.2 *EOMES*

Die starke Expression vom Transkriptionsfaktor *EOMES* am posterioren Rand der Keimscheibe ist eine Parallele zum *NODAL* Expressionsmuster, ebenso die fehlende extraembryonale Expression in den späteren Stadien. Deutlicher, aber zu einem späteren Stadium als *NODAL*, zeigt das Expressionsmuster von *EOMES* durch unterschiedliche Breiten der

anterioren und posterioren Domäne die a.-p. Achse an. Im Stadium 3 deutet das y-förmige Expressionsmuster auf eine starke Expression in der Region hin, in der auch *NODAL* und *CHORDIN* (s. o.) exprimiert sind. Die evolutionär konservierte Eigenschaft von *EOMES* als Marker für Mesodermzellen (Probst und Arnold 2017) wird durch die Expression in den Mesodermzellen bestätigt. Die beiden kurzen Arme des Y deuten aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge auf einen rechts-links Unterschied hin.

Im Huhn ist *EOMES* ähnlich wie beim Kaninchen in den frühen Stadien auch im extraembryonalen Gewebe exprimiert. Im Gegensatz zu den Säugetieren fehlt die anteriore Expressionsdomäne im Huhn (s. Abb.1 bei Pernaute et al. 2010) passend zum fehlenden anterioren Zeichen der a.-p. Achse. Als Gemeinsamkeit zeigt sich die extraembryonale Expression in den frühen Stadien. In der Maus ist *EOMES* im Primitivstreifen (Hancock et al. 1999) und im extraembryonalen Gewebe exprimiert und spielt dort in der Entwicklung des AVEs eine wichtige Rolle (Nowotschin et al. 2013), die für die *EOMES* Expression im AMC des Kaninchens wahrscheinlich ebenso zutreffen könnte. Die Übereinstimmung der Expression von *EOMES* in der Region des Kaninchens, in der auch *CHORDIN* und *NODAL* exprimiert sind, kann durch die möglicherweise enge Verbindung zwischen *NODAL* und *EOMES* in der Maus erklärt werden: Bei Mausembryonen mit defektem *NODAL* Gen ist keine *EOMES* Expression darstellbar (Fig. 1b, n in Brennan et al. 2001).

4.2.3 *PITX2*

Die starke Expression im AMC spricht für eine Beteiligung des Genes in der frühen Achsenbildung des Kaninchens und somit ist das Gen *PITX2* ein evolutionär konservierter Marker für die frühe Achsenbildung. Die leichte Betonung des restlichen Keimscheibenrands unterstützt die Theorie der AMC Bildung (Idkowiak et al. 2004b). Als Mitglied des *NODAL* Signalweges wird *PITX2* durch *NODAL* unter Beteiligung zahlreicher weiteren Gene auf komplizierte Weise reguliert (Schier 2003), wodurch das unterschiedliche Expressionsmuster dieser beiden Gene erklärt werden kann. Auch könnte das unterschiedliche Expressionsmuster durch eine Verzögerung in der Signalkaskade zustande kommen: Die sich rückbildende *NODAL* Expression im anterioren Teil der Keimscheibe reicht aus, um die anteriore *PITX2* Expressionen zeitverzögert zu induzieren. Die extraembryonale Expression von *PITX2* zeigt Ähnlichkeiten zur extraembryonalen Expression von dem Transkriptionsfaktor *GATA2* (unpubliziert) in der Ausbreitung bis zum Äquator der Blastozyste. Eine Beeinflussung der Achsenbildung durch das extraembryonale Gewebe ist durch die Expression von *PITX2* besonders aufgrund der bis zur Keimscheibe heranreichenden Expression denkbar und wird durch das Beispiel einer achsenspezifischen Expression von *GATA2* im extraembryonalen Gewebe unterstützt.

Im Huhn scheint das extraembryonale Gewebe in der *Area opaca* ebenfalls Einfluss auf die Achsenbildung in der Keimscheibe nehmen zu können. Darauf weist die extraembryonale Expression *GATA2* (Bertocchini und Stern 2012) und das zur *TGF*-Familie gehörende und als Signalmolekül translatierte Gen *BMP4* hin (Arias et al. 2017). Passend zur Expression von *PITX2* im Huhn, markiert auch *PITX2* im Kaninchen die Stelle, an der das erste morphologische Zeichen der Achsenbildung auftritt, und den Primitivstreifen (Torlopp et al. 2014). Eine genauere Untersuchung von *PITX2* während der Gastrulation in Mäusen ist noch ausstehend, wobei mutierte Mausembryonen zum Ende der Embryogenese schwere Fehlbildungen zeigten (Gage et al. 1999). Der Transkriptionsfaktor *PITX2*, der die Transkription von *VG1* im Huhn und somit die Bildung des Primitivstreifens aktiviert (Torlopp et al. 2014), ist somit ebenso wie *EOMES* in seiner Funktion als Marker des ersten morphologischen Zeichens der a.-p. Achse und Marker für die zukünftige Bildungsstelle des Primitivstreifens zweigeteilt.

4.2.4 *ID3*

Das ringförmige Expressionsmuster von *ID3*, dessen Protein ein zur *Helix-loop-Helix*-Familie (Murre et al. 1989) gehörende Transkriptionsfaktor ist und Zellwachstum und -differenzierung steuert (Christy et al. 1991; Ellmeier et al. 1992; Deed et al. 1993; Deed et al. 1994), zeigt durch die unterschiedliche Breite des Rings seine Achsenspezifität. Dieses ringförmige Muster weist Ähnlichkeiten mit dem Expressionsmuster von *WNT3* (Idkowiak 2007) und von *BMP3* und *4* (Hopf et al. 2011), deren Proteine beide die Expression von dem Gen *ID3* aktivieren können (Kowanetz et al. 2004; Yang et al. 2013). Obwohl *ID3* durch Proteinkinasen (Deed et al. 1993) reguliert wird, ist aufgrund des komplementären Expressionsmusters ein Einfluss durch die Proteinkinase PKDCC eher unwahrscheinlich. Im Huhn ist *ID3* zuerst in der ganzen Keimscheibe exprimiert und zeigt eine Aussparung in der Region von der *posterior marginal zone* in der weiteren Entwicklung (persönliche Kommunikation mit C. Stern), so dass dieses Gen anders als im Kaninchen nur anterior exprimiert ist. Um die Aktivität zu beurteilen, müsste das Expressionsmuster von *ID3* aktivierenden Proteinkinasen in beiden Spezies untersucht werden. In der Maus ist *ID3* im embryonalen Ektoderm und im extraembryonalen Endoderm exprimiert und ist somit wie im Kaninchen eher in der Peripherie exprimiert (Jen et al. 1997).

4.2.5 *SALL1*

Durch sein dichter gepunktetes Expressionsmuster anterior als posterior könnte *SALL1* eine Rolle in der Achsenbildung im Kaninchen spielen. Während der späteren Entwicklung stimmen die Regionen mit nur schwacher Intensität von *SALL1* mit den Expressionsdomänen von *DICKKOPF* (Idkowiak et al. 2004a) und *BRACHYURY* (Viebahn et al. 2002) überein und unterstützen somit die Beobachtung, dass beide Gene durch die Überexpression von *SALL1* inhibiert werden (Fig. 5C in Karantzali et al. 2011). Im Huhn ist *SALL1* mit Ausnahme der Expressionsdomäne von den posterior exprimierten Genen deutlich in

der Keimscheibe, also im anterioren Teil der Keimscheibe und des Primitivstreifens exprimiert (persönliche Kommunikation C. Stern) und zeigt somit Gemeinsamkeiten mit der schwachen Expressionsintensität am posterioren Pol der Keimscheibe. In der Maus liegt mit einer starken Expression anterior und eine schwächeren Expression posterior eine ähnliches Expressionsmuster wie im Kaninchen vor (*Fig. 1C* in Sousa-Nunes et al. 2003). Als Repressor der Transkription inhibiert *SALL1* die Zellproliferation und Zellmigration (Chi et al. 2019), so dass die schwache Expression im posterioren Teil der Säuger gut zu erklären ist.

4.2.6 *PKDCC*

PKDCC ist durch seine Expression im Zentrum der anterioren Keimscheibe komplementär zu *WNT3* (Idkowiak 2007) exprimiert und lässt die inhibierende Funktion von *PKDCC* auf *WNT3* im Krallenfrosch evolutionär konserviert erscheinen: Im Krallenfrosch inhibiert die Proteinkinase *PKDCC* den *WNT*-abhängigen Signalweg zur Zellpolarität (Vitorino et al. 2015) und den *canonical WNT*-Signalweg unabhängig von der Kinase Aktivität (Ding et al. 2017). Obwohl im Huhn eine genaue Analyse des Expressionsmusters noch fehlt, weist das *screen* auf eine posteriore Expressionsdomäne und somit auf eine Funktion im ersten morphologischem Zeichen der a.-p. Achse und in der Bildung des Primitivstreifens hin (Torlopp et al. 2014). Diese Daten passen zu der leichten Betonung der anterioren Expressionsdomäne im Anbetracht der inversen Achsenbildung im Kaninchen, der Expressionsdomäne am Übergang zum PGE in der späteren Achsenbildung und der Expression im anterioren Teil des Primitivstreifens. In der Maus ist *PKDCC* zuerst anterior im AVE und im anterioren Primitivstreifen exprimiert (siehe Abb. 2A-C bei Imuta et al. 2009; Goncalves et al. 2011) und weist somit große Ähnlichkeiten zur Expression im Kaninchen auf.

4.2.7 *TBX6*

TBX6 zeigt durch den Gradienten zum anterioren Pol die a.-p. Achse an und markiert somit wie im Huhn das erste morphologische Zeichen der a.-p. Achse (persönliche Kommunikation mit C. Stern). Passend zur Zugehörigkeit zu den T-Box Genen wird *TBX6* im Mesoderm exprimiert und weist somit in diesem Punkt Ähnlichkeiten zu den Expressionsmustern von weiteren, beschriebenen T-Box Genen im Kaninchen wie *EOMES* (s. o.) und *BRACHYURY* (Viebahn et al. 2002) auf. Diese Funktion ist evolutionär konserviert, worauf die Expression im Primitivstreifen im Huhn hinweist (*Fig. 3G`* in Hardy et al. 2011). Auch in der Maus ist *TBX6* im Primitivstreifen exprimiert und scheint ein wichtiger Marker für das *paraxial* Mesoderm zu sein (Chapman et al. 1996; Chapman et al. 2003). Um diese Funktion im Kaninchen nachzuweisen, bedarf es einer weiteren Untersuchung wie z. B. der Darstellung der Bewegungen und somit des zukünftigen Schicksals der *TBX6* exprimierenden Zellen. Funktionelle Experimente mit Mutationen von *EOMES* im Mausembryo zeigten eine verringerte Intensität von *TBX6* Expressionen im Primitivstreifen

(Fig. 2K-N in Arnold et al. 2008) und somit die molekulare Grundlage für die Expression von beiden Genen im Primitivstreifen im Säuger.

4.2.8 *ELK3*

Mit der flächigen Expressionsdomäne mit Auslassung des Rands zeigt *ELK3* Ähnlichkeiten zu *PKDCC* im Kaninchen und zu seiner Expression im Huhn. Im Huhn ist *ELK3* nur in der anterioren Spitze des Primitivstreifens exprimiert (persönliche Kommunikation mit C. Stern), so dass *ELK3* im Kaninchen durch seine stärkere Expression im anterioren als im posterioren Primitivstreifen Ähnlichkeiten ausweist. In der Maus wurde eine Expression von *ELK3* bisher erst in Stadien nach Abschluss der Gastrulation in acht Tage alten Embryonen, nachgewiesen (Nozaki et al. 1996). Um die Funktion vom Transkriptionsfaktor *ELK3* zu beurteilen, bedarf es eines Vergleichs mit dem Expressionsmuster von G-Protein RAS, weil *ELK3* mit RAS zusammen aktivierend, ohne Co-expression inhibierend auf die Transkription wirkt (Giovane et al. 1994; Ducret et al. 2000)².

4.2.9 *SPOCK3*

SPOCK3 zeigt große Ähnlichkeiten zu dem Muster im Huhn, in dem *SPOCK3* ebenfalls anterior exprimiert ist (persönliche Kommunikation mit C. Stern). Die Expression in den Mesodermzellen im Primitivstreifen des Kaninchens erfordert eine histologische Untersuchung im Huhn. Das Expressionsmuster von *SPOCK3* in der Maus während der Gastrulation ist noch unbekannt. Als Kalzium bindendes Proteoglykan könnte *SPOCK3* die Proteinkinasen des Typ C, deren Aktivität von Kalzium abhängt (Lipp und Reither 2011), und somit das von Kinasen regulierte ID3 (Deed et al. 1993) in dem überschneidenden Expressionsbereich mitbeeinflussen.

4.2.10 **Untersuchte Gene ohne frühes achsenspezifisches Muster**

DENND5B ist sowohl aufgrund des zeitlichen Auftretens als auch der Lokalisation und des Musters ähnlich im Huhn exprimiert (Torlopp et al. 2014). Da *DENND5B* beim Kaninchen erst nach Abschluss der Achsenbildung im AMC eine stärkere Expression als im Rest der Keimscheibe hat, zeigt sich eine im Vergleich zum Huhn inverse Herausbildung des Expressionsmusters und somit ist die Expression von *DENND5B* ein später Marker für das erste morphologische Zeichen der a.-p. Achse. Histologisch ist dieser Unterschied zwischen dem AMC und der Rest der Keimscheibe nur minimal, so dass die stärkere Expression im Aufsicht-Mikroskop zum größten Teil auf die höhere Zelldichte am AMC zurückzuführen ist. Schließlich ist *DENND5B* für den Transport von Triglyzeriden in die und aus den Zellen zuständig (Gordon et al. 2019) und somit in allen Zellen exprimiert. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren die Expressionsmuster in den Embryonen der Maus während der Achsenbildung nicht bekannt.

² *ELK3* wird in der Literatur auch unter dem Pseudonym *NET* geführt (NCBI 2020).

LASS1 zeigt trotz seiner bicistronischen Verknüpfung mit einem der möglichen orthologen Gene für *VG1* (Wang et al. 2007) in der Ratte kein achsenspezifisches Muster im Kaninchen und stellt eine ähnliche Verknüpfung dieser beiden Gene im Kaninchen in Frage. Daten von *LASS1* im Huhn und in der Maus liegen nicht zu diesem frühen Entwicklungsstadium vor. Sein ubiquitäre Expression lässt sich auch seine Funktion als Hersteller von Ceramide erklären (Zhao et al. 2011).

LITAF gehört zu den Genen, die im Huhn zu den Markern des posterioren Pols gehören, und ist im Vergleich zu diesen Markern erst zum Ende der Achsenbildung exprimiert. (Fig. 2, L und L', Torlopp et al. 2014), so dass Ähnlichkeiten im Zeitpunkt des Auftretens eines achsenspezifischen Musters im Kaninchen bestehen. In der Maus liegen keine Daten zu diesem frühen Entwicklungszeitpunkt vor. Da *LITAF* in Abhängigkeit von Lipopolysacchariden die Expression von Tumornekrosefaktor und somit die Apoptose von Zellen reguliert (Myokai et al. 1999), passt die ubiquitäre Expression in der Keimscheibe während der Gastrulation. Schließlich findet während der Gastrulation immer wieder Apoptose statt (Sanders et al. 1997).

LRP2 gehört zu den Markern im Huhn, die nur einen schwachen Unterschied zwischen dem anterioren und posterioren Pol zeigen (Torlopp et al. 2014) und relativiert somit die Tatsache, dass kein achsenspezifisches Muster bei der makroskopischen und histologischen Untersuchung gefunden werden konnte. Weil die Expressionsmuster im Huhn noch nicht untersucht sind, kann auch über makroskopisches und histologisches Aussehen der Expressionsunterschiede im Huhn keine Angabe gemacht werden. Möglicherweise liegt ein ähnliches Muster mit nur molekular feststellbaren Unterschieden vor. Entsprechende Expressionsmuster in der Maus lagen zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht vor. *LRP2* ist ein Rezeptor für Lipoproteine und scheint in der Zellkommunikation eine Rolle zu spielen (Myokai et al. 1999; Gotthardt et al. 2000).

4.3 Marker in der frühen Achsenbildung

Unter den untersuchten Genen zeigt *NODAL* als erstes Gen ein achsenspezifisches Muster und dies sogar, bevor morphologisch die Achse feststeht. Damit ist die Reihenfolge der Gene, die ein achsenspezifisches Muster zeigen, invers. Im Huhn erscheint *NODAL* erst kurz vor der Primitivstreifenbildung am posterioren Pol der Keimscheibe (Bertocchini und Stern 2002), während die anderen untersuchten Gene bereits vorher ein achsenspezifisches Muster aufweisen (Torlopp et al. 2014, persönliche Kommunikation C. Stern). Ebenfalls invers ist das Muster: Im Kaninchen zieht sich die flächige Expression zu einer posterior gelegenen Sichel zurück, während sich im Huhn eine posterior gelegene Sichel nach ante-

rior ausbreitet. In diesen beiden Punkten ist *WNT* durch die Expression zuerst in der gesamten Keimscheibe und dann durch die sichelförmige, manchmal ringförmige Expression im Kaninchen (Idkowiak 2007) wie *NODAL* ähnlich invers zum Huhn. Auch die Inhibitoren zeigen durch ihr späteres Erscheinen und inverse Ausbildung hierzu passende Expressionsmuster (Idkowiak et al. 2004a). Die inverse Morphologie der Keimscheibe scheint somit auch in einer inversen molekularen Achsenbildung begründet zu sein.

Mit dem Erscheinen des AMC weisen *EOMES*, *PITX2*, *ID3*, *SALL1*, *PKDCC* und *TBX6* zusätzlich zu *NODAL* ein achsenspezifisches Muster auf, wobei diese auch im AMC exprimiert sind und somit die wichtige Funktion des AMC während der Achsenbildung bestätigen. *EOMES*, *PITX2* und *TBX6* sind durch die Expressionsmuster sowohl in der Ausbildung des ersten morphologischen Zeichens der a.-p. Achse wie auch in der Ausbildung des Primitivstreifens im Kaninchen wie auch im Huhn exprimiert. Ihre noch ungeklärte Funktion im ersten morphologischen Zeichen der a.-p. Achse ist also evolutionär konserviert. Dennoch heben sie somit das duale System aus zwei Polen mit jeweiligen spezifischen Genexpressionen im Hühnerembryo auf. Passend zum dem Primitivstreifen gegenüberliegenden Pol sind mit *ID3* und *SALL1* auch Gene im AMC exprimiert, die die Bildung des Primitivstreifens inhibieren sollen. Es kommt somit zur Überlagerung von Genexpressionen, die inhibieren und aktivierend auf dem Primitivstreifen wirken.

Während *TBX6*, *NODAL* und zu diesen Zeitpunkt auch *SALL1* mit einem Gradienten die molekulare Achse definieren, unterstützen *EOMES*, *PITX2* und *ID3* mit ihren ringförmigen Mustern die Theorie des rotierenden Randes der Keimscheibe, bis die Achse feststeht (Idkowiak et al. 2004c). Besonders *EOMES*, *PITX2* und *ID3* zeigen eine deutlich stärkere Expressionsintensität im Hypoblast als im Epiblast des AMCs und eine eher gleichstarke Expressionsintensität im anterioren Hypoblast wie im Hypoblast und Epiblast am posterioren Pol, so dass molekular der Epiblast am posterioren Pol als die den Unterschied bringende Zellschicht wahrgenommen werden muss. Trotz des molekularen Unterschieds im Epiblast an beiden Polen ist der morphologische Unterschied im Hypoblast. Dies verweist auf jeden Fall auf weitere Gene, die die molekularen Mechanismen zur Bildung der kubischen Zellen des Hypoblasts auslösen und daher nicht im posterioren Hypoblast exprimiert sind wie z. B. *CERBERUS* (Idkowiak et al. 2004). Vielleicht spielen auch die Breitenunterschiede der ringförmigen Muster beim Austarieren der jeweiligen Pole eine Rolle. Das aus histologischer und makroskopischer Sicht symmetrische Expressionsmuster der Gene vor dem Erscheinen der morphologischen Achse scheint zu zeigen, dass der Rand zu Beginn an jeder Stelle sowohl den anterioren Rand als auch den posterioren Rand bilden kann.

4.4 Marker der späten Achsenbildung

Mit Fortschreiten der Achsenbildung zeigen *ELK3* und *SPOCK3* eine schwache Expressionsintensität im PGE und ähneln sich somit trotz ihrer gegensätzlichen Zuordnung im dualen System der Genzuordnungen im Huhn. Beide Gene scheinen im Huhn gegensätzlich exprimiert zu sein, was sich auch im Stadium 3 durch die fehlende Expression von *ELK3* und der vorhandenen Expression von *SPOCK3* im Rand der Keimscheibe und der komplementären Expression im Primitivstreifen des Kaninchens überträgt. In diesem Stadium sind besonders die Expressionen im PGE mit einer hohen Intensität wie *EOMES*, *PITX2* und *ID3* wichtig. Schließlich bildet sich hier das erste evolutionär konservierte Zeichen der a.-p. Achse für Säuger und Vögel. Auch *WNT* (Idkowiak 2007) ist im PGE exprimiert. Während im Huhn *NODAL* und *WNT* den Primitivstreifen induzieren (Skromne und Stern 2001; Bertocchini und Stern 2002), unterscheidet sich das Expressionsmuster im Kaninchen insofern, als *NODAL* und *WNT* sich nur im anterioren Teil des PGE überschneidend exprimieren. Wieso sich der Primitivstreifen trotzdem vom posterioren Pol her bildet und welchen Einfluss *EOMES*, *PITX2* und *ID3* auf die Bildung des Primitivstreifens haben, sind spannende Untersuchungsfragen. *SALL1* und *SPOCK3* könnten durch ihre starke Expression im anterioren Teil der Keimscheibe ihre im Huhn beschriebene inhibitorische Funktion auf den Primitivstreifen wahrnehmen.

Expressionsmuster im Primitivstreifen unterteilen diesen in verschiedene Abschnitte. Das passt zu dem Schicksal der Zellen in den jeweiligen Abschnitten im Huhn (Psychoyos und Stern 1996). Die untersuchten Gene bestätigen diese Unterteilung des Primitivstreifens im Kaninchen. Während *PITX2*, *EOMES*, *ELK3* und *SALL1* im gesamten Primitivstreifen exprimiert sind, sind *NODAL* und *PKDCC* im anterioren und *TBX6*, *ID3* und *SPOCK3* im posterioren Primitivstreifen exprimiert. Um die genaue Funktion dieser Gene in den jeweiligen Abschnitten herauszufinden, bedarf es weitere Untersuchungen.

4.5 Neue Domänen im Kaninchenembryo

4.5.1 Die anteriore Gastrulationsscheibe (AGP)

Im Gegensatz zu *ID3* und *EOMES* sind *PKDCC* nur und *ELK3*, *SPOCK3*, *SALL1* sowie *TBX6* stärker im Teil der Keimscheibe anterior zum PGE exprimiert und verlangen eine genauere Untersuchung dieses Teils der Keimscheibe. Histologisch kann dieser Teil durch hochprismatische Zellen von den kubischen Zellen des Epiblasten abgrenzt werden. In Hinblick auf die Form wird dieser Bereich die anteriore Scheibe und mit Hinblick auf ihre Funktion als Ausgangspunkt für die Verlängerung einer ihre Seiten zum PGE und das dortige Stattfinden der Gastrulation die anteriore Gastrulationsscheibe (im englischen: *anterior gastrula platte*, AGP) genannt. Mit der starken Expression von *SALL1* und in den späteren

Stadien *SPOCK3* sind eher Gene exprimiert, die auch im anterioren Teil der Keimscheibe des Huhns exprimiert sind, d.h. inhibierend auf die Bildung des Primitivstreifens wirken sollen. Ob es eine ähnliche Region auch in anderen Säugern gibt, muss erst noch untersucht werden. In der Maus würde sich die Region vom AVE bis zur Region, wo die Spitze des Primitivstreifens zu liegen kommt, anbieten. Die molekularen Marker wie *SALL1*, *PKDCC* und *SPOCK3* müssen nun in der Maus untersucht werden.

4.5.2 Die Domäne des anterioren Primitivstreifens (ASD)

Sowohl *NODAL* als auch *PKDCC* zeigen im Stadium 2 eine Expressionsdomäne, die an der Grenze bzw. auf der Grenze zwischen der AGP und der PGE liegt. Interessanterweise korreliert diese Expressionsdomäne mit dem anterioren Teil des Primitivstreifens im Stadium 3, so dass dieser molekular definierte Bereich der Keimscheibe Domäne des anterioren Primitivstreifens (*anterior streak domain*, ASD) genannt wird. Weil *CHORDIN* (Weisheit 2002) ein Marker für den später in der Entwicklung entstehenden Knoten, ebenfalls in der ASD exprimiert ist und *NODAL* auf den anterioren Teil des Primitivstreifens begrenzt ist, deutet diese Koexpression auf eine gemeinsame Entstehungsregion von Knoten und anterioren Primitivstreifen hin. Die Topographie erinnert an den *mid gastrula organizer* in der Maus (Tam et al. 1997; Tam und Behringer 1997; Kinder et al. 2001; Tam et al. 2001) und stellt somit die Frage, ob der ASD nicht auch Potential eines Organisators hat (Anderson und Stern 2016).

Die ASD scheint bereits durch die sichelförmige Expression von *NODAL* und die Expression von *PKDCC* im Epiblast im Stadium 1 vor der Elongation der Keimscheibe molekular den posterioren Pol der AGP zu definieren. Insofern bildet sich der ASD kurz vor oder zusammen mit dem AMC, nur auf der entgegengesetzten Seite. Der ASD kann somit als zweites molekulares Zeichen der a.-p. Achse gesehen werden. Von dieser Region aus kommt es durch Zellteilungen und Zellbewegungen zur Ausbildung des PGE (Stankova et al. 2015). Hierzu passt die Expression von *NODAL* und *PKDCC* in den anterioren Zellen des PGEs.

4.6 Das Drei-Anker Modell

Mit den neu beschriebenen Domänen im Kaninchenembryo kann das bestehende Modell der Achsenbildung im Kaninchen als Modell für Säuger mit flacher Keimscheibe erweitert werden: Die unpolare Keimscheibe im Stadium 0 lässt sich molekular in einen peripheren Rand (*margin*), der durch u. a. *ID3* markiert ist, und einen zentralen Bereich (*inner cycle*), der durch *PKDCC* markiert ist, unterteilen. Gene wie *NODAL* fangen an, ein achsenspezifisches Muster zu etablieren. Infolgedessen könnte sich das Zentrum ausdehnen und der molekulare Rand so seine Form verändern, dass asymmetrische Ringmuster wie das von *EOMES* und *ID3* entstehen. Dabei kommt es zu Rotationsbewegungen des Randes

(Idkowiak et al. 2004). Der AMC entsteht als erstes morphologisches Zeichen der a.-p. Achse, sozusagen als erster Anker der Achse. Auf der gegenüberliegenden Seite bildet sich am posterioren Rand der Keimscheibe im Hypoblasten und Epiblasten eine Expressionsdomäne namens ASD aus, die zum einen die a.-p. Achse vollständig definiert, die als Ausgangspunkt für die Elongation der Keimscheibe betrachtet werden muss und die die Lage des Primitivstreifens vordefiniert. Der ASD ist somit der zweite Anker. Zum Schluss der Achsenbildung entsteht nun nach der Elongation am posterioren Pol der Keimscheibe der Primitivstreifen. Somit gibt es drei wichtige Anker der Achsenbildung: den AMC, den ASD und den posterioren Pol der Keimscheibe, von dem sich der Primitivstreifen bildet. Im Huhn dagegen gibt es nur ein Zwei-Anker Modell: den molekular definierten vorderen Rand (Arias et al. 2017) und posterior die Koller-Sichel und den Ausbildungsort des Primitivstreifens. Im Vergleich besitzt das Kaninchen somit eine besser abgesicherte Achsenbildung als das Huhn. Inwieweit dies Einfluss auf die Entstehung von multiplen Primitivstreifen hat und sich dieses Drei-Anker Modell auf weitere Säuger übertragen lässt, muss weiter untersucht werden. Sollte sich dieses Modell auf weitere Säuger anwenden lassen, könnte dieses Modell auch für den Menschen gelten. Desweiteren wäre es wichtig herauszufinden, ob einer der drei Anker das Potential eines Organisators (Anderson und Stern 2016) hat bzw. dieses entwickelt. In diesem Fall würden bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Gastrulation die Zellen in der Umgebung induziert, sich ihrem Schicksal entsprechend zu differenzieren. Neben einer morphologischen wäre somit eine molekulare „Archigastrola“ geschaffen: das Nieuwkoop-Zentrum der Amphibien induziert die morphologische Struktur des Mangold-Spemann-Organisators (Wolpert et al. 2015) und die ASD der Säuger den nach Victor Hensen genannten Knoten des Primitivstreifens.

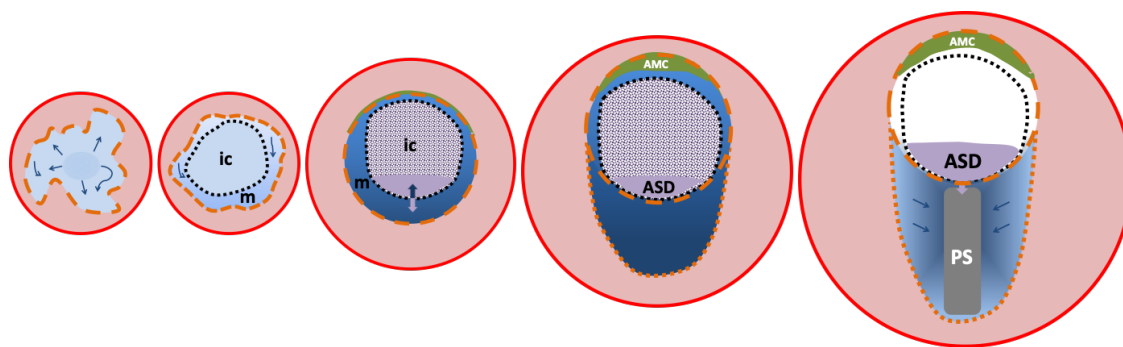


Abbildung 11: Modell zur Entwicklung des Kaninchenembryos bis zur Gastrulation Die schematische Zeichnung zeigt den polaren Pol der Blastozyste (roter Kreis) mit der Keimscheibe (orange gestrichelte Linie). In den späteren Keimscheiben ist die Keimscheibe in die AGP (orange gestrichelte Linie) und die PGE (orange gepunktete Linie) unterteilt. Durch Rotation (blaue Pfeile) am Rand der Keimscheibe kommt es zur Verschiebung der Zellen des Zentrums (ic) und zur Ausbildung eines molekular definierten Randbereichs (m). An einem Pol der Keimscheibe, der Seite mit dem breitesten Rand gegenüberliegend, bildet sich der AMC (grün). Im Zentrum der Keimscheibe (ic), in unmittelbarer Nähe zu diesem Rand, kann eine molekular definierte Region beschrieben werden, der ASD (violett). Es kommt zur Elongation der Keimscheibe am posterioren Rand und der Primitivstreifen (grau) entsteht.

5 Zusammenfassung

Während der Gastrulation sind die morphologischen Entwicklungsschritte bei den Wirbeltieren bereits gut erforscht. Asymmetrische Expressionsmuster sind das erste Zeichen einer a.-p. Achsenbildung und somit Beginn der Gastrulation. Frühe molekulare Marker der a.-p. Achse sind im Huhn und teilweise auch in der Maus bekannt. Diese Modellorganismen lassen die Ähnlichkeit in der Morphologie oder die phylogenetische Nähe zum Menschen im Gegensatz zum Kaninchen, das als Modellorganismus mit einer flachen Keimscheibe die meisten Säuger repräsentiert, vermissen. Die Expressionen der molekularen Marker konnten durch die gewählte Methodik, die Gene aus dem Kaninchen zu klonieren, entsprechende Sonden zu entwickeln, die Expressionen der jeweiligen Gene durch die *In-Situ*-Hybridisierungen im Kaninchenembryo zu färben und histologisch zu untersuchen, dargestellt werden. Die genspezifischen Muster ließen sich in ringförmige Muster wie *PITX2*, *EOMES*, *SALL1* und *ID3* und flächige Genexpressionen mit unterschiedlich starken Gradienten wie *NODAL*, *TBX6*, *ELK3*, *PKDCC*, *SALL1*, *SPOCK3*, *LITAF* und *DENND5B* unterteilen. *NODAL* weist vor dem Erscheinen der morphologischen Achse, *EOMES*, *PITX2*, *ID3*, *SALL1*, *PKDCC* und *TBX6* weisen mit dem ersten morphologischen Zeichen (AMC), *ELK3* und *SPOCK3* mit dem zweiten morphologischen Zeichen (PGE), und *LITAF* und *DENND5B* nach Abschluss der Achsenbildung ein achsenspezifisches Muster auf. Die molekulare a.-p. Achsenbildung im Kaninchen zeigt ein invertiertes Muster durch die Abnahme im Gegensatz zum Erscheinen von Expressionen im Huhn und eine invertierte zeitliche Abfolge der achsenspezifischen Genexpressionen und zeigt somit eine Anpassung an die morphologisch invertierte Achsenbildung. Im AMC waren sowohl im Huhn als posteriore Marker bekannte Gene exprimiert - passend zum ersten morphologischen Zeichen der a.-p. Achse – als auch im Huhn als anteriore Marker bekannte Gene exprimiert – passend zur Inhibition des Primitivstreifens am von diesem entgegengesetzten Pol. Das duale Prinzip aus dem Huhn, Gene in anteriore Marker und posteriore Marker aufzuteilen, ist durch ein komplexeres System im Kaninchen ersetzt: Rand und Zentrum der Keimscheibe scheinen Teil dieses Systems zu sein wie auch die durch die Expressionsmuster von *PKDCC* und *NODAL* molekular definierte Struktur des ASDs. Zusammen mit dem AMC und dem posterioren Pol des PGE sorgen diese drei „Anker“ im gleichnamigen Modell für die Stabilität der Achsenbildung im Kaninchenembryo. In der Forschung nach den Ursachen für multiple Achsen könnte der molekulare ASD neben dem AMC eine Schlüsselrolle einnehmen, weil diese beiden Punkte die a.-p. Achse definieren. In Anlehnung an das Zitat von Wolpert (s.o.) bleibt Gastrulation einer der spannendsten Zeitpunkte im Leben eines Menschen.

6 Veröffentlichungen

Hier werden der Zeitschriftenartikel, der aus dieser Arbeit entstanden ist, und die Tagungsbeiträge aufgelistet.

6.1 Zeitschriftenartikel

Plöger, R. and Viebahn, C., 2018. Pitx2 and nodal as conserved early markers of the anterior-posterior axis in the rabbit embryo. *Annals of Anat* 218, 256-264.

6.1.1 Nutzungsrechte

Dear Mr Plöger

Thank you for your email. Please note that, as one of the Authors of this article, you retain the right to reuse it in your thesis/dissertation. You do not require formal permission to do so. You are permitted to post this Elsevier article online if it is embedded within your thesis. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication. You are also permitted to post your Author Accepted Manuscript online. However posting of the final published article is prohibited.

*“As per our Sharing Policy, authors are permitted to post the Accepted version of their article on their institutional repository – as long as it is for **internal institutional use only**. It can only be shared publicly on that site once the journal-specific embargo period has lapsed You are not permitted to post the Published Journal Article (PJA) on the repository.”*

Please feel free to contact me if you have any queries. Kind regards

Anita Mercy,

Senior Copyrights Coordinator – Copyrights Team, **Elsevier** | Health Content Operations (A division of Reed Elsevier India Pvt. Ltd.) Ascendas International Tech Park, Crest – 12th Floor | Taramani, Chennai 600113 • India | Tel: +91 4442994696 a.vethakkan@elsevier.com

6.2 Tagungsbeiträge

Plöger, R, Stankova, V, Bertochini F, Viebahn C (2015): Extraembryonic Gata2 expression and the emerging anterior-posterior axis in the rabbit embryo. EMBO Workshop, Embryonic-Extraembryonic Interfaces, Göttingen (Deutschland), Poster

Plöger, R, Stern C, Viebahn C (2016): Pitx2, the hypoblast and axial inversion in pre-streak amniote embryos. 111th Annual Meeting of the Anatomical Society, Göttingen (Deutschland), Vortrag

Plöger, R, Viebahn C (2018): The primitive streak in amniotes: the evolutionary conserved genes pitx2 and nodal. 1st Alpine Anatomical Research Conference, Innsbruck (Österreich), Vortrag

- Plöger, R, Viebahn C (2018): The secreted tyrosine kinase PKDCC and the wnt pathway during gastrulation in the rabbit embryo. Joint Meeting of the German and Israeli Societies of Developmental Biology, Wien (Österreich), Poster
- Plöger, R, Viebahn C (2019): Molecular axis formation in the rabbit embryo. XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, Stara Zagora (Bulgarien), Vortrag

7 Anhang

7.1 Materialien

Die Materialien werden einmalig aufgelistet.

7.1.1 Laborgeräte

Arbeitsbank (steril)	Heraeus (Hanau)
Brutschrank, Heraeus 150 Tri-Gas Cell Culture Incubator	Heraeus (Hanau)
Computer	Dell (Round Rock, USA)
Elektrophoresekammer	AGS GmbH (Heidelberg)
Feinwaage, Sartorius TE214S	Sartorius (Göttingen)
ISH Gerät, Biolane HTI	Hölle & Hüttner (Tübingen)
Mikrotom Jung RM2065	Leica (Bensheim)
Mikrowelle, MD10482	Medion (Mühlheim)
MiniCentrifuge Model GMC-060	UMS Co LTD
Photometer, BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
	Gilson inc. (Middleton, WI, USA)
Pipetus	Eppendorf (Hamburg)
	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Schüttel-Inkubator, Innova™ 4000 Inkubator	New Brunswick Scientific (Nürnberg)
Shaker	
Spannungsgerät <i>Shandon Southern</i> SAE2761	Vokam (Manchester, GB)
Thermoblock	Grant instruments (Cambridge, GB)
<i>Thermocycler</i> , PTC-200 Peltier Thermal cyler	Biozym (Oldendorf)

Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
UV Tisch Epichemi3 Darkroom und Kamera INTAS302	Intas (Göttingen)
Vortex, Heidolph REAX top	Heidolph (Schwabach)
Waage, Sartorius excellence	Sartorius (Göttingen)I
Wasserbad, Lauda A 100	Lauda (Lauda- Königshofen)
Wippe (elektrisch), Vari-Mix	Barnstead/Thermoline (Dubuque, USA)
Wolframnadel	Agar scientific (Stansted GB)
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)

7.1.2 Mikroskopie

Stereolupe Stemi SV11	Zeiss (Jena)
mit Digitalkamera	Visitron systems (Puchheim)
Mikroskop, Axioplan 2	Zeiss (Oberkochen)
mit Kamera	Intas (Göttingen)
Immersionsöl für Mikroskopie	Merck KGaA (Darmstadt)

7.1.3 Verbrauchsmaterial

24-Well-Platten	Sarstedt (Nümbrecht)
4-Well-Platten	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Bakterien-Kultur-Röhrchen T406-2A	Simport (Beloeil, QC, Kanada)
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Filtertips TipOne 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab (Ahrensburg)
Kryogefäße, Micro-Röhrchen, 2ml	Starstadt (Nümbrecht)
Küvetten, UVette® Photometer 220-1600 nm	Eppendorf (Hamburg)
Multipette Combitips	Eppendorf (Hamburg)
Nitrilhandschuhe	Kimberley-Clark (Koblenz)
Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)

Organkulturschalen, Falcon ®	Becton, Dickinson Labware and Company (Le Pont de Claix, Frankreich)
Parafilm	Pechiney plastic packaging (Chicago)
Petrischalen (Ø 4 cm, 6 cm, 10 cm)	Greiner-Bio-One GmbH (Frickhausen)
Polypropylenröhrchen 20 ml mit Deckel	Elkay (Hampshire, GB)
Reaktionsgefäße für PCR: 0,5 ml, 1,5 ml, 2ml	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 20 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Skalpellklingen	Aeskulap (Tuttlingen)
Tablettenhülsen	Bayer (Leverkusen)
Zentrifugenröhrchen Eco 50 ml, Rotilabo®	Roth (Karlsruhe)

7.1.4 Allgemeine Laborchemikalien

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma (München)
Ethanol absolut	Merck und AppliChem (Darmstadt)
EDTA	Fluka (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze)
Formamid	Fluka (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze)
Glycerol wasserfrei, reinst	Merck KGaA (Darmstadt)
LiCl ₂	Calbiochem, Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mowiol 4-88	Hoechst (Frankfurt)
NaCl	AppliChem (Darmstadt)
Tris für Molekularbiologie	AppliChem (Darmstadt)

7.1.5 Standardlösungen

PFA	Merck KGaA (Darmstadt), Roth
-----	------------------------------

	GmbH&Co (Karlsruhe), Serva (Heidelberg)
PBS	Roche (Mannheim)
PBS Dulbecco	Biochrom (Berlin)
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma (München)

7.1.6 Chemikalien für die Gelelektrophorese

DNA-Marker 100 bp, Marker III	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ethidiumbromidlösung (0,07%)	AppliChem (Darmstadt)
<i>Loading-Dye</i> -Lösung	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNA-Probenpuffer	Roche (Mannheim)
Seakem LE AgarosegelGel	Cambrex (Charles City, IA, USA)
TAE-Puffer 50X	AppliChem (Darmstadt)

7.1.7 Labortiere

Kaninchen	Charles River (in Frankreich)
-----------	-------------------------------

7.1.8 Pharmakologische Substanzen

Narcoren® (Pentobarbital-Natrium)	Mexical GmbH (Habergmoos)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Heparin	Sigma (München)

7.1.9 Substanzen für die Molekularbiologie (ink. Primer)

Desoxyribonukleosid-Triphosphate	Roche (Mannheim)
MgCl ₂	Roche (Mannheim)
NucleoSpin Extract II-Kit (TE-Puffer, NT-Puffer, Säulchen, NT3-Puffer, NE-Puffer)	Mackerey-Nagel (Düren)
PCR-Puffer 10x	Roche (Mannheim)
Taq-Polymerase	Roche (Mannheim)

5X First-strand reaction buffer	Fermentas (St.Leon-Rot)
Oligo-dT-Primer CDSIIA	Biomers.net GmbH (Ulm)
Primer (s. u.)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
<i>Reverse Transcriptase</i> mit Reaktionspuffer	Promega (Fitchburg, USA)
Ribonukleaseinhibitor: RNase Out	Promega (Fichtburg, USA)
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen (Venlo, Niederlande)

Primer:

DENND5B, forward Primer 5'- GAAGGTGGACCTCTCTTCGC -3'

DENND5B, reverse Primer 5'- CCACAAAGCTGACTTCCCCT -3'

ELK3, forward Primer 5'- TGTACACGAACTTCTGCCCGATCA -3'

ELK3 reverse Primer 5'- TAGCCGGGCAGGACTCAATG -3'

EOMES, forward Primer 5'- GCAGGCGCATGTTTCCATTC -3'

EOMES, reverse Primer 5'- CGTCTTCACAGCCTGCTTCTC -3'

GAPDH, forward Primer 5'- GCTTCTTCTCGTGCAGTGCTAG -3'

GAPDH, reverse Primer 5'- GCAGATTCTCAGCGTGGTGG -3'

ID3, forward Primer 5'- CTCGTGTGCATCTCCGAAGC -3'

ID3, reverse Primer 5'- CCACCCAAGTTCACAGTCCTTC -3'

LASS1, forward Primer 1 5'- TACATGGACACCTGGCGCAA -3'

LASS1, forward Primer 2 5'- TACCACAACGTGGGCATCCT -3'

LASS1, reverse Primer 5'- GTACAGGAACCAGTAGAGGTTTCAT -3'

LITAF, forward Primer 5'- GTTCAGGCTAGTGTTGGTGG -3'

LITAF, reverse Primer 5'- GCGACTCCAAGCAGCAATTC -3'

LRP2, forward Primer 5'- CCACACTTCTCCCTTCTCCTTAGA -3'

LRP2, reverse Primer 5'- GCACAGCTAAAGGCCGTCAAG -3'

PKDCC, forward Primer 5'- TCGGTCCCTCAACGTGCTCTTC -3'

PKDCC, reverse Primer 5'- GCATTATTGCACGTTTGTCTCTGG -3'

SALL1, forward Primer 5'-CCACGTTACCAACCCCTCTG-3'

SALL1, reverse Primer 5'- GCCAGATTAAGACCGCCTAG-3'

SPOCK3, forward Primer 1 5'- TGGCTCGGCGATGCCAAGTT -3'
SPOCK3, forward Primer 2 5'- TGGCGAACAGATTACGGGAC-3'
SPOCK3, reverse Primer 1 5'- TCCCAAGCACGCATTGTCTG -3'
SPOCK3, reverse Primer 2 5'- GACTCGTTAGTGACCTGGGC -3'
TBX6, forward Primer 1 5'- GCAGGTGAGCGTTGTTCCAG -3'
TBX6, forward Primer 2 5'- AGGCAGCTTGACCTGAAGAC -3'
TBX6, reverse Primer 5 5'- 5' AGAGCCTCCCTCCATTCACAC -3'
VG1, forward Primer außen 1 5'- CCGTGCCACGTGGAGGAGCT -3'
VG1, forward Primer außen 2 5'- CTGTGCCYCKGTCATGTGGMG -3'
VG1, forward Primer innen 1 5'-ACCTGTGCCTCCTGTCATGTGGCG -3'
VG1, forward Primer innen 2 5'- GGCCATGCCACGTGGAGGARYT -3'
VG1, reverse Primer innen 1 5'- CCTGGCAGTAGTTGGCTAGG -3
VG1, reverse Primer innen 2 5'- GTGCCCTGGCAWAGTTGGC -3'
VG1, reverse Primer außen 1 5'- GAGCACAGAGATAGGCGATAG -3'
VG1, reverse Primer außen 2 5'- AGCCACACTCATCCACCATGT -3'

Die Sequenzen der Gene konnten mittels der Hilfe von Pubmed ermittelt werden und in *A plasmid Editor* übertragen werden. Die Primer wurden designend und auf Ihre Spezifität für das Kaninchen untersucht und von der Firma Thermo Fisher bezogen.

Zur Herstellung der Sonde für die Gene *PITX2* und *NODAL* wurde auf die Arbeit von Fischer et al. (2002) zurückgegriffen.

7.1.10 Substanzen für die Bakteriologie

<i>Eco</i> RI Restriktionsendonuklease und Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
E. coli vom Stamm DH5 α	Laborbestand
<i>Ligationskit</i>	Promega (Mannheim)
Natrium-Acetat	Merck KGaA (Darmstadt)
<i>Plasmid Purification kits</i>	Qiagen (Venlo, Niederlande)
Tango Puffer	Thermo Fisher (Waltham, USA)

7.1.11 Nährmedien und Zusätze

Agar	Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
IPTG	Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Trypton	Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
X-Gal	Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Yeast extract für Bakteriologie	Roth GmbH&Co (Karlsruhe)

SOB-Medium: 10 g Trypton, 2,5 g Hefeextrakt, 0,25 g NaCl wurden in 500 ml bidestillierten Wasser aufgelöst, gut mischt und autoklaviert.

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, wurden mit 950 ml bidestilliertem Wasser gemischt. Ein pH-Wert von 7 wurde mit NaOH eingestellt. Mit bidestillierten Wasser wurde auf 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wurde autoklaviert. Pro 200 ml wurden 3 g Agar und X-Gal hinzugeben. Nach Aufkochen wurde 400 µl Ampicillin hinzugeben. Das Medium wurde in die Platten gegossen und es wurde gewartet bis das Medium abgekühlt war.

7.1.12 Substanzen für den RNA-Sondenbau

Dig-RNA-Labeling Mix	Roche (Mannheim)
RNA-Polymerase SP6	Roche (Mannheim)
RNA-Polymerase T3	Roche (Mannheim)
RNA-Polymerase T7	Roche (Mannheim)
Transkriptionspuffer 10X	Roche (Mannheim)

7.1.13 Substanzen für die *In-Situ*-Hybridisierung

BBR	Roche (Mannheim)
Anti-Digoxigenin-Antikörper	Roche (Mannheim)
BM-Purple	Roth (Mannheim)
Chaps (3-((3Cholamidipropyl) dimethylaminonio)-1-propane sulfonate)	Biomol (Hamburg)
Heparin	Novo, Applichen (Darmstadt)

Levamisol	Sigma (Taufkirchen)
Maleinsäure	Serva (Heidelberg)
NGS	Sigma (München)
Proteinase K	Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg)
SSC (Saline-sodium citrate buffer)	Sigma (Taufkirchen)
t-RNA	Sigma (München)
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat)	Roche (Mannheim), Sigma (Taufkirchen)

7.1.14 Lösungen für die *In-Situ*-Hybridisierung

DEPC-H₂O: 1000 ml bidestillierten Wasser und 1ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) wurden gemischt, 2h unter dem Abzug bei Raumtemperatur und regelmäßigem Rühren stehen gelassen, zum Abschluss autoklaviert.

PBT: Tween 20 wurde in PBS-DEPC gegeben, bis ein Gehalt von 0,1% Tween 20 in PBS-DEPC erreicht wurde.

PBS-DEPC: Es wurden 100 ml 10x PBS und 900 ml DEPC-H₂O gemischt.

Proteinase K-Lösung: Es wurden 100 mg Proteinase K mit 10 ml DEPC-H₂O gemischt. Bis zum Benutzen erfolgte die Lagerung bei -20°C.

MAB: 100ml Maleinsäure (Endkonzentration 100 mM) und 100 ml NaCl (Endkonzentration 150mM) wurden mit Aqua bidest zu 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit NaOH-Zugabe auf 7,5 eingestellt.

MABT: Zum Erreichen der Endkonzentration von 0,1% wurde 999 ml MAB und 1ml Tween gemischt.

NTMT: Es wurden 40 ml Tris (1M), 8 ml NaCl (5M), 20 ml MgCl₂ (1M), 0,8 ml Levamisol (1M), 0,4 ml Tween mit bidestilliertem Wasser auf 400 ml aufgefüllt.

BBR: 5g BBR wurden in 50 ml MAB aufgelöst, 30 min lang bei 70°C gemischt und bei 20°C bis zum Gebrauch gelagert.

Chaps: 1 g Chaps wurden in 10 ml DEPC-H₂O gelöst, steril filtriert und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Heparin: 50 mg Heparin wurden in 1 ml DEPC-H₂O gelöst.

t-RNA: Es wurden 2000 U in 10 ml DEPC-H₂O gegeben, steril filtriert und bei -20°C bis zum Einsatz gelagert.

20x SSC: Die Gebrauchslösung wurde auf pH 4,5 einstellen.

Hybemix 50ml (180ml für 10 Körbchen): Folgende Substanzen wurden zusammengegeben:

Formamid	25 ml
20x SSC (pH 4,5)	3,5 ml
t-RNA (10mg/ml)	0,25 ml
0,5 M EDTA (pH 8)	0,05 ml
Tween 20	0,1 ml
10% Chaps	2,5 ml
Heparin (50mg/ml)	0,05 ml
DEPC-H ₂ O	18,6 ml

7.1.15 Materialien für die histologische Aufbereitung

Technovit 8100-Kit (Infiltrationsmedium, Härter 1, Härter 2) Heraeus Kulzer, Mitsui Chemicals Group, Hanau

7.1.16 Software

<i>A plasmid Editor</i>	Wahny Davis (Universität von Utah)
BLAST	NCBI (USA)
CrustalW2	European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg)
Word	Microsoft (Redmond, USA)
Zotero	Roy Rosenzweig Center for History and New Media (George Mason University)

8 Literaturverzeichnis

- Anderson C, Stern C (2016): Organizers in Development. *Current Topics in Developmental Biology* 117, 435-54
- Andersson O, Bertolino P, Ibanez C (2007): Distinct and cooperative roles of mammalian Vg1 homologs Gdf1 and Gdf3 during early embryonic development. *Developmental Biology* 311, 500-11
- Arias C, Herrero M, Stern C, Bertocchini F (2017): A molecular mechanism of symmetry breaking in the early chick embryo. *Scientific Reports* 7, 15776
- Arnold S, Hofmann U, Bikoff E, Robertson E (2008): Pivotal roles for Eomesodermin during axis formation, epithelium-to-mesenchyme transition and endoderm specification in the mouse. *Development* 135, 501-11
- Bancroft M, Bellairs R (1974): The onset of differentiation in the epiblast of the chick blastoderm. *Cell and Tissue Research* 155, 399-418
- Beddington R, Rashbass P, Wilson V (1992): Brachyury – a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Development Supplement* 0 157-165
- Behringer R, Wakamiya M, Tsang T, Tam P (2000): A flattened mouse embryo: leveling the playing field. *Genesis* 28, 23-30
- Bellairs R, Lorenz F, Dunlab T (1978): Cleavage in the chick embryo. *Development* 43, 55-69
- Belo J, Bouwmeester T, Leyns L, Kertesz N, Gallo M, Follettie M, De Robertis E (1997): Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mechanisms of Development* 68, 45-57
- Bodemann E (1935): A case of uniovular twins in the mouse. *Anatomical Record* 62, 291-294
- Bertocchini F, Stern C (2002): The hypoblast of the chick embryo positions the primitive streak by antagonizing nodal signaling. *Developmental Cell* 3, 735-44
- Bertocchini F, Stern C (2012): Gata2 provides an early anterior bias and uncovers a global positioning system for polarity in the amniote embryo. *Development* 139, 4232-8
- Brennan J, Lu C, Norris D, Rodrigues A, Beddington R, Robertson J (2001): Nodal signaling in the epiblast patterns the early mouse embryo. *Nature* 411, 965-969
- Brunner M, Peng X, Liu G, Ren X, Ziv O, Choi B, Mathur R, Hajjiri M, Odening K, Steinberg E, Folco E, Pringa E, Centracchio J, Macharzina R, Donahay T, Schofield L, Rana N, Kirk M, Mitchell G, Poppas A, Zehender M, Koren G (2008): Mechanisms of cardiac arrhythmias and sudden death in transgenic rabbits with long QT syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 118, 2246-59

- Callebaut M, Van Nueten E (1994): Rauber`s (Koller`s) Sickle: the early gastrulation organizer of the avian blastoderm. *European Journal of Morphology* 32, 35-48
- Chapman D, Agulmnik I, Hancock S, Silver L, Papaioannou V (1996): Tbx6, a mouse T-box gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation. *Developmental Biology* 180, 534-42
- Chapman D, Cooper-Morgan A, Harrelson Z, Papaioannou V (2003): Critical role for Tbx6 in mesoderm specification in the mouse embryo. *Mechanisms of Development* 120, 837-47
- Chapman S, Schubert F, Schönwolf G, Lumsden A (2002): Analysis of spatial and temporal gene expression patterns in blastula and gastrula stage chick embryos. *Developmental Biology* 245, 187-99
- Chen C, Ware S, Sato A, Houston-Hawkins D, Habas R, Matzuk M, Shen M, Brown C (2006): The Vg1-related protein Gdf3 acts in a Nodal signaling pathway in the pre-gastrulation mouse embryo. *Development* 133, 319-29
- Chi D, Zhang W, Jia Y, Cong D, Hu Shaoshan (2019): Spalt-like transcription factor 1 (SALL1) gene expression inhibits cell proliferation and cell migration of human glioma cells through the Wnt/ β -Catenin signaling pathway. *Medical Science Monitor Basic Research* 25, 128-138
- Christy B, Sanders L, Lau F, Copeland N, Jenkins N, Nathans D (1991): An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor – inducible gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 1815-1819
- Conlon F, Lyons K, Takaesu N, Barth K, Kispert A, Herrmann B, Robertson E (1994): A primary requirement for Nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 120, 1919-28
- Deed R, Bianchi S, Atherton G, Johnston D, Santibanez-Koref M, Murphy J, Norton J (1993): An immediate early human gene encodes an Id-like helix-loop-helix protein and is regulated by protein kinase C activation in diverse cell types. *Oncogene* 8, 599-607
- Deed R, Hirose T, Mitchell E, Santibanez-Koref M, Norton J (1994): Structural organization and chromosomal mapping of the human Id-3 gene. *Gene* 151, 309-314
- Ding Y, Colozza G, Zhang K, Moriyama Y, Ploper D, Sosa E, Benitez M, De Robertis E (2017): Genome-wide analysis of dorsal and ventral transcriptomes of the *Xenopus laevis* gastrula. *Developmental Biology* 426, 176-187
- Ducret C, Maira S, Lutz Y, Wasylyk B (2000): The ternary complex factor Net contains two distinct elements that mediate different responses to MAP kinase signaling cascade. *Oncogene* 19, 5063-72
- Duranthon V, Beaujean N, Brunner M, Odening K, Santos A, Kacs Kovics I, Hiripi L, Weinstein E, Bosze Z (2012): On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Research* 21, 699-713

- Ellmeier W, Aguzzi A, Kleiner E, Kurzbauer R, Weith A (1992): Mutually exclusive expression of a helix-loop-helix gene and N-myc in human neuroblastomas and in normal development. *EMBO Journal* 11, 2563-2571
- Enders A (2003): Implantation in the nine-banded armadillo: how does a single blastocyst form four embryos? *Placenta* 23, 71-85
- Eyal-Giladi H, Kochav S (1976): From Cleavage to Primitive Streak Formation: A Complementary Normal table and a new look at the first stages of the development of the chick, *General Morphology. Developmental Biology* 49, 321-337
- Eyal-Giladi H (1984): The gradual establishment of cell commitments during early stages of chick development. *Cell Differentiation* 14, 245-255
- Fabian B, Eyal-Giladi (1981): A SEM study of cell shedding during the formation of the area pellucida in the chick embryo. *Journal of Embryology and experimental Morphology* 64, 11-22
- Feistel K, Blum M (2008): Gap junctions relay FGF8-mediated right-sided repression of Nodal in rabbit. *Developmental Dynamics* 237, 3516-27
- Ferm V (1963): Congenital malformations in hamster embryos after treatment with vinblastine and vincristine. *Science* 141, 246
- Fischer A, Viebahn C, Blum M (2002): FGF8 acts as a right determinant during establishment of the left-right axis in the rabbit. *Current Biology* 12, 1807-16
- Fischer B, Viebahn C, Navarrete Santos A, Duranthon V (2012): Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* 144, 1-10
- Gage P, Suh H, Camper S (1999): Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* 126, 4643-4651
- Gamow E, Daniel J (1970): Fluid transport in the rabbit blastocyst. *Wilhelm Roux`Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 164, 261-278
- Giovane A, Pintzas A, Maira S, Sobieszczuk P, Wasyluk B (1994): Net, a new Ets transcription factor that is activated by RAS. *Genes & Development* 8, 13
- Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan A, Blumen C, Niehrs C (1998): Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357-62
- Gräper L (1929): Die Primitiventwicklung des Hühnchens nach stereokinematographischen Untersuchungen, kontrolliert durch vitale Farbmarkierung und verglichen mit der Entwicklung anderer Wirbeltiere. *Wilhelm Roux`Archiv Entwicklungsmechanik der Organismen* 116, 382-429
- Goncalves L, Filipe M, Marques S, Salgueiro A, Becker J, Belo J (2011): Identification and functional analysis of novel genes expressed in the anterior visceral endoderm. *International Journal of Developmental Biology* 55, 281-95

- Gordon S, Neufeld E, Yang Z, Pryor M, Freeman L, Fan X, Kullo I, Biesecker L, Remaley A (2019): Dennd5b regulates intestinal triglyceride absorption and body mass. *Scientific Reports* 9, 3597
- Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt M, Shelton J, Richardson J (2000): Interactions of the low-density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25616-25624
- Haeckel E (1874): Die Gastraea-Theorie: die phylogenetische Classification des Thierreiches und die Homologie der Keimblätter. *Jenaische Zeitung für Naturwissenschaften* 8, 1-55
- Halacheva V, Fuchs M, Donitz J, Reupke T, Puschel B, Viebahn C (2011): Planar cell movements and oriented cell division during early primitive streak formation in the mammalian embryo. *Developmental Dynamics* 240, 1905-16
- Haley W (1954): Late London edition. *THE TIMES* 52, 909
- Hamburger V, Hamilton H (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics* 88, 49-92
- Hancock S, Agulnik S, Silver L, Papaioannou V (1999): Mapping and expression analysis of the mouse ortholog of *Xenopus Eomesodermin*. *Mechanisms of Development* 81, 205-8
- Hardy K, Yatskievych T, Konieczka J, Bobbs A, Antin P (2011): FGF signaling through RAS/MAPK and PI3K pathways regulates cell movement and gene expression in the chicken primitive streak without affecting E-cadherin expression. *BMC Developmental Biology* 11, 20
- Hassoun R, Schwartz P, Feistel K, Blum M, Viebahn C (2009): Axial differentiation and early gastrulation stages of the pig embryo. *Differentiation* 78, 301-11
- Hopf C, Viebahn C, Puschel B (2011): BMP signals and the transcriptional repressor BLIMP1 during germline segregation in the mammalian embryo. *Developmental Genes and Evolution* 221, 209-23
- Idkowiak J, Weisheit G, Plitzner J, Viebahn C (2004a): Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo. *Development Genes and Evolution* 214, 591-605
- Idkowiak J, Weisheit G, Viebahn C (2004b): Polarity in the rabbit embryo. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 15, 607-17
- Idkowiak J: Untersuchungen zu Signalzentren der Achsenbildung während der Gastrulation im Kaninchen. *Dissertation Halle* 2007
- Imuta Y, Nishioka N, Kiyonari H, Sasaki H (2009): Short limbs, cleft palate, and delayed formation of flat proliferative chondrocytes in mice with targeted disruption of a putative protein kinase gene, *Pkdcc*. *Developmental Dynamics* 238, 210-22

- Jen Y, Manova K, Benezra R (1997): Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse Gastrulation and Neurogenesis. *Developmental Dynamics* 208, 92-106
- Johnson A (1884): On the fate of the blastopore and the presence of a primitive streak in the newt (*Triton cristatus*). *Quarterly Journal of Microscopical Science* 24, 659-672
- Karantzali E, Lekakis V, Ioannou M, Hadjimichael C, Papamatheakis J, Kretsovali A (2011): Sall1 regulates embryonic stem cell differentiation in association with nanog. *Journal of Biological Chemistry* 286, 1037-45
- Kaufmann M, O'Shea K (1978): Induction of monozygotic twinning in the mouse. *Nature* 276, 707-8
- Keller R, Shook D: Gastrulation in Amphibians. In Stern C (Hrsg.): *Gastrulation*. 1. Auflage; Cold Spring Harbor, New York 2004
- Kemp C, Willems E, Abdo S, Lambiv L, Leyns L (2005): Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Developmental Dynamics* 233, 1064-75
- Kinder S, Tsang T, Wakamiya M, Sasaki H, Behringer R, Nagy A, Tam P (2001): The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm. *Development* 128, 3623-34
- Kispert A, Herrmann B (1994): Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos. *Developmental Biology* 161, 179-93
- Kispert A, Ortner H, Cooke J, Herrmann B (1995): The chick Brachyury gene: developmental expression pattern and response to axial induction by localized activin. *Developmental Biology* 168, 406-15
- Kochav S, Ginsburg M, Eyal-Giladi H (1980): From Cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. II. Microscopic anatomy and cell population dynamics. *Developmental Biology* 79, 263-308
- Koller C (1882): Untersuchungen über die Blätterbildung im Hühnerkeim. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 20, 174-21
- Kowanetz M, Valcourt U, Bergström R, Heldin C, Moustakas A (2004): Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. *Molecular and Cellular Biology* 24, 4241-54
- Krohn A: Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Seeigellarven. 1. Auflage; J. Groos, Heidelberg 1849
- Levin M, Johnson R, Stern C, Kühn M, Tabin C (1995): A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 82, 803-14

- Lipp P, Reither G (2011): Protein Kinase C: The “Masters” of Calcium and Lipid. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a004556-a004556
- Lin A, Krikov S, Riehle Colarusso T, Frias J, Belmont J (2014): Laterality defects in the national birth defects prevention study (1998-2007): birth prevalence and descriptive epidemiology. *American Journal of Medical Genetics Part A* 164, 2581-91
- Liu P, Wakamiya M, Shea M, Albrecht U, Behringer R, Bradley A (1999): Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature Genetics* 22, 361-5
- Loughry W, Prodöhl P, McDounough C, Aive J (1998): Polyembryony in Armadillos. *American Scientist* 86, 274
- Moore K, Persaud T, Torchia M: *The Developing Human*. 10. Auflage; Elsevier, Philadelphia 2016
- Muure C, McCaw P, Baltimore D (1989): A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 77-784
- Myokai F, Takashiba S, Lebo R, Amar S (1999): A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor alpha gene expression: molecular cloning, sequencing, characterization and chromosomal assignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4518,4523
- NCBI (Hersg.): ELK3 ETS transcription factor ELK3, Bethesda 2020; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=2004; abgerufen am 20. März 2020
- Newmann H, Patterson J (1910): The development of the nine-banded armadillo from the primitive streak stage to birth: with especial reference to the question of specific polyembryony. *Journal of Morphology* 21, 359-424
- Nowotschin S, Costello I, Piliszek A, Kwon G, Mao C, Klein W, Robertson E, Hadjant A (2013): The T-box transcription factor Eomesodermin is essential for AVE induction in the mouse embryo. *Genes & Development* 27, 997-1002
- Nozaki M, Onishi Y, Kanno N, Ono Y, Fujimura Y (1996): Molecular cloning of Elk-3, a new member of the Ets family expressed during mouse embryogenesis and analysis of its transcriptional repression activity. *DNA and Cell Biology* 15, 855-62
- Pearce J, Penny G, Rossant J (1999): A mouse cerberus/Dan-related gene family. *Developmental Biology* 209, 98-100
- Pernaute B, Canon S, Crespo M, Fernandes-Tresguerres B, Rayon T, Manzanares M (2010): Comparison of extraembryonic expression of Eomes and Cdx2 in pregastrulation chick and mouse embryo unveils regulatory changes along evolution. *Developmental Dynamics* 239, 620-9
- Plöger R, Viebahn C (2018): Pitx2 and Nodal as conserved early markers of the anterior-posterior axis in the rabbit embryo. *Annals of Anatomy* 218, 256-264

- Probst S, Arnold S (2017): Eomesodermin – At dawn of cell fate decisions during early embryogenesis. *Current Topics in Developmental Biology* 122, 93-155
- Psychoyos D, Stern C (1996): Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. *Development* 122, 1523-34
- Rauber A (1875): Die erste Entwicklung des Kaninchens. *Sitzungsberichte der Naturforschenden Gesellschaft zu Leipzig* 2, 102-103
- Rauber A: Über die Stellung des Hühnchens im Entwicklungsplan. 1. Auflage; Engelmann, Leipzig 1876
- Rivera-Perez J, Magnuson T (2005): Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3. *Developmental Biology* 288, 363-71
- Sanders E, Prasad S, Hu N, Wride M (1997): Cell death in the gastrulating chick embryo: potential roles for tumor necrosis factor-alpha. *Cell Death and Differentiation* 4, 188-199
- Schier A (2003): Nodal signaling in vertebrate development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19, 589-621
- Schneider H, Husslein P, Schneider K: Die Geburtshilfe. 4. Auflage; Springer, Berlin Heidelberg 2014
- Schröder S, Tsikolia N, Weizbauer A, Hue I, Viebahn C (2016): Paraxial Nodal Expression reveals a novel conserved Structure of the left-right Organizer in four Mammalian species. *Cells Tissues Organs* 201, 77-87
- Seleiro E, Connolly D, Cooke J (1996): Early developmental expression and experimental axis determination by the chicken Vg1 gen. *Current Biology* 6, 1476-86
- Selleck M, Stern C (1991): Fate mapping and cell lineage analysis of Hensen's node in the chick embryo. *Development* 112, 615-26
- Shah S, Skromme I, Hume C, Kessler D, Stern C, Dodd J (1997): Misexpression of chick Vg1 in the marginal zone induces primitive streak formation. *Development* 124, 5127-38
- Skromme I, Stern C (2001): Interactions between Wnt and Vg1 signalling pathways initiate primitive streak formation in the chick embryo. *Development* 128, 2915-27
- Skromme I, Stern C (2002): A hierarchy of gene expression accompanying induction of the primitive streak by vg1 in the chick embryo. *Mechanisms of Development* 114, 115-8
- Sousa-Nunes R, Rana A, Kettleborough R, Brickman J, Clements M, Forrest A, Grimmond S, Avner P, Smith J, Dunwoodie S, Beddington R (2003): Characterizing embryonic gene expression patterns in the mouse using nonredundant sequence-based selection. *Genome Research* 13, 2609-20

- Spemann H, Mangold H (1924): Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Wilhelm Roux` Archiv Entwicklungsmechanik der Organismen* 100, 599-638
- Stankova V, Tsikolia N, Viebahn C (2015): Rho Kinase activity controls directional cell movements during primitive streak formation in the rabbit embryo. *Development* 142, 92-8
- Stern (1990): The marginal zone and its contribution to the hypoblast and primitive streak of the chick embryo. *Development* 109, 667-82
- Stern C: Gastrulation in the chick. In Stern C (Hrsg.): *Gastrulation*. 1. Auflage; Cold Spring Harbor, New York 2004
- Stern C (2005): The chick: a great model system becomes even greater. *Developmental Cell* 8, 9-17
- Streit A, Lee K, Woo I, Roberts C, Jessell T, Stern C (1998): Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick. *Development* 125, 507-19
- Sutherland M, Ware S (2009): Disorders of left-right asymmetry: heterotaxy and situs inversus. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 151, 307-17
- Tam P, Steiner K, Zhou S, Quinlan G (1997): Lineage and functional analyses of the mouse organizer. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 62, 135-44
- Tam P, Behringer R (1997): Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mechanisms of Development* 68, 3-25
- Tam P, Gad J, Kinder S, Tsang T, Behringer R (2001): Morphogenetic tissue movement and the establishment of body plan during development from blastocyst to gastrula in the mouse. *BioEssays* 23, 508-17
- Tam P, Gad J: Gastrulation in the mouse embryo. In Stern C (Hrsg.): *Gastrulation*. 1. Auflage; Cold Spring Harbor, New York 2004
- Torlopp A, Kahn M, Oliveira N, Lekk I, Soto-Jimenez L, Sosinsky A, Stern C (2014): The transcription factor Pitx2 positions the embryonic axis and regulates twinning. *eLife* 3, e03743
- Tsikolia N, Schroder S, Schwartz P, Viebahn C (2012): Paraxial left-sided nodal expression and the start of left-right patterning in the early chick embryo. *Differentiation* 84, 380-91
- Uhl B: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 5. Auflage; Thieme, Stuttgart 2013
- Vakaet L (1962): Some new data concerning the formation of the definitive Endoblast in the chick embryo. *Development* 10, 38-57

- Varlet I, Collignon J, Robertson E (1997): nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development* 124, 1033-1044
- Viebahn C, Mayer B, Hrabe de Angelis M (1995a): Signs of the principle body axes prior to primitive streak formation in the rabbit embryo. *Anatomy and Embryology* 192, 159-69
- Viebahn C: The anterior margin of the mammalian gastrula: Comparative and Phylogenetic Aspects of its role in axis formation and head induction. In Peterson R, Schatten G (Hrsg.): *Current Topics in Developmental Biology*. 1. Auflage; Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto 1999
- Viebahn C, Stortz C, Mitchell S, Blum M (2002): Low proliferative and high migratory activity in the area of Brachyury expressing mesoderm progenitor cells in the gastrulating rabbit embryo. *Development* 129, 2355-65
- Viebahn C: Gastrulation in the rabbit. In Stern C (Hrsg.): *Gastrulation*. 1. Auflage; Cold Spring Harbor, New York 2004
- Vitorino M, Silva A, Inacio J, Ramalho J, Gur M, Fainsod A, Steinbeisser H, Belo J (2015): Xenopus Pkdcc1 und Pkdcc2 are two new tyrosine kinases involved in the regulation of JNK dependent Wnt/Pcp signaling pathway. *Public Library of Science One* 10, e0135504
- Voiculescu O, Bertocchini F, Wolpert L, Keller R, Stern C (2007): The amniote primitive streak is defined by epithelial intercalation before gastrulation. *Nature* (449, 1049-52).
- Waddington C (1932): Experiments on the development of chick and duck embryos cultivated in vitro. *Philosophical Transactions of the Royal Society London, Series B* 221, 179-230
- Wang B, Shi G, Fu Y, Xu X (2007): Cloning and characterization of a *Lass1-Gdf1* transcript in rat cerebral cortex: conservation of a bicistronic structure. *Journal of DNA Sequencing and Mapping* 18, 92-103
- Weisheit G: Molekulare Differenzierung und Musterbildung im Hypoblasten während der embryonalen Frühentwicklung des Kaninchens. Dissertation Bonn 2002
- Welsch U, Kummer W, Deller T: *Histologie – das Lehrbuch*. 5. Auflage; Elsevier, München 2018
- Weyerstahl T, Stauber M: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 4. Auflage; Thieme, Stuttgart 2013
- Wilson V, Rashbass P, Beddington R (1993): Chimeric analysis of T (Brachyury) gene function. *Development* 117, 1321-31
- Wolpert L, Tickle C, Martinez A: *Principles of Development*. 5. Auflage; Oxford University Press, Oxford 2015

- Yang J, Li X, Li Y, Southwood M, Ye L, Long L, Al-Lamki R, Morrell N (2013): Id proteins are critical downstream effectors of BMP signaling in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology* 305, L312-L321
- Yoshida M, Kajikawa E, Kurokawa D, Tokunaga T, Onishi A, Yonemura S, Kobayashi K, Kiyonari H, Aizawa S (2016): Conserved and divergent expression patterns of markers of axial development in eutherian mammals. *Developmental Dynamics* 245, 67-86
- Zakin L, Reversade B, Virlon B, Rusniok C, Glaser P, Elalouf J, Brulet P (2000): Gene expression profiles in normal and *Otx2*^{-/-} early gastrulating mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14388-14393
- Zhao L, Spassieva S, Jucius T, Shultz L, Shick H, Macklin W, Hannun Y, Obeid L, Ackermann S (2011): A deficiency of ceramide biosynthesis causes cerebellar purkinje cell neurodegeneration and lipofuscin accumulation. *Public Library of Science genetics* 7, e1002063

9 Danksagung

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Christoph Viebahn, möchte ich sehr herzlich dafür danken, dass er mir die Möglichkeit eröffnet hat, diese Arbeit zu verfassen. Aufgrund der ausgezeichneten Betreuung, seiner hilfreichen und äußerst anregenden Ratschläge und Hilfen bei der experimentellen Durchführung und Niederschrift dieser Arbeit konnte ich sehr viel lernen. Eine sehr bereichernde Erfahrung war für mich auch die Teilnahme an Kongressen und somit am aktuellen wissenschaftlichen Diskurs. Für alle Förderung bin ich Prof. Dr. med. Viebahn überaus dankbar.

Meinen Kolleginnen und Kollegen aus der Abteilung Anatomie und Embryologie gilt mein Dank für die konstruktive und unkomplizierte Zusammenarbeit und die ausgesprochen angenehme Atmosphäre. An die großartige Hilfe im Labor von Frau Kirsten Falk-Stietenroth, Frau Heike Faust und Frau Irmgard Weiss werde ich mich immer gern erinnern. Mittels des Einweiskurses in Photoshop von Herrn Hannes Sydow konnten die Abbildungen erstellt werden. Bei Herrn Dr. rer. nat. Püschel, PD Dr. med. Männer, Dr. med. Tsikolia und Frau Dr. rer. nat. Stankova sowie den Mitdoktoranden Alexander Rulle und Tobias Pieper möchte ich mich für intensive Gespräche und Gedankenanstöße meinen Dank aussprechen. Frau Heike Altmann und Frau Antje Ahrbecker waren schnell mit Rat und Tat dabei, wenn administrative Fragen auftauchten. Ohne sie alle wäre diese Arbeit sicherlich nicht in ihrer jetzigen Form entstanden. Bei Antja Fischer möchte ich mich nochmal für die Überlassung der *PITX2* und *NODAL* Sonde bedanken.

Mein halbjähriger Aufenthalt am *University College London* hat mein Interesse an Fragen der Embryologie sehr verstärkt. Über den herzlichen Empfang im Labor von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Claudio Stern habe ich mich sehr gefreut. Unter all den hilfreichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter möchte ich gerne Dr. rer. nat. Nidia de Oliveira hervorheben, die mir das molekulare Arbeiten zeigte. Die Skype-Gespräche zwischen Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stern, Prof. Dr. med. Viebahn und mir bei der Erstellung meiner Arbeit sehr geholfen.

Meiner Familie danke ich herzlich für Ihre Unterstützung.