

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

im Zentrum Anatomie

(Komm. Direktor: Prof. Dr. rer. nat. J. Wilting)

der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

**Morphologische Charakterisierung von Wnt5a Knock-out-  
Mäusen: Eine licht- und elektronenmikroskopische  
Untersuchung des dermalen Lymphgefäßsystems**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg - August - Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Jules Arnaud Demanou Toukam**

aus

Jaunde, Kamerun

Göttingen 2018

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. J. Wilting
Ko-Referent:	Prof. Jörg Großhans
Drittreferent:	Prof. Dr. Margarete Schön
Datum der mündlichen Prüfung:	29.05.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel  
**"Morphologische Charakterisierung von Wnt5a Knock-out-  
Mäusen: Eine licht- und elektronenmikroskopische  
Untersuchung des dermalen Lymphgefäßsystems"**  
eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir  
angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....  
.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Morphologische Einteilung des Lymphgefäßsystems .....	2
1.1.1 Lymphkapillaren (initiale Lymphgefäße) .....	3
1.1.2 Präkolektoren und Kolektoren .....	3
1.1.3 Lymphstämme .....	4
1.2 Lymphgefäßentwicklung .....	5
1.3 Wnt-Signalwege .....	7
1.3.1 Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg .....	8
1.3.2 Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege .....	9
1.3.3 Aktivierung der Wnt-Signalwege durch Wnt5a .....	9
1.4 Ziel der Arbeit.....	10
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Untersuchtes Gewebe.....	11
2.2 Genotypisierung von Mäusen .....	11
2.3 Elektronenmikroskopie .....	12
2.3.1 Substanzen zur Fixierung und Einbettung in Epoxidharz .....	12
2.3.2 Glasmesserherstellung .....	13
2.3.3 Erstellung der Semidünnschnitte .....	13
2.3.4 Erstellung der Ultradünnschnitte.....	13
2.3.5 Kontrastierung der Ultradünnschnitte.....	14
2.4 Immunhistologie.....	14
2.4.1 Gewebeeinbettung zum Anfertigen von Paraffinschnitten.....	14
2.4.2 Anfertigung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung .....	15
2.4.3 Immunhistologische Antikörperfärbungen an Paraffinschnitten.....	16
2.5 Fotografische Dokumentation .....	17
2.6 Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Geräte.....	17
2.6.1 Reagenzien.....	17
2.6.2 Chemikalien.....	18
2.6.3 Geräte .....	19
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
3.1 Makroskopische Darstellung von Mausembryonen .....	21
3.2 Lichtmikroskopische Auswertung von Semidünnschnitten .....	22
3.3 Elektronenmikroskopische Auswertung der Ultradünnschnitte .....	26
3.3.1 Auswertung von Ultradünnschnitten von heterozygoten Wnt5a-ko- und Wildtyp- Mäusen .....	27
3.3.2 Auswertung von Ultradünnschnitten von homozygoten Wnt5a-ko-Mäusen .....	35
3.4 Auswertung der homozygoten Wnt5a-ko-Mäuse mittels immunhistologischer Färbung.....	39
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>41</b>
4.1 Methodendiskussion .....	41

---

4.1.1	Wahl der licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung zur Auswertung der dermalen Lymphgefäßveränderung bei Mausembryonen.....	41
4.1.2	Wahl der Immunhistologie zum Nachweis der Lymphgefäße von Wnt5a-ko-Mausembryonen .....	42
4.2	Ergebnisdiskussion.....	42
4.2.1	Diskussion der lichtmikroskopischen Befunde von dermalen Lymphgefäßen.....	42
4.2.2	Diskussion der elektronenmikroskopischen Befunde von dermalen Lymphgefäßen.....	43
4.2.3	Diskussion der immunhistologischen Befunde von dermalen Lymphgefäßen.....	45
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>53</b>

# 1 Einleitung

Das Lymphgefäßsystem stellt neben dem Blutkreislauf das zweite Gefäßsystem der Säugetiere dar. Lymphgefäße sind für die Aufrechterhaltung der Funktion der meisten Gewebe unentbehrlich, durch unterschiedliche Mechanismen sorgen sie für eine ausgeglichene Balance der zellulären Aktivitäten und sind daher essenziell für die Aufrechterhaltung der Gewebhomöostase (Schulte-Merker et al. 2011). Die vorrangigen Aufgaben des Lymphgefäßsystems bestehen in der Rückführung überschüssiger Gewebsflüssigkeit in die Blutzirkulation, dem Transport von löslichen Antigenen sowie aktivierten Zellen des Immunsystems und dem Abtransport von resorbierten Nahrungsfetten im Lymphsystem des Verdauungstraktes (Cueni und Detmar 2008; Karpanen und Alitalo 2008). Die Lymphgefäße spielen auch eine bedeutende Rolle in der Pathogenese diverser Erkrankungen, wie bei chronischen Entzündungen, als Wege der Krebsmetastasierung und bei der Lymphödembildung (Alitalo et al. 2005; Böhmer et al. 2010). Funktionelle Fehlbildungen des lymphatischen Systems, wie zum Beispiel im Rahmen der erblich bedingten Milroy-Krankheit (bei der nur die Lymphkapillaren fehlen, aber die Lymphkollektoren noch vorhanden sind), und des Lymphödem-Distichiasis-Syndroms, welches durch eine Mutation in den Genen VEGFR-3 und FOXC2 entstehen kann, kommt es zum sogenannten primären Lymphödem im Bereich des Beckens und der unteren Extremitäten von betroffenen Patienten (Connell et al. 2013). Des Weiteren können auch Schädigungen von Lymphgefäßen, die Ausräumung von Lymphknoten bei operativen Eingriffen oder die Bestrahlung von Lymphknoten im Rahmen einer strahlentherapeutischen Krebsbehandlung zu iatrogenen Lymphödemem führen. Ursächlich für die sekundäre Form des Lymphödems können beispielweise auch ein infiltrierendes Wachstum von Tumoren in Lymphgefäße oder eine tumorbedingte Kompression von Lymphgefäßen sein, was dann wiederum zu einer Blockade des Lymphtransports mit Ödembildung führt (Földi und Földi 2010).

Lymph- und Blutgefäßsystem besitzen anatomische und histologische Ähnlichkeiten, sie unterscheiden sich aber in ihrer Topographie, der Wandstruktur sowie der zellulären und molekularen Ausstattung (Wilting 2002). Dies führt dazu, dass eine Differenzierung von Blut- und Lymphgefäßen heutzutage in der Histologie möglich geworden ist.

Arterielle Blutgefäße sind durch ihren histologischen Aufbau, der mehrere stabilisierende Elemente, wie Zellen der glatten Muskulatur und elastische Fasern, beinhaltet, befähigt, dem hohen arteriellen Blutdruck zu widerstehen und den Verlust von Flüssigkeit ins Gewebe durch passive Filtration, je nach Gefäßbett, weitgehend zu minimieren. Weil jedoch ein Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe unverzichtbar ist, kommt es dennoch auf der

arteriellen Seite des Kapillarbetts zu einem passiven Transport von Flüssigkeit aus dem Blut ins Gewebe. Da durch den Flüssigkeitsverlust der zelluläre und kolloidosmotische Druck des Blutes ansteigt, wird ein Großteil der verlorenen Flüssigkeit auf der venösen Seite durch postkapilläre Venolen wieder resorbiert. Die verbliebene Flüssigkeit muss von Lymphgefäßen aufgenommen werden, um eine permanente Flüssigkeitsansammlung im Gewebe zu verhindern. Gleichzeitig nehmen die Lymphgefäße Leukozyten und Makromoleküle aus dem zwischen den Zellen der Gewebe gelegenen Interstitialraum auf, führen diese in den venösen Ast des Blutgefäßsystems zurück und stellen mit der Lymphe eine repräsentative immunologische Probe eines jeden Gewebes zur Verfügung (Tammela und Alitalo 2010). Daher spielt das Lymphgefäßsystem auch eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Auf ihrem Weg von den blind endenden initialen Lymphgefäßen über lymphatische Sammelgefäße zurück in die venöse Zirkulation wird die Lymphflüssigkeit durch Lymphknoten, die in die Sammelgefäße eingebaut sind, gefiltert. In den Lymphknoten treffen mit der Lymphe transportierte Zellen der angeborenen Immunabwehr und Antigene auf noch naive Lymphozyten. Sind die Lymphozyten in der Lage, auf die Antigene zu reagieren, wird eine Immunantwort ausgelöst (Cueni und Detmar 2006).

## 1.1 Morphologische Einteilung des Lymphgefäßsystems

Das Lymphgefäßsystem stellt funktionell ein dem Venensystem parallel gestelltes Drainagesystem dar. Das oberflächliche System (auch als subkutan oder epifaszial bezeichnet) liegt oberhalb der oberflächlichen Körperfazie, drainiert die Haut und die Subkutis. Dieses System ist durch Perforansgefäße mit dem tiefen System verbunden, das einen direkten Anschluss an die großen Lymphstämme hat. Das tiefe System leitet die Lymphe aus den Muskeln, Gelenken und Nerven ab. Dementsprechend dient das oberflächliche System als Hauptweg, das tiefe System als Entlastungsweg bei der Lymphdrainage der Haut und Subkutis (Földi und Földi 2010).

Das Lymphgefäßsystem beginnt blind mit sehr dünnwandigen Lymphkapillaren (auch initiale Lymphgefäße genannt) in der Körperperipherie, welche in Präkolektoren und Kolektoren münden. Letztere sind in ihrem Verlauf durch eingeschaltete Lymphknoten (als Filterstation) unterbrochen, deren Inhalt schließlich in die Lymphstämme (Trunci lymphatici) einmündet. Diese Trunci schließen sich ihrerseits zu größeren Einheiten zusammen, so dass letztlich je ein großer Lymphstamm an den beiden Venenwinkeln (Zusammenfluss von Vena jugularis interna und Vena subclavia) endet. Hier sollten auch die prälymphatischen Gewebekanäle (*tissue channels*) erwähnt werden, die nicht zum eigentlichen Lymphgefäßsystem zählen, da sie über keine Wandstruktur verfügen, aber für die Lymphbildung im ZNS und Knochenmark eine wichtige Rolle spielen (Földi und Földi 2010).

### 1.1.1 Lymphkapillaren (initiale Lymphgefäße)

Das Lymphgefäßsystem beginnt in den meisten Organen mit blind beginnenden Lymphkapillaren. Diese Lymphkapillaren bilden ein Netzwerk (z. B. in der Dermis an der Grenze zwischen Stratum papillare und Stratum reticulare), dessen Maschenweite zwischen 0,1 und 1 mm variiert. In Organen ohne Lymphkapillaren (z. B. ZNS und Knochenmark) bilden die interstitiellen prälymphatischen Gewebekanäle die ersten Drainagewege, über die lymphpflichtige Substanzen in Richtung Lymphkapillaren fließen.

Der Gefäßdurchmesser der initialen Lymphgefäße schwankt zwischen 10 und 30  $\mu\text{m}$ . Ihre Wand ist sehr dünn, besteht nur aus einer Lage Lymphendothelzellen und dem darunter gelegenen subendothelialen Faserfilz aus Kollagen Typ IV. Eine Basallamina im eigentlichen Sinne fehlt oder ist zumindest nur unvollständig aufgebaut (Maby-El Hajjami und Petrova 2008; Tammela und Alitalo 2010). Über den subendothelialen Faserfilz sind die Lymphendothelzellen mit dem interstitiellen Fasernetzwerk verbunden. Die eichenblattförmigen Endothelzellen der Lymphkapillare können direkt aneinander liegen oder ein- bzw. mehrfach durch Zonulae occludentes und adhärentes miteinander verzahnt sein. Die wie die Zacken eines Eichenblattes geformten Zellfortsätze der benachbarten Lymphendothelzellen überlappen dachziegelartig. An der Basis dieser Fortsätze befinden sich, wie oben erwähnt, Zell-Zellkontakte in Form von Adhärenskontakten und Fasciae occludentes. Diese Kontakte fehlen jedoch an den spitzen der Zellfortsätze, so dass diese frei beweglich sind und daher auch als „schwingende Zipfel“ bezeichnet werden. An der Außenfläche der Lymphkapillarwand inserieren Ankerfilamente, die auch über Integrine mit den interstitiellen Fasern in Verbindung stehen (Maby-El Hajjami und Petrova 2008). Diese Ankerfilamente verhindern (nach älterer Ansicht) das Kollabieren der sehr kleinen und dünnwandigen initialen Lymphgefäße, wenn der interstitielle Druck ansteigt (Maby-El Hajjami und Petrova 2008). Besonders wichtig ist auch, dass sich durch einen erhöhten interstitiellen Druck die Spannung des interstitiellen Fasernetzes über die Ankerfilamente auf die Fortsätze der Lymphendothelzellen überträgt, wodurch Öffnungen zwischen diesen entstehen, welche als Einlassventile bei der Lymphbildung fungieren, über die der Eintritt von Flüssigkeit, Makromolekülen aber auch Zellen aus dem Interstitium in die Lymphkapillaren ermöglicht wird (Maby-El Hajjami und Petrova 2008). Im Bereich der Lymphkapillaren finden sich keine oder nur sehr spärliche Nervenendigungen (Földi und Földi 2010).

### 1.1.2 Präkolektoren und Kolektoren

In Abhängigkeit vom Füllungszustand kann die Präkolektoren-Weite bis zu 150  $\mu\text{m}$  betragen. Präkolektoren sammeln Lymphe aus umschriebenen Arealen des Kapillarnetzes und leiten diese in die Kolektoren. Sie besitzen bereits Klappen und dienen einer ableitenden Funktion. Wesentlich ist jedoch, dass ein und dasselbe Gefäß unterschiedlich aufgebaute



Wandabschnitte zeigt. Es gibt Wandanteile, welche von einer Membrana accessoria (bestehend aus kollagenem Bindegewebe mit vereinzelt glatten Muskelzellen) umgeben sind und daneben auch solche mit kapillärem Charakter (Maby-El Hajjami und Petrova 2008). Damit zeichnen sich Präkollektoren sowohl durch die Fähigkeit zur Resorption wie auch zur Weiterleitung der Lymphflüssigkeit zu den Kollektoren aus. Kollektoren stellen muskuloendotheliale Röhren dar, deren Durchmesser zwischen 100-600  $\mu\text{m}$  schwankt. Histomorphologisch zeigen sie eine ähnliche Dreischichtung wie Venen mit unidirektionalen, intraluminalen Taschenklappen, die den Rückfluss der Lymphe verhindern (Maby-El Hajjami und Petrova 2008). Die Tunica interna besteht aus dem Endothel und der Basalmembran. Der dickste Wandabschnitt, die Tunica media, besteht aus mehreren Lagen von glatten Muskelzellen, die über eine intrinsische kontraktile Aktivität verfügen und damit den Lymphfluss fördern (Maby-El Hajjami und Petrova 2008). Weiterhin wird der Lymphfluss auch durch die Kontraktion von Skelettmuskulatur, welche die Lymphgefäße umgeben, sowie von arteriellen Pulsationen gefördert (Maby-El Hajjami und Petrova 2008). Die Tunica externa oder Adventitia besteht aus lockerem kollagenem Bindegewebe. Größere Kollektoren weisen eine relativ dicke Gefäßwand auf, so dass eine Versorgung der Zellen der Gefäßwand vom Lumen des Lymphkollektors nicht mehr möglich ist. Entsprechend findet man in der Adventitia der großen Kollektoren und auch der Lymphstämme Vasa vasorum zur Eigenversorgung der Lymphgefäßwand mit Sauerstoff und Nährstoffen. In der Adventitia enden vegetative markhaltige und marklose Nervenfasern plexusartig. Das Sammelgebiet eines Kollektors wird auch Drainagegebiet oder Tributärgebiet genannt (Földi und Földi 2010).

### 1.1.3 Lymphstämme

Für die einzelnen Körperabschnitte lassen sich insgesamt 5 teils paarig angelegte Lymphstämme unterscheiden: Truncus jugularis (links/rechts) mit Abflussgebiet (Kopf- und Halshälfte), Truncus subclavius (obere Extremität links/rechts), Truncus bronchomediastinalis (Organe und Wand der Thoraxhälfte links/rechts), Truncus intestinalis (unpaare Organe im Abdomen wie Milz und Magen-Darm-Trakt) und Truncus lumbalis (paarige Organe im Abdomen, wie Nieren, alle Beckenorgane, Wand des Abdomens und untere Extremität links/rechts). Alle Stämme finden im allgemeinen Anschluss an den Ductus thoracicus oder den Ductus lymphaticus dexter, die ihrerseits beide Anschluss an das Venensystem erhalten. Der Ductus thoracicus leitet die Lymphe aus dem gesamten Körper unterhalb des Zwerchfells und aus der linken Körperhälfte oberhalb des Zwerchfells und mündet in den linken Venenwinkel. Der Ductus lymphaticus dexter leitet die Lymphe aus der rechten Körperhälfte oberhalb des Zwerchfells und mündet in den rechten Venenwinkel. Dementsprechend ist eine Einteilung des Körpers in vier Lymphabfluss-Quadranten möglich (Földi und Földi 2010).

## 1.2 Lymphgefäßentwicklung

Zu Beginn der 20. Jahrhunderts stand die Erforschung der Entwicklung des Lymphgefäßsystems im Mittelpunkt einer Kontroverse, die in der heutigen Zeit als beendet anzusehen ist. Im Jahr 1902 veröffentlichte die Wissenschaftlerin Florence R. Sabin die „zentrifugale Theorie“, welche besagt, dass die primitiven Lymphbläschen von den Endothelzellen der embryonalen Venen aussprossen. Sie stellte ihre Theorie nach Versuchen mit Farbstoffinjektionen an Schweineembryonen auf (Sabin 1902). Kurz nach Verfassung dieser Theorie stellten die Wissenschaftler Huntington und McClure eine Gegentheorie auf. Sie vertraten die sogenannte „zentripetale Theorie“, die davon ausgeht, dass Lymphendothelzellen direkt dem Mesenchym entstammen, indem sich freie Räume bilden, diese sich mit Lymphflüssigkeit füllen, im Verlauf der Entwicklung miteinander fusionieren und erst in ihrer weiteren Entwicklung Anschluss an das Blutgefäßsystem erhalten. Die Uneinigkeit der Anhänger der beiden Theorien hielt sich über viele Jahre aufgrund des Mangels an spezifischen Markern der Lymphendothelzellen. Mithilfe von neu entdeckten lymphatischen Markern wie Lyve1, Podoplanin und Prox1 konnte Sabins Theorie der aussprossenden venösen Endothelzellen in verschiedenen Experimenten Unterstützung finden. So gilt diese Theorie zum Ursprung der primitiven Lymphbläschen aus Venen heraus heute weitgehend als gesichert. Letztendlich ließ sich bis dato nicht abschließend belegen, dass das gesamte Lymphsystem sich nur aus aussprossenden Zellen ableitet. Durch Transplantationsexperimente in Hühnerembryonen konnte nachgewiesen werden, dass in Vögeln zumindest einige Lymphgefäße Endothelzellen beinhalten, die nicht venösen Ursprungs sind (Wilting et al. 2000). In weiteren Versuchen in den Flügelanlagen von Vogelembryos konnte gezeigt werden, dass die Lymphangioblasten direkte Vorläuferzellen der Lymphendothelzellen mit mesodermalem Ursprung sind (Wilting et al. 2006).

Auch in Mäusen gehen die Lymphgefäße in der Embryonalentwicklung aus venösen Blutgefäßen hervor. Diese Theorie des venösen Ursprungs von Lymphgefäßen wurde schon von Florence Sabin postuliert und ihre Entdeckung wurde durch neuere Studien untermauert (Martinez-Corral et al. 2015). Die Lymphgefäßentwicklung beginnt, nachdem das Blutgefäßsystem angelegt wurde und der Herzschlag eingesetzt hat (Oliver 2004). In der Tat sind die Parallelen der Entwicklung der Lymphgefäße von Mensch und Maus so weitreichend, dass die Maus vermutlich ohne Einschränkung als vollwertiges Modellsystem für die menschliche Lymphgefäßentwicklung betrachtet werden kann. In Mausembryonen sind die ersten Anzeichen der Bildung von Lymphgefäßen am Tag 9 der Embryonalentwicklung (ED9), das heißt 9 Tage nach der Befruchtung, feststellbar (Hägerling et al. 2013). Im Lumbalbereich gehen allerdings viele Lymphgefäße aus mesenchymalen Vorläuferzellen hervor, ohne Beteiligung von Venen (Martinez-Corral et al. 2015). Das erste zelluläre Merkmal, das auf die beginnende lymphendotheliale Differenzierung hindeutet, ist die polarisierte Ausprägung des Hyaluronanrezeptors Lyve1 (*lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor 1*) in dorsal gelegenen Zellen der Kardinalvene (Oliver 2004). Die Lyve1 exprimierenden venösen Endothelzellen haben damit lymphatische

Kompetenz erworben und spezialisieren sich weiter, indem sie wenig später den Transkriptionsfaktor Sox18 ausprägen (François et al. 2008). Als Folge dessen und gesteuert durch Sox18 wird daraufhin ein weiterer Transkriptionsfaktor, Prox1 (*prospero-related homeobox1*) hergestellt, welcher das wichtigste lymphatische differenzierungsvermittelnde Molekül ist (Kiefer und Adams 2008). Der Transkriptionsfaktor Prox1 steuert als Masterregulator die Ausprägung aller wesentlichen Genprodukte der Lymphendothelzellen (LECs). In Abwesenheit von Prox1 können sich während der Embryonalentwicklung keine Lymphgefäße bilden (Wigle und Oliver 1999). Wird Prox1 zu einem späteren Zeitpunkt ausgeschaltet, verlieren die LECs ihre lymphatische Identität und dedifferenzieren zu Blutendothel, welches offensichtlich den basalen Differenzierungszustand von Endothelzellen darstellt (Johnson et al. 2008). In lymphatischen Vorläuferzellen in der Kardinalvene von Mausembryonen bewirkt Prox1 die verstärkte Expression von VEGFR3 (*vascular endothelial growth factor receptor 3*) und des Gens für dessen Hilfsrezeptor Neuropilin-2 (Nrp2) (Hägerling et al. 2013).

Der wohl wichtigste Wachstumsfaktor für die Entwicklung von Lymphendothelzellen ist VEGF-C (Vascular Endothelial Growth Factor C). Mäuse, in denen VEGF-C fehlt, sind nicht mehr in der Lage, Lymphgefäße zu bilden (Karkkainen et al. 2004). Während der Lymphgefäßentwicklung wandern lymphatische Vorläuferzellen, einem Gradienten des Wachstumsfaktors VEGF-C folgend, aus ihrem venösen Gefäßbett aus und reorganisieren sich schließlich zu größeren lymphatischen Gefäßen, die im Jugularbereich als juguläre Lymphsäcke bezeichnet werden (Sabin 1909; Oliver und Detmar 2002).

Ausgehend von diesen sehr einfach strukturierten, bläschenförmigen Lymphgefäßen entwickeln sich dorsal und lateral gerichtete Aussprossungen, der lymphatische Plexus der Unterhaut. Während der späteren Fetogenese, aber auch in den ersten Tagen nach der Geburt, formt sich dieser vaskuläre Lymphplexus stark um und bildet nun die typische hierarchische Gefäßstruktur aus initialen Lymphgefäßen, Präkollektoren und Kollektoren. Im Zuge dessen baut sich um die Präkollektoren und Kollektorgefäße eine Gefäßwand auf, welche Glattmuskelzellen einlagert. Innerhalb der Präkollektoren und Kollektoren bilden sich zudem Lymphklappen aus, die den Rückfluss der Lymphflüssigkeit verhindern und den gerichteten Transport der Lymphe zu den venösen Gefäßen sicherstellen. Die Glattmuskelzellen der Gefäßwand der Kollektoren besitzen die Fähigkeit zu peristaltischen Kontraktionen, die, im Zusammenspiel mit dem durch die Bewegung der Skelettmuskel erzeugten Druck, die Lymphe in Richtung des venösen Blutgefäßsystems transportieren (Maby-El Hajjami und Petrova 2008).

Mit Ausnahme von zwei Kontaktstellen im Bereich der Venenwinkel, an denen die Lymphflüssigkeit in das venöse Blutsystem zurückgeführt wird, ist das Lymphgefäßsystem strikt vom Blutkreislauf getrennt (Böhmer et al. 2010). Um diese Trennung zu ermöglichen

und aufrecht zu erhalten, sind verschiedenen Genprodukte unverzichtbar. Ein für diesen Prozess wesentliches Protein ist die Tyrosinkinase SYK (*spleen non-receptor tyrosine kinase*), welche in Blutzellen exprimiert wird (Böhmer et al. 2010). Mausembryonen, denen diese Kinase fehlt, sterben schon vor der Geburt (Cheng et al. 1995). Charakteristisch für Föten mit fehlender Tyrosinkinase SYK sind die blutgefüllten Lymphgefäße, was wiederum ein typisches Zeichen dafür ist, dass die Lymphgefäße in fehlerhaftem Kontakt zum Blutkreislauf stehen. Zudem zeigen diese Föten starke Ödeme und eine Hyperplasie von Lymphgefäßen, was auf eine Dysfunktion des Lymphgefäßsystems hinweist. In SYK-ko-Mäusen kommt es zu einer vermehrten Expression der Wachstumsfaktoren VEGF-C/-D und zu einer Hochregulation des Chemokins CCL2 sowie des zugehörigen Rezeptors CCR2. Eine Akkumulation all dieser Faktoren in der Haut führt zu einer massiven Hyperplasie und Dilatation von Lymphgefäßen (Böhmer et al. 2010). Andere Ursache für ein unkontrolliertes Wachstum der Lymphgefäße, welches man in diesen Föten beobachten kann, ist die Ansammlung von myeloischen Zellen, welche verstärkt angiogene Faktoren produzieren (Böhmer et al. 2010).

Neben seiner Funktion in lymphatischen und myeloischen Blutzellen ist SYK von Bedeutung für die Fähigkeit von Blutplättchen, nach Kontakt mit Lymphendothel die Blutgerinnung auszulösen. Diese Fähigkeit der Blutplättchen führte dazu, dass spekuliert wurde, sie könnten für die Trennung von Blut- und Lymphgefäßen während der Embryonalentwicklung verantwortlich sein. In der jüngeren Zeit wurden deshalb sowohl plättchenunabhängige als auch plättchenabhängige Modelle diskutiert (D'Amico und Alitalo 2010). Plättchenunabhängige Modelle gehen von einer Trennung beider Gefäßsysteme durch Wanderung einzelner Lymphendothelzellen (LEC) aus. Demgegenüber gehen plättchenabhängige Modelle von einer Aussprossung von Lymphgefäßen von der Kardinalvene oder Abknospung größerer Bereiche von der Kardinalvene aus.

### 1.3 Wnt-Signalwege

Der Wnt-Signalweg spielt in der frühen Embryonalentwicklung von Säugetieren eine wichtige Rolle und reguliert dabei verschiedene Prozesse, wie z. B. die Ausbildung von Körperachsen, Segmentpolarität, oder Organanlagen. Auch sind die Wnt-Proteine während der Embryonalentwicklung für den Erhalt adulter Gewebestrukturen notwendig (Logan und Nusse 2004). Der Name Wnt setzt sich aus den Bezeichnungen für die homologen Gene *Wingless* (*Drosophila*) und *Int1* (Maus) zusammen. Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* führen Mutationen im *Wingless*-Gen zu flügellosen Organismen. Bei Mäusen wird die Entwicklung von Brustkrebs gefördert, wenn durch die Integration des Mouse Mammary Tumorvirus (MMTV) in der Nähe des *Int1*-Gens (heute *Wnt1*) dessen Expression aktiviert wird. Bislang sind bereits 19 murine sowie humane Wnt-Gene bekannt (vgl. Wnt-

Homepage: <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>). Darüber hinaus sind die Wnt-Signalproteine auch in die Kardiogenese, Nephrogenese und die Extremitätenentwicklung involviert. Die Wnt-Gene können auch mit malignen und metastasierenden Tumoren assoziiert sein (Giles et al. 2003).

Die Wnt-Proteine sind eine Gruppe sezernierter Glykoproteine, die an transmembrane Rezeptoren der Frizzled (Fzd)-Familie binden. Sie wirken auf die Zielzellen, indem sie drei verschiedene Signalkaskaden aktivieren. Dabei werden ihnen wichtige Funktionen wie Proliferation, Migration und Zellspezifizierung während der Embryonalentwicklung zugeschrieben (Logan und Nusse 2004). Neben dem kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg stehen die beiden nicht-kanonischen Signalwege, der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg sowie der Wnt/JNK-Signalweg.

### 1.3.1 Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

Der von den drei Wnt-Signalwegen am besten untersuchte ist der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg. Ist dieser Wnt-Signalweg inaktiv, wird cytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin vom sogenannten „Destruktions-Komplex“ gebunden (He et al. 2004). Der Komplex bewirkt eine Phosphorylierung aller vier Phosphorylierungsstellen von  $\beta$ -Catenin. Dies ermöglicht es der E3-Ubiquitin-Ligase zu binden und  $\beta$ -Catenin zu ubiquitinieren. Dadurch kann  $\beta$ -Catenin im Proteasom abgebaut werden (He et al. 2004). Bei der Aktivierung des Signalweges werden die Wnt-Proteine an Frizzled (Fzd) und Co-Rezeptoren wie LRP5/6 (*low density lipoprotein receptor-related protein 5/6*) gebunden (He et al. 2004). Durch die Bindung von Wnt an den Fzd/LRP5/6-Rezeptorkomplex wird Axin1 an die Zellmembran transloziert und an den zytoplasmatischen Teil von LRP5/6 gebunden (Zeng et al. 2008). Dies führt zur Aktivierung des Proteins Dishevelled (Dvl) und zum Zerfall des „Destruktions-Komplexes“ (Gordon und Nusse 2006).  $\beta$ -Catenin wird somit nicht mehr phosphoryliert oder ubiquitiniert. Es wird daher auch nicht mehr abgebaut und akkumuliert im Zytoplasma. Stabilisiertes  $\beta$ -Catenin wird anschließend in den Nukleus transloziert. Dort fungiert  $\beta$ -Catenin als transkriptioneller Co-Aktivator und bindet zusammen mit anderen Proteinen wie Bcl9 an den TCF/LEF-Transkriptionsfaktor, der dadurch aktiviert wird. TCF/LEF aktiviert wiederum eine RNA-Polymerase, die dann die Transkription verschiedener Zielgene bewirkt. Zu diesen gehören zum Beispiel Myc und CyclinD1 (Reya und Clevers 2005), die in der Onkogenese eine bedeutende Rolle spielen.

### 1.3.2 Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege

#### 1.3.2.1 Der Wnt/JNK-Signalweg

Bei den beiden nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen wird der Wnt/JNK-Signalweg vom  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalweg unterschieden. Da der Wnt/JNK-Signalweg Ähnlichkeiten zu dem Signalweg aufweist, der in *Drosophila* die planare Zellpolarität kontrolliert, wird er deshalb auch als PCP (*planar cell polarity*)-Signalweg bezeichnet. Die Aktivierung des Signalwegs wird über die Bindung von Wnt an den Fzd-Rezeptor über ROR1/2 als Co-Rezeptoren vermittelt (Oishi et al. 2003). Anschließend erfolgt die Rekrutierung des zytoplasmatischen Proteins Dvl an den Fzd-Rezeptor und die Aktivierung der beiden GTPasen Rho und Rac. Daraus resultierend wird die c-Jun N-terminal Kinase JNK aktiviert, was wiederum zur Phosphorylierung und Aktivierung von c-Jun führt (Pukrop und Binder 2008).

#### 1.3.2.2 Der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalweg

Auch beim Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalweg erfolgt die Signalweiterleitung zunächst durch Bindung von Wnt an den Fzd-Rezeptor. Dadurch wird die membranständige Phospholipase C aktiviert und bewirkt die Freisetzung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vom endoplasmatischen Reticulum ins Cytoplasma. Dies hat zur Folge, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinase Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) (Kühl et al. 2000) und die Protein Kinase C (PKC) (Sheldahl et al. 1999) aktiviert werden. Sowohl die CaMKII als auch die PKC aktivieren verschiedene regulatorische Proteine sowie Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B und CREB. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch der Calcium-abhängige Transkriptionsfaktor NFAT durch den Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Weg aktiviert werden kann. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch Dvl intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzen und somit Calcium-sensitive Kinasen aktivieren kann.

### 1.3.3 Aktivierung der Wnt-Signalwege durch Wnt5a

Wnt5a kann sowohl als Ligand des kanonischen Wnt-Signalwegs als auch der nicht-kanonischen Signalwege fungieren. Seine aktivierende bzw. antagonisierende Funktion im kanonischen Signalweg ist vom jeweiligen Rezeptorkontext abhängig (van Amerongen et al. 2012). So wird der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert, wenn Wnt5a an die Rezeptorkombination Fzd4/LRP5 bindet (Mikels und Nusse 2006). Durch Bindung an Fzd8 ist wahrscheinlich eine Wnt5a-vermittelte Aktivierung der Signalkaskade möglich. Eine Bindung von Wnt5a an ROR1/2 resultiert in der Aktivierung des Wnt/JNK-Signalwegs, wohingegen durch Bindung an die Rezeptoren Fzd2 bis Fzd6 der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalweg aktiviert wird (Pukrop und Binder 2008).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Die Bedeutung des Entwicklungskontrollgens *Wnt5a* für die Tumorprogression und Entzündungsprozesse ist in der Vergangenheit schon ausführlich beschrieben worden (Kumawat und Gosens 2016). Aber sein Einfluss auf die embryonale Lymphangiogenese ist bisher wenig untersucht worden (Buttler et al. 2013). Um die Bildung des Lymphgefäßsystems während der Embryonalentwicklung im Detail zu verstehen, bedarf es verschiedener Techniken, welche diese Gefäße in der Mikroskopie sichtbar machen. Vor allem aufgrund der geringen Wandstärke von Lymphkapillaren und der Füllung mit weitgehend farbloser Lymphe sind die Lymphgefäße im Gegensatz zu Blutgefäßen in histologischen Präparationen nicht leicht erkennbar. Die bislang am häufigsten verwendete Methode der Darstellung der Lymphgefäße ist die immunhistochemische Färbung von Geweben oder Gewebsschnitten und die anschließende Analyse mittels Durchlichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie.

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist durch bisherige Untersuchungen an *Wnt5a*-Knock-out (ko)-Mäusen bekannt, dass *Wnt5a* die Entwicklung der dermalen Lymphgefäße steuert und dabei nicht nur die initialen Lymphgefäße, sondern auch die Kollektoren, die bei den homozygoten ko-Mäusen fehlentwickelt sind (Buttler et al. 2013).

Ziel meiner Arbeit sollte es sein, mittels Semi- und Ultradünnschnitt-Techniken die dermalen Lymphgefäße von *Wnt5a*-ko-Mäusen und Wildtyp-Mäusen im Lichtmikroskop und Elektronenmikroskop zu vergleichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst 1- $\mu$ m-Semidünnschnitte Mithilfe des Ultracut-Mikrotoms anfertigt. Nach Beurteilung unter dem Lichtmikroskop wurden geeignete Schnitte mit relevanten anatomischen Strukturen für die Elektronenmikroskopie (EM) ausgewählt. Die anschließende Anfertigung von Ultradünnschnitten und ihre Beurteilung im Elektronenmikroskop waren Hauptbestandteil meiner Arbeit. Besonders limitierend war hier der Prozess des Schneidens der Proben, der meistens mit einem erheblichen Verlust an Geweben und auch Verzerrungen der Schnittflächen einherging. Außerdem war auch das Wabenmuster bei Erstellung der EM-Bilder so gravierend, dass die Übersichtsaufnahme bestimmter Strukturen bei schwachen Vergrößerungen eingeschränkt war.

Da sich während der EM-Beurteilung herausstellte, dass einige Lymphgefäße rote Blutkörperchen beinhalten, habe ich zur Vermeidung von Fehlinterpretationen einen Mausembryo des Entwicklungsstadiums ED17,5 immunhistologisch gefärbt und Mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Dabei wurde besonderer Wert auf die Identifikation und Darstellung des Lymphendothelzell-Markers Lyve-1 gelegt. Mithilfe dieser Methodik war es uns möglich, die mit Erythrozyten ausgefüllten Lymphgefäße zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchtes Gewebe

Für diese Arbeit wurden Wnt5a\*tm1Amc B6-Mäuse verwendet (The Jackson Lab; Bar Harbor, Maine, USA). Diese Mauslinien wurden von der Zentraltierhaltung gezüchtet. Die Mäuse wurden so gepaart, dass nach den Mendelschen Regeln wildtyp-, heterozygote und homozygote Wnt5a-Knock-out-Embryonen im Alter von Embryonaltag 17,5 und 18,5 gewonnen wurden. Dabei wurden trächtige Weibchen aus diesen terminierten Verpaarungen durch zerviko-kraniale Dislokation getötet, aus dem Uterus die Embryonen entnommen und in PBS-Puffer-Lösung überführt. Für die Untersuchung des dermalen Lymphgefäßsystems wurden hierfür aus dem Bereich der Bauchhaut Gewebeproben entnommen und direkt mittels kleiner Nadeln auf eine Korkplatte gespannt. Letztendlich wurden die Gewebeproben bis zur weiteren Nutzung in Karnovsky-Lösung fixiert.

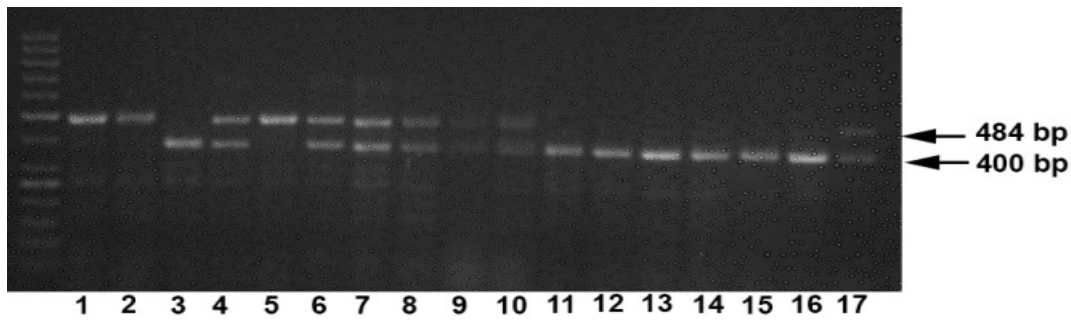
### 2.2 Genotypisierung von Mäusen

Für die Genotypisierung der in den Experimenten eingesetzten Mauslinien wurde die Schwanzspitze der Mausembryos abgetrennt, die genomische DNA isoliert und auf 100-ng/nl verdünnt. Für die Genotypisierung wurden folgende Primerkombinationen verwendet:

- 5' GAG GAG AAG CGC AGT CAA TC 3'
- 5' CATCTC AAC AAG GGC CTC AT 3'
- 5' GCC AGA GGC CAC TTG TGT AG 3'

Die PCR-Produkte wurden schließlich in einer 3%igen Agarosegelelektrophorese getrennt und ausgewertet (Abb. 1).





**Abb. 1: Gelelektrophorese nach Durchführung einer PCR.** Homozygot-ko = 400 bp, Heterozygot-ko = 400 bp und 484 bp, Wildtyp = 484 bp. Aus der oben durchgeführten Elektrophorese lässt sich folgendes ablesen: Wildtyp sind 1, 2 und 5; Homozygot-ko sind 3 und 11-16; Heterozygot-ko sind 4, 6-10 und 17.

### 2.3 Elektronenmikroskopie

Das der elektronenmikroskopischen Untersuchung dienende Gewebe wurde nach der Fixierung in Karnovsky-Lösung in Epon eingebettet. Anschließend erfolgte die Anfertigung der zur Orientierung dienenden Semidünnschnitte. Die darauffolgende Erstellung der Ultradünnschnitte wurde mithilfe eines Ultracut-Mikrotoms durchgeführt, woraufhin die Schnitte in einem letzten Schritt mit Uranylacetat kontrastiert wurden.

#### 2.3.1 Substanzen zur Fixierung und Einbettung in Epoxidharz

Die entnommenen Gewebeproben wurden über Nacht in Karnovsky-Lösung fixiert. Anschließend erfolgte das Waschen für 10 Minuten in 0,15 M Phosphatpuffer. Im nächsten Schritt wurde die Osmierung in 1%iger  $\text{OsO}_4$ -Lösung (Lösungsmittel: 0,15 M Phosphatpuffer) bei 4 °C für 90 Minuten durchgeführt. Nach einem weiteren Waschvorgang in 0,15 M Phosphatpuffer wurden die osmierten Präparate in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100%) bei 4°C für jeweils 10 Minuten entwässert. Nun erfolgte die Lagerung für zweimal 15 Minuten in Propylenoxid und anschließend in einem Gemisch aus Epon und Propylenoxid (1:1) für eine Stunde bei 4 °C. Es schloss sich eine Infiltration in Epon-Propylenoxid-Gemisch (3:1) für 16 Stunden bei 4 °C an. In einem letzten Schritt wurden die Proben in Plastik-Einbettformen gebracht und mit Epon bedeckt, um dann in einem Trockenschrank bei 60 °C für 24 Stunden polymerisiert zu werden.

### 2.3.2 Glasmesserherstellung

Das Schneiden des Gewebes zur Anfertigung der Semidünnschnitte erfolgte mit zu diesem Zweck angefertigten Glasmessern. Hierzu wurde ein Glasstreifen (40 cm lang, 4 cm breit und 0,6 cm hoch) mit Leitungswasser gereinigt und in den Knifemaker eingespannt. Durch einritzen mit einem Diamantmesser konnte eine kontrollierte Brechung durchgeführt werden, so dass quadratische Stücke entstanden. Diese wurden nun diagonal eingeritzt und geteilt, so dass letztlich dreieckige Glasmesser mit jeweils einer ca. 0,6 mm langen Schneidekante hergestellt wurden. Unter Verwendung eines Klebebandstreifens wurde ein dem Auffangen der Schnitte dienendes Wasserbehältnis hinter der Messerkante geformt. Dieses wurde mit Nagellack vollständig abgedichtet.

### 2.3.3 Erstellung der Semidünnschnitte

Die Kunststoffblöcke wurden zunächst von ihrer Kapsel befreit. Die Anfertigung der Semidünnschnitte von 1  $\mu\text{m}$  Dicke diente der Orientierung am Präparat. Hierfür wurden die das Präparat enthaltenden Eponblöcke in einem Präparathalter eingespannt und dann unter einer Stereolupe mit Hilfe einer Rasierklinge pyramidenförmig zurechtgetrimmt. Die Spitze der Pyramide wurde letztlich sauber abgetragen, so dass eine quadratische Schnittfläche entstand. Nach dem Einspannen in ein Ultracut-Mikrotom und unter Verwendung eines exakt zum Präparat ausgerichteten Glasmessers wurden dann 1  $\mu\text{m}$  dicke Serienschritte angefertigt. Die auf der Wasseroberfläche des Auffangbeckens treibenden Schnitte wurden mit einem Glasstab aufgenommen und auf einen mit einem Tropfen Aqua dest. versehenen Objektträger überführt. Es folgte die Trocknung auf einer Heizplatte bei 70 °C für ca. 2 Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Richardson-Lösung (50% von 1%igem Azur + 25% von 2%igem Methylenblau + 25% von 2%igem Borax) angefärbt, ein letztes Mal mit Aqua dest. gespült und nach dem Trocknen mit Deckgläschen eingedeckt. Nach der Beurteilung unter dem Lichtmikroskop konnten geeignete Präparate für die Elektronenmikroskopie ausgewählt werden.

### 2.3.4 Erstellung der Ultradünnschnitte

Zum Anfertigen der Ultradünnschnitte wurde die Schnittfläche der Präparate unter der Stereolupe auf den gewünschten Ausschnitt mit einer Größe von ca. 0,5 mm x 0,5 mm verkleinert. Mit Hilfe eines Ultracut-Mikrotoms und unter Verwendung eines Diamantmessers wurden nun Schnitte von etwa 80 nm Dicke hergestellt. Diese wurden auf zuvor beschichtete Kupfergrids mit Gitterstruktur aufgetragen. Die Beschichtung wurde mit

einem Formvar-Film durchgeführt. Hierzu wurden mit Alkohol gereinigte, staubfreie Glasobjektträger zur leichteren Ablösung des Filmes an drei Seiten mit einer Rasierklinge angeraut und in eine 0,3%ige Formvar-Lösung getaucht. Nach anschließendem Trocknen konnte durch schräges Einführen der Objektträger in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Petrischale der getrocknete Film abgelöst werden. Dieser auf der Wasseroberfläche schwimmende Film wurde mit Kupfergrids befüllt. Zuletzt wurden die auf dem Film liegenden Grids mit Parafilmfolie abgehoben und getrocknet.

### **2.3.5 Kontrastierung der Ultradünnschnitte**

Für die elektronenmikroskopische Beurteilung mussten die auf den Kupfergrids befindlichen Schnitte nach einer mindestens halbstündigen Trocknungszeit kontrastiert werden. Die Kontrastierung erfolgte nach dem folgenden Schema:

- Uranylacetat für 10 Min.
- In Aqua dest. gut spülen
- Bleicitrat für 10 Min.
- In Aqua dest. gut spülen

Nach dem erneuten Trocknen der Präparate konnten diese ca. 30 Minuten später unter einem Leo 906E Elektronenmikroskop betrachtet werden.

## **2.4 Immunhistologie**

### **2.4.1 Gewebeeinbettung zum Anfertigen von Paraffinschnitten**

Das aus dem Mausembryo entnommene Gewebe wurde in 0,15 M Phosphatpuffer nach Sörensen präpariert und anschließend für 24 bis 30 Stunden bei 4 °C in einer wässrigen Lösung von 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach abgeschlossener Fixierung erfolgte die Entwässerung mittels aufsteigender Ethanol-Reihe (30%, 50% und 70%) für jeweils eine halbe Stunde. Das Gewebe wurde anschließend im Einbettautomaten „Citadel 2000“ dehydriert und in Paraplast-plus (Fa. Leica, Wetzlar) überführt. Die Entwässerung und Einbettung verliefen nach dem folgenden Protokoll:

- 70%-Ethanol für 3 Stunden
- 80%-Ethanol für eine Stunde

- 90%-Ethanol für eine Stunde
- 96%-Ethanol für eine Stunde
- abs. Ethanol für 2 Stunden
- Isopropylalkohol für 1,5 Stunden
- Xylol für 30 Min.
- Xylol für 45 Min.
- Xylol für 45 Min.
- Paraplast-plus (60 °C) für 30 Min.
- Paraplast-plus (60 °C) für 7 Stunden

Anschließend wurden die von Paraffin durchtränkten Gewebestücke in eine Paraffinausgießstation gelegt, mit heißem Paraffin überschichtet und zu einem Paraffinblock verarbeitet. Das Gewebe wurde so angeordnet, dass die zu schneidende Fläche auf dem Boden liegt. Nach dem Erkalten des Paraffins wurde der Block aus der Gießform geschlagen.

#### **2.4.2 Anfertigung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung**

Mit einem Rotationsmikrotom (Jung Biocut, Leica) wurden 5 µm dicke Schnitte aus dem Paraffinblock hergestellt. Der Block wurde bis unmittelbar unter die Schnittebene des ebenfalls fest eingeschraubten Messers gebracht. Danach beginnt man die gewünschten Schnitte von 4-7-µm-Dicke zu schneiden. Der Schnitt schiebt sich dabei auf das Messer. Von dort wird er mit einem angefeuchteten Pinsel abgehoben und in ein Warmwasserbad übertragen. Hierdurch wird der Schnitt gestreckt und von Falten befreit. Dann werden die Schnitte auf saubere und fettfreie Objektträger aufgezogen. Dazu werden diese so tief und schräg in das Wasserbad gehalten, dass der Schnitt an der gewünschten Stelle aufgezogen werden kann. Um eine optimale Streckung und Haftung der aufgebrachten Schnitte zu erzielen, erfolgte das Strecken und Trocknen der Schnitte auf einer Heizplatte bei einer Temperatur von 42 °C. Im Anschluss wurden die Präparate für mindestens 24 Stunden in einem Trockenschrank bei 37 °C aufbewahrt und später in staubfreien Präparatekästen gelagert. Für die immunhistologischen Antikörperfärbungen wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert. Die Entparaffinierung und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe erfolgte in dem Automaten „Stainette 23“ nach dem folgenden Protokoll:

- Xylol für 5 Min.
- Xylol für 5 Min.

- abs. Ethanol für 2 Min.
- abs. Ethanol für 2 Min.
- 96%-Ethanol für 2 Min.
- 90%-Ethanol für 2 Min.
- 80%-Ethanol für 2 Min.
- 70%-Ethanol für 2 Min.
- Aqua dest. für 2 Min.

Anschließend wurden die Präparate für 10 Minuten in einer Küvette mit TBS (Tris gepufferte Kochsalzlösung) gespült.

### 2.4.3 Immunhistologische Antikörperfärbungen an Paraffinschnitten

Nach abgeschlossener Entparaffinierung erfolgte die Demaskierung der Epitope. Diese wurde in einem von insgesamt sieben verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Dabei wurden die Schnitte bei 600 Watt 4x5 Min. in der Mikrowelle in Citratpuffer mit pH 6 aufgekocht. Die Schnitte aus der Mikrowelle wurden für 30 Min. auf Raumtemperatur abgekühlt und 2x5 Min. mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte 2x5 Min. und 2x3 Min. in PBS gespült. Anschließend wurden mit 1% BSA in PBS für 30 Min. unspezifische Bindungsstellen auf dem Objektträger blockiert. Als Primärantikörper wurden 1:100 in 1%iger PBS/BSA-Lösung verdünnte Lyve-1 und Wnt5a-Antikörper verwendet und für eine Stunde auf die Schnitte gegeben. Um einer Verdunstung vorzubeugen, wurde die Schnitte für diese Zeit abgedeckt. Nach einer Waschung mit 2x PBS folgte die Inkubation der Sekundärantikörper: Ziege-anti-Ratte-Alexa 488-konjugiert und Ziege-anti-Kaninchen-Alexa 594-konjugiert bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte anschließend mit Aqua dest. gespült. Für die zusätzliche Anfärbung von Zellkernen mit DAPI wurden 100 µl einer verdünnten DAPI-Lösung nach dem letzten Waschschrift aufgetragen und nach 5 Min. Einwirkzeit mit KPP entfernt. Am Ende wurden die Präparate mit Fluoromout-G eingedeckt. Die Präparate wurden dann bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Die Analyse erfolgte mikroskopisch (Axio Imager.Z1, Zeiss, Göttingen) durch Messen der Emission der Farbstoffe bei 488 nm und 594 nm Wellenlänge.

## 2.5 Fotografische Dokumentation

Für die Erstellung lichtmikroskopischer Abbildungen wurde ein Mikroskop verwendet, welches an einen Fotoscanner gekoppelt wurde. Das Aufnehmen der elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte mit einer in das Leo 906E Elektronenmikroskop integrierten Digitalkamera. Die Bearbeitung der Bilder wurde auf einem Computer mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop CS6 Extended durchgeführt. Die Nacharbeitung der Bilder umfasste die Einstellung auf die gewünschte Größe, die Rahmengestaltung und die Beschriftung der Bilder.

## 2.6 Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Geräte

### 2.6.1 Reagenzien

Epon:

Epon A: 31 ml Epon + 50 ml DDSA (dodecenylsuccinid acid anhydride)

Epon B: 50 ml Epon + 45 ml MNA (methyl nadic anhydride)

Epon A und Epon B wurden im Verhältnis 6:4 gemischt. 100 ml dieses Gemisches werden mit 30 ml 1,8% DMP (2,4,6-Trisdimethylaminomethoxyphenol) als Akzelerator versetzt.

Citratpuffer:

9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B mit 450 ml Aqua dest. auffüllen.

(Stammlösung A: 21,01 g Zitronensäure auf 1 l Aqua dest.

Stammlösung B: 29,41 g Natriumcitrat auf 1 l Aqua dest.).

Formvarlösung:

0,6 g Polyvinylformal in 200 ml 1,2-Dichlorethan gelöst.

Formolfixierung nach Lillie (gepuffertes Formalin):

1 Teil Formaldehyd 37%, 9 Teile 0,1 M Sörensen-Puffer über eine Nacht bei 4 °C zusammenmischen. Dann für 3 Stunden mit 70% Alkohol bei pH 7,0 entwässern.

Karnovsky-Lösung (Fixans):

10g Paraformaldehyd werden in 100 ml Aqua dest. gelöst und bei 60 °C eine Stunde lang auf einer Shaker-Plate gerührt. Es erfolgt die Klärung der Lösung mit 1-2 Tropfen NaOH. Nach

dem Abkühlen wird die Lösung filtriert. Unmittelbar vor dem Gebrauch werden 30 ml dieser 10%igen Paraformaldehydlösung mit 58 ml 0,3 M Phosphatpuffer Sörensen und 12 ml 25%iger Glutaraldehyd-Lösung zusammengefügt.

1%iges Osmiumtetroxid:

2%iges  $\text{OsO}_4$  und 0,3 M Phosphatpuffer werden in einem Verhältnis 1:1 gemischt.

Phosphatpuffer Sörensen:

Die Herstellung des 0,3 M Puffers wird erzielt durch Mischen von 18,2 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung (41,37g/l) und 81,8 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung (42,58g). Mit 100 ml Aqua dest. kann auf 0,15 M weiter verdünnt werden.

PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung):

1 PBS-Tablette gelöst in 500 ml Aqua dest., danach autoklaviert.

Richardson-Lösung:

Es werden 2 Teile 1%iges Azur II (in Aqua dest.), 1 Teil 2%iges Methylenblau (in Aqua dest.) und 1 Teil 2%iges Borax (in Aqua dest.) zusammengefügt und filtriert.

Uranylacetat-Lösung:

1g Uranylacetat werden in 100 ml Aqua dest. gelöst. Die Aufbewahrung der lichtempfindlichen Lösung erfolgt in einer braunen Flasche. Der Kontakt mit der Haut ist aufgrund der schwachen Radioaktivität zu vermeiden. Es müssen deshalb Handschuhe getragen werden.

### 2.6.2 Chemikalien

- Akzelerator 1,8% DMP-30: Serva, Heidelberg
- Alkohol (Ethanol 99%): GeRes GmbH, Einbeck
- BSA (bovines Serumalbumin): AppliChem, Darmstadt
- DDSA (Dodecyl Succinic Anhydride): Serva, Heidelberg
- Dinatriumhydrogenphosphat: Merck, Darmstadt
- DMP: Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Ethidiumbromid-Stammlösung: Merck, Darmstadt

- Formalin, 35%: Merck, Darmstadt
- Fluoromout-G: eBioscience, San Diego
- Glutaraldehyd, 25%: Serva, Heidelberg
- Isopropylalkohol: Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Methylenblau: Merck, Darmstadt
- MNA (Methyl Nadic Anhydride): Serva, Heidelberg
- Natriumdihydrogenphosphat: Merck, Darmstadt
- NaOH 1 M: Merck, Darmstadt
- Osmiumtetroxid: Serva, Heidelberg
- Paraformaldehyd: Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim
- Propylenoxid: Serva, Heidelberg
- PBS-Tablette: Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Tris: Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- TBS (Tris gepufferte Kochsalzlösung): Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Uranylacetat: Merck, Darmstadt
- Xylol: J.T. Baker B.V., Deventer

### 2.6.3 Geräte

- Deckgläser: Menzel-Gläser, Braunschweig
- Digitalkamera (CCD Camera KP- M2E/K): Hitachi Denshi, Ltd., Japan
- Elektronenmikroskop (906 E): Leo Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen
- Einbettautomat „Citadel 200“: Shandon, Frankfurt am Main
- Färbeautomat „Stainette 23“: Shandon, Frankfurt am Main
- Fotoscanner (Scann 2000): Praktika, Wiesbaden
- Fotokamera: Nikon D70, Düsseldorf
- Glasstreifen (400 x 25 x 6,4 mm): Leica, Hamburg
- Heizplatte: Schütt, Göttingen
- Knifemaker: Leica, Wien
- Lichtmikroskop: Zeiss, Jena
- Mikrowelle: General Technic, Göttingen
- Mikroskope: Immunfluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1, Zeiss, Göttingen)

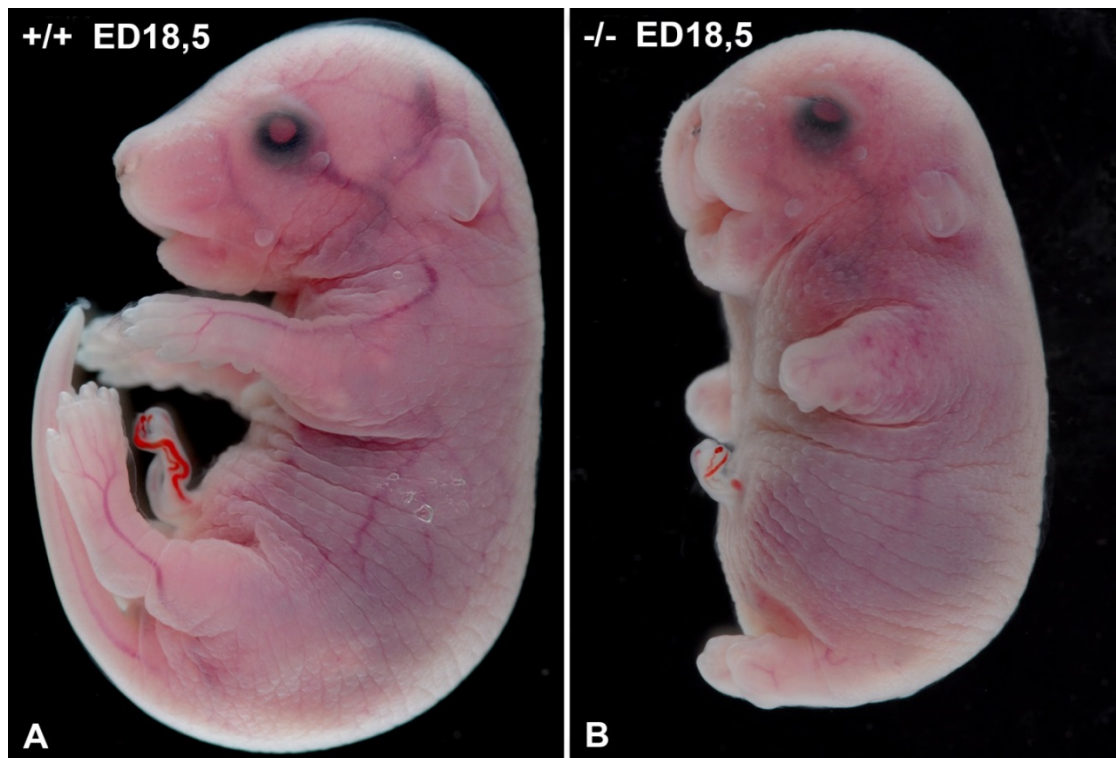


- 
- Kupfergrids: Plano, Wetzlar
  - Objektträger: Knittel Glas, Braunschweig
  - Paraplast-plus: Leica, Hamburg
  - Plastik – Einbettformen: Carl Roth GmbH, Karlsruhe
  - Schlittenmikrotom: Reichert- Jung Biocut, Leica, München
  - Stereolupe: Wild, Heerbrug, Schweiz
  - Ultramikrotom (Ultracut): Reichert/Jung, Heidelberg
  - Wärmeschrank (Modell 200): Memmert, Schwabach

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Makroskopische Darstellung von Mausembryonen

Für diese Studie habe ich Wildtyp-, heterozygote und homozygote ko-Mäuse nicht nur mikroskopisch, aber auch makroskopisch miteinander verglichen. Schon während des Präparierens der Embryonen aus dem Uterus des Muttertiers wurden äußere morphologische Unterschiede bei den Mausembryonen festgestellt und fotografisch mit einer Nikon D70 festgehalten (Abb. 2). Aus den Vorergebnissen der Arbeitsgruppe wurden gleichermaßen Auffälligkeiten ausführlich beschrieben (Buttler et al. 2013). *Wnt5a*-ko-Mäuse sterben perinatal aufgrund verschiedener Organdefekte, die mit dem Überleben der Mausembryonen nicht vereinbart sind (Yamaguchi et al. 1999), weshalb die Embryonen hier kurz vor der Geburt untersucht wurden. Die makroskopischen Bilder von ED-18,5-Mäusen mit homozygotem Genotyp zeigen einen Embryo mit reduzierter Körperlänge (Abb. 2). Malformationen sind am Kopf (kurzer und verbreiteter Mund, kein Hals und kleine Ohren) erkennbar, stark verkürzte Extremitäten und nahezu kein sichtbarer Schwanz. Weiterhin erscheint bei der Ansicht von lateral die Haut ödematös und um die oberen Gliedmaßen herum sind tiefe Falten erkennbar. Darüber hinaus sieht man auf der Hautoberfläche diskrete petechiale Einblutungen, was eventuell auf eine Malformation des Blutgefäßsystems und einer daraus resultierenden Zerreißung von Blutkapillaren und Ansammlung von roten Blutkörperchen unter der Haut zurückzuführen ist. Wie die Wildtyp-Mäuse erscheinen die heterozygoten Embryonen normal entwickelt und sind phänotypisch nahezu identisch und unauffällig.



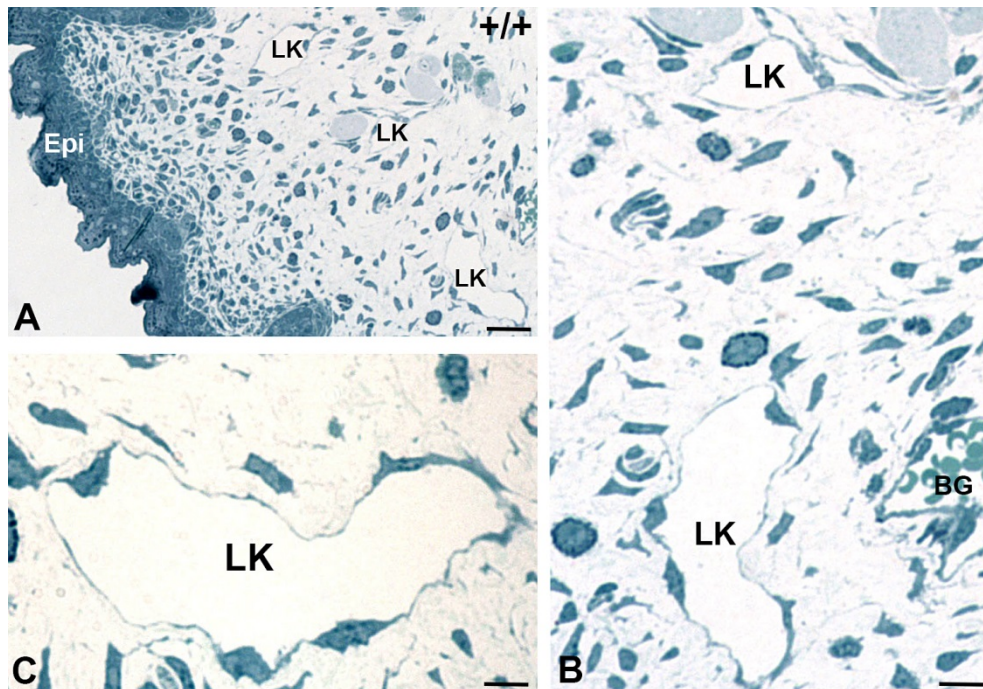
**Abb. 2: Makroskopische Bilder von Mausembryonen am Embryonaltag (ED) 18,5 mit Wildtyp (A) und homozygotem *Wnt5a*-Knock-out-Genotyp (B).**

### 3.2 Lichtmikroskopische Auswertung von Semidünnschnitten

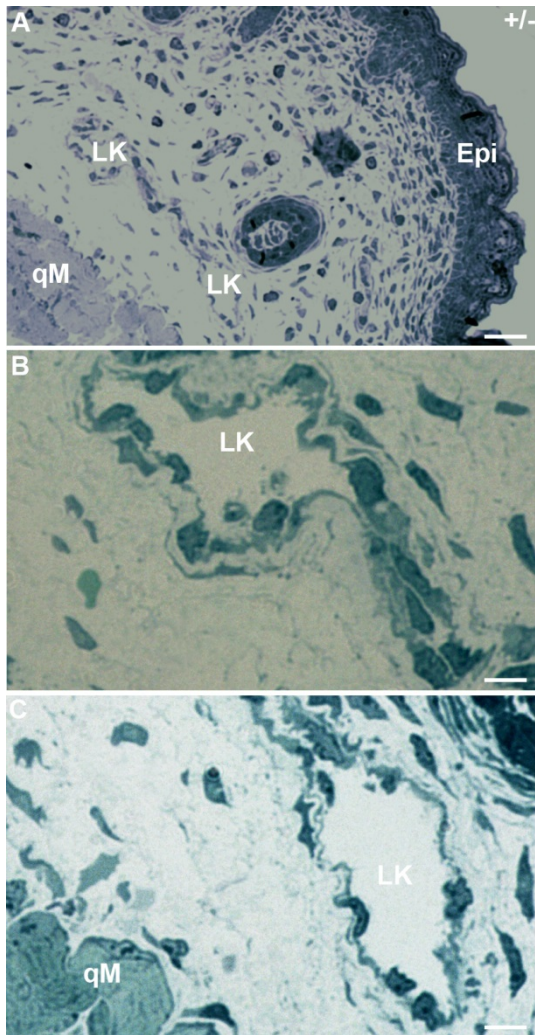
In dieser Arbeit dienen die Semidünnschnitte zuallererst als Übersichtsaufnahmen von Lymphgefäßen und vor allem zur Orientierung am Präparat für die nachfolgende Erstellung der Ultradünnschnitte. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung von Semidünnschnitten aus heterozygoten und Wildtyp-Mausembryonen zeigte sich eine nahezu identische Morphologie. Sowohl die Struktur der Epidermis als auch die der Dermis beider Mauslinien sind kaum voneinander zu unterscheiden. Die Lymphkapillaren in der Dermis sind in ihrer Anzahl hoch, treten in regelmäßigen Abständen auf, sind regelrecht gefüllt und die Lymphendothelzellen, die den Innenraum auskleiden, sind gut erkennbar (Abb. 3, 4). In der Haut findet sich regelmäßig auch quergestreifte Hautmuskulatur (Abb. 5).

Die homozygoten ko-Mäuse zeigten im Vergleich zu den anderen Mauslinien eine unstrukturierte und breitere Epidermis und Dermis. Es finden sich größere Spalträume im lockeren Bindegewebe der Subkutis. Auch die Anzahl der dermalen Lymphgefäße ist bei den homozygoten ko-Mäusen niedriger (1 bis 2 Lymphkapillaren pro Schnitt), aber der Durchmesser der Gefäße signifikant größer als in den beiden anderen Mauslinien. Weiterhin

konnte ich feststellen, dass diese großen dilatierten Lymphgefäße auch Blutkörperchen enthalten, was sich später in den Fluoreszenzaufnahmen bestätigte (Abb. 6,18,19).



**Abb. 3: Semidünnschnitte eines Wildtyp-Mausembryos.** A) Übersicht eines Semidünnschnittes eines Wildtyp-Mausembryos in 10-facher Objektivvergrößerung. Bei Wildtyp- und heterozygoten Embryos kommen kleine, trüb gefüllte Lymphkapillaren in regelmäßigen Abständen in der Dermis vor, Balken=20µm. B) Vergrößerung von zwei einzelnen Lymphgefäßen aus A mit 20-facher Objektivvergrößerung, Balken=10µm. C) Vergrößerung eines Lymphgefäßes mit 40-facher Objektivvergrößerung. Epi=Epidermis, LK=Lymphkapillare, BG=Blutgefäß, Balken=5µm.

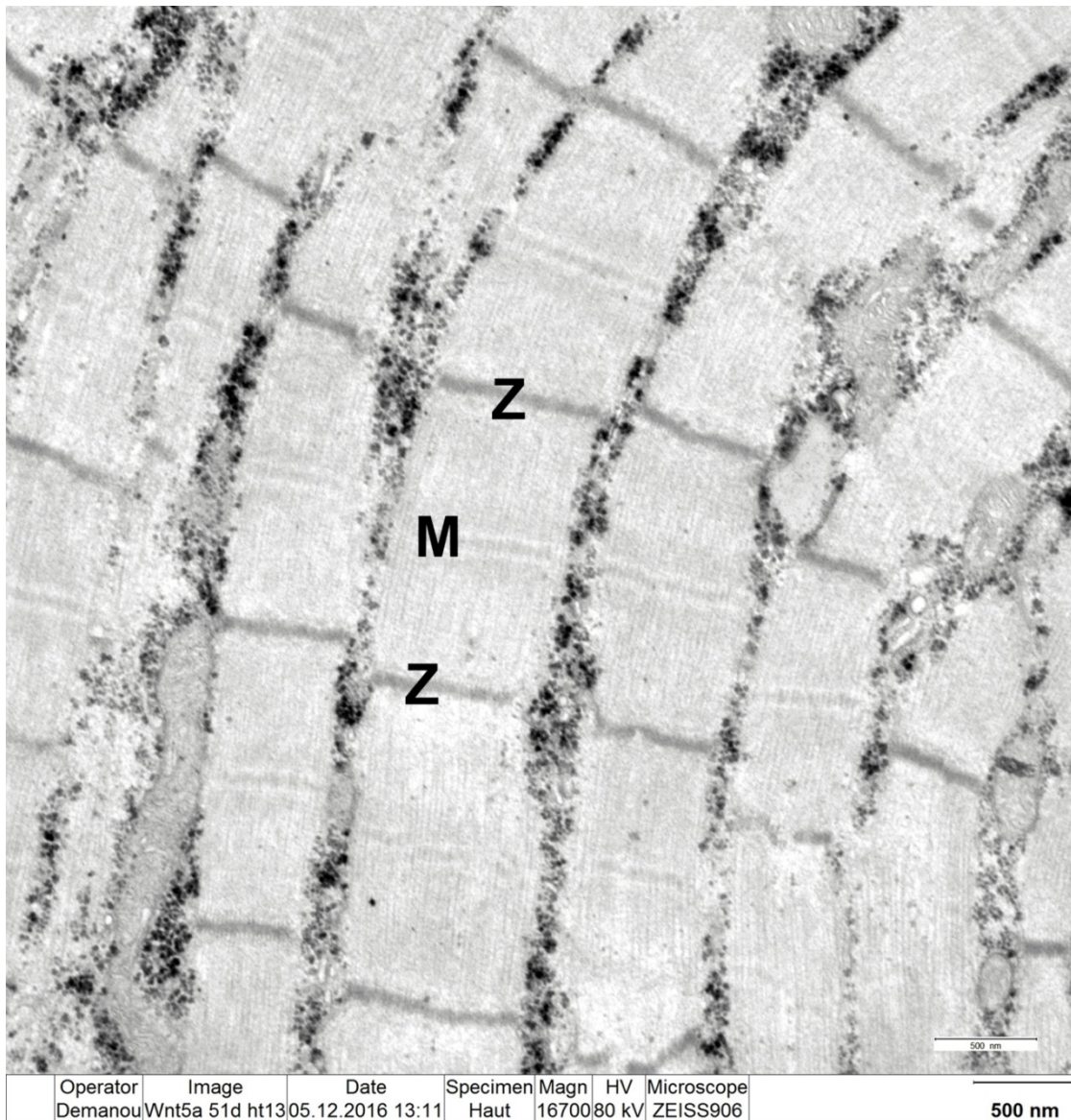


**Abb. 4: Semidünnschnitte eines heterozygoten *Wnt5a*-ko-Mausembryos.**

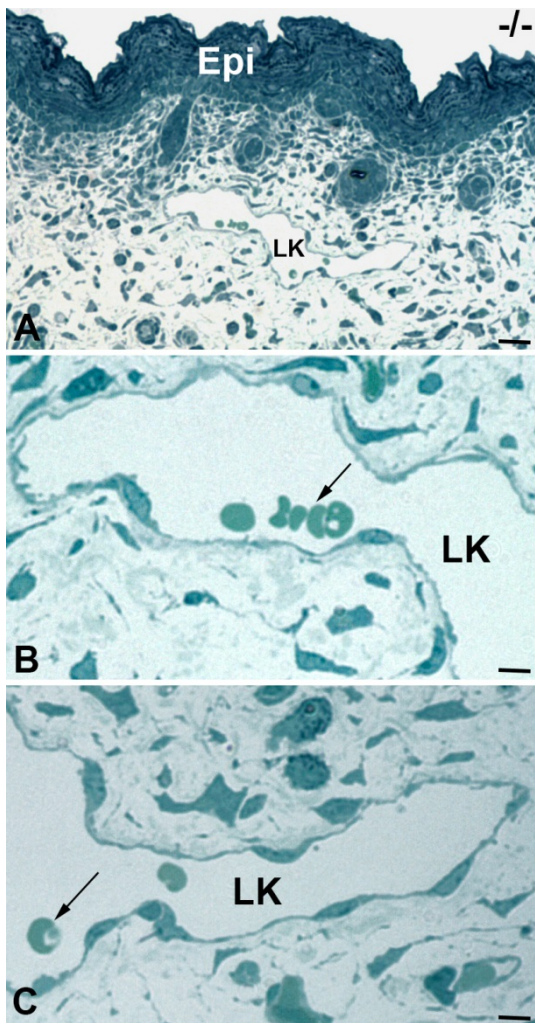
A) Übersichtsaufnahme der murinen Bauchhaut in 10-facher Objektivvergrößerung. Die heterozygoten wie auch die Wildtyp-Embryos weisen eine reguläre gut strukturierte Epidermis und Dermis auf. Weiterhin erkennt man auch unmittelbar unterhalb der Dermis eine dünne quergestreifte Muskelschicht, Balken=20 $\mu$ m.

B, C) Vergrößerungen der einzelnen Lymphgefäße mit 40-facher Objektivvergrößerung, Balken=5 $\mu$ m.

Epi=Epidermis, LK=Lymphkapillare, qM=quergestreifte Hautmuskulatur.



**Abb. 5:** Myofibrillen in mehreren längs geschnittenen Skelettmuskelfasern bei 16.700-facher elektronenmikroskopischer Vergrößerung aus Abb.4A und 4B. Auffallendstes Merkmal ist die Querstreifung, auch gut erkennbar sind die Sarkomere zwischen 2 Z-Linien und die M-Linie.



**Abb. 6: Semidünnschnitte einer homozygoten Wnt5a-ko-Maus.**

A) Übersicht der Bauchhaut in 10-facher Objektivvergrößerung. Die Epidermis scheint aufgelockert, breiter als bei den beiden anderen Mauslinien. In der Dermis ist eine Auflockerung des Bindegewebes sichtbar, möglicherweise sind die Zellen aufgrund von Flüssigkeitseinlagerungen voneinander getrennt, Balken=20 $\mu$ m.

B, C) Vergrößerungen einzelner Lymphgefäße mit 40-facher Objektivvergrößerung, Balken=5 $\mu$ m.

Epi=Epidermis, LK=Lymphkapillare, Erythrozyten (Pfeil).

### 3.3 Elektronenmikroskopische Auswertung der Ultradünnschnitte

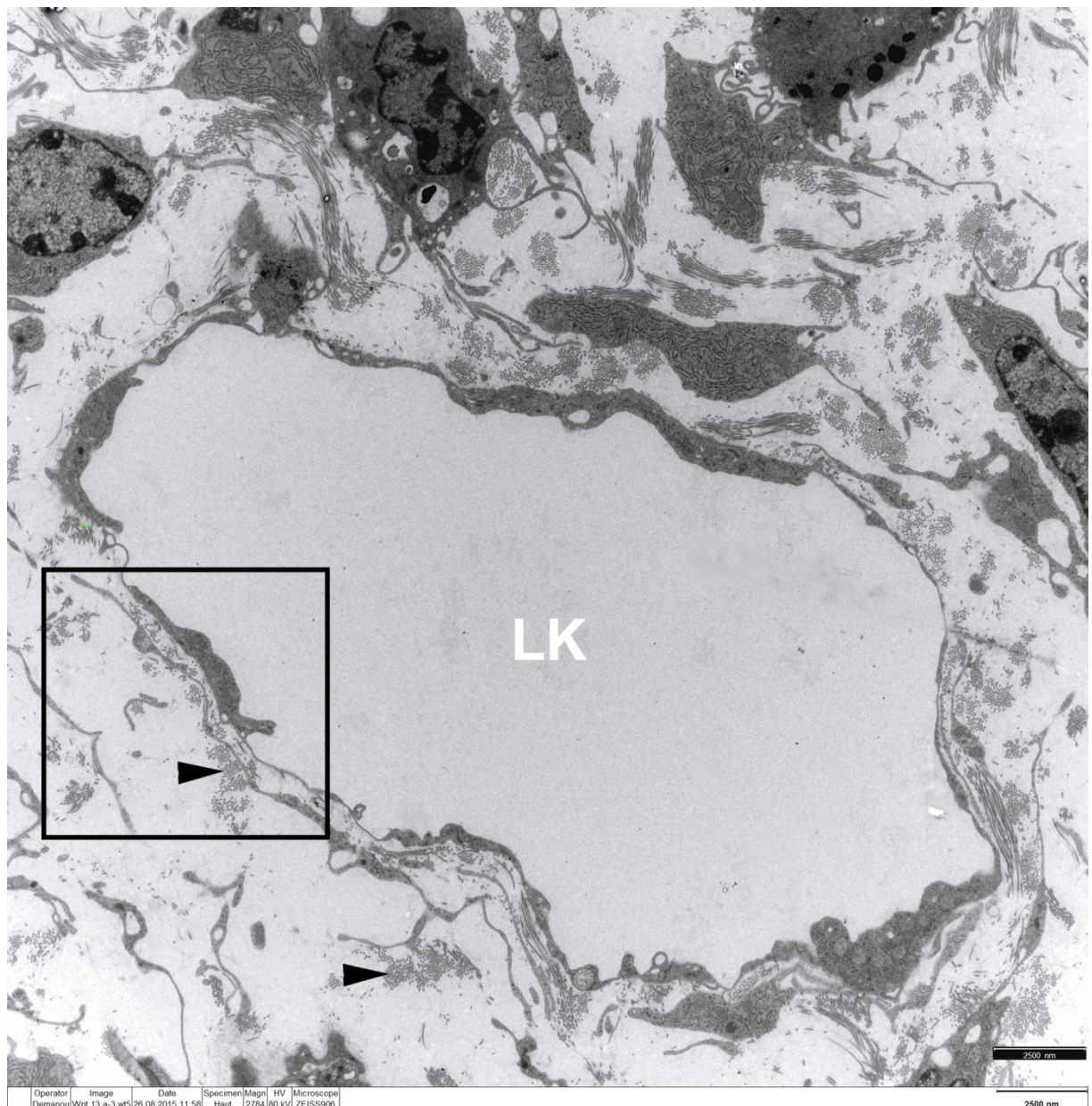
Um die unterhalb des Auflösungsvermögens der Lichtmikroskopie liegenden Strukturen der Lymphkapillare beurteilen zu können, wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung der ausgewählten Ultradünnschnitte durchgeführt. Bei meiner Arbeit liegt das Interesse besonders auf der elektronenmikroskopischen Beurteilung von Veränderungen der Lymphgefäßwände, bedingt durch die Wnt5a-Deletion. Besonders limitierend war hier der Prozess des Schneidens der Probe, der oft mit einem erheblichen Verlust an Gewebe und auch Verzerrungen der Schnittflächen einhergeht. Außerdem war das Wabenmuster der Digitalkamera bei Erstellung der EM-Bilder so gravierend, dass die Aufnahmen bestimmter Strukturen in den niedrigen Vergrößerungen eingeschränkt beziehungsweise häufig sogar unmöglich waren.

### **3.3.1 Auswertung von Ultradünnschnitten von heterozygoten Wnt5a-ko- und Wildtyp-Mäusen**

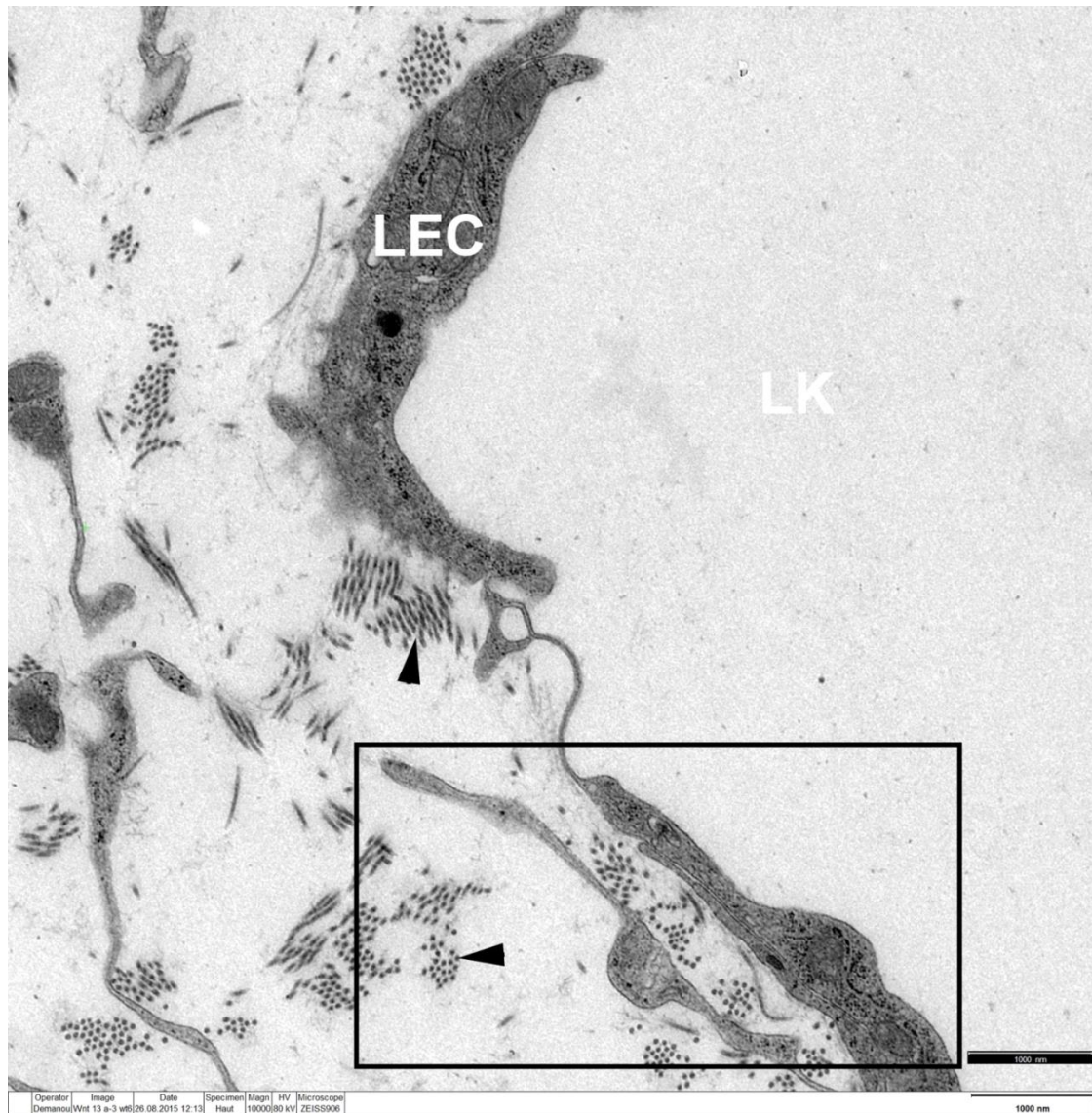
Bei der elektronenmikroskopischen Auswertung von Ultradünnschnitten aus heterozygoten und Wildtyp-Mausembryonen konnte ich feststellen, dass die Lymphgefäße in ihrem morphologischen Wandaufbau, in der Anzahl und im Gefäßdurchmesser nahezu identisch sind. Besonders wichtig bei diesen Mauslinien ist die Integrität der Lymphgefäßwand, d. h. pathologische Veränderungen an Lymphendothelzellen fehlen oder sind nicht sichtbar.

Elektronenmikroskopisch sind die Lymphgefäßwände sehr dünn und bestehen vor allem aus eichenblattförmigen Endothelzellen. An manchen Stellen überlappen sich die Zellfortsätze benachbarter Endothelzellen dachziegelartig und werden schwingende Zipfel genannt. Aus diesen Zipfeln werden bei einer Druckerhöhung im Interzellularraum sogenannte Einlassventile gebildet, wodurch die Lymphe und andere Makromoleküle ins Lumen hineinströmen (Abb. 7-9).



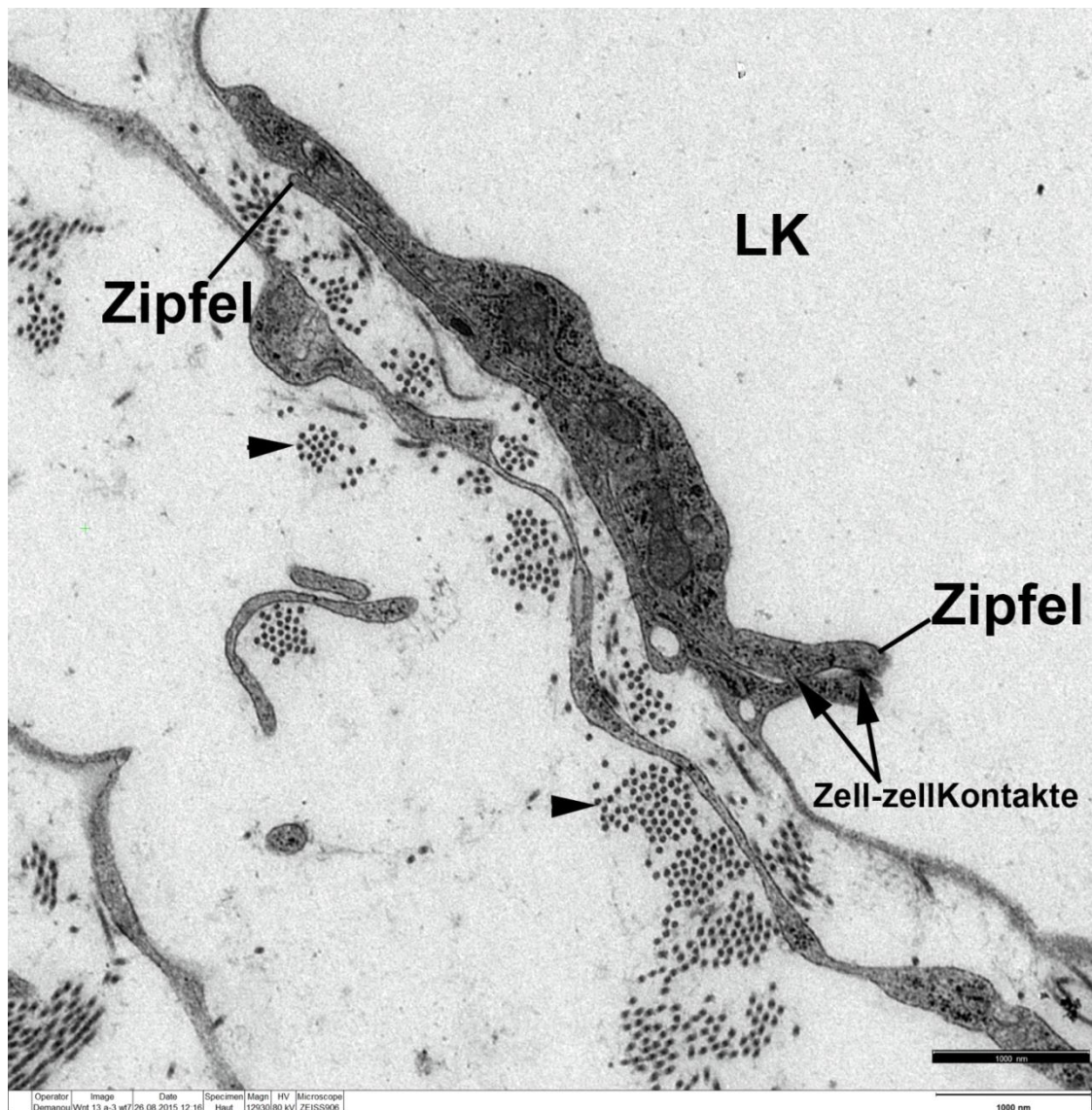


**Abb. 7: EM-Aufnahme einer Lymphkapillare aus der Bauchhaut eines Wildtyp-Mausembryos am ED 18,5.** Die Lymphkapillare (LK) ist sehr dünnwandig und besteht vor allem aus Endothelzellen. Eine Basallamina ist hier nicht erkennbar. Die Fortsätze zweier benachbarter Endothelzellen überlappen dachziegelartig und bilden somit ein Einlassventil, welches für die Lymphbildung eine wichtige Rolle spielt. Zwischen den Zellen im Interstitialraum sind Kollagenfibrillen vom Typ I (Pfeilspitze) vereinzelt zu schmalen Bündeln zusammengefasst. 2.784x.



**Abb. 8: Vergrößerung eines Abschnittes des Einlassventils aus Abb. 7.** Die Endothelzellfortsätze überlappen dachziegelartig. Diese Zellfortsätze können sich bewegen, weshalb sie ‚schwingende Zipfel‘ genannt werden können.

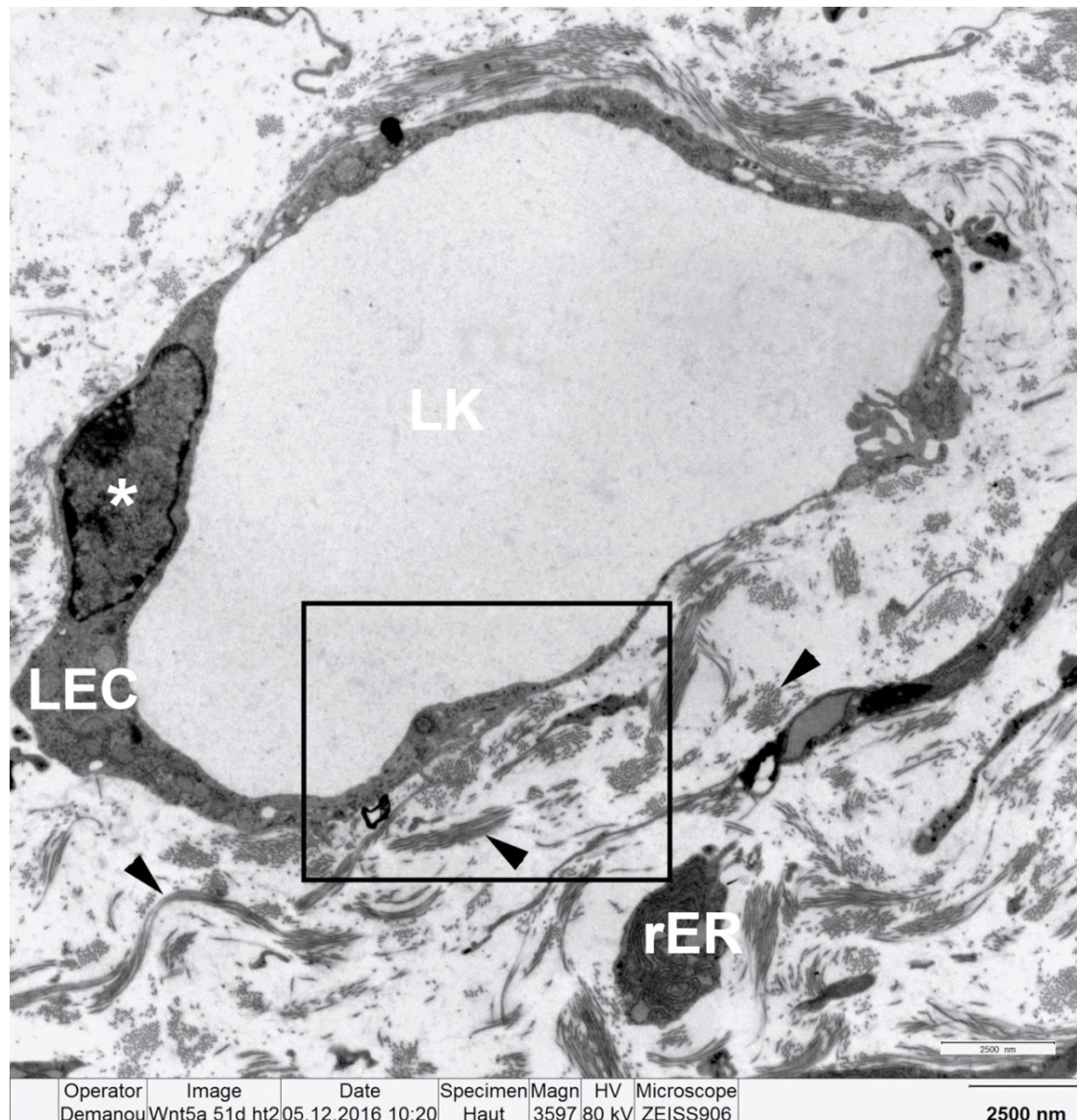
LEC=Lymphendothelzelle, Kollagen vom Typ I (Pfeilspitze). 10.000x.



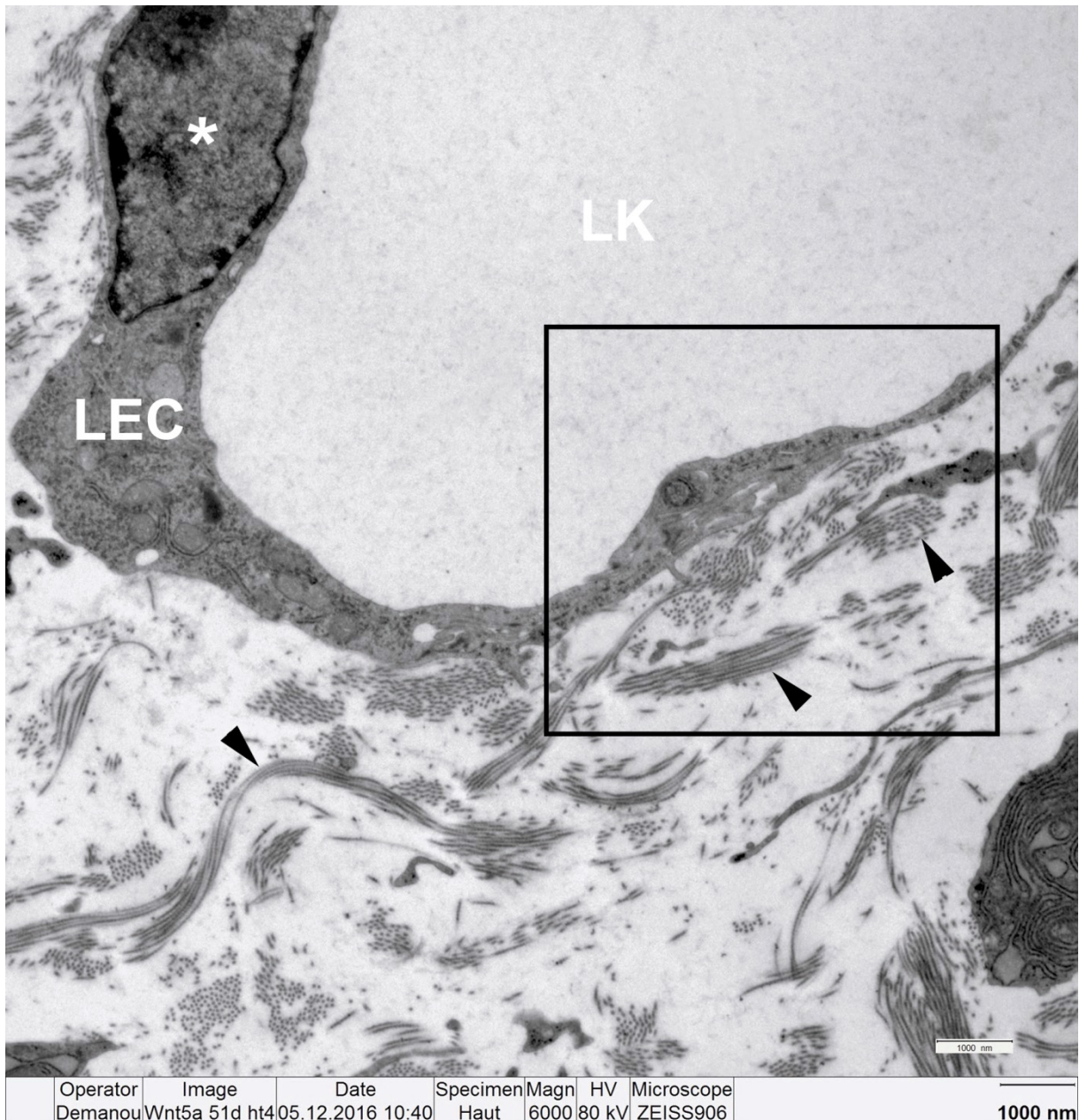
**Abb. 9: Vergrößerung eines Einlassventils aus Abb. 7.** An der Basis dieser eichenblattförmigen Endothelzellfortsätze befinden sich Zell-Zellkontakte in Form von Adhärenskontakten und Zonulae occludentes. An den Außenflächen dieser schwingenden Zipfel inserieren Ankerfilamente, welche die Spannung bei einer Druckerhöhung im Interstitium auf die Zipfel übertragen, wodurch Öffnungen (Einlassventile) zwischen den Fortsätzen entstehen und somit einen Flüssigkeitseintritt aus dem Interstitium ins Lymphkapillarlumen ermöglichen. Zwischen den Zellen im Interstitium sind Kollagenfibrillen vom Typ I (Pfeilspitze) vereinzelt in schmalen Bündeln zusammengefasst. LK=Lymphkapillare. 12.930x.

Wie schon bei den Semidünnschnitten beschrieben, bestehen zwischen Wildtyp- und heterozygoten Mausembryonen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Morphologie

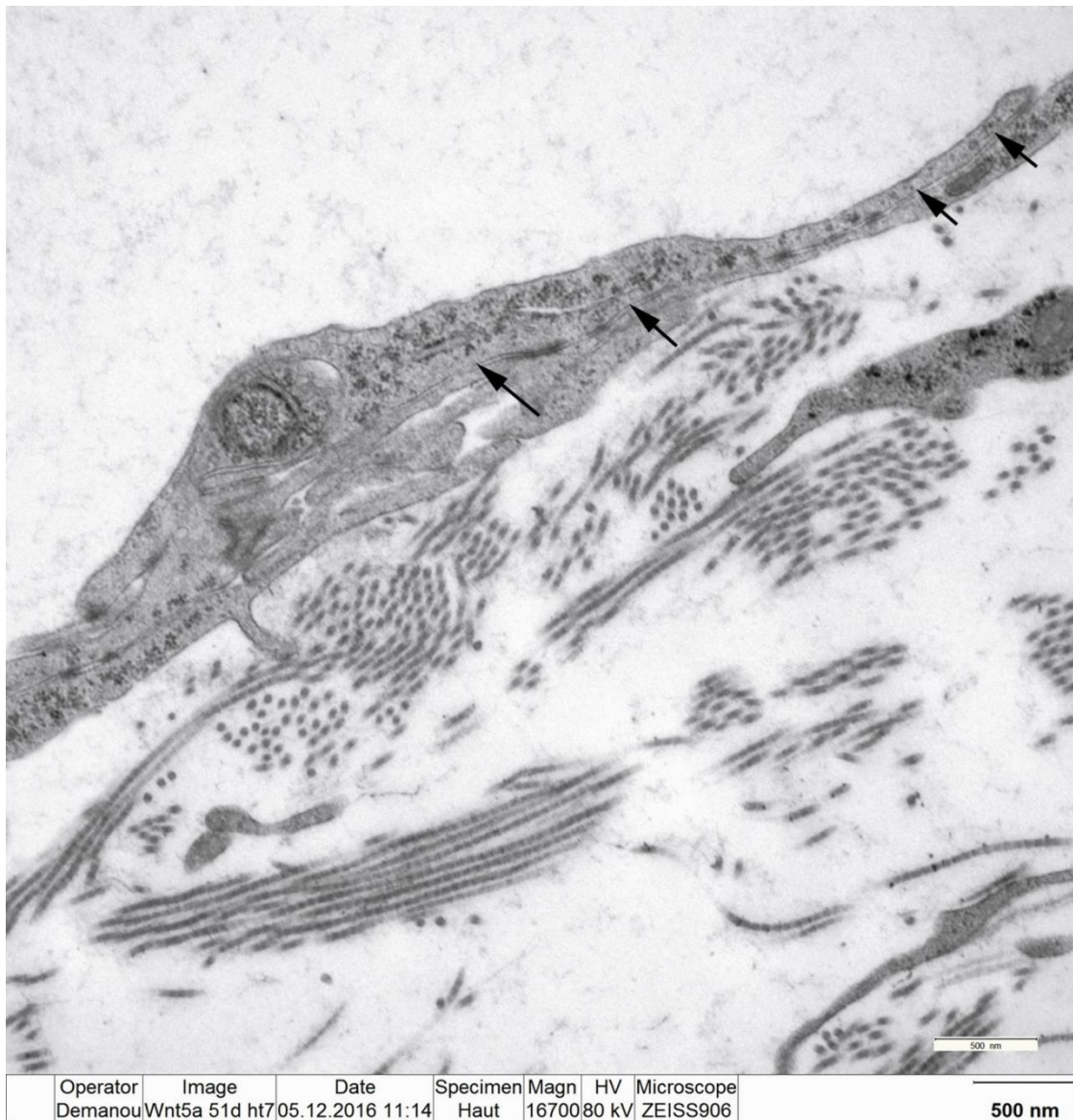
der Lymphgefäßwand und der Anzahl der Lymphgefäße der Haut. Dies konnte ich auch bei den Ultradünnschnitten beobachten (Abb. 10-14).



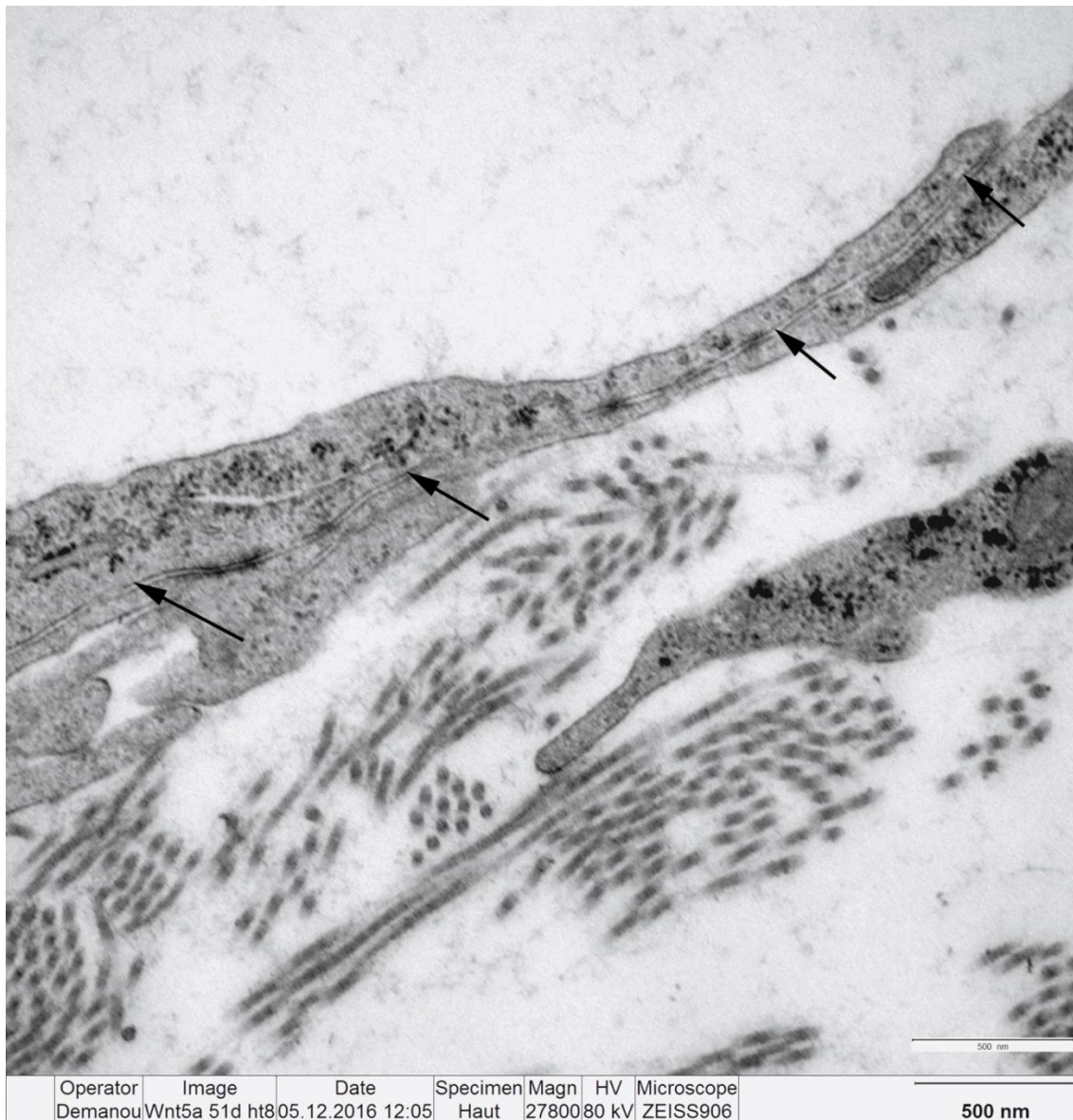
**Abb. 10: EM-Aufnahme einer Lymphkapillare aus der Bauchhaut eines heterozygoten *Wnt5a*-ko-Mausembryos am ED-18,5.** Die Lymphkapillare (LK) ist sehr dünnwandig und besteht aus einschichtigen Endothelzellen mit stachelartigen Fortsätzen. Ein gut ausgeprägtes und im Interstitialraum gelegenes raues endoplasmatisches Retikulum (rER) eines Fibrozyten ist erkennbar. Die interzellulären Kollagenbündel (Pfeilspitze) sind in hoher Dichte angeordnet. Der markierte Ausschnitt zeigt die Überlappung zweier Endothelzellfortsätzen. Die Lymphendothelzellen (LEC) mit ihrem langgestreckten Zellkern (Stern) begrenzen glatt das Lumen, welches oval bis sternförmig sein kann. 3.597x.



**Abb. 11: Vergrößerung eines Einlassventils aus Abb. 10.** LEC=Lymphendothelzelle mit Zellkern (Stern), Kollagenfasern vom Typ I (Pfeilspitze), LK=Lymphkapillare. 6.000x.



**Abb. 12: Vergrößerung des Einlassventils.** Gut erkennbar sind die sich überlappenden Zellfortsätzen, welche bei einer Drucksteigerung im Interstitium als Einlassventil fungieren und den Transport von Flüssigkeiten und anderen Substanzen aus dem Interstitialraum ins Gefäßlumen ermöglichen. 16.700x.



**Abb. 13: Vergrößerung eines Abschnitts des Einlassventils.** Dieser Abschnitt zeigt zwei angrenzende Zellfortsätze, die sich überlappen und einen Spalt für den Lymphfluss freilassen. 27.800x.



**Abb. 14: Vergrößerung eines Abschnittes des Einlassventils.** Längs und quer angeschnittene Kollagenfaserbündel (Pfeilspitzen). 27.800x.

### 3.3.2 Auswertung von Ultradünnschnitten von homozygoten Wnt5a-ko-Mäusen

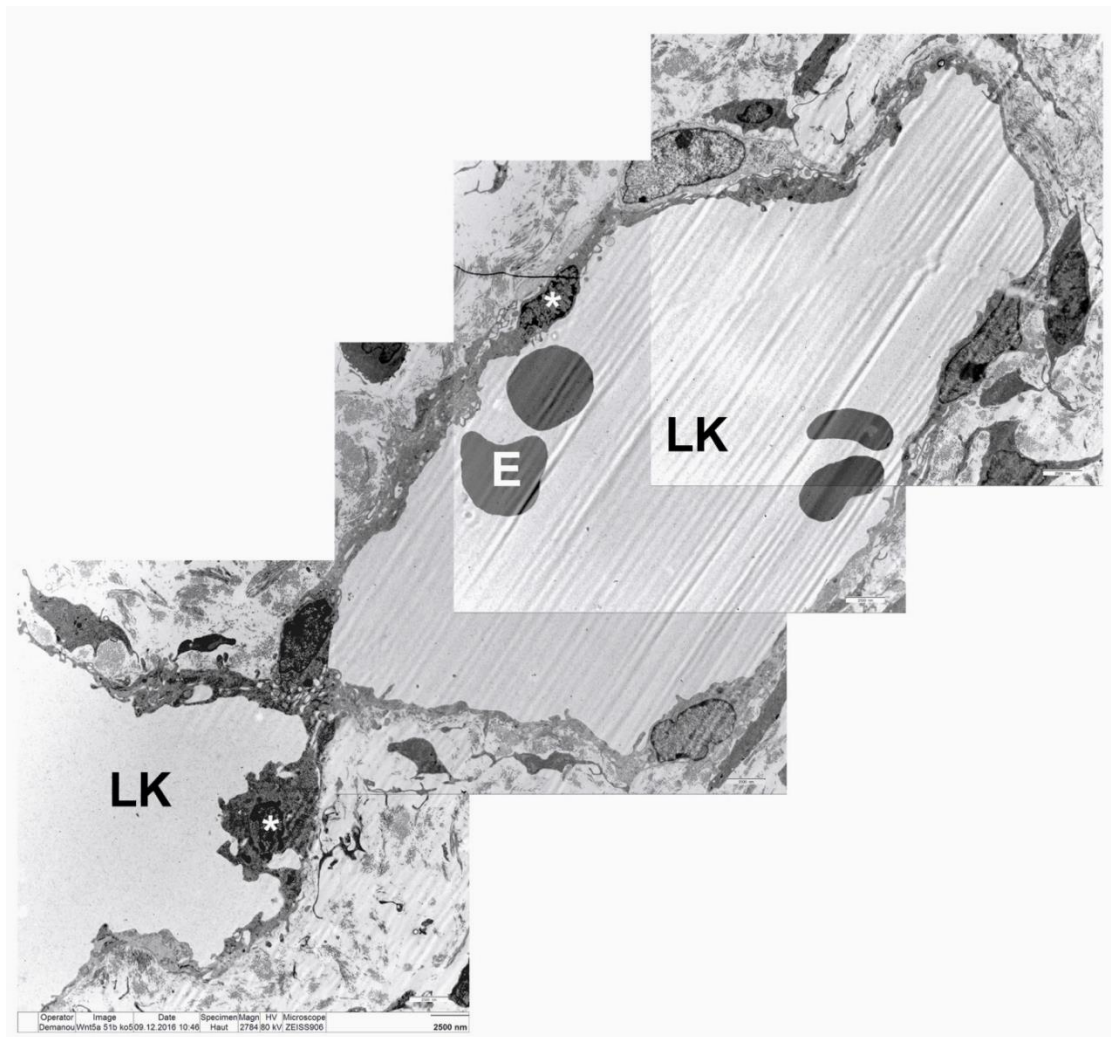
Schon bei der makroskopischen Begutachtung konnte ich feststellen, dass homozygote Wnt5a-ko-Mäuse signifikante Defekte in den Bereichen der Extremitäten und im Kopfbereich zeigten. Man beobachtet bei diesen Mäusen auch ein Fehlen des Schwanzes sowie eine Verkürzung der Körperachse. Die Gefäße der Embryonen sind so dilatiert, dass mehrere Aufnahmen für ein einzelnes Gefäß nötig waren. Anschließend wurden die Bilder so montiert, dass die kompletten Gefäße betrachtet werden können.



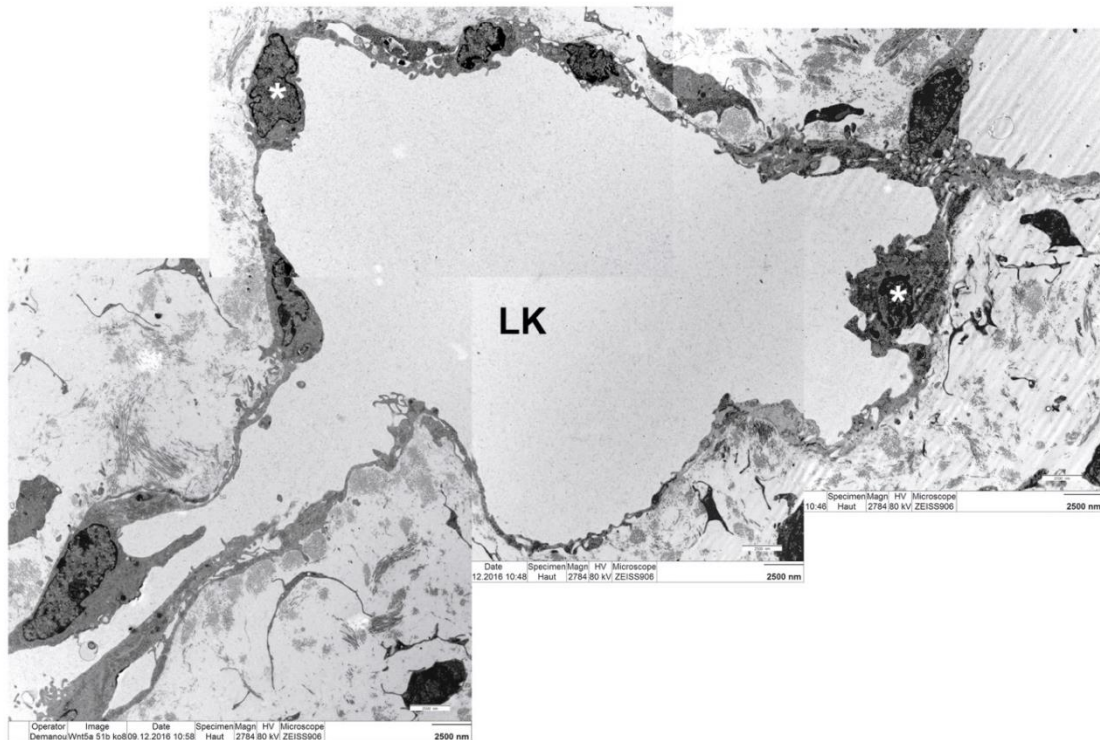
Meine lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die homozygoten *Wnt5a*-ko-Mäuse weniger Lymphgefäße besaßen; dafür aber deutlich größere, dilatiert erscheinende initiale Lymphgefäße. Weiterhin enthielten einige Lymphgefäße rote Blutkörperchen in ihrem Lumen, was für Lymphgefäße untypisch ist (Abb. 15, 16). Die elektronenmikroskopische Beurteilung von dermalen Lymphgefäßen aus homozygoten ko-Embryos lässt im Vergleich zu den anderen Mauslinien neue Gesichtspunkte erkennen. Der Wandbau der Lymphgefäße ist von Endothelzellen gebildet. Diese sind allerdings morphologisch stark verändert und begrenzen das Lumen nicht mehr glatt. Auffällig sind die zahlreichen Bläschen und Membranausläufer an der dem Lumen zugewandten Fläche der Endothelzellen, welche somit ins Lumen hineinragen. Wichtig ist auch, die Polymorphie der Kerne der Endothelzellen zu erwähnen. Diese sind entweder rund, oval oder langgestreckt und mäßig gelappt (Abb. 15-17).



**Abb. 15: EM-Aufnahmen einer Lymphkapillare aus der Bauchhaut eines homozygoten *Wnt5a*-ko-Mausembryos am ED-18,5.** Auch dieses Lymphgefäß besteht aus Endothelzellen, welche Bläschen und Membranvesikel an der dem Lumen zugewandten Fläche der Endothelzellen aufweisen. Auffällig ist auch, dass die Zellkerne (Stern) vielgestaltig sind. Die dachziegelartigen Überlagerungen, die typisch für die lateralen Enden benachbarter Endothelzelle sind, sind hier kaum aufzufinden. Darüber hinaus konnte man an einigen Stellen eine zweite Zellschicht erkennen. Hinzu kommt das Vorhandensein von Erythrozyten im Kapillarlumen, was auch auf eine dünnwandige Vene hinweisen könnte. E=Erythrozyten, Zellkern (Stern). 2.784x.



**Abb. 16: EM-Aufnahmen von zwei angrenzenden Lymphkapillaren eines homozygoten Wnt5a-ko-Mausembryos am ED-18,5.** Die weit dilatierten Lymphkapillaren (LK) weisen unterschiedliche Veränderungen der Endothelzellen auf. Die Begrenzung der Endothelzellen zum Lumen ist nicht glatt. Man erkennt Vesikel und Ausziehungen der Endothelzellen in Richtung Lumen hin. Die dachziegelartige Überlappung, welche charakteristisch für den Wandaufbau der Lymphkapillaren ist, ist nicht erkennbar. Die Zellkerne (Sterne) sind polymorph. E=Erythrozyten. 2784x.



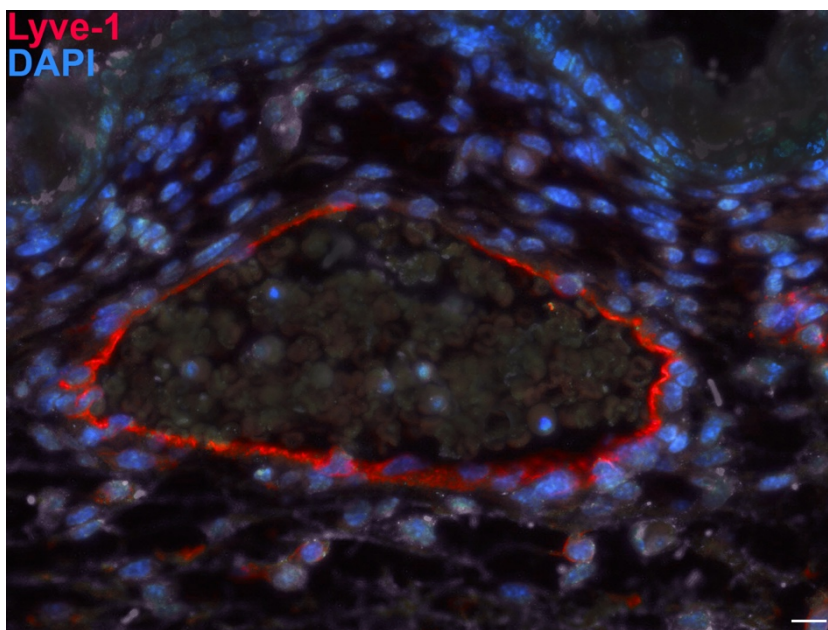
**Abb. 17:** EM-Aufnahmen von zwei angrenzenden Lymphkapillaren eines homozygoten *Wnt5a*-ko-Mausembryos am ED18,5. Die Lymphkapillare (LK) ist dünnwandig und besteht aus einer einschichtigen Lage von Endothelzellen. Ausläufer der Zellen ragen ins Lumen hinein. Das Lumen ist teils sternförmig und am linken unteren Bildrand teilweise kollabiert. Die Kerne (Sterne) der Endothelzellen sind polymorph. 2.784x.

### 3.4 Auswertung der homozygoten *Wnt5a*-ko-Mäuse mittels immunhistologischer Färbung

Da die Lymphgefäße der *Wnt5a*-ko-Embryonen mit Erythrozyten gefüllt waren (siehe Abb. 6, 15 und 16) führte ich eine immunhistologische Färbung der Hautgewebeproben durch, um zu beweisen, dass es sich tatsächlich um Lymphgefäße handelt. Die in der Bauchhaut vorkommenden Lymphgefäße konnten durch Färbungen mit Antikörpern gegen den Hyaluronanrezeptor Lyve-1 (*lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1*) nachgewiesen werden (Abb. 18). Lyve-1 ist einer der frühesten Marker für die Entwicklung von Lymphgefäßen durch Aussprossung aus der embryonalen Kardinalvene. Das Ergebnis zeigt, dass die Lyve-1-positiven dermalen Lymphgefäße Erythrozyten enthalten, was auch mit den Beobachtungen der petechialen Einblutungen in der Dermis dieser Embryonen im Einklang steht. Die Füllung mit Erythrozyten weist auf eine fehlende Funktionsaufnahme der

Lymphgefäße hin. Die ersten embryonalen Lymphgefäße enthalten Erythrozyten, die aber mit der Funktionsaufnahme ins Venensystem gespült werden (Sabin 1902).

Erwähnt sei an dieser Stelle auch, dass der von mir eingesetzte Antikörper gegen Wnt5a bei den homozygoten Wnt5a-ko-Embryonen praktisch das gleiche Signal erzeugte wie bei den Wildtyp Embryonen (nicht gezeigt). Da das Wnt5a Protein bei den homozygoten ko-Embryonen aber vollständig fehlt, muss die Spezifität des Antikörpers bezweifelt werden. Kernhaltige Zellen wurden mit DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol), einem blau fluoreszierenden DNA-Farbstoff, gegengefärbt (Abb. 18).



**Abb. 18: Immunhistologischer Nachweis von Lyve-1 (rot) an Hautgewebe von homozygoten Wnt5a-ko-Mäusen am ED-17,5.** Die Endothelzellen lassen sich durch den spezifischen Lymphendothelmarker Lyve-1 rot anfärben. In dieser Lymphkapillare erkennt man deutlich Erythrozyten durch ihre bikonkave Form. Kernfärbung mit DAPI (blau). Objektivvergrößerung 40x, Balken=12µm.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodendiskussion

Arbeitsschritte wie das Anfertigen von Semidünn- und Ultradünnschnitten für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und die Immunhistologie sind etablierte Verfahren und werden mit großer Sicherheit und Zuverlässigkeit durchgeführt. Nichtsdestoweniger möchte ich betonen, dass der Prozess des Schneidens der Hautgewebe zumeist mit einem Verlust an Strukturen und auch mit Verzerrungen der Schnittflächen einherging. Außerdem war das Wabenmuster der im TEM integrierten Digitalkamera bei Erstellung der EM-Bilder so gravierend, dass das Fotografieren bestimmter Strukturen bei schwachen Vergrößerungen teilweise eingeschränkt oder sogar unmöglich war.

#### 4.1.1 Wahl der licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung zur Auswertung der dermalen Lymphgefäßveränderung bei Mausembryonen

Für die lichtmikroskopische Untersuchung von dermalen Lymphgefäßen der Mausembryonen wurde für Semidünnschnitte eine Methylenblau-Azur-II-Färbung nach Richardson durchgeführt. Durch die Verwendung dieser Färbelösung werden basophile und osmiophile Strukturen blau dargestellt, metachromatische Strukturen färben sich rotviolett an.

Die Anfertigung und die lichtmikroskopische Auswertung der Semidünnschnitte wurden aus zwei Gründen vor der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Ultradünnschnitte durchgeführt. Einerseits dienten die Semidünnschnitte zum Auswählen geeigneter Areale für die ultrastrukturelle Untersuchung am Elektronenmikroskop. Andererseits erlaubten sie eine übersichtliche Beurteilung der Verteilung und Ausprägung unterschiedlich geformter Lymphgefäße der Hautgewebe bei unterschiedlichen Mauslinien.

Um die unterhalb des Auflösungsvermögens der Lichtmikroskopie liegende Ultrastruktur der Lymphgefäßwand beurteilen zu können, wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung der ausgewählten Präparateabschnitte durchgeführt. Die hierfür verwendeten Hautgewebe wurden zuvor in einer Karnovsky-Lösung aus Paraformaldehyd und Glutaraldehyd fixiert, anschließend in einer 1%iger  $\text{OsO}_4$ -Lösung osmiert und letztendlich in Epon eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden am Ultramikrotom Ultracut E mit Hilfe eines Diamantmessers angefertigt. Anschließend wurden die Ultradünnschnitte auf befilmte Kupfergrids aufgezogen. Die Schnittkontrastierung erfolgte mit Uranylazetat und Bleizitrat.

Aufgrund dieser Färbemethode (Osmium, welches Fetteinschlüsse schwarz hervorhebt; Uranylacetat, welches Nukleinsäuren und bestimmte Proteine schwärzt; Bleiionen, die negativ geladene Strukturen färben und den Osmiumeffekt verstärken) erscheinen ultrastrukturell sämtliche Zellmembranen schwarz. Diese gängige Technik ermöglichte durch ihre übersichtliche und besonders kontrastreiche Darstellung sowohl intra- als auch extrazellulärer Strukturen eine umfassende morphologische Untersuchung der zellulären Lymphgefäßelemente.

#### **4.1.2 Wahl der Immunhistologie zum Nachweis der Lymphgefäße von Wnt5a-ko-Mausembryonen**

Während der licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung von homozygoten Wnt5a-ko-Mäusen konnte ich dilatierte und mit roten Blutkörperchen gefüllte initiale Lymphgefäße nachweisen. Da die Morphologie von dünnwandigen Venen und Lymphkollektoren sehr ähnlich ist, war es besonders wichtig, einen immunhistologischen Nachweis mittels Lymphendothelmarkern durchzuführen, um Fehlinterpretationen zu vermeiden. Die Lymphgefäße sind mit Endothelzellen ausgekleidet, welche Moleküle wie z. B. Prox1, Lyve-1 und Podoplanin exprimieren, welche hoch spezifisch für Lymphendothel sind. So konnte die Charakterisierung dieser Lymphendothelzellen mit Hilfe des immunhistologischen Nachweises von Lyve-1 durchgeführt werden.

## **4.2 Ergebnisdiskussion**

### **4.2.1 Diskussion der lichtmikroskopischen Befunde von dermalen Lymphgefäßen**

In der vorliegenden Arbeit konnten einerseits dermale Lymphgefäße aus Wildtyp- und heterozygoten Mausembryonen und andererseits die des homozygoten Wnt5a-ko-Mausembryos mittels Semidünnschnitttechnik und Lichtmikroskopie ausführlich untersucht und miteinander verglichen werden. Dabei waren vor allem die initialen Lymphgefäße von homozygoten-ko-Mäusen morphologisch verändert. Bei den beiden anderen Genotypen lassen sich solche Veränderungen kaum feststellen.

Aus meinen Ergebnissen ließ sich entnehmen, dass die initialen Lymphgefäße (Lymphkapillaren) der Haut von wildtyp- und heterozygoten Mausembryos insgesamt in der Anzahl höher sind als bei den homozygoten Wnt5a-ko-Mäusen. Sie treten in definierten

Abständen auf und die Integrität der einzelnen Endothelzellen ist gewahrt. Lichtmikroskopisch lassen sie einen dünnen Einzelschichtbau aus Endothelzellen erkennen. Bei den homozygoten Wnt5a-ko-Mäusen konnte ich in vergleichbaren Schnitten nur wenige bis gar keine Lymphgefäße auffinden, und die vorhandenen waren dafür auffällig dilatiert und mit Erythrozyten gefüllt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Lymphkapillaren als Endothelröhren präsentieren. Die lichtmikroskopischen Analysen liefern keinen deutlichen Anhaltspunkt dafür, dass sich zwischen Wildtyp und heterozygoten Mäusen bezüglich der Anzahl und des Aussehens der Lymphgefäße in der oberen Dermis Unterschiede ergeben. Bei homozygoten Wnt5a-ko-Mäusen hingegen kommen dermale Lymphgefäße deutlich seltener vor. Sie sind aber weit dilatiert und beinhalten Erythrozyten in ihrem Lumen.

#### **4.2.2 Diskussion der elektronenmikroskopischen Befunde von dermalen Lymphgefäßen**

Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der dermalen Lymphgefäße von Wnt5a-ko-Mäusen ist bislang nicht durchgeführt worden. Die zentrale Methode der vorliegenden Arbeit ist das Erzeugen elektronenmikroskopischer Bilder der dermalen Lymphgefäße von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Wnt5a-ko-Mausembryonen an ED-18,5.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Wildtyp- und heterozygoten Mäuse weisen keine Unterschiede auf und zeigen, dass die Lymphkapillaren vor allem aus einer Schicht überlappender Endothelzellen bestehen. Diese liegen dachziegelartig übereinander. Ihre Fortsätze werden auch „schwingende Zipfel“ genannt. Diese können bei Flüssigkeitsansammlung im Interstitialraum interendotheliale Öffnungen, sogenannte Einlassventile, bilden, welche eine wesentliche Rolle für den Lymphfluss ins Gefäßlumen spielen.

Die homozygoten-Wnt5a-ko-Mäuse zeigen hingegen viele ausgeprägte Veränderungen an viele Organstrukturen (Lymphgefäße, Haut, Kopf und Extremitäten). Die Lymphgefäßwand ist zwar dünn und auch von Endothelzellen gebildet. Diese weisen aber zum Lumen hin Membranausziehungen, beziehungsweise Ausbuchtungen auf. Ihre typischen Überlappungen sind nicht mehr erkennbar. Die Zellgrenzen benachbarter Zellen sind komplett unstrukturiert. Auch die Zellkerne nehmen unterschiedliche Formen an.

Die Abbildung 15 zeigt ein Lymphgefäß, welches aufgrund der unterschiedlich aufgebauten Wandabschnitte Ähnlichkeiten mit einem Präkollector aufweist. Dieses Gefäß weist einen



Wandanteil mit einer zusätzlichen Zellschicht und daneben einen mit kapillärem Charakter auf. Aufgrund der Füllung mit Erythrozyten besteht die Gefahr, es mit einem Blutgefäß zu verwechseln, da Präkollektoren und vor allem die Lymphkollektoren den dünnwandigen Venen ähneln.

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen stark dilatierte Lymphkapillaren, was auf den Verlust des Gens *Wnt5a* zurückzuführen ist (Buttler et al. 2013). Eine andere Ursache für die Dilatation von Lymphkapillaren kann auch die Ansammlung der Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D in der Haut sein. So werden z.B. aufgrund des Fehlens der Tyrosinkinase SYK angiogene Faktoren verstärkt produziert (Böhmer et al. 2010).

Zusätzlich konnte ich auch größere Spalträume zwischen die Bindegewebezellen des Extrazellularraums feststellen, die vermutlich von angesammelter Interstitialflüssigkeit ausgefüllt sind. Die Dysfunktion der Lymphkapillaren manifestiert sich makroskopisch als Lymphödem. Damit lassen sich die Folgen des Verlustes von *Wnt5a* auf die Endothelzellen herleiten. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe an *Wnt5a*-ko-Mäusen ist bekannt, dass *Wnt5a* die Lymphgefäßentwicklung steuert und dabei nicht nur die initialen Lymphgefäße, sondern auch die Kollektoren bei den homozygoten ko-Mäusen fehlentwickelt sind.

Durch immunhistologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Lymphangiom nicht nur die bekannten Lymphendothelmarker wie *Prox1*, *Podoplanin* und *Lyve-1*, aber auch *Wnt5a* in den Lymphendothelzellen nachweisbar ist. Dabei war *Wnt5a* 16-fach höher in Lymphendothelzellen als in HUVEC (humane venöse Endothelzellen) nachweisbar. Weiterhin konnte das Vorhandensein von *Wnt5a* und seiner Rezeptoren *ROR2* und *RYK* in Lymphendothelzellen von Mäusen und auch *in vitro*, aber in geringen Mengen, in Blutendothelzellen von Menschen und Mäusen nachweisen werden (Buttler et al. 2013). Das Fehlen von *Wnt5a* ruft deutliche Defekte bei der Entstehung regulärer Lymphgefäße bei Mausembryonen hervor.

Einen weiteren wichtigen Aspekt von *Wnt5a* konnten Yamaguchi et al. (1999) aufzeigen. Sie zeigten, dass bei Mäusen, die kein funktionelles *Wnt5a*-Gen besitzen, eine Vielzahl von Malformationen beobachtet werden kann: Neben Defekten in distalen Kompartimenten von Extremitäten wurde eine Verkürzung der Körperachse, das Fehlen von Schwanz, Finger und Zehen und Defekte im Gesicht und bei den Genitalien von homozygoten *Wnt5a*-ko-Mäusen beobachtet. Dies zeigt, dass *Wnt5a* bei der Entwicklung dieser Organe wichtige Funktionen besitzt und dort auch hoch exprimiert wird. Bei Mausembryonen ist *Wnt5a* auch in Zellen des Atemapparates lokalisiert und besitzt auch eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung der Atemwege. Der Atemapparat von *Wnt5a*-ko-Mäusen weist mehrere Anomalien auf, z.B.

eine verkürzte Trachea, und auch eine Überdehnung der distalen Atemwege kann beobachtet werden. Eine Hemmung der Lungenreifung ist durch die Persistenz eines verdickten intersacculären Interstitiums gekennzeichnet. Dies führt zum Sterben der Mäuse unmittelbar nach der Geburt (Li et al. 2002).

#### **4.2.3 Diskussion der immunhistologischen Befunde von dermalen Lymphgefäßen**

In der vorliegenden Arbeit konnte ich blutgefüllte Lymphgefäße bei *Wnt5a*-ko-Mäusen feststellen. Bei der Passage von Blut durch die Blutkapillaren tritt eine wässrige farblose Flüssigkeit in den Interzellularraum über. Dieses Ultrafiltrat enthält Elektrolyte, kleine Mengen an Proteinen, Chylomikronen und weiße Blutkörperchen, ebenso Langerhans-Zellen und andere lymphpflichtige Substanzen, wie auch eingeatmeten Staub und apoptotische Zellen (Földi und Földi 2010). Die Tatsache, dass neben kernhaltigen Zellen auch rote Blutkörperchen in den Lymphkapillaren zu finden waren, war eine neue Erkenntnis. Der immunhistologische Nachweis des Lymphendothelzellmarkers Lyve-1 konnte die letzten Zweifel ausräumen, dass es sich um Lymphkapillaren handelte. Eine mögliche Begründung für das Vorkommen von Erythrozyten in den Lymphkapillaren liegt in einer gestörten Trennung der Lymphgefäße von dem venösen Blutsystem. Diese Trennung findet in der frühen embryonalen Phase statt und wird durch die Tyrosinkinase SYK ermöglicht. Das Fehlen dieses Proteins führt zu einer vermehrten Produktion der angiogen wirksamen Wachstumsfaktoren VEGF-C/-D und deren Akkumulation in der Haut, welche letztendlich zu einer lymphatischen Hyperplasie, Gefäßdilatation und zu einer fehlerhaften Verbindung zwischen Blutgefäß- und Lymphgefäßsystem (Lympho-vaskulärer Shunt) führt (Böhmer et al. 2010). Eine weitere Ursache für das Vorhandensein von Blutkörperchen in den Lymphkapillaren könnte ein Zerreißen einer Blutkapillare mit anschließender Blutansammlung im Interstitium sein. Dieses Blut wird letztendlich von den Lymphkapillaren resorbiert.

## 5 Zusammenfassung

Die Lymphgefäße sind essenziell für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase. Ihre vorrangigen Aufgaben bestehen in der Rückführung überschüssiger Gewebsflüssigkeit in die Blutzirkulation, dem Transport von Antigenen sowohl in löslicher Form als auch nach Aufnahme durch Zellen des Immunsystems und schließlich dem Transport von Nahrungsfetten. Fehlbildungen des lymphatischen Systems wie bei primären Lymphödemen (erblich bedingt oder durch spontane genetische Mutation), Schädigungen nach einem operativen Eingriff oder Bestrahlungen im Rahmen einer Krebsbehandlung können den Gesundheitszustand und die Lebensqualität der Betroffenen erheblich beeinträchtigen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, morphologische Veränderungen der dermalen Lymphgefäße aufgrund des Fehlens des Signalmoleküls Wnt5a bei 18,5 Tage alten Mausembryonen licht- und elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Für meine Arbeit verwendete ich die in unserer Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) gezüchteten Wnt5a-knockout-(ko)-Mäuse, denen das Protein Wnt5a fehlt. Die homozygoten Wnt5a-ko-Mausembryonen sind nicht lebensfähig. Sie sterben unmittelbar nach der Geburt. Ich habe daher Embryonen an den Embryonaltagen (ED) 17,5 - 18,5 untersucht. Die zentrale Methode in dieser Arbeit ist das Erzeugen elektronenmikroskopischer Bilder von initialen Lymphgefäßen aus ausgewählten Ultradünnschnitten der Bauchhaut von Mausembryonen aller Genotypen (Wildtyp, homozygote und heterozygote Wnt5a-ko). Um die initialen Lymphgefäße von Wnt5a-ko-Mäusen und Wildtyp-Mäusen zu vergleichen, wurden deren Hautgewebe auf die gleiche Weise aufgearbeitet, gefärbt und alle Bilder mit dem Elektronenmikroskop (Leo906) aufgenommen und im tif- und jpg-Format gespeichert. Bei der Betrachtung der Morphologie und Anzahl der Lymphkapillaren zeigte sich lichtmikroskopisch sowohl in Wildtyp- als auch in heterozygoten Wnt5a-ko-Mäusen eine höhere Anzahl von Lymphkapillaren in definierten Abständen in der oberen Dermis als in den homozygoten Wnt5a-ko. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Lymphgefäße aus einer einschichtigen Endothelzellschicht bestehen. Die Lymphendothelzellen (LEC) überlappen sich dachziegelartig. Das Gefäßlumen ist glatt begrenzt. Die Zellkerne der LEC sind länglich und liegen parallel zur Längsachse des Gefäßes. Eine Basalmembran im eigentlichen Sinne ist bei den Lymphkapillaren nicht erkennbar. Bei den homozygoten Wnt5a-ko-Mäusen lassen sich lichtmikroskopisch bedeutend weniger Lymphkapillaren erkennen, welche allerdings sehr voluminös und dilatiert ausfallen. Zusätzlich sind die Lymphkapillaren mit Erythrozyten gefüllt, was ich mit immunhistologischen Färbungen mit

dem LEC-Marker Lyve-1 bestätigen konnte. Elektronenmikroskopisch sind feine morphologische Veränderungen der Endothelzellen erkennbar. Diese sind offensichtlich nicht eichenblattförmig, so dass die dachziegelartigen Überlappungen benachbarter Zellfortsätze kaum vorhanden sind. Die Zellkerne nehmen viele Formen an (länglich, gelappt, oval).

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass der Verlust des Wnt5a-Proteins, neben vielen dramatischen Auswirkungen in anderen Geweben (Haut, Extremitäten und Genitalien), auch die Funktion der Lymphgefäße massiv einschränkt. Gewebeschwellungen oder Lymphödeme sind häufig die Konsequenz eines Versagens des lymphatischen Systems. Entweder liegt ein genetischer Defekt zugrunde, eine Verletzung nach einer Operation oder ein Trauma. Das Robinow-Syndrom ist eine seltene genetische Erkrankung, welche auf einer autosomal-dominanten Mutation im Wnt5a-Gen beruht. Betroffene zeigen verkürzte Extremitäten, Anomalien von Kopf und Gesicht (auch als Fetal Face bezeichnet), Anomalien der äußeren Genitalien und kardiovaskuläre Malformationen (Roifman et al. 2015). Eine Untersuchung der Rolle von Wnt5a bei der Lymphangiogenese dieser Patienten ist bislang noch nicht durchgeführt worden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV (2005): Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438, 946–953
- Böhmer R, Neuhaus B, Bühren S, Zhang D, Stehling M, Böck B, Kiefer F (2010): Regulation of Developmental Lymphangiogenesis by Syk+ Leukocytes. *Dev Cell* 18, 437–449
- Buttler K, Becker J, Pukrop T, Wilting J (2013): Maldevelopment of dermal lymphatics in Wnt5a-knockout-mice. *Dev Biol* 381, 365–376
- Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T (1995): Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378, 303–306
- Connell F, Gordon K, Brice G, Keeley V, Jeffery S, Mortimer P, Mansour S, Ostergaard P (2013): The classification and diagnostic algorithm for primary lymphatic dysplasia: an update from 2010 to include molecular findings. *Clin Genet* 84, 303–314
- Cueni LN, Detmar M (2006): New Insights into the Molecular Control of the Lymphatic Vascular System and its Role in Disease. *J Invest Dermatol* 126, 2167–2177
- Cueni LN, Detmar M (2008): The Lymphatic System in Health and Disease. *Lymphat Res Biol* 6, 109–122
- D’Amico G, Alitalo K (2010): Inside bloody lymphatics. *Blood* 116, 512–513
- Földi M, Földi E: Lehrbuch Lymphologie für Ärzte, Physiotherapeuten und Masseur, med. Bademeister. 7. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2010
- François M, Caprini A, Hosking B, Orsenigo F, Wilhelm D, Browne C, Paavonen K, Karnezis T, Shayan R, Downes M, et al. (2008): Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature* 456, 643–647
- Giles RH, van Es JH, Clevers H (2003): Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653, 1–24
- Gordon MD, Nusse R (2006): Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors. *J Biol Chem* 281, 22429–22433
- Hägerling R, Pollmann C, Andreas M, Schmidt C, Nurmi H, Adams RH, Alitalo K, Andresen V, Schulte-Merker S, Kiefer F (2013): A novel multistep mechanism for initial lymphangiogenesis in mouse embryos based on ultramicroscopy. *EMBO J* 32, 629–644
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004): LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: Arrows point the way. *Development* 131, 1663–1677
- Johnson NC, Dillard ME, Baluk P, McDonald DM, Harvey NL, Frase SL, Oliver G (2008): Lymphatic endothelial cell identity is reversible and its maintenance requires Prox1 activity. *Genes Dev* 22, 3282–3291

- Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, et al. (2004): Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5, 74–80
- Karpanen T, Alitalo K (2008): Molecular Biology and Pathology of Lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 3, 367–397
- Kiefer F, Adams RH (2008): Lymphatic endothelial differentiation: start out with Sox - carry on with Prox. *Genome Biol* 9, 243
- Kühl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT (2000): Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Is Stimulated by Wnt and Frizzled Homologs and Promotes Ventral Cell Fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* 275, 12701–12711
- Kumawat K, Gosens R (2016): WNT-5A: signaling and functions in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 73, 567–587
- Li C, Xiao J, Hormi K, Borok Z, Mino P (2002): Wnt5a Participates in Distal Lung Morphogenesis. *Dev Biol* 248, 68–81
- Logan CY, Nusse R (2004): The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781–810
- Maby-El Hajjami H, Petrova TV (2008): Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. *Histochem Cell Biol* 130, 1063–1078
- Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Stanczuk L, Tatin F, Kizhatil K, John SWM, Alitalo K, Ortega S, Makinen T (2015): Nonvenous Origin of Dermal Lymphatic Vasculature. Novelty and Significance. *Circ Res* 116, 1649–1654
- Mikels AJ, Nusse R (2006): Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits  $\beta$ -Catenin–TCF Signaling Depending on Receptor Context. *PLoS Biol* 4
- Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC, et al. (2003): The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 8, 645–654
- Oliver G (2004): Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol* 4, 35–45
- Oliver G, Detmar M (2002): The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 16, 773–783
- Pukrop T, Binder C (2008): The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. *J Mol Med* 86, 259–266
- Reya T, Clevers H (2005): Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850
- Roifman M, Brunner H, Lohr J, Mazzeu J, Chitayat D (2015): Autosomal Dominant Robinow Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean

- LJ, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJ, Stephens (Hrsg.): GeneReviews®. University of Washington, Seattle, Seattle (WA) 1993-2018
- Sabin FR (1902): On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am J Anat* 1, 367–389
- Sabin FR (1909): The lymphatic system in human embryos, with a consideration of the morphology of the system as a whole. *Am J Anat* 2, 43–91
- Schulte-Merker S, Sabine A, Petrova TV (2011): Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol* 193, 607–618
- Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT (1999): Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 2, 695-S1
- Tammela T, Alitalo K (2010): Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise. *Cell* 140, 460–476
- van Amerongen R, Fuerer C, Mizutani M, Nusse R (2012): Wnt5a can both activate and repress Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during mouse embryonic development. *Dev Biol* 369, 101–114
- Wigle JT, Oliver G (1999): Prox1 Function Is Required for the Development of the Murine Lymphatic System. *Cell* 98, 769–778
- Wilting J: Integrated Vascular Anatomy. In: Lanzer P, Topol EJ: Pan Vascular Medicine: Integrated Clinical Management. Springer, Berlin Heidelberg 2002, 50–75
- Wilting J, Papoutsi M, Schneider M, Christ B (2000): The lymphatic endothelium of the avian wing is of somitic origin. *Dev Dyn* 217, 271–278
- Wilting J, Aref Y, Huang R, Tomarev SI, Schweigerer L, Christ B, Valasek P, Papoutsi M (2006): Dual origin of avian lymphatics. *Dev Biol* 292, 165–173
- Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S (1999): A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126, 1211–1223
- Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, et al. (2008): Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135, 367–375

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
Ca <sup>2+</sup>	<i>ionized calcium</i>
CaMKII	Calmodulin-abhängige Kinase II
CCL	<i>chemokine ligand</i>
CCR	<i>chemokine receptor</i>
CREB	<i>cAMP response element-protein binding</i>
DAPI	Diamino-2-phenylindole
DDSA	<i>dodecenylsuccinid acid anhydride</i>
DMP	2,4,6-Trisdimethylaminomethoylphenol
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
Dvl	<i>dishevelled</i>
ED	<i>embryonic day</i> (Embryonaltag)
EM	Elektronenmikroskop
FOXC	<i>forkhead box C</i>
Fzd	<i>fryzled</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ht	heterozygot
LEC	<i>lymph endothelial cell</i>
LEF	<i>lymphoid enhancer-binding factor</i>
LK	Lymphkapillare
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
Lyve	<i>lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor</i>
JNK	Jun N-terminal Kinase
Ko	<i>knock-out</i>
MNA	Methyl Nadic Anhydride
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat



---

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
Nrp	Neuropilin
OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PKC	Proteinkinase C
Prox	<i>prospero-related homeobox</i>
ROR	<i>retinoid-related orphan receptor</i>
SYK	<i>spleen non-receptor tyrosine kinase</i>
Sox	<i>sry-related HMG box</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
Wnt	<i>wingless type MMTV integration site</i>
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Gelelektrophorese nach Durchführung einer PCR. ....	13
Abb. 2: Makroskopische Bilder von Mausembryonen am Embryonaltag (ED) 18,5 mit Wildtyp (A) und homozygotem (B) Wnt5a-Knock-out-Genotyp. ....	23
Abb. 3: Semidünnschnitte eines Wildtyp-Mausembryos.....	24
Abb. 4: Semidünnschnitte eines heterozygoten Wnt5a-ko-Mausembryos.....	25
Abb. 5: Myofibrillen in mehreren längs geschnittenen Skelettmuskelfasern bei 16.700 -facher elektronenmikroskopischer Vergrößerung aus Abb.4A und 4B.....	26
Abb. 6: Semidünnschnitte einer homozygoten Wnt5a-ko-Maus.....	27
Abb. 7: EM-Aufnahme einer Lymphkapillare aus der Bauchhaut eines wildtyp-Mausembryos am ED 18,5.....	29
Abb. 8: Vergrößerung eines Abschnittes des Einlassventils aus Abb. 7. ....	30
Abb. 9: Vergrößerung eines Einlassventils aus Abb. 7.....	31
Abb. 10: EM-Aufnahme einer Lymphkapillare aus der Bauchhaut eines heterozygoten Wnt5a-ko-Mausembryos am ED18,5.....	32
Abb. 11: Vergrößerung eines Einlassventils aus Abb. 10. ....	33
Abb. 12: Vergrößerung des Einlassventils.....	34
Abb. 13: Vergrößerung eines Abschnittes des Einlassventils. ....	35
Abb. 14: Vergrößerung eines Abschnittes des Einlassventils. ....	36
Abb. 15: EM-Aufnahmen einer Lymphkapillare aus der Bauchhaut eines homozygoten Wnt5a-ko-Mausembryos am ED18,5.....	38
Abb. 16: EM-Aufnahmen von zwei angrenzenden Lymphkapillaren eines homozygoten Wnt5a-ko-Mausembryos am ED18,5.....	39
Abb. 17: EM-Aufnahmen von zwei angrenzenden Lymphkapillaren eines homozygoten Wnt5a-ko-Mausembryos am ED18,5.....	40
Abb. 18: Immunhistologischer Nachweis von Wnt5a und Lyve-1 an Hautgewebe von homozygoten Wnt5a-ko-Mäusen am ED17,5.....	41

## Danksagung

Diese Doktorarbeit wäre nicht zustande gekommen ohne die Unterstützung vieler hilfreicher Menschen. An erster Stelle möchte ich sehr herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wilting für die intensive wissenschaftliche Betreuung und für die Bereitstellung des spannenden Themas danken. Ich danke ihm vor allem dafür, dass er mir immer die nötigen Freiräume gelassen hat, sowie für seine schnelle Durchsicht meines Manuskripts und seine Geduld.

Ein Dankeschön gilt ebenso Frau Dr. rer. nat. Kerstin Buttler für hilfreiche fachliche Gespräche und die Einweihung in die Geheimnisse der Lymphgefäßforschung. Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Institutes für Anatomie und Zellbiologie: Christina Zelent, Berti Manshausen und Sonja Schwoch, die mir nicht nur beim Erlernen der histologischen Techniken geholfen haben, sondern auch für eine wunderbare und freundliche Atmosphäre in der Abteilung gesorgt haben. Auch Frau Simona Hellbach aus dem Institut für Neuroanatomie danke ich für die Einarbeitung in die Elektronenmikroskopie und die großartige Unterstützung im Labor. Nicht vergessen will ich Herrn Dr. med. T. Ivo Chao und Frau MSc. Melanie Lohrberg, die mit viel Geduld mir die Geheimnisse der Computerwelt nahegebracht haben und mich bei den Fotoarbeiten hervorragend betreut haben.

## Lebenslauf

Ich, Jules Arnaud Demanou Toukam wurde am 20.01.1987 in Jaunde/Kamerun als Sohn der Eheleute Gabriel und Elisabeth Demanou, geb. Tounkam, geboren.

Ich wuchs in Dschang auf und besuchte dort die Grundschule von 1992 bis 1996. Von 1997 bis 2003 besuchte ich das St. Albert-le-Grand-Gymnasium in Bamendou II. Nach meinem Abitur im Jahr 2003 studierte ich Biochemie an der Universität von Dschang und schloss das Studium im Juni 2007 mit einer Licence erfolgreich ab. Im Januar 2008 entschied ich mich, mein Biochemie-Studium in Deutschland fortzusetzen und darauf folgend besuchte ich vorbereitend einen Deutschkurs am Goethe-Institut Jaunde bis zum B2-Niveau.

Am 23.09.2009 landete ich in Hamburg und besuchte einen weiteren Deutschkurs an der Universität Oldenburg bis zum Erwerb der DSH (Deutsche Sprachprüfung für den Hochschulzugang) im März 2010.

Im Sommersemester 2010 begann ich das Chemie-Studium an der Universität Bremen. Im Sommersemester 2011 wechselte ich das Studienhauptfach und studierte fortan Humanmedizin an der Universität Göttingen. Dort habe ich die Approbation am 08 Mai 2018 abgelegt.

Die Arbeiten zur vorliegenden Promotion begann ich im Februar 2015 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wilting, wobei ich im Wintersemester 2016/17 hierfür ein Forschungssemester nahm.

Seit Juli 2017 bin ich im St-Vincenz Krankenhaus in Limburg als Assistenzarzt in der Gastroenterologie tätig.