



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6788

**Links-Rechts-Achsenentwicklung
im Kaninchenembryo:
Klonierung von Markergenen,
Etablierung eines *in vitro*
Kultursystems und Identifizierung
des Wachstumsfaktors FGF8 als
rechte Determinante**

A. Fischer

Institut für Toxikologie und Genetik

Dezember 2002

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6788

Links-Rechts-Achsenentwicklung im Kaninchenembryo:

Klonierung von Markergenen,
Etablierung eines *in vitro* Kultursystems und
Identifizierung des Wachstumsfaktors FGF8
als rechte Determinante

Anja Fischer

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH) genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2002

Impressum der Print-Ausgabe:

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

ISSN 0947-8620

**Links-Rechts-Achsenentwicklung im
Kaninchenembryo:
Klonierung von Markergenen,
Etablierung eines *in vitro* Kultursystems und
Identifizierung des Wachstumsfaktors FGF8
als rechte Determinante**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe

genehmigte

DISSERTATION

von

Anja Fischer

aus Worms

2002

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2002

Referent: Prof. Dr. Martin Blum

Korreferent: Prof. Dr. Peter Herrlich

Zusammenfassung

Die meisten der grundlegenden Mechanismen der embryonalen Achsenbildung sind zwischen den verschiedenen Wirbeltierklassen konserviert, wie z.B. das BMP-Signalsystem und seine Antagonisten bei der Entstehung der Dorsoventral-Achse. Eine markante Ausnahme bildet der Wachstumsfaktor FGF8, der bei der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie in Huhn und Maus entgegengesetzte Funktionen beim Transfer eines noch nicht identifizierten asymmetrischen Signals aus dem Bereich der Mittellinie in die Peripherie wahrnimmt. Im Hühnerembryo wird *fgf8* asymmetrisch auf der rechten Seite des Primitivknotens exprimiert und inhibiert die Transkription der Faktoren der linken Signalkaskade, *nodal*, *Pitx2* und *Lefty2* auf der rechten Seite. In der Maus wird *fgf8* symmetrisch transkribiert. Ein hypomorphes Allel und Missexpressionsexperimente in kultivierten Maus-Embryonen weisen FGF8 eine instruktive Funktion auf der linken Seite bei der Induktion der Nodal-Signalkaskade zu. Diese Unterschiede könnten auf die unterschiedlichen Expressionsmuster, evolutionäre Unterschiede und die Architektur des frühen Embryos, der im Huhn eine flache Keimscheibe, in der Maus dagegen einen zylindrischen sog. Eizylinder bildet, zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Funktion von FGF8 im Kaninchenembryo untersucht, der sich als Säuger über eine Keimscheibe entwickelt. Die Klonierung und Expressionsanalyse von Markergenen ergab eine konservierte asymmetrische Transkription der Gene der Nodal-Kaskade, während alle Gene, die im Bereich des Hühnerprimitivknotens asymmetrisch exprimiert werden, im Kaninchen wie in der Maus stets symmetrisch aktiv sind, u. a. *fgf8* und *shh*. Ebenfalls im Gegensatz zum Huhn konnten Kaninchenembryonen erst nach Ausbildung des ersten Somitenpaares stabil *in vitro* kultiviert werden. Frühere Kulturen resultierten in bilateraler oder fehlender Expression asymmetrischer Marker. Zur Überprüfung der Tauglichkeit des Kaninchensystems wurden Aktivin-getränkte Acrylkugeln in die rechte Seite kultivierter Embryonen plaziert. Aktivin, das wie Nodal wirkt, induzierte bilaterale Expression von *nodal* und *Pitx2*. Dieses Experiment zeigte, dass die Nodal-Kaskade im Kaninchen konserviert ist und dass die rechte Seite kompetent zur Induktion der Nodal-Kaskade ist. FGF8 hingegen hatte, im Gegensatz zur Situation in der Maus, keine induktive Wirkung. Im 1-3 Somitenstadium konnte auch keine repressive Funktion festgestellt werden. Allerdings fand sich eine strikte Korrelation zwischen der Plazierung der FGF8-Kugel und der Abwesenheit von *nodal* in früheren Stadien. Auch eine durch BMP4 ektopisch induzierte Expression der Nodal-Signalkaskade konnte durch gleichzeitige Applikation von FGF8 effizient reprimiert werden. Eine endogene rechts-asymmetrische Rolle von FGF8 konnte nach Unterdrückung der FGF8-Signalkaskade auf der rechten Seite früher Somitenstadien durch den Inhibitor SU5402 gezeigt werden. Dieses Experiment resultierte in bilateraler Expression von *nodal* und *Pitx2*. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Funktionsgewinn- und -verlustexperimente weisen FGF8 im Kaninchenembryo eine rechts-asymmetrische Funktion zu. Sie zeigen, dass die unterschiedliche Wirkung in Huhn, Maus und Kaninchen nicht auf die asymmetrische Expression im Huhn und auch nicht auf eine Funktionsumkehr des FGF8 während der Evolution zwischen Vogel und Säuger zurückzuführen ist. Vielmehr deuten sie auf die spezifische Anatomie des Gastrula-/Neurulaembryos als eine zentrale Determinante der Links-Rechts-Achsenbildung hin.

Abstract

Most of the fundamental mechanisms of embryonic axis formation are conserved between the various classes of vertebrates, for example the BMP-signaling system and its antagonists in the formation of the dorsal-ventral axis. A marked exception is the growth factor FGF8, which plays opposite roles in the transfer of an not yet identified asymmetric signal from the midline domain to the periphery during the formation of left-right asymmetry in chick and mouse. In the chicken embryo *fgf8* is expressed asymmetrically on the right side of the primitive node and inhibits the transcription of factors of the left signaling cascade, *nodal*, *Pitx2* and *lefty2* on the right side. In mouse, *fgf8* is transcribed symmetrically. A hypomorphic allele and misexpression experiments in cultured mouse embryos assign FGF8 an instructive function in the induction of the Nodal signaling cascade on the left side. This discrepancy could be attributed to the different expression patterns, evolutionary differences and the architecture of the early embryo, which forms a flat blastodisc in chick, in contrast to a cylindrical so-called egg-cylinder in mouse. Thus in the present work the function of FGF8 was analysed in the rabbit embryo, which as a mammal develops via a blastodisc.

Cloning and expression analysis of marker genes showed a conserved asymmetric expression of the *nodal* cascade genes, whereas all genes, which are asymmetrically expressed in or at the chicken primitive node, for example *fgf8* and *shh*, are always symmetrically active both in rabbit and mouse. Likewise in contrary to the chick, stable *in vitro* culture of rabbit embryos was only possible after the formation of the first pair of somites. Earlier cultures resulted in bilateral or missing expression of asymmetric marker genes. In order to check the suitability of the rabbit system Activin-soaked acrylic beads were introduced into the right side of cultured embryos. Activin, which functions like Nodal, induced bilateral expression of *nodal* and *Pitx2*. This experiment showed that the Nodal cascade is conserved in the rabbit and that the right side is competent to induce the Nodal cascade. Whereas, unlike in mouse, FGF8 did not show an inducing effect. In stage 1-3 somite embryos FGF8 had also no repressive function. But a clear correlation between the placement of a FGF8 bead and absence of *nodal* transcription was observed in earlier stages. An ectopically induced expression of the Nodal signaling cascade by BMP4 could also be efficiently repressed by the parallel administration of FGF8. An endogenous right-asymmetric role of FGF8 could be shown by repressing the FGF8 signaling cascade on the right side of early somatic stages by the inhibitor SU5402. This experiment resulted in bilateral expression of *nodal* and *Pitx2*. Gain- and loss of function experiments presented in this work assign FGF8 a right-asymmetric function in the rabbit embryo. They show that the different effects in chick, mouse and rabbit cannot be attributed to the asymmetric expression in the chick and also not to a reversal of FGF8 function in the course of evolution birds to mammals. In fact they suggest that the specific anatomy of the gastrula/neurula embryo plays a pivotal determinant in left-right axis formation.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Links-Rechts-Achsenbildung.....	1
1.1.1 Theoretische Überlegungen zum Symmetriebruch	2
1.1.2 Konservierte Funktion von Nodal und dessen Zielgenen im Aufbau der Links-Rechts-Achse.....	3
1.1.2.1 Konservierte asymmetrische Gen-Expression	3
1.1.2.2 Die Nodal-Signaltransduktion.....	4
1.1.2.3 Die Nodal-Signalkaskade.....	5
1.1.2.4 Das Morphogen Nodal	6
1.1.3 Die Mittellinie ist involviert in die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Seitenplattenexpression.....	7
1.1.4 Asymmetrische Organmorphogenese	8
1.1.5 Frühe Ereignisse, oberhalb der konservierten Nodal- Signalkaskade	9
1.1.5.1 Frühe asymmetrisch exprimierte Gene im Huhn.....	9
1.1.5.2 Die Rolle von Cilien in der Maus	12
1.1.5.3 Die Rolle von Gap junctions.....	14
1.1.5.4 Die Rolle des Primitivknotens.....	15
1.1.6 Unterschiede in der Links-Rechts-Achsenentwicklung zwischen Huhn und Maus	16
1.1.6.1 Funktion von Shh	16
1.1.6.2 Nicht-konservierte Expression von <i>Snail</i> und <i>NKx3.2</i>	18
1.1.6.3 Funktion von FGF8	19
1.2 Das Kaninchen als Modellsystem.....	20
1.3 Ziel der Arbeit	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Bezugsquellen.....	25
2.1.1.1 Chemikalien und Labormaterial.....	25
2.1.1.2 Tiere.....	27

2.1.1.3	Proteine.....	27
2.1.1.4	Kits	27
2.1.2	Puffer, Lösungen und Medien	28
2.1.3	Oligonukleotide.....	29
2.1.3.1	Sequenzierprimer.....	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Behandlung von Nucleinsäuren.....	30
2.2.1.1	Spektrophotometrische Konzentrationbestimmung von Nucleinsäuren in wässriger Lösung.....	30
2.2.1.2	Präzipitation von Nucleinsäuren aus wässriger Lösung.....	30
2.2.1.3	Elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren über Agarosegele	30
2.2.2	Präparationen von DNA	31
2.2.2.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	31
2.2.2.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA	31
2.2.2.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen mit dem DNA Purifikation Kit Easy Pure (Biozym)	32
2.2.3	Präparation von RNA	32
2.2.3.1	Isolierung von mRNA aus Embryonen mit dem MPG Direct mRNA Purifikation Kit (Eurobio)	32
2.2.3.2	Extraktion von RNA aus Embryonen mit dem PeqGOLD TriPure Kit (Peqlab).....	33
2.2.4	Klonierungstechniken.....	33
2.2.4.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen.....	33
2.2.4.2	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	33
2.2.4.3	Subklonierung von PCR Produkten mit dem TOPO Cloning Kit (Invitrogen).....	34
2.2.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.5.1	DNA-Sequenz der Oligonukleotide und PCR-Bedingungen der klonierten Gene.....	35
2.2.6	Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA nach der Dideoxymethode	37
2.2.7	Transkription von Nucleotidsequenzen	38

2.2.7.1 Erst-Strang-Synthese mit der SUPERSCRIPT II Rnase H [□]	
Reversen Transkriptase (GIBCO)	38
2.2.7.2 Transkription von Plasmid-DNA	39
2.2.8 <i>In situ</i> Hybridisierung im Ganzpräparat	40
2.2.9 Embryologische Methoden.....	41
2.2.9.1 Isolieren und Fixieren von Embryonen.....	41
2.2.9.2 <i>In vitro</i> Kultur	42
2.2.9.2.1 Vorbereitung der Agarosehügel	42
2.2.9.2.2 Isolieren der Kaninchenembryonen für die Kultur	42
2.2.9.2.3 Vorbereiten der Protein-getränkten Acrylkugeln	42
2.2.9.2.4 Plazieren des Embryos auf dem vorbereiteten	
Agarosehügel.....	43
2.2.9.2.5 Implantation der Substanz-getränkten Acrylkugel im	
Embryo.....	43
2.2.9.2.6 Fixieren der Kulturembryonen.....	43
2.2.9.2.7 Vorbereiten und Plazieren von SU5402.....	44
2.2.9.3 Einbetten und Anfertigung von histologischen Schnitten	44
3. Ergebnisse	46
3.1 Links-Rechts-Markergene im Kaninchenembryo	46
3.1.1 Expression der Gene <i>fgf8</i> und <i>shh</i> im Kaninchen	46
3.1.1.1 Klonierung und Expressionsanalyse des FGF-Signalmoleküls	
<i>fgf8</i> im Kaninchenembryo.....	46
3.1.1.1.1 Klonierung von <i>fgf8b</i> im Kaninchen	46
3.1.1.1.2 Symmetrische Expression von <i>fgf8</i> im Bereich des	
Primitivknotens.....	47
3.1.1.1.3 Expression von <i>fgf8</i> in der Herzanlage, der anterioren	
Neuralplatte und der Mittelhirn-Hinterhirn-Anlage	50
3.1.1.2 Expressionsanalyse des Signalmoleküls <i>sonic hedgehog</i>	
(<i>shh</i>) im Kaninchenembryo	51
3.1.1.2.1 Symmetrische Expression von <i>shh</i>	52
3.1.2. Die konservierte Expression von <i>nodal</i> , <i>Pitx2</i> und <i>lefty</i>	54

3.1.2.1 Klonierung und Expressionsanalyse des TGF β -Signalmoleküls	
<i>nodal</i> im Kaninchenembryo	54
3.1.2.1.1 Klonierung von <i>nodal</i> im Kaninchen.....	55
3.1.2.1.2 Expression von <i>nodal</i> im Primitivstreifen.....	55
3.1.2.1.3 Expression von <i>nodal</i> im seitlichen Rand der posterioren Notochordplatte.....	56
3.1.2.1.4 Expression von <i>nodal</i> in der linken Seitenplatte.....	57
3.1.2.1.5 Expression von <i>nodal</i> in der linken Herzanlage	57
3.1.2.1.6 Expression von <i>nodal</i> in den Somiten und der Bodenplatte	59
3.1.2.2 Expressionsanalyse des Homöobox-Transkriptionsfaktors	
<i>Pitx2</i> im Kaninchenembryo.....	60
3.1.2.2.1 Konservierte Expression von <i>Pitx2</i> im Kaninchenembryo	60
3.1.2.3 Expressionsanalyse des TGF β -Signalmoleküls <i>lefty</i> im	
Kaninchenembryo	62
3.1.2.3.1 Konservierte Expression von <i>lefty</i> im Kaninchenembryo	63
3.2 Etablierung eines <i>in vitro</i> Kultur-Systems für Kaninchenembryonen	67
3.2.1 <i>in vitro</i> Kultur von Kaninchenembryonen.....	67
3.2.1.1 <i>in vitro</i> Kultur der Stadien 5 und 6	67
3.2.1.2 <i>in vitro</i> Kultur des 1 bis 3 Somitenstadiums	70
3.2.2 Aktivin induziert ektoische <i>nodal</i> und <i>Pitx2</i> -Expression im rechten Seitenplattenmesoderm des 1 bis 4 Somitenstadiums	72
3.2.3 Funktionelle Analyse von FGF8 im Hinblick auf die asymmetrische linksseitige Expression von <i>nodal</i>	74
3.2.3.1 Keine ektoische Induktion von <i>nodal</i> und <i>Pitx2</i> durch FGF8 während des 1 bis 3 Somitenstadiums.....	74
3.2.3.2. Repression von <i>nodal</i> durch FGF8 im Stadium 5 und 6.....	76
3.2.4 BMP4 induziert <i>nodal</i> und <i>Pitx2</i> im paraxialen Mesoderm und in der rechten Seitenplatte.....	81
3.2.5 BMP4 induziert <i>lefty</i> im paraxialen Mesoderm und reprimiert dessen Expression in der Mittellinie.....	86
3.2.6 FGF8 hemmt die durch BMP4 erzeugte Expression von <i>nodal</i>	89
3.2.7 Inhibition der FGF8-Signaltransduktion rechts des Primitivknotens bewirkt bilaterale Expression von <i>nodal</i> und <i>Pitx2</i>	94

4. Diskussion	97
4.1 FGF8 wirkt als rechts-asymmetrische Determinante im Kaninchenembryo	97
4.1.1 FGF8 inhibiert die Nodal-Signalkaskade	97
4.1.2 Inhibition der FGF8-Signaltransduktion aktiviert die Nodal-Kaskade...	99
4.1.3 Asymmetrische Funktion von FGF8	100
4.1.3.1 Rechtsasymmetrische Expression ist keine Voraussetzung für rechtsasymmetrische Funktion.....	100
4.1.3.2 Die rechtsseitige Wirkung des FGF8 wird nicht über Mittelliniendefekte vermittelt	101
4.1.3.3 Gibt es asymmetrische Komponenten der FGF-Signaltransduktion?.....	102
4.2 Späte Fixierung der Lateralität im Säugerembryo	104
4.2.1 Knotenfluss.....	104
4.2.2 Extrazelluläre Matrix.....	105
4.2.3 <i>lefty1</i> -Expression in der Mittellinie korreliert mit der Fixierung der Lateralität in Huhn und Säuger	107
4.3 Positive Wirkung von BMP4 auf die Nodal-Signalkaskade.....	108
4.4 Huhn - Maus - Kaninchen: Welche Faktoren determinieren die Wirkungsweise von FGF8 bei der Entstehung der L/R-Achse?	112
5. Anhang	118
A1. Ergebnisse	119
A1.1 Klonierung von <i>HNF3β</i> im Kaninchen.....	119
A1.1.1 Symmetrische Expression von <i>HNF3β</i> im Kaninchenembryo	120
A1.2 Klonierung von <i>ptc</i> im Kaninchen.....	122
A1.2.1 Symmetrische Expression von <i>ptc</i> im Kaninchenembryo	122
A1.3 Klonierung von <i>Snail</i> im Kaninchen	124
A1.3.1 Symmetrische Expression von <i>Snail</i> im Kaninchenembryo	125
A1.4 Klonierung von <i>NKx3.2</i> im Kaninchen.....	127
A1.4.1 Keine Expression von <i>NKx3.2</i> im Seitenplattenmesoderm.....	128
A1.5 Klonierung des TGF β -Signalmoleküls <i>AktivinβB</i> im Kaninchen.....	130

A1.6 Klonierung des <i>Aktivin-Rezeptors IIA</i> im Kaninchen.....	132
A2. Diskussion.....	133
A2.1 Gene der 1. Gruppe.....	133
A2.1.1 Expression von <i>fgf8</i>	134
A2.1.2 Expression von <i>shh</i> und <i>HNF3β</i>	135
A2.1.3 Expression von <i>ptc</i>	137
A2.1.4 Expression des <i>Aktivinrezeptors IIA</i> und <i>Aktivin βB</i>	138
A2.2 Gene der 2. Gruppe.....	139
A2.2.1 Expression von <i>nodal</i> , <i>Pitx2</i> und <i>lefty</i>	139
A2.3 Gene der 3. Gruppe.....	146
A2.3.1 Expression von <i>Snail</i>	146
A2.3.2 Expression von <i>NKx3.2</i>	147
6. Abkürzungen	150
7. Literatur	152

1. Einleitung

1.1 Die Links-Rechts-Achsenbildung

Der Bauplan der Wirbeltiere ist bilateral symmetrisch angelegt, doch besteht eine links-rechts-spezifische Asymmetrie bezüglich der Struktur und der Position der inneren Organe. Diese Asymmetrie ist das Resultat eines komplexen Entwicklungsmusters an Drehungen und Windungen der primären Organanlagen des frühen Embryos hin zum adulten funktionellen Organ. So dreht sich der primäre Herzschlauch eines Wirbeltierembryos immer nach rechts und ist damit das erste morphologische Anzeichen der sich entwickelnden Links-Rechts-Achse. Die Richtung dieser Drehungen und Windungen ist, ebenso wie die letztendliche Anordnung der einzelnen Organe zueinander, unter den Wirbeltieren hochkonserviert und scheint für die Funktion dieser Organe unerlässlich zu sein. Im adulten Organismus teilt sich der rechte Lungenflügel in drei, der linke in zwei Lappen auf, die Spitze des Herzens zeigt nach links, die Leber findet sich auf der rechten, Magen und Milz auf der linken Körperseite und der Darm windet sich entgegen dem Uhrzeigersinn. Diese normale Anordnung der inneren Organe nennt man *Situs solitus*, dessen exakte Umkehr wird als *Situs inversus* bezeichnet. Entwickeln hingegen einzelne Organe unabhängig von den anderen eine entgegengesetzte Asymmetrie, so dass manche Organe den normalen, andere den umgekehrten Situs aufzeigen, spricht man von Heterotaxie. Sind die Organe symmetrisch angelegt, so entwickeln sie zwei linke oder zwei rechte Hälften, bzw. sie kommen in der Mitte des Körpers zu liegen. Dieser Zustand wird als linker bzw. rechter Isomerismus bezeichnet. Vor allem Heterotaxie und Isomerismus führen zu Organfunktionsstörungen, wobei gerade die Herzfunktion sensibel auf Lateralitätsstörungen reagiert.

Die asymmetrische Ausbildung der inneren Organe stellt den sichtbaren Endzustand der Links-Rechts-Achsenentwicklung dar, die bereits viel früher in der Embryonalentwicklung einsetzt. Aufgrund bisheriger Untersuchungen kann man diese Entwicklung in vier Abschnitte unterteilen:

1. Der Bruch der Bilateralsymmetrie im Bereich des Primitivknotens
2. Der Transfer der links-rechts-spezifischen Signale von der Mittellinie zu den Seitenplatten
3. Die Etablierung asymmetrischer Signale in den Seitenplatten
4. Die asymmetrische Organmorphogenese

1.1.1 Theoretische Überlegungen zum Symmetriebruch

Eine linke und rechte Körperseite definiert sich allein durch die Anordnung der dorso-ventralen (DV) und der anterior-posterioren (AP) Achsen. Eine asymmetrische Links-Rechts-Achse muss jedoch gezielt in Hinsicht auf die schon bestehenden oder sich gleichzeitig entwickelnden beiden anderen Achsen ausgebildet werden. Der molekulare Mechanismus, der diesen Symmetriebruch auslöst, ist bis heute ungeklärt.

Eine schon vor der Entdeckung der ersten asymmetrisch exprimierten Gene formulierte Theorie beschäftigt sich mit der Involvierung eines chiralen Moleküls, das drei ungleiche Spiegel-Achsen besitzt und als "F-Molekül" bezeichnet wurde. Die Ausrichtung des "F"-Moleküls bezüglich der DV- und der AP-Achse würde gleichzeitig die Richtung der Links-Rechts-Achse festlegen (Brown und Wolpert, 1990). Weiterhin bestand die Überlegung, dass die Bindung des "F"-Moleküls an Mikrotubuli, die hinsichtlich der AP- oder der DV-Achse orientiert wären, dem chiralen Molekül und letztlich der Links-Rechts-Achse die korrekte Orientierung ermöglichen würde (Brown und Wolpert, 1990; Brown et al., 1991). Andererseits könnte das hypothetische "F"-Molekül, wie auch immer hinsichtlich der AP- und DV-Achse orientiert, den Mikrotubuli die korrekte Links-Rechts-Ausrichtung ermöglichen und damit einen gerichteten links-rechts-asymmetrischen Transport mithilfe von Motorproteinen entlang des Cytoskeletts ermöglichen (Levin und Nascone, 1997). Wo und wann die Orientierung der Links-Rechts-Achse hinsichtlich der beiden anderen Achsen stattfindet, konnte bisher ebenso wenig geklärt werden wie die Frage, ob ein solches in der Links-Rechts-Achse funktionelles chirales Molekül überhaupt existiert.

Interessant erscheint das Phänomen, dass die sich entwickelnde Links-Rechts-Asymmetrie immer zur selben Seite geneigt ist und nicht z.B. innerhalb einer Population sowohl *Situs solitus* als auch *Situs inversus* vorzufinden ist. Allerdings

kann in Mutationen der Maus, in denen eine Inversion des Situs auftritt, immer ein gewisser Anteil an Heterotaxie vorgefunden werden, der Organfunktionsstörungen nach sich zieht. Die als *Situs solitus* definierte Anordnung der einzelnen Organe zueinander ist daher mit der korrekten Morphogenese und Funktion der einzelnen Organe eng verknüpft, so dass jedwede Veränderung in Funktionsstörungen resultiert, die das Überleben des Individuums gefährden.

Bisherige Untersuchungen bezüglich der Links-Rechts-Achsenentwicklung beruhen sowohl auf genetischen als auch embryonalen Daten.

Die Untersuchung der Funktion bestimmter Gene erfolgt in der Maus anhand von spontan auftretenden Mutationen, sowie mithilfe gezielter Mutation des zu untersuchenden Gens in transgenen Mäusen. In Nullmutationen bewirkt dies den gesamten Verlust und in hypomorphen Mutationen einen Teilverlust der entsprechenden Proteinfunktion vom Beginn der Entwicklung an.

Im Huhn dagegen wird vor allem anhand von Missexpressionsexperimenten, dem Plazieren von Antikörpern, sowie mithilfe von Transplantationsexperimenten eine bestimmte Genfunktion untersucht. Diese Experimente sind zeitlich und ausserdem innerhalb des Embryos lokal begrenzt. Sie können daher die Aktivität eines bestimmten Gens innerhalb definierter Entwicklungszeitfenster und in spezifischen Geweben bestimmen.

1.1.2 Konservierte Funktion von Nodal und dessen Zielgenen im Aufbau der Links-Rechts-Achse

1.1.2.1 Konservierte asymmetrische Gen-Expression

Die dritte Phase der Links-Rechts-Achsenentwicklung ist charakterisiert durch die konservierte Expression bestimmter Gene, deren Funktion unter den Vertebraten im Laufe der Evolution gleichermaßen konserviert zu sein scheint. Zu diesen Genen zählen *nodal*, *lefty1* und *lefty2*, drei Mitglieder der TGF β -Superfamilie der Transformierenden Wachstumsfaktoren, die von der Zelle sekretiert werden, um

als Signalmoleküle wirksam zu werden. Desweiteren schließt die konservierte Gengruppe den Homöobox-Transkriptionsfaktor *Pitx2* mit ein.

nodal und *Pitx2* werden asymmetrisch im linken Seitenplattenmesoderm in allen bisher untersuchten Wirbeltieren wie Maus, Huhn, dem Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und dem Zebrafisch (*Danio rerio*) während der frühen Somitenstadien exprimiert (siehe Capdevilla et al., 2000). *lefty2*-Expression findet sich ebenso konserviert in der linken Seitenplatte von Maus, *Xenopus* und Zebrafisch (Meno et al., 1996, 1997; Bisgrove et al., 1999). *nodal* wird zudem in der Mittellinie nahe des Primitivknotens exprimiert. Diese Expressionsdomäne ist im Huhn linksseitig asymmetrisch und in Maus, *Xenopus* und Zebrafisch bilateral mit einer linksseitigen Verstärkung ausgeprägt (Levin et al. 1995; Collignon et al. 1996; Lowe et al. 1996, Lustig et al., 1996; Rebagliati et al. 1998a; Sampath et al. 1998). Die Mittellinienexpression geht der linksseitigen Seitenplattenexpression voraus und bleibt auch während derselben bestehen. *lefty1* wird in der Mittellinie im Primitivknoten und dem linken Teil der Bodenplatte in allen untersuchten Wirbeltierembryonen transkribiert (Meno et al., 1997, Ishimaru et al., 2000).

1.1.2.2 Die Nodal-Signaltransduktion

Die typische Signaltransduktion der Mitglieder der TGF β -Superfamilie verläuft über heteromere Rezeptorkomplexe, die sich aus einer Typ I und einer Typ II Serin/Threonin-Kinase zusammensetzen. Aktivin, ein weiteres Mitglied der TGF β -Superfamilie, bindet an die Typ II Serin/Threonin-Kinaserezeptoren ActRIIA und ActRIIB, die darauffolgend den Typ I Kinase Rezeptor ActRIB aktivieren und zur Phosphorylierung des rezeptorgekoppelten Proteins Smad2 veranlassen. Das daraufhin aktivierte Smad2 wandert in den Zellkern, wo es mit Smad4 und dem Transkriptionsfaktor FAST einen Komplex bildet, der schließlich die Transkription von Zielgenen bewirkt (Whitman, 1998; Massag e und Chen, 2000). Unterschiedliche Ver offentlichungen weisen mittlerweile daraufhin, dass Nodal-Signale über die gleichen oder zumindest sehr ähnliche Aktivin-Rezeptoren vermittelt werden (Kumar et al., 2001; Reissmann et al., 2001). In der Seitenplatte aktives Nodal-Protein benötigt dafür allerdings, im Gegensatz zu Aktivin, die Aktivität von EGF-CFC-Proteinen der Zellmembran, wie *one eyed pinhead* (*oep*) im Zebrafisch und *cryptic* in der Maus, als Co-Rezeptoren (Gritsman et al., 1999; Yan et al., 1999; Gaio et al., 1999). Mitglieder der EGF-CFC-Familie sind

extrazelluläre Proteine mit einer aminoterminalen Signalsequenz, einem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-ähnlichem Motiv, einer cysteinreichen Domäne (CFC) und einer carboxyterminalen hydrophoben Region (Shen et al., 1997; Zhang et al., 1998). *oep* und *cryptic* werden sowohl in der Mittellinie als auch in der Seitenplatte mit *nodal* co-exprimiert, wobei die Seitenplattenexpression im Gegensatz zu der von *nodal* bilateral ausgeprägt ist (Gritsman et al., 1999, Yan et al., 1999; Gaio et al., 1999).

Mutationen der einzelnen Komponenten des Nodal-Signaltransduktionsweges resultieren in sehr ähnlichen Phänotypen und verdeutlichen zwei Funktionen von Nodal. Mäuse mit Nullmutationen der Gene *nodal* (Zhou et al., 1993; Conlon et al., 1994), des *Aktivinrezeptors IB* (Gu et al., 1998), der Doppelnullmutation des *Aktivinrezeptors IIA* und des *Aktivinrezeptors IIB* (Song et al., 1999), *Smad2* (Waldrip et al., 1998; Weinstein et al., 1998; Nomura und Li, 1998), sowie *Smad4* (Sirard et al., 1998; Yang et al., 1998) entwickeln keinen Primitivstreifen und ebenfalls keine meso- und endodermale Zellschicht und verweisen damit auf die Funktion von Nodal-Signalen in der Bildung des Mesoderms während der Gastrulation.

Mäuse mit Nullmutationen der Gene *cryptic* (Yan et al., 1999; Gaio et al., 1999), sowie des *Aktivinrezeptors IIB* (Song et al., 1999, Oh und Li, 1997) sterben kurz nach der Geburt aufgrund von Herzdefekten, die eine randomisierte Herzposition, eine Transposition der Herzgefäße und Fehlbildungen der Septen von Ventrikel und Atrium einschließen. Desweiteren wurde ein rechter Lungenisomerismus, eine Randomisierung der Magenposition und ein Milzminderwuchs beobachtet. Diese Defekte wurden auch bei einer hypomorphen Mutation des *nodal*-Gens (Lowe et al., 2001) gesehen und verdeutlichen die zusätzliche Funktion von Nodal im Aufbau der Links-Rechts-Achse.

1.1.2.3 Die Nodal-Signalkaskade

Sämtliche der unter 1.1.2.2 beschriebenen Mutationen resultieren im Verlust der *nodal*-Transkription in der Seitenplatte, die immer mit dem gleichzeitigen Verlust der Expressionen von *lefty2* und *Pitx2* verbunden ist. Dies dokumentiert die in weiteren Experimenten und Mutationen beschriebene konservierte Signalkaskade von Nodal, *Lefty2* und *Pitx2* (Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al.,

1998, Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999; Cheng et al., 2000). Untersuchungen des *nodal*-, *lefty2*- und *Pitx2*-Locus enthüllten die Existenz von linksseitig-spezifischen Enhancer (ASE) Elementen, welche Bindungsstellen des FAST-Transkriptionsfaktors aufweisen. Die gezielte Deletion dieser ASE-Elemente führt zu einer Störung der asymmetrischen Expression von *nodal* in der Mittellinie und der Seitenplatte (Adachi et al., 1999; Norris und Robertson, 1999), sowie *lefty2* und *Pitx2* in der Seitenplatte (Saijoh et al., 1999; Shiratori et al., 2001). Die linksseitige Expression der Seitenplattengene *nodal*, *lefty2* und *Pitx2* ist somit von diesen ASE-Elementen abhängig (Saijoh et al., 2000; Shiratori et al., 2001). *nodal* ist damit in der Lage seine eigene, sowie die Expression von *lefty2* und *Pitx2* in der Seitenplatte in Abhängigkeit von FAST und den EGF-CFC-Proteinen zu induzieren (Abb.1).

Lefty-Proteine gelten wegen ihrer Struktur als aussergewöhnliche TGF β -Mitglieder, da sie aufgrund des Fehlens einer langen α -Helix und eines bestimmten Cysteinrestes nicht in der Lage sind Dimere zu bilden (Thisse und Thisse, 1999). Mehrere Studien zeigen, dass Lefty2 als Inhibitor der Nodal-Signalkaskade funktioniert, vermutlich aufgrund einer möglichen kompetitiven Hemmung des Nodal-Rezeptors ActRIIB (Bisgrove et al., 1999; Meno et al., 1999; Cheng et al., 2000). Lefty2, durch Nodal induziert, wirkt der Expression von *nodal* inhibitorisch entgegen und beendet schließlich mit dem 6/7 Somitenstadium die Transkription von *nodal* in der Seitenplatte und folglich auch die eigene (Abb.1; Saijoh et al., 2000).

Die *Pitx2*-Expression, die ebenfalls durch Nodal induziert wird, erhält sich in der linken Seitenplatte aufgrund eines positiven Rückführkreises der Pitx2c-Isoform und aufgrund der weiteren Aktivierung des ASE-Elements über den Transkriptionsfaktor *NKx2.5* (Schweickert et al., 2000 und Shiratori et al., 2001).

1.1.2.4 Das Morphogen Nodal

Die gezielte Deletion des ASE-Elements des *lefty2*-Genlocus verhindert die asymmetrische Expression von *lefty2* in der linken Seitenplatte (Meno et al., 2001). Dies führt zu einer verlängerten Expression von *nodal* in der linken Seitenplatte bishin zum 8 Somitenstadium, sowie zur Diffusion des Nodal-Proteins von der linken Seitenplatte zur Mittellinie und darüber hinaus auf die rechte Seite

des Embryos. Diese Experimente belegen die Fähigkeit des Nodal-Proteins als Morphogen über lange Distanzen innerhalb des Mäuse-Embryos zu wandern, was kurz zuvor schon für eine homologe Form von Nodal im Zebrafisch festgestellt werden konnte (Chen und Schier, 2001).

1.1.3 Die Mittellinie ist involviert in die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Seitenplattenexpression

Zahlreiche Mutationen im Zebrafisch und der Maus, sowie Experimente in *Xenopus* und Huhn weisen auf eine wichtige Rolle der Mittellinie in der Aufrechterhaltung der asymmetrischen Seitenplattenexpression von *nodal*, *lefty2* und *Pitx2* hin. In *Xenopus*-Embryonen führt der Verlust einer intakten Mittellinie nach UV-Behandlung oder das direkte Entfernen des Mittelliniengewebes zu einer Randomisierung des Herzsitus, verbunden mit bilateraler Expression von *nodal* in den Seitenplatten (Danos und Yost 1995, Danos und Yost, 1996). Mutationen in der Maus und im Zebrafisch, deren Phänotyp durch eine nicht vorhandene oder zumindest gestörte Mittellinie charakterisiert ist, zeigen gleichfalls eine Randomisierung des Herzsitus und bilaterale Expression der linken Seitenplattengene *nodal* und *lefty2* (Melloy et al., 1998; Izraeli et al., 1999; Meyers und Martin, 1999; Tsukui et al., 1999; Bisgrove et al., 1999). Siamesische Zwillinge in Huhn und *Xenopus* zeigen oftmals Links-Rechts-Anomalien. Dabei bildet ein Zwilling zumeist eine korrekte Links-Rechts-Achse aus, wohingegen der andere, häufig der rechte der beiden Zwillinge, einen gestörten Situs aufweist, der mit dem Verlust linksseitiger Markergene in der Seitenplatte verbunden ist (Levin et al., 1996; Nascone und Mercola, 1997; Hyatt und Yost, 1998). Diese Untersuchungen ließen vermuten, dass links-rechts-spezifische Signale über weite Strecken diffundieren können und dadurch den rechten Zwilling negativ beeinflussen, allerdings nicht in der Lage sind die Mittellinie zu überqueren.

Die Mittellinie scheint daher als eine physiologische Barriere zu funktionieren, die die Ausbreitung links- oder rechtsspezifischer Signale auf die jeweils gegenüberliegende Seite verhindert. Interessanterweise fehlt die Expression von *lefty1* in der linken Seite des Primitivknotens, sowie auf der linken Seite der Bodenplatte in den meisten der oben beschriebenen Mutationen, in denen eine

bilaterale Expression von *nodal* und *lefty2* vorliegt (Melloy et al., 1998; Izraeli et al., 1999; Meyers und Martin, 1999; Tsukui et al., 1999). Mäuse mit einer Nullmutation des *lefty1*-Gens sind durch linken Isomerismus und bilaterale Expression von linksspezifischen Genen, wie *nodal* und *lefty2*, gekennzeichnet (Meno et al., 1998). Aufgrund der repressiven Wirkung der *lefty*-Gene auf die *nodal*-Expression wird vermutet, dass Lefty1 die Barriere-Funktion der Mittellinie übernimmt, indem es den Nodal-Rezeptor an der Mittellinie blockiert und somit die Ausbreitung von Nodal-Signalen auf die rechte Seite verhindert (Meno et al., 1998).

1.1.4 Asymmetrische Organmorphogenese

Über die asymmetrische Strukturierung der Organe ist bisher nicht viel bekannt. *Pitx2* ist das einzige der drei Seitenplattenmarkergene, dessen Expression bis in die Stadien der Organmorphogenese erhalten bleibt und auch in mehreren Organanlagen, wie Herz, Lunge, Magen und Darm, weiterhin aktiv ist (Logan et al., 1998; Meno et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; St. Amand et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Bisgrove et al., 1999; Campione et al., 1999). Diese Expression ist, ebenso wie die in der Seitenplatte, asymmetrisch angelegt und damit nur auf der linken Seite dieser Organe zu finden. Mutationen, die eine Veränderung des Situs bewirken, besitzen immer eine gestörte mRNA-Verteilung der Seitenplattengene und somit auch von *Pitx2* (King et al., 1998; Meno et al., 1998; Gaio et al., 1999; Izraeli et al., 1999; Meyers und Martin et al., 1999; Tsukui et al., 1999; Yan et al., 1999; Constam und Robertson et al., 2000; Rankin et al., 2000). Desgleichen verursacht die Missexpression von *Pitx2* auf der rechten Seite des Primitivknotens, genauso wie die von *nodal*, Situsdefekte, wie z.B. die Randomisierung der Herzdrehung (Logan et al., 1998; Ryan et al., 1998; Campione et al., 1999). *Pitx2* wird daher als Vermittler der links-rechts-spezifischen Information von der linken Seitenplatte in die Organe angesehen. Allerdings zeigt der Phänotyp der Nullmutation des *Pitx2*-Gens ein korrekt orientiertes Herz und eine korrekte Körperdrehung, dessen Richtung, ebenso wie die der Herzdrehung, festgelegt ist. Links-Rechts-Defekte waren hingegen z.B.

anhand des rechten Lungenisomerismus erkennbar (Gage et al., 1999; Kitamura et al., 1999; Lin et al., 1999; Lu et al., 1999).

Missexpression von *nodal* in der rechten Seite von *Xenopus* und Huhn führen zu einer Randomisierung der Herzschlauchdrehung (Levin et al., 1997; Sampath et al., 1997). Andererseits sind Mutationen, die eine Veränderung des Situs mit sich führen, immer mit einer gestörten *nodal*-Expression in der Seitenplatte in Verbindung zu bringen (Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996; Heymer et al., 1997; Dufort et al., 1998; King et al., 1998; Melloy et al., 1998; Meno et al., 1998; Rebagliati et al., 1998b; Sampath et al., 1998; Gaio et al., 1999; Izraeli et al., 1999; Meyers und Martin, 1999; Tsukui et al., 1999; Yan et al., 1999). Auch die hypomorphe Mutation des *nodal*-Gens, die zu einer abgeschwächten Expression von *nodal* führt, ist durch Links-Rechts-Defekte gekennzeichnet, die das Herz und die angrenzenden Gefäße, die Lunge und den Magen betreffen (Lowe et al., 2001). Nodal ist demzufolge ebenso wie Pitx2 in die asymmetrische Organbildung involviert. Die von Nodal, jedoch nicht von Pitx2, abhängige Orientierung des Herzens, muss folglich von bislang unbekanntem Zielgenen des Nodal-Signalweges hervorgerufen werden.

1.1.5 Frühe Ereignisse, oberhalb der konservierten Nodal-Signalkaskade

Die Ereignisse, die letztlich zur konservierten Expression von *nodal*, *lefty2* und *Pitx2* in der Seitenplatte führen, sind bislang weniger gut erforscht und bisherige Untersuchungen deuten auf Unterschiede im Aufbau der frühen Links-Rechts-Achse zwischen den einzelnen Wirbeltieren hin.

1.1.5.1 Frühe asymmetrisch exprimierte Gene im Huhn

Im Bereich des Hühnerprimitivknotens, dem Organisationszentrum der anterioren Körperachse, wurden die ersten asymmetrisch exprimierten Gene entdeckt (Abb.1). *Aktivin β B*, ein Mitglied der TGF β -Superfamilie, wird bereits im Primitivstreifenstadium asymmetrisch rechts des anterioren Primitivstreifens bzw. des sich gerade gebildeten Primitivknotens exprimiert (Levin et al., 1997) und induziert die ebenfalls rechtsseitige Expression des *Aktivinrezeptors IIA* (Abb.1;

Levin et al, 1995, 1997). Signaltransduktion über diesen Rezeptor bewirkt die gleichermaßen rechtsseitige Expression des TGF β -Signalmoleküls *BMP4* (Abb.1; Monsoro-Burq und Le Douarin, 2000, 2001), das induktiv auf die rechtsseitige Expression von *fgf8*, einem von 21 weiteren Mitgliedern der Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF-Familie, wirkt (Abb.1; Boettger et al., 1999; Monsoro-Burq und Le Douarin, 2001). Das rechtsseitig exprimierte *BMP4* wirkt zudem repressiv auf die Expression des Signalmoleküls *sonic hedgehog (shh)* aus der Familie der Hedgehog-Proteine. Demzufolge wird die Transkription von *shh*, die ursprünglich symmetrisch angelegt ist, auf die linke Seite des Primitivknotens beschränkt (Abb.1; Levin et al., 1995, 1997; Monsoro-Burq und Le Douarin, 2001). Dadurch asymmetrisch linksseitig exprimiertes *shh* induziert wiederum die Expression seines Rezeptors *patched (ptc)* auf der linken Seite des Primitivknotens (Abb.1; Marigo und Tabin, 1996; Pagán-Westphal und Tabin, 1998), sowie die linksseitige Expression des Transkriptionsfaktors *HNF3 β* (Abb.1; Levin et al., 1995). *Aktivin β B* ist damit im Huhn das am frühesten asymmetrisch exprimierte Gen. Die Ursache dieser Asymmetrie ist jedoch unbekannt. Missexpressionsexperimente von *Aktivin* auf der linken Seite des Primitivknotens führten zur Randomisierung der Herzschlauchdrehung und bestätigten dem *Aktivin* eine Rolle im Aufbau der Links-Rechts-Achsenentwicklung (Levin et al., 1995). Aufgrund der ersten offensichtlichen Asymmetrie im Bereich des Primitivknotens wurde vermutet, dass hier der Symmetriebruch stattfindet.

Die Etablierung der ersten asymmetrischen Expressionen im Bereich des Primitivknotens des Huhns gipfelt letztlich in der linksseitigen Expression von *shh* (Levin et al., 1995) und der rechtsseitigen Expression von *fgf8* (Boettger et al., 1999). Im Huhn folgt der einseitig linken Expression von *shh* die gleichermaßen einseitige Expression des Signalmoleküls *nodal* auf der linken Seite des Primitivknotens (Abb.1; Levin et al., 1995).

Die asymmetrische Expression der Gene *Aktivin β B* (Levin et al., 1997), *Aktivinrezeptor IIA* (Levin et al., 1995), *BMP4* (Monsoro-Burq und Le Douarin, 2000), *fgf8* (Boettger et al., 1999) und *shh* (Levin et al., 1995) im Bereich des Primitivstreifens beschränkt sich bisherigen Untersuchungen zufolge ausschließlich auf die Spezies Huhn. In allen anderen Tierarten wurde eine symmetrische Expression beobachtet. Die Expressionsdomäne von *nodal* in der

Mittellinie der Maus ist zwar ebenfalls bilateral angelegt, es kann jedoch vom frühen Somitenstadium an eine verstärkte Expression in der linken Seite beobachtet werden (Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996). Damit ist *nodal* das erste asymmetrisch exprimierte Gen in der Maus.

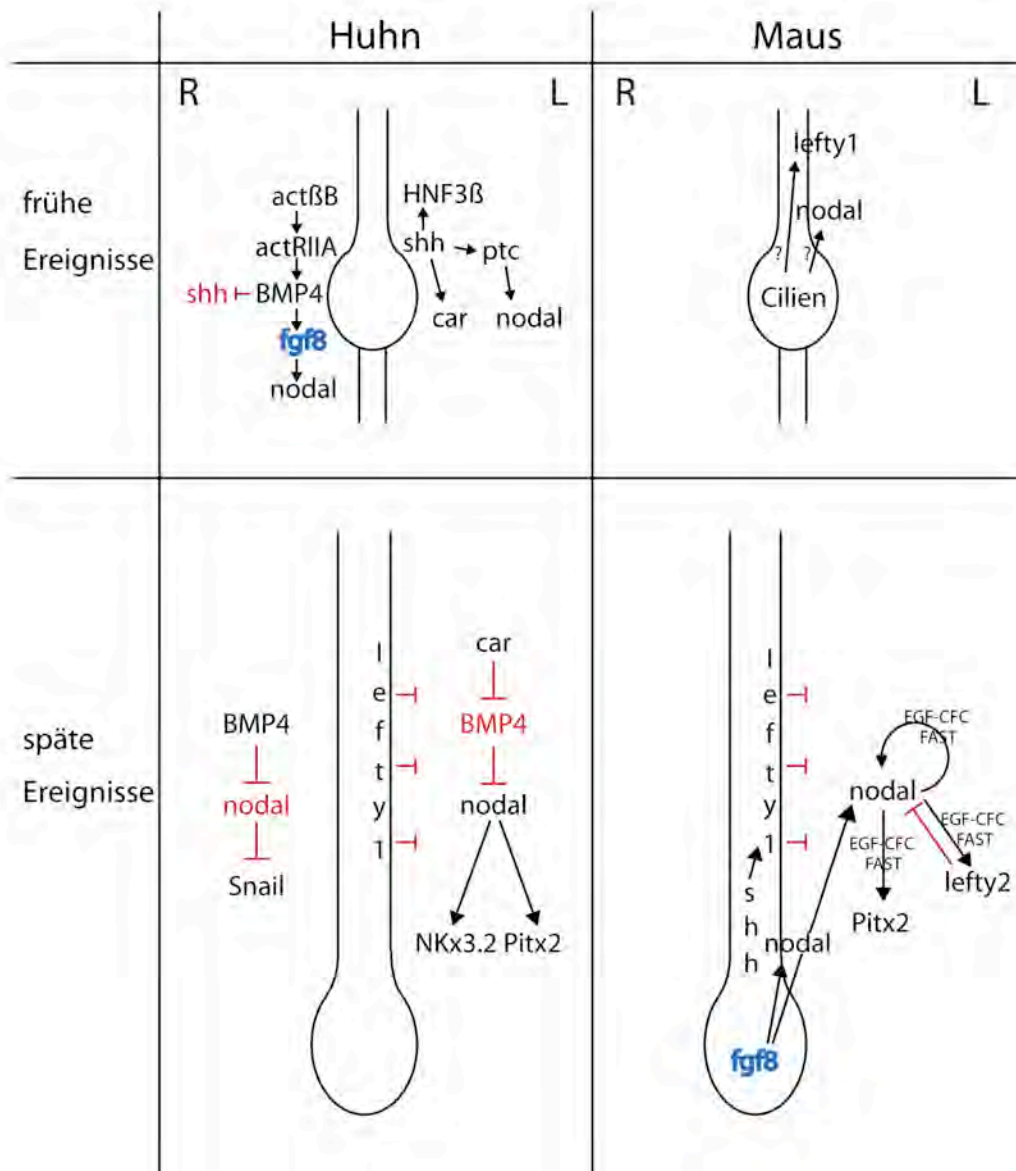


Abb. 1 **Genkaskaden der frühen und späten Links-Rechts-Achsenentwicklung beim Huhn und der Maus**

Der obere Teil der Abbildung dokumentiert die frühen Vorgänge zum Zeitpunkt der Primitivknoten- bzw. der Mittellinienentstehung, der untere verdeutlicht vor allem die anschließende Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie in den Seitenplatten. Dabei wurde eine ventrale Ansicht gewählt. Rot markierte Gene werden auf der jeweiligen Seite in ihrer Expression unterdrückt. Das bereits frühzeitig im Huhn asymmetrisch rechts exprimierte *fgf8* bewirkt die Repression der *nodal*-Expression. Symmetrisch im Bereich des Primitivknoten exprimiertes *fgf8* in der Maus ist dagegen für die Expression von *nodal* in der Mittellinie und in der Seitenplatte notwendig.

1.1.5.2 Die Rolle von Cilien in der Maus

In der Maus befinden sich auf der Oberfläche jeder einzelnen ventralen Primitivknotenzelle Monocilien (Sulik et al., 1994). Diese Cilien weisen die 9+0 Anordnung von Mikrotubuli auf (Nonaka et al., 1998), was sie als primäre Cilien charakterisiert, die bis dahin als unbeweglich angesehen wurden. Anhand von Videomikroskopie konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Cilien beweglich sind und dass ihr Rotieren im Gegenuhrzeigersinn einen zur linken Seite getriebenen Fluss der extrazellulären Flüssigkeit im Bereich des Primitivknotens bewirkt. Dieser wurde als Knotenfluss bezeichnet (Nonaka et al., 1998). Daraufhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Knotenfluss den Bruch der Bilateralsymmetrie im Primitivknoten verursacht, indem er extrazelluläre Signalmoleküle auf die linke Knotenseite der Mittellinie transportiert, um hier die asymmetrische Expression weiterer Gene zu bewirken (Abb.1; Takeda et al., 1999; Okada et al., 1999).

Mutationen, die sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen den Aufbau oder die Beweglichkeit der Cilien beeinträchtigen, weisen immer Links-Rechts-Defekte auf und sprechen damit für die Beteiligung von Cilien im Aufbau der Links-Rechts-Achse (Afzelsius 1976; Supp et al, 1997). Dabei kann man zwei Mutations-Phänotypen unterscheiden, zum einen den Verlust der Cilien und zum anderen die funktionelle Beeinträchtigung der Primitivknotencilien, die beide letztlich den Verlust des Knotenflusses bewirken.

Die gezielte Mutation von zwei Mikrotubuli-assoziierten Motorproteinen der Kinesin-Superfamilie, KIF3A und KIF3B, die sowohl am Transport von Material für den Aufbau der Cilien als auch am intrazellulären Transport von Organellen entlang von Mikrotubuli beteiligt sind, führen zum Verlust der Cilien und des Knotenflusses und zu einer randomisierten Herzorientierung (Nonaka et al., 1998; Marszalek et al., 1999; Takeda et al., 1999). Die Seitenplattenexpression von *lefty2* war nicht vorhanden oder bilateral ausgeprägt.

Die spontan aufgetretene Mausmutation *inversus viscerum (iv)* ist auf eine Unsinnmutation des Gens *left-right-dynein (Ird)* zurückzuführen (Supp et al, 1997, 1999), das zur Familie der Dyneine gehört, die als Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine am Transport von Organellen im Cytoplasma und in den Axonemen

an der Erzeugung der Cilienbewegung beteiligt sind (King, 2000). Die Mutation verursacht *situs inversus* in 50% der Embryonen (Supp et al., 1997, 1999) und ist durch unbewegliche Cilien und das Fehlen des Knotenflusses charakterisiert (Okada et al., 1999). Die Expression von *nodal* und *lefty2* in der Seitenplatte ist randomisiert. Da Mäuse mit einer gezielten Mutation des *Ird*-Locus ansonsten keinen veränderten Phänotyp zeigen, wird der Zusammenhang zwischen Knotenfluss und dem Aufbau der Links-Rechts-Signalkaskade bestärkt (Supp et al., 1999).

Eine Verbindung zwischen Knotenfluss und einer weiteren die Links-Rechts-Achsenentwicklung betreffenden Mausmutation ist jedoch schwerer herzustellen. Die *inversion of embryonic rotation (inv)* Mutation ist charakterisiert durch 100% *Situs inversus* (Yokayama et al., 1993). Der Herzsitus ist in allen Fällen revertiert, die Seitenplattenexpression von *nodal*, *lefty2* und *Pitx2* ist ausschließlich auf die rechte Seite beschränkt. Das der Mutation zugrundeliegende Gen kodiert für das intrazelluläre Protein Inversin, das ubiquitär im frühen Mäuseembryo exprimiert wird (Mochizuki et al., 1998). Da die Abwesenheit des Knotenflusses zu einer randomisierten Links-Rechts-Achse führt, wurde erwartet, dass der Knotenfluss der *inv*-Mutation in umgekehrter Richtung verlaufen sollte. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Cilien nach wie vor in gewohnter Richtung rotieren, der Knotenfluss jedoch deutlich verlangsamt erscheint (Okada et al., 1999). Dieser unzureichende Knotenfluss soll zur Anreicherung eines normalerweise zur linken Seite transportierten linksspezifischen Signals auf der rechten Seite führen und damit die Situs-Umkehr auslösen (Okada et al., 1999).

Eine weitere Mutation in der Maus betrifft das *Hfh4*-Gen, das zur Familie der Helix/Forkhead-Transkriptionsfaktoren gehört und das in cilienbesetzten Zellen, einschließlich der Primitivknotenzellen exprimiert wird (Hackett et al., 1995; Lim et al., 1997). Die Mutation führt zum Verlust von Cilien des 9+2-Typs, wie sie in Epithelien des respirativen und des reproduktiven Trakts angetroffen werden, jedoch nicht zum Verlust der Primitivknotencilien (Chen et al., 1998; Brody et al., 2000). Allerdings sind die mutierten Mäuse durch eine Randomisierung der L-R-Achse charakterisiert, die im Zusammenhang mit dem gleichzeitigen Verlust der *Ird*-Expression zu stehen scheint (Chen et al., 1998). Obwohl die Motilität der

Primitivknotencilien bisher nicht untersucht wurde, wird vermutet, dass diese, ebenso wie die der *iv*-Mutante, unbeweglich sind. Hfh4 scheint daher die Expression von verschiedenen Dyneinen zu kontrollieren (Chen et al., 1998).

Mäuse, mit einer Mutation, die den Verlust des Proteins Polaris bewirken, das in cilienbesetzten Zellen im Bereich des Basalkörpers und des Axonemas konzentriert ist (Taulman et al., 2001) und am Aufbau des Ciliums beteiligt ist (Yoder et al., 2002), besitzen, ebenso wie die Kif3-Mutanten, keine Cilien im Bereich des Primitivknotens und zeigen unter anderem eine Randomisierung der Herzdrehung (Murcia et al., 2000).

Obwohl sich eine Verbindung zwischen den Cilien des Primitivknotens und der Links-Rechts-Achsenentwicklung immer deutlicher herauszustellen scheint, konnte die Existenz beweglicher Cilien im Bereich des Primitivknotens in anderen Wirbeltieren bisher nicht belegt werden (Wright, 2001).

1.1.5.3 Die Rolle von Gap junctions

Experimentelle Daten in Huhn und *Xenopus* deuten auf einen frühzeitigen Einfluss der über gap junctions verlaufenden interzellulären Kommunikation auf die Entwicklung der Links-Rechts-Achse hin, die der Etablierung der Primitivknotenasymmetrie zeitlich vorauszugehen scheint. Gap junctions sind interzelluläre Transmembrankanäle, die aus zwei von jeder Zelle gebildeten Hälften, den Connexonen, aufgebaut sind. Jedes Connexon besteht wiederum aus 6 Transmembranprotein-Untereinheiten, den Connexinen, die hexagonal angeordnet sind. Der gesamte Tunnel umfasst daher zweimal 6, also 12 Connexine. Gap junctions ermöglichen den Durchtritt von kleinen Molekülen bis zu einer Größe von 1000 Dalton, wie z.B. Ionen, Nukleotiden und sekundären Botenstoffen, aus dem Cytoplasma der einen in das der Nachbarzelle (Simon und Goodenough, 1998; Yeager et al., 1998). In *Xenopus*-Embryonen konnte gezeigt werden, dass schon in den Stadien der Zellteilung Unterschiede in der über gap junctions verlaufenden Kommunikation zwischen ventralen und dorsalen Zellen bestehen (Levin und Mercola, 1998). Pharmazeutische Substanzen, die die Aktivität der gap junctions verändern oder die gezielte Missexpression von

Connexinen verursachen in Furchungs-, Blastula- und Gastrulastadien des Amphibienembryos Heterotaxie in Bezug auf das Herz, den Magen und die Gallenblase (Levin und Mercola, 1998). Im Huhn konnte gezeigt werden, dass *connexin43* schon ab Stadium 2 im gesamten Blastoderm und im Stadium 5 im Primitivstreifen und asymmetrisch rechts des Primitivknotens exprimiert wird (Levin und Mercola, 1999). Das Entfernen des Primitivknotens in Stadium 3-, das normalerweise die Neubildung eines korrekt gebildeten Primitivknotens bewirkt (Psychoyos und Stern, 1996b), führt in Anwesenheit des gap junction Inhibitors Lindan, der bei *Xenopus*-Embryonen Heterotaxie verursacht, zu einer symmetrischen Expression von *shh* im neugebildeten Primitivknoten (Levin und Mercola, 1999). Ebenso löst die Verabreichung von Gegensinn-Oligonukleotiden des *connexin43*, das zur Verminderung der endogenen *connexin43*-Expression führt, sowie die Blockade des Connexin43-Proteins eine gestörte Expression von *shh* und weiterer Marker der Links-Rechts-Kaskade aus (Levin und Mercola, 1999). Es wird daher vermutet, dass ein unidirektionaler Transport über gap junctions aufgrund einer entsprechenden Struktur der gap junctions oder aufgrund eines sich über eine gewisse Entfernung erstreckenden Ladungsgradienten zum Aufbau einer frühen Asymmetrie im Embryo führen könnte (Levin und Mercola, 1998).

1.1.5.4 Die Rolle des Primitivknotens

Die asymmetrische Expression von bestimmten Genen im Bereich des Primitivknotens des Huhns, sowie der Einfluss der Cilien im Primitivknoten weisen dem Primitivknoten eine wichtige Rolle in der Entstehung der Links-Rechts-Achsenbildung zu.

Transplantationsexperimente im Huhn während der Primitivknotenausbildung konnten zeigen, dass der Primitivknoten zum Zeitpunkt seiner Entstehung noch keine links-rechts-spezifische Information enthält und dass er diese über Signale aus dem umgebenden Gewebe erhält (Pagán-Westphal und Tabin, 1998). Obwohl im anschließenden Stadium die links-rechts-spezifische Information im Primitivknoten etabliert ist, ist dieser somit im Huhn nicht der Ort des Symmetriebruchs. Das Rotieren des bereits asymmetrisch angelegten Primitivknotengewebes führte zur Induktion der *nodal*-Expression in der rechten

Seitenplatte und bestätigte damit den aus Missexpressionsexperimenten vermuteten induktiven Einfluss des Primitivknotens auf die Seitenplattenexpression (Pagán-Westphal und Tabin, 1998).

Mutationen in der Maus, die zum Verlust der Gene *HNF3 β* und *Brachyury* führen, bestätigen eine induktive Rolle des Primitivknotens im Aufbau der linksseitigen Expression. Diese Embryonen besitzen keinen oder einen defekten Primitivknoten und infolgedessen keine linksseitige Expression von *nodal* und *lefty2* (Beddington et al., 1992; Ang und Rossant, 1994; Weinstein et al., 1994; Kispert et al., 1995; Collignon et al., 1996; King et al., 1998).

1.1.6 Unterschiede in der Links-Rechts-Achsenentwicklung zwischen Huhn und Maus

Zwischen Huhn und Maus bestehen hinsichtlich der Funktion oder der Expression einzelner Gene nicht nur Unterschiede, diese scheinen zudem gegensätzlicher Natur zu sein. Dies betrifft die Funktion der Gene *shh* und *fgf8* sowie die Expression der Gene *Snail* und *NKx3.2*.

1.1.6.1 Funktion von Shh

Das Signalmolekül Shh scheint hinsichtlich des Aufbaus der Links-Rechts-Kaskade unterschiedliche Funktionen in Huhn und Maus zu übernehmen. Im Huhn wird *shh* asymmetrisch auf der linken Seite des Primitivknotens exprimiert. Die mit einem monoklonalen Antikörper verursachte Blockierung von Shh verhinderte die linksseitige Expression von *nodal* in der Seitenplatte (Levin et al., 1995). Die rechtsseitige Missexpression resultierte in einer ektopischen rechtsseitigen Expressionsdomäne von *nodal* (Levin et al., 1995). Shh besitzt damit im Huhn eine linke induktive Funktion.

Anhand von Transplantationsexperimenten im Huhn konnte gezeigt werden, dass Shh die Induktion der *nodal*-Expression in der Seitenplatte nur in Anwesenheit des paraxialen Mesoderms auslösen kann (Levin et al., 1995; Pagán-Westphal und Tabin, 1998). *Caronte* (*car*), ein Mitglied der *cerberus/dan*-Familie von extrazellulären Antagonisten der TGF β -Signalmoleküle, wird, durch Shh induziert, im linken paraxialen Mesoderm auf Höhe der asymmetrischen *shh*-Expression und

im gesamten linken Seitenplattenmesoderm transkribiert (Rodriguez Esteban et al., 1999; Yokouchi et al., 1999). Missexpressionsexperimente von *car* auf der rechten Seite des Primitivknotens führen zur Induktion der *nodal*-Expression in der rechten Seitenplatte und zu Situs-Defekten. Da ektopisch plaziertes BMP4 die Repression der *nodal*-Expression in der Seitenplatte bewirkt, wurde ein Modell abgeleitet, in dem BMP-Signale, die bilateral in der Seitenplatte aktiv sind, zur Repression von *nodal* in der Seitenplatte führen (Abb.1). *car*, das wahrscheinlich als BMP-Antagonist agiert, reprimiert BMP4 auf der linken Seite, entfernt dadurch dessen antagonistischen Einfluss auf die *nodal*-Transkription und ermöglicht die linksseitige Expression von *nodal* in der Seitenplatte (Rodriguez Esteban et al., 1999; Yokouchi et al., 1999). Allerdings konnte *car* bisher in keinem anderen Organismus identifiziert werden.

In der Maus wird *shh*, ebenso wie in *Xenopus* und Zebrafisch, nicht asymmetrisch im Primitivknoten des frühen Embryos exprimiert (Collignon et al., 1996; Sampath et al., 1997; Schilling et al., 1999). Allerdings ist der Phänotyp der Nullmutation von *shh* in der Maus durch Links-Rechts-Defekte charakterisiert, die einen linken Lungenisomerismus, sowie die bilaterale Expression der linken Seitenplattengene miteinschlossen (Tsukui et al., 1999, Meyers und Martin, 1999). Daraufhin wurde Shh in der Maus, entgegen der linksseitigen Wirkung im Huhn, eine rechte Funktion in der Links-Rechts-Achsenentwicklung zugesprochen. Da *shh*-Mutanten nicht in der Lage waren eine Bodenplatte zu induzieren, scheinen die beobachteten Defekte allerdings auf den gleichzeitigen Verlust von *lefty1* in der defekten Mittellinie zurückzuführen zu sein, das normalerweise die ektopische Expression von *nodal* und anderen Seitenplattenmarkern auf der rechten Seite verhindert (Abb.1; Meno et al., 1998).

Die Missexpression von *shh* in *Xenopus*- und Zebrafisch-Embryonen führt, ebenso wie im Huhn, zu einer ektopischen rechtsseitigen Expression von *nodal* und einer Beeinflussung des Herz- und Darm-Situs (Sampath et al., 1997; Schilling et al., 1999). Doppelnulmutationen der Gene *shh* und dem verwandten Gen *indian hedgehog (ihh)*, sowie die Nullmutation des *shh*-Rezeptors *smoothened (smo)* in der Maus resultieren im Verlust der asymmetrischen Seitenplattenexpression der linken Seitenplattenmarker. Somit besitzt Shh auch in anderen Vertebraten, wie z.B. der Maus, eine induktive linksseitige Funktion. Allerdings konnte in der

Doppelnullmutation eine Störung der Mittellinienexpression von *nodal* beobachtet werden. Somit scheint Shh in der Maus, im Gegensatz zu dem direkten Einfluss auf die Seitenplattenexpression im Huhn, regulatorisch auf die Mittellinienexpression von *nodal* einzuwirken (Zhang et al., 2001).

1.1.6.2 Nicht-konservierte Expression von *Snail* und *NKx3.2*

Weitere unterhalb der Nodal-Signalkaskade wirkende Transkriptionsfaktoren sind das Zinkfinger-Gen *Snail*, sowie das Homöobox-enthaltende Gen *Nkx3.2*, deren Expression jedoch in Huhn und Maus nicht konserviert zu sein scheint.

Im Huhn wird *Snail* während der Somitenstadien einseitig nur im rechten Seitenplattenmesoderm exprimiert, wobei es funktionell unterhalb von *nodal* in der Links-Rechts-Kaskade eingeordnet werden konnte (Abb.1; Isaac et al., 1997; Patel et al., 1999). Missexpression von *nodal* in der rechten Seitenplatte des Huhns führen zum Verlust der rechtsseitigen *Snail*-Expression und verdeutlichen die durch *nodal* verursachte negative Kontrolle der *Snail*-Expression (Patel et al., 1999). Weiterhin verursacht die Behandlung von Hühnerembryonen mit Gegensinn-Oligonukleotiden von *Snail* die ektopische Expression von *Pitx2* in der rechten Seitenplatte (Patel et al., 1999). Den Huhn-Experimenten zufolge kann *Snail* daher nur auf der *nodal*-defizienten rechten Seite exprimiert werden und verhindert weiterhin die rechtsseitige Expression von *Pitx2*.

Die Expression in der Maus scheint unklar. Einer Publikation zufolge wird *Snail* nur symmetrisch exprimiert (Isaac et al., 1997), einer anderen nach wird *Snail* im Somitenstadium auch asymmetrisch in der rechten Seitenplatte exprimiert (Sefton et al., 1998). Eine Funktion im Aufbau der Links-Rechts-Kaskade konnte bislang nicht dargestellt werden.

Das Homöobox-Gen *Nkx3.2* wird im Huhn ebenfalls asymmetrisch in der linken Seitenplatte exprimiert und steht Experimenten im Huhn zufolge unter der positiven Kontrolle der Nodal-Signaltransduktion (Abb.1; Schneider et al., 1999). In der Maus hingegen konnte eine rechtsseitige Expression festgestellt werden, die wiederum in den *inv*-Mutanten verstärkt links zu finden ist und demzufolge eine asymmetrische Funktion zu haben scheint (Schneider et al., 1999).

1.1.6.3 Funktion von FGF8

Im Huhn nimmt die rechtsseitige Expression von *fgf8*, ebenso wie die linksseitige Expression von *shh*, Einfluss auf die Expression von *nodal*.

Im Hühnerembryo wird *fgf8* nur in der rechten Seite des Primitivknotens exprimiert, so dass vermutet wurde, dass allein die rechts aus dem Primitivknoten auswandernden Zellen unter den Einfluss von *fgf8* gelangen. Die daraufhin erfolgte Missexpression von FGF8-Protein auf der linken Seite des Hühnerprimitivknotens im Stadium 4 führte zur Repression von *nodal*, sowohl in der Mittellinie als auch in der Seitenplatte (Boettger et al., 1999). Dies ordnete dem *fgf8* eine rechtsseitige repressive Rolle in Bezug auf die Seitenplattenexpression von *nodal* zu. Somit induziert im Huhn links des Primitivknotens exprimiertes *shh* die *nodal*-Expression in der Seitenplatte, wohingegen rechtsseitig exprimiertes *fgf8* diese unterdrückt (Abb.1).

In der Maus wird *fgf8* nur symmetrisch exprimiert. Mäuse mit einer hypomorphen Mutation des *fgf8*-Gens, dessen reduzierte Expression den schweren Gastrulationsphänotyp der *fgf8*-Nullmutation rettet, sind jedoch auch durch Links-Rechts-Defekte gekennzeichnet. So zeigen 50 Prozent der untersuchten Embryonen einen invertierten Herz situs, sowie einen rechten Lungenisomerismus, der auf molekularer Ebene mit dem Verlust der *nodal*-Expression in der Mittellinie sowie im Seitenplattenmesoderm verbunden ist (Meyers und Martin, 1999). Der Verlust von *nodal* in der Seitenplatte verursachte zudem den Verlust der *lefty2*- und *Pitx2*-Expression. FGF8 in der Mittellinie ist daher für die Induktion der *nodal*-Expression im Bereich des Primitivknotens, sowie der Nodal-Signalkaskade in der Seitenplatte notwendig (Abb.1).

Desweiteren bewirkte die Plazierung von FGF8-Protein in der Seitenplatte des 0 bis 2 Somitenstadiums eine ektopische rechtsseitige und damit bilaterale Expression von *nodal* in der Seitenplatte (Meyers und Martin, 1999). Demzufolge ist FGF8 sowohl hinreichend, als auch notwendig für die Induktion der *nodal*-Expression in der Seitenplatte. Daher wurde vermutet, dass FGF8 entgegengesetzt seiner rechtsseitigen repressiven Funktion im Huhn, in der Maus als ein linksseitig funktionierender Induktor der *nodal*-Expression tätig ist.

Aufgrund der gegensätzlichen Funktion des FGF8 in Huhn und Maus stellt sich die Frage, woraus diese Unterschiede resultieren. Dies könnte einerseits auf evolutionäre Unterschiede zwischen Vogel und Säuger oder Huhn und Nagetier im speziellen zurückgeführt werden. Andererseits könnte die asymmetrische FGF8-Expression im Huhn, die im Gegensatz zur symmetrischen Expression in der Maus steht, die verschiedenen Funktionen erklären. Desweiteren könnten auch die unterschiedlichen Versuchsansätze (Missexpression im Vorsomitenstadium beim Huhn; hypomorphe Nullmutation und Missexpression im Somitenstadium der Maus) die gegensätzlichen Resultate erklären.

Letztendlich stellt sich jedoch die Frage, welche der beiden Funktionen des FGF8 innerhalb der Wirbeltiere konserviert ist und daher auch auf den Menschen übertragbar ist, bzw. welches der beiden Tiermodelle eine Ausnahme darzustellen scheint. Eine Klärung dieses Problems ist auch im Hinblick auf weitere Fragestellungen der Links-Rechts-Entwicklung von Bedeutung.

Neben dem Huhn wurden bisher keine anderen Vögel analysiert. Untersuchungen an der Ratte als zweitem Säugermodell dürften, da Ratten ebenso wie die Maus zur Ordnung der Nagetiere gehören und sich in den frühen Embryonalstadien entsprechend gleich entwickeln, keine neuen Erkenntnisse bringen. Zur vergleichenden Analyse der Rolle von FGF8 in Vogel und Säuger wurde daher das Kaninchen als zusätzliches Säugermodell hinsichtlich der Expression und Funktion von FGF8 untersucht.

1.2 Das Kaninchen als Modellsystem

Der Kaninchenembryo bietet eine Reihe von Vorzügen im Hinblick auf die Untersuchung von Genexpressionen, sowie seinen Einsatz in der *in vitro* Kultur. Er entwickelt sich über eine flache Keimscheibe und entspricht damit in seiner Morphologie der des Hühnerembryos und gleichermaßen der des menschlichen Embryos. Die Entwicklung des Mäuseembryos über ein kompliziert aufgebautes,

gebogenes Eizylinderstadium ist eine nur unter den Nagetieren zu findende Ausnahmeerscheinung, da sich alle anderen Säugetiere ausschließlich über die flache Keimscheibe entwickeln. Morphologisch gesehen ist das Kaninchen daher das dem menschlichen Embryo nächststehende Säugermodell.

Der leichte Zugang zur Keimscheibe des Huhns auf der Oberfläche des Eidotters machten den Hühnerembryo zu einem beliebten Untersuchungsobjekt. Beim Kaninchenembryo findet, im Vergleich zur interstitiellen Implantation des Mäuseembryos, der bereits vor der Gastrulation in das Interstitium der Mutter eindringt, eine relativ späte und vor allem nur oberflächliche Implantation statt, bei der der Embryo nicht in die Uterusschleimhaut eindringt. Dies erleichtert, ebenso wie im Huhn, den Zugang zur Keimscheibe und fördert letztlich ein schnelleres Arbeiten.

Das Kaninchen ermöglicht, aufgrund seiner im Vergleich zu Gastrulationsstadien der Maus relativ großen und vor allem flachen Keimscheibe, eine übersichtliche und einfache Analyse von morphologischen und genexpressionsbezogenen Veränderungen, gerade im Vergleich zum gebogenen Eizylinderstadium der Maus. Diese auch beim Hühnerembryo gegebene Übersicht garantiert und erleichtert das manipulative Arbeiten mit den frühen Embryonalstadien. Das Kaninchen bietet daher sämtliche beim Huhn anzutreffenden Vorteile, ist jedoch als Säugetier das dem menschlichen Embryo nächststehende Modellsystem.

Der Kaninchenembryo wurde schon zuvor erfolgreich für embryologische Experimente eingesetzt, wie z.B. der heterotypischen Transplantation des Primitivknotengewebes zwischen Hühner- und Kaninchenembryonen (Knoetgen et al., 2000). Dies ist gerade aufgrund der sehr ähnlichen Morphologie zwischen dem frühen Huhn und Kaninchenembryo möglich. Die Gastrulation des Kaninchens gleicht derjenigen des Huhns und aufgrund der daraus resultierenden morphologischen Gemeinsamkeiten teilt man den Kaninchenembryo in Entwicklungsstadien ein, die an die nach Hamburger und Hamilton aufgestellten Entwicklungsstadien im Huhn angelehnt sind (Hamburger und Hamilton, 1951). Dabei werden die Vorsomitenstadien von 1 bis 6 durchnummeriert und zudem im Huhn in – und + , im Kaninchen in a und b unterteilt.

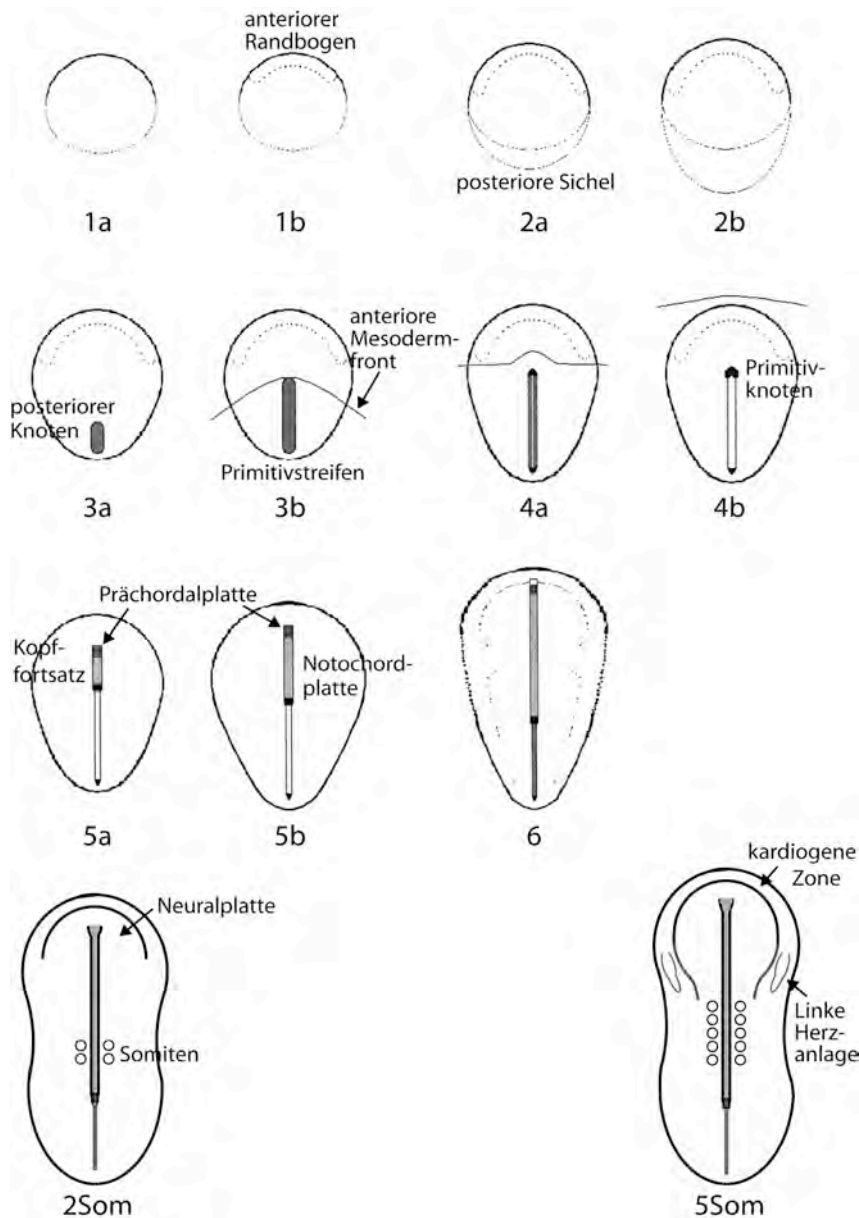


Abb.2 Schematische Darstellung der frühen Kaninchenembryogenese

Gezeigt werden die Stadien 1 bis 6 (nach Christoph Viebahn), sowie zwei ausgewählte Somitenstadien in ventraler Ansicht.

Die Embryonen sind planar ausgerichtet und besitzen morphologische Marker, welche die einzelnen Stadien definieren.

Im Stadium 1a grenzt sich der anteriore Rand der Keimscheibe scharf vom umgebenden extraembryonalen Gewebe ab und führt in Stadium 1b zur Bildung einer lokalen Verdickung, des anterioren Randbogens. Im Stadium 2a bildet sich gegenüberliegend die posteriore Sichel, welche sich im darauffolgenden Stadium 2b noch verbreitert. Mit dem Stadium 3a beginnt sich der Primitivstreifen zu bilden, der sich in den darauffolgenden Stadien nach anterior verlängert, um schließlich im Stadium 4b den Primitivknoten zu bilden. Durch den Primitivstreifen wandern epidermale Zellen zwischen Epiblast und Hypoblast und differenzieren sich zu Endoderm- und Mesodermzellen. Die anteriore Ausbreitung des Mesoderms ist im Stadium 3b bis 4b markiert. Durch den Primitivknoten wandern mesodermale Zellen nach anterior aus und bilden im Stadium 5a einen losen Zellstrang, den Kopffortsatz. Dieser verschmilzt mit dem darunterliegenden Endoderm und bildet im darauffolgenden Stadium 5b die Notochordplatte, welche sich in den darauffolgenden Stadien noch verlängert. Links und rechts der Notochordplatte beginnen sich runde Epithelringe paarweise vom umgebenden paraxialen Mesoderm abzugrenzen, die Somiten. Im 5 Somitenstadium wird die zuerst bilateral angelegte Herzanlage im anterioren Seitenplattenmesoderm sichtbar.

Der Prozess der Gastrulation beginnt im posterioren Abschnitt des birnenförmigen Embryos in Form einer Verdickung, die posteriorer Knoten genannt wird. Im Stadium 3b verlängert sich dieser zum Primitivstreifen und erfährt im Stadium 4a seine längste Ausdehnung. Im anterioren Teil des Primitivstreifens differenziert sich eine lokale Verdickung, der Primitivknoten und ordnet den Embryo in das Stadium 4b ein. In diesem Stadium ist das gesamte Ektoderm mit mesodermalen und definitiv endodermalen Zellen unterlegt, welche seit dem Beginn der Gastrulation kontinuierlich aus dem Primitivstreifen ausgewandert sind (Abb.2, Vergleiche Stadium 3b bis 4b, Linie markiert die anteriore Ausdehnung der mesodermalen Zellen). Im darauffolgenden Stadium 5a entsteht durch das anteriore Auswandern eines Zellbandes von Primitivknotenzellen, das axiale Mesoderm. Es besteht aus dem Kopffortsatz und der davorliegenden Prächordalplatte. Die Zellen des Kopffortsatzes verschmelzen mit dem darunterliegenden Endoderm und formen einen flachen Streifen, die Notochordplatte, im Stadium 5b (Abb.2). Die Regression des Primitivknotens bewirkt schließlich die Verlängerung des axialen Mesoderms im Stadium 6, dem letzten Vorsomitenstadium.

Interessanterweise kann dem Kaninchenembryo bereits vor der Bildung des Primitivstreifens eine anterior-posteriore Achse aufgrund einer randständigen Verdickung im anterioren Teil der Keimscheibe zugeordnet werden. Dieser anteriore Randbogen ist die erste morphologische Differenzierung der Keimscheibe im danach benannten Stadium 1 und entspricht dem Kopforganisor der Maus. Im Stadium 2 differenziert sich eine posteriore Verdünnung, die posteriore Sichel und verdeutlicht die bereits bestehende anterior-posteriore Achse.

Die auf die Vorsomitenstadien folgenden Entwicklungsstadien des Kaninchenembryos werden nicht weiter durchnummeriert, sondern aufgrund der regelmäßigen paarweisen Abgliederung von lokalen Zellkondensationen seitlich der axialen Mittellinie, den Somiten, in die entsprechenden Somitenstadien eingeteilt. Im 5 Somitenstadium wird die zunächst bilateral ausgeprägte Herzanlage am unteren Ende der hufeisenförmigen kardiogenen Zone deutlich. Es bilden sich zwei isolierte gefäßartige Röhren, die in darauffolgenden

Gestaltungsbewegungen des Embryos ventral der Mittellinie zusammenkommen und schließlich zum unpaaren Herz fusionieren.

Die Übersichtlichkeit der relativ großen, flachen Keimscheibe, die ähnliche Morphologie zwischen Huhn und Kaninchen, sowie die Zugehörigkeit des Kaninchens zur Klasse der Säugetiere machen das Kaninchen zu einem interessanten Modellsystem zur Untersuchung bestehender evolutionär oder morphologisch bedingter Unterschiede.

1.3 Ziel der Arbeit

Aufgrund der zwischen Maus und Huhn bestehenden Unterschiede bezüglich der Expression und Funktion des FGF8 in der frühen Links-Rechts-Achsenentwicklung, soll die Rolle von FGF8 im Kaninchen untersucht werden. Der Kaninchenembryo ist als Säuger und aufgrund seiner zum Huhn vergleichbaren Morphologie in der Lage evolutionär oder morphologisch bedingte Unterschiede zwischen Maus und Huhn aufzuklären. Dazu sollten sämtliche der bisher in die Links-Rechts-Kaskade involvierten Markergene kloniert und auf eventuelle asymmetrische Expressionsmuster untersucht werden.

Weiterhin sollten *in vitro* Kulturbedingungen erstellt werden, die es Kaninchenembryonen der Neurula- und frühen Somitenstadien ermöglichen, sich ausserhalb des Muttertieres normal zu entwickeln.

Schließlich sollte mithilfe von Missexpressionsexperimenten des *fgf8*, die den Maus- und den Huhn-Experimenten vergleichbar waren, der Einfluss von FGF8 auf die Links-Rechts-Achse anhand von Veränderungen der asymmetrischen Seitenplattenexpression von *nodal* und *Pitx2* analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bezugsquellen

2.1.1.1 Chemikalien und Labormaterial

β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Acrylkugeln, heparinisiert	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio Rad, München
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
AP-Digoxigenin	Roche, Mannheim
AP-Digoxigenin Antikörper	Roche, Mannheim
Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Augsburg
Bakto-Peptide	Difco, Augsburg
Bakterialschalen (9 cm, 15 cm)	Greiner, Nürtingen
Boehringer Block	Roche, Mannheim
BM-Purple	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chaps	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Deckgläschen	Bender und Hobein, Karlsruhe
DEPC	Fluka, Schweiz
Desoxynukleosidtriphosphate	Peqlab, Erlangen
DTT	Roche, Mannheim
Dig-NTP's	Roche, Mannheim
DNA Purifikation Kit (Easy Pure)	Biozym, Oldendorf
DMF	Roth, Karlsruhe
DMSO	Fluka, Schweiz
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen

Glycerin	BRL, Neu-Isenburg
Harnstoff	BIO-RAD, München
Hefe-RNA	Roche, Mannheim
Heparin	Sigma, Deisenhofen
Inkubator Gasboy C40	Labotect, Göttingen
Lithiumchlorid (LiCl)	Serva, Heidelberg
Kulturschalen	BectonDickinson, Frankreich
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Maltose	Serva, Heidelberg
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Na-Acetat	Roth, Karlsruhe
Na-Citrat	Roth, Karlsruhe
Na-Cl	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
NaOH	Serva, Heidelberg
N,N´-Methylen-Bisacrylamid	BIO-RAD, München
N,N, N´, N´-Tetramethyldiamin (TEMED)	BIO-RAD, München
Objektträger	Labonord, Frankreich
Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicilin-Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Phenol	Roth, Karlsruhe
Plastikpipetten (3,5 + 6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Quiagen-Tip 500 Säulen	Quiagen, Düsseldorf
Rediprime	Amersham, Braunschweig
Restriktionsenzyme	New England Biolabs; Promega, Mannheim
Rinderserumalbumin(BSA)	Serva, Heidelberg
Rnase A	Roche, Mannheim
RNase-Inhibitor	Promega, Heidelberg
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	AmershamPharmacia, Braunschweig
Saccharose	Serva, Heidelberg
SU5402	Calbiochem,Bad Soden
Superscript-RT	Gibco, Eggenstein
T61	Hoechst, Frankfurt
Taq Polymerase	Amersham, Braunschweig
Temed	Amersham, Braunschweig
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
TrisHCl	Sigma, Deisenhofen

Tween20
Whatman 3 MM Papier

Wolframdraht
X-Gal
Ziegenserum

Serva, Heidelberg
Bender und Hobein,
Karlsruhe
Plano, Wetzlar
Sigma, Deisenhofen
Sigma, Deisenhofen

Radiochemikalien:

[γ -³³P]ddGTP
[γ -³³P]ddATP
[γ -³³P]ddTTP
[γ -³³P]ddCTP

AmershamPharmacia,
Braunschweig

2.1.1.2 Tiere

Kaninchen (Weiße Neuseeländer)

Harlan-Winkelmann,
Borchen

2.1.1.3 Proteine

rekombinantes FGF8b (Maus)
rekombinantes BMP4 (Mensch)
rekombinantes Aktivin A

R&DSystems, Wiesbaden
R&D Systems, Wiesbaden

2.1.1.4 Kits

DNA Purification Kit Easy Pure
MPG Direct mRNA Purification Kit
Peqlab GOLD Tripure Kit
Plasmid-Maxi-Präp. Kit
TOPO Cloning Kit
Wizard Plus SV Minipreps Kit

Biozym, Oldendorf
Eurobio, Frankreich
Peqlab, Erlangen
Quiagen, Düsseldorf
Invitrogen, Groningen
Promega, Mannheim

2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

alkalischer Agarose 2x Ladepuffer:	200 µl Glycerin, 750 µl H ₂ O, 46 µl gesättigtes BPB, 5 µl 5 M NaCl
10 x alkalischer Puffer:	3 ml 5 M NaOH, 2 ml 5 M EDTA, 45 ml deionisiertes H ₂ O
DNA-Probenpuffer:	10 mM EDTA, 10% Glycerin, 0,1% SDS, 0,02% Bromphenolblau
Einbettmedium:	2,2 g Gelatine, 135 g Rinder-Albumin, 90 g Saccharose in 450 ml PBS gelöst
Hybridisierungslösung (<i>in situ</i>):	25 ml Formamide 0,5 g Boehringer Block 12,5 ml 20x SSC (pH7) 6 ml H ₂ O 5 ml 10mg/ml Hefe-RNA 100 µl 50mg/ml Heparin 250 µl 20% Tween20 500 µl 10% Chaps 500 µl 0,5 M EDTA
Kulturmedium (<i>in vitro</i> Kultur):	F10-Medium, 20% FCS, 2% Glutamat, 2% Penicilin-Streptomycin
LB-Agar:	10 g Pepton, 10 g NaCl, 5 g Hefe und 20 g Agar auf 1 Liter auffüllen, pH mit NaOH auf 7,0, autoklavieren, auf 50°C abkühlen, gießen
LB-Medium:	10 g Bacto-Pepton, 10 g NaCl, 5 g Bacto-Hefeextrakt mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen, sterilisieren durch autoklavieren
Maltose:	20% Stammlösung in dest.H ₂ O, steril filtrieren
Maxi-Präp.-Puffer: Puffer 1	50 mM TrisHCl, 10 mM EDTA, pH 8, 200 µl 20 mg/ml RnaseA zugeben

Puffer 2	0,2 M NaOH, 1% SDS
Puffer 3	3 M K Ac , pH 5,5
QBT	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% EtOH, 0,15% Triton-X100, pH 7 mit 10 N NaOH
QC	1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% EtOH, pH 7 mit 10 N NaOH
QF	1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% EtOH, pH 8,2 mit 10 N NaOH
1x PBS:	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,49 g Na ₂ HPO ₄ , 24 g KH ₂ PO ₄ , mit Wasser auf 1 Liter auffüllen, ph auf 7,2 einstellen
10x PCR-Puffer:	500 mM Tris-HCl, pH 9, 100 mM MgCl ₂
SOB:	2% Bakto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, mit dest. Wasser auf 1 Liter auffüllen, sterilisieren durch autoklavieren
20x SSC:	175,3 g NaCl, 88,2 g Na-Citrat, auf 1 Liter mit dest. Wasser auffüllen, mit 10 N NaOH auf pH 7 einstellen, autoklavieren
TBE-Puffer:	90 mM Tris pH 8,3, 90mM Borsäure, 2,5 mM EDTA

2.1.3 Oligonukleotide

2.1.3.1 Sequenzierprimer:

M 13 forward:	5'GTAAAACGACGGCCAGT 3'
M 13 reverse:	5'GGAAACAGCTATGACCATG 3'
Sp6:	5'ATTTAGGTGACACTATAG 3'
T7:	5'TAATACGACTCACTATAGGG 3'

2.2 Methoden

2.2.1 Behandlung von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels eines Spektralphotometers. Hierzu wird die Absorption (A) von UV-Strahlung der Wellenlängen 260 und 280 nm beim Durchtreten einer Nukleinsäurelösung, im Abgleich gegen das jeweilige Lösungsmittel gemessen. Eine A₂₆₀-Einheit entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml, einer RNA-Konzentration von 40 mg/ml und einer Einzelstrang-Oligonukleotid-Konzentration von 20 mg/ml. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung ermittelt sich aus dem Verhältnis der bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm aufgetretenen Absorption. Er nimmt bei optimaler Reinheit von DNA den Wert 1,8 und von RNA den Wert 2,0 an.

2.2.1.2 Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung

Die bei -80°C gelagerte und in 70% Ethanol gelöste RNA wurde mit 3 M Natriumacetat (pH 5,2), das zum Vermeiden von RNase-Verunreinigung mit DEPC-H₂O angesetzt wurde, auf eine Natriumacetatkonzentration von 0,3 M eingestellt. Nach anschließendem Vortexen wurde für 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet an der Luft kurz antrocknen gelassen. Die RNA wurde in DEPC-H₂O aufgenommen und zum Lösen für 5 Minuten bei 65 °C auf dem Heizblock geschüttelt.

2.2.1.3. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren über Agarosegele

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte, je nach der Länge der Nukleinsäurefragmente, in Agarosegelen einer Konzentration zwischen 0,8 und 1,5%. Je nach Größe und Volumen der Gelkammern wurde die entsprechende Menge an Agarose in 100 oder 300 ml 1x TBE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml zugegeben, bevor es in die horizontale Gelkammer gegossen werden konnte. Nach dem Überschichten des Gels mit 1x TBE-Puffer wurden die, mit 10x DNA-Probenpuffer versehenen, Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte, je nach Gelkammergröße, bei 100 oder 140 V. Im Anschluss konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente, aufgrund des sich zwischen die DNA-Stränge gelagerten und fluoreszierenden Ethidiumbromids, unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.2.2 Präparationen von DNA

2.2.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation kleiner Mengen an Plasmid-DNA wurde das "Wizard Plus SV Minipreps Kit" verwendet. Die Bakterien wurden in 3,5 ml Nährmedium mit 50 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt, kurz gevortext und in 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt, um dann für 5 Minuten bei 10000 rpm herunterzentrifugiert zu werden. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte in 250 µl Zellresuspensionslösung (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A) durch Vortexen und eine anschließende Inkubation von 5 Minuten bei RT. Nach Zugabe von 250 µl Zelllysislösung (0,2 M NaOH, 1% SDS) wurden die Proben durch viermaliges Umdrehen durchmischt und für weitere 5 Minuten stehen gelassen. Nach Zugabe von 10 µl alkalischer Protease-Lösung wurde durch erneutes viermaliges Umdrehen durchmischt und es erfolgte eine weitere Inkubation von 5 Minuten. Die alkalische Protease führt zur Inaktivierung von Endonukleasen und weiterer Proteine. Schließlich wird durch Zugabe von 350 µl Neutralisationslösung (4,09 M Guanidin Hydrochlorid, 0,759 M Kaliumacetat, 2,12 M Eisessig, (pH 4,2)) und erneutem viermaligen Umdrehen die durch die alkalische Zelllysislösung verursachte Denaturierung der Nukleinsäuren gestoppt. Die anschließende Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 Minuten trennt die sich in der wässrigen Lösung befindliche regenerierte Plasmid-DNA von der denaturierten genomischen Bakterien-DNA, sowie den denaturierten Proteinen. Die Plasmid-DNA-Lösung wird dann über spezielle DNA-bindende Säulen aufgereinigt und letztlich in 100 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

2.2.2.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

200 ml einer über Nacht bei 37°C in NB-Selektionsmedium (1% N-Broth, 0.5% Hefe-Extrakt, 100 µg/ml Ampicillin) geschüttelten E.coli-Suspensionskultur wurden in einen Bakterienbecher überführt und 20 Minuten bei 4°C im BECKMAN-Rotor "J2-21" mit 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet bei RT kurz trocknen gelassen. Danach wurde es in 10 ml Suspensionspuffer "P1" (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg hitzebehandelte RNaseA/ml) gründlich resuspendiert, 5 Minuten bei RT stehen gelassen und mit 10 ml Lysepuffer "P2" (0,2 M NaOH, 1% SDS) versetzt. Nach 5 Minuten vorsichtigen Schwenkens und einer Inkubation bei RT wurde mit 10 ml 3,0 M Kaliumacetat pH 5,5 durch wiederum vorsichtiges Schwenken neutralisiert und die Lösung für 15 Minuten auf Eis gestellt. Die nachfolgende Zentrifugation, für eine halbe Stunde bei 9000 rpm und 4°C, trennte die Bakterienzelltrümmer von den frei schwimmenden Plasmiden. Das Austragen des Überstandes auf eine zuvor mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol) äquilibrierte "QIAGEN-pack 500"-Säule erfolgte über ein Mullnetz, um frei schwimmende Teile des Bakterienpellets zurückzuhalten. Nach Durchlaufen des Überstandes wurde die Säule mit 30 ml Puffer "QC" (1000 mM

NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol) gewaschen und die Plasmide mit 15 ml Puffer "QF" (1500 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol) eluiert und anschließend mit 11 ml Isopropanol bei RT präzipitiert. Nach einer Stunde wurde die gefällte DNA abzentrifugiert (30 min, 10000 rpm, 4°C, HERMLE SwingOut-Rotor "AS 4.13"), mit 5 ml 80% Ethanol gewaschen, nochmals für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend bei RT getrocknet und je nach Pelletgröße in 300 bis 500 µl H₂O oder TE-Puffer gelöst.

2.2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mit dem DNA Purifikation Kit Easy Pure (Biozym)

Unter dem UV-Licht wurde die DNA-Bande knapp aus dem TBE-Gel ausgeschnitten und ihr Volumen bestimmt (100mg = 100 µl). Anschließend wurde das 1/2 Volumen „MELT“-Lösung und 4,5 x das Ausgangsvolumen an „SALT“-Lösung zugegeben und für mindestens 5 Minuten bei 55°C unter Schütteln inkubiert, bis sich das Gelstück aufgelöst hatte. 5 µl + 1µl/µg der erwarteten DNA-Ausbeute musste an „BIND“-Lösung zugesetzt und danach für 5 Minuten unter häufigem Mischen inkubiert werden. Die DNA wurde durch kurzes Zentrifugieren pelletiert, in 1 ml Waschlösung vollständig resuspendiert, nochmals durch kurzes Zentrifugieren pelletiert und vollständig trocken gelassen. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 10-20 µl deionisiertem H₂O. Diese Lösung wurde erneut für 1 Minute zentrifugiert und der Überstand als gereinigte Probe in ein neues Gefäß überführt.

2.2.3 Präparation von RNA

2.2.3.1 Isolierung von mRNA aus Embryonen mit dem MPG Direct mRNA Purifikation Kit (Eurobio)

Dieses mRNA-Isolierungssystem beruht auf einer wässrigen Suspension von superparamagnetischen, total porösen Glaspartikeln an deren Oberfläche Streptavidin kovalent gebunden ist. Zum Kit gehört zudem biotinyliertes Oligo (dT)₂₅, das an die Streptavidin-Partikel gebunden wird und diverse Puffer. Die in PBS bei -80°C tiefgefrorenen Embryos des Stadiums 8 und 8.8 wurden in soviel Gewebe-Extraktions/Hybridisierungspuffer, dem die Oligo(dT)₂₅-gebundenen Streptavidin-Partikel zugesetzt worden waren, mit einer Spritze homogenisiert, dass die Endkonzentration des Homogenisats bei 10⁶ - 10⁷ Zellen pro ml lag. Anschließend wurde 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde zu den, an die Streptavidin gebundenen, Oligo(dT)'s gegeben und die vorhandene mRNA über ihren PolyA-Schwanz an die Oligo(dT)'s gebunden. Mithilfe einer magnetischen Bank wurden die an die paramagnetischen Glaskugeln gebundenen mRNA's nach gründlichem Vortexen und 5 Minuten Inkubationszeit (RT) von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Nachdem die, an die Streptavidin-Glaspartikel gebundenen, mRNA's dreimal in Waschpuffer

resuspendiert wurden, konnte die mRNA, durch Zugabe von Release-Lösung, von den, an die Streptavidin-Glaskugeln gebundenen, Oligo(dT)'s abgelöst und ihre Konzentration mittels Spektrometrie gemessen werden. Der RNA-Lösung wurde Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 70% zugesetzt und diese bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Extraktion von RNA aus Embryonen mit dem PeqGOLD TriPure Kit (Peqlab)

Die Extraktionsmethode basiert auf einer Einzelschritt-Flüssigphasen-Separation. PeqGOLD Tripure enthält Phenol und Guanidinthiocyanat in einphasiger Lösung. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf, wobei die wässrige Phase die RNA, die Interphase die DNA und die organische Phase die Proteine enthält.

Die 30 in PBS bei -80°C tiefgefrorenen Embryos des Stadiums 9 wurden in 10 ml PeqGOLD TriPure (1 ml PeqGOLD TriPure pro $5 - 10 \times 10^6$ Zellen) mithilfe eines Glashomogenisators homogenisiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Chloroform zugegeben, 15 Sekunden kräftig geschüttelt, 10 Minuten bei RT inkubiert und 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere farblose wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt und in 10 ml Isopropanol 15 Minuten bei RT gefällt und danach für 10 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgezogen und das Pellet in 75%igen Ethanol zweimal resuspendiert und zentrifugiert (10 min, 12000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet, in DEPC-Wasser aufgenommen und zum Lösen des Pellets 10 Minuten auf 55°C erwärmt, bevor die RNA bei -80°C zur Aufbewahrung tiefgefroren wurde.

2.2.4 Klonierungstechniken

2.2.4.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Pro μg zu verdauender DNA wurden 2 - 4 Einheiten Enzym in 20 μl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Salzkonzentrationen wurden nach den Herstellerangaben mit den entsprechenden Restriktionsenzym-puffern des gleichen Herstellers eingestellt. Die Inkubation erfolgte für zumindest zwei Stunden, bei einer Linearisierung auch über Nacht, bei 37°C. Im Anschluss konnte die Vollständigkeit des Verdaus auf einem Agarosegel gegen das ungeschnittene Plasmid geprüft werden.

2.2.4.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

500 ng Plasmid-DNA bzw. 10 - 15 μl des Ligationsansatzes wurden zu 100 μl , auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien gegeben und für 30 Minuten auf Eis

inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für exakt 90 Sekunden auf 42°C erwärmt und direkt wieder für 2 Minuten auf Eis plaziert, bevor nach Zugabe von 1 ml LB-Medium die Inkubation der Bakteriensuspension für 1 - 1,5 Stunden bei 37°C erfolgte. Die Bakterien wurden dann durch Zentrifugation (5000 rpm, 5 min) sedimentiert, 800 µl des Überstandes verworfen, das Bakterienpellet in den verbleibenden 100 µl Medium resuspendiert und der gesamte Transformationsansatz auf einer Selektions-Agarplatte ausgestrichen. Man lässt die Bakteriensuspension auf den Platten eintrocknen, bevor man diese 12 - 16 h bei 37°C inkubiert.

Alternativ konnte zur Zeitersparnis die gesamte Bakteriensuspension nach 1 - 1,5 Stunden bei 37°C direkt zu 200 ml LB-Amp-Medium gegeben werden und diese als Übernachtkultur bei 37°C inkubiert werden, um im Anschluss eine Maxipräparation durchzuführen.

2.2.4.3 Subklonierung von PCR Produkten mit dem TOPO Cloning Kit (Invitrogen)

Das TOPO-Klonierungssystem bewirkt aufgrund einer schnellen, einstufigen Klonierungsstrategie die Möglichkeit der direkten Insertion von *Taq* Polymerase-amplifizierten PCR-Produkten in einen Plasmidvektor.

Es beruht auf einer Template unabhängigen Aktivität der thermostabilen *Taq* Polymerase während PCR Reaktionen. Diese heftet an alle 3' Enden von doppelsträngiger DNA ein zusätzliches Desoxyadenosin (A). Diese A-Überhänge werden benutzt um PCR Produkte in einen speziell konstruierten pCR™II TOPO Vektor, mit einzelnen 3' Desoxythymidin (T) Überhängen, zu ligieren. In dem TOPO Cloning Kit waren zusätzlich kompetente Bakterien (TOP10F' One Shot Cells), SOC-Medium und β-Mercaptoethanol für die Transformation enthalten.

Diese Subklonierungsmethode wurde für sämtliche der klonierten Gene verwendet.

0,5 - 2 µl (10 ng/µl) PCR-Produkt mit einer durchschnittlichen Insertlänge von 400 - 1000 bp können für die Ligation eingesetzt werden.

Die Konzentration an PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese, durch Abschätzung und Vergleich mit Markern definierter Menge, ermittelt. Die Ligation wurde wie folgt angesetzt:

frisches PCR-Produkt	0,5 - 2 µl
mit sterilem Wasser auffüllen bis zu	4 µl
pCR TOPO Vektor	1 µl

Nach gründlichem, vorsichtigen Hoch- und Runterpipettieren, erfolgte die Ligation innerhalb von 5 Minuten bei RT, so dass im Anschluss direkt mit der Transformation nach Vorschrift des TOPO Klonierungssystems begonnen werden konnte.

2.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation der cDNA wurden 100 bzw 200 ng cDNA mit 2,5 µl 2 mM NTP's 2,5 µl 10 x PCR-Puffer, 0,2 µl thermostabiler DNA-Polymerase (*Taq*) und jeweils 10 pmol Primern in einem Gesamtvolumen von 25 µl gemischt und in einen Thermocycler eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen der Zyklen richtete sich jeweils nach der Länge und der Abundanz des zu amplifizierenden DNA-Fragments, sowie der Schmelztemperatur (T_m für „melting temperature“) der Amplifikationsprimer und waren empirisch ermittelt. Normalerweise wurde zuerst 1 Minute bei 95°C denaturiert und anschließend mit der in der Regel 39maligen Wiederholung der folgenden Zyklen begonnen: zuerst wurde 30 Sekunden bei 95°C denaturiert, anschließend für 30 Sekunden oder 1 Minute bei einer bestimmten Temperatur hybridisiert, die 2-3°C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur der Amplifikationsprimer (siehe unten) lag und schließlich bei 72°C 30 Sekunden oder 1 Minute synthetisiert. Als Anhaltspunkt zur Berechnung der Schmelztemperatur von Amplifikationsprimern gilt folgende Gleichung:

$$T_m = 20 \cdot (4 \cdot G/C + 2 \cdot A/T) \cdot n^{-1}$$

wobei: G/C = Anzahl der hybridisierenden G/C-Basenpaare
A/T = Anzahl der hybridisierenden A/T-Basenpaare
n = Gesamtzahl der hybridisierenden Basenpaare

Die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) steigerte die Spezifität der PCR-Reaktion und ermöglichte somit eine spezifischere Amplifikation. DMSO ist eine denaturierend wirkende Chemikalie, die während der PCR-Reaktion die Hybridisierung der Primer erschwert und somit die Möglichkeit der unspezifischen Bindung verringert, was sonst nur durch die Erhöhung der Annealingtemperatur erfolgen kann. Somit können in einem PCR-Ansatz mehrere Hybridisierungsbedingungen angewendet werden.

2.2.5.1 DNA-Sequenz der Oligonukleotide und PCR-Bedingungen der klonierten Gene

FGF8b

for1 5'ATGGGCAGCCCCCGCTCCGCGCTGA 3'
rev4 5'GGGTAGTTGAGGAACTCGAAGCGC 3'
30'' 95°C, 1' 62 °C, 1' 72°C, 40x

nodal

for1

5'CAGAACTGGACITTCACITTTGACTT 3'

rev2

5'TAIGCATTGTACTGCTTIGGGTA 3'

30'' 95°C, 30'' 55°C, 1' 72°C, 40x

Pitx2

Kkkfor

5'GA(GT)GA(CT)CC(GC)TC(CT)AAGAAGAAG 3'

14asrev

5'TGCTT(GT)GCTTT(GC)AGTCTCAGG 3'

1' 95°C, 1' 60°C, 1' 72°C, 40x

shh

for1

5'CCCCAAAAGCTGACCCCTTTAGC 3'

rev2

5'GCCCAGCTGTGCTCCTCGATGAC 3'

30'' 95°C, 1' 60°C, 1' 72°C, 40x

HNF3B

for3

5'CCTACTCGTACATCTCGCTCATCAC 3'

rev2

5'GTTTCGTAGGCCTTGAGGTCCATTTT 3'

30'' 95°C, 1' 61°C, 1' 72°C, 40x

ptc

for2

5'TACATGGATCAGATAATAGAATA 3'

rev1

5'TTGGAGCAGTCCCAGCGCAGCATGG 3'

30'' 95°C, 1' 49°C, 1' 72°C, 40x

Snail

for2

5'CCTACGACCAGGCCACCTGCTGGC 3'

rev2

5'AGCAGCCAGGGCCTAGAGAAGGCCT 3'

30'' 95°C, 1' 67°C, 1' 72°C, 40x

NKx3.2

for3

5'TGGGGGGCGCCGAGGACTCTCT 3'

rev1

5'AGTAGGAGGGCTGCAGTGGCAGAAG 3'

30'' 95°C, 30'' 65°C, 30'' 72°C, 40x

act β B

for1 5'CGCCTCCTCCCGGGTCCGCCT 3'
rev3 5'AGCATGGACATGG(AT)GCTCAGCTTGG 3'
30'' 95°C, 1' 63°C, 1' 72°C, 40x

actRlla

for2 5' GGAAGATATTCTGGTTCCATTGA 3'
rev4 5' CATCTACAGGTCCATCTGCAGCAGT 3'
30'' 95°C, 1' 55°C, 1' 72°C, 40x

2.2.6 Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA nach der Didesoxymethode

Die zur Sequenzierung verwendete Plasmid-DNA (pCR II-TOPO-Vektor) wurde nach der Isolierung mit dem Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifikation System von Promega in 100 μ l sterilem Wasser aufgenommen und deren Konzentration mittels Spektroskopie bestimmt. Für jeden zu sequenzierenden Klon wurden zwei PCR-Reaktionen angesetzt, um die Sequenz von beiden Seiten mit den, für den TOPO-Vektor passenden, Primern M13 forward und M13 reverse lesen zu können. Für jede dieser beiden Reaktionen wurden wiederum vier PCR-Reaktionen angesetzt, von denen jede 2,5 μ l Terminationsmix, der aus 2 μ l dGTP Nukleotid Mastermix (7,5 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 0,5 μ l des entsprechenden [33 P]ddNTP ([33 P]ddATP, -ddGTP, -ddTTP, -ddCTP) besteht, enthielt. Jede dieser PCR-Reaktionsansätze enthielt somit 0,25 μ l des entsprechenden Primers (2 pmol), 0,5 μ l 10 x Reaktionspuffer, 3,75 μ l DNA (= 1 - 3 μ g), 0,5 μ l *Taq* Polymerase (4U/ μ l) und 2,5 μ l Terminationsmix.

Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler nach dem folgenden Programm:

30 sek	95°C
30 sek	55°C
1 min	72°C für 50 Zyklen

Anschließend wurde die Reaktion mit je 4 μ l Stop-Lösung ("SSB") abgestoppt und für 20 Minuten auf 80°C erhitzt, bevor sie auf ein denaturierendes 6%-iges Polyacrylamid-Harnstoff-Sequenziergel aufgetragen werden konnte. Der Gellauf erfolgte bei 1500 V und 120 mA in 1 x TBE-Puffer bis die Bromphenolblaubande den unteren Gelrand erreicht hatte. Nach Abkühlen und Trocknen des Gels erfolgte die Exponierung auf AMERSHAM-Hyperfilm-MP (24 - 48 h).

Stop Lösung: 95% Formamid, 20mM EDTA, 0,05% Bromphenol Blau, 0,05% Xylen Cyanol FF

6% Polyacrylamidgel:

Zur Auftrennung von, im Verlauf von Sequenzierreaktionen entstandenen, DNA-Fragmentgemischen, wurden denaturierende 6% Polyacrylamidgele verwendet. Um die DNA-Fragmente in denaturiertem Zustand zu halten, wurden Sequenzgele normalerweise mit einer hohen Harnstoffkonzentration (8M) hergestellt. Unter Verwendung einer Sequenzierapparatur der Firma BIO-RAD wurde die Elektrophorese bei einer hohen Leistung (100 W) durchgeführt, um die erforderliche Temperatur von 45 – 50°C aufrechtzuerhalten. Die Elektrophoresedauer richtete sich nach dem Ausmaß der gewünschten Sequenzinformation und betrug daher zwischen 1,5 und 4,5 Stunden. 150 ml einer Gellösung [6% (w/v) Acrylamid; 0,16% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 8 M Harnstoff in TBE pH 8,3] wurden mit 900 µl 10% (w/v) APS und 90 µl TEMED versetzt und nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei, durch 0,4 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen eines Taschenformers (Haifischkamm) erfolgte die Polymerisation des Gel in horizontaler Lage über Nacht. Am nächsten Morgen wurde das auspolymerisierte Gel in eine Vertikalgelapparatur eingespannt, oberes und unteres Pufferreservoir mit TBE gefüllt und der Taschenformer umgedreht. Nach einem 0,5 stündigen Vorlauf des Gels bei einer Leistung von 100 W konnten die Proben in die Taschen überführt werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten, nach Abkühlen des Gels auf RT, voneinander getrennt, das Gel auf 3MM Papier aufgezogen und für zwei Stunden bei 80°C im Wasserstrahlvakuum getrocknet, bevor das Gel auf einem AMERSHAM-Hyperfilm-MP bei RT über Nacht exponiert wurde.

2.2.7 Transkription von Nukleotidsequenzen

2.2.7.1 Erst-Strang-Synthese mit der SUPERSCRIPT II Rnase H⁰ Reversen Transkriptase (GIBCO)

Diese RT ermöglicht die Synthese von Erst-Strang-DNA, die im Anschluss mittels der PCR-Reaktion amplifiziert wird, aus RNA.

Dazu wurden 11 µl RNA (ca. 1,7 µg) mit 1 µl (50ng) random Primer gemischt, für 12 Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gesetzt. Nach der Zugabe der folgenden Komponenten

4 µl 5x Erst-Strang-Puffer

2 µl 0,1 M DTT

1 µl 10 mM dNTP Mix (10 nM je dATP, dGTP, dTTP und dCTP bei neutralem pH)

wurde die Reaktion für 10 Minuten bei RT stehen gelassen und anschließend für 2 Minuten auf 42°C erhitzt, bevor 1 µl (200 E) an SUPERSCRIPT II-RT durch vorsichtiges Hoch- und Herunterpipettieren zugegeben werden konnte. Anschließend wurde die Reaktion für 1 Stunde bei 42°C inkubiert, bevor die Reverse Transkriptase durch einen 15 minütigen 70°C-Schritt inaktiviert und damit die Reaktion gestoppt wurde.

2.2.7.2 Transkription von Plasmid-DNA

Die Transkription wurde wie folgt angesetzt:

Template (cDNA-Matrize)	X µl = 1 µg
DEPC-H ₂ O	bis 10 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
DIG-NTP	2 µl
5x Puffer	4 µl
Polymerase	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Dieser Ansatz wurde gevortext, kurz abzentrifugiert und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde dem Transkriptionsansatz folgendes zugesetzt:

DEPC-H ₂ O	6 µl
DIG-NTP	1 µl
5x Puffer	2 µl
Polymerase	1 µl
Gesamtvolumen	30 µl

Auch dieser Ansatz wurde gevortext, kurz abzentrifugiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die darauffolgende Fällung erfolgte durch die Zugabe von 1,5 µl 0,4 M EDTA, 3,75 µl 4M LiCl und 100 µl 100% EtOH für 10 Minuten auf -20 °C. Anschließend wurde die RNA abzentrifugiert (20 min, 13000 rpm, 4 °C), in 100µl 80% EtOH gewaschen und in 100 µl DEPC-H₂O 5 Minuten gelöst, bevor sie erneut mit 12,5 µl LiCl, und 250 µl 100% EtOH, für 10 Minuten bei -20 °C, gefällt wurde. Nachdem abzentrifugiert (20 min, 13000 rpm, 4 °C) und in 100 µl 80% EtOH gewaschen wurde, konnte die RNA in 25 µl DEPC-H₂O gelöst und deren Qualität und Menge (1 µl= 0,4 µg RNA) gelelektrophoretisch analysiert werden.

2.2.8 *In situ* Hybridisierung im Ganzpräparat

1.Tag:

In 100% Methanol aufbewahrte Embryonen wurden durch eine absteigende Methanol-Reihe (je 5 min 75%, 50%, 25% Methanol in PBS+0,1%Tween20 auf Eis rehydriert und anschließend dreimal für 5 Minuten in PBS+0,1%Tween20 gewaschen. Daraufhin wurden die Embryonen mit Proteinase K (10 µg/µl in PBS+0,1%Tween20) für 10 Minuten angedaut, um der Hybridisierungssonde den Zugang zum Zellinneren zu erleichtern und somit die Intensität der Färbung zu erhöhen. Dieser Verdau wurde durch die anschließende 5 minütige Inkubation in 2mg/ml Glycin in PBS+0,1%Tween20 beendet, da Glycin die Proteinase K vergiftet. Anschließend folgten drei weitere Waschschrte für 5 Minuten in PBS+0,1%Tween20, bevor die Embryonen in 4% Paraformaldehyd in PBS⁻, dem 0,2% Glutaraldehyd zugesetzt wurde für 15 bis 20 Minuten fixiert wurden. Nach weiteren drei Waschschrten (5 Minuten in PBS+0,1% Tween20) wurden die Embryonen schrittweise zuerst in 50% Hybridisierungslösung in PBS und schließlich in 100%ige Hybridisierungslösung überführt.

Die Hybridisierungslösung (50 ml) besteht aus folgenden Komponenten:

25 ml	Formamide
0,5 g	Boehringer Block
12,5 ml	20x SSC (pH7)
6 ml	H ₂ O
5 ml	10mg/ml Hefe-RNA
100 µl	50mg/ml Heparin
250 µl	20% Tween20
500 µl	10% Chaps
500 µl	0,5 M EDTA

Die anschließende Vorhybridisierung erfolgte für zwei bis drei Stunden bei 65°C in 900 µl Hybridisierungslösung und führte zur Denaturierung endogener Phosphatasen. Anschließend 1 µl Sonde (ca 20 ng Digoxigenin-markierte Gegenstrang-RNA) in 100 µl Hybridisierungsmix für 5 bis 10 Minuten bei 95°C denaturiert, sofort auf Eis plziert und darauf den restlichen 900 µl Hybridisierungslösung, in denen sich die Embryonen befanden zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 70°C.

2.Tag:

Am zweiten Tag wird die überschüssige Sonde herausgewaschen und die Embryonen auf die Antikörperbehandlung vorbereitet.

Die mit Sonde versetzte Hybridisierungslösung wird durch 800 µl frische Hybridisierungslösung ausgetauscht, in der die Embryonen für 5 Minuten bei 70°C gewaschen werden. Anschließend wird durch dreimaliges Zugeben von 400 µl 2x SSC (pH4,5) der pH-Wert schrittweise erhöht, um die Embryonen anschließend

für zweimal 30 Minuten in 2x SSC (pH7) bei 70°C zu waschen. Diesen folgen zwei Waschschrirte bei Raumtemperatur in Maleinsäure-Puffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7.5) für jeweils 10 Minuten, sowie zwei weitere für jeweils 30 Minuten bei 70°C. Die Embryonen werden daraufhin für dreimal 10 Minuten in PBS+0,1%Tween20 bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend für zwei Stunden bei 4°C im Blocking-Puffer (10% bei 65°C hitzeinaktiviertes Ziegenserum, 1% Boehringer Block in PBS+ 0,1% Tween20) vorinkubiert. Eine ebenso schon vorbereitete 10.000mal verdünnte Lösung des Dig-spezifischen Antikörpers im Blocking-Puffer wurde ebenfalls für zwei Stunden bei 4°C vorinkubiert und ersetzte anschließend den reinen Blockingpuffer. Die Antikörper-Reaktion erfolgte über Nacht bei 4°C.

3.Tag:

Um den nicht gebundenen Antikörper wieder zu entfernen, werden die Embryonen einmal kurz und anschließend 5 mal für 45 Minuten in 0,1% BSA in PBS+0,1% Tween20 bei Raumtemperatur auf einem Taumelrollenmischer gewaschen. Es folgen zwei weitere Waschschrirte für 30 Minuten in PBS+0,1% Tween20, bevor die Embryonen dreimal für 10 Minuten in AP1-Puffer (100mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die anschließende Zugabe von 1 ml BMPurple (BCIP/NBT) bewirkte aufgrund der dem Antikörper zugehörigen alkalischen Phosphatase in einer Übernachtsreaktion im Dunkeln die gewünschte Färbung. Diese wurde, um Hintergrundfärbung zu vermeiden, anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS⁻ abgestoppt. Das Überführen der Embryonen in Methanol verstärkte die Intensität der Färbung. Die Embryonen wurden schließlich in Glycerin überführt und bei 4°C gelagert.

2.2.9 Embryologische Methoden

2.2.9.1 Isolieren und Fixieren von Embryonen

Zu einem definierten Zeitpunkt besamte Kaninchen der Rasse Weißer Neuseeländer wurden 1 ml der Injektionslösung T61 in die Ohrvene injiziert, die innerhalb von 30 Sekunden den Tod durch Lähmung der Atemmuskulatur und herbeigeführten Kreislaufkollaps bewirkte. Dem Muttertier wurde daraufhin die Peritonealhöhle durch einen medialen Schnitt geöffnet, der gesamte Uterus entfernt und dieser sofort in PBS überführt. Anschließend erfolgte eine Vorfixierung für ca. 20-30 Minuten in 4% Paraformaldehyd in Ca²⁺ und Mg²⁺ - freien PBS (PBS⁻). Daraufhin wieder in PBS überführt, wurde der Uterus zwischen den einzelnen Embryonen durchtrennt und diese auf Eis aufbewahrt. Das weitere Isolieren der Embryonen erfolgte unter dem Binokular in PBS. Mit einer Schere wurde das Uterusgewebe gegenüber der Implantationsstelle aufgeschnitten und soweit entfernt, dass der Embryo, der mit dem Ektoderm nach unten der Uterusschleimhaut flach auflag, frei zugänglich war. Dieser wurde sodann

einschließlich eines gewissen Anteils von extraembryonalen Gewebe mit einer feinen Schere ringförmig vom restlichen extraembryonalen Gewebe getrennt. Die isolierten Embryonen wurden wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd in PBS⁻ fixiert, anschließend 3mal für 5 Minuten in PBS gewaschen und letztlich über eine aufsteigende Methanolreihe von 25%, 50% und 75% in 100% Methanol überführt. Die anschließende Lagerung der fixierten und dehydrierten Embryonen erfolgte bei -20°C.

2.2.9.2 *In vitro* Kultur

2.2.9.2.1 Vorbereitung der Agarosehügel

0,5% Agarose wurden in PBS gelöst, autoklaviert und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Kurz vor der Verwendung wurde die Agarose in der Mikrowelle verflüssigt und mit einer Pipette ein Volumen von 80 μ l in die Innenschale einer 3,5cm großen Petrischale überführt. Nach dem Antrocknen des ersten Tropfens wurde ein weiterer 30 μ l großer Tropfen möglichst flach darüber plaziert. Durch zwei getrennt übereinander plazierte Agarosetropfen konnte ein erhöhter, auf der Oberfläche jedoch weitgehend abgeflachter Agarosehügel geformt werden, der ein einfaches Positionieren des Embryos ermöglichen und ein Abrutschen desselben verhindern sollte. Dieser Agarosehügel wurde daraufhin mit F10-Medium, dem 20% FCS, 2% Glutamat und 2% Penicilin-Streptomycin zugesetzt wurden überdeckt und für weiteres im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Begasung aufbewahrt.

2.2.9.2.2 Isolieren der Kaninchenembryonen für die Kultur

Zu einem definierten Zeitpunkt besamte Kaninchen der Rasse Weißer Neuseeländer wurden, wie oben beschrieben, mittels Injektion von T61 getötet. Mit bei 250°C sterilisierten Instrumenten wurde dem Muttertier die Peritonealhöhle geöffnet, der Uterus entnommen und dieser sofort in PBS überführt. Mit einer Schere wurde der Uterus zwischen den einzelnen Embryonen durchtrennt und diese bis zur Präparation der Embryonen bei Raumtemperatur in 1% BSA in PBS aufbewahrt.

32.2.9.2.3 Vorbereiten der Protein-getränkten Acrylkugeln

Heparinisierte Acrylkugeln, die in einer Lösung von 0,15 M NaCl + 0,02% Thimerosal lagerten, wurden dreimal für 10 Minuten in PBS gewaschen und anschließend in PBS auf Eis oder bei 4°C aufbewahrt. Die lyophilisierten Proteine wurden entsprechend der gewünschten Konzentration in definierten Volumina an PBS/0,1%BSA gelöst und gleich darauf mit den gewaschenen heparinisierten Acrylkugeln versetzt. Die Acrylkugeln wurden dazu in eine Pipettenspitze überführt, in deren Spitze angesammelt und diese vorsichtig in die Proteinlösung

getaucht. Dadurch konnten die Acrylkugeln allein aufgrund ihres Gewichts in die Proteinlösung sinken. Auf diese Weise wurde eine Verdünnung der Proteinlösung durch die PBS-Lösung der Acrylkugeln weitgehend verhindert und die Konzentration des verwendeten Proteins gewährleistet.

Die mit Acrylkugeln versetzte Proteinlösung wurde für mindestens eine Stunde auf Eis oder bei 4°C aufbewahrt.

2.2.9.2.4 Plazieren des Embryos auf dem vorbereiteten Agarosehügel

Da sich die unfixierten Embryonen aufgrund der sie umgebenden Proteine als äußerst klebrig erwiesen, wurden diese in 1% BSA in PBS, unter dem Binokular wie unter "Isolieren und Fixieren von Embryonen", aus dem Uterus herauspräpariert. Der isolierte Embryo wurde daraufhin mit einer Pipette in das, den Agarosehügel enthaltene, vorinkubierte F10-Medium überführt. Mittels zwei sterilen Woframnadeln wurde der Embryo mit dem Ektoderm nach unten oberhalb des mit Medium bedeckten Agarosehügel orientiert und durch das vorsichtige Abziehen des Mediums mit einer fein ausgezogenen Pipette auf dem Hügel abgesenkt und plaziert. Dabei soll das Medium das den Embryo umgebende extraembryonale Gewebe gerade berühren, um eine Benetzung des Embryos zu garantieren. Der Flüssigkeitsstand musste jedoch niedrig genug sein, um ein Abschwimmen des Embryos zu verhindern, das in jedem Fall eine Deformation des Embryos nach sich gezogen hätte. Der auf dem Agarosehügel plazierte Embryo wurde bis zur Beendigung der Präparation sämtlicher Embryonen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Begasung vorinkubiert.

2.2.9.2.5 Implantation der Substanz-getränkten Acrylkugel im Embryo

Dem bereits vorinkubierten Embryo wurde, mittels einem unter der Flamme zugespitzten Wolframdraht, eine kleine Öffnung in das dem Primitivknoten benachbarte Endoderm geritzt. Die zu plazierende Kugel wurde daraufhin in wenig Volumen mit einer sehr fein ausgezogenen Glaspipette aufgenommen und in deren Spitze absenken gelassen. Durch das vorsichtige Berühren der vorbereiteten Implantationsstelle mit der die Acrylkugel beinhalteten Pipettenspitze, konnte die Kugel ohne Flüssigkeitstropfen auf den Embryo gesetzt werden. Mithilfe feiner Wolframnadeln wurde die Kugel anschließend in die vorbereitete Implantationsstelle, zwischen Ekto- und Endoderm, im Mesoderm plaziert. Nach erneutem Prüfen des Flüssigkeitsstandes wurde der Embryo bis zum Erreichen des 3 bis 6 Somitenstadiums bei 37°C und 5% CO₂-Begasung inkubiert.

2.2.9.2.6 Fixieren der Kulturembryonen

Nach Beendigung der Kultur wurde das den Embryo umgebende Medium mit einer feinen Pipette abgezogen, kurz mit PBS nachgespült und die Petrischale erneut vorsichtig mit 4% PFA in PBS⁻ gefüllt, bis der Embryo vom Agarosehügel

abschwamm. Die darauffolgende Fixierung des Embryos erfolgte innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Durch das Schwimmen der Embryonalscheibe auf der PFA-Lösung, während des gesamten Fixierungsvorganges, versteifte sich der Embryo in seiner flachen Scheibenform und war während der folgenden *in situ* Hybridisierung einfacher zu handhaben. Nach dem Fixierungsvorgang wurden die Embryonen dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen und über eine aufsteigende Methanolreihe, von 25, 50, 75, 100% Methanol in PBS⁻, in Methanol überführt. Bis zur anschließenden *in situ* Hybridisierung erfolgte die Lagerung der fixierten und dehydrierten Embryonen bei -20°C.

2.2.9.2.7 Vorbereiten und Plazieren von SU5402

Das lyophilisierte SU5402 wurde auf eine Konzentration von 1mg/ml (3,37 mM) in DMSO gelöst und als 50µl-Aliquote bei -20°C aufbewahrt. Das Ansetzen der Lösung erfolgte, aufgrund der Lichtempfindlichkeit des SU5402, in einem abgedunkelten Raum. Zur Lagerung wurden die Aliquote mit Alufolie eingewickelt. Zum Plazieren der Inhibitorsubstanz wurden stark basische Anionen-Austauscher-Gelkugeln (AG1-X2, BIO-RAD) verwendet. Diese wurden kurz vor ihrem Einsatz dreimal für je 10 Minuten in PBS gewaschen und bis auf weiteres in PBS auf Eis aufbewahrt. Die Gelkugeln wurden nach dem abgedunkelten Auftauen eines Aliquots wie unter "Vorbereiten der Protein-getränkten Acrylkugeln" beschrieben, unter abgedunkelten Lichtverhältnissen, in die SU5402/DMSO-Lösung überführt und diese für mindestens eine Stunde auf 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Vor dem Plazieren der SU5402-getränkten Acrylkugel musste diese kurz in einer PBS-Lösung von DMSO freigewaschen werden und konnte dann mithilfe einer fein ausgezogenen Glaspipette auf dem Embryo wie unter "Implantation der Substanz-getränkten Acrylkugel im Embryo" beschrieben aufgebracht werden.

2.2.9.3 Einbetten und Anfertigung von histologischen Schnitten

Das Einbettmedium setzte sich zusammen aus 2,2 g Gelatine, 135 g Rinder-Albumin und 90g Saccharose, die in 450 ml PBS gelöst wurden. Deswegen mussten die zu schneidenden Embryonen zunächst aus 100% Methanol oder Glycerin wieder in PBS überführt werden, um anschließend im Einbettmedium equilibriert zu werden. Das vollständige Absinken des Embryos im Einbettmedium garantierte die erfolgte Equilibrierung. Mithilfe von zwei auf einer Glasplatte angeordneten Winkeln wurde eine würfelförmige Einbettform gebildet. Zur Bildung des Bodens wurden 2 ml Einbettmedium mit 140 µl Glutaraldehyd versetzt, kurz gevortext und sofort in die Form gegossen. Innerhalb weniger Sekunden war der Boden verfestigt und der zuvor equilibrierte Embryo wurde auf diesem ausgerichtet. Das Entfernen von überschüssigem Einbettmedium ließ den Embryo am Boden festkleben, so dass seine Orientierung gesichert blieb. Der Embryo konnte daraufhin durch weitere 2 ml Einbettmedium, denen ebenso 140 µl

Glutaraldehyd zugesetzt wurde, eingedeckt werden. Der nun entstandene Gelatine-Albumin-Würfel wurde mit einem Skalpell zurechtgestutzt, so dass der Embryo die gewünschte Ausrichtung erfuhr und anschließend mit Sekundenkeber auf der Halterung des Vibratoms parallel zum Messer befestigt werden konnte. Mithilfe des Vibratoms VT 1000 S (Leica) wurden 30µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträgern angeordnet und mit dem Eindeckmittel Shandon Immu-Mount eingedeckelt.

3. Ergebnisse

3.1 Links-Rechts-Markergene im Kaninchenembryo

Zur Klonierung von Gen-Sonden wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt. Die Expression wurde in Kaninchenembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien mithilfe von Digoxigenin-markierten Sonden durch eine nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung im Ganzpräparat ermittelt.

3.1.1 Expression der Gene *fgf8* und *shh* im Kaninchen

3.1.1.1 Klonierung und Expressionsanalyse des FGF-Signalmoleküls *fgf8* im Kaninchenembryo

Im Huhn wird *fgf8* vom Stadiums 6 bis hin zum 4 Somitenstadium asymmetrisch auf der rechten Seite des Primitivknotens exprimiert (Boettger et al., 1999). In der Maus hingegen findet sich nur eine symmetrische Transkription (Crossley und Martin, 1995). Das *fgf8*-Gen besteht aus drei Exons, von denen der codierende Teil des Exons 1 wiederum in drei variable Exons unterteilt ist, die als Exon 1a, 1b und 1c bezeichnet werden (Crossley und Martin, 1995). Unterschiedlicher Gebrauch dieser drei Exons, sowie der unterschiedliche Gebrauch von Spleißdonor und Spleißakzeptorstellen innerhalb dieser 3 Exons führen zu mindestens 7 bekannten Isoformen des *fgf8*-Gens (Crossley und Martin, 1995; MacArthur et al., 1995).

3.1.1.1.1 Klonierung von *fgf8b* im Kaninchen

Der Vergleich bekannter cDNA-Sequenzen von Mensch und Huhn mit der genomischen DNA der Maus führte zur Konstruktion von 9 Oligonukleotiden, die zur jeweiligen Region von Mensch und Maus 100-prozentig identisch waren und die speziell die am weitesten verbreitete Isoform 8b und die Isoform 8f erkennen konnten. Unter Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion wurden 14 Primerkombinationen auf cDNA von E9 Kaninchenembryonen als Matrize getestet.

Dabei wurden für jedes Primerpaar Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert. Nach Klonierung und anschließender Sequenzierung unterschiedlicher Fragmente konnten zwei Isoformen eindeutig bestimmt werden, Isoform 8b und Isoform 8f.

Die Isoform 8b ist während der Embryonalentwicklung von Maus und Mensch die vorherrschende, der sich zeitlich sowie räumlich in ihrem Expressionsmuster nicht zu unterscheidenden Isoformen (Crossley und Martin, 1995). Da auch im Kaninchen durchgeführte *in situ* Hybridisierungen mit beiden Isoformen keine Unterschiede zeigten, wurde die Isoform 8f nicht weiter untersucht.

Das klonierte *fgf8b*-Fragment besaß eine Länge von 590 bp und umfasste einen Teil der nichtcodierenden Region von Exon 1, den N-terminalen Teil von Exon 1a, den gesamten Teil des Exon 1c und Exon 2, sowie einen Teil von Exon 3. Der aminoterminalen Teil von 1c, Exon 2 und der N-terminale Teil von Exon 3 umfassten die in allen FGF-Familienmitgliedern konservierte Aminosäureregion (Abb.9, unterstrichene Aminosäuresequenz).

3.1.1.1.2 Symmetrische Expression von *fgf8* im Bereich des Primitivknotens

Untersucht wurden sämtliche Entwicklungsstadien vom Stadium 4b bis hin zum 7 Somitenstadium (siehe Abb.2).

Das Stadium 4b ist gekennzeichnet durch die Ausbildung des Primitivknotens am anterioren Ende des Primitivstreifens (Abb.2). Dieser entwickelte sich ausgehend von einer runden Verdickung des bis dahin einschichtigen Embryos, dem Epiblasten. Diese als posteriorer Knoten bezeichnete Struktur liegt im posterioren Abschnitt des Kaninchenembryos und entsteht im Stadium 3a aufgrund des Eindringens von einzelnen Epiblastenzellen, die sich aus dem epithelialen Verband gelöst haben (Abb.2). Durch das Heranwandern weiterer Epiblastenzellen aus den lateralen Regionen des Embryos wird der Primitivstreifen mit zusätzlichen Zellen versorgt, woraus seine weitere Verlängerung bis hin zur längsten Ausdehnung im Stadium 4a resultiert (Abb.2). Am anterioren Ende des Primitivstreifens differenziert sich schließlich der Primitivknoten als lokale Verdickung (Abb.2). In diesem Entwicklungsstadium wurde *fgf8* nur im posterioren Drittel des Primitivstreifens (Abb.3, A), und zwar hauptsächlich in den Ektodermzellen (nicht gezeigt) exprimiert.

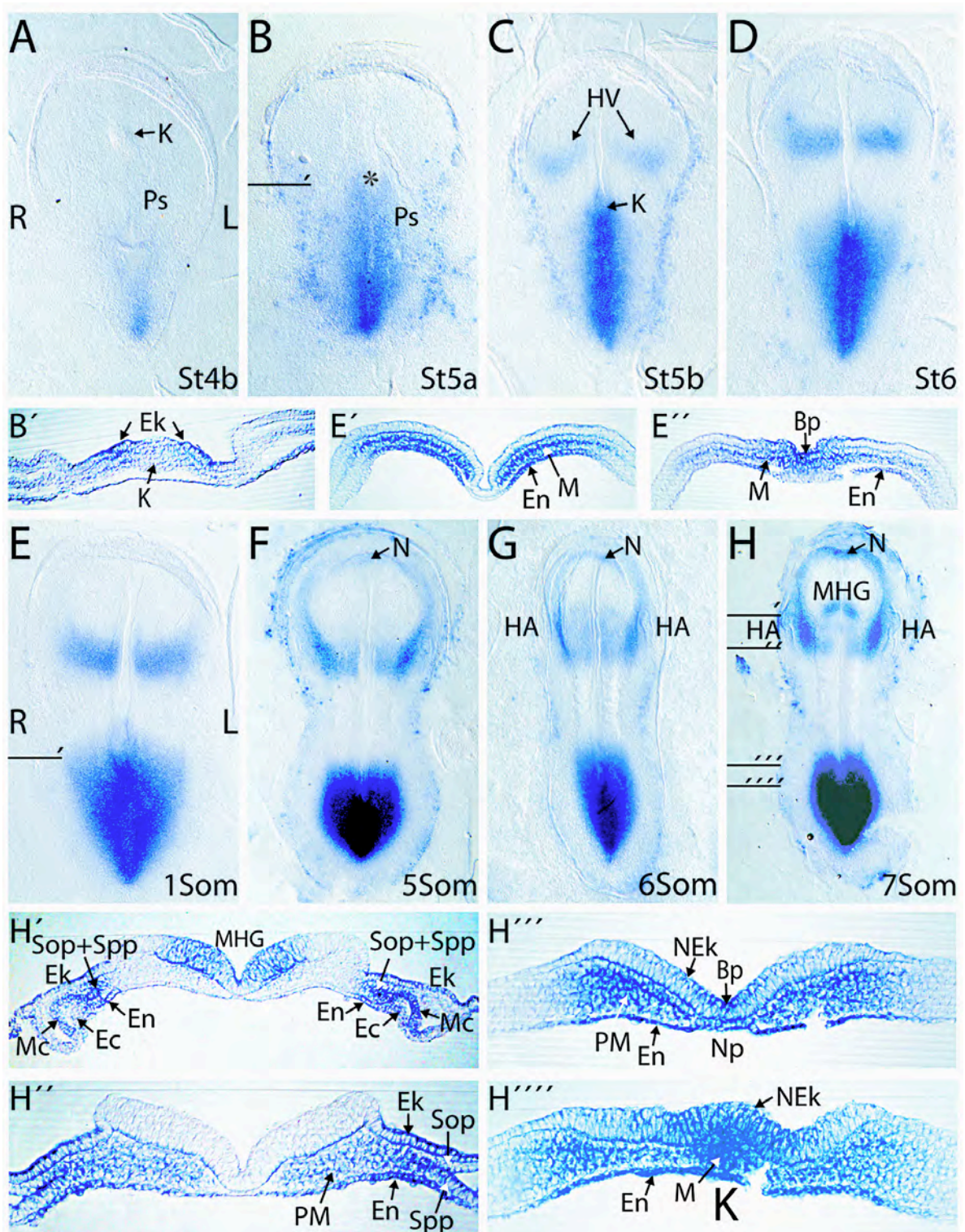


Abb. 3 Expressionsanalyse von *fgf8* in Wildtyp-Kaninchenembryonen nach *in situ* Hybridisierung

(A) Die *fgf8*-Expression im Stadium 4b war auf den posterioren Teil des Primitivstreifens (Ps) begrenzt und fand sich vom Stadium 5a (B-H) an im gesamten Primitivstreifen, sowie ab Stadium 6 (D-H, E'') im naszierenden Mesoderm (M). Die Expression um den Primitivknoten (K) war in jedem Stadium symmetrisch (Stern in B, B', H''''') und fand sich auch anterior vom Primitivknoten in allen drei Keimschichten (E'', H''').

(C-E, E') *fgf8*-mRNA-Lokalisation in den Herzvorläuferzellen (HV), bzw. (F-H, H') in beiden Herzanlagen (HA).

(F-H) Vom 5 Somitenstadium fand sich *fgf8*-mRNA in einem schmalen Band der anterioren Neuralplatte (N).

(H, H') Ab dem 7 Somitenstadium wurde *fgf8* in der Mittelhirn-Hinterhirngrenze (MHG) exprimiert. (H', H'') Schnitte in Höhe der bilateralen Herzanlage zeigen die Expression in Endo- (Ec) und Myocardium (Mc), Somatopleura (Sop) und Splanchnopleura (Spp), sowie dem darüberliegenden epidermalen Ektoderm (Ek) und dem darunterliegenden Endoderm (En). Zusätzlich fand sich *fgf8*-mRNA in einem schmalen Band des anterioren paraxialen Mesoderms.

(H''') Expression anterior des Primitivknotens in der Notochordplatte (Np), der darüberliegenden Bodenplatte (Bp), sowie lateral davon im Neuroektoderm (NEk), dem paraxialen Mesoderm (PM) und den Endodermzellen (En).

(H''''') Transversalschnitt durch den Primitivknoten zeigt die Expression im dortigen Mesoderm (M), Neuroektoderm (NEk) und Endoderm (En).

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an.

Im darauffolgenden Stadium 5a verlassen die ersten meso- und endodermalen Zellen den Primitivknoten in anteriorer Richtung und schieben sich als loser Zellstrang unter das Neuroektoderm, um den Kopffortsatz zu bilden (Abb.2). *fgf8*-Transkripte fanden sich von nun an im gesamten Primitivstreifen, aber verstärkt wiederum im posterioren Drittel desselben (Abb.3, B). Im Primitivknoten selbst ("*" in Abb.3, B) war *fgf8* nicht aktiv, jedoch fanden sich *fgf8*-exprimierende Zellen links und rechts davon (Abb.3, B). In transversalen Schnitten des Stadiums 5a im Bereich des Primitivknotens wurde die symmetrische Verteilung von *fgf8*-mRNA zu beiden Seiten des Primitivknotens, im an den Primitivknotenbereich angrenzenden Ektoderm, deutlich (Abb.3, B').

Im Stadium 5b verschmelzen die Zellen des Kopffortsatzes mit dem darunterliegenden Endoderm und formen einen flachen Streifen, die Notochordplatte. Signale der Notochordplattenzellen bewirken in den darüberliegenden Epiblastenzellen eine Verdickung, die sich fortan als Neuroektoderm vom restlichen epidermalen Ektoderm abgrenzt (Abb.2). Die exakt der Notochordplatte übergeordnete Region wird als Bodenplatte bezeichnet. *fgf8*-mRNA war von nun an uniform über den gesamten Primitivstreifen verteilt (Abb.3, C) und auch im Bereich des Primitivknotens in allen drei Keimschichten detektierbar (Abb.3, C und nicht gezeigt).

Im darauffolgenden Stadium 6 verlängert sich die Notochordplatte aufgrund des ständigen Zutritts von Zellen aus dem weiterhin proliferierenden Primitivknoten, sowie der Zurückwanderung des Primitivknotens (Abb.2). Bereits mit Beginn der Bildung des Primitivstreifens durchwandern die ersten Epiblastenzellen diesen und

differenzieren sich zu Endoderm und dem zwischen Endo- und Ektoderm angesiedelten Mesoderm. Obwohl damit im Stadium 6 bereits der gesamte Embryo mit Mesoderm und definitivem Endoderm unterlegt ist, fand sich in diesem Stadium erstmals eine Expression im naszierenden Mesoderm, sowie den darunterliegenden Endodermzellen. Die Expression beschränkte sich jedoch nicht nur auf die seitlich auswandernden Zellen, sondern war auch anterior des Primitivknotens detektierbar. Damit war nicht nur der gesamte Knotenbereich (Abb.3, H'''''), sondern ebenfalls der posteriore Teil von Notochord- und Bodenplatte, sowie das angrenzende Neuroektoderm, paraxiale Mesoderm und das darunterliegende Endoderm für *fgf8*-mRNA positiv (Abb.3, E'',H'''). Dieses Expressionsmuster blieb in allen untersuchten Somitenstadien bestehen (Abb.3, D-H).

3.1.1.1.3 Expression von *fgf8* in der Herzanlage, der anterioren Neuralplatte und der Mittelhirn-Hinterhirn-Anlage

Von Stadium 5b an erschien eine weitere *fgf8*-Expressionsdomäne im anterioren Teil des Kaninchenembryos (Abb.3, C). *fgf8*-mRNA fand sich hier bilateral-symmetrisch in zwei sichelförmigen Domänen links und rechts der axialen Mittellinie, die von Notochord- und Bodenplatte gebildet wird. Die Analyse von transversalen Schnitten zeigte die Lokalisation von *fgf8*-exprimierenden Zellen im Mesoderm, sowie den im engen Kontakt dazu stehenden Endodermzellen (Abb.3, E'). Diese *fgf8*-exprimierenden Zellen beinhalten Vorläufer des Herzens und der damit verbundenen Gefäße.

Parallel zur Bildung der ersten Somiten entsteht innerhalb einer hufeisenförmigen Region, die das unter der Neuralplatte befindliche Kopfmesenchym anterior sowie lateral umgrenzt, die kardiogene Zone im splanchnischen Mesoderm (Abb.2). Das splanchnische Mesoderm bildet den unteren Teil des zweigeteilten und epithelial um die Zölohmöhle angeordneten Seitenplattenmesoderms. In dem seitlich des Kopfmesenchyms gelegenen Teil dieses splanchnischen Mesoderms beginnt aufgrund induktiver Signale aus dem darunterliegenden Endoderm die Ausbildung der Herzanlage. Dabei differenzieren sich aus dem splanchnischen Mesoderm das Endocardium, sowie das darüberliegende Myocardium und es kommt zum Zeitpunkt des 5 Somitenstadiums zur Bildung von zwei isolierten gefäßartigen

Röhren, den endocardialen Röhren. Diese fusionieren in späteren Somitenstadien im ventralen Teil des Embryos zur unpaaren Herzröhre.

fgf8, das auch während dieses Differenzierungsprozesses weiterhin in den Herzvorläuferzellen exprimiert wurde, fand sich schließlich in beiden Herzanlagen im 6 bis 7 Somitenstadium (Abb. 3, H). Im Schnitt wurde die Verteilung von *fgf8*-mRNA sowohl im Myo- als auch im Endocard, sowie verstärkt in der angrenzenden Somato- und Splanchnopleura, aus dem sich im Laufe der weiteren Entwicklung die dorsale Aorta bildet, sichtbar (Abb.3, H'). In diesen Somitenstadien blieb zudem die Expression im paraxialen Mesoderm zwischen bilateral angeordneter Herzanlage und der Mittellinie bestehen. Dieses ist mesenchymal ausgeprägt und kann somit dem Kopfmesenchym zugeordnet werden (Abb.3, H''). Das der Herzregion übergeordnete Ektoderm, sowie das gesamte unter der Herzanlage und dem paraxialen Mesoderm liegende Endoderm exprimierte ebenfalls *fgf8* (Abb.3, H', H'').

Vom 5 Somitenstadium an wurde *fgf8* auch im anterioren Rand der Neuralplatte, dessen Zellen das spätere Vorderhirn bilden und ab dem 7 Somitenstadium in der sogenannten Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze exprimiert. Transversale Vibratome-Schnitte zeigten, dass diese Expressionsdomäne keine Zellen der Bodenplatte miteinschloss. (Abb.3, H').

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die *fgf8*-Expression im Kaninchen von dem im Mausembryo beschriebenen Expressionsmuster nicht wesentlich unterscheidet. Insbesondere konnten zu keinem Zeitpunkt asymmetrische Signale detektiert werden.

3.1.1.2 Expressionsanalyse des Signalmoleküls *sonic hedgehog (shh)* im Kaninchenembryo

Im Huhn wird *shh*, vom Stadium 4+ an, asymmetrisch auf der linken Seite des Primitivknotens exprimiert (Levin et al., 1995). In der Maus hingegen ist die Expression im Bereich des Primitivknotens stets symmetrisch (Collignon et al., 1996; Sampath et al., 1997; Schilling et al., 1999).

Der *shh*-Locus besteht insgesamt aus drei Exons (Echelard, 1993).

Ein 1015 bp großes *shh*-Fragment wurde schon während meiner Diplomarbeit mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert und anschließend kloniert (Fischer, 1999). Die weitere Charakterisierung zeigte, dass die Sequenz den C-terminalen Teil von Exon 1, das ganze Exon 2, sowie einen Teil von Exon 3 und somit fast den gesamten Bereich der hochkonservierten N-terminalen Domäne der hedgehog-Proteine umfasste (Abb.9).

3.1.1.2.1 Symmetrische Expression von *shh*

Analysiert wurde die Expression in Kaninchenembryonen der Stadien 4b bishin zum 5 Somitenstadium (siehe Abb. 2)

Die Expression von *shh* konnte erstmals im Stadium 5a beobachtet werden. *shh*-exprimierende Zellen erstreckten sich in diesem Stadium vom Primitivknotenmesoderm bis in die aus dem Primitivknoten ausgewanderten mesodermalen Zellen des Kopffortsatzes und fanden sich auch anterior davon im Prächordalplattenmesoderm (Abb.4, A). Die Zellen des prächordalen Mesoderms verließen den Primitivknoten noch vor den mesodermalen Zellen des Kopffortsatzes und positionierten sich als loser Zellverband anterior davon. Die dem axialen Mesoderm, bestehend aus Kopffortsatz und prächordalem Mesoderm, übergeordneten Bodenplattenzellen transkribierten *shh* ebenso. Dieses Expressionsmuster blieb in allen analysierten Stadien erhalten (Abb.4, A-F).

Transversale Vibratomschnitte im Bereich des Primitivknotens zeigten die Expression von *shh* im Mesoderm, sowie eine ebenso starke Expression im darunterliegenden Endoderm (Abb.4, B´´). Die Expression im Primitivknoten erschien in allen daraufhin untersuchten Stadien stets symmetrisch (Abb.4, B´´, E´´). Schnitte durch die von Notochordplatte und Bodenplatte gebildete Mittellinie wiesen auf eine hohe Konzentration von *shh*-mRNA in den Notochordplattenzellen, sowie eine schwächere Konzentration in den Bodenplattenzellen hin (Abb.4, B´). Diese Verteilung war in allen Stadien zu beobachten (Abb.4, B´, E´).

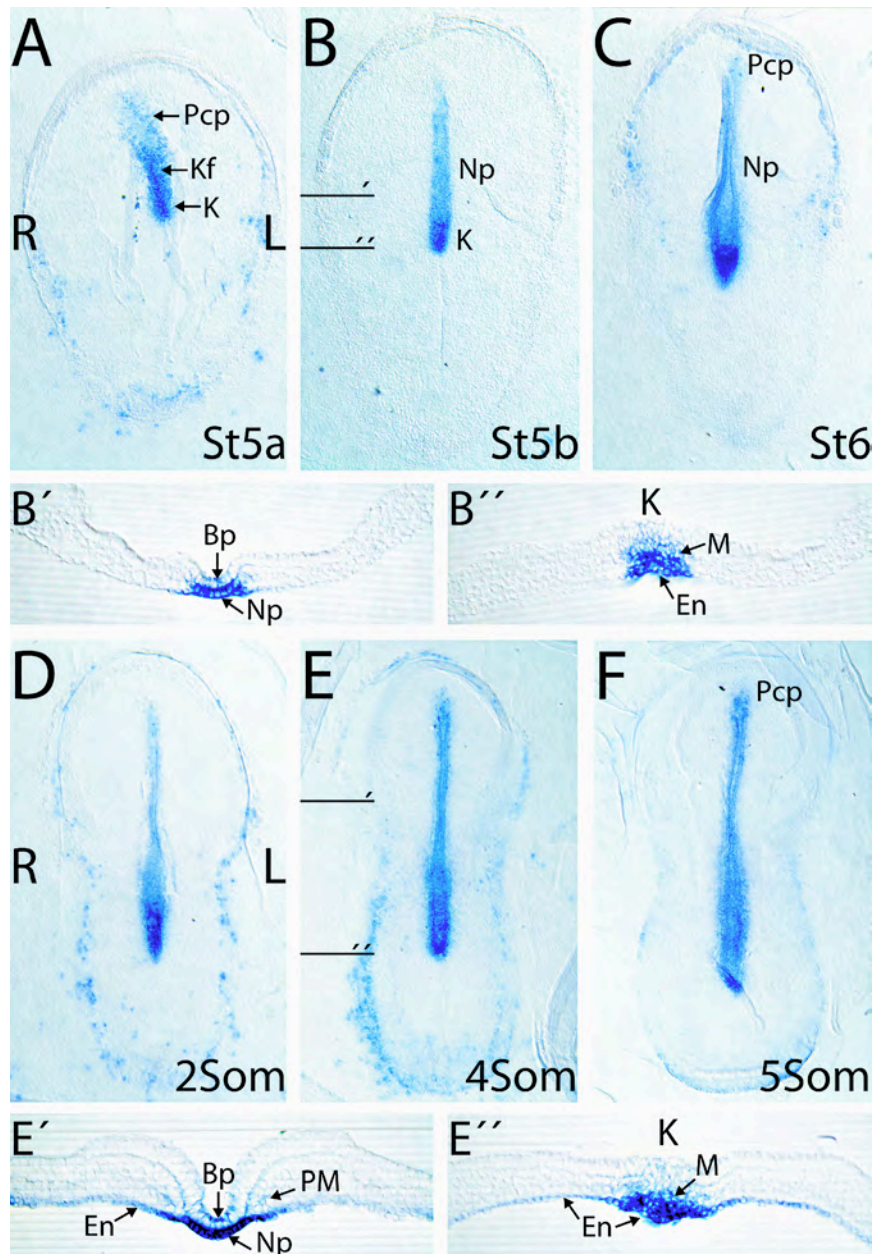


Abb. 4 Expressionsanalyse von *shh* in Wildtyp-Kaninchenembryonen nach *in situ* Hybridisierung

(A) Expression von *shh* im Stadium 5a im Primitivknoten (K), dem daraus auswandernden Mesoderm des Kopffortsatzes (Kf), sowie der Prächordalplatte (Pcp).

(B-F) Konstantes Expressionsmuster mit *shh*-mRNA in Primitivknoten (K) (B'', E''), Notochordplatte (Np), sowie vorgelagerter Prächordalplatte (Pcp) und der darüber angeordneten Bodenplatte (Bp) (B', E').

Die Expression im Primitivknoten war in jedem Stadium symmetrisch (B'', E''). In den Somitenstadien wurde *shh* zudem im Endoderm (En) und in einigen Zellen des paraxialen Mesoderms (PM) exprimiert (E', E'').

(B'', E'') Transversalschnitte durch den Knoten zeigen Expression im Knotenmesoderm (M) und dem darunterliegenden Endoderm (En), das sich im Somitenstadium (E'') auf das gesamte Endoderm (En) ausbreitete.

(B', E') Transversalschnitte durch die Mittellinie zeigen starke Expression in der Notochordplatte (Np) und schwächere in der darüberliegenden Bodenplatte (Bp). (E') Zusätzliche Expression im paraxialen Mesoderm (PM) und dem gesamten Endoderm (En).

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an.

In transversalen Vibratonschnitten der Somitenstadien wurde auch im gesamten Endoderm eine Expression von *shh* deutlich, das in den Vorsomitenstadien keine *shh*-Aktivität aufwies (Vergleiche E´, E´´ mit B´, B´´). Ebenso zeigten Schnitte durch den Primitivknoten dieser Stadien eine im Vergleich zu den Mesodermzellen sehr starke Aktivität der Primitivknoten-Endodermzellen (Abb.4, E´´).

In den Somitenstadien verbreiterte sich die Mittellinienexpression, da zusätzlich zu den Endodermzellen auch einige angrenzende Zellen des paraxialen Mesoderms, die den stark *shh*-transkribierenden Zellen der Notochordplatte anliegen, *shh* exprimierten (Abb.4, E´).

shh wurde somit, ebenso wie *fgf8*, im Bereich des Primitivknotens des Kaninchenembryos ausschließlich symmetrisch exprimiert.

3.1.2 Die konservierte Expression von *nodal*, *Pitx2* und *lefty*

3.1.2.1 Klonierung und Expressionsanalyse des TGF β -Signalmoleküls *nodal* im Kaninchenembryo

Nodal ist ein Mitglied der TGF β -Superfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren, deren Mitglieder von der Zelle sekretiert werden und als Signalmoleküle wirken. Die C-terminale Region des Proteins, welche innerhalb der TGF β -Familie hoch konserviert ist, umfasst die reife Form des Proteins, die nach Abspaltung der Signalsequenz aus dem Vorläuferprotein entsteht. Der *nodal*-Locus selbst besteht aus drei Exons.

nodal-Gene werden in allen bisher untersuchten Wirbeltieren, wie Maus, Huhn, *Xenopus* und Zebrafisch, asymmetrisch im linken Seitenplattenmesoderm der frühen Somitenstadien exprimiert. Zudem existiert eine *nodal*-Expressionsdomäne im Bereich des Primitivknotens, die linksseitig asymmetrisch beim Huhn, sowie bilateral in Maus, *Xenopus* und Zebrafisch ausgeprägt ist (Levin et al. 1995; Collignon et al. 1996; Lowe et al. 1996, Lustig et al., 1996; Rebagliati et al. 1998a; Sampath et al. 1998).

3.1.2.1.1 Klonierung von *nodal* im Kaninchen

Basierend auf einem Nukleotidsequenzvergleich von *nodal* in Mensch, Maus und *Xenopus* wurden 10 Oligonukleotide entworfen, die als Primer für die PCR eingesetzt werden konnten. Da selbst zwischen Maus und Mensch keine durchgängig 100-prozentig homologen Regionen zu finden waren, wurden degenerierte Oligonukleotide verwendet, die die jeweiligen Sequenzunterschiede entsprechend berücksichtigten.

In einer Versuchsreihe wurden 19 Primerkombinationen jeweils auf cDNA von 9 Tage alten (E9) Kaninchenembryonen, sowie zusätzlich auf genomischer DNA als Matrize getestet, da *nodal* in anderen Wirbeltierarten nur bis zum Tag E8 aktiv zu sein schien. Dabei konnten, wie erwartet, nur mit Hilfe der genomischen DNA drei Fragmente in der zu erwartenden Größe amplifiziert werden. Somit schien eine *nodal*-Transkription im E9 Kaninchenembryo (was ca. dem 12 bis 16 Somitenstadium entsprach) unwahrscheinlich.

Klonierung und Sequenzierung ergaben ein ca. 630 bp großes Fragment, das einen Großteil von Exon 2 des *nodal*-Locus umfasste und daher als Kaninchenhomolog zu *nodal* betrachtet werden konnte (Abb.9).

3.1.2.1.2 Expression von *nodal* im Primitivstreifen

Untersucht wurden sämtliche Entwicklungsstadien vom Stadium 3b bis hin zum 9 Somitenstadium (Abb.2).

nodal wurde im Stadium 3b vor allem im anterioren Teil des Primitivstreifens, im Ektoderm, sowie den den Primitivstreifen durchwandernden Meso- und Endodermzellen exprimiert (Abb.5, A, A'). Im posterioren Teil dagegen war die Expression nur schwach detektierbar (Abb.5, A). *nodal*-Transkription fand sich zudem schwach im Ektoderm, und zwar in einer den mittleren Teil des Primitivstreifens umgebenden Region, die sich lateral nach anterior ausweitete (Abb.5, A, A'). Diese Zellen schienen auf den sich gerade entwickelnden Primitivstreifen zuwandernde Epiblastenzellen zu sein.

Im darauffolgenden Stadium 4a wurde *nodal* ausschließlich im anterioren Teil des vollends ausgebildeten Primitivstreifens, und zwar wiederum in allen drei Keimschichten exprimiert (Abb.5, B, B'). Aus diesen Zellen differenziert sich im darauffolgenden Stadium 4b der Primitivknoten, in welchem jedoch keine *nodal*-mRNA mehr detektierbar war (Abb.5, C, C').

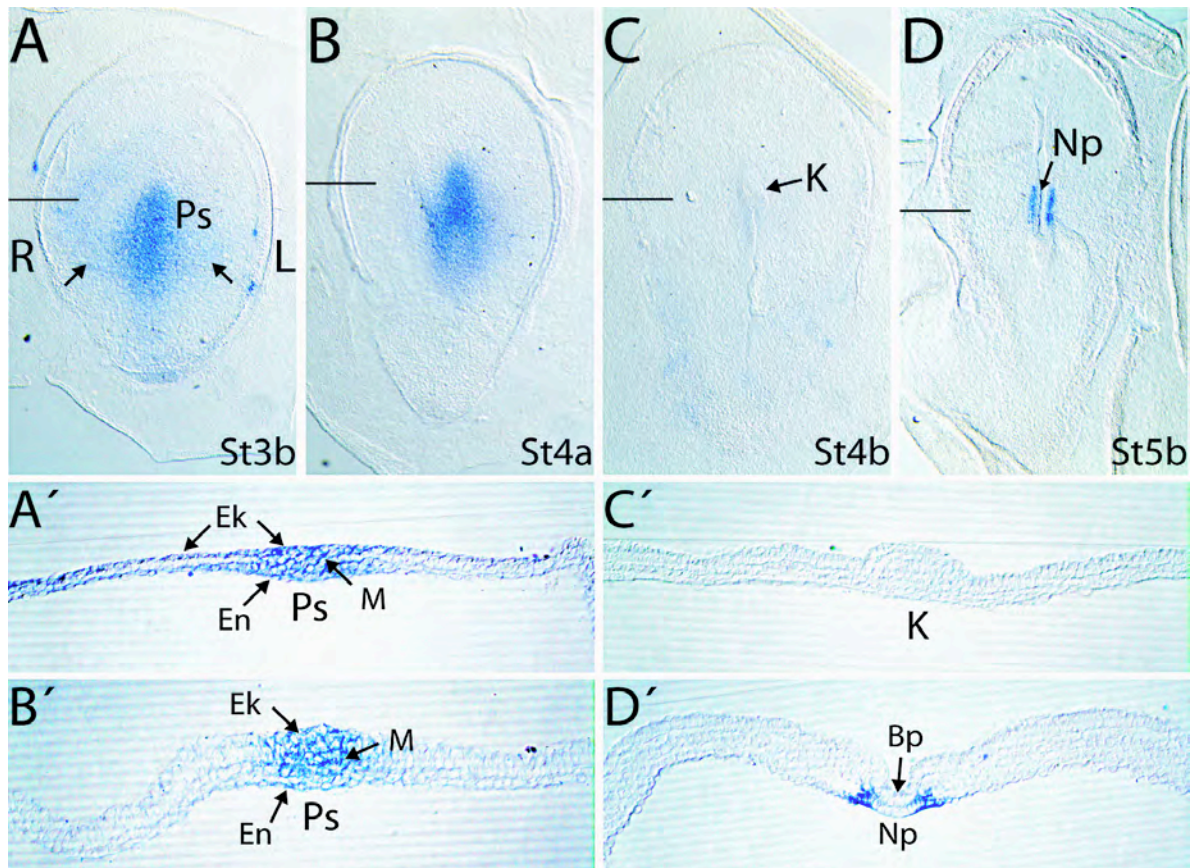


Abb. 5 Expressionsanalyse von *nodal* in Wildtyp-Kaninchenembryonen der Vorsomitenstadien nach *in situ* Hybridisierung

(A, A', B, B') *nodal*-Expression im anterioren Teil des Primitivstreifens (Ps) im Ekto- (Ek), Meso- (M) und Endoderm (En), sowie im umgebenden Ektoderm (Ek) (A, A').

(C, C') Keine *nodal*-Expression im gerade gebildeten Primitivknoten (K) des Stadiums 4b.

(D, D') Ab Stadium 5b erschien eine neue bilateral-symmetrische Expressionsdomäne in der Randzone der posterioren Notochordplatte (Np). (C, C', D) Es fand sich weiterhin keine Expression im Primitivknoten.

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an.

3.1.2.1.3 Expression von *nodal* im seitlichen Rand der posterioren Notochordplatte

Mit dem Erreichen des Stadiums 5b konnte *nodal*-mRNA wieder detektiert werden, allerdings nicht mehr im Primitivstreifen, sondern im seitlichen Rand der neugebildeten posterioren Notochordplatte (Abb.5, D). Die Expression war genau in den Zellen sichtbar, die nicht mit den, der Notochordplatte räumlich übergeordneten, Bodenplattenzellen in Kontakt standen (Abb.5, D'). Diese bilaterale Expressionsdomäne blieb bis zum 9 Somitenstadium bestehen, wobei die linke Domäne zwischen dem 3 bis 9 Somitenstadium eine verstärkte sowie nach anterior und posterior verlängerte Expression aufwies (Abb.6, A-F, Pfeilköpfe in D''''-D''''').

3.1.2.1.4 Expression von *nodal* in der linken Seitenplatte

Mit dem Erreichen des 3 Somitenstadiums fand sich *nodal*-mRNA nun zusätzlich im linken Seitenplattenmesoderm, welches den am weitesten lateral liegenden Teil des Mesoderms darstellt (Abb.6, B-E). Diese Expressionsdomäne entstand sehr schwach im 2 Somitenstadium, und zwar genau auf Höhe der Notochordplatten-Expression (Abb.6, A). Von dort breitete sie sich sehr schnell in den anterioren und posterioren Teil des Seitenplattenmesoderms aus, um schließlich im 6 Somitenstadium die größtmögliche Ausdehnung zu erreichen (Abb.6, D). Transversale Schnitte zeigten zudem eine Ausweitung der Expressionsdomäne auf alle drei Keimschichten. So fand sich *nodal*-mRNA nicht nur im Seitenplattenmesoderm, sondern auch in den darüberliegenden Zellen des epidermalen Ektoderms und den darunterliegenden Zellen des Endoderms, mit einer jeweils scharfen Begrenzung zur Mitte des Embryos hin (Abb.6, D'', D'''-D''''').

3.1.2.1.5 Expression von *nodal* in der linken Herzanlage

Das Seitenplattenmesoderm besteht aus zwei epithelialen Zellschichten, der Somatopleura, direkt unter dem Ektoderm und der Splanchnopleura, direkt über dem Endoderm. Diese schließen zwischen sich die Zölmhöhle ein. Im anterioren Teil des splanchnischen Seitenplattenmesoderms differenziert sich im 5 bis 6 Somitenstadium die Herzanlage, welche zu diesem Zeitpunkt bilateral angelegt ist, weswegen eine rechte und eine linke Herzanlage vorliegt (Abb.2). *nodal*-mRNA war zu diesem Entwicklungszeitpunkt in der linken Herzanlage detektierbar (Abb.6, D). Bei einer genaueren Analyse dieser Expressionsdomäne, anhand transversaler Vibratonschnitte, zeigte sich die Verbreitung der *nodal*-Transkripte in den Myo-, sowie Endocardzellen der linken Herzanlage (Abb.6, D'). Ebenso fand sich eine *nodal*-Expression in den Somatopleura- und Splanchnopleurazellen (Abb.6, D'). Diese Zellen umgrenzen das Pericard, die anteriore Verlängerung der Zölmhöhle und bilden in späteren Entwicklungsstadien den Ausflusstrakt des Herzens. Desweiteren wurde *nodal* in den räumlich darüberliegenden Ekto- und den darunter befindlichen Endodermzellen exprimiert (Abb.6, D').

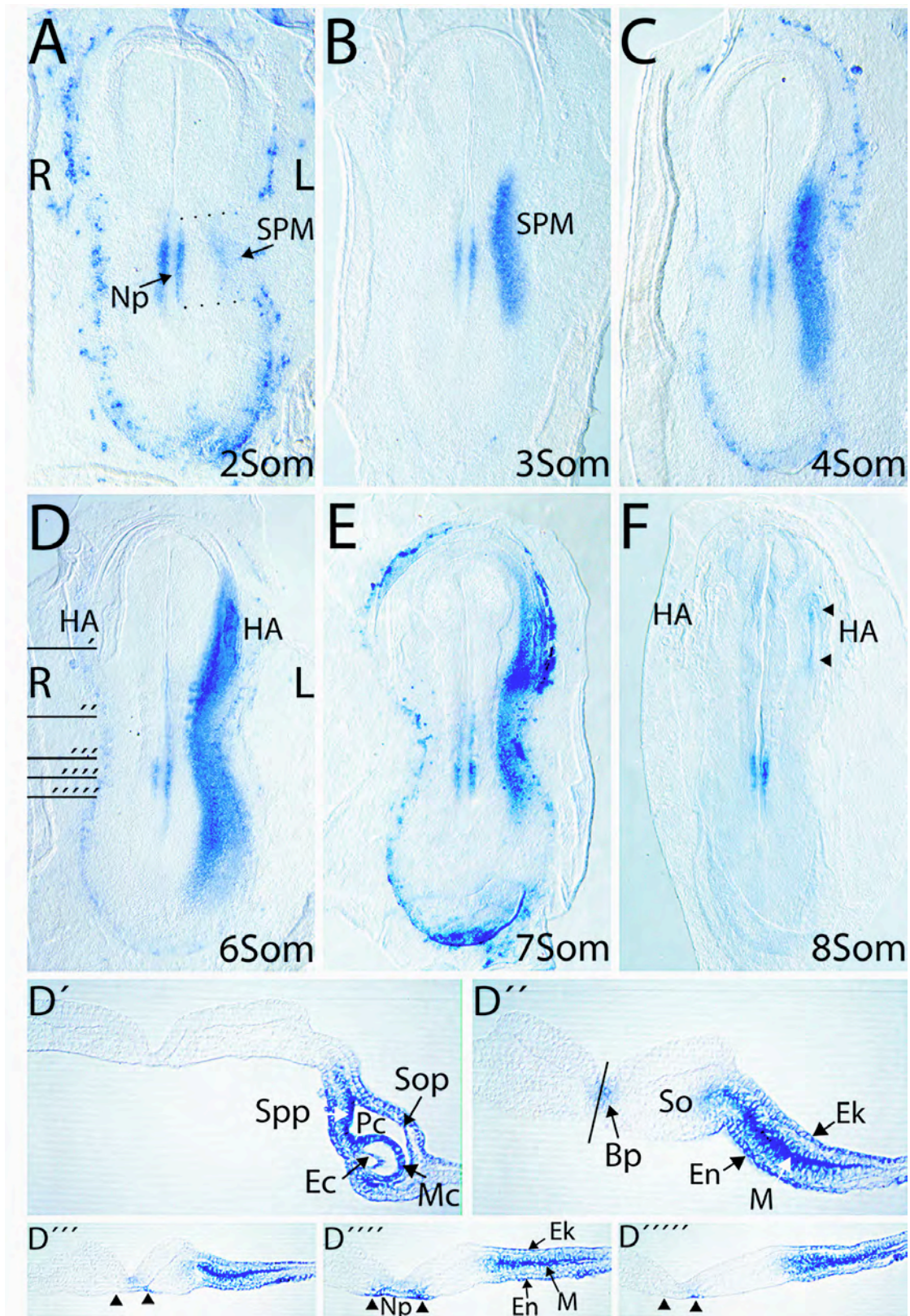


Abb. 6 Expressionsanalyse von *nodal* in Somitenstadien von Wildtyp-Kaninchenembryonen nach *in situ* Hybridisierung

(A-F) Bilateralsymmetrische *nodal*-Expression in der Randzone der posterioren Notochordplatte (Np), die sich im 3-6 Somitenstadium (D, Pfeilspitzen in D''', D'''' und D''''') asymmetrisch auf der linken Seite verstärkt und verlängerte.

(A-E, D''-D''''') Transiente asymmetrische *nodal*-mRNA-Lokalisation im linken Seitenplattenmesoderm (SPM) und (D, D', E, F) in der linken Herzenlage (HA).

(A) Die Seitenplattendomäne bildete sich auf der Höhe der Mittelliniendomäne und breitete sich von dort sowohl in anteriorer als auch in posteriorer Richtung über die gesamte linke Seitenplatte aus (A-D).
 (B, C, D, D´) Zudem weitete sich die linke Expressionsdomäne auf den lateralen Teil der Somiten (So) und auf das darüberliegende Ektoderm (Ek), sowie das darunterliegende Endoderm (En) aus (D´-D´´´´´).
 (F) Zurückgehende *nodal*-Expression in der linken Herzanlage (HA) im 8 Somitenstadium (Pfeilspitzen).
 (D, D´, D´´, E) Im 6-7 Somitenembryo wurde *nodal* auch in der Bodenplatte (Bp) exprimiert.
 (D´) Transversalschnitt durch die linke Herzanlage zeigt die Expression in Endo- (Ec) und Myocardium (Mc), der Somatopleura (Sop) und der Splanchnopleura (Spp), sowie dem darüberliegenden epidermalen Ektoderm (Ek) und den darunterliegenden Endodermzellen (En).
 (D´) Transversalschnitt in Höhe eines Somiten zeigt die Expression in allen drei Keimblättern der Seitenplatte, dem lateralen Teil des Somiten (So) und die asymmetrische Expression in der linken Hälfte der Bodenplatte (Bp).
 Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an.

3.1.2.1.6 Expression von *nodal* in den Somiten und der Bodenplatte

Mit der Verlängerung der Notochordplatte im Stadium 6 beginnen sich im benachbarten paraxialen Mesoderm paarweise, lokale Zellkondensationen auf jeder Seite der Mittellinie zu formen, die als Somiten bezeichnet werden (Abb.2). Diese entstehen durch Kompaktierung und anschließender ringförmiger Epithelialisierung einer Zellgruppe, die sich somit deutlich vom zuvor mesenchymal angelegten paraxialen Mesoderm abgrenzt. Vom Seitenplattenmesoderm ausgehend verbreiterte sich die *nodal*-Expression jeweils auf Höhe der einzelnen Somiten in das paraxiale Mesoderm hinein, so dass im lateralen Teil des Somitenepithels *nodal*-Transkripte auffindbar waren (Abb.6, D´). Zwischen dem 6 und 7 Somitenstadium erschien eine zusätzliche Expressionsdomäne in dem sich über der Notochordplatte befindlichen ventralen Teil des Neuroektoderms, der Bodenplatte (Abb.6, D´). *nodal*-mRNA war hier hauptsächlich in der linken Hälfte der Bodenplatte nachweisbar, womit eine weitere asymmetrische *nodal*-Verteilung festgestellt werden konnte.

Die Expression von *nodal* war daher sowohl in der Mittellinie als auch in der Seitenplatte asymmetrisch ausgeprägt und entsprach damit der konservierten Verteilung der *nodal*-mRNA in allen Organismen. Zusätzlich konnte eine Expression in der linken Herzanlage, im lateralen Teil der Somiten und in der Bodenplatte gezeigt werden, die bisher noch nicht beschrieben wurde.

3.1.2.2 Expressionsanalyse des Homöobox-Transkriptionsfaktors *Pitx2* im Kaninchenembryo

Pitx2 ist ein Mitglied der *bicoid*-Familie der Homöobox-Transkriptionsfaktoren (Gehring et al., 1994). Sein Genlocus umspannt sechs Exons, mit dem Startcodon in Exon 2 und dem Stopcodon in Exon 6. Die unterschiedliche Verwendung der Exone 2, 3 und 4 führen zur Bildung der drei Isoformen a, b und c. Nur die in allen drei Isoformen vorhandenen Exone 5 und 6 sind hochkonserviert und beinhalten die sogenannte Homöodomäne (Gage und Camper, 1997; Arakawa et al., 1998; Logan et al., 1998; St. Armand et al. 1998; Campione et al., 1999; Schweickert et al., 2000). Allein die *Pitx2c*-Isoform wird, durch Nodal induziert, asymmetrisch in der linken Seitenplatte und in darauffolgenden Stadien ebenso asymmetrisch in Herz und Darm exprimiert (Essner et al., 2000; Schweickert et al, 2000; Yu et al. 2001).

Ein 641 bp großes *Pitx2*-Fragment wurde schon während meiner Diplomarbeit mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und anschließend kloniert (Fischer, 1999; Abb.9). Die Kaninchen-*Pitx2*-Sequenz umfasst Teile der Exone 5 und 6, die Homöobox eingeschlossen. Als Sonde für die *in situ* Hybridisierung verwendet, war sie in der Lage alle drei Isoformen zu erkennen.

3.1.2.2.1 Konservierte Expression von *Pitx2* im Kaninchenembryo

Untersucht wurden die Stadien 5b bis hin zum 9 Somitenstadium.

Von Stadium 6 an (nicht gezeigt) wurde *Pitx2* erstmals im prächordalen Mesoderm (Abb.7, A-D) und in den darauffolgenden Somitenstadien zusätzlich bilateral-symmetrisch im Kopfmesenchym, welches mit dem prächordalen Mesoderm in Verbindung steht und die beiden bilateralen Herzanlagen trennt, exprimiert (Abb.7, A-D, D'). Diese Expressionsdomäne befand sich exakt unter der darüberliegenden Neuralplatte.

Eine asymmetrische Expression fand sich zuerst im 3 Somitenstadium in einer kleinen Domäne des linken Seitenplattenmesoderms, ungefähr auf Höhe der Somiten (Abb.7, A). Diese Domäne breitete sich in den darauffolgenden

Somitenstadien rasch in anteriorer sowie posteriorer Richtung aus, bis schließlich im 6 Somitenstadium das gesamte Seitenplattenmesoderm *Pitx2* exprimierte.

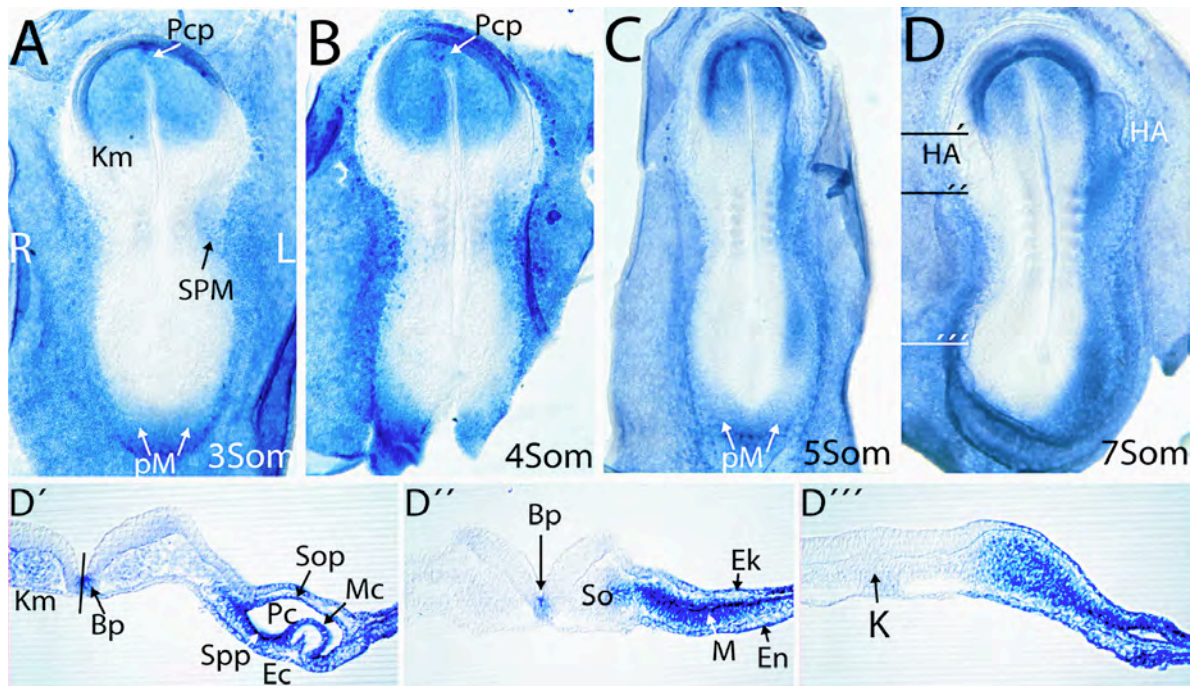


Abb. 7 Expressionsanalyse von *Pitx2* in Wildtyp-Kaninchenembryonen der Somitenstadien nach *in situ* Hybridisierung

(A-D) *Pitx2*-Expression in der Prächordalplatte und im umgebenden Kopfmesechym (Km) (D'), im linken Seitenplattenmesoderm (SPM) (D'', D'''), der linken Herzanlage (HA) (D') und bilateral im posterioren Mesoderm (pM).

(C, D) *Pitx2*-mRNA im 5-7 Somitenstadium im lateralen Teil der Somiten (So) (D'') und in der Bodenplatte (Bp) (D', D'').

(D') Transversalschnitt durch die linke Herzanlage zeigt die Expression im Endo- (Ec) und Myocardium (Mc), dem Somatopleura (Sop) und Splanchnopleura (Spp), dem linken Teil der Bodenplatte (Bp), sowie schwach im posterioren Teil des Kopfmesechym (Km).

(D'', D''') Die Seitenplattenexpression weitete sich zusätzlich zum Mesoderm (M), auch auf das darüberliegende Ektoderm (Ek) und Endoderm (En) aus. Zudem strahlte sie in den lateralen Teil der Somiten (So) aus und fand sich ebenso in der Bodenplatte (Bp) (D'').

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an

Damit fanden sich, ähnlich wie bei der Expression von *nodal* (vgl. Abb.6, sowie Text), *Pitx2*-Transkripte vom 6 Somitenstadium an auch in der linken Herzanlage (Abb.7, D). In transversalen Schnitten der Herzregion wurde die Expression in Myo- und Endocardzellen, sowie der Somato- und der Splanchnopleura sichtbar (Abb.7, D'). Aber auch die über der Herzanlage befindlichen Ektoderm- und die darunterliegenden Endodermzellen wiesen *Pitx2*-Aktivität auf (Abb.7, D').

Ebenso zeigte sich in transversalen Schnitten der Somiten-, sowie der Primitivknotenregion, dass sich *Pitx2*-exprimierende Zellen hier ebenfalls in allen

drei Keimschichten finden ließen (Abb.7, D'', D'''). Jeweils auf Höhe der einzelnen Somiten war eine deutliche Verbreiterung der Seitenplattenmesoderm-Domäne erkennbar (Abb.7, C, D). In transversalen Schnitten wurde die Expression von *Pitx2* in den lateralen Bereichen der epithelialisierten Somiten sichtbar. Die darüberliegenden Ekto-, sowie die darunter befindlichen Endodermzellen zeigten allerdings keine *Pitx2*-Aktivität (Abb.7, D').

Von den Somitenstadien an wurde *Pitx2* auch im posterioren Teil des Kaninchenembryos transkribiert (Abb.7, A-D). Bilateral zu beiden Seiten des posterioren Abschnitts des Primitivstreifens war *Pitx2*-Expression in den Mesodermzellen erkennbar. Zudem wurde *Pitx2* auch im gesamten den Embryo umgebenden extraembryonalen Gewebe exprimiert (Abb.7, A-D).

Im 5/6-Somitenstadium schwach beginnend und stärker werdend im 7-Somitenstadium wurde eine weitere *Pitx2*-Domäne in der Mittellinie des Kaninchenembryos sichtbar (Abb.7, C, D). Wie schon bei der Expression von *nodal* beobachtet (Abb.6, sowie Text), fand sich auch *Pitx2*-mRNA in der Bodenplatte, dem ventralen Teil des Neuroektoderms (Abb.7, D', D''). Transkriptionsaktive Zellen waren auch hier hauptsächlich im linken Teil der Bodenplatte detektierbar. Die Lokalisation von *Pitx2*-mRNA in der Bodenplatte war, ebenso wie diejenige von *nodal*, bisher noch nie beschrieben worden.

nodal und *Pitx2* wurden somit, abgesehen von der posterioren Domäne links und rechts des Primitivstreifens, sowie dem Kopfmesenchym, in exakt denselben Regionen des Kaninchenembryos exprimiert.

3.1.2.3 Expressionsanalyse des TGF β -Signalmoleküls *lefty* im Kaninchenembryo

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde im Verlauf der Diplomarbeit von Christina Karcher ein Fragment des *lefty1*-Genlocus und des *lefty2*-Genlocus amplifiziert und kloniert (Karcher, 1999). Die entsprechenden Sonden sind jedoch nicht in der Lage zwischen den beiden Isoformen zu unterscheiden und erkennen daher beide Isoformen.

3.1.2.3.1 Konservierte Expression von *lefty* im Kaninchenembryo

Untersucht wurden Kaninchenembryonen der 1 bis 9 Somitenstadien.

Die Expression von *lefty* begann im 2/3 Somitenstadium in einer kleinen Domäne der Bodenplatte etwas unterhalb der ersten Somitenpaare (Abb.8, A). Diese Expressionsdomäne kann anhand vergleichender Analysen der Expressionen in Maus, Huhn, Zebrafisch und *Xenopus* der *lefty1*-Isoform zugeordnet werden.

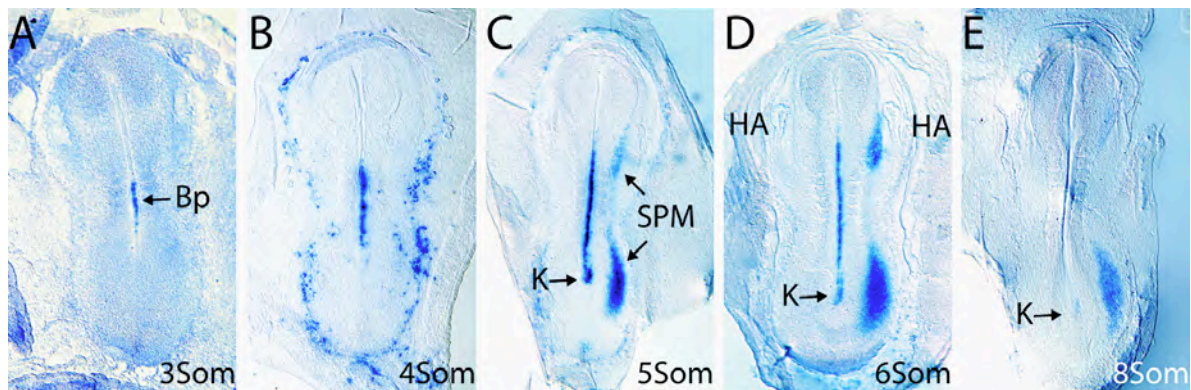


Abb. 8 Expressionsanalyse von *lefty* in Wildtyp-Kaninchenembryonen nach *in situ* Hybridisierung

Die verwendete *lefty*-Sonde erkennt sowohl die Isoform 1, die in der Mittellinie als auch die Isoform 2, welche in der linken Seitenplatte exprimiert wird.

(A-D) *lefty1* wurde beginnend mit dem 3 Somitenstadium in der Bodenplatte (Bp) transkribiert. Die Expression war asymmetrisch ausgeprägt und fand sich hauptsächlich in der linken Seite der Bodenplatte. Ausgehend von einer Domäne auf Höhe der Somiten erweiterte sich die Expression nach anterior und posterior, bis *lefty1*-mRNA vom 5 Somitenstadium an auch in der linken Seite des Primitivknotens (K), sowie der gesamten linken Bodenplatte verteilt war. Die Expression in der Bodenplatte ging im 7 Somitenstadium verloren, wohingegen die Transkription von *lefty1*-mRNA links des Primitivknotens bis zum 8 Somitenstadium andauerte (C-E).

(C-E) *lefty2* wurde vom 5 bis 8 Somitenstadium in der linken Seitenplatte (SPM) transkribiert. Diese Expression war jedoch, im Gegensatz zu derjenigen von *nodal* und *Pitx2*, in eine starke posteriore und eine schwächere anteriore Domäne unterteilt. Die *lefty2*-mRNA der anterioren Domäne war ausserdem nicht in der linken Herzanlage (HA) zu finden.

Lefty1-mRNA war bereits zu diesem Zeitpunkt asymmetrisch in der linken Seite der Bodenplatte zu finden. Von hier aus weitete sie sich sowohl nach anterior als auch nach posterior aus und war ab dem 5 Somitenstadium auch im Primitivknoten und dem posterioren Teil der Notochordplatte detektierbar (Abb. 8, A-D). Die Expression in der Bodenplatte war nur transient vorhanden und wurde mit dem 6 Somitenstadium schwächer (Abb.8, D). Im 7 Somitenstadium war sie ganz verschwunden (nicht gezeigt und Abb.8, E). Die asymmetrisch linksseitige Expression im Primitivknoten blieb zumindest bis zum 8 Somitenstadium bestehen (Abb.8, E).

Mit Beginn des 5 Somitenstadiums wurde eine zweite Expressionsdomäne im linken Seitenplattenmesoderm erkennbar (Abb.8, C). Diese Expressionsdomäne kann aufgrund der konservierten Expression in Maus, Zebrafisch und *Xenopus* der *lefty2*-Expression zugeordnet werden. *lefty2*-Transkription konnte zuerst hauptsächlich im posterioren Teil der Seitenplatte detektiert werden. Mit dem 5/6-Somitenstadium trat auch im anterioren Seitenplattenmesoderm eine *lefty2*-Expression auf (Abb.8, D). Diese beiden Domänen waren allerdings durch einen Abschnitt auf Höhe der Somiten getrennt, in dem in nur sehr geringem Maße *lefty2*-Aktivität zu erkennen war (Abb.8, C, D). Im posterioren Abschnitt des Seitenplattenmesoderms war die Expression vergleichsweise stärker ausgeprägt. Die *lefty2*-exprimierenden Zellen der anterioren Domäne befanden sich zwar auf Höhe der linken Herzanlage, waren jedoch nur im medialen Seitenplattenmesoderm und nicht in der Herzanlage selbst zu finden (Abb.8, D). Das definitive Fehlen von *lefty2* in der linken Herzanlage konnte in dieser Deutlichkeit bisher nicht gezeigt werden. Die Expression in der Seitenplatte blieb bis zum 8 Somitenstadium vorhanden.

Obwohl ebenso wie *nodal* und *Pitx2* in der Seitenplatte exprimiert und durch Nodal induziert, unterscheidet sich die *lefty2*-Expression damit in zweierlei Hinsicht von den anderen beiden Seitenplattenmarkern. Zum einen fehlt die Expression in Höhe der Somiten und zum anderen findet sich keine Transkription in der linken Herzanlage.

Zusammenfassend lässt sich die in allen anderen untersuchten Wirbeltierembryonen hochkonservierte Expression der Gene *nodal*, *Pitx2*, *lefty1* und *lefty2* auch für den Kaninchenembryo feststellen. Dies legt eine ebenso funktionelle Konservierung der Nodal-Signalkaskade unter den Vertebraten nahe. Für alle drei Gene konnten zudem neue, bisher nicht beschriebene Expressionsdomänen sichtbar gemacht werden:

Die Expression von *nodal* wurde erstmals in der linken Herzanlage, der linken Bodenplatte und im lateralen Teil der linksseitigen Somiten detektiert.

Gleichermaßen konnten *Pitx2*-Transkripte in der linken Herzanlage, der linken Bodenplatte und im lateralen Teil der linksseitigen Somiten beobachtet werden.

Für *lefty2* wurde gezeigt, dass zwar eine Seitenplattenexpression auf Höhe der linken Herzanlage vorhanden ist, eine Expression in der Herzanlage selbst jedoch nicht vorliegt.

<p>A</p> <p>1 CAGAACTGACGTTCACTGTTGACTTCTCCTCTGAGCCAAAGAGAGCTGGCGTGG 60 Q N N W T F T F D F S F L S Q E E E L A W</p> <p>61 GGTGAGCTCGGCTGCAGCGCTGCGCCGAGGAGCTGCGCCGAGGGCCGCTCCAC 120 A E L R L Q P S G P E D L P A E G P L T</p> <p>121 ATGAGACTTCCACCAAGCCAGGACACAGAGGAGCCGCGGCTGTTGGAG 180 I E I F H Q P K A D T E Q D P A D C L E</p> <p>181 CFTCTCCGATGGAGTGTACCTCGCTCTCTCCAGTCACTTCTCTCAGGACG 240 R L R H E V F T V A L S Q V P F S S G S</p> <p>241 ATGTCCTGGAGTGCAGCCCACTCTCAAGTGGTGAAGCACCCAGGCGACTGGAG 300 M V L E V T R P L S K W L K H P R A L E</p> <p>301 GAGCAGGTGTCAGCTGCGGAGCGCTGCGGCTACCCCTACTCCACTGGGACC 360 E Q V S S L A G A C W R L P P T P P G T</p> <p>361 CTGCGCGGACGACTGCGCCACCGTGGNCTCGCTCCACTCCAACTCTCCCGAG 420 L P G T D S V P T V X L V L L H S N L S Q</p> <p>421 GAGCAGAGCGCTGGCGGCTCCACTTCTGTGGAAAGCCGAGAGCTCTGCGCGCC 480 E Q R R L G G S T L L W E A E S S W R A</p> <p>481 CAGGAGGCGACTGGACTCGAGGGGCGAGGACCGCGGCTCAGTTCAGCCAGC 540 Q E G Q L D S E R G R R H R R H Q L P D</p> <p>541 AGAAGCCAACTGCGCAAGTCAAGTTCAGTGGACTTCAACTCATCGCTGGGCG 600 R S Q L C R K V K F Q V D F N L I G W G</p> <p>601 TCTTGGATCATCTACCCAGCAGTACAACCTA 635 <u>S W F I Y P K Q Y N A</u></p>	<p>B</p> <p>1 GATGATCCGTCGAAGAAGCGCAACGGCCGAGAGACTCCTTACCAGCAGCAG 60 D D P S K K K R Q R R Q R T H F T S Q Q</p> <p>61 CTGAGGAGCTGGAGGCTTCCAGAGGAGCCCTACCCTGAGCATGTCACCGCGAG 120 <u>L Q E L E A T F Q R N R Y P D M S T R E</u></p> <p>121 GAAATCGGCTGTGGACCACTTACAGAAGCCGAGTGGGTTGGTTCAAGATCGC 180 <u>E I A V M T N L L T E A R V R V M F K N R</u></p> <p>181 CGGCGCAAGTGGAGAAGGGAGCGCAACCGAGCGGCTGTCGAGAAATGCGTTT 240 <u>R A K H R K R E R N Q Q A E L C K N G P</u></p> <p>241 GGGCCGAGTTCACGGCTGATGACGCCCTATGACACATGACCGGGCTATTCTTAC 300 G P Q F N G L M Q P Y D D H Y P G Y S Y</p> <p>301 AACAACTGGGCGCAAGGGCTCAGCTGGGCTCGCTCCACCAAGATTTCCCTTC 360 N N W A A K G L T S A S L S T K S F P P</p> <p>361 TTCAACTATGAAATGCAACCCCTGCTCTCAGAGACAGTTCCTCCCGCCCACTCC 420 F N S M N V N P L S S Q S M F S P P N S</p> <p>421 ATCTGTCCATGATGATGCTCCAGCATGGCCCTCGCCGCTCAGCGGAGTCCCGCG 480 I S S M S M S S S M V P S A V T G V P G</p> <p>481 TCCAGCTCAAGAGCTGAACAACCTGAACACCTGAGCAGCCGCTCGCTGAATCCGCG 540 S S L N S L N N E L N L S P S L N S A</p> <p>541 GTGCCAGCCCGCTGCTTACGCGCCGCTGCTCCGCTGATGATGAGGACAGCAG 600 V P T P A C P Y A P P T P Y Y R D T</p> <p>601 TGTAACTGAGGCTGGCCGCTGAGACTGAAGCAACGA 641 <u>C N S S L A S L R L R K A K</u></p>	<p>C</p> <p>1 ATGGGACGCCCCCTCGCGCTGAGCTGCTGCTGACTGCTGCTCTCTGCTC 60 M G S P R S A L S C L L L H L L V L C L</p> <p>61 CAAGCCAGTACGCTGACCTCACTAATTACACAGCATGTAGGAGGACAGAGC 120 Q A Q V T V Q S E P N F T Q H V R E Q S</p> <p>121 CTGTCAGGATCAGCTACGCGCGCTCATCCGGAOCTTACAGCTGTACAGCGCAC 180 L V T D Q L S R R E I R T Y Q E Y S R T</p> <p>181 AGCGGAACACGCTGAGTCTCGGCAACAGCGCATCAAGCCATGGCAGAGGAGCGC 240 <u>S G K H V Q V L A N K R I N A H A E D G</u></p> <p>241 GACCGTTCGAAAGCTCATTGTGAGACAGATCCTTGGAGCGGGTTCGGGTCGA 300 <u>D P F A K L I V E T D T F G S R V R V R</u></p> <p>301 GGAGCCGAGCGGCTTTCATCTCTATGAAACAAGGGAGGAGCTGATGCGCAAGAGC 360 <u>G A E T G L Y I C M N K K G K L I A K S</u></p> <p>361 AACGGCAAGGCAAGGATGCTCTCACGGAGTGTGCTGGAGAACACTACAGCGG 420 <u>N G K G K D C V F T E I V L E H N V T A</u></p> <p>421 CTGCAAGCCAAAGTCAAGGGCTGGTACATGGCTTACCCGCAAGGGCGCGCCGCG 480 <u>L Q N A K Y E G W I H A F T R K G R P R</u></p> <p>481 AAGGCTCCAAAGACCGCAGCAGCGGAAGTCCACTTCAAGAAGGGCTTCCCGCC 540 <u>K G S K T R Q H D R E V H F M K R L P R</u></p> <p>541 GGCCACCACACGAGGAGAGCGCTGCGCTTCAAGTCTCACTACCC 590 <u>G H H T T E Q S L R F E F L N Y</u></p>	<p>D</p> <p>1 CCCCCAAAGCTGACCCCTTAGCCTACAAGAGTTFATCCCAAGCTGGCGGAGAGAC 60 <u>P K K L T P L A Y K O F I P N V A E K T</u></p> <p>61 CCTAGGGCCAGCGAAGATGAGGAGAGATCTCGAAGACTCCGAGCATTTAAGA 120 <u>L G A S G R Y E G K I S R N S E R F K E</u></p> <p>121 ACTCACCCCAATTACACCCCGACATCATATTTAAGATGAGGAAACACAGAGCAGA 180 <u>E T P N Y N P D I I F K D E N T G A D</u></p> <p>181 CAGGCTGATGACTCAGAGGTGTAAGGCAAGTGAACCTCTGGCCTCAGTGATGAA 240 <u>R L M T Q R C K D K L N A L A I S V H N</u></p> <p>241 CCAGTGGCGGAGTGAAGCTCGGCTGACCGAGGCTGGGACAGGAGCGCCACATTC 300 <u>Q W P G V K L R V T E G W D E D G H H S</u></p> <p>301 GGAGGAGTCTGACTACGAGGCTGCGCTGTGGACATCACAGCTGTGACCTGAGCC 360 <u>E E S L H Y E G R A V D I T T S D R D R</u></p> <p>361 TAGCAAGTACGCACTGCGCCGCTGCTGTGGAAGCCGCTGACTGCTACTA 420 <u>S K Y G H D A R L A V F A G F D X V Y Y</u></p> <p>421 TGAGTCAAGCCACATCCACTGCTCGTGAAGCAGAGAACTGGTGGCGCCAAATC 480 <u>E S K A H I H C S V K A E N S V A A K S</u></p> <p>481 GGGCGGCTCTCCCTGGCTCGCCACCGTGCAGCTGGAGCAGGCGGCAAGCTGCT 540 <u>G G C F P G S A T V H L E Q G G T K L V</u></p> <p>541 GAAAGACTTGCCTCTGGGACCGCTGCTGGCGCCGACGACAGGCGCGGCTCTA 600 <u>K D L R P G D R V L A A D D Q G R L L Y</u></p> <p>601 CAGCGACTTCTCACTCTGATGCGAGCAGCAGCGGAGAAAGTCTTTACTGAT 660 <u>S D F L T F L D R D D S A R K V F Y V I</u></p> <p>661 CGAGACCTGGAGCCGCGGAGCGCTGCTCTCACCGCCGCTCTGCTGTCTGCTCC 720 <u>E T L E P R E R L L L T A H L L F V A</u></p> <p>721 GCGCACAAAGCTCCGCGCGGCGAGCCGAGCTGGCGCGGCGGAGCGCGCCGCC 780 <u>P H N A S A A G E P E L A P G A G P P P</u></p> <p>781 GGGGGCGCGCGCGCGCGCTCTTCCGACCGCGCTGCTCGCGGCGGAGCTGCT 840 <u>G G A P F G R R A L F A S R V R P G Q R V</u></p> <p>841 GTACTGTGGCGAGCGGCTNCGGGAGCCGCGACTGCTGCGCGCGGCTGACAGCG 900 <u>Y V V A E R V R G P P T A A S R R A Q R</u></p> <p>901 TGAAGCTCCGAGGAGCGCGCGCTTACCGCGCTCACGGCGGAGGCGGAGCCTCC 960 <u>D A P R G G H G R L R A A H G A G H H P</u></p> <p>961 TCATCAACCGGCTGCGCTGCTGCTACCGGCTCATCGAGGAGCAGCTGGCC 1015 <u>H Q P G A G L V L R G H R G A Q L</u></p>
---	--	---	--

Abb.9 Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von Kaninchen PCR-Fragmenten der Gene *nodal*, *Pitx2*, *fgf8* und *shh*

(A) 635 bp Fragment von *nodal*, die TGFβ-Domäne ist unterstrichen.

(B) 641 bp Fragment von *Pitx2*, die Homöobox ist unterstrichen.

(C) 590 bp Fragment von *fgf8* Isoform b, die FGF-Domäne ist unterstrichen.

(D) 1015 bp Fragment von *shh*, die in sämtlichen Hedgehog-Proteinen hochkonservierte N-terminale Domäne ist unterstrichen.

Desweiteren wurden im Kaninchen die Gene *HNF3 β* , *ptc*, *Snail*, *NKx3.2*, *Aktivin β B* und der *Aktivinrezeptor IIA* kloniert und analysiert, welche im Hühnerembryo asymmetrisch exprimiert werden. In allen diesen Genen konnte, ebenso wie in der Maus, nur eine symmetrische Expression detektiert werden. Die Klonierung und vergleichende Expressionsanalyse dieser Gene wird im Anhang dieser Arbeit in komprimierter Form dargestellt.

Die konservierte und asymmetrische Expression der Seitenplattenmarker *nodal*, *Pitx2* und *lefty* ermöglichte ihre Verwendung als Indikatoren für erfolgte Veränderungen der Nodal-Signalkaskade nach der Manipulation des FGF8-Signalweges in der *in vitro* Kultur.

3.2 Etablierung eines *in vitro* Kultur-Systems für Kaninchenembryonen

3.2.1 *in vitro* Kultur von Kaninchenembryonen

3.2.1.1 *in vitro* Kultur der Stadien 5 und 6

Die Rolle von FGF8 bei der Links-Rechts-Entwicklung sollte am lebenden Kaninchenembryo untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Kulturbedingungen gesucht, die eine normale Entwicklung des Kaninchenembryos *in vitro* gestatten. Da der Primitivknoten in der Entwicklung der Links-Rechts-Achse eine wichtige Rolle zu spielen schien und *fgf8* vom Stadium 5 an im Primitivknoten exprimiert wurde, sollten Kaninchenembryonen zum Zeitpunkt der Bildung des Primitivknotens im Stadium 4b in Kultur genommen werden. Diese sollten sich *in vitro* bis zum 3 bis 5 Somitenstadium weiterentwickeln, um die in diesem Stadium auftretende linksseitige Expressionsdomäne von *nodal* auf etwaige Veränderungen hin analysieren zu können.

Kaninchenembryonen wurden am Tag 7.5 der Schwangerschaft aus dem Uterus der Mutter herauspräpariert und auf einem Agarosehügel mit dem Ektoderm nach unten plaziert (Abb.10, A). Diese Orientierung berücksichtigte die Lage des Embryos im Uterus, der ebenfalls mit dem Ektoderm der Uterusschleimhaut aufliegt. Der Agarosehügel war dabei von gerade soviel Medium umgeben, dass ein Benetzen des Embryos mit Flüssigkeit gewährleistet und gleichzeitig das Abschwimmen, das eine Deformation des Embryos mit sich führen würde, verhindert wurde. Als Medium wurde F10-Medium, dem 20% fötales Rinderserum zugesetzt worden war, eingesetzt. Die präparierten Embryonen befanden sich im Stadium 4b bis 6 und wurden über Nacht bis zum 3 bis 5 Somitenstadium kultiviert.

Die Kaninchenembryonen entwickelten sich hinsichtlich morphologischer Kriterien, wie der Bildung von Notochord, den Somiten und der Herzanlage, weitgehend normal (Abb.10, B). Embryonen der Stadien 4b allerdings, die sich im Prozess der Gastrulation befanden und noch kein axiales Mesoderm angelegt hatten,

entwickelten sich sehr langsam und erreichten oftmals auch nach längerer Kulturzeit nicht das gewünschte Stadium von 3 bis 5 Somiten. Deswegen wurden im folgenden nur Embryonen der Stadien 5 bis 6 verwendet.

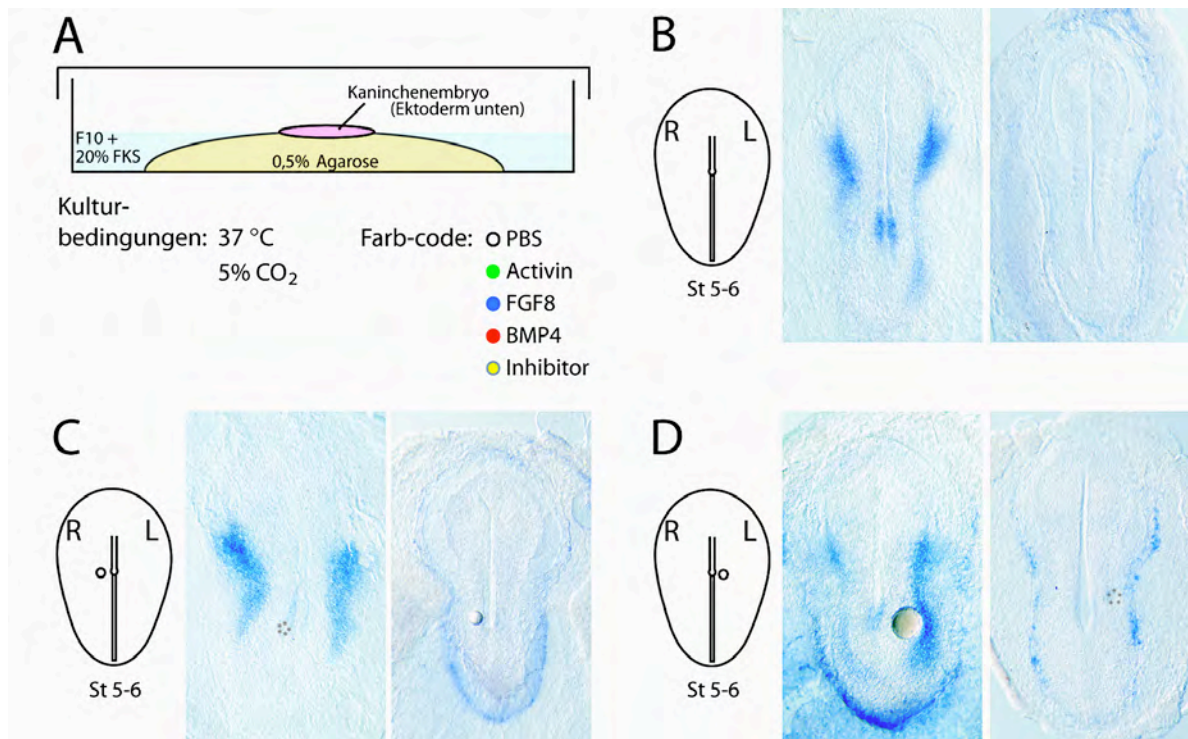


Abb. 10 Störung der asymmetrischen *nodal*-Expression nach Kultur von Vorsomitenstadien des Kaninchens

(A) Skizze des Experimentaufbaus mit den Kulturbedingungen, sowie dem Farbcode für die *in vitro* Kulturexperimente der Abb.10-14 und 16-19.

(B-D) Die Kultur von Kaninchenembryonen der Stadien 5-6 führte zum Verlust der asymmetrischen linksseitigen *nodal*-Expression ohne (B), mit einer PBS-gefüllten Acrylkugel rechts vom Primitivknoten (C) und mit einer PBS-gefüllten Acrylkugel links vom Primitivknoten (D). Dabei trat zum größten Teil eine bilaterale Expression (B, C, D jeweils linkes Bild), sowie der Verlust der kompletten Seitenplattendomäne (B, C, D jeweils rechtes Bild) auf.

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Schematische Skizzen kennzeichnen Stadium und Plazierung der Acrylkugeln.

In einer nachfolgenden *in situ* Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter *nodal*-Sonde wurde deutlich, dass die kultivierten Embryonen, trotz ihrer normalen morphologischen Entwicklung, in den meisten Fällen ein gestörtes *nodal*-Expressionsmuster zeigten (Abb.10, B, Tab.1). In nur drei (13%) von 23 untersuchten Embryonen fand sich das normale linksseitige Expressionsmuster von *nodal* (Tab.1). Weitere 7 (30%) Embryonen zeigten überhaupt keine Expression und in 13 (57%) konnte die Expression, zusätzlich zur linken, auch in der rechten Seitenplatte detektiert werden (Abb.10, B; Tab.1). Somit zeigte die Mehrzahl der Embryonen keine oder bilaterale Expression von *nodal* im

Seitenplattenmesoderm. Die ektopische Expression auf der rechten Seite befand sich dabei ausschließlich im Seitenplattenmesoderm und den darüberliegenden Ektoderm- und Endodermzellen (nicht gezeigt) und spiegelte damit die linksseitige Expressionsdomäne wieder.

Um eine Störung der *nodal*-Expression durch im fötalen Kälberserum enthaltene Wachstumsfaktoren ausschließen zu können, wurde der Versuch mit anderen Medienzusammensetzungen wiederholt. Zum einen wurde die Konzentration des fötalen Kälberserums auf 10 Prozent gesenkt und schließlich ganz durch Rinderserumalbumin ersetzt, zum anderen wurde das Medium komplett durch serumfreies M16-Medium ausgetauscht. Die Störung der *nodal*-Expression konnte allerdings in keinem der Versuche verhindert werden (nicht gezeigt) und ließ sich folglich nicht auf die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren im Serum zurückführen.

Parallel zu den ersten Kulturversuchen wurden den Kulturembryonen auch PBS-getränkte Acrylkugeln links und rechts des Primitivknotens implantiert (Abb.10, C, D). Diese Acrylkugeln waren, wie sämtliche weiterhin verwendeten, heparinisiert. In 39 untersuchten Embryonen mit linker PBS-Kugel zeigten 16 (41%) keine und 10 (26%) eine bilaterale Expression (Abb.10, D; Tab.1). In 14 untersuchten Embryonen mit rechter PBS-Kugel konnten in 6 (43%) keine und in 5 (36%) der Embryonen bilaterale *nodal*-mRNA-Verteilung beobachtet werden (Abb.10, C; Tab.1). Somit fand sich auch in mit Acrylkugeln beladenen Kaninchenembryonen, die im Stadium 5 bis 6 in Kultur genommen wurden, in der Mehrzahl der Embryonen keine oder bilaterale *nodal*-Expression nach Übernachtkultur.

Zusätzlich konnte jedoch bei 20% der Embryonen mit linksseitiger Acrylkugel eine einseitige Expression im rechten Seitenplattenmesoderm beobachtet werden, die bei einer Kultur ohne Acrylkugel nie auftrat (Tab.1). Gleichzeitig wurde eine im Vergleich zu unbehandelten Kulturembryonen (57%) aufgetretene Verminderung der bilateralen Expression beobachtet (26%) (Tab.1). Das Auftreten einer normalen linksseitigen Expression blieb jedoch bei 13% (Tab.1). Die Platzierung der Acrylkugel links des Primitivstreifens führte damit zu einer Verschiebung der bilateralen Expression zugunsten der einseitig rechten Expression.

Ebenso wie bei unbehandelten Kulturembryonen, wurde bei den mit rechtsseitigen Kugeln beladenen Kaninchenembryonen keine einseitige Expression in der rechten Seitenplatte beobachtet (Tab.1). Bei diesen konnte jedoch im Vergleich zu

unbehandelten Kulturembryonen eine Abnahme der bilateralen Expression zugunsten einer Zunahme der normalen linksseitigen Expression auf 21% beobachtet werden (Tab.1).

Kontrollpuffer oder Protein	Stadium	Links (l) oder rechts (r) plaziert	Analyisiertes Gen	Linke Expr. (%)	Bi-laterale Expr. (%)	Keine Expr. (%)	Rechte Expr. (%)	Gesamtanzahl
PBS	St 5-6	-	<i>nodal</i>	3 (13)	13 (57)	7 (30)	-	23
		l	<i>nodal</i>	5 (13)	10 (26)	16 (41)	8 (20)	39
		r	<i>nodal</i>	3 (21)	5 (36)	6 (43)	-	14
	1-3Som	-	<i>nodal</i>	10 (91)	1 (9)			11
		l	<i>nodal</i>	11 (85)	2 (15)			13
		r	<i>nodal</i>	12 (86)	2 (14)			14
Aktivin	1-4Som	r	<i>nodal</i>	8 (44)	10 (56)			18
		r	<i>Pitx2</i>	9 (50)	9 (50)			18

Tab.1: Aktivin induziert die ektopische Expression von *nodal* und *Pitx2* während der *in vitro* Kultur von Kaninchenembryonen

Kaninchenembryonen wurden unbehandelt (-) oder mit einer PBS- oder Aktivin A- (800 U/ml) getränkten Acrylkugel versehen in Kultur genommen und anschließend einer *in situ* Hybridisierung unterzogen. Die in Klammer stehenden Zahlen belegen den prozentualen Anteil der jeweiligen Ergebnisse.

Abgesehen von einigen wenigen Fällen, schien das Plazieren der Acrylkugel die Expression in der jeweiligen Seitenplatte in den meisten Embryonen nicht zu stören. Im Gegensatz zur *in vitro* Kultur von Hühnerembryonen war jedoch eine normale Links-Rechts-Achsen-Entwicklung, im Hinblick auf die linksseitige *nodal*-Expression, beim Kultivieren von Kaninchenembryonen der Stadien 5 und 6 nicht möglich.

3.2.1.2 *in vitro* Kultur des 1 bis 3 Somitenstadiums

Aufgrund der Störung der normalen *nodal*-Aktivität in den zum Stadium 5 und 6 in Kultur genommenen Kaninchenembryonen, wurden nun frühe Somitenstadien auf ihre Kulturtauglichkeit hin getestet. Kaninchenembryonen im 1 bis 3 Somitenstadium wurden, wie oben beschrieben, in F10-Medium, dem 20% fötales

Kälberserum zugesetzt worden war, kultiviert, bis sie das 3 bis 5 Somitenstadium erreichten. Diese Stadien entwickelten sich nach morphologischen Kriterien völlig unauffällig und behielten in 10 (91%) der 11 untersuchten Embryonen ihre normale linksseitige *nodal*-Expression (Abb.11,A; Tab.1) In nur einem (9%) der Embryonen trat bilaterale Expression auf (Tab.1). Ein Verlust der Expressionsdomäne, wie in den oben beschriebenen Vorsomitenstadien, trat nie ein.

Wurden PBS-beladene Acrylkugeln links neben den Primitivknoten implantiert, so fand sich in 13 untersuchten Embryonen die normale *nodal*-Expression in 11 (85%) Fällen (Abb.11, B; Tab.1). Eine bilaterale Expression konnte zweimal (15%) beobachtet werden (Tab.1). Bei der Implantation von PBS-beladenen Acrylkugeln in das rechte Seitenplattenmesoderm blieb die normale linksseitige Expressionsdomäne in 12 (86%) von 14 Kulturkaninchen erhalten (Abb.11, C; Tab.1). Eine Störung in Form einer bilateralen Expression trat nur in zwei (14%) der Embryonen auf (Tab.1). Somit fanden sich sowohl bei linksseitig als auch bei rechtsseitig mit PBS-getränkten Acrylkugeln beladenen Kaninchenembryonen, keine Fälle in der die Expressionsdomäne während der Kultur verloren ging.

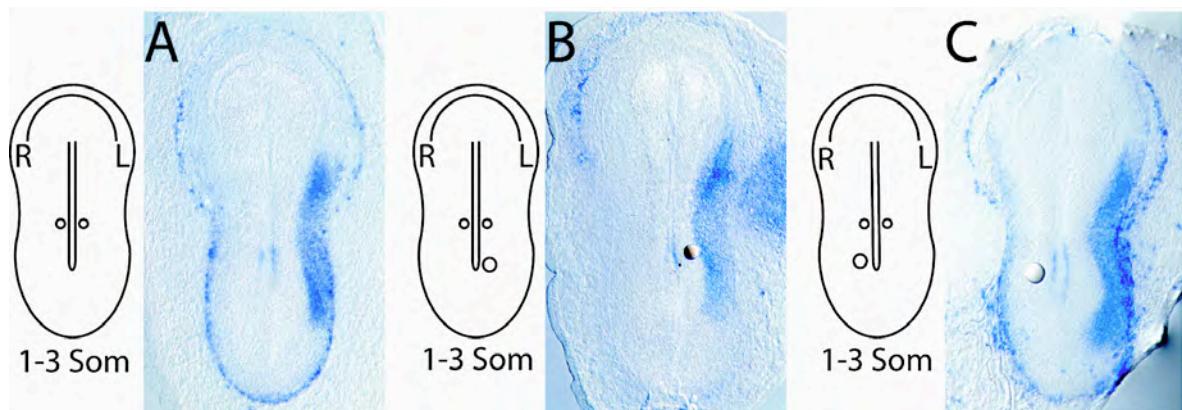


Abb. 11 Normale asymmetrische *nodal*-Expression nach Kultur von Somitenstadien des Kaninchens

Kaninchenembryonen wurden mit oder ohne PBS-getränkter Acrylkugel kultiviert und anschließend einer *in situ* Hybridisierung unterzogen.

(A-C) Im 1-3 Somitenstadium blieb die normale *nodal*-Expressionsdomäne erhalten, sowohl in unbehandelten Kulturembryonen (A), nach Platzierung von PBS-gefüllten Acrylkugeln links vom Primitivknoten (B), als auch nach Platzierung von PBS-gefüllten Acrylkugeln in die rechte Seitenplatte (C).

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Schematische Skizzen kennzeichnen Stadium und Platzierung der Acrylkugeln.

Die endogene linksseitige Expressionsdomäne von *nodal* wurde daher weder durch die Kulturbedingungen, noch durch das Plazieren von Acrylkugeln gestört und blieb folglich stets erhalten. Es konnten demzufolge Versuchsbedingungen etabliert werden, die eine vollkommen normale Entwicklung des Kaninchenembryos in der *in vitro* Kultur vom frühen Somitenstadium an ermöglichten. Im Gegensatz zur Kultur von Hühnerembryonen, die in jedem Entwicklungsstadium kultiviert werden konnten, war eine bezüglich der Links-Rechts-Achsenentwicklung störungsfreie Kultur von Kaninchenembryonen nur vom frühen Somitenstadium an möglich.

3.2.2 Aktivin induziert ektopische *nodal* und *Pitx2*-Expression im rechten Seitenplattenmesoderm des 1 bis 4 Somitenstadiums

Die prinzipielle Tauglichkeit dieses Kultursystems für die Untersuchung der Links-Rechts-Achsenbildung wurde durch die Implantation Aktivin A-getränkter Acrylkugeln überprüft. Aktivin ist ein TGF β -Signalmolekül, das an denselben Rezeptor wie Nodal bindet und in Huhn und Maus Nodal-ähnliche Aktivität auslösen kann (Kumar et al., 2001; Reissmann et al., 2001). Dies führt letztlich über die positive Autoregulation von Nodal zur Induktion von *nodal* selbst und ebenso von *Pitx2* (Saijoh et al., 2000; Shiratori et al., 2001).

Zu diesem Zweck wurden mit Aktivin A-getränkte Acrylkugeln in das rechte Seitenplattenmesoderm von Kaninchenembryonen der frühen Somitenstadien bishin zum 4 Somitenstadium eingeführt (Abb.12, Skizze). Diese wurden daraufhin für 4 bis 5 Stunden kultiviert, bis sie das 3 bis 5 Somitenstadium erreicht hatten und anschließend einer *in situ* Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter *nodal*- oder *Pitx2*-Sonde unterzogen.

Von 18 auf *nodal*-Expression untersuchten Kulturembryonen zeigten 10 (56%), zusätzlich zur normalen linksseitigen Domäne, eine ektopische Expression im rechten Seitenplattenmesoderm (Abb.12, A; Tab.1). In den restlichen 8 (44%) Embryonen trat nur die normale linksseitige Expression auf. Eine Hemmung der endogenen Expressionsdomäne wurde in keinem der untersuchten Fälle beobachtet (Tab.1).

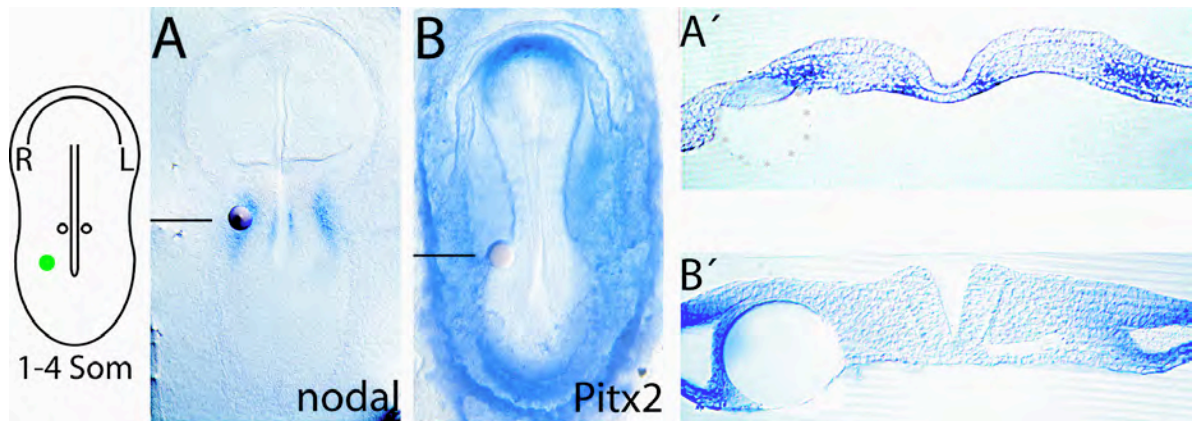


Abb. 12 Aktivin induziert ektopische *nodal*- und *Pitx2*-Transkription im rechten Seitenplattenmesoderm von Somitenstadien

Aktivin-getränkte Acrylkugeln wurden in die rechte Seitenplatte gesetzt. Die Embryonen wurden daraufhin kultiviert und einer *in situ* Hybridisierung unterzogen.

(A, B) Die Plazierung von Aktivin-gefüllten Acrylkugeln in das rechte Seitenplattenmesoderm führte zu ektopisch rechtsseitiger und damit bilateraler *nodal*- (A, A') und *Pitx2*- (B, B') Expression.

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an. Schematische Skizzen kennzeichnen Stadium und Plazierung der Acrylkugeln.

In den 18 auf *Pitx2*-Expression untersuchten Embryonen konnte in 9 (50%) der Embryonen, zusätzlich zur linken Expressionsdomäne, eine ektopische und damit bilaterale Transkription festgestellt werden (Abb.12, B; Tab.1). Die restlichen 9 (50%) Kulturembryonen zeigten keine Veränderung ihres endogenen Transkriptionsmusters. Eine Repression der endogenen *nodal*-Expression durch die Aktivin-getränkte Kugel wurde auch hier nicht gesehen (Tab.1).

Aktivin führte somit, sowohl kurz vor der endogenen *nodal*-Expression im Seitenplattenmesoderm des 1 und 2 Somitenstadiums als auch nach Beginn der endogenen *nodal*-Expression im 3 und 4 Somitenstadium, zur ektopischen Induktion von *nodal* und *Pitx2* im rechten Seitenplattenmesoderm. Aufgrund des Erhalts der linksseitigen Expressionsdomäne bewirkte dies eine bilaterale *nodal* und *Pitx2*-Expression. Die induzierte Expression war ausschließlich in der Seitenplatte detektierbar und spiegelte somit das Expressionsmuster der linken Seite wieder (Abb.12, A, B). Transversale Vibratomschnitte auf Höhe der platzierten Aktivin A-getränkten Acrylkugel bestätigten die ektopische Transkription im rechten Seitenplattenmesoderm, sowie den darüberliegenden Ektoderm- und den darunterliegenden Endodermzellen. Sie bescheinigten zudem, dass die morphologische Struktur des Embryos weder durch die Kugel selbst, noch durch den Wachstumsfaktor Aktivin beeinträchtigt wurde (Abb.12, A', B').

Obwohl in der normalen Entwicklung des Kaninchenembryos weder *nodal* noch *Pitx2* in der rechten Seitenplatte exprimiert werden, konnte mit diesem Experiment belegt werden, dass das rechte Seitenplattenmesoderm durchaus die Kompetenz besitzt, auf Nodal-Signale zu reagieren.

3.2.3 Funktionelle Analyse von FGF8 im Hinblick auf die asymmetrische linksseitige Expression von *nodal*

3.2.3.1 Keine ektopische Induktion von *nodal* und *Pitx2* durch FGF8 während des 1 bis 3 Somitenstadiums

In der Maus wurde durch das Plazieren von FGF8-Protein in die rechte Seitenplatte zum Zeitpunkt des 0 bis 2 Somitenstadiums eine ektopische Expression von *nodal* und *Pitx2* im rechten Seitenplattenmesoderm erzielt (Meyers und Martin, 1999). Dieser Befund, sowie der Phänotyp des hypomorphen *fgf8*-Allels sprachen dem FGF8 eine linksseitige induktive Funktion zu (Meyers und Martin, 1999). Zur Untersuchung einer auch im Kaninchen möglichen Induktion der *nodal*-Transkription durch FGF8, wurden Kaninchenembryonen FGF8-getränkte Acrylkugeln zum Zeitpunkt des 1 bis 3 Somitenstadiums in die rechte Seitenplatte eingesetzt (Abb.13, Skizze oben). Nach der Kultivierung dieser Embryonen bis zum 3 bis 6 Somitenstadium wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *nodal*- oder *Pitx2*-Sonde durchgeführt.

Alle 20 auf *nodal*-Transkription untersuchten Kulturembryonen zeigten ausschließlich die endogene Expressionsdomäne in der linken Seitenplatte (Abb.13, A, Tab.2). In keinem der analysierten Embryonen konnte eine Induktion in der rechten Seitenplatte oder um die FGF8-getränkte Acrylkugel beobachtet werden (Tab.2). Transversale Vibratomschnitte in Höhe der FGF8-Kugel bestätigten diesen Befund, sowie die normale morphologische Struktur der mit FGF8 behandelten Embryonen (Abb13, A').

In weiteren 6 Embryonen, die auf *Pitx2*-Expression hin analysiert wurden, fand sich ebenfalls nur die endogene Expression in der linken Seitenplatte (Abb.13, B). Die Aktivität des FGF8-Proteins konnte anhand von animalen Polkappen-Kulturen des *Xenopus*-Embryos bestätigt werden (Schweickert, nicht gezeigt). FGF8-

Applikation in das rechte Seitenplattenmesoderm, zum Zeitpunkt des 1 bis 3 Somitenstadiums, führte damit nicht zur ektopischen Induktion von *nodal* oder *Pitx2*.

Im Huhn konnte gezeigt werden, dass ektopisch links des Primitivstreifens plaziertes FGF8-Protein zur Repression der linken Seitenplattenexpression von *nodal* führt (Boettger et al., 1999). Aufgrund der zudem asymmetrischen rechtsseitigen Expression von *fgf8* im Huhn wurde dem FGF8 eine rechtsseitige repressive Funktion zugeordnet (Boettger et al., 1999). Zur Untersuchung einer ebenso im Kaninchen möglichen Repression von *nodal* durch FGF8, wurden FGF8-getränkte Acrylkugeln links des Primitivknotens von Kaninchenembryonen des 1 bis 3 Somitenstadiums implantiert (Abb.13, Skizze unten). Nach Erreichen des 3 bis 6 Somitenstadiums in der *in vitro* Kultur wurden die Kulturembryonen anhand einer *in situ* Hybridisierung auf ihr *nodal*-, bzw. *Pitx2*-Expressionsmuster analysiert.

In allen vier auf *nodal*-Expression untersuchten Kulturembryonen blieb die endogene *nodal*-Domäne in der linken Seitenplatte unverändert (Abb.13, C; Tab.2). Auch in der direkten Umgebung der FGF8-Kugel konnte keine Repression der *nodal*-Transkription beobachtet werden. Die unveränderte Expression im linken Seitenplattenmesoderm, sowie den darüberliegenden Zellen des epidermalen Ektoderms und den darunter angeordneten Zellen des Endoderms, als auch die morphologische Unversehrtheit des Kaninchenembryos, konnten durch transversale Schnitte in Höhe der FGF8-getränkten Acrylkugel belegt werden (Abb.13, C'). Weitere 7 Kulturembryonen, welche auf *Pitx2*-Transkription hin analysiert wurden, zeigten, ebenso wie schon bei *nodal* beobachtet, eine unbeeinträchtigte linke Expressionsdomäne (Abb.13, D; Tab.2).

Damit konnte FGF8, im 1 bis 3 Somitenstadium plazierte, weder die endogene *nodal* noch die endogene *Pitx2*-Expression der linken Seitenplatte reprimieren. FGF8 im Kaninchen schien daher weder induktiv noch reprimierend auf die *nodal*-Expression der Seitenplatte zu wirken. Dies widersprach folglich sowohl den Befunden in der Maus als auch den im Huhn erzielten Ergebnissen.

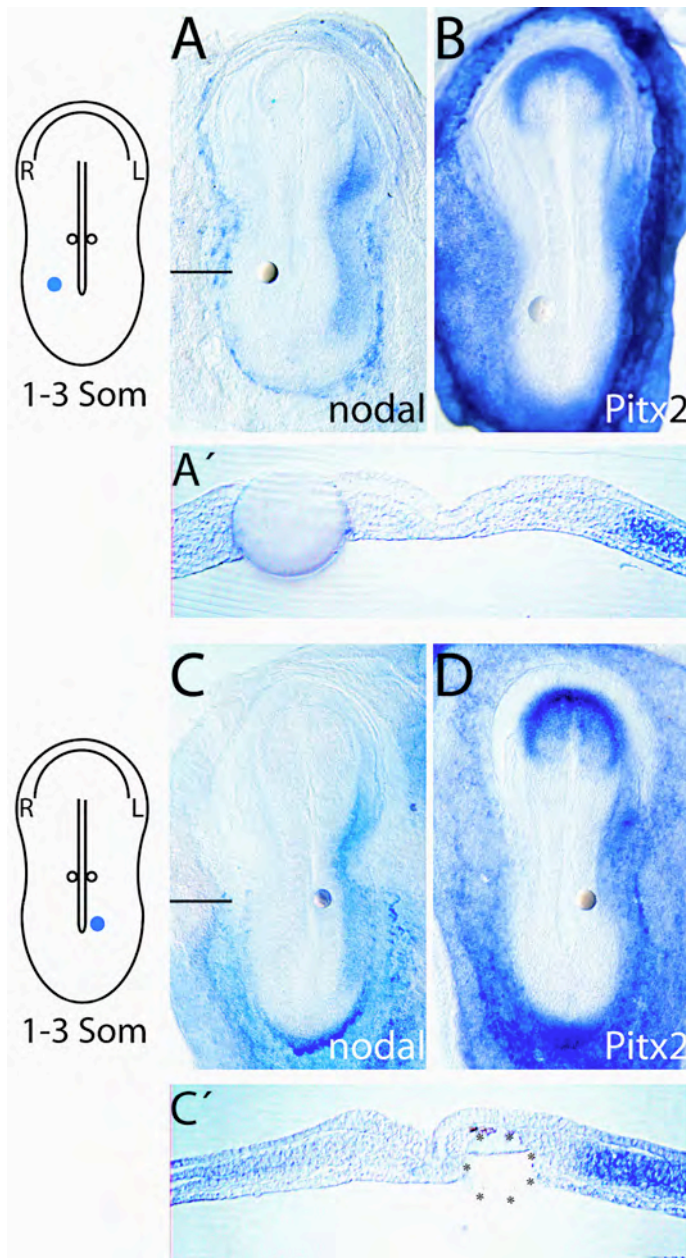


Abb. 13 FGF8 bewirkt keine Induktion von *nodal* und *Pitx2* in Somitenstadien von Kaninchen-Embryonen

FGF8-getränkte Acrylkugeln (1mg/ml) wurden im 1-3 Somitenstadium links und rechts neben den Primitivknoten plaziert. Die Embryonen wurden daraufhin kultiviert und einer *in situ* Hybridisierung unterzogen.

(A, B) Keine Induktion von *nodal* (A, A') und *Pitx2* (B) nach der Plazierung von FGF8-getränkten Acrylkugeln in die rechte Seitenplatte während des 1-3 Somitenstadiums.

(C, D) Keine Repression von *nodal* (C, C') und *Pitx2* (D) nach der Plazierung von FGF8-Acrylkugeln in die linke Seitenplatte während des 1-3 Somitenstadiums.

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an. Schematische Skizzen kennzeichnen Stadium und Plazierung der Acrylkugeln.

3.2.3.2 Repression von *nodal* durch FGF8 im Stadium 5 und 6

Die oben beschriebenen Experimente zeigten eindeutig, dass die Expression von *nodal* nicht durch lokal verabreichtes FGF8-Protein induziert werden kann. Die im 1 bis 3 Somitenstadium ausgebliebene Repression der *nodal*-Transkription könnte jedoch auf die kurz darauf einsetzende positive Autoregulation von *nodal* in der linken Seitenplatte zurückgeführt werden. Zu diesem Zeitpunkt plaziertes FGF8 wäre damit nicht mehr in der Lage diesen Rückführkreis zu unterbinden. Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurden in den folgenden Kulturexperimenten Kaninchenembryonen der Stadien 5 und 6 verwendet und diesen FGF8-getränkte Acrylkugeln links neben den Primitivknoten gesetzt (Abb.14, Skizze oben). Die bis

zum 3 bis 5 Somitenstadium kultivierten Embryonen wurden anschließend auf ihre *nodal*-Expression hin untersucht.

Von 36 untersuchten Kulturembryonen mit linksseitiger FGF8-getränkter Acrylkugel blieb in nur einem einzigen Embryo (3%) die normale linksseitige *nodal*-Expressionsdomäne erhalten (Tab.2). 31 (86%) der Embryonen konnten keine linksseitige Expression vorweisen (Abb.14, B, C; Tab.2). In 4 (11%) weiteren wurde die linksseitige *nodal*-Transkription im großem Umkreis um die FGF8-Applikation gehemmt, so dass nur eine kleine anteriore Restexpression im linken Seitenplattenmesoderm zu beobachten war (Abb.14, A; Tab.2, Stern). Dies deutete auf eine Repression der *nodal*-Aktivität durch lokal verabreichtes FGF8-Protein hin.

Protein oder sonst. Agenz	Stadium	Links (l) oder rechts (r) plaziert	Analy-siertes Gen	Linke Expr. (%)	Bi-laterale Expr. (%)	Keine Expr. (%)	Rechte Expr. (%)	Gesamt anzahl
FGF8	St 5-6	l	<i>nodal</i>	1 (3)	4 * (11)	21 (58)	10 (28)	36
		r	<i>nodal</i>	7 (33)		14 (67)		21
	1-3Som	l	<i>nodal</i>	4 (100)				4
		l	<i>Pitx2</i>	7 (100)				7
		r	<i>nodal</i>	20 (100)				20
r	<i>Pitx2</i>	6 (100)				6		
SU5402	1-2Som	r	<i>nodal</i>	5 (23)	17 (77)			22
		r	<i>Pitx2</i>	–	2			2
	3-4Som	r	<i>nodal</i>	3 (100)	–			3

Tab. 2: FGF8 reprimiert die endogene und der FGFR1-Inhibitor SU5402 induziert die ektopische Expression von *nodal* und *Pitx2*

Mit FGF8-Protein getränkte Acrylkugeln oder dem FGFR1-Inhibitor SU5402 getränkte Anionen-Austauscher-Gelkugeln wurden links (l) oder rechts (r) des Primitivknotens in den angezeigten Embryonalstadien plaziert, um nach erfolgreicher *in vitro* Kultur die Expression von *nodal* und *Pitx2* anhand einer *in situ* Kultur zu analysieren. Die in Klammer stehenden Zahlen belegen den prozentualen Anteil der jeweiligen Ergebnisse.

*Deutliche Reduktion der Expression im Umkreis der FGF8-Kugel und daher keine normale bilaterale Expression.

Vergleiche mit Kontrollembryonen mit linksseitig plazierten PBS-Acrylkugeln verdeutlichten den repressiven Effekt auf die *nodal*-Expression in den ohnehin

durch die Kultur gestörten Vorsomitenstadien, die hauptsächlich bilaterale oder keine *nodal*-Aktivität vorwies (Abb.10, B-D, Tab.1). Fand sich bei diesen Kontrollen in 41% der analysierten Embryonen ein Verlust der endogenen Expression, so wurde dies durch FGF8 auf 58% gesteigert. Gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der normalen linksseitigen Expression von 13% auf 3% (Tab.2). Die in Kontrollen mit 26% häufig auftretende bilaterale Expression sank auf 11% und gleichzeitig stieg die einseitig rechte Expression von 20 auf 28% an (Tab.2). Die statistische Verschiebung der Fälle von normaler linksseitiger zum gänzlichen Verlust der *nodal*-Transkription, sowie der bilateralen zugunsten der einseitig rechten Expression verdeutlichte die durch linkseitige FGF8-Plazierung erfolgte Repression im linken Seitenplattenmesoderm. Zudem wiesen alle vier bilateralen Fälle eine starke Repression in der Umgebung der linken FGF8-getränkten Acrylkugel auf.

Insgesamt wurde daher nur in einem einzigen Fall (3%) von 36 mit FGF8 linksseitig behandelten Kaninchenembryonen der Stadien 5 und 6 die normale endogene Expression in der linken Seitenplatte gesehen. In den restlichen 35 (97%) Kulturembryonen wurde keine oder eine im Umkreis der FGF8-Plazierung reprimierte Expression in der linken Seitenplatte beobachtet. Lokal links vom Primitivknoten verabreichtes FGF8-Protein reprimierte daher die Expression von *nodal* in der linken Seitenplatte im Stadium 5 und 6.

In transversalen Vibratomschnitten konnte der Verlust der endogenen linken Expression, vor allem im Vergleich zu der durch die Kultur in diesem Stadium verursachten ektopischen rechten Expression, bestätigt werden (Abb.14, A'). Desweiteren konnte die auch schon in den 1 bis 3 Somitenstadien beobachtete normale Entwicklung der mit FGF8 linksseitig behandelten Vorsomiten-Embryonen verdeutlicht werden.

Da in 57% der unbehandelten Kontrollembryonen eine bilaterale Expression während der Kultur auftrat (Abb.10, C-D; Tab. 1), stellte sich die Frage, ob eine rechtsseitige FGF8-Applikation ebenfalls zur Repression der ektopischen *nodal*-Expression führen würde. Daher wurden Kaninchenembryonen der Stadien 5 und 6 FGF8-getränkte Acrylkugeln rechts des Primitivknotens implantiert (Abb.14, Skizze unten). Nach Übernachtskultur konnten die Embryonen des 3 bis 5

Somitenstadiums, anhand einer *in situ* Hybridisierung, auf ihre *nodal*-Expression analysiert werden.

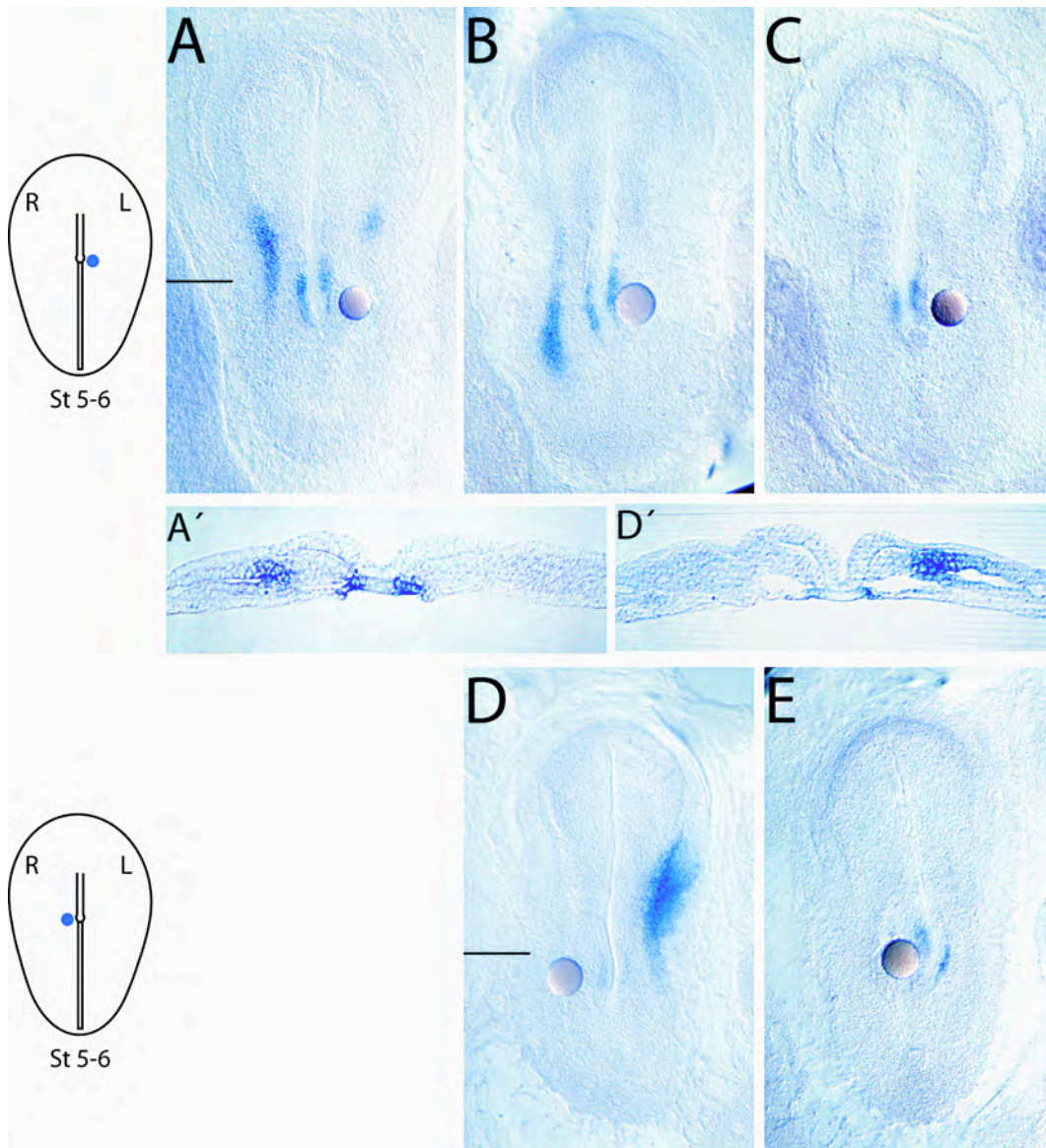


Abb. 14 FGF8 reprimiert *nodal* in Vorsomitenstadien des Kaninchens

FGF8-getränkte Acrylkugeln (1mg/ml) wurden im Stadium 5-6 links und rechts des Primitivknotens plaziert. Die Embryonen wurden daraufhin kultiviert und einer *in situ* Hybridisierung unterzogen.

(A-C) Die Plazierung von FGF8-getränkten Acrylkugeln (1mg/ml) auf die linke Seite des Primitivknotens verhinderte die normale *nodal*-Expression im linken Seitenplattenmesoderm.

(B, C) Die gesamte Seitenplattenexpression wurde reprimiert.

(A, A') Die Expressionsdomäne in der Umgebung der FGF8-getränkten Acrylkugel wurde gehemmt (siehe auch Tabelle2).

(D, D', E) Die Applikation von FGF8-getränkten Acrylkugeln auf die rechte Seite des Primitivknotens verhinderte die ektopische Induktion der *nodal*-Expression, die aufgrund der Kultur von Vorsomitenstadien auftrat (siehe Abb. 10 und Text).

(A', D') Die Morphologie der Embryonen wurde durch die FGF8-Behandlung nicht gestört.

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an. Schematische Skizzen kennzeichnen Stadium und Plazierung der Acrylkugeln.

Eine Expression im rechten Seitenplattenmesoderm, wie sie in der Kontrollkultur in Form einer bilateralen Expression erscheint, konnte in keinem einzigen der 21 mit rechter FGF8-getränkter Acrylkugel versehenen Embryonen beobachtet werden (Tab.2). Gleichzeitig wurde in 7 (33%) der behandelten Kulturembryonen die normale linksseitige Expressionsdomäne detektiert (Abb.14, D; Tab.2). Im Vergleich zu den mit rechter PBS-Kugel versehenen Kontrollembryonen sank somit die bilaterale Expression von 36% auf 0%, bei einem gleichzeitigen Anstieg der einseitigen linken Expression von 21% auf 33% (Tab.2). Die restlichen 14 (67%) Embryonen zeigten keine Expression in der Seitenplatte, was einen Anstieg dieser Fälle von 43% auf 67% bedeutete (Abb.14, E; Tab.2). Embryonen mit einseitiger rechter Expression traten, wie auch bei den mit rechten PBS-Kontrollkugeln beladenen Embryonen, nicht auf (Tab.1).

Der Verlust des in Kontrollembryonen vorkommenden bilateralen Expressionsmusters und der gleichzeitige Anstieg an Embryonen mit linksseitiger Expression ließen auf eine Repression von *nodal* durch rechts vom Primitivknoten verabreichtes FGF8-Protein schließen. Ausserdem konnte in keinem der untersuchten 21 Kaninchenembryonen eine ektopische rechtsseitige Expression beobachtet werden.

Anhand des Balkendiagramms in Abb. 15 kann die repressive Wirkung des FGF8 sowohl auf die endogene linksseitige als auch auf die durch die Kultur verursachte rechtsseitige *nodal*-Expression im Stadium 5 und 6 verdeutlicht werden. Hierzu wurden die FGF8-Kulturen den entsprechenden PBS-Kontrollen der Stadien 5 und 6 gegenübergestellt und die Repression der *nodal*-Expression nach linker, bzw. rechter Applikation von FGF8, bzw. PBS analysiert. Diese Untersuchung berücksichtigte auch die linken und rechten Seitenplattenexpressionen der durch die Kultur erzeugten bilateralen Expressionsmuster.

Links plaziertes FGF8 führte zu einem starken Rückgang der endogenen linken Expression von *nodal* von 39% in den Kontrollen auf 3% in den FGF8-Kulturen. Rechts plaziertes FGF8 führte zu einem absoluten Verlust der rechtsseitigen Expressionsdomäne von 36% auf 0%. Dies zeigt deutlich die inverse Korrelation zwischen FGF8 und der *nodal*-Expression in der Seitenplatte.

Transversale Schnitte in Höhe der endogenen Expressionsdomäne bestätigten das Fehlen ektopischer *nodal*-Expression in der rechten Seitenplatte sowie die

normale morphologische Entwicklung der rechtsseitig mit FGF8-beladenen Vorsomiten-Embryonen (Abb.14, D').

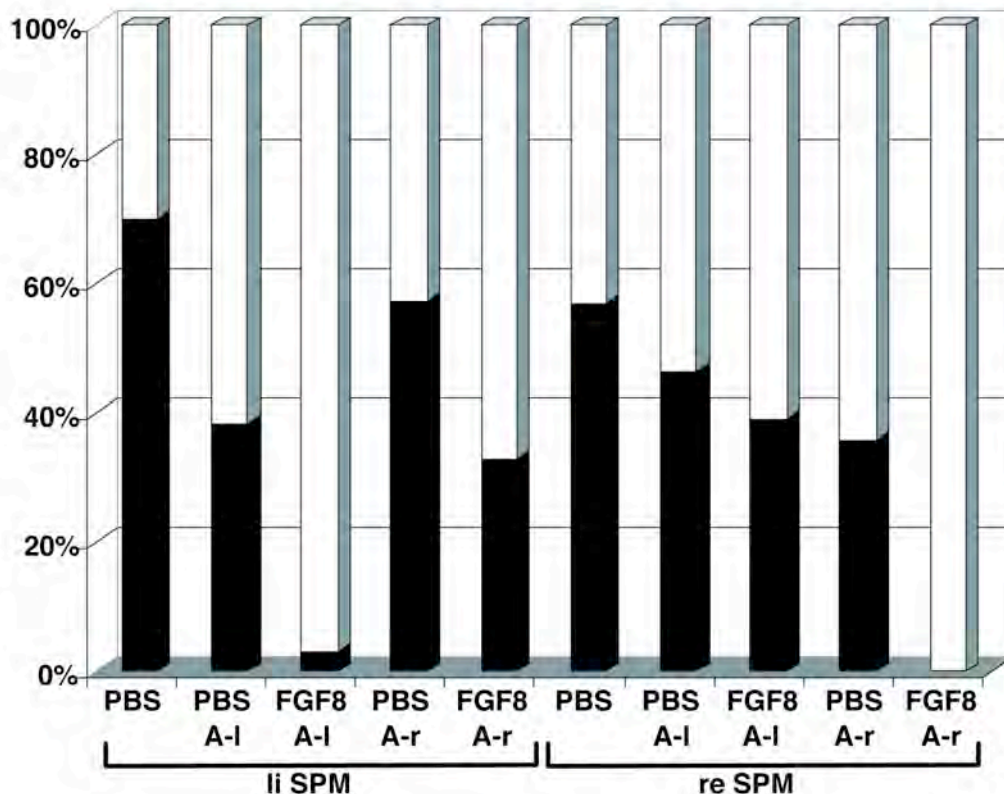


Abb. 15 Der repressive Effekt des FGF8 auf die *nodal*-Expression im Stadium 5 und 6 im Vergleich mit den entsprechenden PBS-Kontrollen

Zur Verdeutlichung des repressiven Effekts im Stadium 5 und 6, wurden die linken und rechten Seitenplattenexpressionen der bilateralen Kulturartefakte mit den einseitigen linken und rechten Expressionsmustern zusammengefaßt. Untersucht wurde der prozentuale Anteil an linker (li SPM) und rechter (re SPM) Seitenplattenexpression von *nodal* nach der Applikation von PBS und FGF8 links (A-l) und rechts (A-r) des Primitivknotens, im Vergleich zu unbehandelten Kulturembryonen. Die Plazierung der PBS-getränkten Acrylkugel resultierte bereits in einer Verringerung der jeweiligen Seitenplattenexpression. Die linksseitige Applikation von FGF8 führte jedoch zu einem vergleichsweise sehr starken Rückgang der linksseitigen Expression auf 3%. Die rechtsseitige Applikation bewirkte sogar den absoluten Verlust der rechten Expressionsdomäne.

3.2.4 BMP4 induziert *nodal* und *Pitx2* im paraxialen Mesoderm und in der rechten Seitenplatte

Die inverse Korrelation zwischen der *nodal*-Expression und der Plazierung von FGF8-getränkten Acrylkugeln im Vorsomitenstadium legte eine repressive Wirkung von FGF8 nahe. Unklar blieb, weswegen sich die Repression auf dieses enge Zeitfenster beschränkte. Fraglich schien insbesondere, ob *nodal* im 1 bis 3

Somitenstadium überhaupt reprimierbar ist, da die Transkription durch die Nodal-Signalkette ständig induziert wird. Im Hühnerembryo wurde gezeigt, dass links des Primitivknotens plaziertes BMP4 die Repression der *nodal*-Expression in der linken Seitenplatte bewirken kann (Rodriguez Esteban, et al., 1999). Anhand von lokaler BMP4-Applikation sollte daher überprüft werden, bis zu welchem Entwicklungszeitpunkt eine Repression von *nodal* in der linken Seitenplatte überhaupt möglich ist.

Kaninchenembryonen der Stadien 5/6 bishin zum 3 Somitenstadium wurden BMP4-getränkte Acrylkugeln mit einer Konzentration von 100 μ g/ml links des Primitivknotens gesetzt (Abb.16, Skizze oben). Die so behandelten Embryonen entwickelten sich in der *in vitro* Kultur bis zum 3 bis 6 Somitenstadium, in dem die Seitenplattenexpression anhand einer *in situ* Hybridisierung mit einer *nodal*- oder *Pitx2*-Sonde untersucht werden konnte.

Erstaunlicherweise konnte in keinem der untersuchten Embryonen eine Hemmung der endogenen linksseitigen *nodal*- und *Pitx2*-Expressionsdomäne beobachtet werden. Statt dessen traten zwei unerwartete Effekte auf: Zum einen erfolgte eine ektopische rechtsseitige und damit bilaterale Expression von *nodal* und *Pitx2* (Abb.16, B, D). Zum anderen wurde eine Verstärkung der endogenen Expression von *nodal* und *Pitx2* im Seitenplattenmesoderm und eine ektopische Expression im benachbarten paraxialen Mesoderm sowie dem darunterliegenden Endoderm beobachtet (Abb.16, A, B, C, D; Tab.3). Diese ektopische Expression im paraxialen Mesoderm umspannte eine Region, die posterior von der Mittellinienexpression von *nodal* ausging und anterior bis an das unter der Neuralplatte liegende Kopfmesenchym grenzte. Aufgrund dieser ektopischen Expression konnte *nodal*- und *Pitx2*-mRNA in der gesamten linken Seite des Kulturembryos, abgesehen vom naszierenden Mesoderm der Primitivstreifenregion und dem Kopfmesenchym, detektiert werden (Abb.16, A, B, C, D).

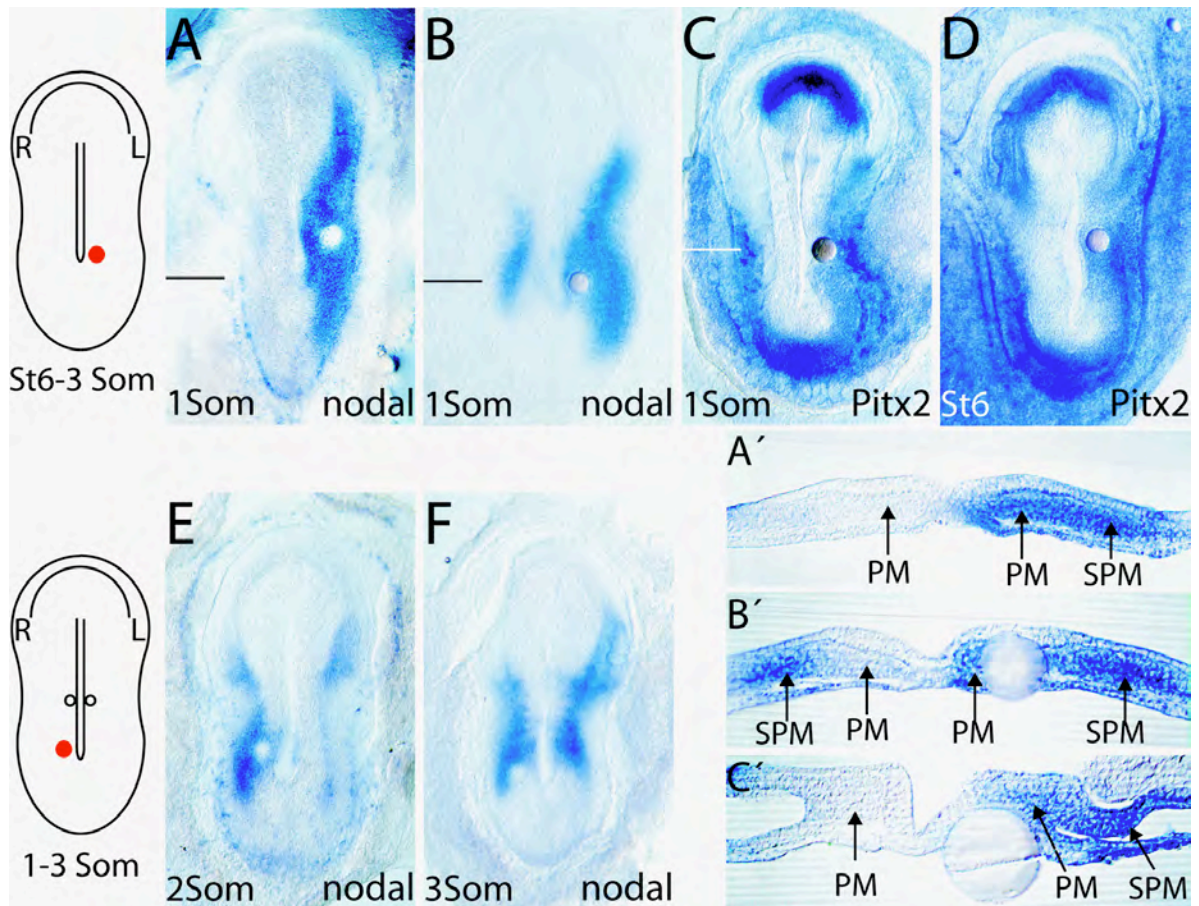


Abb. 16 BMP4 induziert *nodal* und *Pitx2* im paraxialen Mesoderm in Neurula- und frühen Somitenstadien

BMP4-getränkte Acrylkugeln (100 µg/ml) wurden im Stadium 6 bis hin zum 3 Somitenstadium auf die linke, bzw. rechte Seite des Primitivknotens gesetzt. Die Embryonen wurden daraufhin kultiviert und einer *in situ* Hybridisierung unterzogen.

(A, C) Ektopische Induktion von *nodal* (A, A') und *Pitx2* (C, C') im paraxialen Mesoderm (PM), sowie im darunterliegenden Endoderm nach Platzierung einer BMP4-getränkten Acrylkugel links vom Primitivknoten zwischen Stadium 6 und dem 3 Somitenstadium.

(B, D) Zusätzlich zur ektopischen Expressionsdomäne im paraxialen Mesoderm und Endoderm erfolgte ektopische Induktion von *nodal* (B, B') und *Pitx2* (D) im rechten Seitenplattenmesoderm (SPM).

(E, F) Ektopische Induktion von *nodal* erfolgte auch im rechten paraxialen Mesoderm nach Platzierung einer BMP4-getränkten Acrylkugel auf die rechte Seite des Primitivknotens im 1-3 Somitenstadium.

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an. Schematische Skizzen kennzeichnen Stadium und Platzierung der Acrylkugeln.

In transversalen Schnitten wurde die Expression von *nodal* und *Pitx2* im gesamten Meso- und Endoderm der linken Seite sowie dem darüberliegenden epidermalen Ektoderm sichtbar (Abb.16, A', B', C'). Das Neuroektoderm und die Mittellinie blieb dabei immer frei von *nodal*- und *Pitx2*-Transkripten.

Die durch eine BMP4-Konzentration von 100 µg/ml verursachte Verbreiterung der endogenen linken Seitenplattenexpression von *nodal* wurde bei im 1 bis 3

Somitenstadium in Kultur genommenen Kaninchenembryonen in 7 (37%) von 19 Embryonen (Abb.16, A, B; Tab.3, Wt + l, Bi + l) gefunden. Die restlichen 12 Kulturen (63%) wiesen die normale Expression in der Seitenplatte auf (Tab.3, Wt, Bi).

Ebenso wurden Kaninchenembryonen des Stadiums 5 und 6 BMP4-getränkte Acrylkugeln links des Primitivknotens implantiert. Gerade die Stadien 5a konnten sich daraufhin nicht normal weiterentwickeln und wurden daher nicht auf ihr *nodal*-Expressionsmuster analysiert (nicht gezeigt).

Embryonen, die im Stadium 5b/6 in Kultur genommen wurden und sich morphologisch normal entwickelten, zeigten ebenso wie die Somitenstadien keine Repression der endogenen Expressionsdomäne. Statt dessen konnte auch hier mit einer BMP4-Konzentration von 100 ng/ml eine Verbreiterung der Seitenplattenexpression von *nodal* in 3 von 3 untersuchten Embryonen beobachtet werden (Abb.16, D; Tab.3, Bi + l, Bi + bi).

Die *Pitx2*-Expression wurde in 8 Kulturembryonen nach linksseitiger Platzierung von BMP4 untersucht, wovon 7 im Stadium 5/6 und ein Embryo im 1 Somitenstadium in Kultur genommen wurde (Tab.3). Eine Verbreiterung der *Pitx2*-Expression wurde in 6 (75%) dieser 8 Embryonen gesehen (Abb.16, C, D; Tab.3, Wt + l, Bi + l, Bi + bi). Die beiden anderen zeigten die normale *Pitx2*-mRNA-Verteilung (Tab.3, Wt).

BMP4-Applikation links des Primitivknotens führte somit vom Stadium 5b bis hin zum 3 Somitenstadium in keinem der untersuchten Embryonen zu einer Repression der linken Seitenplattenexpression von *nodal* und *Pitx2*. Jedoch konnte eine ektopische Expression der beiden Seitenplattenmarker im paraxialen und darunterliegenden Endoderm und damit eine Verbreiterung der linksseitigen Expression beobachtet werden. Eine exakte Auswertung dieser Versuchsreihen wies daraufhin, dass der Effekt der Verbreiterung hauptsächlich in den Stadien 6 bis hin zum 1 Somitenstadium und weniger häufig im 2 und 3 Somitenstadium zu finden waren. BMP4 bewirkte somit entgegengesetzt den Erwartungen eine Induktion von *nodal* und *Pitx2* in Neurula- und frühen Somitenstadien des Kaninchens.

Gen	Stad.	BMP4-Konz.	Wt	Wt + l	bi	Bi + l	Bi + r	Bi + bi	Gesamtanzahl
<i>nodal</i>	1-3 Som	100	6	2	6	5	-	-	19
		10	1	-	-	-	-	-	1
	St 5-6	100	-	-	-	2	-	1	3
		10	1	1	-	-	-	-	2
<i>Pitx2</i>	1-3 Som	100	-	1	-	-	-	-	1
	St 5-6	100	2	3	-	1	-	1	7
<i>lefty</i>	1-3 Som	100	5	4	4	-	3	1	17
□			15/30%	11/22%	10/20%	8/16%	3/6%	3/6%	50

Tabelle 3: BMP4 induziert die ektopische Expression von *nodal*, *Pitx2* und *lefty*

BMP4-Protein der Konzentration von 10 oder 100 μ g/ml wurde links des Primitivknotens in den genannten Stadien (Stad.) plaziert, um nach erfolgreicher Kultur die Expression der linken Seitenplattengene anhand einer *in situ*-Hybridisierung zu untersuchen. Die letzte Reihe zeigt die Summe der einzelnen Ergebnisse und deren prozentuelles Auftreten.

„+“ bezeichnet die Induktion der jeweiligen Markergen-Expression im paraxialen Mesoderm, sowie dem darunterliegenden Endoderm auf der linken (l), der rechten (r) oder auf beiden (bi) Seiten.

Wie oben bereits erwähnt, wurde auch eine ektopische Induktion in der rechten Seitenplatte beobachtet, die unabhängig von einer linksseitigen Verbreiterung oder auch gemeinsam mit dieser auftrat (Abb.16, B, D). In den im Stadium 5b und 6 in Kultur genommenen Embryonen, die sowohl auf *nodal*-, als auch auf *Pitx2*-Expression hin analysiert wurden, trat dies in 5 (50%) von 10 Fällen auf (Tab.3, Bi + l, Bi + bi), was auf die durch die frühe Kultur auftretenden Störungen zurückgeführt werden konnte.

In weiteren 11 (58%) von 19 der im 1 bis 3 Somitenstadium in Kultur genommenen Kaninchenembryonen, die auf *nodal*-Expression hin untersucht wurden, konnte jedoch ebenso eine bilaterale Expression gesehen werden (Tab.3, Bi, Bi + l). Diese trat in Kontrollembryonen (Tab.1) dieses Stadiums in nur maximal 15% auf und konnte daher auf die Wirkung des BMP4 zurückgeführt werden. Die rechte Expressionsdomäne beschränkte sich in diesem Stadium ausschließlich auf das Seitenplattenmesoderm und die darüber und darunterliegenden ektodermalen und endodermalen Zellen und wurde nie, wie häufig auf der linken Seite, im paraxialen Mesoderm gesehen (Abb.16, B'). Allerdings konnte in 2 Embryonen, die im

Stadium 5b in Kultur genommen und nach BMP4-Behandlung auf *nodal*- und *Pitx2*-Expression hin untersucht wurden, auch eine ektopische Expression im kontralateralen paraxialen Mesoderm beobachtet werden (Tab.3, Bi + bi).

In 4 weiteren Kaninchenembryonen der 1 bis 3 Somitenstadien wurde BMP4-Protein rechts des Primitivknotens implantiert (Abb.16, Skizze unten) und nach erfolgter Kultur die *nodal*-Expression analysiert. Dabei zeigte sich in 3 von 4 untersuchten Embryonen eine ektopische Expression im rechten Seitenplattenmesoderm, welche sich in 2 Fällen zusätzlich auf das paraxiale Mesoderm ausweitete (Abb.16, E, F).

Zusammenfassend führte links sowie rechts des Primitivknotens verabreichtes BMP4, im Stadium 5/6 und im 1 bis 3 Somitenstadium, zur Induktion von *nodal* und *Pitx2* im paraxialen Meso- und dem darunterliegenden Endoderm und löste damit eine Verbreiterung der Expression bis zur Mittellinie aus.

Desweiteren verursachte der rechts, aber auch der links im 1 bis 3 Somitenstadium gesetzte Wachstumsfaktor eine ektopische Expression in der rechten Seitenplatte.

3.2.5 BMP4 induziert *lefty* im paraxialen Mesoderm und reprimiert dessen Expression in der Mittellinie

Eine den BMP4-Kulturen des 1 bis 3 Somitenstadiums vergleichbare bilaterale *nodal*-Expression tritt in Mäusemutanten stets in Verbindung mit einer defekten Mittellinie, bzw. fehlender *lefty1*-Expression in der Bodenplatte auf (Chiang et al., 1996; Melloy et al., 1998; Meno et al., 1998; Izraeli et al., 1999; Meyers und Martin, 1999; Tsukui et al., 1999). In Hühnerembryonen konnte zudem gezeigt werden, dass neben der Mittellinie plaziertes BMP4-Protein die Expression von *lefty1* in der Bodenplatte reprimiert (Yokouchi et al., 1999). Die durch BMP4 verursachte bilaterale Expression von *nodal* und *Pitx2* schien damit auf eine gleichzeitige Repression der *lefty1*-Expression in der Mittellinie zurückzuführen zu sein.

Zur Untersuchung der *lefty1*-Expression nach erfolgter BMP4-Applikation, wurden Kaninchenembryonen zum Zeitpunkt des 1 bis 3 Somitenstadiums BMP4-getränkte Acrylkugeln links neben die Mittellinie gesteckt (Abb.17, Skizzen links oben und unten) und im Anschluss an die Kultur einer *in situ* Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *lefty*-Sonde unterzogen. Als Kontrolle wurden 5 weiteren Kaninchenembryonen des 1 bis 3 Somitenstadiums PBS-getränkte Acrylkugeln implantiert (Abb.17, Skizze rechts unten).

Wie in den Kontrollembryonen (Abb.17, D) ersichtlich und bereits in Kapitel 3.1 "Links-Rechts-Markergene im Kaninchenembryo" beschrieben, erkannte die für diese Experimente eingesetzte *lefty*-Sonde beide der im Kaninchen vorkommenden *lefty*-Isoformen, *lefty1* und *lefty2*. Aufgrund dieser zwei Isoformen konnten in den 17 mit BMP4 behandelten und auf *lefty*-Expression analysierten Kaninchenembryonen drei Effekte beobachtet werden:

In 8 (47%) Kulturembryonen wurde, ebenso wie bei *nodal* und *Pitx2*, eine ektopische Expression von *lefty2* im paraxialen Seitenplattenmesoderm sowie dem darunterliegenden Endoderm, also eine Verbreiterung der Seitenplattenexpression zur Mittellinie hin, beobachtet (Abb.17, A, B; Tab.3, Wt + l, Bi + r, Bi + bi). Diese Verbreiterung fand sich ähnlich wie bei *nodal* und *Pitx2* zwischen der Mittellinie und der Seitenplatten-*lefty2*-Domäne. Sie glich jedoch, da *lefty2* hauptsächlich nur im posterioren Seitenplattenmesoderm zu finden ist, eher einer schmalen Brücke zwischen Primitivknoten und posteriorer Mittellinien-Domäne auf der einen und der posterioren Seitenplattendomäne auf der anderen Seite. In transversalen Schnitten wird die Verteilung der *lefty2*-mRNA in allen drei Keimschichten des Primitivknotens, dem benachbarten paraxialen Mesoderm und Seitenplattenmesoderm und dem darunterliegenden Endoderm deutlich (Abb.17, A´). Im paraxialen Mesoderm auf Höhe der Somiten, also auch im Umfeld der BMP4-getränkten Acrylkugel, konnte kein *lefty2* induziert werden (Abb.17, A, A´).

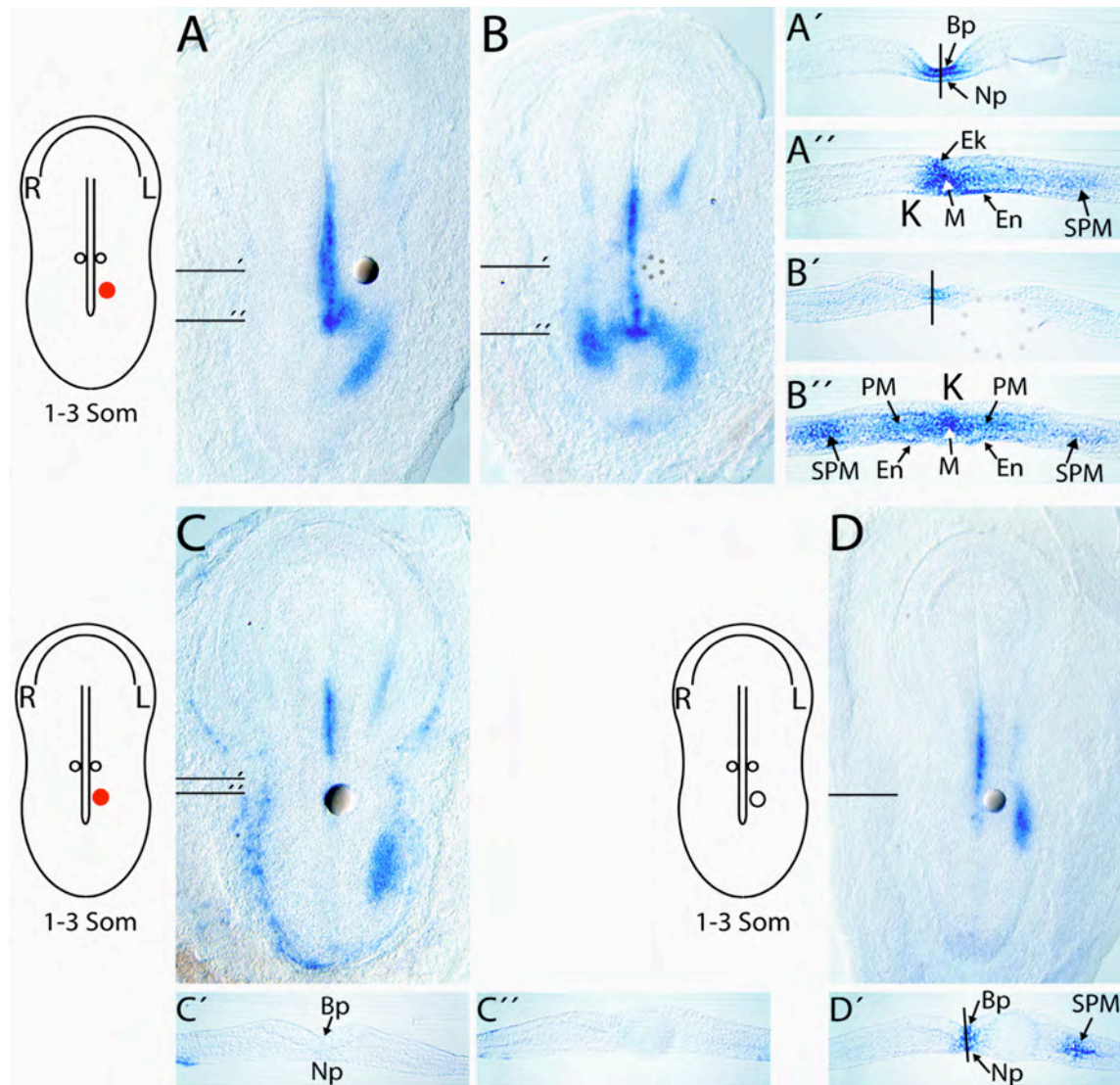


Abb. 17 BMP4 induziert *lefty* im paraxialen Mesoderm und reprimiert *lefty* in der Mittellinie in Somitenstadien

BMP4-getränkte Acrylkugeln (1mg/ml) wurden im 1-3 Somitenstadium auf die linke Seite der Mittellinie gesetzt. Die Embryonen wurden daraufhin kultiviert und mittels einer *lefty*-Sonde, die sowohl *lefty1* als auch *lefty2* erkannte *in situ* hybridisiert.

(A, A´) BMP4, links der Mittellinie plaziert, führte zu ektoptischer Expression von *lefty2* im paraxialen Mesoderm (PM) und dem darunterliegenden Endoderm (En). Diese ektoptische Domäne befand sich zwischen der normalen Mittellinienexpression in Notochordplatte (Np), Bodenplatte (Bp) sowie dem Primitivknotenmesoderm (M) und der Expression im Seitenplattenmesoderm (SPM).

(B, B´) Zudem erfolgte ektoptische Induktion von *lefty2* auch im rechten Seitenplattenmesoderm (SPM).

(B, C) Die Mittelliniendomäne von *lefty1* wurde durch eine dicht plazierte BMP4-getränkte Acrylkugel reprimiert (Vergleich A´ mit B´, sowie C´´), wobei die Struktur der Mittellinie durch die Plazierung des BMP4 unbeeinträchtigt blieb (C´).

(D, D´) Normale *lefty*-mRNA-Lokalisation im Seitenplattenmesoderm (SPM), der Bodenplatte (Bp) und dem posterioren Teil der Notochordplatte (Np) nach Plazierung einer PBS-getränkten Kontrollacrylkugel auf die linke Seite der Mittellinie.

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an. Schematische Skizzen kennzeichnen Stadium und Plazierung der Acrylkugeln.

Zusätzlich wurde als zweiter Effekt, ähnlich wie bei *nodal* und *Pitx2*, in 8 (47%) der 17 untersuchten Embryonen auch eine ektopische Expression von *lefty2* in der rechten Seitenplatte gefunden (Abb.17, B, B´; Tab.3, Bi, Bi + r, Bi + bi), die sich in 4 Fällen auch auf das rechte paraxiale Mesoderm ausweitete (Abb.17, B, B´; Tab.3, Bi + r, Bi + bi).

Als dritter Effekt konnte in 5 (29%) der 17 Kulturembryonen eine deutliche Hemmung der Mittellinienexpression von *lefty1* in der Umgebung der BMP4-getränkten Acrylkugel beobachtet werden (Abb.17, C), welche in den 5 Kontrollembryonen nie gesehen wurde (Abb.17, D, D´). In 10 weiteren war die Expression in der Mittellinie meist auf Höhe der BMP4-getränkten Acrylkugel abgeschwächt (Abb.17, B, B´). Transversale Schnitte in Höhe der BMP4-getränkten Acrylkugel bestätigten dabei die Unversehrtheit von Notochordplatte und der darüberliegenden Bodenplatte (Abb.17, C´, C´´).

Somit bewirkte links der Mittellinie plaziertes BMP4 eine Verbreiterung der Seitenplattenexpression von *lefty2*, die auch für die beiden anderen Seitenplattenmarker *nodal* und *Pitx2* beobachtet werden konnte. Ebenso wurde auch für *lefty2* eine bilaterale Expression festgestellt. *lefty2* verhält sich demzufolge ebenso wie *nodal* und *Pitx2*, es wird durch BMP4 induziert. BMP4 wirkt folglich unerwarteterweise als Induktor sämtlicher linksseitiger Seitenplattenmarkergene.

Die Expression von *lefty1* in der Mittellinie wird hingegen durch BMP4 reprimiert und entspricht damit den im Huhn beobachteten Ergebnissen. Diese Repression erklärt die zusätzlich durch BMP4 hervorgerufene bilaterale Expression von *nodal*, *Pitx2* und *lefty2*.

3.2.6 FGF8 hemmt die durch BMP4 erzeugte Expression von *nodal*

Die überraschenderweise durch BMP4 erzeugte Induktion von *nodal* in der Seitenplatte, sowie im paraxialen Mesoderm bot die Möglichkeit die oben

beschriebene repressive Wirkung von FGF8 auf *nodal* gegen die induktive Wirkung von BMP4 zu testen. Dazu wurden Kaninchenembryonen der Stadien 6 und des sich gerade erst entwickelnden 1 Somitenstadiums (0/1 Somiten) verwendet, welche sowohl kompetent für eine Repression als auch eine Induktion von *nodal* waren. Diesen wurden BMP4-getränkte Acrylkugeln links neben den Primitivknoten und gleichzeitig FGF8-getränkte Acrylkugeln, lateral-posterior davon, in die posteriore Seitenplatte gesteckt (Abb.18, Skizze oben links).

Bei einer auch in den vorherigen Versuchen verwendeten Konzentration des BMP4 von 100 μ g/ml konnte, bei einem der drei untersuchten Embryonen, nur in einem schmalen Ring um die FGF8-getränkte Acrylkugel eine Repression der *nodal*-Expression beobachtet werden. Die durch BMP4 verursachte *nodal*-Expression war gerade bei dem in Abb. 18 A gezeigten Embryo so stark, dass nur die Neuralplatte, das darunterliegende Kopfmesenchym sowie das naszierende Mesoderm ausgespart wurde (Abb.18, A, A', A'', A'''; Tab.4). In transversalen Schnitten kann man die starke Induktion von *nodal* in der gesamten linken Seite, oberhalb der BMP4-getränkten Acrylkugel, mit der deutlich schwächeren Expression um die FGF8-getränkte Kugel vergleichen (Abb.18, A'', A'''). Dieses Ergebnis verdeutlichte die starke Induktion durch Bmp4 auch in der endogenen Expressionsdomäne von *nodal*, die mit FGF8 alleine leicht hätte reprimiert werden können.

Um den Effekt des FGF8 deutlicher hervorzuheben, wurde die Konzentration des BMP4 auf 50 (Abb.18, B; Tab.3) sowie 10 μ g/ml (Abb.18, C; Tab.4) gesenkt. Mit einer Konzentration von 50 μ g/ml konnte in 3 der 5 untersuchten Kulturembryonen eine deutliche Repression in einem großem Umkreis um die FGF8-Kugel, beobachtet werden (Abb.18, B, B', B'', B'''; Tab.4). Diese Repression betraf sowohl die endogene als auch die ektopisch im paraxialen Mesoderm erzeugte Expression.

Bei einer BMP4-Konzentration von 10 μ g/ml wurde ebenfalls der inhibitorische Effekt von FGF8 auf die *nodal*-Expression in 5 der 7 analysierten Kaninchenembryonen beobachtet. Das Ausmaß der Repression verdeutlichte sich vor allem im Vergleich mit Kontroll-Embryonen, denen neben BMP4 eine PBS-

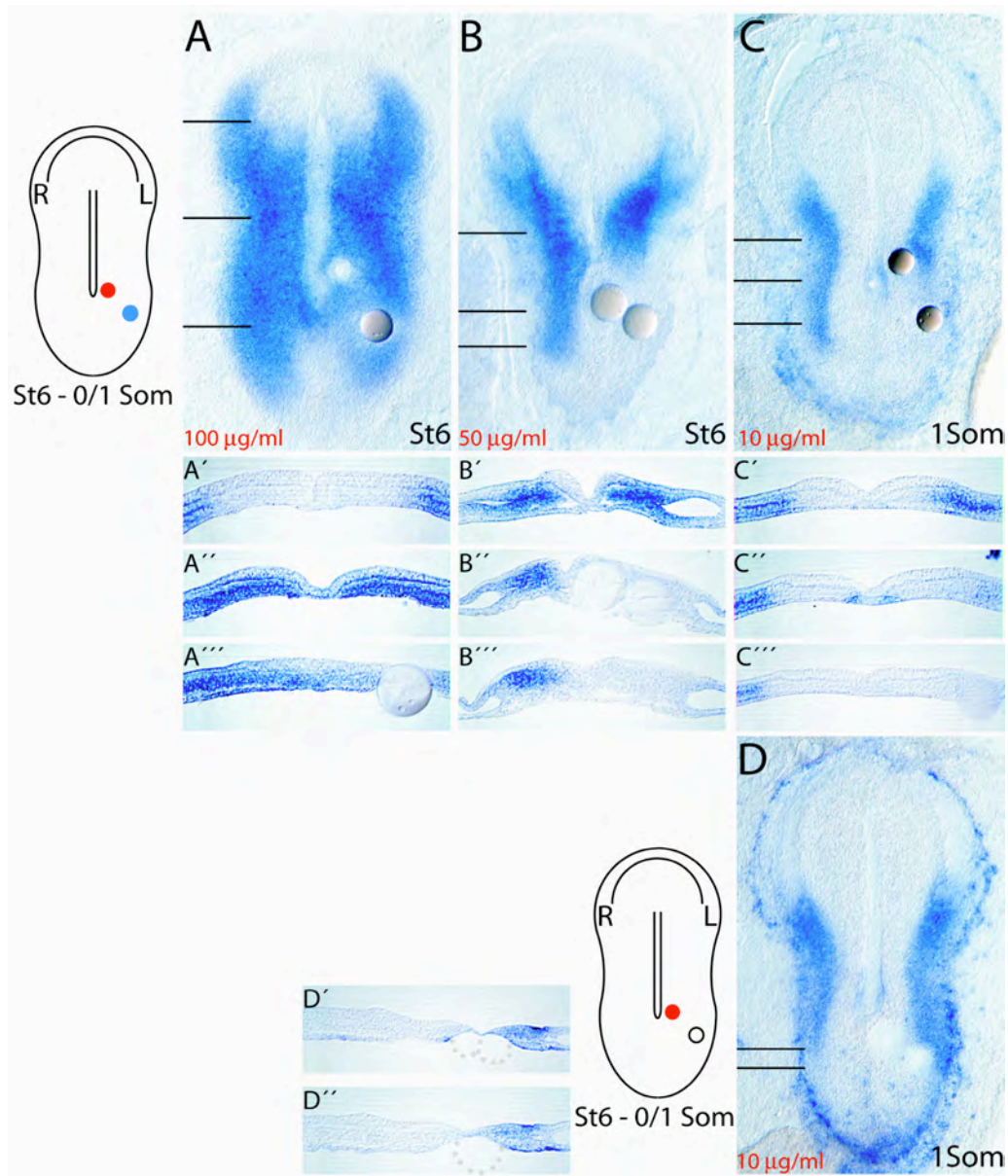


Abb. 18 FGF8 reprimiert die durch BMP4 erzeugte ektopische *nodal*-Expression in Neurula- und frühen Somitenstadien

Kaninchenembryonen des Stadium 6 und des gerade entstehenden 1 Somitenstadiums (0/1Som) wurden BMP4- (10, 50, 100 µg/ml) getränkte Acrylkugeln links neben den Primitivknoten sowie gleichzeitig FGF8 (1mg/ml) getränkte Acrylkugeln in das posteriore Seitenplattenmesoderm gesetzt. Nach erfolgreicher *in vitro* Kultur wurden diese einer *in situ* Hybridisierung unterzogen.

(A-C) Die zusätzliche Platzierung einer FGF8-getränkten Acrylkugel (1mg/ml) neben eine BMP4-getränkte Acrylkugel resultierte in der Repression der ektopischen *nodal* Induktion. Diese Repression war abhängig von der Konzentration des BMP4.

(A) Schwache Repression von *nodal* durch FGF8 bei einer BMP4-Konzentration von 100µg/ml (Vergleiche A''' mit A''), die eine *nodal*-Induktion im gesamten Embryo, abgesehen von der Neuralplattenregion und dem naszierenden Mesoderm, bewirkte.

(B, C) Starke Repression von *nodal* durch FGF8 bei einer BMP4-Konzentration von 50 (B, B'-B''') bzw. 10 µg/ml (C, C'-C''').

(D) Keine Repression von *nodal* nach lokaler Verabreichung von BMP4 und PBS. Die Expressionsdomäne von *nodal* reichte bis dicht an die PBS-Acrylkugel heran (D', D'').

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an. Schematische Skizzen kennzeichnen Stadium und Platzierung der Acrylkugeln.

getränkte Acrylkugel gesteckt wurde (Abb.18, D; Tab.3). Konnte mit einer FGF8-getränkten Acrylkugel die *nodal*-Expression im Umkreis der FGF8-Kugel wirkungsvoll gehemmt werden (Abb.18, C, C', C'', C'''), so reichte diese bei allen 3 Kontrollen direkt an die PBS-Kugel heran (Abb.18, D, D', D''; Tab.4).

Somit war die repressive Wirkung von FGF8 ausreichend der durch BMP4 erzeugten Induktion von *nodal* entgegenzuwirken.

Da mit einer BMP4-Konzentration von 10 μ g/ml sowohl bei den Versuchs- als auch bei den Kontrollembryonen keine Verbreiterung der *nodal*-Domäne zur Mittellinie hin beobachtet werden konnte (Abb.18, C, D; Tab.4), wurde Kaninchenembryonen eine einzige BMP4-getränkte Acrylkugel in einer Konzentration von 10 μ g/ml gesteckt. Mit dieser Konzentration war nur in einem einzigen Embryo des Stadiums 6 eine Verbreiterung möglich (Tab.3). In zwei weiteren Embryonen des Stadiums 6 sowie des 2 Somitenstadiums konnte diese ebenso wie die Expression in der rechten Seitenplatte nicht mehr erzielt werden (Tab.3). Eine ektopische Expression von *nodal* im paraxialen Mesoderm und in der rechten Seitenplatte konnte daher nur mit einer BMP4-Konzentration von 100 und 50 μ g/ml erwartet werden.

Die häufig in den Doppelapplikationen von BMP4-FGF8 und BMP4-PBS aufgetretenen bilateralen Expressionen konnten auf die *in vitro* Kultur von Vorsomiten-, bzw. gerade erst beginnenden Somitenstadien zurückgeführt werden (siehe Text oben, Tab.1, Tab.4). In Kontrollembryonen dieser Stadien kommt es zudem in 41% zu einem Verlust der linken Seitenplattenexpression von *nodal* (Tab.1). Ein solcher Verlust trat in den Doppelapplikationen interessanterweise nur mit BMP4-Konzentrationen von 10 μ g/ml und nie mit 50 oder 100 μ g/ml auf (Tab.4). Dies verdeutlichte die induktive Wirkung von BMP4 mit einer Konzentration von 50 und 100 μ g/ml auch auf die linke endogene Seitenplattendomäne, sowie die nicht vorhandene induktive Wirkung des BMP4 mit einer Konzentration von 10 μ g/ml. Die Wirkung von BMP4 ist somit dosisabhängig.

Stadium 6 und 0/1 Som	links		bilateral		keine	rechts
	Gesamt- anzahl	normal	reduziert	normal		
10 µg/ml + FGF8	7		2	2	3	1
50 µg/ml + FGF8	5		1	2V	2V	
100 µg/ml + FGF8	3			2V	1V	
10 µg/ml + PBS	4			3		1

Tab. 4: FGF8 reprimiert die durch BMP4 induzierte Expression von *nodal* und *Pitx2*

Eine BMP4-getränkte Acrylkugel wurde zeitgleich mit einer FGF8 oder PBS-getränkten Acrylkugel auf die linke Seite des Embryos plaziert, um nach erfolgter *in vitro* Kultur die Expression von *nodal* anhand einer *in situ* Hybridisierung zu bestimmen.

Die durch BMP4 ausgelöste Induktion von *nodal* im paraxialen Mesoderm wurde mit V gekennzeichnet.

☐ zählten nicht zur Statistik, da keine linksseitige Expression vorhanden war, anhand der Repression durch FGF8 gezeigt werden konnte. Ein repressiver Effekt durch FGF8 kann andererseits jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Allerdings war die mit einer Konzentration von 50 und 100 µg/ml erfolgte Induktion im paraxialen Mesoderm, gerade in den verwendeten Vorsomitenstadien, sehr stark. So konnte in 4 von 5 mit 50 µg/ml BMP4 (Tab.4, V), sowie allen drei (Tab.4, V) mit 100 µg/ml behandelten Kaninchenembryonen eine weitreichende Induktion im paraxialen Mesoderm beobachtet werden, die in den meisten Fällen das kontralaterale paraxiale Mesoderm miteinschloss. In Vorsomitenstadien schien somit das verabreichte BMP4, im Gegensatz zu den 1 bis 3 Somitenstadien, auch direkt auf das paraxiale Mesoderm der gegenüberliegenden Seite zu wirken.

Die FGF8-Experimente führten zu den folgenden Resultaten:

1. Es konnte keine Induktion der Nodal-Signalkaskade in den Somitenstadien beobachtet werden.
2. In den Vorsomitenstadien bestand eine inverse Korrelation zwischen der Plazierung des FGF8-Proteins und der *nodal*-Expression in der Seitenplatte.
3. FGF8 ist in der Lage dem induktiven Effekt von BMP4 auf die *nodal*-Expression entgegenzuwirken.

Diese Funktionsgewinn-Experimente ließen auf eine rechte Funktion von FGF8 im Kaninchenembryo schließen.

3.2.7 Inhibition der FGF8-Signaltransduktion rechts des Primitivknotens bewirkt bilaterale Expression von *nodal* und *Pitx2*

Zur Bestätigung einer asymmetrischen Funktion des endogenen FGF8 wurden Funktionsverlust-Experimente des FGF8-Signalweges durchgeführt. Dazu sollte der FGF-Rezeptor1 (FGFR1) spezifisch mit der chemischen Substanz SU5402 gehemmt werden. Diese interferiert mit dem katalytischen Zentrum der Kinase-Aktivität des FGFR1 (Mohammadi, et al., 1997), wodurch eine Signalübertragung durch FGF8 über diesen Rezeptor unmöglich wird. Ausgehend von einer endogenen repressiven Wirkung des FGF8-Proteins auf die *nodal*-Expression in der rechten Seitenplatte sollte diese mit der Plazierung des Inhibitors SU5402 auf die rechte Seite des Primitivknotens aufgehoben und somit eine ektopische Expression von *nodal* ermöglicht werden.

Kaninchenembryonen der Stadien 5 und 6 wurde SU5402 mithilfe von Anionenaustauscher-Gelkugeln rechts des Primitivknotens implantiert. Die sich während der Übernachtskultur zum 3 bis 5 Somitenstadium entwickelten Kulturembryonen wurden daraufhin einer *in situ* Hybridisierung mit einer *nodal*- oder *Pitx2*-Sonde unterzogen.

Die in diesem Experiment aufgetretene bilaterale Expression konnten jedoch nicht signifikant von der allein durch die Kultur in diesen Embryonalstadien erzeugten bilateralen Expression unterschieden werden (nicht gezeigt).

Daher wurden, in Folgeversuchen, Kaninchen der frühen Somitenstadien verwendet und diesen Inhibitor-gefüllte Gelkugeln rechts des posterioren Primitivknotens plaziert (Abb.19, Skizze). Gleichzeitig durchgeführte Kontrollkulturen mit PBS-gefüllten Gelkugeln belegten, dass die Anionenaustauscher-Gelkugeln die Entwicklung des Embryos ebenso wenig störten, wie die zuvor verwendeten Acrylkugeln (nicht gezeigt).

In 17 (77%) von 22 im 1 und 2 Somitenstadium in Kultur genommenen und auf *nodal*-Expression untersuchten Kaninchenembryonen konnte, zusätzlich zur endogenen linksseitigen Expression, eine ektopische Expression im rechten Seitenplattenmesoderm festgestellt werden (Abb. 19, A, Tab.2). Diese Expression beschränkte sich ausschließlich auf das Seitenplattenmesoderm sowie die

darüberliegenden ektodermalen und die darunterliegenden endodermalen Zellen und spiegelte somit die endogene Verteilung von *nodal*-mRNA in der linken Seitenplatte wieder (Abb.19, A, A').

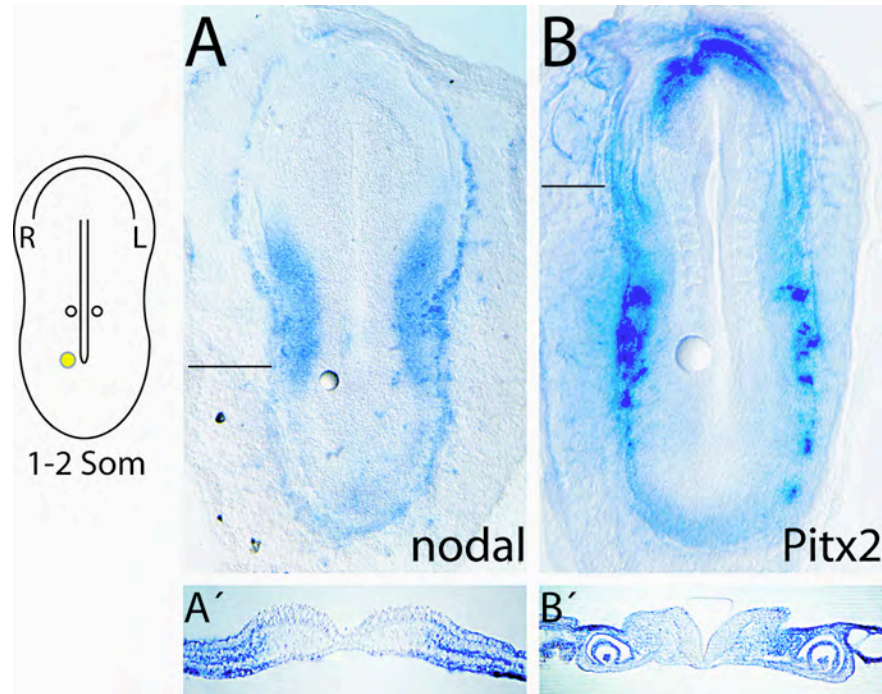


Abb. 19 Repression des *FGFR1*-Signalweges resultiert in ektopischer rechtsseitiger *nodal*- und *Pitx2*-Transkription in frühen Somitenstadien

Acrylkugeln getränkt mit dem *FGFR1*-Inhibitor SU5402 wurden auf die posteriore rechte Seite des Primitivknotens in 1-2 Somitenstadien gesetzt. Die Embryonen wurden daraufhin kultiviert und einer *in situ* Hybridisierung unterzogen.

(A, B) Ektopische, rechtsseitige Induktion von *nodal* (A) und *Pitx2* (B) nach Plazierung einer SU5402-getränkten Acrylkugel rechts neben den posterioren Primitivknoten. Die ektopische Expressionsdomäne glich exakt der endogenen linksseitigen Domäne (A', B').

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an. Schematische Skizzen kennzeichnen Stadium und Plazierung der Acrylkugeln.

In zwei weiteren auf *Pitx2*-Expression untersuchten Kulturembryonen wurde ebenfalls eine bilaterale Expression detektiert, welche, wie auch in den transversalen Vibratonschnitten sichtbar, in beiden Herzanlagen zu finden war (Abb.19, B, B'; Tab.2). Drei zum Zeitpunkt des 3 und 4 Somitenstadiums in Kultur genommene Kaninchenembryonen zeigten dagegen keine Expression in der rechten Seitenplatte (Tab.2). Die Hemmung der FGF8-Signaltransduktion durch lokale Plazierung des Inhibitors SU5402 auf der rechten Primitivknotenseite führte somit zu einer ektopischen Induktion von *nodal* und *Pitx2* in der rechten Seitenplatte des 1 und 2 Somitenstadiums. Diese Experimente bestätigten demzufolge eine asymmetrisch rechtsseitige Funktion von FGF8.

Abschließend lässt sich die Expression und Funktion von FGF8 im Kaninchen mit den vorhandenen Daten in Huhn und Maus vergleichen (Abb. 20, in Diskussion):

1. Die symmetrische Expression von *fgf8* entspricht der Situation in der Maus und steht im Gegensatz zur asymmetrischen Expression im Huhn.
2. Die durch FGF8 nicht erfolgte Induktion der *nodal*- und *Pitx2*-Expression widerspricht den in der Maus erzielten Resultaten, gleicht jedoch den Huhnexperimenten.
3. Die durch FGF8 erzielte Repression der *nodal*-Expression bestätigt die Experimente im Huhn, steht aber im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Maus.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Funktion von FGF8 bei der Entstehung der Links-Rechts-Achse im Kaninchenembryo. Funktionsgewinn- und Funktionsverlustexperimente wiesen diesem Wachstumsfaktor in frühen Somitenstadien eine asymmetrische Rolle auf der rechten Seite zu. FGF8 verhindert in der Konsequenz eine rechtsseitige Induktion der *nodal*-Expression und ermöglicht dadurch die asymmetrische linksseitige Aktivierung von *nodal* und der nachgeschalteten Signalkaskade. Im Rahmen dieser Untersuchungen ergaben sich mit der, im Vergleich zum Hühnerembryo, späteren Fixierung der ursprünglichen Asymmetrie und mit der hier erstmals berichteten positiven Wirkung der BMP4-Signalkaskade auf die Expression von *nodal*, *Pitx2* und *Lefty2* weitere relevante Teilergebnisse. Als Ursache für die Diskrepanz zwischen der Funktion von FGF8 in Huhn und Maus, die der Ausgangspunkt für diese Untersuchungen war, können aufgrund der vorliegenden Arbeit zwei Möglichkeiten ausgeschlossen werden. Die asymmetrische Expression von *fgf8* im Bereich des Primitivknotens ist keine Voraussetzung für eine asymmetrische Funktion, da FGF8 im Kaninchen, trotz symmetrischer Transkription, nur auf der rechten Seite wirkt. Ebenso kann, aufgrund der im Kaninchen erhobenen Daten, eine Funktionsumkehr des FGF8 von Vogel zu Säuger im Verlauf der Evolution ausgeschlossen werden. Die vorliegenden Ergebnisse deuten vielmehr auf eine veränderte FGF8-Funktion im Eizylinder der Maus, dessen morphologische Struktur als Sonderfall innerhalb der Vertebraten angesehen werden kann.

4.1 FGF8 wirkt als rechts-asymmetrische Determinante im Kaninchenembryo

4.1.1 FGF8 inhibiert die Nodal-Signalkaskade

Die Funktionsgewinnexperimente in Kaninchenembryonen belegen eine inhibitorische Funktion von FGF8 auf die Nodal-Signalkaskade. Diese Befunde stehen im direkten Gegensatz zu Experimenten in der Maus, die mit Embryonen

der gleichen Entwicklungsstadien und mit rekombinantem FGF8-Protein desselben Herstellers und derselben Aktivität durchgeführt wurden. Obgleich bei den meisten der durchgeführten Experimente keine durchgängig übereinstimmenden Resultate erzielt werden konnten, wurde in keinem einzigen Fall eine positive Wirkung von FGF8 auf die Nodal-Signalkette beobachtet. Dabei ist das rechte Seitenplattenmesoderm durchaus kompetent zur Expression der Gene *nodal*, *Pitx2* und *lefty2*. Das zeigte die Plazierung von Aktivin-getränkten Acrylkugeln rechts vom Primitivknoten, die in ca. der Hälfte der so behandelten Embryonen zur ektopisch rechtsseitigen Induktion der Transkription von *nodal* oder *Pitx2* führte (Abb.12). Dieses Experiment simulierte die Nodal-Signalkaskade auf der rechten Seite, da Aktivin an denselben Rezeptor wie Nodal bindet (Kumar et al., 2001; Reissmann et al., 2001).

Umgekehrt ergab die Applikation von FGF8 in Kaninchenembryonen der Vorsomitenstadien eine nahezu 100-prozentige Korrelation zwischen der Plazierung des FGF8 und der Abwesenheit der *nodal*-Transkription (Abb.15), was eine inhibitorische Funktion von FGF8 nahelegte. In Kaninchenembryonen der frühen Somitenstadien, die sich durch den Erhalt des asymmetrischen Zustands in Kontrollkulturen auszeichneten (Abb.11; Tab.1), konnte hingegen keine Inhibition der endogenen linksseitigen Nodal-Signalkaskade erzielt werden. Das kann auf zwei mögliche Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen könnte die Kompetenz für die FGF8-Wirkung zeitlich limitiert sein. Dagegen spricht, dass der/die FGF-Rezeptor(en), sowie die weiteren bekannten Modulatoren der FGF8-Signaltransduktion (s. u.) im wesentlichen mit dem Liganden co-exprimiert werden (Yamaguchi et al., 1992; Minowada et al., 1999; Chambers und Mason, 2000; Fürthauer et al., 2001).

Andererseits könnte die wohl bereits im frühen Somitenstadium einsetzende positive Rückkopplungsschleife von Nodal auf seine eigene Transkription (Adachi et al., 1999; Norris und Robertson, 1999; Saijoh et al., 2000) und auf die Transkription von *Pitx2* und *lefty2* (Saijoh et al., 2000; Shiratori et al., 2001) einer effizienten Repression zu diesem Zeitpunkt entgegenwirken. Für diese Möglichkeit spricht eine sorgfältige Auswertung der Kontroll- und FGF8-Kulturen in frühen Somitenstadien. In Kontrollkulturen der frühen Somitenstadien trat in 10 bis 15 Prozent eine bilaterale *nodal*- oder *Pitx2*-Expression auf (Tab.1). Nach Plazierung einer rechten FGF8-getränkten Acrylkugel konnte dieser seltene Effekt hingegen

nie beobachtet werden. Somit konnte auch im frühen Somitenstadium eine repressive Aktivität von FGF8 festgestellt werden. Bei der in den Kontrollkulturen rechtsseitigen Aktivierung der Nodal-Signalkaskade handelt es sich um einen Kulturartefakt, der erst mit dem Zeitpunkt der Inkulturnahme der Embryonen induziert wird. Die praktisch gleichzeitige Applikation von FGF8 war offensichtlich ausreichend, diesen Effekt zu kompensieren, während auf der linken Seite die endogene, vermutlich bereits unumkehrbar induzierte Nodal-Signalkaskade nicht mehr durch FGF8 antagonisiert werden konnte.

Diese Argumentation wird durch die BMP4-Befunde, die weiter unten ausführlich diskutiert werden, unterstützt. BMP4 führte auf der linken und auf der rechten Seite zu einer Induktion der Expressionen von *nodal* und *Pitx2* im paraxialen Mesoderm, die in Kontroll- oder FGF8 behandelten Embryonen nie beobachtet wurde (Abb.16; Tab.3). Diese Induktion, die wie die kulturbedingte rechtsseitige ektopische Expression erst mit dem Zeitpunkt der experimentellen Manipulation ausgelöst wird, ließ sich durch FGF8 auf der linken und auf der rechten Seite effizient antagonisieren, d. h. auch in diesem Szenario verhielt sich FGF8 als Repressor der Nodal-Signalkaskade.

4.1.2 Inhibition der FGF8-Signaltransduktion aktiviert die Nodal-Kaskade

Rechts des Primitivknotens im 1 bis 2 Somitenstadium plaziertes SU5402, das die Tyrosinkinase-Aktivität des FGFR1 inhibiert, führte zur ektopischen Induktion der *nodal*- und *Pitx2*-Expression.

Obwohl noch drei weitere Rezeptoren in die Übertragung von FGF-Signalen involviert sind, wird der FGFR1 als Rezeptor der FGF8-Signaltransduktion angesehen. Dies beruht auf den phänotypischen Ähnlichkeiten der Nullmutation des *fgf8* (Sun et al., 1999) und des *FGFR1* (Yamaguchi et al., 1994). Neuere Experimente im Zebrafisch konnten zudem zeigen, dass sowohl die Überexpression des *FGFR1*, sowie die Missexpression von *fgf8* in ähnlichen Phänotypen resultieren (Fürthauer et al., 2001). Obwohl SU5402 ebenso als schwacher Inhibitor des PDGF-Rezeptors wirkt, konnte sich die Substanz

aufgrund zahlreicher entwicklungsbiologischer Experimente als ein FGF-spezifischer Inhibitor etablieren (Mohammadi et al., 1997; Muhr et al., 1999; Picker et al., 1999; Rodriguez Esteban et al., 1999; Schneider et al., 1999; Norlin et al., 2000; Poss et al., 2000; Wilson et al., 2000, Mandler und Neubüser, 2001).

Diese Experimente bestätigten somit dem FGF8 eine rechtsseitige Aktivität während der frühen Somitenstadien, die letztlich in einer Unterdrückung der rechtsseitigen Nodal-Signalkaskade resultiert. Damit erklärt sich das Fehlen der *nodal* und *Pitx2*-Expression in der rechten Seitenplatte des Wildtyp-Embryos. Die endogene linksseitige Expression von *nodal* und *Pitx2* verweisen andererseits auf die Abwesenheit einer linksseitigen Repression durch FGF8. Die Funktionsverlustexperimente von FGF8 dokumentierten daher die rechtsasymmetrische Funktion des FGF8 im Kaninchen.

4.1.3 Asymmetrische Funktion von FGF8

4.1.3.1 Rechtsasymmetrische Expression ist keine Voraussetzung für rechtsasymmetrische Funktion

Im Kaninchenembryo konnte dem FGF8 eine asymmetrische Funktion zugeordnet werden, obwohl ausschließlich eine symmetrische Expression detektiert werden konnte. Dagegen wird *fgf8* im Huhn auf der rechten Seite des Primitivknotens asymmetrisch exprimiert (Boettger et al., 1999). Dies führte zu der Annahme, dass Zellen, die im Verlauf der Gastrulation aus dem Primitivknoten in die Seitenplatten auswandern, nur auf der rechten Seite durch die einseitig rechte Aktivität von FGF8 beeinflusst würden. Die nach rechts auswandernden Zellen sollten ein repressives FGF8-Signal erhalten, das gleichzeitig den nach links auswandernden Zellen vorenthalten würde. Diese Argumentation kann jedoch, aufgrund der ausschließlich symmetrischen Expression, nicht auf das Kaninchen übertragen werden. Trotzdem konnte dem FGF8 im Kaninchen, ebenso wie im Huhn, eine asymmetrische rechtsseitige Funktion zugeordnet werden. Es stellt sich daher die Frage, inwiefern diese asymmetrische Expression für die Funktion des FGF8 in der Links-Rechts-Achsenentwicklung von Bedeutung ist.

Einzelzellmarkierungen (Smith et al., 1994; Parameswaran und Tam et al., 1995; Wilson und Beddington, 1996; Psychoyos und Stern, 1996a; Kinder et al., 1999)

fürten zu der Erkenntnis, dass die Zellen des Primitivknotens zur Bildung der axialen Mittellinie und des Endoderms und die Zellen des anterioren Primitivstreifens zur Bildung des paraxialen Mesoderms beitragen. Demzufolge wandern die Zellen der Primitivknotenregion nicht in das Seitenplattenmesoderm. Die Zellen, die das Seitenplattenmesoderm aufbauen, verlassen den Primitivstreifen im mittleren Abschnitt, in dem *fgf8* in Huhn und Kaninchen sowieso symmetrisch exprimiert werden. Da eine asymmetrisch rechte Funktion des FGF8 im Kaninchen auch ohne asymmetrische Primitivknotenexpression gegeben ist, liegt die Vermutung nahe, dass die asymmetrische Verteilung von *fgf8*-mRNA im Bereich des Hühnerprimitivknotens nicht von Bedeutung für diese Funktion ist. Die symmetrische Expression im Primitivstreifen bedingt allerdings eine nachträgliche asymmetrische Regulation der FGF8-Aktivität.

4.1.3.2 Die rechtsseitige Wirkung des FGF8 wird nicht über Mittelliniendefekte vermittelt

Störungen der embryonalen Mittellinie (Primitivstreifen, Notochord, Bodenplatte des Neuralrohrs) sind häufig die Ursache für Lateralitätsdefekte in Maus und Zebrafisch (Collignon et al., 1996; Danos und Yost, 1996; Dufort et al., 1998; King et al., 1998; Melloy et al., 1998; Izraeli et al., 1999; Meyers und Martin, 1999; Tsukui et al., 1999). Die Verteilung der *fgf8*-mRNA im Primitivstreifen und Primitivknoten, sowie zusätzlich im posterioren Abschnitt der Notochordplatte und der Bodenplatte könnten demzufolge ebenso auf eine Beeinflussung der Mittellinie schließen lassen. Auch die Nullmutationen von *fgf8* und des *FGFR1* lassen einen Einfluss des FGF8 auf die Ausbildung des axialen Mesoderms während der Gastrulation vermuten.

Die *fgf8*-Nullmutation führt ausserdem zum gleichzeitigen Verlust der nachgeschalteten *fgf4*-Expression und in Abwesenheit beider Gene zu schweren Migrations- und folglich Gastrulationsdefekten (Sun et al., 1999). Es bildet sich kein Primitivknoten und folglich auch kein axiales Mesoderm. Sonstiges Mesoderm liegt bestenfalls in kleinen isolierten Flecken vor. Embryonen mit einer Nullmutation des *FGFR1*, bzw. der speziellen Isoformen des *FGFR1*, sowie die Plazierung des FGFR1-Inhibitors SU5402 in frühen Stadien der Ascidientwicklung demonstrierten ebenfalls Migrationsdefekte, die sich jedoch

vordergründig in der Ausbildung des axialen Mittellinienmesoderms zeigten (Deng et al., 1994; Yamaguchi et al., 1994; Xu et al., 1999; Ciruna et al., 1997; Kim et al., 2001). Somit scheint die Signaltransduktion von FGF8 durch den FGFR1 wichtig für die korrekte Ausbildung des Primitivknotens und des Notochords und folglich der gesamten Mittellinie zu sein. Anhand diverser Nullmutationen konnte die Notwendigkeit einer intakten Mittellinie für den Aufbau der Links-Rechts-Achse demonstriert werden. Diese Befunde werfen die Frage auf, ob die lateralen FGF8 Wirkungen über eine morphologische Beeinflussung der Mittellinie erfolgen könnten.

Für eine unabhängige lateralitätsspezifische FGF8-Wirkung sprechen drei Argumente. Der Phänotyp der hypomorphen *fgf8*-Mutation in der Maus zeigte keine offensichtlichen morphologischen Schäden und trotzdem wurden Lateralitätsdefekte beobachtet. Ebenso konnte anhand von transversalen Schnitten die morphologische Unversehrtheit der mit FGF8 behandelten Kaninchenembryonen dokumentiert werden. Ausserdem wurde das FGF8-Protein erst nach Beginn der Gastrulation plaziert und sollte daher keinen Einfluss auf die Struktur der axialen Mittellinie ausgeübt haben.

Der Einfluss des FGF8 auf die Bildung von Primitivknoten und Mittellinie ist demnach sowohl vom Prozess her als auch zeitlich gesehen deutlich von der Funktion des FGF8 in der Entwicklung der Links-Rechts-Achse zu trennen.

4.1.3.3 Gibt es asymmetrische Komponenten der FGF-Signaltransduktion?

Da eine asymmetrische Funktion des FGF8 trotz symmetrischer Expression nachgewiesen wurde, stellt sich die Frage, ob diese Asymmetrie auf einer asymmetrischen Expression von Komponenten des FGF8-Signalweges beruhen könnte. Die FGF8-Signaltransduktion wird vermittelt durch hoch-affine Tyrosinkinaserzeptoren und niedrig-affine Heparansulfat-Proteoglykane, die als Co-Rezeptoren wirksam sind (Boilly et al., 2000). Die Bindung von FGF8 induziert die Dimerisierung der Tyrosinkinaserzeptoren und in Folge die Autophosphorylierung mehrerer intrazellulärer Tyrosinreste. Diese Modifikation ermöglicht die Interaktion mit SH2-Domänen-enthaltenden Proteinen wie Grb2, das daraufhin selbst phosphoryliert und aktiviert wird und letztlich über die Bindung des Guanin-Nukleotid-Freisetzungsfaktors Sos in der Aktivierung des

membranständigen G-Proteins Ras resultiert. Das aktivierte Ras führt zur Aktivierung einer Kinasen-Kaskade, die die Serin/Threonin-Kinase Raf, die Tyrosin-, als auch Serin-Kinase MEK und die Serin/Threonin-Kinase MAPK einschließt. Die Aktivierung der MAPK veranlasst diese zur Translokalisierung in den Zellkern, um dort spezielle Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Pou2 und Snail, zu phosphorylieren. (Belting et al., 2001; Ciruna und Rossant, 2001; Reim und Brand et al., 2002)

Die wachstumsfaktorinduzierte Signaltransduktion über Tyrosinkinaserzeptoren wird auf unterschiedlichen Ebenen der Signalkaskade reguliert, die die Verfügbarkeit des Liganden, die Phosphatase-Aktivität und Ras-inhibitorische Proteine, wie Ras-GAP miteinschließen. In Zebrafisch, *Xenopus*, Huhn und Maus wurden weitere Inhibitoren des FGF8-Signaltransduktionsweges entdeckt, die durch diesen induziert werden und anschließend eine negative Rückkopplung erzeugen. Sprouty, ein zellmembrangebundener Inhibitor der FGF-Signaltransduktion, von dem im Säuger vier Isoformen vorkommen, sowie Spred 1 und 2, zwei sprouty-verwandte Proteine, werden über den MAPK-Signalweg von FGF8 induziert. Diese Repressorproteine wirken negativ auf die FGF8-Signaltransduktion zurück, indem sie die Phosphorylierung und Aktivierung von Raf verhindern (Minowada et al., 1999; Nutt et al., 2001; Fürthauer et al., 2001; Ozaki et al., 2001; Wahioka et al., 2001; Sasaki et al., 2001; Yusoff et al., 2002). Allerdings konnte bislang bei keinem dieser Komponenten der FGF8-Signaltransduktion eine asymmetrische Expression detektiert werden, die eine einseitige Kompetenz von FGF8 gewährleisten könnte. Andererseits konnten noch vor kurzem neue Regulatoren des FGF8-Signalweges entdeckt werden, die wiederum auf weitere bisher unentdeckte Komponenten schließen lassen. Sef, ein Membranprotein in Zebrafisch und Maus, wird über den MAPK-Signalweg des FGFR1 und 2 induziert und wirkt anschließend negativ auf die *fgf8*-Expression zurück (Fürthauer et al., 2002; Tsang et al., 2002). Zudem konnte in *Xenopus* neben den bereits erwähnten Inhibitoren ein membranständiger Agonist der FGF8-Signaltransduktion identifiziert werden (Christoph Niehrs, persönliche Mitteilung).

Die oben erwähnten Inhibitoren werden im Embryo mit *fgf8* co-exprimiert, wobei interessanterweise ihre Expressiondomäne im Vergleich zu *fgf8* verbreitert

erscheint (Minowada et al., 1999; Chambers und Mason, 2000; Fürthauer et al., 2001). Da FGF8 von der Zelle sekretiert wird, scheint die Aktivität der Inhibitoren die Expression von *fgf8* zeitlich und räumlich zu begrenzen. Folglich verdeutlicht die breitere Expression der Inhibitoren den tatsächlichen Wirkungskreis des FGF8-Proteins. Es ist demnach möglich, dass *fgf8*, das zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung in den Seitenplatten des Kaninchenembryos translatiert wird, aufgrund der FGF8-Sekretion der benachbarten naszierenden Mesoderm- und paraxialen Zellen, einen direkten Einfluss auf das Seitenplattenmesoderm ausübt.

Eine weitergehende Untersuchung der Komponenten des FGF8-Signaltransduktionsweges, einschließlich der Regulierung ihrer Aktivität, könnte im Prinzip asymmetrisch wirksame Faktoren enthüllen. Das momentane Verständnis der FGF8-Signaltransduktion lässt allerdings keine Rückschlüsse auf asymmetrische Funktionen zu.

4.2 Späte Fixierung der Lateralität im Säugerembryo

Während Hühnerembryonen im Stadium 4/5 erfolgreich unter Bewahrung der Links-Rechts-Asymmetrie *in vitro* kultiviert werden können, gingen die asymmetrischen Positionsinformationen im Kaninchenembryo vor Ausbildung der ersten Somitenpaare während der Kultur verloren (Abb.10; Tab.1). Eine vergleichbare Labilität in Bezug auf die Links-Rechts-Achsendifferenzierung konnte auch während der Kultur von Maus- und Ratten-Embryonen beobachtet werden (McCarthy und Brown, 1998; Davidson et al., 1999; Tsang et al., 1999). Als mögliche Ursachen bieten sich kulturbedingte Störungen des bislang nur in der Maus charakterisierten sogenannten Knotenflusses, Veränderungen der extrazellulären Matrix (ECM) in der Kultur, sowie die im Vergleich zum Huhn späte Induktion der *lefty1*-Expression in der Mittellinie an.

4.2.1 Knotenfluss

Der in der Maus diskutierte Knotenfluss, der als Ausgangspunkt der linksseitigen Expression angesehen wird, könnte als Ursache der Störung in Betracht gezogen werden. Da sich dieser Knotenfluss bereits in den Vorsomitenstadien aufbaut,

wurde vermutet, dass durch den Kontakt der Primitivknotenregion mit dem artifiziellen Kulturmedium ein möglicher Gradient von Wachstumsfaktoren durcheinandergewirbelt wird, infolgedessen die normale links-rechts-asymmetrische Expression im Seitenplattenmesoderm verloren ginge (Nonaka et al., 1998). Im Hühnerembryo wurden zwar ebenfalls Cilien im Primitivknoten gefunden, diese scheinen jedoch ersten Untersuchungen zufolge spärlich und zur Erzeugung eines Knotenflusses unzureichend verteilt zu sein (Wright, 2001). Auch im Kaninchen lässt die Struktur und Verteilung der Primitivknotencilien nicht auf eine der Maus vergleichbare Funktion dieser Cilien schließen (Christoph Viebahn, persönliche Mitteilung). Damit bleibt die Existenz eines Knotenflusses in anderen Wirbeltierembryonen fragwürdig.

Die Hypothese, dass sekretierte Wachstumsfaktoren, die normalerweise an die extrazelluläre Matrix gebunden sind, mithilfe einer durch die Cilienrotation erzeugten Strömung transportierbar sind, konnte bislang nicht experimentell bestätigt werden. Die für den Aufbau und die Funktion der Primitivknotencilien verantwortlichen Motorproteine werden nicht nur in den Cilien selbst, sondern auch im Cytoplasma der Cilienzellen sowie anderen cilienlosen Zellen exprimiert (Supp et al., 1999). Dort können sie ebenso am Transport von zellulärer Fracht, wie z.B. Protein-gefüllten Vesikeln, entlang der das Cytoplasma durchziehenden Mikrotubuli beteiligt sein. Es ist daher unklar, ob der Verlust der Cilien selbst bzw. ihrer Beweglichkeit, in Embryonen mit einer Nullmutation dieser Motorproteine, die beobachtete Störung der Links-Rechts-Asymmetrie bewirkt oder selbst nur eine Randerscheinung eines anderen zugrundeliegenden Mechanismus ist.

4.2.2 Extrazelluläre Matrix

Experimente mit *Xenopus*-Embryonen haben gezeigt, dass das Entfernen oder Beeinträchtigen der extrazellulären Matrix, die das Ektoderm von Blastula- und Gastrulastadien des *Xenopus*-Embryos bedeckt, zu einer Störung der Links-Rechts-Achsenentwicklung in Form einer Heterotaxie führen (Yost, 1992). Die extrazelluläre Matrix scheint demzufolge für die Links-Rechts-Achsenentwicklung

von Bedeutung zu sein. Neueste Untersuchungen konnten speziell dem Proteoglykan Syndecan-2 eine Rolle im Aufbau der Links-Rechts-Achse zusprechen. Injektionen von mRNA, die cytoplasmatisch verkürztes *Syndecan-2* kodiert, in *Xenopus*-Embryonen, führten zu einer Randomisierung der Expressionen von *nodal*, *lefty2* und *Pitx2* in der Seitenplatte (Kramer und Yost, 2002). Interessanterweise konnten diese Effekte jedoch nur bei einer Störung der Syndecan-2-Funktion während der frühen Gastrulastadien beobachtet werden. Daher scheint die Funktion des Syndecans in der Links-Rechts-Achsenentwicklung zeitlich auf das Gastrulastadium eingegrenzt zu sein. Störungen der extrazellulären Matrix, die in einem späteren Entwicklungsstadium auftreten, beeinträchtigten die Links-Rechts-Achsenentwicklung dagegen nicht mehr (Kramer und Yost, 2002).

Auch in Kaninchenembryonen, die im Vorsomitenstadium kultiviert wurden, trat eine Randomisierung der Seitenplattenexpression von *nodal* auf. Dieser Effekt war ebenfalls zeitlich begrenzt, da er nur in Vorsomitenkulturen auftrat. Der Kontakt mit artifiziellem Kulturmedium könnte in dieser Entwicklungsphase eine Störung der extrazellulären Matrix des Kulturembryos verursachen. In der Kultur von Hühnerembryonen kann das im Hühnerei reichlich vorhandene Albumin dem Kulturmedium zugesetzt werden, so dass dieses weitgehend dem normalen Milieu des Embryos entspricht. Dagegen kann das künstliche Medium der Säugerkultur Abweichungen in der Ionenzusammensetzung und damit im pH-Wert sowie anderer wichtiger Faktoren aufweisen. Dies könnte sich störend auf die Proteinfunktion der extrazellulären Matrix auswirken.

FGF8 sowie andere Wachstumsfaktoren werden nach ihrer Sekretion aus der Zelle von Makromolekülen der extrazellulären Matrix gebunden. FGF8 selbst bindet an Heparansulfat-Glykosaminoglykan-Ketten, die wiederum an die extrazelluläre Domäne von Proteoglykanen gebunden sind. Diese ermöglichen als Co-Faktoren den Mitgliedern der FGF-Familie die Bindung an deren Membranrezeptoren und sind somit für die FGF-Signaltransduktion unentbehrlich (Lin et al., 1999). Zusammenfassend könnte eine Störung der extrazellulären Matrixproteine die endogene Funktion des FGF8-Proteins in der Links-Rechts-Achsendifferenzierung durchaus beeinflussen.

4.2.3 *lefty1*-Expression in der Mittellinie korreliert mit der Fixierung der Lateralität in Huhn und Säuger

Interessanterweise kann man im Huhn die Expression von *lefty1* in der Mittellinie schon ab dem Stadium 3 im Primitivstreifen und schon ab dem Stadium 5 im Primitivknoten, dem Notochord sowie der linken Seite der Bodenplatte beobachten (Ishimaru et al., 2000). *lefty1* ist damit im Hühnerembryo bereits im Vorsomitenstadium in der Mittellinie aktiv. Die Expression in Maus (Meno et al., 1997) und Kaninchen beginnt dagegen erst im 2 bzw. 3 Somitenstadium im Primitivknoten und der Bodenplatte und ist damit nicht im Primitivstreifen der Vorsomitenstadien zu finden. Demzufolge scheint es eine Korrelation zwischen dem ersten Auftreten der *Lefty1*-Aktivität in der Mittellinie und der Fixierung der asymmetrischen Signale zu geben.

Interessanterweise stehen Störungen der Asymmetrie, die durch Mittelliniendefekte verursacht werden, häufig mit dem Fehlen der *lefty1*-Expression in der Bodenplatte der axialen Mittellinie in Beziehung (Danos und Yost, 1996; Melloy et al., 1998; Meno et al., 1998; Meyers und Martin, 1999; Izraeli et al., 1999; Tsukui et al., 1999). *Lefty1* wurde in diesem Zusammenhang eine Funktion als Mittellinienbarriere zugesprochen, die eine Migration von linksseitigen Signalen auf die rechte Seite verhindern soll (Meno et al., 1998). *Lefty1* könnte somit, aufgrund der frühen Expression im Huhn, zusätzlich eine frühe Funktion im Aufbau der Asymmetrie in der Mittellinie, bzw. ihrer Aufrechterhaltung wahrnehmen. In der Tat bewirkt im Stadium 4 und dem frühen Stadium 5 des Huhns ektopisch rechts des Primitivknotens plaziertes *Lefty1*-Protein eine Repression der asymmetrischen *fgf8*-Expression im Primitivknotenbereich (Rodriguez Esteban et al., 1999). Die frühere Expression von *lefty1* im Huhn könnte die Stabilität der Links-Rechts-Achse während der frühen Hühnerembryokultur erklären, die bei Maus und Kaninchen erst mit den Somitenstadien gegeben ist.

Heterotypische und heterochrone Transplantationsexperimente könnten zur Überprüfung dieser Hypothese durchgeführt werden. So könnten die Primitivknoten zwischen Kaninchen und Huhn im Vorsomitenstadium ausgetauscht werden. Die Kaninchenembryonen, in dessen neuem Primitivknoten folglich *lefty1* exprimiert wäre, sollten sich dementsprechend in der *in vitro* Kultur

normal entwickeln. Die Hühnerembryonen, in deren Primitivknoten *lefty1* fehlt, müssten eine gestörte Links-Rechts-Achse vorweisen. Ebenso könnte man das Primitivknotengewebe zwischen Somiten- und Vorsomitenstadien von Kaninchenembryonen austauschen. Vorsomiten-Embryonen, in dessen Primitivknoten dadurch *lefty1* exprimiert wäre, sollten sich normal entwickeln, die Somitenstadien, denen *lefty1* im Primitivknoten fehlt, dagegen gestört.

Es wäre zudem möglich eine transgene Maus zu konstruieren, die ebenso wie das Huhn, *lefty1* bereits im Primitivstreifen und Primitivknoten des Gastrulastadiums exprimieren würde. Dazu könnte das *lefty1*-Gen unter der Kontrolle des *gooseoid*-Promotors exprimiert werden, da das *gooseoid*-Gen bereits im Gastrulastadium im anterioren Primitivstreifen und auch im Primitivknoten selbst aktiv ist. Diese transgenen Mausembryonen sollten sich, wenn Lefty1 tatsächlich die Lateralität fixiert, in der *in vitro* Kultur bereits vom Vorsomitenstadium an mit einer stabilen Links-Rechts-Achse entwickeln.

4.3 Positive Wirkung von BMP4 auf die Nodal-Signalkaskade

Die linksseitige Plazierung von BMP4 in Neurula- und frühen Somitenstadien des Kaninchens führte entgegen den Erwartungen nicht zu einer Repression der Nodal-Signalkaskade. Stattdessen konnte sowohl eine ektopische Induktion der linken Seitenplattenmarker in der rechten Seitenplatte, als auch im benachbarten paraxialen Mesoderm beobachtet werden (Abb.16, 17).

Die im 1 bis 3 Somitenstadium durch links plaziertes BMP4 verursachte ektopische Expression von *nodal*, *Pitx2* und *lefty2* in der rechten Seitenplatte konnte auf die repressive Wirkung von BMP4 auf die Expression von *lefty1* in der Bodenplatte zurückgeführt werden. Eine durch BMP4 erzielte Repression von *lefty1* in der Mittellinie wurde in vergleichbaren Stadien des Hühnerembryos dokumentiert (Yokouchi et al., 1999). Wie oben bereits diskutiert, ist der Verlust der *lefty1*-Expression in der Mittellinie immer, soweit die Nodal-Signalkaskade in der linken Seitenplatte nicht inhibiert wird, mit einer ektopischen Expression der

linken Seitenplattenmarker auf der rechten Seite verbunden (Meno et al., 1998; Izraeli et al., 1999; Tsukui et al., 1999). Aufgrund der Abwesenheit oder zumindest der Abschwächung der *lefty1*-Expression im mit BMP4-behandelten Kaninchenembryo könnte Nodal-Protein auf die rechte Seite gelangt sein und könnte hier, aufgrund der Expression seines Co-Faktors *cryptic* in der rechten Seitenplatte, seine eigene sowie die Expression von *Pitx2* und *lefty2* induziert haben. In der Tat konnte die im 1 bis 3 Somitenstadium durch BMP4 verursachte rechtsseitige Expression nur in der Seitenplatte und nicht im *cryptic*-defizienten paraxialen Mesoderm beobachtet werden.

Überraschenderweise verursachte die Applikation von BMP4 im Stadium 5b bishin zum 3 Somitenstadium keine Repression, sondern eine Induktion der Nodal-Signalkaskade, sowohl in der linken Seitenplatte als auch im benachbarten paraxialen Mesoderm. Dieser Effekt konnte mit einer Konzentration von 100 ng/ml und 50 ng/ml auf der linken und der rechten Seite beobachtet werden.

Die Induktion im paraxialen Mesoderm und dem darunterliegenden Endoderm ist ungewöhnlich, da dies bisher weder mit ektopisch plaziertem Aktivin (siehe oben), noch mit ektopisch exprimiertem *nodal* (Logan et al., 1998) erreicht werden konnte. Ausgehend von einer fehlenden Kompetenz des paraxialen Mesoderms für Nodal-Signale, muss BMP4 eine solche erzeugen können. Die Kompetenz des Seitenplattenmesoderms für *nodal* beruht auf der bilateralen Expression von *cryptic*, welches als essentieller Co-Faktor für die Nodal-Signaltransduktion unerlässlich ist (Shen et al., 1997; Gaio et al., 1999). Die ektopische Plazierung von BMP4 links des Primitivknotens, in frühen Somitenstadien des Kaninchens, könnte daher die ektopische Induktion des Nodal-Co-Faktors *cryptic* im paraxialen Mesoderm bewirkt haben. In der Tat konnte im Huhn gezeigt werden, dass die Expression von *cryptic* in der Seitenplatte von BMP-Signalen abhängig ist (Schlange et al., 2001). Die Implantation von BMP2-exprimierenden Zellen in die Seitenplatte des Huhns führte zu einer deutlichen Verstärkung und Verbreiterung der *cryptic*-Transkription, die andererseits durch den BMP-Antagonisten Noggin reprimiert werden konnte.

Erst kürzlich konnte in der Maus gezeigt werden, dass sich das Nodal-Protein aus der Seitenplatte heraus im Embryo ausbreiten kann (Meno et al., 2001) und dass

diese Ausbreitung durch die repressive Wirkung von *Lefty2* auf *Nodal* verhindert wird (Meno et al., 2001). Ist nun *cryptic* in der Zellmembran der paraxialen Zellen vorhanden, können aus der Seitenplatte in das paraxiale Mesoderm diffundierende *Nodal*-Proteine genügen, die Transkription von *nodal* im paraxialen Mesoderm zu starten. Aufgrund der Autoinduktion würde sich diese Transkription auf die *cryptic*-exprimierenden Zellen des paraxialen Mesoderms ausbreiten und die beobachtete ektopische Expression verursachen.

Gleichermaßen könnte man sich die Ausbreitung des *Nodal*-Proteins von der Mittellinienexpressionsdomäne in die *cryptic*-exprimierende Seitenplatte vorstellen. Interessanterweise bildet sich die Seitenplattendomäne von *nodal* zuerst nur schwach, nämlich genau auf Höhe der Mittellinienexpression von *nodal*, von wo aus sie sich sehr rasch zu beiden Seiten über das gesamte Seitenplattenmesoderm ausbreitet.

Die ektopische Expression von *Pitx2* und *lefty* kann hier, wie auch in der Seitenplatte, auf die induktive Wirkung von *Nodal* auf die Transkription von *Pitx2* und *lefty* zurückgeführt werden (Saijoh et al., 2000; Shiratori et al., 2001).

Die Induktion der *Nodal*-Signalkaskade durch *BMP4* im Kaninchen steht im Gegensatz zu Experimenten im Huhn, bei denen eine Repression der *nodal*-Expression in 30 Prozent der untersuchten Hühnerembryonen, nach Plazierung von *BMP4* links des Primitivknotens, beobachtet wurde (Rodriguez Esteban et al., 1999). Allerdings wurden diese Experimente im Huhn des Stadiums 4, also zum Zeitpunkt der Primitivknotenbildung, durchgeführt. Die Plazierung von *BMP4* in vergleichbaren Stadien im Kaninchen bewirkte ebenfalls den Verlust der endogenen *nodal*-Expression. In diesen Experimenten war die Kaninchenentwicklung jedoch beeinträchtigt (nicht gezeigt). Da sich diese Gastrulationsstadien in der Kultur sowieso unbefriedigend entwickeln (siehe Ergebnisse), ist ein direkter Effekt von *BMP4* auf die *nodal*-Expression in diesen Embryonen allerdings schwer zu bestimmen. Somit muss in diesen frühen Entwicklungsstadien kein Unterschied in der Funktion von *BMP4* in Kaninchen und Huhn vorliegen.

Die Wirkung des *BMP4* scheint demnach stadiumsabhängig zu sein, so dass die durchgeführten Experimente wahrscheinlich mit unterschiedlichen *BMP4*-abhängigen Signalwegen interferierten. Experimente im Huhn zeigten eine

induktive Wirkung von BMP4 im Stadium 5- (vergleichbar mit 5a im Kaninchen) auf die asymmetrische *fgf8*-Expression im Bereich des Primitivknotens (Monsoro-Burq und Le Douarin, 2001). Da *fgf8* im Huhn und Kaninchen repressiv auf die *nodal*-Expression wirkt, scheint BMP4 im Stadium der Primitivknotenbildung eine andere Wirkung auf die *nodal*-Expression zu besitzen, als in den frühen Somitenstadien. Im gleichen Stadium des Huhns bewirkt die ektopische Plazierung von BMP4 links des Primitivknotens die Repression der linksseitigen Expression von *shh* (Monsoro-Burq und Le Douarin, 2001). Diese linksseitige Expression von *shh* ist jedoch für die Transkription von *nodal* in der Seitenplatte notwendig (Levin et al., 1997). Frühzeitig plaziertes BMP4 könnte daher durch die Beeinträchtigung der *shh*-Signalkaskade zur Repression von *nodal* in der Seitenplatte führen.

Allerdings wurde auch im Stadium 6 eine Repression der Seitenplattenexpression von *nodal* nach linksseitiger Applikation von BMP2 beobachtet (Yokouchi et al., 1999). Die BMP-Proteine in diesem, sowie im zuvor geschilderten Experiment waren hingegen im Vergleich zu den Kaninchenexperimenten 10 bis 20fach höher konzentriert (Rodriguez Esteban et al., 1999; Yokouchi et al., 1999). Dies ist vor allem deswegen interessant, da BMP4 als ein Morphogen wirkt. Morphogene bilden ausgehend von wenigen lokalen Signalen Gradienten aus, wobei die dadurch gebildeten unterschiedlichen Konzentrationen verschiedene Effekte in den Zielzellen hervorrufen. Aufgrund dieser Funktion könnten unterschiedliche BMP4-Konzentrationen somit auch unterschiedliche Effekte auf die *nodal*-Transkription ausüben. Experimente im Huhn (Schmidt et al., 1998) konnten zudem zeigen, dass BMP4 konzentrationsabhängig Apoptose verursacht. Damit könnte der Verlust der *nodal*-Expression in den Hühnerexperimenten auch auf die erhöhte Konzentration von BMP4 zurückgeführt werden.

Die gegensätzlichen Wirkungen von BMP4 in Huhn und Kaninchen könnten demnach auf unterschiedlichen Embryonalstadien sowie Konzentrationsunterschieden des BMP4 begründet sein. Unveröffentlichten Ergebnissen zufolge konnte auch in Hühnerembryonen, die den Kaninchenstadien der BMP4-Experimente entsprechen, eine ektopische Induktion der Nodal-Signalkaskade durch BMP4 hervorgerufen werden (Thomas Schlange, Marian Ross, persönliche

Mitteilungen). Die Funktion des BMP4 in Kaninchen, zum Zeitpunkt der Neurula- und frühen Somitenstadien, kann damit derjenigen im Huhn gleichgesetzt werden.

4.4 Huhn - Maus - Kaninchen: Welche Faktoren determinieren die Wirkungsweise von FGF8 bei der Entstehung der L/R-Achse?

Die Abbildung 20 stellt die experimentellen Befunde zur FGF8-Wirkung in Huhn, Maus und Kaninchen zusammenfassend gegenüber.

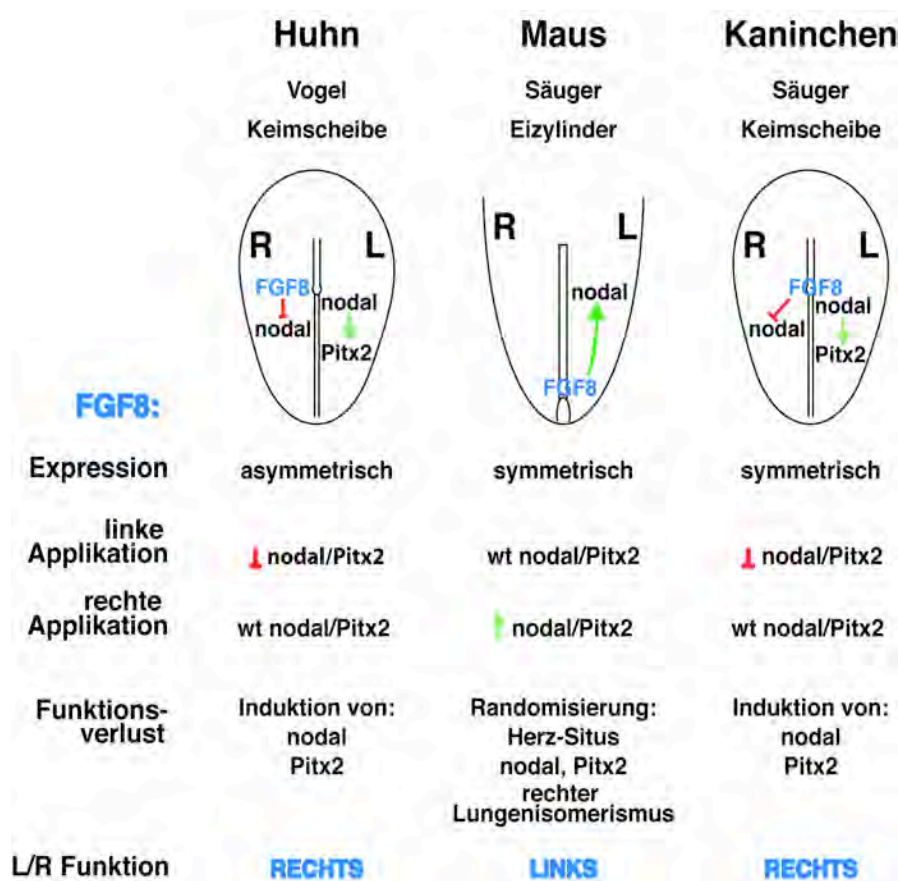


Abb. 20 Vergleichende Darstellung der Funktion von FGF8 in Huhn, Maus und Kaninchen

Dargestellt wird die unterschiedliche Expression von FGF8 und die Veränderung der Expression von *nodal* und *Pitx2* nach linker und rechter Applikation von FGF8-Protein in Huhn, Maus und Kaninchen. Der Funktionsverlust von FGF8 resultiert aus der Plazierung des Inhibitors SU5402 in Huhn und Kaninchen, sowie der hypomorphen Nullmutation in der Maus. Aus diesen Experimenten ergibt sich eine rechte Funktion des FGF8 in Huhn und Kaninchen, sowie eine linke Funktion des FGF8 in der Maus.

Die gleichermaßen in Huhn und Kaninchen vorliegende rechts-asymmetrische Funktion von FGF8 verdeutlicht, dass bezüglich der Rolle von FGF8 keine evolutionär bedingten Unterschiede zwischen Vogel und Säuger existieren. Desweiteren ist die asymmetrische Expression von *fgf8* im Huhn keine Voraussetzung für eine asymmetrische Funktion des FGF8. Die linksseitige Wirkung von FGF8 in der Maus erscheint in dieser Gegenüberstellung aussergewöhnlich und erfordert eine Interpretation der experimentellen Maus-Daten im neuen Gesamtkontext.

Die Lateralitätsdefekte in der partiellen Funktionsverlustsituation des hypomorphen *fgf8*-Allels in der Maus, insbesondere das Fehlen der *nodal*-Expression in der Seitenplatte, lassen sich nur bedingt mit den Ergebnissen der Inhibitor-Experimente in Huhn und Kaninchen vergleichen. So scheint die *nodal*-Expression in der Mittellinie der mutanten Mausembryonen deutlich gestört zu sein (Meyers und Martin, 1999). Findet sich in Wildtyp-Embryonen eine scharf umgrenzte *nodal*-Expression im Bereich des Primitivknotens, so ging diese in den mutanten Embryonen entweder vollständig verloren oder war nur in vereinzelt um die Primitivknotenregion herum verstreuten Zellen zu beobachten. Dieser Befund deutet auf Migrationsdefekte hin, die auch in den Nullmutationen des *fgf8*-, sowie des *FGFR1*-Gens in der Maus beschrieben wurden (Yamaguchi et al., 1994; Sun et al., 1999). Die hypomorphe Mutation des *nodal*-Gens selbst führt ebenfalls zu einer gestörten Expression von *nodal* in der Mittellinie, die in jedem Fall mit einem Verlust der Seitenplattenexpression verbunden ist (Lowe et al., 2001). Eine korrekte *nodal*-Expression in der Mittellinie scheint daher für die Ausbildung der Seitenplattenexpression unerlässlich. Demzufolge stünde die hypomorphe Mutation des *fgf8*-Gens in der Maus nicht notwendigerweise im Widerspruch zu den in Huhn und Kaninchen erhobenen Daten. Allerdings sollte der Migrationsdefekt, sofern es sich wirklich um einen handelt, nicht sonderlich gravierend sein, da der Phänotyp der hypomorphen Mutation, abgesehen von Links-Rechts-Achsendefekten, weitgehend normal erscheint. Das schlüssigste Experiment zur Überprüfung dieses Zusammenhangs wäre eine konditionale Inaktivierung von FGF8 im Primitivknoten im frühen Somitenstadium der Maus.

Die Funktionsgewinn-Daten in der Maus stehen allerdings im Widerspruch zu den entsprechenden Huhn- und Kaninchenexperimenten. Gerade diese Experimente sind aber vor allem in Maus und Kaninchen absolut vergleichbar. So wurde in allen drei Vertebraten das gleiche FGF8-Protein, in der gleichen Konzentration und mit heparinisierten Acrylkugeln desgleichen Typs appliziert. Zudem wurden in Kaninchen und Maus vergleichbare frühe Somitenstadien verwendet. Konnte in diesen Stadien der Maus eine induktive Wirkung des rechtsseitig plazierten FGF8 auf die *nodal*-Expression nachgewiesen werden, so verweisen die entsprechenden Stadien der Kaninchenembryonen auf eine Repression.

Ein offensichtlicher Unterschied zwischen Maus auf der einen sowie Kaninchen und Huhn auf der anderen Seite besteht im anatomischen Aufbau der Gastrula- und Neurulastadien. Im Gegensatz zur flachen Keimscheibe von Huhn und Kaninchen entwickelt sich die Maus über ein Eizylinderstadium. Dieses Stadium erscheint als eine ventrale Ausstülpung einer Keimscheibe in der Primitivknotenregion, wodurch das Ektoderm in das Innere des Zylinders verlagert wird und aussen von Endoderm umgeben ist. Stellt man sich eine vektoriell gerichtete Ausbreitung von Signalen in einem Winkel von 90°C vom Primitivstreifen aus vor, so würden diese in der flachen Keimscheibe den Embryo an der Grenze zum umgebenden extraembryonalen Gewebe verlassen. In einem Eizylinder liegt dagegen eine ringförmig geschlossene Zellschicht vor, die den gesamten Zylinder umhüllt. Vom Primitivstreifen ausgehende Signale würden den Zylinder einmal umkreisen, um letztlich wieder am Primitivstreifen anzukommen. Die linke und rechte Seite einer Keimscheibe wären somit deutlicher räumlich voneinander getrennt, als diejenigen des Eizylinders, in dem rechtsseitige Signale relativ einfach auf die linke Seite wandern könnten.

Eine schnelle Übermittlung von Signalen innerhalb eines Epithels erfolgt in vielen Fällen über gap junctions, die damit einen vektoriellen Transport gewährleisten könnten. Interessanterweise können FGF-Signale mit der Regulation von gap junctions in Verbindung gebracht werden. So konnte in Primärkulturen von Epithelzellen der Hühnerlinse gezeigt werden, dass FGF2 eine Steigerung der durch gap junctions vermittelten Zell-Zell-Kommunikation durch positive Regulation des Öffnungszustandes der gap junctions bewirkt (Le und Musil, 2001).

Die Kultivierung des posterioren Mesenchyms der Gliedmaßenknospe in Anwesenheit von FGF4-Protein bewirkte sowohl im Huhn als auch in der Maus einen Anstieg der Dichte der gap junctions. Diese kann auf eine Steigerung der Connexin43- und Connexin32-Expression zurückgeführt werden und führt letztlich zu einer Zunahme der über gap junctions verlaufenden Kommunikation (Makarenkova et al., 1997). Da FGF8 die Induktion von FGF4 bewirkt, kann die Funktion des FGF4-Proteins letztlich auf FGF8 zurückgeführt werden. Die Applikation von Gegensinn-Oligonukleotiden des Connexin43 auf Gliedmaßenknospen des Huhns, die den Verlust der Connexin43-Expression verursachten, führten andererseits zu Gliedmaßenverkürzungen, die mit einem Verlust der Expression von *fgf8* und *fgf4* verbunden waren (Makarenkova und Patel, 1999). Es besteht somit ein positiver Rückführkreis zwischen den Expressionen von *fgf4* und *fgf8* auf der einen und *Connexin 43* auf der anderen Seite bei der Ausbildung der Gliedmaßenknospe (Makarenkova et al., 1997; Makarenkova und Patel, 1999). *fgf8* und die *Connexine* der gap junctions könnten damit auch während der Links-Rechts-Achsenentwicklung interagieren.

Zudem konnte in *Xenopus*- und Hühnerembryonen ein Einfluss der über gap junctions verlaufenden Kommunikation auf die Entwicklung der Links-Rechts-Achse dokumentiert werden. Basierend auf experimentellen Daten wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem ein über gap junctions verlaufender unidirektionaler Informationsfluss zum Aufbau eines LR-Gradienten führen würde (Levin und Mercola, 1998; Levin und Mercola, 1999). In der Keimscheibe des Huhns ist die Kommunikation über gap junctions im Bereich des Primitivstreifens unterbunden (Levin und Mercola, 1999). Der Primitivstreifen würde daher eine Barriere des Informationsflusses zwischen rechter und linker Seite darstellen. Ein sich vom Primitivstreifen nach rechts über gap junctions ausbreitendes Signal würde sich daher auf der rechten Seite einer Keimscheibe konzentrieren, wohingegen es sich im ringförmig geschlossenen Eizylinder der Maus womöglich auf die linke Seite des Embryos ausbreiten könnte.

Es stellt sich die Frage, inwiefern sich die Wirkung des FGF8 auf die gap junctions mit deren Funktion in der Links-Rechts-Achsenbildung zusammenführen lässt. FGF-Signale induzieren die Expression und modulieren den Öffnungszustand der

gap junctions und beeinflussen letztlich die über gap junctions verlaufende Kommunikation in positiver Weise. Die experimentelle Blockade dieser Kommunikation in Hühnerembryonen bewirkt eine bilaterale Expression von *nodal* in der Seitenplatte (Levin und Mercola, 1999). Demzufolge wäre ein Schließen der gap junctions für die Expression von *nodal* in der Seitenplatte erforderlich. Andererseits bewirkt FGF8 in Huhn und Kaninchen eine Repression von *nodal* in der Seitenplatte. Es scheint somit eine inverse Korrelation zwischen der Aktivität der gap junctions und der Expression von *nodal* in der Seitenplatte zu bestehen.

Es lässt sich daher mutmaßen, ob FGF8 nicht infolge der Aktivierung der gap junctions die *nodal*-Expression in der rechten Seitenplatte verhindert. Dies könnte mit weiteren Experimenten überprüft werden. Zuerst müsste die inverse Korrelation zwischen der Aktivität der gap junctions und der *nodal*-Expression, z.B. mithilfe von Lindan, das die Aktivität der gap junctions stört oder von Gegensinn-Oligonukleotiden des Connexin43 auch im Kaninchen belegt werden. In einem weiteren Experiment könnten FGF8-getränkte Acrylkugeln zusammen mit Lindan verabreicht werden. Aufgrund der Störung der gap junctions wäre FGF8 nun nicht mehr in der Lage eine Aktivierung der gap junctions zu bewirken und sollte daher ebensowenig eine Repression von *nodal* herbeiführen können.

Die Applikation von FGF4 führte sowohl im Huhn als auch in der Maus zur Induktion der Expression von Connexinen (Makarenkova et al., 1997), so dass bezüglich der Wirkung des FGF8 auf die gap junctions keine Unterschiede zwischen Huhn und Maus vorliegen dürften. Die Unterschiede könnten jedoch in der Funktion der gap junctions selbst in der Links-Rechts-Achsenentwicklung oder in der Verteilung derselben im ringförmig geschlossenen Eizylinders begründet sein. Interessanterweise konnten in der Nullmutationen des Connexin43 in der Maus keine Links-Rechts-Defekte festgestellt werden (Reaume et al., 1995). Andererseits konnten in menschlichen Patienten, die Lateralitäts-Defekte aufwiesen, Mutationen der Connexin43-Sequenz nachgewiesen werden (Britz-Cunningham et al., 1995). Demnach konnte ein Einfluss der gap junctions auf die Entwicklung der Links-Rechts-Achse bislang nur in Huhn und Mensch, aber nicht in der Maus festgestellt werden. Dies könnte, da sich der menschliche Embryo ebenfalls über ein Keimscheibenstadium entwickelt, auf eine unterschiedliche

Funktion der durch FGF8 gesteuerten gap junctions im Eizylinder der Maus hindeuten.

Gerade die vergleichbare morphologische Entwicklung von Kaninchen und Mensch macht das Kaninchen zu einem interessanten und im Vergleich zur Maus potentiell relevanteren Modell. Zudem zeigen die meisten der klonierten Kaninchen-Nukleotidsequenzen eine höhere Homologie zu den entsprechenden menschlichen Nukleotidsequenzen, als die entsprechenden Maus-Mensch-Nukleotidsequenzpaare (Abb.A6, im Anhang). Der einfache Zugang zur relativ großen Keimscheibe, das frühzeitige und einfache Erkennen der embryonalen Achsen vor der Bildung des Primitivstreifens, sowie die Möglichkeit zur *in vitro* Kultur und zur Manipulation des Embryos sichern dem Kaninchen einen Platz als Säugermodellsystem für die frühe Embryogenese.

Anhang

Im Hühnerembryo wird eine Anzahl von Genen im Bereich der Mittellinie, sowie in der Seitenplatte asymmetrisch exprimiert und entsprechende Experimente sicherten ihnen eine ebenso asymmetrische Funktion zu (Levin et al., 1995; Meno et al., 1996; Isaac et al., 1997; Levin et al., 1997; Logan et al., 1998; Meno et al., 1997; Pagan-Westphal et al., 1998; Ryan et al., 1998; St. Amand et al., 1998; Boettger et al., 1999; Schneider et al., 1999; Tsukui et al., 1999). In der Maus, im Zebrafisch und in *Xenopus* konnte eine asymmetrische Expression nur bei *nodal*, *Pitx2* und *lefty* festgestellt werden (Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996; Varlet et al., 1997; Yoshioka et al., 1998; Campione et al. 1999; Essner et al., 2000; Faucourt et al., 2001). Funktionelle Analysen in der Maus bescheinigten indessen auch symmetrisch exprimierten Genen, wie *fgf8* und *shh*, eine Funktion in der Regulation der Links-Rechts-Kaskade (Meyers und Martin, 1999; Tsukui et al., 1999). Es bestand daher die Vermutung, dass dieser asymmetrischen Funktion eine eventuell sehr transiente und nur auf wenige Zellen begrenzte Asymmetrie zugrundeliegt, die bei der Analyse des sehr kleinen Eizylinderstadiums der Maus nicht ausreichend untersucht werden konnte. Die relativ große und flache Keimscheibe des Kaninchens könnte die Detektion einer solchen Asymmetrie hingegen ermöglichen.

Im folgenden wird die Klonierung und Expressionsanalyse von Genen im Kaninchen beschrieben, die im Huhn asymmetrisch exprimiert werden. Diese sind *HNF3 β* , *ptc*, *Snail*, *NKx3.2*, *Aktivin β B* und der *Aktivinrezeptor IIA*.

Im Huhn wird die Transkription von *HNF3 β* und *ptc* durch *shh* induziert, weswegen diese, ebenso wie *shh*, asymmetrisch in der linken Seite des Primitivknotens exprimiert werden (Levin et al., 1995; Marigo et al., 1996; Pagán-Westphal und Tabin, 1998). In allen anderen Wirbeltieren konnte diese Asymmetrie nicht beobachtet werden.

Snail wird im Huhn während der Somitenstadien einseitig nur im rechten Seitenplattenmesoderm exprimiert (Isaac et al., 1997). In der Maus konnte *Snail*

einer Publikation zufolge ebenso asymmetrisch in der rechten Seitenplatte detektiert werden (Sefton et al., 1998).

NKx3.2 findet sich im Huhn vom 12 Somitenstadium an asymmetrisch im linken Seitenplattenmesoderm (Schneider et al., 1999). In der Maus wird *NKx3.2* dagegen verstärkt asymmetrisch im rechten Seitenplattenmesoderm exprimiert (Schneider et al., 1999).

Die beiden Gene *Aktivin β B* und der *Aktivinrezeptor IIA* werden im Huhn asymmetrisch auf der rechten Seite des Primitivknotens exprimiert (Levin et al. 1995). In der Maus kann eine Expression in den entsprechenden Stadien nicht nachgewiesen werden.

A1. Ergebnisse

A1.1 Klonierung von *HNF3 β* im Kaninchen

HNF3 β gehört, ebenso wie *HNF3 α* und *HNF3 γ* , zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die die sogenannte forkhead-Domäne enthalten, benannt nach dem in *Drosophila* gefundenen homöotischen Gen *forkhead* (Weigel und Jäckle, 1990). Diese konservierte Domäne umfasst 110 Aminosäuren und wird für die DNA-Bindung benötigt.

Anhand des Vergleiches bekannter cDNA-Sequenzen von Maus, Ratte, Huhn und *Xenopus* wurden 8 Oligonukleotide entworfen, die zur entsprechenden Region von Maus und Ratte 100-prozentig homolog waren. Mit cDNA von E9 Kaninchenembryonen konnten bei einer PCR mit 8 unterschiedlichen Primerkombinationen drei Fragmente amplifiziert werden. Die anschließende Klonierung und Sequenzierung des größten Fragmentes bestätigte den Erhalt eines *HNF3 β* -Fragmentes mit einer Länge von 762 bp, welches einen Großteil der hoch konservierten forkhead-Domäne enthält (Abb. A5).

A1.1.1 Symmetrische Expression von *HNF3 β* im Kaninchenembryo

Untersucht wurden Kaninchenembryonen der Stadien 5a bis hin zum 5 Somitenstadium (vgl. Abb. 2).

Im Stadium 5a wurde *HNF3 β* im anterioren Teil des Primitivstreifens in allen drei Keimschichten exprimiert (Abb.A1, A, A´´´). In transversalen Schnitten dieser Region zeigten sich *HNF3 β* -exprimierende Zellen im Ekto- und einwandernden Mesoderm des Primitivstreifens, sowie im gesamten Endoderm. Die deutlich am stärksten *HNF3 β* -exprimierende Region des Kaninchenembryos war jedoch der Primitivknoten (Abb.A1, A, sowie B-F). Im Schnitt wurde die Verteilung von *HNF3 β* -Transkripten im Ekto-, Meso- und dem Endoderm deutlich, wobei die Mesodermzellen die stärkste Expression aufwiesen (Abb.A1, A´´). In diesem sowie in allen nachfolgenden Stadien war keine asymmetrische Verteilung von *HNF3 β* -exprimierenden Zellen im Bereich des Primitivknotens erkennbar (Abb.A1, A´´, B´´). Nach anterior auswandernde Zellen des Kopffortsatzes exprimierten ebenfalls *HNF3 β* . Deutlich erkannte man im transversalen Schnitt die starke Expression in mesodermalen Zellen des Kopffortsatzes und den darunterliegenden Endodermzellen, die zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung noch nicht zur Notochordplatte verschmolzen sind (Abb.A1, A, A´). In den darüberliegenden Ektodermzellen der Bodenplatte wurde *HNF3 β* ebenfalls exprimiert (Abb.A1, A´).

Vom Stadium 5b an konnte keine *HNF3 β* -mRNA mehr im Primitivstreifen nachgewiesen werden. Wiederum in besonders hohem Maße fanden sich dagegen *HNF3 β* -Transkripte im Primitivknoten (Abb.A1, B), und zwar hauptsächlich in den Mesodermzellen, sowie den darunterliegenden als auch sämtlichen Endodermzellen (Abb.A1, B´´). In der Mittellinie wurden *HNF3 β* -exprimierende Zellen in der mittlerweile gebildeten Notochordplatte und der darüberliegenden Bodenplatte (Abb.A1, B´), sowie im Prächordalplatten-Mesoderm detektiert (Abb.A1, A-F). Dieses Expressionsmuster blieb in sämtlichen untersuchten Somitenstadien bestehen. In transversalen Vibratomschnitten dieser Stadien wurde zudem die in den Somitenstadien verstärkte Expression von *HNF3 β* in den Endodermzellen deutlich (Abb.A1, E´). Gleichzeitig fanden sich nun auch *HNF3 β* -Transkripte in einigen an die Mittellinie grenzenden Zellen des paraxialen Mesoderms (Abb.A1, E´).

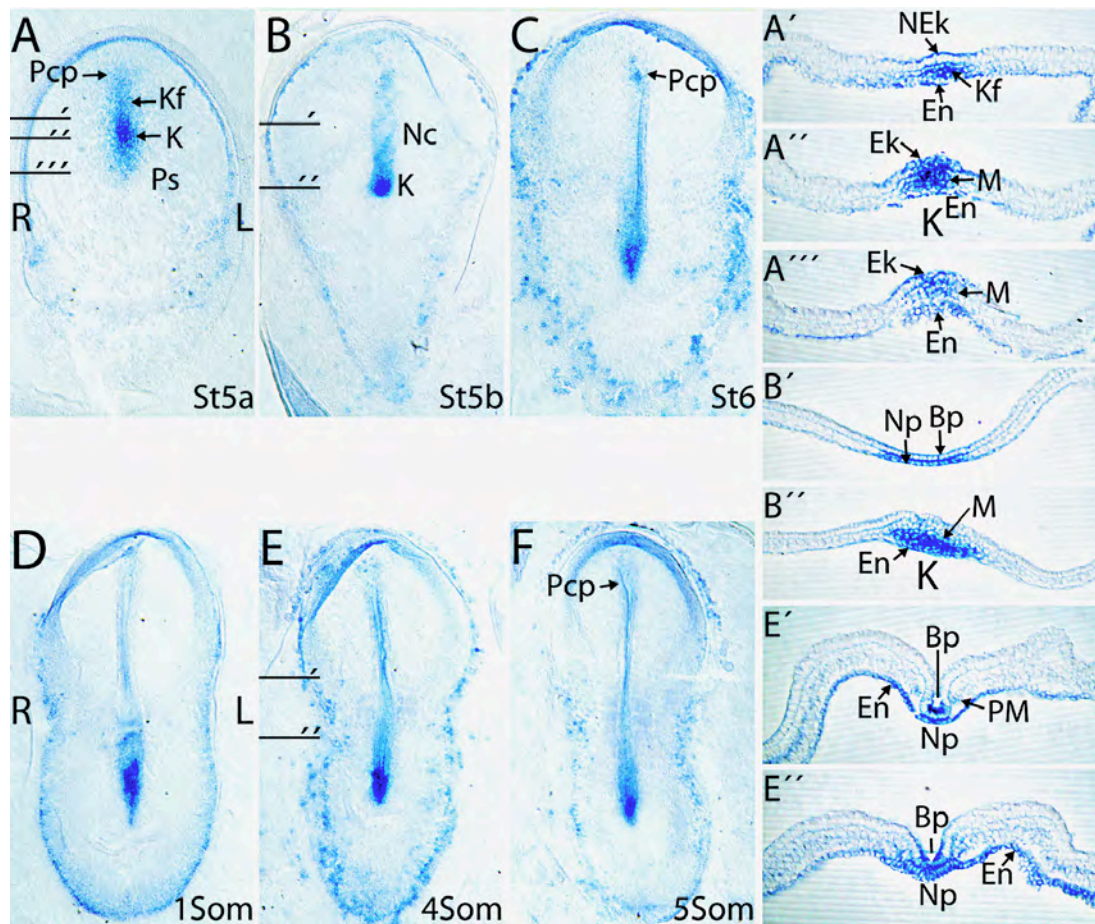


Abb. A1 Expressionsanalyse von *HNF3β* in Wildtyp-Kaninchenembryonen nach *in situ* Hybridisierung

(A) *Hnf3β*-Expression im anterioren Teil des Primitivstreifens (Ps) (A'''), im Primitivknoten (K) (A'') und im Kopffortsatz (Kf) (A'), sowie im Prächordalplattenmesoderm (Pcp) im Stadium 5a.

(B-F) Vom Stadium 5b an fanden sich *HNF3β*-Transkripte im Primitivknoten (K), sowie in der Notochordplatte (Np) (B', E', E''), der Prächordalplatte (Pcp) und der darüberliegenden Bodenplatte (Bp) (B', E', E''). Die Expression im Primitivknoten war in jedem Stadium symmetrisch (A'', B'').

(A''') Transversalschnitt durch den Primitivstreifen des Stadiums 5a, in welchem Expression im Ektoderm (Ek), Mesoderm (M) und Endoderm zu finden war.

(A'', B'') Transversalschnitte auf Knotenhöhe zeigen die symmetrische Verteilung der mRNA im Ektoderm (Ek), Mesoderm (M) und Endoderm (En).

(A') Transversalschnitt anterior des Knotens in Stadium 5a zeigt die Expression im Endoderm (En), des auswandernden Mesoderms des Kopffortsatzes (Kf) und dem darüberliegenden Neuroektoderm (NEk).

(B', E', E'') Transversalschnitte durch die Mittellinie verdeutlichen die Expression in Notochordplatte (Np) und darüberliegender Bodenplatte (Bp), dem gesamten Endoderm (En), sowie die Expression in den der Mittellinie benachbarten Zellen des paraxialen Mesoderms (PM).

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an.

Abgesehen von der Expression im Primitivstreifen und der schon in Vorsomitenstadien einsetzenden Expression im gesamten Endoderm, glichen sich die Expressionsdomänen von *shh* und *HNF3β*. Die Expression von *HNF3β* war damit, ebenso wie die von *shh*, stets symmetrisch ausgeprägt.

A1.2 Klonierung von *ptc* im Kaninchen

Anhand des Vergleiches von *ptc*-cDNA-Fragmenten der Spezies Maus, Ratte, Mensch und Huhn wurden 7 Oligonukleotide konstruiert, die zu den entsprechenden Regionen von Maus, Ratte und Mensch 100-prozentig homolog waren. Anhand von 12 verschiedenen Primerkombinationen konnten, mithilfe der cDNA von E9 Kaninchenembryonen als Matrize, 10 interessante Fragmente per PCR amplifiziert werden. Die Klonierung des längsten Fragmentes und seine anschließende Sequenzierung bestätigten den Erhalt eines 760 bp großen Fragmentes von *ptc* (Abb.A5).

A1.2.1 Symmetrische Expression von *ptc* im Kaninchenembryo

Untersucht wurden die Stadien 4b bis hin zum 5 Somitenstadium (Abb.2).

ptc-Expression trat erstmals im Stadium 5a im Primitivknoten, sowie in den Mesodermzellen des Kopffortsatzes in Erscheinung (Abb.A2, A). Im darauffolgenden Entwicklungsstadium 5b fanden sich *ptc*-Transkripte ebenfalls im Primitivknoten, in dessen Transversalschnitt *ptc*-exprimierende Zellen im Ektoderm, den Mesodermzellen und im gesamten Endoderm zu erkennen waren (Abb.A2, B, B'). Die Verteilung der für *ptc*-Transkription positiven Zellen war in diesem, sowie in allen untersuchten Stadien stets symmetrisch (Abb.A2, B', D'). Transversalschnitte durch die von der Notochordplatte und dem ventralen Abschnitt der Neuralplatte gebildeten Mittellinie zeigten *ptc*-Transkription in den Zellen der Bodenplatte, sowie den darunterliegenden mesodermalen Notochordplattenzellen (Abb.A2, B'). Expression von *ptc* war zudem in den aus dem Primitivknoten ausgewanderten Zellen des prächordalen Mesendoderms am anterioren Ende des axialen Mesoderms detektierbar (Abb.A2, A-D). Diese Expressionsdomäne blieb in sämtlichen untersuchten Kaninchenstadien bestehen und weitete sich auch auf die darüberliegenden Neuralplattenzellen aus (Abb.A2, D').

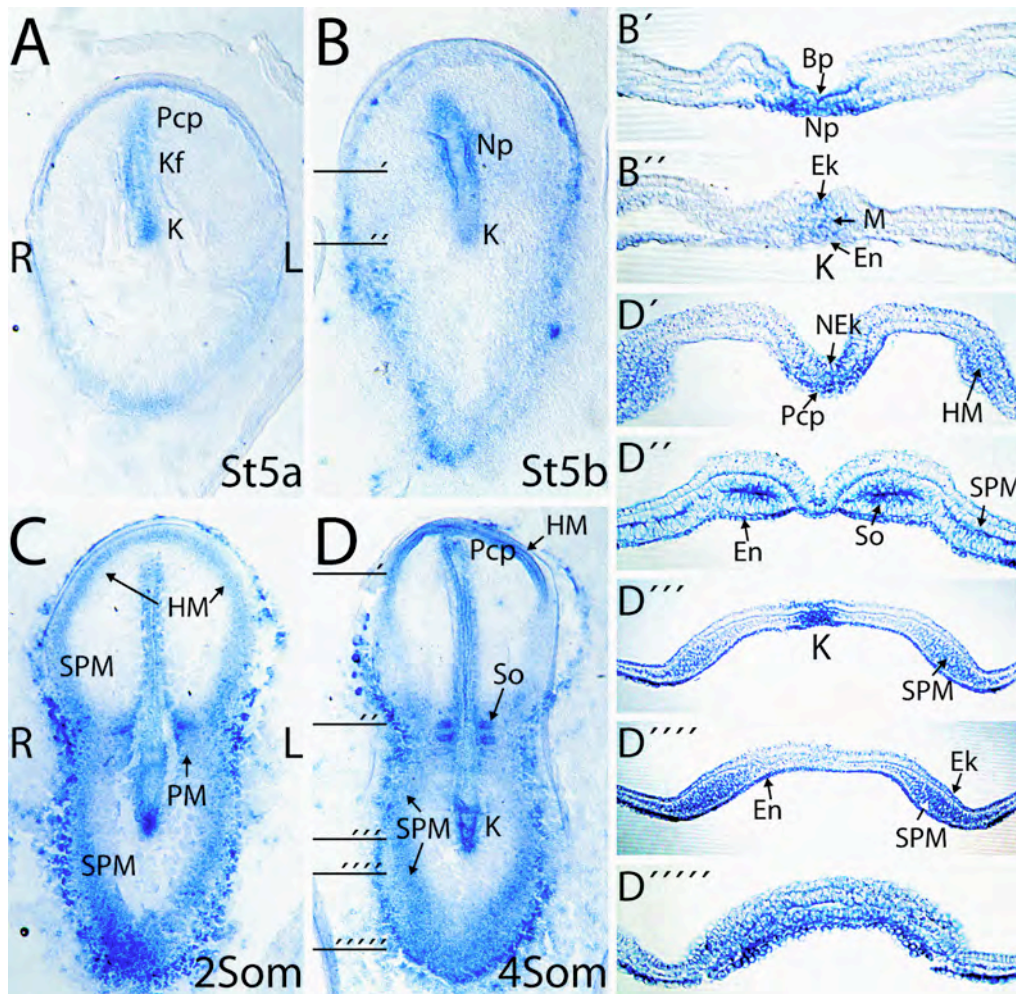


Abb. A2 Expressionsanalyse von *patched* in Wildtyp-Kaninchenembryonen nach *in situ* Hybridisierung

(A,B) In Vorsomitestadien wurde *patched* im Primitivknoten (K), dem Kopffortsatz (Kf), bzw. der Notochordplatte (Np), der Prächordalplatte (Pcp) und der darüberliegenden Bodenplatte (Bp) exprimiert (B, B'). Die Expression im Knoten war in jedem Stadium symmetrisch (B'', D''').

(B'') Transversalschnitt durch den Primitivknoten im Stadium 5b zeigt die Verteilung von *patched*-mRNA im Ekto- (Ek), Meso- (M) und Endoderm (En).

(B') Transversalschnitt durch die Mittellinie zeigt die Expression in der Notochordplatte (Np) und in der darüberliegenden Bodenplatte (Bp).

(C,D) Die Expression in den Somitenstadien weitete sich zusätzlich auf die Somiten (So) (D''), das paraxiale Mesoderm (PM), das Seitenplattenmesoderm (SPM) (D'', D''', D''') und das Mesoderm der Herzregion (HM) (D') aus.

(D') Transversalschnitt durch die Herzregion zeigt die Expression in der Prächordalplatte (Pcp), dem darüberliegenden Neuroektoderm (NEk) und dem Herzmesoderm (HM).

(D'') Transversalschnitt in Höhe eines Somiten zeigt die Verteilung von *ptc*-mRNA im Somitenepithel (So), dem gesamten Endoderm (En), sowie dem Seitenplattenmesoderm (SPM).

(D''', D''') Transversalschnitte durch Knoten und Primitivstreifen zeigen die bilaterale Expression in der Seitenplatte, im epidermalen Ektoderm (Ek), dem Seitenplattenmesoderm (SPM) und im gesamten Endoderm (En).

(D''''') Transversalschnitt durch den posterioren Primitivstreifen verdeutlicht die Expression in allen drei Keimschichten.

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an.

Von Stadium 5b an fand sich bereits eine schwache *ptc*-Expression in einem Streifen links und rechts der direkt an die Mittellinie angrenzenden Zellen des Mesoderms (Abb.A2, B). Mit der Differenzierung der ersten Somiten wurde eine neue Expressionsdomäne in dem die Somiten umgebenden paraxialen Mesoderm deutlich (Abb.A2, C, D), wobei vor allem die Epithelzellen der Somiten eine starke Transkription aufwiesen (Abb.A2, D´). Diese Expression ging lateral auch auf die Zellen des angrenzenden Seitenplattenmesoderms über. Hier beschränkte sich die Expression nicht allein auf die sich auf Höhe der Somiten befindlichen Zellen, sondern weitete sich auf das gesamte sowohl anteriore als auch posteriore Seitenplattenmesoderm aus (Abb.A2, C, D). Demzufolge fand sich *ptc*-Transkription auch in den Zellen der Herzanlage (Abb.A2, D´), sowie im gesamten posterioren Mesoderm des Kaninchenembryos (Abb.A2, D´´-D´´´´´). Die bereits seit den Vorsomitenstadien aufgetretene Expression im gesamten Endoderm, blieb bis in die Somitenstadien hinein erhalten (Abb.A2, alle Schnitte).

Eine Co-Expression von *shh* und *ptc* fand nur im Primitivknoten und den Zellen von Notochord-, Boden- und Prächordalplatte statt. Spätestens mit dem Einsetzen der Somitendifferenzierung wurde die Expression von *ptc* sehr komplex und war auch in nicht *shh*-transkribierenden Zellen des Mesoderms zu finden. Ebenso wie andere Mittellinienmarker zuvor, wurde auch *ptc* in den untersuchten Entwicklungsstadien des Kaninchenembryos ausschließlich symmetrisch exprimiert.

A1.3 Klonierung von *Snail* im Kaninchen

In Vertebraten existieren nur zwei Mitglieder der *Snail*-Familie von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, *Snail* und *Slug*. Das *Snail*-Gen umfasst drei Exons und besitzt im Vergleich zu *Slug* nur vier von fünf möglichen Zinkfingern (Smith et al., 2000).

Anhand eines cDNA-Sequenzvergleiches zwischen Maus, Mensch, Huhn und *Xenopus* konnten vier Oligonukleotide bestimmt werden, die zu 100 Prozent den entsprechenden Regionen in Maus und Mensch homolog waren. Unter Verwendung von E9 Kaninchen-cDNA wurden in einer Polymerase-Kettenreaktion 4 Primerkombinationen unter unterschiedlich stringenten Bedingungen auf

mögliche Amplifikationsprodukte untersucht. Es konnte nur eine interessante Bande gefunden werden, die sich nach Klonierung und anschließender Sequenzierung als ein *Snail*-Fragment mit einer Größe von 484 bp herausstellte. Die Sequenz beinhaltet den ersten und den N-terminalen Teil des zweiten von vier Zinkfingermotiven, sowie einen Großteil der N-terminalen Region, die *Snail*-deutlich von *Slug*-Mitgliedern unterscheidet (Abb. A5).

A1.3.1 Symmetrische Expression von *Snail* im Kaninchenembryo

Untersucht wurden die Stadien 3b bis hin zum 6 Somitenstadium (siehe Abb. 2).

Snail wurde im Stadium 3b in dem sich nach vorne verlängernden Primitivstreifen in allen drei Keimschichten exprimiert. Die ersten endodermalen und mesodermalen Zellen, die in diesem Stadium den Primitivstreifen zu beiden Seiten verlassen, behielten dabei weiterhin ihre *Snail*-Aktivität (Abb.A3, A, A').

Snail-Transkription fand sich während der Entwicklung des Primitivstreifens, von Stadium 3b bis zum Stadium 5b, immer auf der jeweils ganzen Länge desselben (Abb.A3, A-C) und weitete sich daher im Stadium 4b bis hin zum Primitivknoten aus (Abb.A3, B, B'). In den Zellen des Primitivknotens selbst war hingegen keine *Snail*-Aktivität feststellbar. Im Stadium 4b war bereits das gesamte Ektoderm mit endodermalen und mesodermalen Zellen unterlegt. Deutlich erkannte man die Verteilung von *Snail*-mRNA im naszierenden Mesoderm und den darunterliegenden Endodermzellen auf beiden Seiten des Primitivstreifens, jedoch noch keineswegs uniform, sondern verstärkt in der Nähe des Primitivstreifens, vor allem in dessen posterioren Bereich (Abb.A3, B, B').

Im Stadium 5b war nun das gesamte Endo- und Mesoderm, links und rechts des gleichermaßen für *Snail*-mRNA positiven Primitivstreifens, von *Snail*-exprimierenden Zellen ausgefüllt (Abb.A3, C, C', C''). *Snail*-Transkription war dagegen, abgesehen von den ektodermalen Primitivstreifenzellen, nicht im Ektoderm zu finden (Abb.A3, C', C'').

Die Verteilung von *Snail*-mRNA in den Zellen des Primitivstreifens der bisher analysierten Stadien war keineswegs gleichmäßig. Vielmehr konnte, ähnlich wie bei *fgf8*, eine verstärkte Expression im posterioren Abschnitt des Primitivstreifens, dem posterioren Knoten, beobachtet werden (Abb.A3, A, B, C, C''), welcher auch in späteren Somitenstadien noch eine starke Transkription aufwies (Abb.A3, F, G, G'', H).

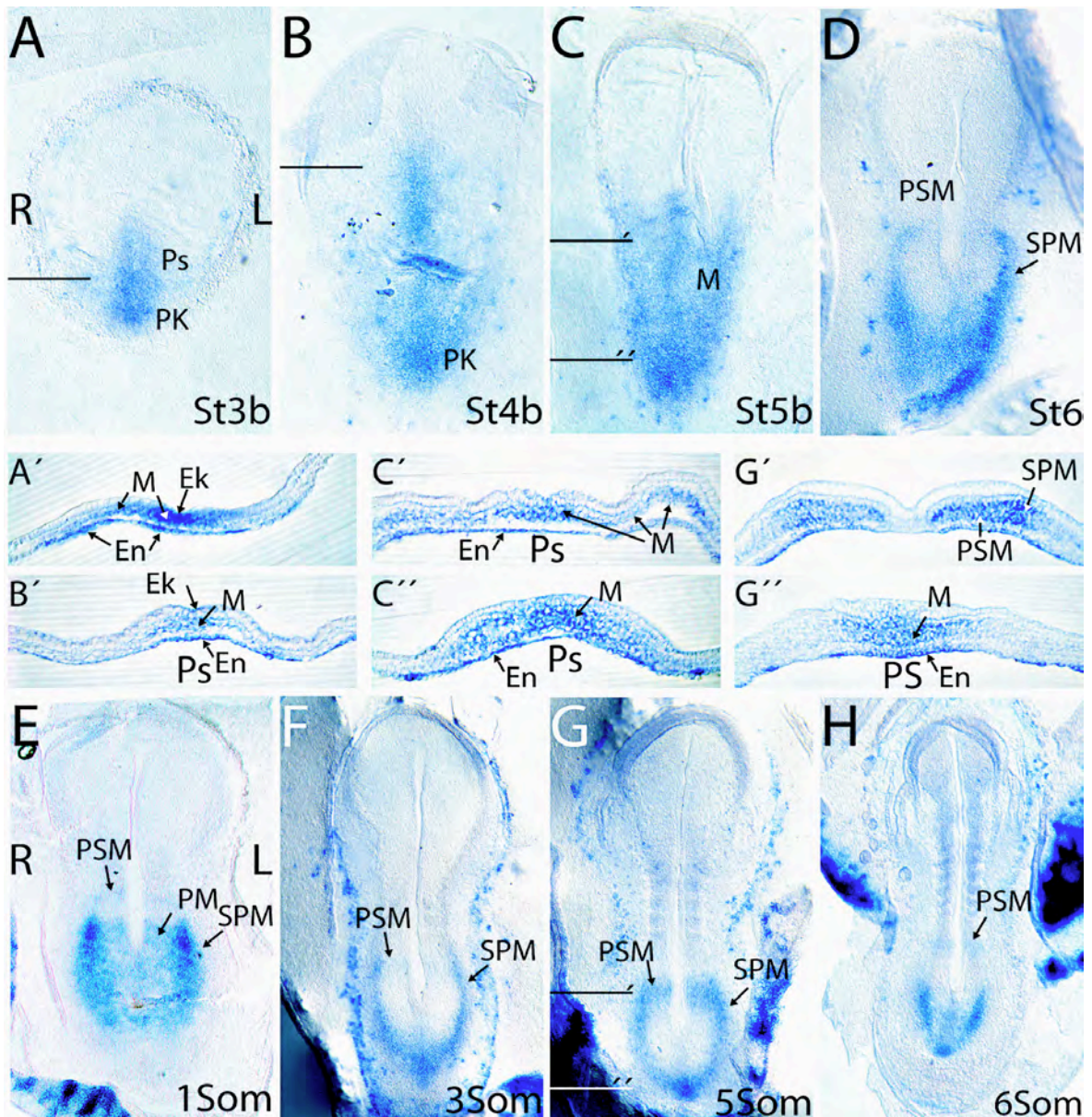


Abb. A3 Expressionsanalyse von *Snail* in Wildtyp-Kaninchenembryonen nach *in situ* Hybridisierung

(A, B, C) Vom Stadium 3b an wurde *Snail* im Primitivstreifen (Ps), mit der stärksten Expression im posterioren Knoten (PK) (C'), im auswandernden Mesoderm (M), sowie im Endoderm (En) exprimiert.

(A', B', C', C'') Transversalschnitte in Höhe des Primitivstreifens im Stadium 3b, 4b und 5a zeigen die Expression im Ekto- (Ek), Meso- (M) und Endoderm (En) des Primitivstreifens, sowie im gesamten Endoderm (En) und dem auswandernden Mesoderm (M).

(D-H) Von Stadium 6 an fanden sich *Snail*-Transkripte zusätzlich im paraxialen Mesoderm (PM) vor allem in einer vom restlichen paraxialen Mesoderm abgegrenzten Domäne, dem Präsomitischen Mesoderm (PSM), sowie in einem schmalen Randstreifen des Seitenplattenmesoderms (SPM). Die Expression im SPM war in jedem Stadium symmetrisch (D-H).

(G') Transversalschnitt in Höhe des präsomitischen Mesoderms zeigt die Expression im präsomitischen Mesoderm (PSM), dem zur Mitte hinweisenden Teil des Seitenplattenmesoderms (SPM), sowie dem darunterliegenden Endoderm (En).

(G'') Transversalschnitt durch den posterioren Primitivstreifen zeigt die Verteilung von mRNA im Meso- (M) und Endoderm (En) des Primitivstreifens.

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an.

Vom Stadium 6 an veränderte sich mit der einsetzenden Differenzierung des Mesoderms auch die Lokalisierung von *Snail*-mRNA (Abb.A3, D-H). Zum einen verlagerte sich das für *Snail*-mRNA positive Mesoderm aufgrund der Regression des Primitivknotens nach anterior und erschien somit links und rechts der Mittellinie im paraxialen Mesoderm (Abb.A3, D-H, G´). Zum anderen wurde die *Snail*-Transkription um den Primitivknoten und den vorderen Abschnitt des Primitivstreifens herunterreguliert, wodurch sich die Expression auf den posterioren Primitivstreifen beschränkte und gleichzeitig eine deutlich abgegrenzte Expressionsdomäne im paraxialen Mesoderm entstand. Diese Expressionsdomäne lag als präsomitisches Mesoderm exakt vor dem zuletzt differenzierten Somiten und wurde vom restlichen paraxialen Mesoderm durch eine *Snail*-mRNA-freie Region getrennt (Abb.A3, E).

Es kam folglich zur Ausbildung einer U-förmigen Domäne, die ausgehend vom posterioren Mesoderm des Primitivstreifens zur paraxialen Mesodermdomäne zog (Abb.A3, F-H). Transversale Schnitte zeigten *Snail*-exprimierende Zellen im Mesoderm, sowie dem darunterliegenden Endoderm, das in sämtlichen Stadien eine Expression vorwies (Abb.A3, G´). Bei der genauen Analyse dieser Schnitte konnte eine *Snail*-Expression auch in den Zellen der Seitenplatte detektiert werden, allerdings nur in einer schmalen zur Embryomitte ausgerichteten Randzone des Seitenplattenmesoderms und nicht in der äusseren Hauptzone desselben. Die Expression im Seitenplattenmesoderm war zu jedem Entwicklungsstadium symmetrisch (Abb.A3. D-H) Im 6/7 Somitenstadium wurde *Snail* zusätzlich auch in den Somiten exprimiert (Abb.A3, H).

Die Verteilung der *Snail*-mRNA war damit in den untersuchten Stadien stets symmetrisch.

A1.4 Klonierung von *NKx3.2* im Kaninchen

NKx3.2 gehört zur Homöobox-enhaltenden NK-Familie, die nach der Hox-Klasse die umfangreichste Homöobox-Super-Klasse darstellt (Lufkin, 1996). *NKx3.2*-Gene, bestehend aus zwei Exons, besitzen neben der Homöobox im zweiten

Exon drei weitere konservierte Domänen, die TN-Domäne ca. 8-35 Aminosäuren vom Startcodon, die NK2-SD-Domäne und die BAP-Domäne (Harvey, 1996). Für die Klonierung von *NKx3.2* wurden mir freundlicherweise zwei degenerierte Oligonukleotide von André Schneider (Universität Braunschweig) zur Verfügung gestellt, wovon einer in der Homöobox und der andere in der Bap-Domäne lag und welche bereits positiv auf Huhn und Maus getestet worden waren. Da ein erster PCR-Ansätze keinen Erfolg brachte und die Primer nur ein sehr kurzes Fragment von ca. 240 bp versprachen, wurden anhand von cDNA-Vergleichen von Mensch, Maus und *Xenopus* 6 neue Oligonukleotide entworfen. Diese waren sowohl zur menschlichen als auch zur Mäuse-cDNA 100-prozentig homolog. Nach zahlreichen Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Primerkombinationen, neu konstruierten Primern, neu hergestellter cDNA, sowie verschiedenen Versuchsbedingungen der PCR konnte schließlich ein interessantes Fragment amplifiziert und kloniert werden. Eine nachfolgende Sequenzierung bestätigte den Erhalt eines 747 bp großen *NKx3.2*-Homologs, das den C-terminalen Teil des ersten Exons, sowie den N-terminalen Teil des zweiten Exons mit der Homöobox und der NK2-SD-Domäne umfasst (Abb.A5).

A1.4.1 Keine Expression von *NKx3.2* im Seitenplattenmesoderm

Untersucht wurden die Stadien 5b bis hin zum 13 Somitenstadium (Abb.2).

NKx3.2-Expression war nicht vor Beginn der Somitenbildung detektierbar (nicht gezeigt). In den frühen Somitenstadien wurde eine Lokalisation von *NKx3.2*-mRNA schwach in den sich vom restlichen paraxialen Mesoderm durch Epithelialisierung abgrenzenden Somiten sichtbar (nicht gezeigt).

Erst vom 8 Somitenstadium an konnte *NKx3.2*-Transkription verstärkt in den Somitenpaaren nachgewiesen werden, wobei die Intensität der *NKx3.2*-Expression mit zunehmenden Somitenalter anstieg. Somit kam es zur Ausbildung eines anterior-posterioreren mRNA-Gradienten entlang den sich neben der Mittellinie aufgereihten Somiten, mit der stärksten Expression in den anterioren und damit älteren Somitenpaaren (Abb.A4, A-D, Vergleiche C'' und C''').

Das ringförmig angeordnete Epithel der Somiten gliedert sich im Verlauf der Entwicklung in zwei Hälften, den ventro-medialen Bereich, der nahe Mittellinie und Endoderm angesiedelt ist und als Sklerotom bezeichnet wird, sowie die laterale Region, die als Derma-Myotom bezeichnet wird. Die Sklerotomzellen lösen sich in

späteren Somitenstadien aus dem Epithelverband, um neben dem Notochord die Wirbelsäulenanlage zu bilden. Die Verteilung von *NKx3.2*-Transkripten innerhalb des in sich geschlossenen Epithelverbandes des Somiten konzentrierte sich hauptsächlich auf den medial-ventralen Teil des Sklerotoms (Abb.A4, C''). Ebenso fanden sich *NKx3.2*-exprimierende Zellen im darunterliegenden Abschnitt des Endoderms (Abb.A4, C'').

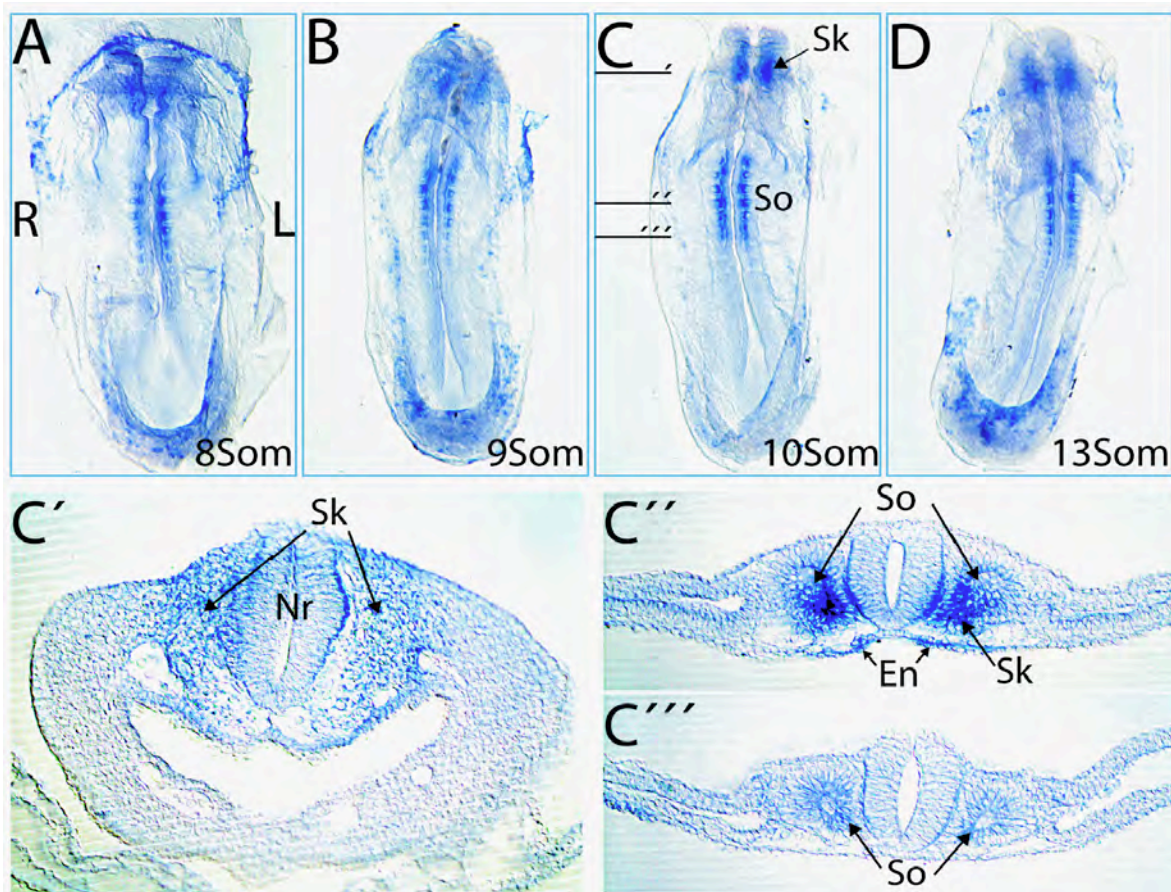


Abb. A4 Expressionsanalyse von *NKx3.2* in Wildtyp-Kaninchenembryonen des Somitenstadiums nach *in situ* Hybridisierung

(A-D) Expression von *NKx3.2* in den Somiten (So) (C'', C''') und dem okzipitalen Sklerotom (Sk) (C') zwischen dem 8-13 Somitenstadium. Die Expression war stets stärker in den anterioren Somitenpaaren (Vergleich C'' mit C''').

(C') Transversalschnitt in Höhe eines Somiten zeigt die Expression vor allem im medial-ventralen Bereich des Somitenepithels, dem Sklerotom (Sk), sowie im darunterliegenden Endoderm (En).

(C'') Im Kopf fand sich *NKx3.2*-mRNA bilateral zu beiden Seiten des Neuralrohrs (Nr), im okzipitalen Sklerotom (Sk).

Sämtliche Embryonen sind in ventraler Ansicht dargestellt. Balken deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an.

Im Kopfbereich des 8 bis 13 Somiten-Kaninchenembryos wurde eine bilateralsymmetrische Domäne sichtbar, dessen Zellen in transversalen Vibratonschnitten dem okzipitalen Sklerotom zugeordnet werden konnten (Abb.A4, C').

Eine über den Hintergrund hinausgehende deutliche Expression im Seitenplattenmesoderm konnte in keinem der analysierten Stadien beobachtet werden.

A1.5 Klonierung des TGF β -Signalmoleküls *Aktivin β B* im Kaninchen

Aktivin β B ist eine von vier Isoformen der monomeren Untereinheiten des Aktivindimers. Aktivine sind Mitglieder der Transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β) - Superfamilie. Die einzelnen biologisch aktiven Untereinheiten bilden sich aus einem inaktiven Vorläufer-Protein, mit einer Signalsequenz am N-terminalen Ende und der reifen C-terminalen Sequenz.

Für die Klonierung der *Aktivin β B*-Untereinheit wurden cDNA-Sequenzen von Maus, *Xenopus* und Huhn auf homologe Regionen hin geprüft und schließlich 5 degenerierte Oligonukleotide konstruiert, die in der nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktion als Primer dienen sollten. Mit cDNA von E9 Kaninchenembryonen konnten bei einer Versuchsreihe mit 6 unterschiedlichen Primerkombinationen zwei interessante Fragmente amplifiziert werden, wovon eines kloniert und einer nachfolgenden Sequenzierung unterzogen wurde. Diese bestätigte ein 693 bp großes *Aktivin β B*-Homolog, das den C-terminalen Teil der Pro-Peptid-Domäne und den N-terminale Teil der Nukleotidsequenz, die für das reife Peptid kodiert, beinhaltet (Abb.A5).

Versuche die Expression von *Aktivin β B* im frühen Kaninchenembryo der Stadien 3 bis hin zum 5 Somitenstadium mithilfe einer nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierung nachzuweisen schlugen allesamt fehl. Offensichtlich ist das Gen in diesen Stadien nicht oder nur sehr schwach aktiv, weswegen es nicht über den Hintergrund einer *in situ* Hybridisierung hinaus detektierbar ist.

A1.6 Klonierung des *Aktivin-Rezeptors IIA* im Kaninchen

Der *Aktivin-Rezeptor IIA* gehört zur Familie der Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren, welche eine einzige Transmembran-Domäne, eine extrazelluläre Liganden-Binde-Domäne, sowie einen cytoplasmatischen Teil mit der Serin/Threonin Protein-Kinase-Aktivität besitzen.

Basierend auf einem Nukleotidsequenzvergleich des *Aktivinrezeptors IIA* in Ratte, Mensch, Huhn und Rind wurden daher 10 Oligonukleotide entworfen, die als Primer für die PCR eingesetzt werden konnten und die zu 100 Prozent mit der Sequenz von Ratte, Mensch und Rind übereinstimmten. Aus einem Versuchsansatz mit 13 verschiedenen Primerkombinationen konnten 10 interessante Fragmente erhalten werden. Klonierung und anschließende Sequenzierung führten schließlich zur Gewinnung eines 1038 bp großen *Aktivinrezeptor IIA*-Homologs, welche eine für Aktivinrezeptoren des Typs I und II charakteristische Domäne sowie die Protein-Kinase-Domäne enthält (Abb.A5).

Ebenso wie bei *Aktivin β B*, schlugen auch mit dem *Aktivinrezeptor IIA* sämtliche Versuche die Expression im frühen Kaninchenembryo der Stadien 3 bis hin zum 5 Somitenstadium mithilfe einer nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierung nachzuweisen fehl. Es scheint daher offensichtlich keine oder nur sehr geringe Aktivität des Aktivinrezeptors in diesen Stadien vorzuliegen, welche mit einer nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierung nicht nachgewiesen werden kann.

Die Aktivität der *Aktivin β B*- und *Aktivinrezeptor IIA*-Sonden konnte jedoch mit E10 Kaninchenembryonen bestätigt werden, welche eine Expression u.a. im Herz und den Somiten zeigten (nicht gezeigt).

A2. Diskussion

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene können in drei Gruppen eingeteilt werden:

1. Gene mit einer asymmetrischen Expression im und um den Primitivknoten des Huhns, die hingegen in der Maus und anderen Spezies stets nur symmetrisch exprimiert werden:

fgf8, *shh*, *HNF3 β* , *ptc*, *actR1IA* und *act β B*

2. Gene mit einer in allen untersuchten Spezies hochkonservierten Expression im linken Seitenplattenmesoderm:

nodal, *Pitx2* und *lefty*

3. Gene mit einer Asymmetrie in der rechten Seitenplatte des Huhns, die in der Maus nicht oder nur schwach gegeben ist oder in der linken Seite gefunden wurde:

Snail und *NKx3.2*

A2.1 Gene der 1. Gruppe:

Sämtliche Gene der ersten Gruppe wurden im Kaninchen, genauso wie in der Maus und anderen untersuchten Tierarten, in allen analysierten Stadien stets symmetrisch exprimiert. Die im Huhn beobachtete Asymmetrie ist daher keine Folge der Keimscheibenentwicklung, sondern scheint eine spezielle Eigenschaft des Hühnerembryos zu sein. Interessanterweise finden sich Gene, die auch im Primitivstreifen transkribiert werden, wie *fgf8*, *actR1IA* und *Aktivin β B*, stets auf der rechten Seite des Primitivstreifens, wohingegen in der axialen Mittellinie aktive Gene, wie *shh*, *HNF3 β* und *ptc*, stets links des Primitivknotens zu finden sind.

Schon frühe Untersuchungen der Vogelkeimscheibe dokumentieren eine morphologische Asymmetrie der Primitivknotens, die im Stadium 5 beginnt und mit dem 3/4 Somitenstadium wieder verschwindet (Wetzel, 1929; Stalsberg, 1969; Lepori, 1966 {Huhn+Ente}; Cooke, 1995). Der Zeitraum dieser morphologischen Asymmetrie stimmt mit der transienten asymmetrischen Expression der Hühnergene im Bereich des Primitivknotens überein. So wird z.B. *fgf8* vom Stadium 5 bis hin zum 4 Somitenstadium asymmetrisch exprimiert (Boettger et al., 1999).

Der Primitivknoten des Huhns behält seine Asymmetrie zu 100 Prozent während der *in vitro* Kultur von Hühnerembryonen, wohingegen die Drehungsrichtung des Herzschlauches in 7 Prozent der Kulturembryonen eine Umkehr erfährt (Cooke et al., 1995). Somit korreliert die Primitivknotenasymmetrie in keinster Weise mit der Asymmetrie der Herzschlauchdrehung und scheint daher keine Funktion im Aufbau der Links-Rechts-Achse zu besitzen. Inwiefern die asymmetrische Expression der Hühnergene nur diese Morphologie widerspiegelt oder tatsächlich eine Funktion in der Links-Rechts-Kaskade aufzeigt, ist daher fragwürdig.

A2.1.1 Expression von *fgf8*

Die Analyse der *fgf8*-Expression im Kaninchenembryo zeigte eine Verteilung der *fgf8*-mRNA im Primitivstreifen, im naszierenden Mesoderm, in der sich entwickelnden Herzanlage und in der Mittelhirn-Hinterhirn-Anlage.

Die Expression von *fgf8* im Primitivstreifen spiegelt die Funktion von FGF8 bei der vom Primitivstreifen ausgehenden Zellmigration wieder, die zur Bildung von Meso- und Endoderm führt (Sun et al., 1999; Ciruna und Rossant, 2001). Fand sich die Expression im frühen Kaninchenembryo des Stadiums 4b hauptsächlich im posterioren Teil des Primitivstreifens, wird *fgf8* im Huhn in den anterioren zwei Dritteln desselben exprimiert und kann bereits mit der Bildung des Kopffortsatzes erstmals asymmetrisch in der rechten Seite des Hühnerprimitivknotens detektiert werden (Boettger et al., 1999). Im vergleichbaren Stadium 5a des Kaninchens war der Primitivknoten weiterhin frei von *fgf8*-mRNA, welche jedoch links und rechts des Knotens symmetrisch im benachbarten Ektoderm zu finden war. Erst im darauffolgenden Stadium 5b wurde *fgf8* auch im Primitivknoten des Kaninchens exprimiert. Die Verteilung von *fgf8*-mRNA im Primitivstreifen der Maus gleicht der des Kaninchens, allerdings weitet sie sich in der Maus zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung auf den Primitivknoten und das paraxiale Mesoderm aus, sondern wird posterior vom Primitivknoten scharf begrenzt (Crossley und Martin, 1995). In allen drei untersuchten Spezies unterscheidet sich somit die Expression von *fgf8* im Bereich des Primitivknotens. Im Huhn geht die Aktivität von *fgf8* im Primitivknoten, die zudem asymmetrisch ausgeprägt ist, der des Kaninchens

zeitlich voraus. Der Primitivknoten der Maus ist dagegen stets frei von *fgf8*-Transkripten. Aufgrund der grundlegenden Funktion der Primitivknotenregion in der Bildung der Links-Rechts-Achse, könnte dies ein Hinweis auf die unterschiedliche Funktion von FGF8 in der Maus gegenüber der des Huhns und des Kaninchens sein.

Die Expression im auswandernden Mesoderm ist, abgesehen von der scharfen anterioren Begrenzung in der Maus, die keine Transkription im paraxialen Mesoderm seitlich des Primitivknotens zulässt, zusammen mit der Expression in der Mittelhirn-Hinterhirn-Anlage innerhalb der Wirbeltiere konserviert (Crossley und Martin, 1995; Boettger et al., 1999; Lee et al., 1997).

Die Expression von *fgf8* in den Herzvorläuferzellen, sowie der eigentlichen Herzanlage wurde bisher in der Maus (Kaufman und Navaratnam, 1981; DeRuiter et al. 1992) und im Zebrafisch (Reifers et al., 2000) beschrieben und kann als gleichermaßen konserviert angesehen werden. Funktionelle Daten im Zebrafisch weisen auf eine Funktion von FGF8 in der Entwicklung der frühen Herzanlage hin (Reifers et al., 2000).

A2.1.2 Expression von *shh* und *HNF3 β*

shh wurde vom Stadium 5a an im Primitivknoten, im axialen Mesoderm, bestehend aus Notochordplatte und dem prächordalen Mesoderm, sowie in der Bodenplatte exprimiert. In den Somitenstadien fand sich zusätzliche Aktivität in den Endodermzellen.

Die Expression in der Mittellinie wurde ebenfalls in der Maus (Echelard et al., 1993), dem Menschen (Marigo et al., 1995), der Ratte (Roelink et al., 1994) dem Huhn (Riddle et al., 1993) und dem Zebrafisch (Krauss et al., 1993) dokumentiert. Sie spiegelt den anhand von Zellkulturexperimenten sowie einer Nullmutation des *shh*-Locus gezeigten Bedarf von Shh-Signalen für die Aufrechterhaltung der Notochordplattenstruktur und der Induktion der darüberliegenden Bodenplatte wieder (Roelink et al., 1995; Marti et al., 1995; Chiang et al., 1996).

Ein annähernd gleiches Expressionsmuster zeigte der Transkriptionsfaktor *HNF3 β* , der im Kaninchen ebenfalls im Primitivknoten, der Notochordplatte, dem prächordalen Mesoderm und der Bodenplatte exprimiert wurde. Darüberhinaus war *HNF3 β* schon im anterioren Primitivstreifen und im Endoderm der

Vorsomitenstadien aktiv und ging damit der Expression von *shh* voraus. Gleichmaßen wie die Expression von *shh* ist auch die von *HNF3 β* in der Mittellinie in anderen Spezies, wie z.B. der Maus (Ang et al., 1993; Monaghan et al., 1993; Sasaki und Hogan, 1993), hochkonserviert. Die zeitliche und räumliche Verteilung von *shh*- und *HNF3 β* -Transkripten lassen dabei auf eine enge funktionelle Verbindung der beiden Gene im Aufbau der anterioren Mittellinie schließen, die durch zahlreiche Experimente belegt werden kann. Nullmutationen in der Maus, sowie Missexpressionsexperimente weisen auf die Notwendigkeit der *HNF3 β* -Aktivität für die Bildung von Primitivknoten, Notochord und Bodenplatte (Ang und Rossant et al., 1994; Weinstein et al., 1994), sowie der Induktion von *shh* in der Bodenplatte (Echelard et al., 1993; Sasaki und Hogan, 1994; Ruiz i Altaba et al., 1995) hin. *shh*-Expression ist andererseits sowohl für die Erhaltung der Notochordexpression von *HNF3 β* als auch für die Bildung der Bodenplatte unerlässlich (Chiang et al. 1996).

Die Expression von *HNF3 β* im Primitivstreifen sowie im Endoderm lässt auf eine Funktion bei der Entstehung des definitiven Endoderm schließen, die jedoch aufgrund des Phänotyps einer Nullmutation des *HNF3 β* -Gens in der Maus nicht gegeben ist (Ang und Rossant, 1994). In der Maus bleibt die Expression im Endoderm vom Primitivstreifenstadium an bishin zur Bildung des Vorder- und Hinterdarms erhalten, wo sie letztlich im gesamten Darm zu finden ist (Sasaki et al., 1993; Monaghan et al., 1993; Ang et al., 1993). Funktionelle Daten weisen auf eine Rolle von *HNF3 β* in der Aufrechterhaltung des definitiven Endoderms (Hallonet et al., 2002) und der Bildung des Vorderdarms hin (Ang und Rossant, 1994).

Vom Somitenstadium des Kaninchens an und damit später als *HNF3 β* fand sich auch *shh* im definitiven Endoderm. In der Maus wird *shh* in späteren Entwicklungsstadien, genauso wie *HNF3 β* , im Vorder- und Hinterdarm exprimiert (Echelard et al., 1993). Vorderdarmdefekte aufgrund einer Nullmutation von *shh* in der Maus (Litingtung et al. 1998) weisen auf eine wichtige Rolle von *Shh* in der Vorderdarmbildung hin. Die gemeinsame Expression von *shh* und *HNF3 β* im Endoderm des Kaninchens und die ähnlichen Defekte der beiden Nullmutationen in der Maus lassen auch im definitiven Endoderm auf eine Interaktion der beiden Gene schließen. Dabei deutet die frühere Expression von *HNF3 β* im Endoderm des Kaninchens auf eine Induktion von *shh* durch *HNF3 β* hin.

A2.1.3 Expression von *ptc*

Die Signaltransduktion der *hedgehog*-Genfamilie, welche *shh* miteinschließt, wird durch zwei Zellmembranproteine reguliert. Smoothened, ein siebenfaches Transmembranprotein, überträgt Hedgehog-Signale in den Zellkern der Hedgehog-Zielzelle (Alcedo et al., 1996). Ptc, ein 12-faches Transmembranprotein, wirkt als Rezeptor für Shh und bewirkt als negativer Regulator von Smoothened dessen Dephosphorylierung und anschließende proteolytische Degradation (Denef et al., 2000; Kalderon, 2000; Ingham et al., 2000). Die Bindung von Shh an Ptc führt zur Internalisierung (Incardona et al., 2000) und anschließender Degradation von Ptc (Mastronardi et al., 2000) und damit zu einer Stabilisierung des Smoothened-Proteins. Die Expression von *ptc* wird wiederum durch Shh induziert (Goodrich et al., 1996; Marigo et al., 1996).

Demzufolge sollten *shh*-mRNA und *ptc*-mRNA im Kaninchenembryo zeitlich sowie räumlich in ähnlicher Weise detektierbar sein. Tatsächlich wurde *ptc* in den Vorsomitenstadien des Kaninchens, genauso wie *shh*, im Primitivknoten, dem axialen Mesoderm, bestehend aus Notochordplatte und prächordalem Mesoderm, sowie dem darüber angeordneten ventralen Neuroektoderm exprimiert. Von den Somitenstadien an fanden sich *ptc*-Transkripte zusätzlich in dem die Somiten umgrenzenden paraxialen Mesoderm sowie den Somiten selbst und im angrenzenden lateralen Mesoderm. *shh*-Expression wurde dagegen in diesen Regionen des Kaninchenembryos nie beobachtet. Dieses Expressionsmuster von *ptc* ist jedoch, ebenso wie das von *shh*, sowohl in der Maus (Goodrich et al., 1996) als auch im Huhn (Marigo et al., 1996) hochkonserviert und verdeutlicht damit die hohe Konservierung des Hedgehog-Signaltransduktionsweges innerhalb der Vertebraten.

Aufgrund der durch Shh erzeugten Induktion von *ptc* könnte die zusätzliche Transkription von *ptc* in nicht-*shh*-exprimierenden Zellen auf die Funktion von Shh als Langstreckensignal zurückgeführt werden. Diese Funktion wurde bereits bei der Bildung der Neuralplatte (Hynes et al., 2000; Briscoe et al., 2001) und der Gliedmaßenknospe (Yang et al., 1997; Lewis et al., 2001) dokumentiert und konnte zudem immunohisto- und biochemisch (Gritli-Linde et al., 2001) begründet werden. Die Funktion als Langstreckensignal vorausgesetzt, wären aufgrund der bilateralen Expression von *ptc* im paraxialen und im Seitenplattenmesoderm auch diese Zellen kompetent für Shh-Signale. Shh könnte daher auch im Kaninchen,

wie in Missexpressionsexperimenten im Hühnerembryo gezeigt (Levin et al., 1997), einen Einfluss auf die Seitenplattenexpression von *nodal* besitzen.

A2.1.4 Expression des *Aktivinrezeptors IIA* und *Aktivin β B*

Im Hühnerembryo induziert links des Primitivknoten gesetztes Aktivin die Expression des *Aktivinrezeptors IIA*, der normalerweise asymmetrisch nur auf der rechten Seite des Primitivknotens zu finden ist und verhindert zudem die asymmetrische linkseitige Expression von *shh* im Primitivknoten und *nodal* in der linken Seitenplatte (Levin et al., 1995). *Aktivin β B*, dessen Expression der des *Aktivinrezeptors* vorausgeht und ebenso asymmetrisch rechts des Primitivknotens erscheint, ist das am frühesten im Huhn erzeugte asymmetrische Signal und scheint daher für die Induktion des *Aktivinrezeptors* verantwortlich zu sein (Levin et al., 1997). *Aktivin β B* wird im Huhn vom Stadium 3 bis 5+, welches den Stadien 3 bis 5b des Kaninchens entspricht, rechts des Primitivknotens bzw. des anterioren Primitivstreifens exprimiert (Levin et al., 1997). Die Transkription des *Aktivinrezeptors IIA* erfolgt im Stadium 4 rechts asymmetrisch im Primitivstreifen und im Stadium 5 rechts des Primitivknotens (Stern et al., 1995; Levin et al., 1995). Daher wurden gerade die frühen Kaninchenstadien, sowie einige der Somitenstadien auf die Expression von *Aktivin β B* und des *Aktivinrezeptors IIA* untersucht. In keinem der Stadien konnte indessen eine spezifische Expression gesehen werden.

In der Maus wird die *Aktivin β B*-Untereinheit zusammen mit der *Aktivin β A*-Untereinheit vor der Implantation und danach erst wieder im E10.5 Entwicklungsstadium exprimiert (Manova et al., 1992; Lu et al., 1993; Matzuk et al., 1995a). Mäuse mit einer Nullmutation des *Aktivin β B*-Gens sind lebensfähig und können sich reproduzieren (Schrewe et al., 1994). Ebenso wird der *Aktivinrezeptor IIA* während der frühen Mäuseentwicklung nicht (Van den Eijnden-van Raaij, et al., 1992), bzw. nur in der Decidua der E6.5 und E7.5 Embryonen exprimiert (Manova et al., 1995). Zudem sind Mäuse mit einer Nullmutation des *Aktivinrezeptors IIA* lebensfähig und zeigen keine auffälligen Anomalien bei der Bildung des Mesoderms und des Neuralrohrs (Matzuk et al., 1995b). Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass der Nodal-Rezeptor ALK7 spezifisch mit dem Aktivin-Rezeptor IIB und nicht mit dem Aktivin-Rezeptor IIA

zusammenwirkt (Reissmann et al., 2001). Mäuse mit einer Doppelmutation der beiden Typ II Aktivinrezeptoren Aktivinrezeptor IIA und IIB weisen, im Gegensatz zur Nullmutation des Aktivinrezeptor IIA, massive Gastrulationsdefekte auf (Song et al., 1999). Daher könnte der Aktivinrezeptor IIB in den untersuchten Stadien des Kaninchens und der Maus die Funktion des Aktivin-Rezeptors IIA übernehmen. *Aktivin β B* sowie der *Aktivinrezeptor IIA* scheinen folglich im Embryo der Gastrula- und frühen Neurulastadien nicht aktiv zu sein.

A2.2 Gene der 2. Gruppe:

A2.2.1 Expression von *nodal*, *Pitx2* und *lefty*

Vom Stadium 3b bis hin zum Stadium 4a des Kaninchens wurde *nodal* im anterioren Abschnitt des Primitivstreifens exprimiert. Diese Expression wurde gleichermaßen in Huhn (Levin et al., 1995) und Maus (Varlet et al., 1997) beobachtet. Misexpression von *nodal* in *Xenopus* und Zebrafisch führten zur Induktion der Mesodermbildung (Jones et al., 1995; Toyama et al., 1995; Joseph und Melton, 1997), wohingegen eine Blockade der Nodal-Signaltransduktion die Bildung von Mesoderm im *Xenopus* verhinderte (Osada und Wright, 1999; Agius et al., 2000). In der Maus findet sich *nodal*-Expression bereits vor der Bildung des Primitivstreifens (diese Stadien wurden im Kaninchen nicht untersucht) im Ektoderm, sowie dem primitiven Endoderm (Varlet et al., 1997). Eine retroviral eingeführte Mutation des *nodal*-Locus verhindert die Bildung des Primitivstreifens und des Mesoderms in homozygoten Embryonen (Conlon et al., 1994). Die frühe Expression von *nodal* weist in Verbindung mit den funktionellen Daten auf eine Rolle von *nodal* in der Induktion des Primitivstreifens und der Mesodermbildung während der Gastrulation hin.

Aus den anterioren *nodal*-exprimierenden Zellen des Primitivstreifens differenziert sich im Stadium 4b der Kaninchenentwicklung der Primitivknoten, in dem hingegen keine *nodal*-mRNA zu finden war und gleichzeitig verschwand die Expression im Primitivstreifen. Der Verlust der frühen *nodal*-Expression und die fehlende Expression im Primitivknoten konnten auch im Huhn detektiert werden

(Levin et al., 1995). In der Maus liegen hierzu keine detaillierten Untersuchungen vor.

Mit der Bildung der Notochordplatte im Stadium 5b des Kaninchenembryos kehrte die *nodal*-Expression zurück und fand sich von nun an bis zum 9 Somitenstadium in den lateralen Zellen der posterioren Notochordplatte. Grundsätzlich bilateral angelegt, fand sich allerdings während der Somitenstadien eine linksseitig verstärkte Transkription. Auch diese Expressionsdomäne ist hochkonserviert und daher im Huhn (Levin et al., 1995; Ryan et al., 1998), der Maus (Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996; Varlet et al., 1997) und allen anderen untersuchten Spezies (Jones et al., 1995; Rebagliati et al., 1998) zu finden. Dabei ist die Expression im Huhn zuerst nur auf der linken Seite vorhanden und wird erst im Stadium 9 bilateral (Levin et al., 1995). Auch in der Maus findet sich verstärkte und damit asymmetrische Transkription auf der linken Seite der bilateralen Expressionsdomäne (Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996).

Mit dem 2/3 Somitenstadium des Kaninchenembryos entstand eine neue Expressionsdomäne im linken Seitenplattenmesoderm, die nur transient bis zum 7 Somitenstadium erhalten blieb. Interessanterweise ging diese Expression von wenigen Zellen auf Höhe der Mittellinienexpression aus und weitete sich von dort auf die gesamte linke Seitenplatte aus. Dies weist auf einen direkten Einfluss der Mittellinienexpression auf die Transkription in der Seitenplatte. In der Tat ist Nodal in der Lage über linksseitig-spezifische Enhancer-Elemente (ASE) innerhalb seines ersten Introns seine eigene Transkription mit Hilfe des Co-Faktors cryptic und des Transkriptionsfaktors FAST, die beide in der Seitenplatte exprimiert werden, zu induzieren (Adachi et al., 1999; Norris und Robertson, 1999; Saijoh et al., 2000). Zudem ist Nodal befähigt über längere Strecken zu diffundieren (Meno et al., 2001). Es wäre daher möglich, dass von der Mittellinie in die Seitenplatte diffundierendes Nodal-Protein dort seine eigene Transkription bewirkt. Dies müsste allerdings auf der rechten Seite verhindert werden.

Die Expression in der linken Seitenplatte ist im Huhn (Levin et al., 1995), in der Maus (Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996) und anderen untersuchten Vertebraten (Jones et al., 1995; Rebagliati et al., 1998) hochkonserviert. Mutationen in der Maus, die den Verlust dieser Seitenplattenexpression bewirken, führen zu einer Randomisierung der Richtung der Herzschlauchdrehung, einer fehlerhaften Morphologie des Herzens und der damit verbundenen Gefäße, sowie

rechtem Lungenisomerismus (Gaio et al., 1999; Yan et al., 1999; Lowe et al., 2001). *Nodal* im Seitenplattenmesoderm ist folglich für die Links-Rechts-Spezifizierung und die korrekte Morphologie des Herzens von Bedeutung.

Nodal-Signale im Seitenplattenmesoderm bewirken die Induktion von *Pitx2* (Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Campione et al., 1999; Gaio et al., 1999; Yan et al., 1999; Lowe et al., 2001, Shiratori et al., 2001). Demzufolge fanden sich im Kaninchenembryo vom 3 Somitenstadium an und somit kurzfristig nach dem Einsetzen der *nodal*-Expression, *Pitx2*-Transkripte im Seitenplattenmesoderm und nachfolgend in der rechten Herzanlage. Diese Expression ist, genauso wie die von *nodal*, im Huhn (Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; St. Amand et al., 1998; Yoshioka et al., 1998), der Maus (Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999) und anderen Spezies (Campione et al., 1999; Essner et al., 2000; Faucourd et al., 2001) hochkonserviert. Embryonen mit einer Nullmutation des *Pitx2*-Gens zeigen eine normale Herzschlauchdrehung, die allerdings mit schweren Defekten der Herzmorphologie verbunden ist (Gage et al., 1999; Kitamura et al., 1999; Lin et al., 1999; Lu et al., 1999). Die Expression von *Pitx2* im Seitenplattenmesoderm und der linken Herzanlage ist daher für die Herzstruktur, aber nicht für seine Asymmetrie unentbehrlich.

Pitx2 ist vom Stadium 6 an im prächordalen Mesoderm, sowie dem Kopfmesenenchym des Kaninchenembryos aktiv und geht auch hier mit der Expression in Huhn und Maus konform (Ryan et al., 1998; St. Amand et al., 1998; Yoshioka et al., 1998). Isoformspezifische Untersuchungen ordneten die symmetrische Expression im Kopfmesenenchym den Isoformen a und c zu, wohingegen die asymmetrische Seitenplattenexpression allein auf die Isoform c zurückgeführt werden kann (Essner et al., 2000; Faucourt et al., 2001; Schweickert et al., 2000; Yu et al., 2001). Die Isoform a verursacht zudem die extraembryonale Expression von *Pitx2* (Yu et al., 2001), die auch im Kaninchenembryo beobachtet wurde.

Zusätzlich zu der hochkonservierten Expression der beiden Gene *nodal* und *Pitx2* im Kaninchen wurden weitere Expressionsdomänen gefunden, die bisher nicht beschrieben wurden und die beiden Genen gemeinsam waren. So wurde *nodal*, ebenso wie *Pitx2*, im 5/6 Somitenstadium des Kaninchens in der linken

Herzanlage exprimiert. Auf LacZ Färbung hin untersuchte Mausembryonen zeigen eine Expression von *nodal* in der caudalen Region der sich entwickelnden Herzröhre, die bis zum 12 bis 14 Somitenstadium bestehen bleibt (Collignon et al., 1996). Weitere Analysen der Seitenplattenexpression von *nodal* in der Maus verweisen auf eine Expression im gesamten Mesoderm (Lowe et al., 1996), das auch das präcardiale Mesoderm und somit die beiden Herzanlagen miteinschließt. Die Expression von *nodal* in der linken Herzanlage des Kaninchens und die beobachtete Störung der Herzasymmetrie bei Mäusen mit einer hypomorphen Mutation des *nodal*-Locus (Lowe et al., 2001), welche bei Nullmutationen des *Pitx2*-Gens nicht zu beobachten ist (Gage et al., 1999), lassen auf eine von *Pitx2* unabhängige Funktion von *Nodal* in der linken Herzanlage schließen.

Die Transkription von *nodal* und *Pitx2* in der Seitenplatte des Kaninchens beschränkte sich nicht nur auf das Mesoderm, sondern war gleichermaßen in den darüberliegenden Ekto- und den darunterliegenden Zellen des Endoderms, sowie in den lateralen Zellen der benachbarten Somiten, zu finden. Abgesehen von *Pitx2*, das auch im Huhn im Endoderm exprimiert wird (Ryan et al., 1998; St. Armand et al., 1998; Yoshioka et al., 1998), wurden die ausserhalb des Seitenplattenmesoderms liegenden Expressionsdomänen bisher nicht beobachtet. Aus dem endodermalen Epithelium entwickeln sich die inneren Organe, wie das Atmungssystem und der Verdauungstrakt, inklusive Ösophagus, Magen, Leber, Pankreas und Darm. In der Entwicklung von Darm und Herz stehen die Zellen des Endoderms dabei in engem Kontakt mit den darüberliegenden Mesodermzellen und interagieren während der Bildung des Darms (Haffen et al., 1987; Kedingler et al., 1988) sowie bei der Herzbildung (Nascone und Mercola, 1995). Hypomorphe und Nullmutationen des *nodal*- (Lowe et al., 2001) und *Pitx2*-Locus (Gage et al., 1999) zeigen eine fehlerhafte Herzstruktur sowie Links-Rechts-Defekte in mehreren visceralen Organen, wodurch beide Gene an der Entwicklung dieser Organe beteiligt zu sein scheinen. Dementsprechend kann die Expression im Endoderm mit diesen Funktionen in Verbindung stehen.

Im 5 bis 7 Somitenstadium des Kaninchens zeigte sich *nodal*- sowie *Pitx2*-Aktivität in der Bodenplatte mit einer Tendenz zur asymmetrisch linksseitigen Expression. Diese Expression wurde bisher in keinem anderen Organismus beschrieben und konnte nur mit Hilfe einer vergleichsweise starken Sonde detektiert werden, d.h. die

Expression ist hier entsprechend schwach. Nodal benötigt für die Bindung an seinen Rezeptor in der Seitenplatte den extrazellulären Cofaktor cryptic (Gaio et al., 1999; Yan et al., 1999), welcher im anterioren Teil des Primitivstreifens und in der axialen Mittellinie im Primitivknoten, dem Notochord sowie der Bodenplatte aktiv ist und zudem bilateral im Seitenplattenmesoderm exprimiert wird. Die Anwesenheit von cryptic in der Bodenplatte könnte somit genauso wie im Seitenplattenmesoderm die Expression von *nodal* ermöglichen. Von der Bodenplatte scheinen allerdings repressive Signale auszugehen, da *nodal* nur in den die Bodenplatte nicht kontaktierenden Randzellen aktiv ist und nur schwach im 6/7 Somitenstadium in der Bodenplatte selbst. Das Transkriptionsmuster ähnelt dem von *lefty1*, das ebenso links asymmetrisch in der Bodenplatte von Kaninchen des Somitenstadiums exprimiert wird. Die linksseitig asymmetrische Expression von *lefty1* ist in allen untersuchten Wirbeltieren hockkonserviert (Meno et al., 1996, 1997; Bisgrove et al., 1999; Ishimaru et al., 2000). Untersuchungen verweisen auf die Rolle von Lefty-Proteinen als Antagonisten der Nodal-Signaltransduktion, womöglich aufgrund einer kompetitiven Hemmung des Nodal-Rezeptors (Meno et al., 1999; Thisse und Thisse et al., 1999; Bisgrove et al., 1999). *lefty1* ist im Kaninchen vom 3 bis zum 6 Somitenstadium aktiv und könnte somit in dieser Zeit die Expression von *nodal* und ebenso die von *Pitx2* in der Bodenplatte hemmen. Das Abklingen der *lefty1*-Aktivität im 6 Somitenstadium könnte anschließend die Expression von *nodal* ermöglichen. *nodal*-Expression in der Bodenplatte bewirkt vermutlich, genauso wie in der Seitenplatte, die Induktion *Pitx2*.

In Mäusen, die ein Transgen-Konstrukt bestehend aus Teilen des *nodal*-Genoms in Verbindung mit einem LacZ-Reporter und des Hitzeschockprotein68-Minimalpromotors besitzen, konnte mithilfe der sensitiveren lacZ-Färbung ebenfalls eine Expression von *nodal* in der Bodenplatte gezeigt werden (Adachi et al., 1999; Norris und Robertson, 1999). Diese Expression war nur aufgrund von Konstrukten, die den Hsp68 Minimalpromotor enthielten, möglich, der insgesamt eine stärkere X-Gal-Färbung bewirkte und demzufolge diese ansonsten sehr schwache Expressionsdomäne enthüllte.

Nodal-Signale in der Seitenplatte bewirken neben der Induktion von *Pitx2* auch diejenige von *lefty2* (Saijoh et al., 2000). Demzufolge fanden sich, zwar verzögert, auch vom 5 Somitenstadium an *lefty2*-Transkripte asymmetrisch im linken

Seitenplattenmesoderm des Kaninchenembryos. Im 8/9 Somitenstadium verschwinden diese allerdings wieder. Diese transiente Expression in der linken Seitenplatte ist in allen untersuchten Wirbeltieren wie Maus, *Xenopus* und Zebrafisch hochkonserviert (Meno et al., 1996, 1997, 1999). Nur im Huhn konnte bisher kein *lefty2*-Homolog isoliert werden. Die Überexpression von *lefty2* im Zebrafisch (Meno et al., 1999), sowie die Nullmutation des *lefty2*-Gens in der Maus (Meno et al., 2001) konnten einen repressiven Effekt von Lefty2 auf die Transkription von *nodal* verdeutlichen. Aufgrund dieser repressiven Wirkung erklärt sich die transiente *nodal*-, aber auch die transiente *lefty2*-Expression in der Seitenplatte. Mit dem durch Lefty2 verursachten Verlust der *nodal*-Expression im 7/8 Somitenstadium geht auch die durch Nodal verursachte Induktion von *lefty2* verloren.

Obwohl die Transkription von *lefty2*, ebenso wie diejenige von *Pitx2* und von *nodal* selbst, von Nodal-Signalen induziert wird, unterscheidet sich die Seitenplattenexpression von *lefty2* von den anderen beiden Seitenplattenmarkern. Im Gegensatz zu *nodal* und *Pitx2*, dessen Transkripte über das gesamte Seitenplattenmesoderm verteilt sind, wird *lefty2* in zwei separaten Domänen im posterioren und anterioren Seitenplattenmesoderm exprimiert. Genauso wenig findet sich eine Expression in der linken Herzanlage, obwohl *nodal* und *Pitx2* hier aktiv sind. Die Nullmutation des *lefty2*-Gens in der Maus führte nicht nur zu einer zeitlich verlängerten *nodal*-Expression, sondern zudem zu einer Ausbreitung der *Pitx2*-Expression über die posteriore und anteriore Seitenplattendomäne hinaus bishin zu einer Ausbreitung in das rechte Mesoderm (Meno et al., 2001). Lefty2 wirkt daher, gleichermaßen wie Lefty1 in der Mittellinie, als eine anteriore und posteriore Barriere, die die Ausbreitung der Nodal-Aktivität auf die rechte Seite verhindert. Die Verteilung von *lefty2*-mRNA im posterioren und anterioren Seitenplattenmesoderm scheint daher die räumliche Eingrenzung von *nodal*- und *Pitx2*-Signalen auf das linke Seitenplattenmesoderm zu garantieren.

Die für die Links-Rechts-Entwicklung notwendige Expression von *nodal*, *Pitx2* und *lefty2* in der Seitenplatte der frühen Somitenstadien ist somit auch im Kaninchen hochkonserviert und konnte daher in den *in vitro* Kulturexperimenten als Indikator für eine normale bzw. gestörte Links-Rechts-Achsenentwicklung dienen.

FGF8	Kaninchen	Maus	Mensch
Kaninchen		94	96
Maus	100		95
Mensch	100	100	

D
N
A

P r o t e i n

nodal	Kaninchen	Maus	Mensch
Kaninchen		82	85
Maus	77		81
Mensch	80	76	

D
N
A

P r o t e i n

Pitx2	Kaninchen	Maus	Mensch
Kaninchen		93	93
Maus	99,5		92
Mensch	99,5	100	

D
N
A

P r o t e i n

hnf3β	Kaninchen	Maus	Mensch
Kaninchen		87	93
Maus	92		91
Mensch	95	97	

D
N
A

P r o t e i n

shh	Kaninchen	Maus	Mensch
Kaninchen		91	92
Maus	91		90
Mensch	95	99	

D
N
A

P r o t e i n

ptc	Kaninchen	Maus	Mensch
Kaninchen		87	89
Maus	94		91
Mensch	97	97	

D
N
A

P r o t e i n

snail	Kaninchen	Maus	Mensch
Kaninchen		85	87
Maus	83		84
Mensch	88	84	

D
N
A

P r o t e i n

NKx3.2	Kaninchen	Maus	Mensch
Kaninchen		85	90
Maus	88		83
Mensch	91	84	

D
N
A

P r o t e i n

actβB	Kaninchen	Maus	Mensch
Kaninchen		88	92
Maus	97		89
Mensch	96	97	

D
N
A

P r o t e i n

actRIIa	Kaninchen	Maus	Mensch
Kaninchen		93	96
Maus	100		94
Mensch	99,7	99,7	

D
N
A

P r o t e i n

Abb.A6 Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der klonierten Kaninchengenfragmente mit den homologen Regionen von Mensch und Maus

Die Identität zwischen Nukleotiden (in Tabelle rechts oben) bzw. Aminosäuren (in Tabelle links unten) ist in Prozent angegeben und bezieht sich nur auf die bei Mensch und Maus jeweils homologen Regionen des klonierten Kaninchenfragments und nicht auf die vollständigen Sequenzen. Im Vergleich der Nukleotidsequenzen steht das Kaninchen dem Menschen näher (Ausnahme *ptc*), als die Maus.

A2.3 Gene der 3. Gruppe

A2.3.1 Expression von *Snail*

Mit der Ausbildung des Primitivstreifens im Stadium 3b des Kaninchens zeigte sich in diesem die Transkription von *Snail* mit einer verstärkten Expression im Bereich des posterioren Knotens. Mit dem Auswandern der ersten Endo- und Mesodermzellen aus dem Primitivstreifen wurde *Snail* im naszierenden Endo- und Mesoderm auf beiden Seiten des Primitivstreifens exprimiert. Nullmutationen, die zum Verlust der *Snail*-Expression führen, ermöglichen zwar das Auswandern von Zellen aus dem Primitivstreifen während der Gastrulation, zeigen jedoch Defekte in der Bildung des mesodermalen Mesenchyms. Dies lässt auf eine Funktion von *Snail* beim Übergang der Zellen vom epithelialen in den mesenchymalen Zustand schließen (Grau et al., 1984; Nüsslein-Volhard et al., 1984; Ciruna und Rossant, 2001; Carver et al., 2001; Savagner, 2001). Die Expression im Primitivstreifen und den daraus auswandernden Zellen im Kaninchen steht demnach im Einklang mit der Funktion von *Snail* in der mesenchymalen Strukturierung des Mesoderms und ist folglich charakteristisch für undifferenziertes Mesoderm.

In den Somitenstadien des Kaninchens wurde *Snail* im paraxialen Mesoderm und in einem schmalen medialen Randbereich des Seitenplattenmesoderms exprimiert. Im paraxialen Mesoderm bildete sich zudem eine Expressionsdomäne posterior des zuletzt gebildeten Somitenpaares, die klar vom restlichen paraxialen Mesoderm abgegrenzt war. Zudem war *Snail* schwach in den Somiten des 6/7 Somitenstadiums aktiv. Dieses Expressionsmuster von *Snail* im Kaninchen konnte ebenso in den entsprechenden Stadien der Mausentwicklung beobachtet werden und ist darum zwischen den beiden Säugetieren konserviert (Smith et al., 1992; Sefton et al., 1998).

Interessanterweise unterscheidet sich die Expression von *Snail* im Huhn grundlegend von der der beiden Säuger (Isaac et al., 1997; Sefton et al., 1998). Vergleiche der Expression von *Snail* und *Slug*, dem zweiten Mitglied der *Snail*-Familie in Maus und Huhn, zeigten eine Inversion der Expression der beiden *Snail*-Familienmitglieder zwischen Huhn und Maus (Sefton et al., 1998). Somit gleichen sich die Expressionen von Maus-*Snail* und Huhn-*Slug*, sowie Maus-*Slug* und Huhn-*Snail*. Die Expression von *Snail* im Kaninchen gleicht dabei der von

Maus-*Snail* und Huhn-*Slug* und bestätigt die Theorie, dass eine Inversion in der Vogellinie nach der evolutionären Abspaltung der Säuger auftrat (Sefton et al., 1998).

Im Huhn wird *Snail* asymmetrisch im rechten Herzmesoderm transkribiert (Isaac et al., 1997). Aufgrund der Inversion zwischen Maus und Huhn müsste eine entsprechende Asymmetrie in der Seitenplatte des Säugers in der Expression von *Slug* zu sehen sein. Eine asymmetrische Expression von *Slug* wurde allerdings weder im Huhn noch in der Maus detektiert (Sefton et al., 1998) und muss für das Kaninchen noch analysiert werden. Selbst Publikationen über eine etwaige asymmetrische Expression von *Snail* in der Maus sind widersprüchlich. So ist diese einer Publikation zufolge symmetrisch (Isaac et al., 1997), einer anderen zufolge asymmetrisch in der linken Seitenplatte des 8.5 Tage alten Embryos ausgeprägt (Sefton et al., 1998). Im Kaninchen liegt bis zum 6 Somitenstadium nur eine symmetrische Expression vor, die auf den medialen Rand des posterioren Seitenplattenmesoderms beschränkt ist. Nachfolgende Stadien wurden nicht mehr untersucht, da in diesen die *nodal*-Expression wieder verschwindet und eine eventuell vorliegende Asymmetrie von *Snail* daher nicht mehr regulativ auf die Nodal-Signaltransduktion eingreifen könnte.

A2.3.2 Expression von *NKx3.2*

NKx3.2 wurde in Kaninchenembryonen der Somitenstadien im ventro-lateralen und damit sklerotomalen Abschnitt der Somiten exprimiert. Die Intensität der Expression stieg dabei mit zunehmenden Somitenalter an, so dass letztlich ein anterior-posteriorer *NKx3.2*-mRNA-Gradient entlang der Somiten entstand. Zudem fand sich *NKx3.2*-Transkription in dem das Neuralrohr umgebenden okzipitalen Sklerotom im Kopf des Embryos. Diese Expressionsdomänen wurden ebenfalls in Huhn (Schneider et al., 1999), *Xenopus* (Newman et al., 1997), Mensch (Triboli und Lufkin, 1997) und Maus (Triboli et al., 1997; Schneider et al., 1999) beschrieben. Nullmutationen des *NKx3.2*-Gens führen zu einer Reduktion der sklerotomalen Zellen und somit zu schweren Missbildungen bishin zum Verlust der Wirbelsäule und Abnormalitäten in der Bildung der Schädelbasisknochen (Lettice et al., 1999; Triboli und Lufkin et al., 1999; Lettice et al., 2001). *NKx3.2* spielt damit eine wichtige Rolle in der Entwicklung des embryonalen Achsenskeletts.

Desweiteren wird *NKx3.2* in Maus und Huhn im Seitenplattenmesoderm exprimiert. Im Huhn konnte *NKx3.2*-mRNA beginnend mit dem 12 Somitenstadium asymmetrisch im linken Seitenplattenmesoderm, in der Maus vom Tag E8.5 an dagegen im rechten Seitenplattenmesoderm und im Tag E9.5 Embryo im Magen detektiert werden (Schneider et al., 1999). Bis zum 13 Somitenstadium konnte *NKx3.2* nicht in der Seitenplatte des Kaninchens beobachtet werden. Die Expression von *NKx3.2* in der Seitenplatte muss daher in späteren Entwicklungsstadien einsetzen. Aufgrund der zumindest in den frühen Somitenstadien fehlenden Expression von *NKx3.2* in der Seitenplatte, scheint dieses Gen, wenigstens im Kaninchen, keinen Einfluss auf die Regulation der *nodal*-Transkription zu nehmen. Missexpression des FGF8-Proteins im Huhn und Untersuchungen von *inv*-Mutanten weisen hingegen auf eine asymmetrische Funktion von *NKx3.2* hin (Schneider et al., 1999). Weitere Analysen des Expressionsmusters in älteren Kaninchenembryonen werden das Auffinden einer asymmetrischen Expression von *Nkx3.2* im Seitenplattenmesoderm beabsichtigen.

In den untersuchten Stadien konnte daher weder eine asymmetrische Verteilung von *Snail*-mRNA, noch von *Nkx3.2*-mRNA in der Seitenplatte des Kaninchens festgestellt werden. Da diese Arbeit die Untersuchung der frühen Ereignisse der Links-Rechts-Kaskade, die zur hochkonservierten asymmetrischen Expression von *nodal* und *Pitx2* im Seitenplattenmesoderm führen, zum Ziel hatte, wurden daher nur frühe Somitenstadien untersucht. Da die in anderen Spezies dokumentierten Asymmetrien der beiden Gene jedoch hauptsächlich in späteren Somitenstadien auftraten, werden weitere Expressionsanalysen im Kaninchen folgen, die auch ältere Entwicklungsstadien miteinschließen.

Letztlich besteht weiterhin ein großes Fragezeichen bezüglich der Gene der ersten Gruppe. Da eine asymmetrische Expression dieser Gene bislang nur im Huhn beobachtet wurde, könnte dies lediglich eine Reflektion der morphologischen Asymmetrie des Primitivknotens im Huhn darstellen. Sämtliche dieser im Bereich des Primitivknotens asymmetrisch exprimierten Gene werden ausserdem im Primitivstreifen und/oder der axialen Mittellinie aller untersuchten Wirbeltiere

exprimiert und sind an deren Aufbau beteiligt. Die in den diversen Nullmutationen beobachteten Links-Rechts-Defekte beruhen daher vermutlich auf einer morphologischen Störung der Mittellinie, sowie einer dadurch bedingten fehlerhaften Expression von *lefty1* in der Bodenplatte.

Es wäre daher interessant einen Vogelembryo zu finden, dessen Primitivknoten morphologisch symmetrisch angelegt ist und diesen auf eine asymmetrische Expression dieser Gene zu analysieren.

6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bi	bilateral
BMP4	Bone Morphogenic Growth Factor4
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CTP	Cytidintriphosphat
ddATP	Dideoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Dideoxycytidintriphosphat
ddGTP	Dideoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Dideoxythymidintriphosphat
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E(X)	Tag X der Embryonalentwicklung
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FGF8	Fibroblast Growth Factor8
g	Gramm
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl-thiogalactosid
kb	Kilobasen
KAc	Kaliumacetat
L	links
LiCl	Lithiumchlorid
M	Mol/Liter
m	mol
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	milli-Mol
MMLV-RT	Moloney-Maus-Leukämie-Virus-

MOPS	Reverse transkriptase
mRNA	N-Morpholinopropansulfonsäure
Na ₂ HPO ₄	Boten-RNA (messenger-)
NaAc	Dinatriumhydrogenphosphat
Na-Citrat	Natriumacetat
NaCl	Natriumcitrat
NaH ₂ PO ₄	Natriumchlorid
NaOH	Natriumdihydrogenphosphat
ng	Natriumhydroxid
nm	Nanogramm
PBS	Nanometer
p.c.	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	post coitum
pH	Polymerasenkettenreaktion
PIPES	potentium hydrogenium
	Piperazin-N,N'-bis
	[2-ethansulfonsäure]
	Pikomol
pmol	rechts
r	Ribonukleinsäure
RNA	Ribonuklease
RNase	Umdrehungen pro Minute
rpm	(rounds per minute)
	Raumtemperatur
RT	Natriumdodecylsulfat
SDS	Sekunden
sec	Somiten
Som	standard saline citrat
SSC	Stadium
St	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer +Tween
TBST	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEMED	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris	Thymidintriphosphat
TTP	unter anderem
u. a.	Enzymeinheiten (Units)
U	Ultraviolett
UV	Volt
V	Volumen:Volumen
v/v	Volumen:Gewicht
v/w	Watt
W	Wildtyp
Wt	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-
X-gal	Galaktosid
	zum Beispiel
z.B.	

7. Literatur

- Adachi, H., Saijoh, Y., Mochida, K., Ohishi, S., Hashiguchi, H., Hirao, A., und Hamada, H. (1999). Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 enhancer. *Genes Dev.* **13**, 1589–1600.
- Afelius, B.A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* **193**, 317–319.
- Agius E., Oelgeschlager M., Wessely O., Kemp C., und De Robertis E.M. (2000). Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. *Development*. **127**, 1173-83.
- Alcedo J., Ayzenzon M., Von Ohlen T., Noll M., und Hooper J.E. (1996). The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell*. **86**, 221-32.
- Ang S.L., Wierda A., Wong D., Stevens K.A., Cascio S., Rossant J., und Zaret K.S. (1993). The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development*. **119**, 1301-15.
- Ang S.L., und Rossant J. (1994). HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell*. **78**, 561-74.
- Arakawa H., Nakamura T., Zhadanov A.B., Fidanza V., Yano T., Bullrich F., Shimizu M., Blechman J., Mazo A., Canaani E., und Croce C.M. (1998). Identification and characterization of the ARP1 gene, a target for the human acute leukemia ALL1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 4573-8.
- Beddington R.S., Rashbass P., und Wilson V. (1992). Brachyury--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Dev Suppl.* 157-65.
- Belting H.G., Hauptmann G., Meyer D., Abdelilah-Seyfried S., Chitnis A., Eschbach C., Soll I., Thisse C., Thisse B., Artinger K.B., Lunde K., und Driever W. (2001). *spiel ohne grenzen/pou2* is required during establishment of the zebrafish midbrain-hindbrain boundary organizer. *Development*. **128**, 4165-76.
- Bisgrove, B.W., Essner, J.J., und Yost, H.J. (1999). Regulation of midline development by antagonism of lefty and nodal signaling. *Development* **126**, 3253–3262.
- Briscoe J., Chen Y., Jessell T.M., und Struhl G. (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell*. **7**, 1279-91.
- Britz-Cunningham S.H., Shah M.M., Zuppan C.W., und Fletcher W.H. (1995). Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N Engl J Med*. **332**, 1323-9.
- Boettger, T., Wittler, L., und Kessel, M. (1999). FGF8 functions in the specification of the right body side of the chick. *Curr. Biol*. **9**, 277–280.
- Boilly B., Vercoutter-Edouart A.S., Hondermarck H., Nurcombe V., und Le Bourhis X. (2000). FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev*. **11**, 295-302. Review.
- Brody S.L., Yan X.H., Wuerffel M.K., Song S.K. und Shapiro S.D. (2000). Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**, 45-51.
- Brown, N.A., und Wolpert, L. (1990). The development of handedness in left/right asymmetry. *Development* **127**, 1081–1093.

- Brown N.A., McCarthy A., und Wolpert L. (1991). Development of handed body asymmetry in mammals. *Ciba Found Symp.* **162**, 182-96; discussion 196-201. Review.
- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L.A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R., und Blum, M. (1999). The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* **126**, 1225–1234.
- Capdevila J., Vogan K.J., Tabin C.J., und Izpisua Belmonte JC. (2000). Mechanisms of left-right determination in vertebrates. *Cell.* **101**, 9-21. Review.
- Carver E.A., Jiang R., Lan Y., Oram K.F., und Gridley T. (2001). The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol.* **21**, 8184-8.
- Chambers D., und Mason I. (2000). Expression of *sprouty2* during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling. *Mech Dev.* **91**, 361-4.
- Chen J., Knowles H.J., Hebert J.L. und Hackett B.P. (1998). Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest* **102**, 1077-1082.
- Chen Y., und Schier A.F. (2001). The zebrafish Nodal signal *Squint* functions as a morphogen. *Nature.* **411**, 607-10.
- Cheng, A.M.S., Thisse, B., Thisse, C., und Wright, C.V.E. (2000). The lefty-related factor *Xatv* acts as a feedback inhibitor of Nodal signaling in mesoderm induction and L-R axis development in *Xenopus*. *Development* **127**, 1049–1061.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., und Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407–413.
- Ciruna B.G., Schwartz L., Harpal K., Yamaguchi T.P., und Rossant J. (1997). Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (*Fgfr1*) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak. *Development.* **124**, 2829-41.
- Ciruna B., und Rossant J. (2001). FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell.* **1**, 37-49.
- Collignon, J., Varlet, I., und Robertson, E.J. (1996). Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature* **381**, 155–158.
- Conlon F.L., Lyons K.M., Takaesu N., Barth K.S., Kispert A., Herrmann B. und Robertson E.J. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* **120**, 1919-1928.
- Constam, D.B., und Robertson, E.J. (2000). Tissue-specific requirements for the proprotein convertase *Furin/SPC1* during embryonic turning and heart looping. *Development* **127**, 245–254.
- Cooke, J. (1995). Vertebrate embryo handedness. *Nature* **374**, 681.
- Crossley P.H. und Martin G.R. (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development.* **121**, 439-51.
- Danos M.C. und Yost H.J. (1995). Linkage of cardiac left-right asymmetry and dorsal-anterior development in *Xenopus*. *Development* **121**, 1467-1474.
- Danos, M.C., und Yost, H.J. (1996). Role of notochord in specification of cardiac left-right orientation in zebrafish and *Xenopus*. *Dev. Biol.* **177**, 96–103.

- Davidson B.P., Kinder S.J., Steiner K., Schoenwolf G.C., und Tam P.P. (1999). Impact of node ablation on the morphogenesis of the body axis and the lateral asymmetry of the mouse embryo during early organogenesis. *Dev Biol.* **211**, 11-26.
- Deneff, N., Neubuser, D., Perez, L., and Cohen, S. (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed. *Cell* **102**, 521-531
- Deng C.X., Wynshaw-Boris A., Shen M.M., Daugherty C., Ornitz D.M., und Leder P. (1994). Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev.* **8**, 3045-57.
- DeRuiter M.C., Poelmann R.E., VanderPlas-de Vries I., Mentink M.M., und Gittenberger-de Groot A.C. (1992). The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos. Fusion of two heart tubes? *Anat Embryol (Berl)*. **185**, 461-73.
- Dufort, D., Schwartz, L., Harpal, K., und Rossant, J. (1998). The transcription factor HNF3beta is required in visceral endoderm for normal primitive streak morphogenesis. *Development* **125**, 3015–3025.
- Echelard Y., Epstein D.J., St-Jacques B., Shen L., Mohler J., McMahon J.A. und McMahon A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell.* **75**, 1417-30.
- Essner, J.J., Branford, W.W., Zhang, J., und Yost, H.J. (2000). Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by pitx2 isoforms. *Development* **127**, 1081–1093.
- Faucourt M., Houliston E., Besnardeau L., Kimelman D. und Lepage T. (2001). The pitx2 homeobox protein is required early for endoderm formation and nodal signaling. *Dev Biol.* **229**, 287-306.
- Fischer A. (1999). Klonierung und Expressionsanalyse von sonic hedgehog und Pitx2 im Kaninchen. Universität Karlsruhe.
- Furthauer M., Reifers F., Brand M., Thisse B., und Thisse C. (2001). sprouty4 acts in vivo as a feedback-induced antagonist of FGF signaling in zebrafish. *Development.* **128**, 2175-86.
- Furthauer M., Lin W., Ang S.L., Thisse B., und Thisse C. (2002). Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol.* **4**, 170-4.
- Gage P.J. und Camper S.A. (1997). Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum Mol Genet.* **6**, 457-64.
- Gage, P.J., Suh, H., und Camper, S.A. (1999). Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* **126**, 4643–4651.
- Gaio, U., Schweickert, A., Fischer, A., Garratt, A.N., Muller, T., Ozcelik, C., Lankes, W., Strehle, M., Britsch, S., Blum, M., und Birchmeier, C. (1999). A role of the cryptic gene in the correct establishment of the left-right axis. *Curr. Biol.* **9**, 1339–1342.
- Gehring W.J., Affolter M., und Burglin T. (1994). Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem.* **63**, 487-526. Review.
- Goodrich L.V., Johnson R.L., Milenkovic L., McMahon J.A., und Scott M.P. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev.* **10**, 301-12.

- Grau, Y., C. Carteret, and P. Simpson. (1984). Mutations and chromosomal rearrangements affecting the expression of snail, a gene involved in embryonic patterning in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **108**, 347-360.
- Gritli-Linde A., Lewis P., McMahon A.P., and Linde A. (2001). The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded long-range activity of hedgehog signaling peptides. *Dev Biol.* **236**, 364-86.
- Gritsman K., Zhang J., Cheng S., Heckscher E., Talbot W.S. and Schier A.F. (1999). The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* **97**, 121-132.
- Gu Z., Nomura M., Simpson B.B., Lei H, Feijen A., van den Eijnden-van Raaij J., Donahoe P.K., and Li E. (1998). The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse. *Genes Dev.* **12**, 844-857.
- Hackett B.P., Brody S.L., Liang M., Zeitz I.D., Bruns LA., and Gitlin J.D. (1995). Primary structure of hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 and characterization of gene expression in the developing respiratory and reproductive epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 4249-53.
- Haffen K., Kedinger M., und Simon-Assmann P. (1987). Mesenchyme-dependent differentiation of epithelial progenitor cells in the gut. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **6**, 14-23. Review.
- Hallonet M., Kaestner K.H., Martin-Parras L., Sasaki H., Betz U.A., und Ang S.L. (2002). Maintenance of the specification of the anterior definitive endoderm and forebrain depends on the axial mesendoderm: a study using HNF3beta/Foxa2 conditional mutants. *Dev Biol.* **243**, 20-33.
- Hamburger, V., und Hamilton, H. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* **88**, 49–92.
- Harvey RP.(1996). NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol.* **178**, 203-16. Review.
- Heymer J., Kuehn M. und Ruther U. (1997). The expression pattern of nodal and lefty in the mouse mutant Ft suggests a function in the establishment of handedness. *Mech Dev* **66**, 5-11.
- Hyatt, B.A., und Yost, H.J. (1998). The left-right coordinator: the role of Vg1 in organizing left-right axis formation. *Cell* **93**, 37–46.
- Hynes, M., Ye, W., Wang, K., Stone, D., Murone, M., Sauvage, F., and Rosenthal, A. (2000). The seven-transmembrane receptor smoothed cell-autonomously induces multiple ventral cell types. *Nat. Neurosci.* **3**, 41-46.
- Incardona J.P., Lee J.H., Robertson C.P., Enga K., Kapur R.P., und Roelink H. (2000) Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 12044-9.
- Ingham P.W., Nystedt S., Nakano Y., Brown W., Stark D., van den Heuvel M., und Taylor A.M. (2000). Patched represses the Hedgehog signalling pathway by promoting modification of the Smoothed protein. *Curr Biol.* **10**, 1315-8.
- Isaac, A., Sargent, M.G., und Cooke, J. (1997). Control of vertebrate left-right asymmetry by a Snail-related zinc finger gene. *Science* **275**, 1301–1304.
- Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Tao, H., Thisse, B., Thisse, C., Wright, C.V.E., Hamada, H., Ohuchi, H., und Noji, S. (2000). Asymmetric expression of antivin/lefty1 in the early chick embryo. *Mech. Dev.* **90**, 115–118.
- Izraeli, S., Lowe, L.A., Bertness, V.L., Good, D.J., Dorward, D.W., Kirsch, I.R., und Kuehn, M.R. (1999). The SIL gene is required for mouse embryonic axial development and left-right specification. *Nature* **399**, 691–694.

- Jones C.M., Kuehn M.R., Hogan B.L., Smith J.C., und Wright C.V. (1995). Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development*. **121**, 3651-62.
- Joseph E.M., und Melton D.A.. (1997). Xnr4: a Xenopus nodal-related gene expressed in the Spemann organizer. *Dev Biol*. **184**, 367-72.
- Kalderon D. (2000). Transducing the hedgehog signal. *Cell*. **103**, 371-4. Review.
- Karcher C. (1999). Klonierung und Expressionsanalyse von *lefty1*, *lefty2* und *BMP4* im Kaninchen. Universität Karlsruhe.
- Kaufman M.H., und Navaratnam V. (1981). Early differentiation of the heart in mouse embryos. *J Anat*. **133**, 235-46.
- Kedinger M., Simon-Assmann P., Bouziges F., und Haffen K. (1988). Epithelial-mesenchymal interactions in intestinal epithelial differentiation. *Scand J Gastroenterol Suppl*. **151**, 62-9.
- Kim G.J., und Nishida H. (2001). Role of the FGF and MEK signaling pathway in the ascidian embryo. *Dev Growth Differ*. **43**, 521-33.
- Kinder S.J., Tsang T.E., Quinlan G.A., Hadjantonakis A.K., Nagy A., und Tam P.P. (1999). The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development*. **126**, 4691-701.
- King, T., Beddington, R.S., und Brown, N.A. (1998). The role of the *brachyury* gene in heart development and left-right specification in the mouse. *Mech Dev*. **79**, 29-37.
- King S.M. (2000). The dynein microtubule motor. *Biochim Biophys Acta*. **1496**, 60-75. Review.
- Kispert A., Koschorz B., und Herrmann B.G. (1995). The T protein encoded by *Brachyury* is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J*. **14**, 4763-72.
- Kitamura, K., Miura, H., Miyagawa-Tomita, S., Yanazawa, M., Katoh-Fukui, Y., Suzuki, R., Ohuchi, H., Suehiro, A., Motegi, Y., und Nakahara, Y. et al. (1999). Mouse *Pitx2* deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and pericardial mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development* **126**, 5749-5758.
- Knoetgen H., Teichmann U., Wittler L., Viebahn C. und Kessel M. (2000). Anterior neural induction by nodes from rabbits and mice. *Dev Biol*. **225**, 370-80.
- Kramer K.L., und Yost H.J. (2002). Ectodermal syndecan-2 mediates left-right axis formation in migrating mesoderm as a cell-nonautonomous *Vg1* cofactor. *Dev Cell*. **2**, 115-24.
- Krauss S., Concordet J.P., und Ingham P.W. (1993). A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*. **75**, 1431-44.
- Kumar A., Novoselov V., Celeste A.J., Wolfman N.M., ten Dijke P., und Kuehn M.R. (2001). Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads. *J Biol Chem*. **276**, 656-61.
- Le A.C. und Musil L.S. (2001). A novel role for FGF and extracellular signal-regulated kinase in gap junction-mediated intercellular communication in the lens. *J Cell Biol*. **154**, 197-216.
- Lee S.M., Danielian P.S., Fritsch B., und McMahon A.P. (1997). Evidence that FGF8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development*. **124**, 959-69.
- Lepori, N.G. (1969). Sur la genese des structures asymetriques chez l'embryon des oiseaux. *Monitore Zool. Ital. (N.S.)* **3**, 33-53.

- Lettice L.A., Purdie L.A., Carlson G.J., Kilanowski F., Dorin J. und Hill R.E. (1999). The mouse bagpipe gene controls development of axial skeleton, skull, and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 9695-700.
- Lettice L., Hecksher-Sorensen J. und Hill R. (2001). The role of Bapx1 (Nkx3.2) in the development and evolution of the axial skeleton. *J Anat*. **199**, 181-7. Review.
- Levin, M., Johnson, R.L., Stern, C.D., Kuehn, M., und Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **82**, 803–814.
- Levin, M., Roberts, D.J., Holmes, L.B., und Tabin, C. (1996). Laterality defects in conjoined twins. *Nature* **384**, 321.
- Levin, M., Pagan, S., Roberts, D.J., Cooke, J., Kuehn, M.R., und Tabin, C.J. (1997). Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev. Biol.* **189**, 57–67.
- Levin, M., und Mercola, M. (1998). Gap junctions are involved in the early generation of left-right asymmetry. *Dev. Biol.* **203**, 90–105.
- Levin, M., und Mercola, M. (1999). Gap junction-mediated transfer of left-right patterning signals in the early chick blastoderm is upstream of shh asymmetry in the node. *Development* **126**, 4703–4714.
- Levin M., und Nascone N. (1997). Two molecular models of initial left-right asymmetry generation. *Med Hypotheses*. **49**, 429-35. Review.
- Lewis P.M., Dunn M.P., McMahon J.A., Logan M., Martin J.F., St-Jacques B., und McMahon A.P. (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell*. **105**, :599-612.
- Lim L., Zhou H, und Costa R.H. (1997). The winged helix transcription factor HFH-4 is expressed during choroid plexus epithelial development in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 3094-9.
- Lin C.R., Kioussi C., O'Connell S., Briata P., Szeto D., Liu F., Izpisua-Belmonte J.C., und Rosenfeld M.G. (1999). Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature*. **401**, 279-82.
- Lin X., Buff E.M., Perrimon N., und Michelson A.M. (1999). Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during Drosophila embryonic development. *Development*. **126**, 3715-23.
- Litingtung Y., Lei L., Westphal H., und Chiang C. (1998). Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet*. **20**, 58-61.
- Logan, M., Pagán-Westphal, S.M., Smith, D.M., Paganessi, L., und Tabin, C.J. (1998). The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* **94**, 307–317.
- Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.V., Potter, S.S., Overbeek, P., und Kuehn, M.R. (1996). Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature* **381**, 158–161.
- Lowe, L., Yamada, S., und Kuehn, M. (2001). Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development* **128**, 1831-1843.

- Lu R.Z., Matsuyama S., Nishihara M., und Takahashi M. (1993). Developmental expression of activin/inhibin beta A, beta B, and alpha subunits, and activin receptor-IIB genes in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod.* **49**, 1163-9.
- Lu M.F., Pressman C., Dyer R., Johnson R.L., und Martin J.F. (1999). Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature.* **401**, 276-8.
- Lufkin T. (1996). Transcriptional control of Hox genes in the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev.* **6**, 575-80. Review.
- Lustig, K.D., K. Kroll, E. Sun, R. Ramos, H. Elmendorf, und M.W. Kirschner. (1996). A *Xenopus* nodal-related gene that acts in synergy with noggin to induce complete secondary axis and notochord formation. *Development* **122**, 3275-3282.
- MacArthur C.A., Lawshe A., Xu J., Santos-Ocampo S, Heikinheimo M, Chellaiah AT und Ornitz DM. (1995). FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development. *Development.* **121**, 3603-13.
- Makarenkova H., Becker D.L., Tickle C. und Warner A.E. (1997). Fibroblast growth factor 4 directs gap junction expression in the mesenchyme of the vertebrate limb Bud. *J Cell Biol.* **138**, 1125-37.
- Makarenkova H. und Patel K. (1999). Gap junction signalling mediated through connexin-43 is required for chick limb development. *Dev Biol.* **207**, 380-92.
- Mandler M., und Neubuser A. (2001). FGF signaling is necessary for the specification of the odontogenic mesenchyme. *Dev Biol.* **240**, 548-59.
- Manova K., Paynton B.V., und Bachvarova R.F. (1992). Expression of activins and TGF beta 1 and beta 2 RNAs in early postimplantation mouse embryos and uterine decidua. *Mech Dev.* **36**, 141-52.
- Manova K., De Leon V., Angeles M., Kalantry S., Giarre M., Attisano L., Wrana J., und Bachvarova R.F. (1995). mRNAs for activin receptors II and IIB are expressed in mouse oocytes and in the epiblast of pregastrula and gastrula stage mouse embryos. *Mech Dev.* **49**, 3-11.
- Marigo V., Roberts D.J., Lee S.M., Tsukurov O., Levi T., Gastier J.M., Epstein D.J., Gilbert D.J., Copeland N.G., und Seidman C.E. (1995). Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics.* **28**, 44-51.
- Marigo V., Scott M.P., Johnson R.L., Goodrich L.V., und Tabin, C.J. (1996). Conservation in hedgehog signaling: induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb. *Development.* **122**, 1225-33.
- Marigo V., und Tabin C.J. (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 9346-51.
- Marszalek, J.R., Ruiz-Lozano, P., Roberts, E., Chien, K.R., und Goldstein, L.S. (1999). Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5043–5048.
- Marti E., Takada R., Bumcrot D.A., Sasaki H., und McMahon A.P. (1995). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development.* **121**, 2537-47
- Massague J., und Chen Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* **14**, 627-44. Review.
- Mastronardi, F., Dimitroulakos, J., Kamel-Reid, S., and Manoukian, A. (2000). Co-localization of patched and activated sonic hedgehog to lysosomes in neurons. *Neuroreport* **11**, 581-585

Matzuk M.M., Kumar T.R., Vassalli A., Bickenbach J.R., Roop D.R., Jaenisch R., und Bradley A. (1995a). Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature*. **374**, 354-6.

Matzuk M.M., Lu N., Vogel H., Sellheyer K., Roop D.R., und Bradley A. (1995b). Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*. **374**, 360-3.

McCarthy A., und Brown N.A. (1998). Specification of left-right asymmetry in mammals: embryo culture studies of stage of determination and relationships with morphogenesis and growth. *Reprod Toxicol*. **12**, 177-84.

Melloy, P.G., Ewart, J.L., Cohen, M.F., Desmond, M.E., Kuehn, M.R., und Lo, C.W. (1998). No turning, a mouse mutation causing left-right and axial patterning defects. *Dev. Biol*. **193**, 77-89.

Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y., und Hamada, H. (1996). Left-right asymmetric expression of the TGFB-family member *lefty* in mouse embryos. *Nature* **381**, 151-155.

Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K., Kuhara, S., und Hamada, H. (1997). Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, *lefty-1* and *lefty-2*: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes Cells* **2**, 513-524.

Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H., und Hamada, H. (1998). *lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell* **94**, 287-297.

Meno, C., Gritsman, K., Ohishi, S., Ohfuji, Y., Heckscher, E., Mochida, K., Shimono, A., Kondoh, H., Talbot, W.S., und Robertson, E.J. et al. (1999). Mouse *Lefty2* and zebrafish *antivin* are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation. *Mol. Cell* **4**, 287-298.

Meno C., Takeuchi J., Sakuma R., Koshiba-Takeuchi K., Ohishi S., Saijoh Y., Miyazaki J., ten Dijke P., Ogura T. und Hamada H. (2001) Diffusion of nodal signaling activity in the absence of the feedback inhibitor *Lefty2*. *Dev Cell*. **1**, 127-38.

Meyers, E.N., und Martin, G.R. (1999). Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH. *Science* **285**, 403-406.

Minowada G., Jarvis L.A., Chi C.L., Neubuser A., Sun X., Hacoen N., Krasnow M.A., und Martin G.R. (1999). Vertebrate *Sprouty* genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development*. **126**, 4465-75.

Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., Overbeek, P.A., Hamada, H., und Yokoyama, T. (1998). Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* **395**, 177-181.

Mohammadi M., McMahon G., Sun L., Tang C., Hirth P., Yeh B.K., Hubbard S.R. und Schlessinger J. (1997). Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science*. **276**, 955-60.

Monaghan A.P., Kaestner K.H., Grau E., und Schutz G. (1993). Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development*. **119**, 567-78.

Monsoro-Burq A., und Le Douarin N.M. (2000). Left-right asymmetry in BMP4 signalling pathway during chick gastrulation. *Mech Dev*. **97**, 105-8.

Monsoro-Burq A., und Le Douarin N.M. (2001). BMP4 plays a key role in left-right patterning in chick embryos by maintaining Sonic Hedgehog asymmetry. *Mol Cell*. **7**, 789-99.

- Murcia N.S., Richards W.G., Yoder B.K., Mucenski M.L., Dunlap J.R. und Woychik R.P. (2000). The Oak Ridge Polycystic Kidney (ork) disease gene is required for left-right axis determination. *Development* **127**, 2347-2355.
- Muhr J., Graziano E., Wilson S., Jessell T.M., und Edlund T. (1999). Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in gastrula stage chick embryos. *Neuron*. **23**, 689-702.
- Nascone N., und Mercola M. (1995). An inductive role for the endoderm in *Xenopus* cardiogenesis. *Development*. **121**, 515-23.
- Newman C.S., Grow M.W., Cleaver O., Chia F. und Krieg P. (1997). Xbap, a vertebrate gene related to bagpipe, is expressed in developing craniofacial structures and in anterior gut muscle. *Dev Biol*. **181**, 223-33.
- Nomura, M., und Li, E. (1998). Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature* **393**, 786–790.
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., und Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**, 829–837.
- Norlin S., Nordstrom U., und Edlund T. (2000). Fibroblast growth factor signaling is required for the proliferation and patterning of progenitor cells in the developing anterior pituitary. *Mech Dev*. **96**, 175-82.
- Norris, D.P., und Robertson, E.J. (1999). Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes Dev*. **13**, 1575–1588.
- Nüsslein-Volhard, C., E. Wieschaus, and H. Kluding. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol*. **193**, 267-282.
- Nutt S.L., Dingwell K.S., Holt C.E., und Amaya E. (2001). *Xenopus* Sprouty2 inhibits FGF-mediated gastrulation movements but does not affect mesoderm induction and patterning. *Genes Dev*. **15**, 1152-66.
- Oh, S.P., und Li, E. (1997). The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes Dev*. **11**, 1812–1826.
- Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H., und Hirokawa, N. (1999). Abnormal nodal flow precedes situs inversus in *iv* and *inv* mice. *Mol. Cell* **4**, 459–468.
- Osada S.I., und Wright C.V. (1999). *Xenopus* nodal-related signaling is essential for mesendodermal patterning during early embryogenesis. *Development*. **126**, 3229-40.
- Ozaki K., Kadomoto R., Asato K., Tanimura S., Itoh N., und Kohno M. (2001). ERK pathway positively regulates the expression of Sprouty genes. *Biochem Biophys Res Commun*. **285**, 1084-8.
- Pagán-Westphal, S.M., und Tabin, C.J. (1998). The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis. *Cell* **93**, 25–35.
- Parameswaran M., und Tam P.P. (1995). Regionalisation of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation. *Dev Genet*. **17**, 16-28.
- Patel, K., Isaac, A., und Cooke, J. (1999). Nodal signaling and the roles of the transcription factors SnR and Pitx2 in vertebrate left-right asymmetry. *Curr. Biol*. **9**, 609–612.

- Picker A., Brennan C., Reifers F., Clarke J.D., Holder N., und Brand M. (1999). Requirement for the zebrafish mid-hindbrain boundary in midbrain polarisation, mapping and confinement of the retinotectal projection. *Development*. **126**, 2967-78.
- Piedra, M.E., Icardo, J.M., Albajar, M., Rodriguez-Rey, J.C., und Ros, M.A. (1998). Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* **94**, 319–324.
- Poss K.D., Shen J., Nechiporuk A., McMahon G., Thisse B., Thisse C., und Keating M.T. (2000). Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. *Dev Biol*. **222**, 347-58.
- Psychoyos D., Stern C.D. (1996a). Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. *Development*. **122**, 1523-34.
- Psychoyos D., Stern C.D. (1996b). Restoration of the organizer after radical ablation of Hensen's node and the anterior primitive streak in the chick embryo. *Development*. **122**, 3263-73.
- Rankin C.T., Bunton T., Lawler A.M. und Lee S.J. (2000). Regulation of left-right patterning in mice by growth/differentiation factor-1. *Nat Genet* **24**, 262-265.
- Reaume A.G., de Sousa P.A., Kulkarni S., Langille B.L., Zhu D., Davies T.C., Juneja S.C., Kidder G.M., und Rossant J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*. **267**, 1831-4.
- Rebagliati, M.R., Toyama, R., Fricke, C., Haffter, P., und Dawid, I.B. (1998a). Zebrafish nodal-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Dev. Biol.* **199**, 261–272.
- Rebagliati M.R., Toyama R., Haffter P., und Dawid I.B. (1998b) cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 9932-7.
- Reifers F., Walsh E.C, Leger S., Stainier D.Y., und Brand M.. (2000). Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar). *Development*. **127**, 225-35.
- Reim G., und Brand M. (2002). Spiel-ohne-grenzen/pou2 mediates regional competence to respond to Fgf8 during zebrafish early neural development. *Development*. **129**, 917-33.
- Reissmann E., Jornvall H., Blokzijl A., Andersson O., Chang C., Minchiotti G., Persico M.G., Ibanez C.F., und Brivanlou A.H. (2001). The orphan receptor ALK7 and the Activin receptor ALK4 mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development. *Genes Dev*. **15**, 2010-22.
- Riddle R.D., Johnson R.L., Laufer E., und Tabin C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. **75**, 1401-16.
- Rodriguez-Esteban, C., Capdevila, J., Economides, A.N., Pascual, J., Ortiz, A., und Izpisua Belmonte, J.C. (1999). The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature* **401**, 243–251.
- Roelink H., Augsburger A., Heemskerk J., Korzh V., Norlin S., Ruiz i Altaba A., Tanabe Y., Placzek M., Edlund T., und Jessell T.M. (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell*. **76**, 761-75.
- Roelink H., Porter J.A., Chiang C., Tanabe Y., Chang D.T, Beachy P.A., und Jessell T.M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell*. **81**, 445-55.
- Ruiz i Altaba A., Jessell T.M., und Roelink H. (1995). Restrictions to floor plate induction by hedgehog and winged-helix genes in the neural tube of frog embryos. *Mol Cell Neurosci*. **6**, 106-21.

- Ryan, A.K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Pena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., und Choe, S. et al. (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**, 545–551.
- Saijoh, Y., Adachi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Hirao, A., und Hamada, H. (1999). Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left-right asymmetric expression of lefty-1 and lefty-2. *Genes Dev.* **13**, 259–269.
- Saijoh, Y., Adachi, H., Sakuma, R., Yeo, C.Y., Yashiro, K., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Ohishi, S., und Kawabata, M. et al. (2000). Left-right asymmetric expression of lefty2 and nodal is induced by a signaling pathway that includes the transcription factor FAST2. *Mol. Cell* **5**, 35–47.
- Sampath, K., Cheng, A.M.S., Frisch, A., und Wright, C.V.E. (1997). Functional differences among Xenopus nodal-related genes in left-right axis determination. *Development* **124**, 3293–3302.
- Sampath, K., Rubinstein, A.L., Cheng, A.M., Liang, J.O., Fekany, K., Solnica-Krezel, L., Korzh, V., Halpern, M.E., und Wright, C.V. (1998). Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signaling. *Nature* **395**, 185–189.
- Sasaki H., und Hogan B.L.. (1993). Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development*. **118**, 47-59.
- Sasaki H., und Hogan B.L. (1994). HNF-3 beta as a regulator of floor plate development. *Cell*. **76**, 103-15
- Sasaki A., Taketomi T., Wakioka T., Kato R., und Yoshimura A. (2001). Identification of a dominant negative mutant of Sprouty that potentiates fibroblast growth factor- but not epidermal growth factor-induced ERK activation. *J Biol Chem*. **276**, 36804-8.
- Savagner P. (2001). Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*. **23**, 912-23. Review.
- Schilling, T.F., Concordet, J.P., und Ingham, P.W. (1999). Regulation of left-right asymmetries in the zebrafish by Shh and BMP4. *Dev. Biol.* **210**, 277–287.
- Schlange T., Schnipkoweit I., Andree B., Ebert A., Zile M.H., Arnold H.H. und Brand T. (2001). Chick CFC controls Lefty1 expression in the embryonic midline and nodal expression in the lateral plate. *Dev Biol.* **234**, 376-89.
- Schmidt C., Christ B., Patel K., und Brand-Saberi B. (1998). Experimental induction of BMP-4 expression leads to apoptosis in the paraxial and lateral plate mesoderm. *Dev Biol.* **202**, 253-63.
- Schneider, A., Mijalski, T., Schlange, T., Dai, W., Overbeek, P., Arnold, H.H., und Brand, T. (1999). The homeobox gene NKX3.2 is a target of left-right signaling and is expressed on opposite sides in chick and mouse embryos. *Curr. Biol.* **9**, 911–914.
- Schrewe H., Gendron-Maguire M., Harbison M.L., und Gridley T. (1994). Mice homozygous for a null mutation of activin beta B are viable and fertile. *Mech Dev.* **47**, 43-51.
- Schweickert, A., Campione, M., Steinbeisser, H., und Blum, M. (2000). Pitx2 isoforms: involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. *Mech. Dev.* **90**, 41–51.
- Sefton, M., Sanchez, S., und Nieto, M.A. (1998). Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* **125**, 3111–3121.
- Shen, M. M., Wang, H. und Leder, P. (1997). A differential display strategy identifies Cryptic, a novel EGF-related gene expressed in the axial and lateral mesoderm during mouse gastrulation. *Development* **124**, 429-442.

- Shiratori H., Sakuma R., Watanabe M., Hashiguchi H., Mochida K., Sakai Y., Nishino J., Saijoh Y., Whitman M., und Hamada H. (2001). Two-step regulation of left-right asymmetric expression of Pitx2: initiation by nodal signaling and maintenance by Nkx2. *Mol Cell*. **7**, 137-49.
- Simon A.M., und Goodenough D.A. (1998). Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol*. **8**, 477-83. Review.
- Sirard C., de la Pompa J.L., Elia A., Itie A., Mirtsos C., Cheung A., Hahn S., Wakeham A., Schwartz L., Kern S.E., Rossant J., und Mak T.W. (1998). The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev*. **12**, 107-119.
- Smith D.E., Franco del Amo F., und Gridley T. (1992). Isolation of Sna, a mouse gene homologous to the Drosophila genes snail and escargot: its expression pattern suggests multiple roles during postimplantation development. *Development*. **116**, 1033-9.
- Smith J.L., Gesteland K.M., und Schoenwolf G.C. (1994). Prospective fate map of the mouse primitive streak at 7.5 days of gestation. *Dev Dyn*. **201**, 279-89.
- Smith S., Metcalfe J.A. und Elgar G. (2000). Identification and analysis of two snail genes in the pufferfish (*Fugu rubripes*) and mapping of human SNA to 20q. *Gene*. **247**, 119-28.
- Song J., Oh S.P., Schrewe H., Nomura M., Lei H, Okano M., Gridley T., und Li E. (1999). The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation, and rostral head development in mice. *Dev. Biol*. **213**, 157-169.
- St Amand, T.R., Ra, J., Zhang, Y., Hu, Y., Baber, S.I., Qiu, M., und Chen, Y. (1998). Cloning and expression pattern of chicken Pitx2: a new component in the SHH signaling pathway controlling embryonic heart looping. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **247**, 100–105.
- Stalsberg H. (1969). The origin of heart asymmetry: right and left contributions to the early chick embryo heart. *Dev Biol*. **19**, 109-27.
- Stern C.D., Yu R.T., Kakizuka A., Kintner C.R., Mathews L.S., Vale W.W., Evans R.M., und Umesono K. (1995). Activin and its receptors during gastrulation and the later phases of mesoderm development in the chick embryo. *Dev Biol*. **172**, 192-205.
- Sulik K., Dehart D.B., Iangaki T., Carson J.L., Vrablic T., Gesteland K., und Schoenwolf G.C. (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev Dyn*. **201**, 260-78.
- Sun X., Meyers E.N., Lewandoski M., und Martin G.R. (1999). Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev*. **13**, 1834-46.
- Supp, D.M., Witte, D.P., Potter, S.S., und Brueckner, M. (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. *Nature* **389**, 963–966.
- Supp, D.M., Brueckner, M., Kuehn, M.R., Witte, D.P., Lowe, L.A., McGrath, J., Corrales, J., und Potter, S.S. (1999). Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *Development* **126**, 5495–5504.
- Takeda, S., Yonekawa, Y., Tanaka, Y., Okada, Y., Nonaka, S., und Hirokawa, N. (1999). Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by kif3A^{-/-} mice analysis. *J. Cell Biol*. **145**, 825–836.
- Taulman P.D., Haycraft C.J., Balkovetz D.F., und Yoder B.K. (2001). Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell*. **12**, 589-99.
- Thisse, C., und Thisse, B. (1999). Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* **126**, 229–240.

- Toyama R., O'Connell M.L., Wright C.V., Kuehn M.R., und Dawid I.B. (1995). Nodal induces ectopic gooseoid and *lim1* expression and axis duplication in zebrafish. *Development*. **121**, 383-91.
- Tribioli C., Frasch M., und Lufkin T. (1997). *Bapx1*: an evolutionary conserved homologue of the *Drosophila* bagpipe homeobox gene is expressed in splanchnic mesoderm and the embryonic skeleton. *Mech Dev*. **65**, 145-62.
- Tribioli C., und Lufkin T. (1997). Molecular cloning, chromosomal mapping and developmental expression of BAPX1, a novel human homeobox-containing gene homologous to *Drosophila* bagpipe. *Gene*. **203**, 225-33.
- Tribioli C., und Lufkin T. (1999). The murine *Bapx1* homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen. *Development*. **126**, 5699-711.
- Tsang T.E., Kinder S.J., und Tam P.P. (1999). Experimental analysis of the emergence of left-right asymmetry of the body axis in early postimplantation mouse embryos. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. **45**, 493-503.
- Tsang M., Friesel R., Kudoh T., und Dawid I.B. (2002). Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol*. **4**, 165-9.
- Tsukui, T., Capdevila, J., Tamura, K., Ruiz-Lozano, P., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Magallon, J., Chandraratna, R.A., Chien, K., und Blumberg, B. et al. (1999). Multiple left-right asymmetry defects in *Shh* (-/-) mutant mice unveil a convergence of the *shh* and retinoic acid pathways in the control of *Lefty-1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11376–11381.
- van den Eijnden-van Raaij A.J., Feijen A., Lawson K.A., und Mummery C.L. (1992). Differential expression of inhibin subunits and follistatin, but not of activin receptor type II, during early murine embryonic development. *Dev Biol*. **154**, 356-65.
- Varlet I., Collignon J. und Robertson E.J. (1997). nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development*. **124**, 1033-44.
- Wakioka T., Sasaki A., Kato R., Shouda T., Matsumoto A., Miyoshi K., Tsuneoka M., Komiya S., Baron R., und Yoshimura A. (2001). Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature*. **412**, 647-51.
- Waldrip, W.R., Bikoff, E.K., Hoodless, P.A., Wrana, J.L., und Robertson, E.J. (1998). Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* **92**, 797–808.
- Weigel D., und Jackle H. (1990). The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell*. **63**, 455-6.
- Weinstein D.C., Ruiz i Altaba A., Chen W.S., Hoodless P., Prezioso V.R., Jessell T.M., und Darnell J.E Jr. (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell*. **78**, 575-88.
- Weinstein M., Yang X., Li C., Xu X., Gotay J., und Deng C.X. (1998). Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 9378-9383.
- Wetzel, R. (1929). Untersuchungen am Huhnchen. Die Entwicklung des Keims während der ersten Bruttage. *Arch. Entwicklungsmech*. **119**, 188-321.
- Whitman M. (1998). Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev*. **12**, 2445-62. Review.

- Wilson V., und Beddington R.S. (1996). Cell fate and morphogenetic movement in the late mouse primitive streak. *Mech Dev.* **55**, 79-89.
- Wilson S.I., Graziano E., Harland R., Jessell T.M., und Edlund T. (2000). An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol.* **10**, 421-9.
- Wright C.V. (2001). Mechanisms of left-right asymmetry: what's right and what's left? *Dev Cell.* **1**, 179-86.
- Xu X., Li C., Takahashi K., Slavkin H.C., Shum L., und Deng C.X. (1999). Murine fibroblast growth factor receptor 1alpha isoforms mediate node regression and are essential for posterior mesoderm development. *Dev Biol.* **208**, 293-306.
- Yamaguchi T.P., Conlon R.A., und Rossant J. (1992). Expression of the fibroblast growth factor receptor FGFR-1/flg during gastrulation and segmentation in the mouse embryo. *Dev Biol.* **152**, 75-88.
- Yamaguchi T.P., Harpal K., Henkemeyer M., und Rossant J. (1994). fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev.* **8**, 3032-44.
- Yan, Y.T., Gritsman, K., Ding, J., Burdine, R.D., Corrales, J.D., Price, S.M., Talbot, W.S., Schier, A.F., und Shen, M.M. (1999). Conserved requirement for EGF-CFC genes in vertebrate left-right axis formation. *Genes Dev.* **13**, 2527-2537.
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A. et al. (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* **124**, 4393-4404
- Yang, X., Li, C., Xu, X. und Deng, C. (1998). The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 3667-3672.
- Yeager M., Unger V.M., und Falk M.M. (1998). Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol.* **8**, 517-24. Review.
- Yoder B.K., Tousson A., Millican L., Wu J.H., Bugg C.E. Jr, Schafer J.A., und Balkovetz D.F. (2002). Polaris, a protein disrupted in orpk mutant mice, is required for assembly of renal cilium. *Am J Physiol Renal Physiol.* **282**, F541-52.
- Yokouchi, Y., Vogan, K.J., Pearse, R.V. II, und Tabin, C.J. (1999). Antagonistic signaling by Caronte, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell* **98**, 573-583.
- Yokoyama, T., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Montgomery, C.A., Elder, F.F., und Overbeek, P.A. (1993). Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation. *Science* **260**, 679-682.
- Yoshioka H., Meno C., Koshiba K., Sugihara M., Itoh H., Ishimaru Y., Inoue T., Ohuchi H., Semina E.V., Murray J.C., Hamada H. und Noji S. (1998). Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell.* **94**, 299-305.
- Yost H.J. (1992). Regulation of vertebrate left-right asymmetries by extracellular matrix. *Nature.* **357**, 158-61.
- Yu X., St Amand T.R., Wang S., Li G., Zhang Y., Hu Y.P., Nguyen L., Qiu M.S. und Chen Y.P. (2001). Differential expression and functional analysis of Pitx2 isoforms in regulation of heart looping in the chick. *Development.* **128**, 1005-13.

Yusoff P., Lao D.H., Ong S.H., Wong E.S., Lim J., Lo T.L., Leong H.F., Fong C.W., und Guy G.R. (2002). Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *J Biol Chem.* **277**, 3195-201.

Zhang, J., W.S. Talbot, und A.F. Schier. (1998). Positional cloning identifies zebrafish one-eyed pinhead as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation. *Cell* **92**, 241-251.

Zhang X.M., Ramalho-Santos M., und McMahon A.P. (2001). Smoothened mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell* **106**, 781-92.

Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B. L. und Kuehn, M. R. (1993). Nodal is a novel TGF β -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* **361**, 543-547

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Toxikologie und Genetik des Forschungszentrums Karlsruhe durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Martin Blum für die Betreuung dieser Arbeit, sowie seine ständige Motivation und Unterstützung.

Dr. Christoph Viebahn (Universität Halle) möchte ich für die bereitwillige Einarbeitung in die Präparation von Kaninchenembryonen und deren Kultur danken, durch die die erstellten Kulturbedingungen erst möglich wurden.

Prof. Dr. Peter Herrlich danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Gruppe Martin Blum für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die freundliche Unterstützung. Vor allem möchte ich mich bei Axel Schweickert für die vielen Anregungen und Diskussionen bedanken, die so manches interessante Experiment erst ermöglicht haben.

Unabhängig von den bereits Erwähnten danke ich meinem Lebensgefährten Dirk für die liebevolle und engagierte Unterstützung, besonders in der letzten Phase der Arbeit.