

**Ektodermale Differenzierung im Wirbeltierembryo:
Die Induktion der Vorderhirnanlage und der Neuralleiste**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Diplom-Biochemiker Hendrik Knötgen

geboren am 30.08.1971 in Münster, Westfalen

Diese Arbeit wurde von November 1997 bis Oktober 2000 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen in der Abteilung für Molekulare Zellbiologie unter der Betreuung von Priv. Doz. Dr. M. Kessel angefertigt.

Referent: Priv. Doz. Dr. W. H. Müller

Korreferenten: Priv. Doz. Dr. M. Kessel

Tag der Promotion: 21.12.2000

Für Daniela

Inhaltsverzeichnis	- 4
Einleitung	
1. Einführung	- 8
1.1 Die Gastrulation der Wirbeltierembryonen	- 8
1.2 Das primitive Endoderm der Amnieten	- 11
1.3 Das Konzept des Organisators	- 12
1.4 Die Induktion des Vorderhirns in Säugetierembryonen	- 14
1.5 Die Entstehung der Neuralleiste	- 16
2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	- 19
Material und Methoden	
1. Verwendete Plasmide, Organismen und Zellen	- 20
1.1 Plasmide	- 20
1.2 Organismen und Zellen	- 21
1.2.1 Bakterien	- 21
1.2.2 Embryonale Hühnerfibroblasten	- 21
1.2.3 Hühnerembryonen	- 21
1.2.4 Kaninchenembryonen	- 21
2. Isolierung von Nukleinsäuren	- 21
2.1 Aufreinigung von bakterieller Plasmid DNA	- 21
2.2 Aufreinigung von DNA- und RNA-Sonden	- 22
2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe und Hühnerfibroblasten	- 22
2.4 Elektrophorese und Elektroelution von DNA aus Agarosegelen	- 23
3. Modifizierung von Nukleinsäuren	- 24
3.1 Restriktionsverdau	- 24
3.2 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	- 24
3.3 Erzeugung von glatten Enden bei DNA-Fragmenten	- 24
3.4 Klonierung von doppelsträngigen, synthetischen DNA-Oligonukleotiden	- 24
3.5 Ligation	- 25
3.6 DNA-Konstrukte	- 25
3.6.1 Konstruktion des eukaryontischen Expressionsvektors pCMV3	- 25
3.6.2 DNA-Konstrukte des Gens <i>Cresto</i>	- 27
3.6.2.1 Deletionsmutanten des Gens <i>Cresto</i>	- 27

3.6.2.2 DNA-Konstrukte für ein Fusionsprotein aus GFP und Cresto	28
3.6.2.2.1 Cresto-GFP	29
3.6.2.2.2 Cresto-HA-GFP	29
3.6.2.2.3 Cresto-GS-GFP-	30
3.6.2.2.4 GFP-Cresto	30
3.6.2.2.5 EGFP-HA-Cresto-	30
3.6.2.3 DNA-Konstrukte zur Fusion von Cresto mit Myc- bzw. His-Epitop	31
3.7 Konstruktion von cDNA Banken aus embryonalen Hühnergewebe	31
3.8 Markieren von RNA-Sonden mit Digoxigenin oder Fluoreszein	33
3.9 Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Molekülen	34
3.10 Subtraktion von Klonen durch Kolonie-Hybridisierung	35
3.11 cDNA Erststrang-Synthese für die RT-PCR-	35
3.12 Polymerase-Kettenreaktion	36
3.12.1 Standard Polymerase-Kettenreaktion-	36
3.12.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion	37
3.12.3 Herstellung von DNA-Fragmenten mit modifizierter Basenabfolge	38
3.12.4 Amplifikation des Gens <i>SLUG</i> aus cDNA	38
4. Analyse von Nukleinsäuren	38
4.1 Sequenzierungen	38
4.2 In-situ-Hybridisierung am ganzen Embryo	39
5. Molekularbiologische Methoden-	42
5.1 Herstellung von kompetenten Bakterien für die Transfektion	42
5.2 Transformation von Bakterien durch Elektroporation	42
6. Kultivierung von embryonalen Hühnerfibroblasten	43
6.1 Auftauen von embryonalen Hühnerfibroblasten	43
6.2 Passagieren-	43
6.3 Transfektion der embryonalen Hühnerfibroblasten	43
6.4 Kultivierung embryonaler Hühnerfibroblasten auf Objektträgern	44
7. Embryologische Manipulationen	44
7.1 In-vitro-Kultivierung von Hühnerembryonen-	44
7.2 Transplantationen-	45
7.2.1 Transplantation von Kaninchengewebe in Hühnerembryonen-	45
7.2.2 Transplantation von Hühnergewebe-	45

7.3 Gen-Transfer in Hühnerembryonen durch Elektroporation	46
7.4 Gen-Transfer in Explantate	47
8. Immunohistochemie	47

Ergebnisse

1. Analyse der neuralinduzierenden Fähigkeiten verschiedener Gewebe im Transplantationsexperiment	49
1.1 Transplantation des anterioren, primitiven Endoderms	51
1.2 Transplantation des Knotens aus dem Hühnerembryo	53
1.3 Transplantation des Knotens aus dem Kaninchenembryo	55
1.4 Transplantation des hinter dem Knoten liegenden Teils des Primitivstreifens aus dem Kaninchenembryo	59
1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Transplantationsexperimente	59
2. Identifikation des Gens <i>Cresto</i>	61
2.1 Herstellung der cDNA-Plasmid-Banken	61
2.2 Das Gen <i>Cresto</i>	64
2.3 Die Expression des Gens <i>Cresto</i> in der frühen Entwicklung des Hühnerembryos	66
2.4 Die Überexpression des Gens <i>Cresto</i> im Hühnerembryo durch Elektroporation	66
2.4.1 Die Überexpression des Gens <i>Cresto</i> im Hühnerembryo	68
2.4.2 Die Überexpression des Gens <i>Cresto</i> löste bei neuralen Zellen Wanderungen aus	71
2.4.3 Die Überexpression von <i>Cresto A</i> , <i>Cresto B</i> und <i>Cresto C</i>	73
2.5 Die Überexpression des Gens <i>Cresto</i> in embryonalen Hühnerfibroblasten	74
2.5.1 Die zelluläre Lokalisation der überexprimierten Proteine EGFP-HA- <i>Cresto</i> , <i>Cresto</i> -his bzw. <i>Cresto</i> -myc	74
2.5.2 Der Einfluß von <i>Cresto</i> in embryonalen Hühnerfibroblasten auf die Expression der Gene <i>MSX1</i> , <i>SLUG</i> und <i>DLX5</i>	76
2.6 Die Überexpression des Gens <i>SLUG</i> im Hühnerembryo	77

Diskussion

1. Die Induktion der Vorderhirnanlage im Wirbeltierembryo	79
1.1 Die Induktion der Vorderhirnanlage im Hühnerembryo	79
1.2 Induktion der Vorderhirnanlage im Säugetierembryo	82

1.2.1 Die Induktion der Vorderhirnanlage im Säugetierembryo durch das anteriore, primitive Endoderm - - - - -	82
1.2.2 Der Einfluß des Knotens des Kaninchenembryos auf die Anlage des Vorderhirns - - - - -	83
1.2.3 Das induktive Potential entlang des Primitivstreifens- - - - -	84
1.3 Vergleich des primitiven Endoderms von Säugetier- und Vogelembryonen - - - - -	85
1.4 Vergleich der anterioren Neuralinduktion in Amphibien, Vögeln und Säugern - -	86
2. Die Rolle der Gene <i>Cresto</i> und <i>SLUG</i> bei der Entwicklung der Neuralleisten- zellen im Hühnerembryo - - - - -	88
2.1 <i>Cresto</i> und <i>Geminin</i> - - - - -	88
2.2 Die Expression des Gens <i>Cresto</i> im Hühnerembryo impliziert eine Rolle bei der Entwicklung der Neuralleistenzellen- - - - -	88
2.3 Die Überexpression des Gens <i>Cresto</i> induziert die frühe Entwicklung von Neuralleistenzellen - - - - -	90
2.4 Die unterschiedlichen Domänen des Proteins Cresto aktivieren unterschied- liche Markergene - - - - -	93
2.5 Die zelluläre Lokalisation des Proteins Cresto - - - - -	94
2.6 Die Überexpression des Gens <i>SLUG</i> - - - - -	94
2.7 Die Signalkaskade zur Induktion von frühen Neuralleistenzellen - - - - -	96
Zusammenfassung - - - - -	97
Summary - - - - -	98
Abkürzungen - - - - -	99
Literaturverzeichnis - - - - -	101
Anhang	
1. Danksagung - - - - -	113
2. Liste der aus Prioritätsgründen bereits veröffentlichten Teile dieser Arbeit- - - -	115
3. Lebenslauf - - - - -	116

Einleitung

1. Einführung

Die Entwicklungsbiologie beschäftigt sich mit der Entstehung eines vielzelligen Organismus aus einer befruchteten Eizelle (Zygote). Dabei bildet sich in einem dynamischen Prozeß aus einer einfachen eine überaus komplexe, hochorganisierte Struktur. Bei der Entstehung von Wirbeltieren beginnt unmittelbar nach der Befruchtung der Eizelle zunächst eine Phase, die durch schnelle, mitotische Zellteilungen gekennzeichnet ist. Die Zygote wird dabei in kleinere Zellen, die Blastomere, unterteilt. Am Ende dieser Phase haben sich die Blastomere zur Blastula angeordnet, aus deren Epithel, dem Epiblasten, sich der spätere Embryo entwickelt (Abb. 1). Anschließend beginnt die Gastrulation, in der die Blastula dramatisch umgeformt wird. Die Zellteilungsrate verlangsamt sich und ausgeprägte Zellwanderungen setzen ein, bei der die Zellen der Blastula die Zellen der drei Keimblätter, das Ektoderm, das Mesoderm und das Endoderm, hervorbringen. Die damit entstandene räumliche Organisation des Embryos ermöglicht die Interaktion von Zellen der verschiedenen Keimblätter miteinander, die dabei die weitere Diversifikation der Zellen und letztlich die Entstehung von Geweben und Organen auslöst. Im Wirbeltierembryo differenzieren die Zellen des Ektoderms auf diese Weise in die Zellen des zentralen Nervensystems, der Neuralleiste und der Epidermis. Die Zellen des Endoderms entwickeln sich in das Verdauungssystem mit seinen assoziierten Organen wie Pankreas und Leber und die Zellen des Mesoderms in das hämatopoetische System, die Nieren, die Knochen und die Muskeln. In dem ersten Teil dieser Arbeit werden die zellulären Interaktionen, die zur Induktion der Vorderhirnanlage im Ektoderm führen, untersucht und zwischen dem Hühner- und Kaninchenembryo verglichen. Im zweiten Teil wird die Rolle eines in dieser Arbeit identifizierten Gens bei der Differenzierung der Neuralleistenzellen analysiert.

1.1 Die Gastrulation der Wirbeltierembryonen

Sowohl bei den Amphibien, wie dem Frosch *Xenopus laevis*, als auch bei den Amnioten, wie dem Huhn *Gallus gallus*, der Maus *Mus musculus* und dem Kaninchen *Oryctolagus cuniculus*, wandern bei der Gastrulation außenliegende Zellen des Epiblasten nach innen ein und bilden dabei das Endoderm und das Mesoderm. Bei dem Frosch beginnt die Einwanderung, indem dotterreiche Zellen vom vegetalen Pol durch die Epibolie der Zellen vom animalen Pol internalisiert werden (Abb. 1). Dabei bildet sich die Blastoporenlippe, wo die vegetalen Zellen eingestülpt werden. Die zu Beginn der Gastrulation an der dorsalen Blastoporenlippe eingeschobenen, dotterreichen Zellen bilden das anteriore (vordere) Endoderm, das sich später zu dem Vorderdarm und der Leber entwickelt (Bouwmeester et al., 1996). Diesen endodermalen Zellen folgen die Zellen, die vom Epiblasten um die Blastoporenlippe einwandern und

das axiale Mesoderm ausbilden. Die zuerst einwandernden Zellen des axialen Mesoderms werden zum sogenannten prächordalen Mesoderm, das weit nach anterior einwandert und zwischen dem Vorderdarm und der zukünftigen Vorderhirnanlage liegt (Hausen und Riebesell, 1991; Abb.1). Die später einwandernden Zellen des axialen Mesoderms tragen dagegen zum Notochord bei, das unter dem weiter posterior (hinten) gelegenen Teil des Nervensystems liegt.

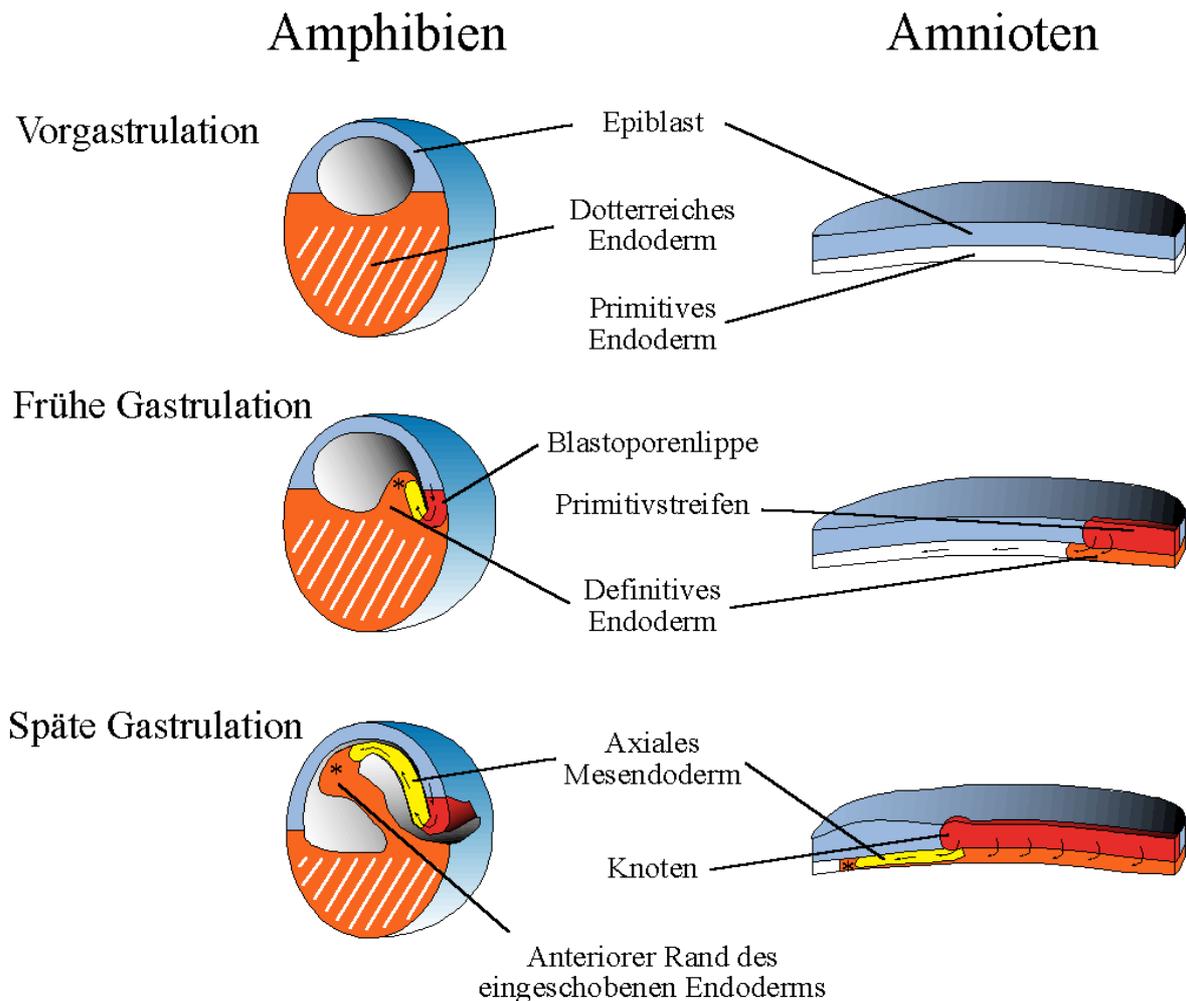


Abb. 1: Schematischer Vergleich von Amphibien- (Frosch) und Amniotenembryonen (Huhn, Kaninchen, und Maus) während der Gastrulation. Im Froschembryo begrenzt vor dem Beginn der Gastrulation der Epiblast (hellblau) das Blastozoele am animalen Pol. Das zukünftige Endoderm (orange) befindet sich am dotterreichen, vegetalen Pol. Der größte Teil der dotterreichen Zellen wird zur Versorgung des Embryos verbraucht (orange-gestreift). Zu Beginn der Gastrulation wandern Zellen des Epiblasten über die dorsale Blastoporenlippe (rot) ein. Die einwandernden Zellen schieben die endodermalen Zellen nach innen und entwickeln sich selbst zum Mesoderm (gelb). Der anteriore Teil des Endoderms (mit einem Stern markiert) entwickelt sich zur Leber und zum Vorderdarm. Bei der Darstellung des Amniotenembryos ist zur besseren Übersicht auf das extraembryonale Gewebe mit Ausnahme des extraembryonalen Endoderms verzichtet worden. Bereits vor der Gastrulation ist der Embryo der Amnioten zweischichtig und besteht aus dem Epiblasten (hellblau) und dem primitiven Endoderm (weiß). Zu Beginn der Gastrulation entsteht am posterioren Ende des Embryos der Primitivstreifen (rot), durch den zunächst das definitive Endoderm (orange) und dann das Mesoderm (gelb) einwandern. Dabei wird das primitive Endoderm unter dem Epiblasten ersetzt und in den extraembryonalen Teil verschoben.

Bei der Gastrulation der Amniotenembryonen finden sich morphologisch vergleichbare Prozesse. Das Endoderm und das Mesoderm wandern durch eine langgestreckte Öffnung im Epiblasten ein. Diese Öffnung ist der Blastopore der Amphibien vergleichbar und wird als Primitivstreifen beschrieben (für weiterführende Diskussionen siehe Arendt und Nübler-Jung, 1999). Der Primitivstreifen bildet sich bei den Amnioten zunächst am zukünftigen posterioren Ende des Embryos und breitet sich dann nach anterior aus. Dabei wandern Zellen des Epiblasten von den Seiten auf den Primitivstreifen zu, durchwandern ihn und breiten sich unter dem Epiblasten aus (Schoenwolf, 1991). Aufgrund der festen Verbindung der drei Keimblätter an der anterioren Spitze des Primitivstreifens wurde die Spitze des Primitivstreifens im Kaninchenembryo zuerst von V. Hensen als „Knoten“ beschrieben (Hensen, 1876). Seitdem wird der Begriff des „Hensenschen Knotens“ oder abgekürzt „Knoten“ für alle Amnioten verwendet. Die anteriore Spitze des Primitivstreifens bringt wie an der dorsalen Blastoporenlippe des Frosches das anteriore Endoderm und das axiale Mesoderm hervor. Die ersten einwandernden Zellen werden zum anterioren Endoderm, das sich wie bei den Amphibien zum Vorderdarm und zur Leber entwickelt (Schoenwolf und Sheard, 1990; Lawson et al., 1991; Selleck und Stern, 1991; Lawson und Pedersen, 1992; Beddington, 1994; Abb. 1). Nachdem der Primitivstreifen seine volle Länge erreicht hat, wandern die Zellen des axialen Mesoderms aus der anterioren Spitze des Primitivstreifens zwischen das Endoderm und Ektoderm (Beddington, 1982; Tam und Beddington, 1987; Tam, 1989). Die ersten Zellen wandern wie bei den Amphibien bis unter das zukünftige Vorderhirn und bilden in der Region vor dem Notochord das prächordale Mesoderm aus. Bei Hühnerembryonen liegt es in frühen Stadien mesenchymal im Endoderm und kann von diesem nicht eindeutig abgegrenzt werden (Abb. 2). Es wird daher auch als Mesendoderm beschrieben. Das prächordale Mesoderm nimmt in seinen Ausmaßen vom Fisch über Frosch bis zu Vögeln und Säugern immer weiter ab (Hausen und Riebesell, 1991; Kimmel et al., 1995; Bellairs und Osmond, 1998; Couly et al., 1992). Bei den Mäusen befindet sich die entsprechende Zellpopulation einschichtig im Endoderm (Sulik et al., 1994). Diese Zellen sind jedoch morphologisch und in ihrer Genexpression von denen des Endoderms verschieden und bilden erst später ein prächordales Mesenchym zwischen Endo- und Ektoderm. Das prächordale Mesoderm wird auch als prächordale Platte bezeichnet, da es sich morphologisch von dem stabförmigen Notochord abgrenzt. Der Begriff der prächordalen Platte wurde zuerst von Oppel (1890) und später präziser von Adelman (1922) für mesenchymale Zellen anterior vom Notochord benutzt, die sich unter dem entwickelnden Vorderhirn befinden (siehe auch Meier, 1981; Seifert et al., 1993; Kuratani et al., 1999).

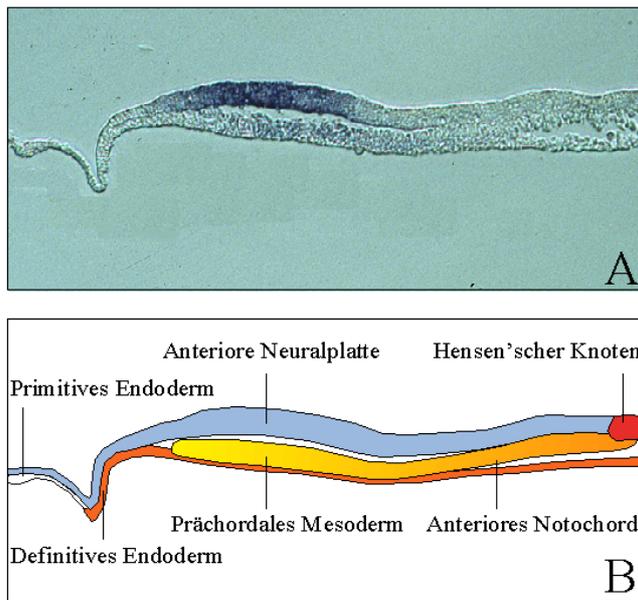


Abb. 2: Sagittaler Schnitt der anterioren Region eines Hühnerembryos im prächordalen Platten-Stadium. (A) Die Expression des Homeoboxgens *GANF* ist mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung in blau sichtbar gemacht. In der anterioren Neuralplatte ist das Gen *GANF* exprimiert. Im direkt darunter liegenden prächordalen Mesoderm ist *GANF* schwächer exprimiert. (B) Schematische Darstellung der verschiedenen Gewebe des in A abgebildeten Hühnerembryos. Das Ektoderm ist hellblau, der Hensensche Knoten rot, das primitive Endoderm weiß und das definitive Endoderm orange gefärbt. Das axiale Mesoderm besteht aus der prächordalen Mesoderm (gelb) und dem anterioren Notochord (hellorange).

1.2 Das primitive Endoderm der Amnioten

Im Gegensatz zu den Amphibien besitzen die Amnioten extraembryonale Gewebe. Diese tragen nicht zu dem Embryo selbst bei, sondern gewährleisten über die Ausbildung des Dottersackes bzw. der plazentalen Strukturen bei den Amnioten die Versorgung des Embryos während seiner Entwicklung. Das extraembryonale oder „primitive“ Endoderm befindet sich bereits vor der Gastrulation unter dem Epiblasten. Der junge Amniotenembryo ist daher zweischichtig und besteht aus einer äußeren Schicht, dem Epiblasten, und einer inneren, dem primitiven Endoderm (Abb. 1). Während der Gastrulation wird das primitive Endoderm durch das über den Primitivstreifen einwandernde, definitive Endoderm unter dem Epiblasten ersetzt und in den nicht-embryonalen Teil verdrängt. Das primitive Endoderm wird bei dem Hühnerembryo als Hypoblast (Eyal-Giladi und Kochav, 1976) und bei den Säugern als viszerales Endoderm (Kaufman, 1992) bezeichnet.

Von der Existenz des primitiven Gewebes bei den Amnioten abgesehen ist die Entstehung der drei Keimblätter während der Gastrulation unter den Amphibien und Amnioten prinzipiell ähnlich. Nicht nur die Zellbewegungen und das spätere Schicksal der sich ausbildenden Zellen sind identisch, sondern auch die Expression zahlreicher konservierter Gene unterstützt die Homologisierung der oben angeführten Gewebe zwischen den unterschiedlichen Wirbeltierembryonen. So exprimieren die dotterreichen Zellen am anterioren Rand des eingeschobenen Endoderms im Frosch und die Zellen des anterioren, definitiven Endoderms des Huhns und der Maus das Homeoboxgen *XHex* und den sezernierten Faktor Cerberus (Bouwmeester et al.,

1996; Newman et al., 1997; Belo et al., 1997; Thomas et al., 1997; Biben et al., 1998; Shawlot et al., 1998; Thomas et al., 1998). Die Expression der Homeoboxgene *Lim1* und *Gooseoid*, des Forkheadgens *HNF3b* und der sezernierten Proteine Chordin und Noggin ist dagegen charakteristisch für die Zellen der dorsalen Blastoporenlippe (Frosch) bzw. der Spitze des Primitivstreifens (Huhn und Maus) und der prächordalen Platte nach deren Einwanderung (Harland und Gerhart, 1997; Piccolo et al., 1996; Zimmermann et al., 1996; zusammengefaßt in Beddington und Robertson, 1999).

1.3 Das Konzept des Organisators

Auf der Suche nach den regulativen Mechanismen, die die Entwicklung eines Wirbeltierembryos steuern, sind verschiedene „organisierende Zentren“ identifiziert worden. Bei diesen Zentren handelt es sich um spezialisierte Zellen, die durch die Aussendung von induktiven Signalen den Aufbau des Embryos gestalten (Harland und Gerhart, 1997; Pearse und Tabin, 1997). Das bekannteste und zuerst beschriebene derartige Zentrum ist der „Organisator“ der Amphibienembryonen, der während der Gastrulation für die Zellen aller drei Keimblätter, des Ektoderms, des Mesoderms und des Endoderms, schicksalsbestimmend ist (Spemann, 1931). Der Organisator hat für das Ektoderm zwei wesentliche Auswirkungen. Unter dem Einfluß des Organisators unterteilt sich zum einen das Ektoderm zunächst in einen zentralen, neuralen und einen peripheren, nicht-neuralen Teil. Der erste bringt das spätere zentrale Nervensystem hervor, während der zweite sich zur Epidermis entwickelt. Im Übergangsbereich beider Regionen entstehen später die Neuralleistenzellen (s.u.). Darüber hinaus ist der Organisator auch an der Regionalisierung des Ektoderms beteiligt, bei der das neurale Ektoderm in das Vorder-, das Mittel- und das Hinterhirn sowie in das Rückenmark untergliedert wird (Harland und Gerhart, 1997).

Der Organisator der Amphibien besteht aus den Zellen der dorsalen Blastoporenlippe (Spemann und Mangold, 1924; Abb. 1). Diese Zellen können einen kompletten, sekundären Embryo induzieren, wenn sie in einen Wirtsembryo transplantiert werden (Spemann und Mangold, 1924). Der transplantierte Organisator differenziert dabei selbst wie unter normalen Bedingungen in den endodermalen Vorderdarm und in axiales Mesoderm (prächordale Platte und Notochord). Das induzierte, neurale Gewebe besteht jedoch aus rekrutierten und umprogrammierten Zellen des Wirtsembryos (zusammengefaßt in Harland und Gerhart, 1997). Die prächordale Platte, die aus der dorsalen Blastoporenlippe hervorgeht, behält einen Teil der induktiven Fähigkeiten des Organisators. Sie kann anteriore, neurale Strukturen wie das Vorderhirn im Transplantationsexperiment induzieren und wird daher auch als Kopforganisator bezeichnet (Niehrs, 1999). Das anteriore Endoderm verfügt nicht über eine derartige

Eigenschaft (Bouwmeester et al., 1996). Die Zellen des Notochords, die von der dorsalen Blastoporenlippe nach den Zellen der prächordalen Platte einwandern, wie auch die dorsale Blastoporenlippe nach dem Auswandern der Zellen der prächordalen Platte induzieren dagegen Neuralgewebe von posteriorer Identität und werden aus diesem Grund auch als Rumpforganisator (anteriores Notochord) und Schwanzorganisator (posteriores Notochord) bezeichnet.

Das klassische Spemannsche Organisatorexperiment wurde in anderen Spezies zur Überprüfung der Allgemeingültigkeit des Konzeptes für andere Wirbeltierembryonen wiederholt. In allen untersuchten Wirbeltierembryonen wurden dabei vergleichbare organisierende Strukturen identifiziert, so z. B. das embryonale Schild des Fischembryos (Shih und Fraser, 1996) und der Knoten des Hühner- (Waddington, 1932; Gallera, 1971; Dias und Schoenwolf, 1990; Storey et al., 1992), des Maus- sowie des Kaninchenembryos (Beddington, 1994; Waddington, 1936; Waddington, 1937). Die Transplantation eines jungen Knotens aus dem Hühnerembryo in die extraembryonale Region eines Hühnerembryos führt zur Ausbildung eines kompletten, sekundären Neuralsystems mit anterioren und posterioren Identitäten, während ein älterer Knoten, aus dem die prächordalen Mesodermzellen bereits ausgewandert sind, nur posteriores Neuralgewebe induziert (Gallera, 1971; Dias und Schoenwolf, 1990; Storey et al., 1992). Die Transplantation des prächordalen Mesoderms, das aus dem Knoten unter das anteriore Ektoderm wandert, ergibt wie beim Frosch die Induktion von Vorderhirngewebe, während das anteriore Notochord neurales Gewebe von Mittel- und Hinterhirncharakter induziert (Hara, 1961; Storey et al., 1992; Izpisua-Belmonte et al., 1993; Pera und Kessel, 1997; Streit et al., 1997; Knoetgen et al., 1999b; Pera et al., 1999).

Die geringe Größe des Knotens verhinderte für lange Zeit die Überprüfung des Organisationskonzeptes für den Mausembryo. Die ersten erfolgreichen Transplantationen ergaben, daß der Knoten aus den Mäuseembryonen eine sekundäre Achse induzierten, der allerdings anteriore Strukturen fehlten (Beddington, 1994; Tam et al., 1997; Tam und Steiner, 1999). Die Transplantationen wurden allerdings in die Region des zukünftigen Hinterhirns und des Rückenmarks durchgeführt, die schon unter dem Einfluß von posteriorisierenden Signalen gestanden hat (Muhr et al., 1999). Aus diesem Grund könnte das auf das Transplantat reagierende Gewebe nicht mehr die Kompetenz gehabt haben, um anteriore Strukturen auszubilden (Beddington, 1994). Die Abwesenheit der anterioren Identitäten in den Organisatorexperimenten bei der Maus ist daher entweder auf das Fehlen des anterioren Signals oder aber auf die eingeschränkte Kompetenz an der Implantationsstelle zurückzuführen. Die erste Möglichkeit gewann an Bedeutung, als eine Reihe von Experimenten auf die Existenz eines vom klassischen Organisator unabhängigen „Kopforganisators“ im anterioren, primitiven Endoderm der Maus hindeutete (zusammengefaßt in Beddington und Robertson, 1998). Diese

Ergebnisse unterstützten die Idee, daß das anteriore, primitive Endoderm der Maus die kopfororganisierenden Qualitäten des Organisator übernommen haben könnte (Bouwmeester und Leyns, 1997).

1.4 Die Induktion des Vorderhirns in Säugetierembryonen

Die Rolle des anterioren, primitiven Endoderms bei der Induktion der Vorderhirnanlage im Mausembryo ist durch eine Reihe von Experimenten untersucht worden. Die mechanische Ablation des anterioren, primitiven Endoderms an kultivierten Mausembryonen verhinderte die Expression des anterioren Neuralplattenmarkers *Hesx-1/Rpx* und verringerte die Größe der anterioren Neuralfalten (Thomas und Beddington, 1996). Bei genauerer Analyse stellte sich zudem heraus, daß viele Gene, die im klassischen Organisator und dessen Derivat, der prächordalen Platte, exprimiert sind, überraschenderweise schon vor der Ausbildung des Primitivstreifens in einer unabhängigen Domäne im anterioren, primitiven Endoderm der Maus gefunden worden (*Dkk-1*, *HNF3 β* , *Gsc*, *FGF8*, *Lim1*, *Otx2*, *Nodal*; Ang et al., 1994; Shawlot und Behringer, 1995; Filosa et al., 1997; Varlet et al., 1997; Glinka et al., 1998; Tsang et al., 1999). Auch die definitiven endodermalen Marker *Hex* und *Cer-1* sind zusätzlich auch im anterioren, primitiven Endoderm von Maus (Thomas et al., 1998; Belo et al., 1997) exprimiert. Die Homeoboxgene *Hesx1/Rpx* und *Otx2* sind nicht nur in der anterioren Neuralplatte und dem prächordalen Mesoderm, sondern ebenfalls auch im anterioren, primitiven Endoderm der Maus exprimiert (Ang et al., 1994; Hermes et al., 1996; Thomas und Beddington, 1996; Belo et al., 1998; Thomas et al., 1998).

Die genetische Inaktivierung von *Hesx1/Rpx*, *Lim1*, *Otx2*, *HNF3 β* oder *Nodal* führt zwar zu schweren Kopfmißbildungen (Weinstein et al., 1994; Acampora et al., 1995; Matsuo et al., 1995; Shawlot und Behringer, 1995; Ang et al., 1996; Varlet et al., 1997; Dattani et al., 1998), da jedoch all diese Gene sowohl im anterioren, primitiven Endoderm als auch im Knoten oder dessen Derivaten exprimiert werden, bleibt der zelluläre Ursprung dieses Defekts ungeklärt. Andere Experimente untersuchten die Rolle des anterioren, primitiven Endoderms direkter: In chimären Mäusen, deren primitives Endoderm vorwiegend aus *Nodal* *-/-* oder *Otx2* *-/-* Zellen, während der Rest des Embryos aus normalen Zellen bestand, fehlten ebenfalls die anterioren Kopfstrukturen (Varlet et al., 1997; Rhinn et al., 1998). Die gezielte Inaktivierung des Gens *Cripto* führte zum Verlust des Primitivstreifens und deswegen weder zur Ausbildung eines Knotens noch zur Bildung des definitiven Endoderms oder des axialen Mesoderms. Dennoch bildeten die mutierten Embryonen anteriore, neurale Strukturen aus, obwohl das Ektoderm nur von primitivem Endoderm unterlegen ist (Ding et al., 1998). Allerdings stehen die Ergebnisse der genetischen Inaktivierung des Gens *Wnt3* im Widerspruch zu diesen Experimenten. Obwohl diese Mutation die Entwicklung des Knotens behindert und gleichzeitig die des

anterioren, primitiven Endoderms unangetastet läßt, führt sie zum Verlust der anterioren, neuralen Strukturen (Liu et al., 1999).

Mögliche Induktionen der Vorderhirnanlage im Amniotenembryo:

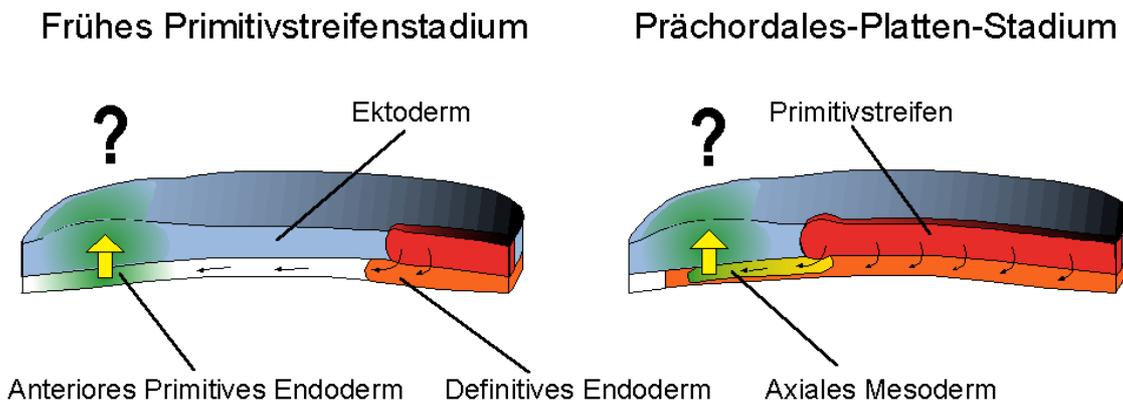


Abb. 3: Die Induktion der Vorderhirnanlage kann im Embryo der Amnioten auf zwei unterschiedlichen Geweben beruhen. Zum einen könnte das anteriore, primitive Endoderm zu Beginn der Gastrulation Signale aussenden (gelber Pfeil links) und dadurch die Anlage des Vorderhirns im anterioren Ektoderm initiieren (grün). Zum anderen können die induzierenden Signale aber auch von dem axialen Mesoderm, das während der Gastrulation einwandert, ausgehen (gelber Pfeil rechts).

Für die Säuger stellt sich daher die Frage, ob und inwieweit die Induktion der Vorderhirnanlage vom klassischen Organisator getrennt und vom anterioren, primitiven Endoderm übernommen worden ist. Die induktiven Signale können einerseits ausschließlich vom anterioren, primitiven Endoderm ausgehen oder andererseits zusätzlich zum anterioren, primitiven Endoderm durch den Organisator bzw. dessen Derivat, der prächordalen Platte, wiederholt werden (Abb. 3).

Die Rolle des anterioren, primitiven Endoderms scheint innerhalb der Gruppe der Amnioten unterschiedlich zu sein. Beispielsweise ist die Expression des in der anterioren Neuralplatte exprimierten Homeoboxgens der ANF Klasse zwischen dem Säuger- und dem Hühnerembryo unterschiedlich (Kazanskaya et al., 1997). Während das Hühnergen *GANF* nicht im anterioren, primitiven Endoderm exprimiert ist (Knoetgen et al., 1999b), zeigt das orthologe Gen *Hesx-1/Rpx* der Maus und des Kaninchens bereits vor der Gastrulation eine deutliche Expressionsdomäne im anterioren, primitiven Endoderm (Thomas und Beddington, 1996; persönliche Mitteilung von C. Viebahn). Daher war zu Beginn dieser Arbeit ungeklärt, ob die Auftrennung des Organisators eine generelle Eigenschaft der Amnioten ist oder ob sie ausschließlich für die Säuger zutrifft. In dem ersten Teil dieser Arbeit wurde daher den Fragen nachgegangen, ob die Säuger am Beispiel der Kaninchenembryonen das primitive Endoderm als ein dem Organisator vergleichbares Signalzentrum etabliert haben und ob der „Kopfororganisator“ dabei exklusiv ins

anteriore, primitive Endoderm übertragen worden ist oder ob er durch den klassischen Organisator rekapituliert wird. Außerdem sollte überprüft werden, ob die Auftrennung des Organisators ein für alle Amnioten gültiges Phänomen ist, das diese klar von den Amphibien abgrenzt und in evolutiver Hinsicht von Bedeutung ist.

1.5. Die Entstehung der Neuralleiste

Unter dem Einfluß des Organisators unterteilt sich das Ektoderm des Hühnerembryos zunächst in zwei Regionen. Der zentrale/mediale Teil entwickelt sich während der Gastrulation wie oben beschrieben zur Neuralplatte, die sich während der Neurulation einrollt und sich zum Neuralrohr, dem Vorläufer des zentralen Nervensystems, entwickelt (Couly und Le Douarin, 1987; siehe Abb. 4). Der äußere/distale Teil des Ektoderms entwickelt sich zum Oberflächenektoderm, das nach dem Einrollen und Abschnüren des Neuralrohrs, den gesamten Embryo als Epidermis umgibt. Der Übergangsbereich zwischen dem später neuralen und dem später epidermalen Ektoderm erfährt in der weiteren Entwicklung ein besonderes Schicksal. Er bringt die sogenannten Neuralleistenzellen hervor, die sich nach dem Schließen des Neuralrohrs aus dem Epithel des dorsalen Ektoderms lösen und durch den Embryo zu wandern beginnen (LaBonne und Bronner-Fraser, 1999). Diese Zellen entwickeln sich unter anderem zum peripheren Nervensystem, zu Melanozyten sowie zu kraniofaszialen Knochen- und Knorpelzellen (Le Douarin, 1982).

Während der Entwicklung des Ektoderms sind verschiedene Gene in dem intermediären Bereich des Ektoderms, das später die Neuralleistenzellen hervorbringt, exprimiert. Der sezernierte Faktor der TGF β -Familie *BMP4* und die Homeoboxgene *MSX1* und *DLX5* sind die Gene, die zuerst am Rand der Neuralplatte exprimiert werden (Liem et al., 1995; Pera et al., 1999; Selleck und Bronner-Fraser, 1995; Streit und Stern, 1999a). Die Expression dieser Gene bleibt auch nach der Neurulation im dorsalen Teil des Neuralrohrs bestehen. Zu Beginn der Neurulation werden der Transkriptionsfaktor *PAX3* und das Zelladhäsionsprotein *Cadherin-6b* in den sich erhebenden Neuralfalten transkribiert (Goulding et al., 1991; Nakagawa und Takeichi, 1995). Während *Pax3* allerdings auch nach dem Auswandern der Neuralleistenzellen im dorsalen Neuralrohr exprimiert wird, wird das *Cadherin-6b* nur von Neuralleistenzellen vor ihrem Auswandern exprimiert. Der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *SLUG*, der Helix-Loop-Helix-Repressor *ID2* und das Glykoprotein *NOELIN-1* werden dagegen sowohl von noch nicht-wandernden Neuralleistenzellen als auch von wandernden exprimiert (Nieto et al., 1994; Martinsen und Bronner-Fraser, 1998; Barembaum et al., 2000). Nach dem Auswandern der Neuralleistenzellen exprimieren sie den HMG-Transkriptionsfaktor *SOX10* (Cheng et al., 2000)

bzw. ein Teil von ihnen das Zelladhäsionsprotein *Cadherin-7*. Nachdem die Neuralleistenzellen über das Neuralrohr hinausgewandert sind, weisen sie das Epitop HNK-1 auf ihrer Zelloberfläche auf (Nakagawa und Takeichi, 1995; Bronner-Fraser, 1986; Vincent und Thiery, 1984).

Entwicklung des Ektoderms im Hühnerembryo

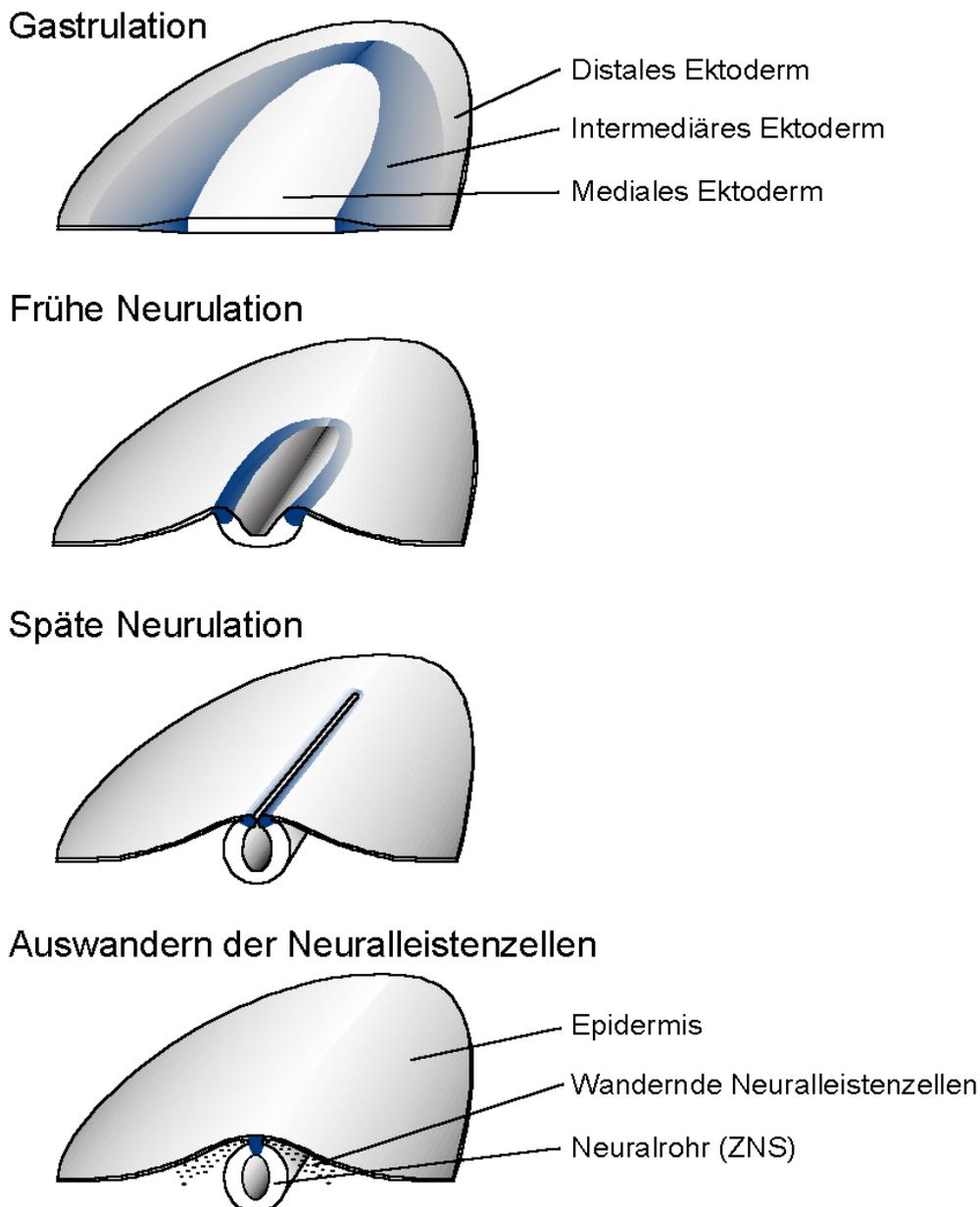


Abb. 4: Schematische Darstellung der Entwicklung des Ektoderms im Hühnerembryo. Während der Gastrulation wird das Ektoderm zunächst in zwei verschiedene Regionen unterteilt. Der zentrale, mediale Teil wird zur Neuralplatte und der periphere, distale Teil zum nicht-neuralen Ektoderm. Das mediale Ektoderm verdickt sich und rollt sich während der Neurulation zum Neuralrohr, dem Vorläufer des zentralen Nervensystems, ein. Das distale Ektoderm umhüllt nach der Neurulation den gesamten Embryo und entwickelt sich zur späteren Epidermis. Der intermediäre Teil des Ektoderms (blau) zwischen dem nicht-neuralen und neuralen Ektoderm bildet während der Neurulation die Neuralleiste, die dorsale Kante der Neuralfaltens. Die Zellen der Neuralleiste wandern nach dem Schließen des Neuralrohrs aus dem Ektoderm.

Die Rolle einiger dieser Gene bei der Differenzierung der Neuralleistenzellen ist durch eine Reihe von Überexpressions- und Genverlustexperimenten untersucht worden. In Mäusen bewirkt die gezielte Verlustmutation des Gens *MSX1* ebenso wie die Mutation des Gens *Pax3* den Verlust von Derivaten der Neuralleistenzellen (Foerst-Potts und Sadler, 1997; Franz, 1990; Epstein et al., 1991; Tremblay et al., 1995). Allerdings scheint *PAX3* nicht unmittelbar an der Differenzierung der Neuralleistenzellen beteiligt zu sein, da die Neuralleistenzellen *in vitro* ohne eine Expression von *Pax3* differenzieren können (Bang et al., 1997). Das sezernierte Protein BMP4 kann in Explantaten von Neuralplatten die Differenzierung von Neuralleistenzellen auslösen (Liem et al., 1995). Unklar ist allerdings, ob *in vivo* BMP4 als Signal aus dem nicht-neuralen Ektoderm oder aus dem dorsalen Neuralrohr agiert (LaBonne und Bronner-Fraser, 1999). Die Überexpression des Gens *SLUG* in Froschembryonen führt zu einer Vergrößerung der Expressionsdomänen von Neuralleistemarkern (LaBonne und Bronner-Fraser, 1998), und die funktionelle Inaktivierung von *SLUG* durch Gegenstrang-Oligonukleotide im Hühnerembryo verhindert die normale Entwicklung von Neuralleistenzellen (Nieto et al., 1994). Die Gene *ID2* und *NOELIN-1* können durch Überexpression mit Hilfe von rekombinanten Viren im Hühnerembryo ektodermale Zellen in der Nähe der epidermal-neuralen Grenze in Neuralleistenzellen umprogrammieren (Barembaum et al., 2000; Martinsen und Bronner-Fraser, 1998). Die Überexpression von Cadherinen in Hühnerembryonen mit Hilfe rekombinanter Viren zeigt, daß für ein Auswandern der Neuralleistenzellen ein Wechsel in der Expression der Zelladhäsionsproteine *Cadherin-6b* und *Cadherin-7* notwendig ist (Nagakawa und Takeichi, 1998).

Bisher ist jedoch nicht bekannt, wie die genannten Gene bei der Ausbildung der Neuralleistenzellen aktiviert werden und ob untereinander Abhängigkeiten zwischen ihnen bestehen. In dem zweiten Teil der vorgestellten Arbeit werden daher ein im Rahmen der Arbeit identifiziertes Gen, *Cresto*, und der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *SLUG* auf ihre Fähigkeit hin untersucht, inwieweit sie in Überexpressionsexperimenten im Hühnerembryo transfizierte Zellen in Neuralleistenzellen umprogrammieren können und welche der angeführten Gene dabei aktiviert werden.

2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Aufklärung von Prozessen, die an der Entwicklung des Ektoderms der Wirbeltierembryonen beteiligt sind. Zwei unterschiedliche Fragestellungen wurden bearbeitet. Zum einen sollte mit Hilfe von Transplantationsexperimenten der zelluläre Ursprung des organisierenden Zentrums, das für die Induktion der Vorderhirnanlage verantwortlich ist, ermittelt werden. Die dabei identifizierten Zentren des Kaninchen- und des Hühnerembryos sollten sowohl untereinander als auch mit dem am besten untersuchten Wirbeltierembryo, dem Frosch *Xenopus laevis*, verglichen werden, um Aussagen über die Konservierung der Induktion der Vorderhirnanlage unter den Wirbeltierembryonen treffen zu können. Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein neu identifiziertes Gen, *Cresto*, charakterisiert, das an der Differenzierung des Ektoderms im Hühnerembryo in die Neuralleistenzellen beteiligt zu sein schien. In Überexpressionsexperimenten sollte die Rolle des Gens und des ebenfalls an der Entstehung der Neuralleistenzellen beteiligten Zink-Finger-Transkriptionsfaktors *SLUG* analysiert und verglichen werden, um Aussagen über eine genetische Aktivierungskaskade, die zur Differenzierung von Neuralleistenzellen führt, treffen zu können.

Material und Methoden

1. Verwendete Plasmide, Organismen und Zellen

1.1 Plasmide

Zur Klonierung wurden die Plasmide Bluescript II KS + (Stratagene) und pTracer-CMV2 (Invitrogen) verwendet. Für die In-situ-Hybridisierung wurden die folgenden, tabellarisch aufgeführten cDNA-Fragmente benutzt (Tab. 1).

Gename	Restriktionsenzym	RNA Polymerase	Quelle
GANF	SmaI	T3	Knoetgen et al., 1999b
OTX2	EcoRI	T3	Bally-Cuif et al., 1995
KROX20	EcoRI	T3	Sham et al., 1993
GBX2	XhoI	T3	Niss et al., 1998
CNOT1	EcoRI	T7	Stein et al., 1995
CH-T	BamHI	T7	Kispert et al., 1995
HOXB1	HindIII	T7	Guthrie et al., 1992
SOX2	XbaI	T7	Rex et al., 1997
SOX3	BamHI	T7	Rex et al., 1997
SOX10	SacI	T7	Cheng et al., 2000
SLUG	BamHI	T7	Nieto et al., 1994
ID2	NcoI	SP6	Martinsen und Bronner-Fraser 1998
BMP4	BamHI	T3	Schultheiss et al., 1995
BMP2	HindIII	T3	Schultheiss et al., 1995
DLX5	BamHI	T7	Pera et al., 1999
MSX1	EcoRV	T7	Streit und Stern, 1999a
PAX3	BamHI	T3	Goulding et al., 1993
CAD7	BamHI	T3	Nakagawa und Takeichi, 1995
CAD6B	SpeI	T7	Nakagawa und Takeichi, 1995
Cresto	ClaI	T7	Knoetgen et al., eingereicht

Tab. 1: Übersicht der verwendeten cDNA-Fragmente. Das zur Linearisierung des Plasmids verwendete Restriktionsenzym, sowie die zur Synthese der RNA eingesetzte Polymerase sind angegeben.

1.2 Organismen und Zellen

1.2.1 Bakterien

Für die Klonierung von Plasmiden wurde der *E.coli* Stamm DH5 α benutzt (Hanahan, 1985).

1.2.2 Embryonale Hühnerfibroblasten

Primäre embryonale Hühnerfibroblasten wurden in tiefgefrorenem Zustand von Thomas Böttger zur Verfügung gestellt (Böttger, 1999).

1.2.3 Hühnerembryonen

Die befruchteten Hühnereier der Rasse White Leghorn wurden von der Firma Lohmann Tierzucht (Cuxhaven) bezogen und in einem Brutschrank (Kleinmotorbrüter, W. Ehret, Emmendingen) bei 38°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60% bis zu dem gewünschten Entwicklungsstadium entsprechend Hamburger und Hamilton (Hamburger und Hamilton, 1951) inkubiert.

1.2.4 Kaninchenembryonen

Weibliche Kaninchen der Rasse New Zealand White wurden in einem superovulierten und besamten Zustand von dem Züchter Lammers (Euskirchen) erworben. Die Embryonen wurden am Tag 6,0 bzw. 7,0 nach der Befruchtung entnommen.

2. Isolierung von Nukleinsäuren

2.1 Aufreinigung von bakterieller Plasmid DNA

Die Präparation von bakterieller Plasmid DNA erfolgte nach dem Qiagen Plasmid Aufreinigungsprotokoll. Alle verwendeten Plasmide verliehen den transformierten Bakterien eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin, so daß zum selektiven Kultivieren der plasmidtragenden Bakterien stets LB-Medium (1% (w/v) Bacto-Tryptone (Gibco BRL), 0,5% (w/v) Bacto-Hefe Extrakt (Gibco BRL), 1% (w/v) NaCl in Wasser (Millipore)) mit 50 μ g/ml Ampicillin verwendet wurde. Zur Aufreinigung der Plasmid DNA wurden die Qiagen Systeme (MINI, bis 10 μ g, MAXI, bis 1 mg und MEGA, für bis zu 5 mg Plasmid DNA) eingesetzt. Die Plasmid DNA, die bei der Elektroporation der Hühnerembryonen (siehe 7.3) verwendet wurde, wurde im Anschluß an das Qiagen Protokoll noch zweimal mit je einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v) extrahiert. Dann wurde die DNA einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) ausgeschüttelt und nach Zugabe von einem Zehntel

Volumen Natriumazetatlösung (3 M, pH 5,2) mit 2,5 Volumen Ethanol ausgefällt. Das Pellet wurde in 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet und dann in PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄ in Wasser (Millipore), pH 7,0) mit einer Endkonzentration von 5 µg/µl aufgenommen.

2.2 Aufreinigung von DNA- oder RNA-Sonden

Die radioaktiv markierten DNA-Moleküle, die als Sonden für die Hybridisierung der cDNA Banken dienen, bzw. mit Digoxigenin oder Fluoreszein markierte RNA-Moleküle für die In-situ-Hybridisierung wurden mit Hilfe von Sephadex-Gelfiltrationssäulen (ProbeQuant G-50, Amersham-Pharmacia) von freien Nukleotiden gereinigt.

2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe und Hühnerfibroblasten

Die Gewinnung von Gesamt-RNA aus Hühnergewebe erfolgte nach der Einzelschrittmethode von Chomczynski (Chomczynski und Sacchi, 1987) mit Hilfe des „Micro RNA Isolation Kits“ (Stratagene). Die Embryonen wurden dazu aus dem Ei präpariert und in PBS überführt. Die gewünschten Gewebeteile wurden dann mit einer gebogenen Insektennadel und einer Wolframnadel isoliert (Insektennadeln: 0,1 mm Durchmesser, Länge 12 mm, Wolframdraht: 0,125 mm Durchmesser, PLANO, Marburg) und mit einer Mikropipette in ein in flüssigem Stickstoff gekühltes Eppendorfgefäß überführt. Zur Gewinnung von RNA aus embryonalen Hühnerfibroblasten wurden diese auf einer 5,3 cm Schale nach der Transfektion (siehe 6.3) bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden sie in 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA, Gibco BRL) von der Kulturschale abgelöst und mit 1 ml Kulturmedium (siehe 6.2) versehen. Dann wurden sie in einem 2 ml Eppendorfgefäß in einer Tischzentrifuge bei 1600 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die pelletierten Zellen wurden unmittelbar nach der Zentrifugation in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zum Aufschluß der Zellen und zur Inaktivierung aller Proteine, insbesondere der RNA abbauenden Enzyme, wurde eine denaturierende Lösung (4 M Guanidiniumisothiocyanat, 20 mM Natriumzitat, 0,5% Sarkosylat, 100 mM 2-Merkaptoethanol) direkt zu dem tiefgefrorenen Probenmaterial gegeben. Nach dem Auftauen wurde das Gewebe durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Das Volumen der Proben wurde mit Hilfe einer Mikropipette abgeschätzt. Das Homogenat wurde dann durch Zugabe von einem Zehntel Volumen Natriumazetatlösung (2 M, pH4,0) angesäuert und durch Zugabe von einem

Volumen Phenol und einem Fünftel Volumen Chloroform-Isoamylalkohol Gemisch extrahiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation bei 10000 xg getrennt und die anschließende Präzipitation der RNA durch Zugabe von einem Hundertstel Volumen Glykogen-Lösung (20 mg/ml) als Trägermaterial verbessert. Die wäßrige Phase wurde mit einem Volumen Isopropanol versetzt und die RNA bei 10000 xg innerhalb von 30 min pelletiert. Das Pellet wurde in 75%igem Ethanol gewaschen. Die Reinheit und die Konzentration der präparierten RNA wurde am Spektralphotometer überprüft.

2.4 Elektrophorese und Elektroelution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden zur Analyse ihrer Größe oder zu ihrer Präparation in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden entsprechend der erwarteten DNA-Fragmentgrößen 1 bis 1,8%ige Agarosegele mit TBE Puffer (89 mM Tris-Borat, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0) mit etwa 10 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Zum Auftragen wurden die Proben mit einem Fünftel ihres Volumens an Probenpuffer (0,125% (w/v) Bromphenol Blau, 25% (w/v) Ficoll, 100 mM EDTA) versetzt und nach dem Anlegen einer konstanten Spannung von 1 bis 7 V/cm aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch Anregung mit UV-Licht (Wellenlänge 258 nm) analysiert. Um die Beschädigung der DNA zu verringern, wurde bei präparativen Gelen UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm verwendet. Die DNA-Fragmente wurden aus präparativen Agarosegelen elektrophoretisch eluiert. Dazu wurden im Anschluß an die Elektrophorese die zu isolierenden DNA-Banden unter Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch überführt. Je nach Größe des ausgeschnittenen Agarosestückes wurden 500 µl bis 1000 µl 0,5x TBE in den Dialyseschlauch gegeben und beide Enden mit Gefrierbeutelklammern verschlossen. Anschließend wurde für 15 bis 20 min eine Spannung von 8 V/cm angelegt. Darauf wurde die Polung für weitere 30 s vertauscht und anschließend der Puffer aus dem Dialyseschlauch in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde nach Zugabe von einem Zehntel Volumen Natriumazetatlösung (3 M, pH 5,2) und 1 µl Glykogenlösung (20 mg/ml) mit einem Volumen Isopropanol gefällt und bei 10000 xg für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einem halben Volumen an 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 15 bis 30 µl Wasser aufgenommen.

3. Modifizierung von Nukleinsäuren

Die verwendeten Techniken und Methoden basieren soweit nicht anders beschrieben auf Sambrook et al., 1989.

3.1 Restriktionsverdau

Für analytische Restriktionsverdaue wurden 500 ng bis 1 µg DNA mit 10 U Restriktionsenzym innerhalb von 2 h geschnitten und anschließend auf einem Agarosegel ausgewertet. Für präparative Verdaue wurden 10 µg DNA mit 100 U Restriktionsenzym für 4 h inkubiert.

3.2 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Mit Restriktionsenzymen geschnittene Vektoren wurden zur Verhinderung der Religation vor der Ligation von DNA-Fragmenten dephosphoryliert. Dazu wurden die geschnittenen Vektoren zunächst aufgereinigt (Nukleotid Removal Kit, Qiagen) und dann mit Hilfe des Enzyms Alkalische Phosphatase innerhalb von 30 min bei 37°C dephosphoryliert (1 U Intestinale Phosphatase für 20 pmol Vektor, Roche).

3.3 Erzeugung von glatten Enden bei DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente mit 5'-überhängenden Enden (bis zu 5 µg) wurden mit Hilfe des Klenow-Enzyms (2,5 U) in Gegenwart von dNTPs (50 µM) im T4-DNA-Polymerase Puffer (50 mM TrisHCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) für 30 min bei 37°C zu glatten DNA-Enden aufgefüllt.

DNA-Fragmente mit 3'-überhängenden Enden (bis zu 5 µg) wurden mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase (1 U) in Gegenwart von dNTPs (50 µM) im T4-DNA-Polymerase Puffer für 20 min bei Raumtemperatur zu glatten DNA-Enden abgebaut.

3.4 Klonierung von doppelsträngigen, synthetischen DNA-Oligonukleotiden

Bei verschiedenen Klonierungsschritten wurden komplementäre, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide mit einer Größe von 18 bis 40 Nukleotiden (NAPS, Göttingen oder Eurogentec, Belgien) verwendet. Zwei komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide wurden dabei auf eine Konzentration von 100 pmol/µl mit Wasser (Millipore) eingestellt und dann bei Raumtemperatur zu gleichen Verhältnissen gemischt. Mit Hilfe der Polynukleotidkinase (PNK, Roche, Mannheim) wurden die Oligonukleotide innerhalb von 30 min bei 37°C an den 5'-Enden phosphoryliert (Tab. 2). Die phosphorylierten Oligonukleotide wurden mit dem Nukleotid-

Removal-Kit von Qiagen mit einer Ausbeute von etwa 50 % aufgereinigt und in 30 μl mit einer Endkonzentration von etwa 0,8 pmol/ μl eluiert.

doppelsträngiges Oligonukleotid 50 pmol/ μl	1 μl
10x PNK Puffer (500 mM TrisHCl pH 8,2, 100 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM Spermidin)	6 μl
1 mM ATP	1,5 μl
Wasser (Millipore)	46,5 μl
10 U/ μl PNK	5 μl
Gesamtvolumen	60 μl

Tab. 2: Ansatz zur Phosphorylierung von Oligonukleotiden.

3.5 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (1 U, Promega oder Roche) in einem Volumen von 10 μl im Ligationspuffer (30 mM TrisHCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP). Dazu wurden 25 ng bis 50 ng des dephosphorylierten Vektors mit einem 3 bis 10 fachen Überschuß an phosphoryliertem DNA-Fragment zugegeben und über Nacht bei 16°C inkubiert. Falls synthetische Oligonukleotide in einen Vektor ligiert wurden, wurden diese in einem hundertfachen Überschuß gegenüber dem Vektor eingesetzt.

3.6 DNA-Konstrukte

3.6.1 Konstruktion des eukaryontischen Expressionsvektors pCMV3

Der Vektor für die cDNA-Bank mußte den folgenden Kriterien gerecht werden. Zum einen sollte er eine gerichtete Klonierung der cDNA ermöglichen. Zum anderen sollte von dem Vektor unmittelbar Gegenstrang-RNA für die In-situ-Hybridisierung synthetisiert werden können. Schließlich sollte der Vektor auch die Eigenschaften eines eukaryontischen Expressionsvektors haben, um die klonierte cDNA sofort im Hühnerembryo überexprimieren zu können (siehe 7.3). Als Ausgangsvektor für einen derartigen Vektor diente das Plasmid pTracer-CMV2 (6212 Nukleotide, Invitrogen). Dieser Vektor enthielt zwei eukaryontische Promotoren, den Promotor des Cytomegalo-Virus (CMV) und den Promotor des Elongationsfaktors 1 α (EF-1 α), gefolgt von den Polyadenylierungssequenzen des Rinderwachstum-

hormons (BGHpA) bzw. des SV40 Virus (SV40pA). Der EF-1 α Promotor kontrollierte die Expression eines GFP-Zeocin-Resistenz-Fusionsproteins. Der EF-1 α Promotor, die Sequenz des Fusionsproteins und das Polyadenylierungssignal SV40 pA wurden aus dem Vektor entfernt. Dazu wurde der pTracer-CMV2 Vektor mit den Restriktionsenzymen StuI und PvuII geschnitten, religiert und so die Sequenz von Nukleotid 1683. bis 4222. entfernt. Das daraus resultierende Plasmid wurde pCMV2 genannt und umfaßte 3672 Nukleotide.

Der pCMV2 Vektor wurde dann um zwei Schnittstellen für das Restriktionsenzym SfiI in der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Vektors erweitert. Dazu wurde er mit dem Restriktionsenzym BstXI geschnitten und doppelsträngige Oligonukleotide für die beiden SfiI-Schnittstellen hineinligiert. Die Orientierung des doppelsträngigen Oligonukleotids im Vektor wurde durch Sequenzierung der MCS überprüft. Der daraus hervorgehende Vektor wurde pCMV2-Sfi genannt.

Die beiden SfiI Schnittstellen wurden mit dem folgenden doppelsträngigen Oligonukleotid in den Vektor eingefügt.

SfiI A

SfiI B

TCGGCCATTACGGCCTGCAGGATCCGGCCGCCTCGGCCCAGT
AGCCGGTAATGCCGGACGTCCTAGGCCGGCGGAGCCGGGTCA

Um später von den klonierten cDNAs Gegenstrang-RNA für die In-situ-Hybridisierung gewinnen zu können, wurde das Plasmid pCMV2-Sfi um einen T7 Promotor erweitert. Dazu wurde es mit den Restriktionsenzymen NotI und XbaI geschnitten und doppelsträngige Oligonukleotide für den T7 Promotor mit Überhängen für die NotI und XbaI Schnittstellen hineinligiert. Der Expressionsvektor wurde nun pCMV3 genannt (Abb. 5).

Der T7-Promotor wurde mit dem folgenden doppelsträngigen Oligonukleotid in den Vektor eingefügt.

NotI-Überhang T7-Promotor XbaI-Überhang

GGCCGCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAT
CGAGAGGGATATCACTCAGCATAATAGATC

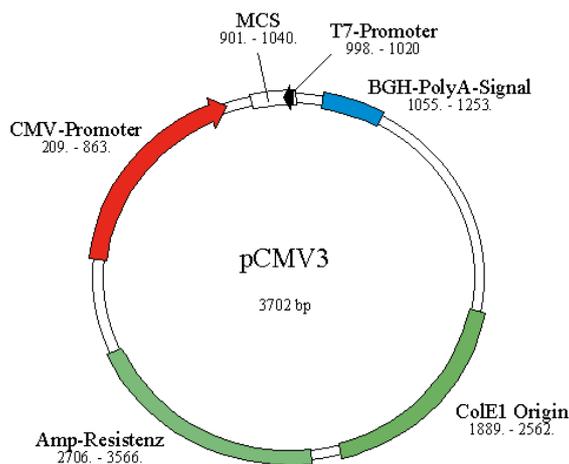


Abb. 5: Schematische Darstellung des Vektors pCMV3. Der eukaryontische CMV-Promotor ist in rot, das eukaryontische BGH-Polyadenylierungssignal in blau, die bakterielle Ampicillin-Resistenz in hellgrün, die bakterielle Replikationssequenz in dunkelgrün und der T7-Promotor zur Erzeugung der Gegenstrang-RNA in schwarz dargestellt.

In den pCMV3 ligierte cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe der folgenden Primer sequenziert: Der CMV-Vorwärts-Primer (CGC-AAA-TGG-GCG-GTA-GGC-GTG) bindet aufwärts der MCS (769-789). Der pCDNA-Primer (TAG-AAG-GCA-CAG-TCG-AGG) bindet abwärts der MCS (1052-1069).



Abb. 6: Übersicht der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Vektors pCMV3 mit Restriktionsschnittstellen von Base 901 bis einschließlich 1040.

3.6.2 DNA-Konstrukte des Gens *Cresto*

3.6.2.1 Deletionsmutanten des Gens *Cresto*

Mit Hilfe der PCR (siehe 3.12.3) und spezifischen Primern (siehe Tab. 3) wurden ausgehend von dem in dieser Arbeit identifizierten Gen *Cresto* die Deletionsmutanten Cresto A, Cresto B und Cresto C erstellt (zur Übersicht Abb. 18) und diese zuerst in den Vektor pBSII kloniert. Nachdem die Konstrukte sequenziert worden waren, wurden sie in den Vektor pCMV3 kloniert. Das DNA-Konstrukt Cresto C erstreckte sich von dem kompletten, nicht-translatierten 5'-

Bereich des Gens *Cresto* über das Startcodon bis einschließlich des für die 90. Aminosäure kodierenden Codons, an das sich ein Stopcodon anschloß. Die beiden anderen Deletionsmutanten wurden am 5'-Ende mit einer Restriktionsschnittstelle für das Enzym EcoRI versehen. Nach der Klonierung der Deletionsmutanten in den Vektor pBSII wurden sie mit dem Restriktionsenzym EcoRI und ClaI geschnitten. Die ClaI Schnittstelle wurde wie unter 3.3 beschrieben zu einem glatten Ende modifiziert. Dann wurde das DNA-Fragment der Deletionsmutante in den Expressionsvektor für *Cresto*, pCMV-Cresto, ligiert, der zuvor mit EcoRI und NotI geschnitten und dessen NotI Schnittstelle wie unter 3.3 beschrieben in ein glattes Ende überführt worden war. Das Gen *Cresto* besitzt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRI beginnend mit dem G des Startcodons. Dadurch wurden die Deletionsmutanten Cresto A, die die 37. bis 90. Aminosäure des Proteins Cresto umfaßte, und Cresto B, die die 85. bis 165. Aminosäure des Proteins Cresto einschloß, mit den ersten drei Aminosäuren des Proteins Cresto fusioniert (Abb. 18 in gelb). Auch die Deletionsmutanten Cresto A und Cresto B verfügten daher über den gleichen nicht translatierten 5'-Bereich und über die gleichen ersten drei Aminosäuren.

DNA-Konstrukt	Primer
Cresto A	aufwärts GAATTCCATGATTCAGCCTTCTGCAAAAGGT abwärts TCATTGAATGACATCATCTGTATTCTC
Cresto B	aufwärts GAATTCCACAGATGATGTCATTCAAGCT abwärts TCACCCTGTTAGCCTCTCAATCAT
Cresto C	aufwärts GCGTGCGTTACTTCAGTGATC abwärts wie bei Cresto A

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Primer zur Erzeugung der Deletionsmutanten Cresto A, B und C. Die angegebene Sequenz ist immer vom 5'- zum 3'-Ende angegeben.

3.6.2.2 DNA-Konstrukte für ein Fusionsprotein aus GFP und Cresto

Es wurden verschiedene DNA-Konstrukte zur Fusion des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) und Cresto hergestellt. Dabei wurde die kodierende Sequenz des GFPs aus dem Vektor pTracer-CMV2 (Invitrogen; Prasher et al., 1992) bzw. des modifizierten GFPs (EGFP, engl. enhanced green fluorescent protein) aus dem Vektor pIRES-EGFP (Clontech; Cormack et al., 1996; Yang et al., 1996; Haas et al., 1996) verwendet. Die folgenden Konstrukte wurden erstellt.

3.6.2.2.1 Cresto-GFP

Die kodierende Sequenz des GFPs aus dem Vektor pTracer wurde mit den Restriktionsschnittstellen ClaI und NotI mit Hilfe der PCR (siehe 3.12.3) und entsprechenden Primern versehen (ClaI-GFP-NotI, siehe Tab. 4). Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit glatten Enden in einen mit BamHI geschnittenen und mit Klenow-Enzym behandelten Vektor pCMV3 kloniert. Das Gen *Cresto* wurde in gleicher Weise mit einer Restriktionsschnittstelle für ClaI am 3'-Ende als Ersatz für das Stopkodon versehen (Cresto-ClaI, siehe Tab. 4) und wie oben in den Vektor pCMV3 ligiert. Anschließend wurden beide Vektoren mit den Restriktionsenzymen ClaI und NotI verdaut und das Fragment ClaI-GFP-NotI in den Vektor pCMV3-Cresto-ClaI ligiert.

DNA-Konstrukt	Primer
ClaI-GFP-NotI	aufwärts AAATCGATATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAGAACTTTTC abwärts TTGCGGCCGCTTAATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCAGT
Cresto-ClaI	aufwärts GCGTGCGTACTTCAGTGATCTGATGAATTCCA abwärts ATCGATGTAATTTCCACTGAAGCAAGATCTGATAC
GFP-ClaI	aufwärts ATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACT abwärts ATCGATTTAATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCAGT
ClaI-Cresto-NotI	aufwärts AAATCGATATGAATTCCAAAATGAAACAAAGCCTGAAT abwärts TTGCGGCCGCTCAGTAATTTCTTCACTTGAAGCAAGATCTGA
KpnI-EGFP-ClaI	aufwärts GGTACCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT abwärts ATCGATCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGAT

Tab. 4: Übersicht der Primer für das Fusionskonstrukt aus GFP und Cresto.

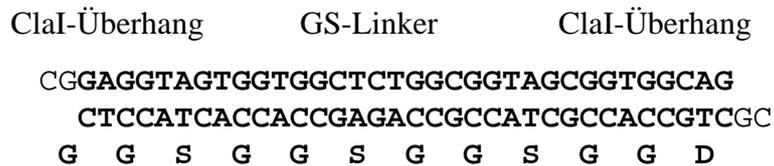
3.6.2.2.2 Cresto-HA-GFP

Das Konstrukt Cresto-GFP wurde mit ClaI verdaut und ein Hämagglutinin-Linker (Rizzuto et al., 1995) mit Hilfe des folgenden doppelsträngigen Oligonukleotids in die Schnittstelle ClaI ligiert. Die durch das Oligonukleotid kodierten Aminosäuren sind unter der Nukleotidsequenz angegeben.

ClaI-Überhang HA-Linker ClaI-Überhang
CGGCTATGATGTTCTGATTATGCAAGCTTAGG
CGATACTACAAGGACTAATACGTTCTGAATCCGC
G Y D V P D Y A S L G

3.6.2.2.3 Cresto-GS-GFP

Das Konstrukt Cresto-GFP wurde mit ClaI verdaut und ein (GGS)-Linker mit Hilfe eines doppelsträngigen Oligonukleotids in die Schnittstelle ClaI ligiert. Die durch das Oligonukleotid kodierten Aminosäuren sind unter der Nukleotidsequenz angegeben.

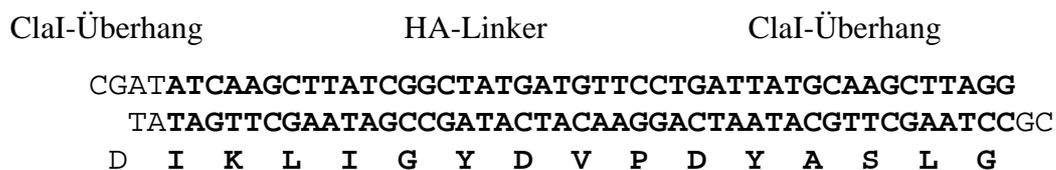


3.6.2.2.4 GFP-Cresto

Zunächst wurde die kodierende Sequenz für GFP aus dem Vektor pTracer mit Hilfe der PCR (Primer siehe Tab. 4) mit einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym ClaI anstelle des Stopcodons am 3'-Ende versehen (GFP-ClaI). Dann wurde GFP-ClaI mit glatten Enden in den Vektor pCMV3, der zuvor mit dem Enzym BamHI geschnitten und mit dem Enzym Klenow aufgefüllt worden war, ligiert (pCMV-GFP-ClaI). Mit Hilfe der PCR wurde das Fragment ClaI-Cresto-NotI erstellt (Primer siehe Tab. 4). Das Fragment wurde mit den beiden Restriktionsenzymen ClaI und NotI verdaut und in den auf dieselbe Weise geschnittenen Vektor pCMV-GFP-ClaI ligiert.

3.6.2.2.5 EGFP-HA-Cresto

Die kodierende Sequenz des EGFPs aus dem Vektor pIRES-EGFP wurde mit den Restriktionschnittstellen KpnI und ClaI mit Hilfe der PCR und entsprechenden Primern versehen (KpnI-EGFP-ClaI, Primer siehe Tab. 4). Die Sequenz der Schnittstelle ClaI ersetzte das Stopkodon des EGFPs. Dann wurde das Konstrukt GFP-Cresto (3.6.2.2.4) mit den Enzymen KpnI und ClaI verdaut und das auf dieselbe Weise verdaute Fragment KpnI-EGFP-ClaI ligiert. Dieses Konstrukt wurde dann ClaI verdaut und ein Hämagglutinin-Linker mit Hilfe eines doppelsträngigen Oligonukleotids in die Schnittstelle ClaI ligiert. Die durch das Oligonukleotid kodierten Aminosäuren sind unter der Nukleotidsequenz angegeben.



3.6.2.3 DNA-Konstrukte zur Fusion von Cresto mit Myc- bzw. His-Epitop

Das DNA-Konstrukt Cresto-ClaI (3.6.2.2.1) wurde mit einem Myc- bzw. einem His-Epitop am 3'-Ende versehen. Dazu wurde Cresto-ClaI mit dem Restriktionsenzym ClaI und NotI verdaut und spezifische doppelsträngige Oligonukleotide für die Epitope wie unter 3.4 beschrieben in die Schnittstelle ligiert. Die durch das Oligonukleotid kodierten Aminosäuren sind unter der Nukleotidsequenz angegeben.

ClaI-Überhang	Myc-Tag	NotI-Überhang
CGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTGA		
TTGTTTTTGAGTAGAGTCTTCTCCTAGACACTCCGG		
E Q K L I S E E D L *		

ClaI-Überhang	His-Tag	NotI-Überhang
CGATCATCATCACCATCACCATTGA		
TAGTAGTAGTGGTAGTGGTAACTCCGG		
D H H H H H H *		

3.7 Konstruktion von cDNA Banken aus embryonalen Hühnergewebe

Um bisher unbekannte Gene, die an der Musterbildung des Hühnerembryos beteiligt sind, identifizieren zu können, wurden aus embryonalem Hühnergewebe cDNA-Expression-Banken angelegt. Bei der Herstellung dieser Banken mußte berücksichtigt werden, daß das Ausgangsmaterial nur in geringer Menge zur Verfügung stand. Außerdem sollte vor allem cDNA in voller Länge gewonnen werden und diese gerichtet kloniert werden. Darüber hinaus sollte eine einfache Subtraktion die Isolierung von entwicklungsbiologisch relevanten Genen begünstigen. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurde eine durch die Polymerase-Kettenreaktion (siehe 3.12) amplifizierte und gerichtet klonierte cDNA-Bank mit Hilfe eines modifizierten „SMART cDNA Library Construction Kits“ (Clontech) hergestellt. Dazu wurde 1 µg Gesamt-RNA (siehe 2.3) verwendet. Zur Erststrangsynthese der cDNA wurde die Reverse Transkriptase (MMLV Reverse Transkriptase, Superscript II, Gibco BRL) eingesetzt. Als Primer für diese Reaktion diente ein Oligo-dT-Primer, CDS III (5'-ATTCTAGAGCCGAGGCGGCCG-ACATG-(T)₃₀-N₁N-3'), der spezifisch an die Poly-A-Enden der Boten-RNA (mRNA) hybridisiert und so die Kopie der in der Gesamt-RNA unterrepräsentierten mRNA ermöglicht. Die Fähigkeit der Reverse Transkriptase nach dem vollständigen Kopieren der mRNA in cDNA an

das DNA-Molekül im RNA-DNA-Hybrid Cytodinreste anzuhängen erlaubte, den SMART III Primer über dessen Guanidinreste komplementär zu binden. Anschließend kopierte die Reverse Transkriptase den SMART III Primer an den cDNA Erststrang (engl. Primer Extension). Die Erststrangsynthese lieferte so DNA Kopien der mRNA, die am 3'-Ende die Sequenz des CDS III Primers aufwiesen und sofern sie in ihrer ganzen Länge in cDNA kopiert wurden, am 5'-Ende die Sequenz des SMART III Primers. Unvollständige Kopien der mRNA besaßen nur die CDS III Sequenz am 3'-Ende und nicht die SMART III Sequenz am 5'-Ende und wurden in der nachfolgenden PCR nicht amplifiziert. Da die Sequenz des SMART III Primers des Herstellers ein ATG enthielt, wurde abweichend von dem kommerziellen Protokoll ein modifizierter SMART III Primer (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3') verwendet (Eurogentec). In dessen Sequenz wurde das störende ATG durch ein ACG ausgetauscht, um nach der später erfolgenden Klonierung der cDNAs in einen eukaryontischen Expressionsvektor pCMV3 keine unerwünschte Initiation der Translation innerhalb des 5'-Primers zu ermöglichen. Um ausreichende Mengen an cDNA zu erhalten und komplette cDNA Kopien anzureichern, wurde die cDNA nun in einer PCR amplifiziert. Als spezifische Primer wurden der 5'-PCR Primer (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'), der komplementär zur SMART III Sequenz war, und der CDS III Primer verwendet. 18 bis 20 Zyklen waren bereits ausreichend, um die cDNA so stark zu amplifizieren, daß sie auf einem Agarosegel mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden konnte (Abb. 15). In allen Fällen wurde stets das gleiche Bandenmuster erhalten und diente als Kontrolle für eine gelungene cDNA-Synthese. Anschließend wurde die cDNA in den eukaryontischen Expressionsvektor, pCMV3, kloniert. Dazu wurden die cDNA-Moleküle in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und alle mit einer Länge von mehr als 1000 Nukleotiden aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (siehe 2.4). Dann wurden sie mit dem Restriktionsenzym SfiI in dem 5'- und 3'-Primer, die jedes amplifizierte cDNA-Molekül flankieren, geschnitten. Das Restriktionsenzym SfiI hat eine Erkennungssequenz, die aus zwei Abschnitten, die aus vier Basen bestehen und die um 5 Nukleotide beliebiger Basensequenz von einander getrennt sein müssen (GGCCNNNNNGGCC). Durch einen Verdau mit SfiI konnten dadurch zwei verschiedene Enden entstehen, die zur gerichteten Klonierung der cDNA Moleküle in den Expressionsvektor geeignet waren. Außerdem verringert die Verwendung von einem Restriktionsenzym statt zwei verschiedenen die Wahrscheinlichkeit, daß durch interne Schnittstellen in den zu klonierenden Genen diese ungewollt zerschnitten wurden. Die Ligation der geschnittenen cDNA-Fragmente in den Vektor pCMV3 mußte mit einer besonders hohen Ausbeute geschehen, um bei der

späteren Subtraktion die Selektion von Klonen ohne ein Insert (religierte pCMV3 Vektoren) nicht zu begünstigen. Um den mit dem Restriktionsenzym SfiI an beiden Schnittstellen geschnittenen pCMV3 Vektor sicher von nur einfach geschnittenem Vektor elektrophoretisch trennen zu können, wurde ein pCMV3 Vektor mit einem Insert von 1500 Nukleotiden mit SfiI geschnitten, dephosphoryliert und dann aus dem Gel aufgereinigt. Für die Ligation wurden anstelle der sonst üblichen 50 ng Vektor 400 bis 500 ng des geschnittenen Vektors eingesetzt. Um eine hohe Transformationseffizienz bei der Elektroporation des Ligationsansatzes in die Bakterien zu erreichen, wurde der Ligationsansatz zuvor entsalzt (siehe 4.2). Außerdem wurden kompetente Bakterien, die mit einer Effizienz von mehr als $5 \cdot 10^8$ pro μg Plasmid DNA transformiert werden konnten, verwendet. Die transformierten Bakterien wurden zu je 35000 Kolonien auf 24 mal 24 cm Agarplatten ausgestrichen (15 g Bacto Agar in 1 L LB-Medium, autoklaviert, nach dem Abkühlen auf 50°C mit 2 ml 50 mg/ml Ampicillin versetzt).

3.8 Markieren von RNA-Sonden mit Digoxigenin oder Fluoreszein (Krieg und Melton, 1984)

Zur In-situ-Hybridisierung wurde mit Digoxigenin bzw. Fluoreszein markierte Gegenstrang-RNA verwendet. Die Gegenstrang-RNA wurde nach dem „Run-off“-Prinzip synthetisiert. Dazu wurde zunächst das die cDNA enthaltende Plasmid am 5'-Ende der cDNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Dabei wurden nur Restriktionsenzyme verwendet, die ein 5'-überhängendes Ende erzeugten. Es wurden 10 μg des Plasmids mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (100 U) in einem Ansatz von 100 μl linearisiert. Anschließend wurde der Ansatz mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt (siehe Material und Methoden 2.1). Die ausgefällte DNA wurde 10 μl Wasser (Millipore) aufgenommen. 1 μl der resuspendierten DNA wurde zur Überprüfung der Linearisierung auf ein Agarosegel aufgetragen.

Der Ansatz (Tab. 5) wurde bei 37°C für 2 h inkubiert. Dann wurde er auf 50 μl mit Wasser (Millipore) aufgefüllt und mit Hilfe von Sephadex-Gelfiltrationssäulen von dem Überschuss an nicht eingebauten Nukleotiden bereinigt (siehe 2.2). Ein Zehntel des Ansatzes wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Qualität und Quantität der Synthese zu überprüfen. Die RNA-Sonde wurde bei -20°C gelagert.

linearisiertes Plasmid (1 µg/µl)	1 µl
10 x Transkriptions Puffer (Roche, 400 mM TrisHCl pH 8,0, 60 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 20 mM Spermidin)	2 µl
10 x Digoxigenin oder Fluoreszein RNA labelling mix (Roche, 10 mM ATP, CTP bzw. GTP, 6,5 mM UTP und 3,5 mM Digoxigenin bzw. Fluoreszein-12-UTP)	2 µl
RNasin (100 U/ml; Promega)	1 µl
RNA Polymerase (SP6, T3 oder T7 abhängig vom Promoter des Plasmids)	1 µl
Wasser (Millipore)	13 µl

Tab. 5: Ansatz zur Markierung von RNA-Sonden.

3.9 Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Molekülen

Zur Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Molekülen wurden zwischen 50 ng und 100 ng der aufgereinigten DNA (siehe 2.4) bei 95°C für 10 min denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Hexamernukleotide mit jeder möglichen Sequenz (N₆) dienten als Primer für das Klenow-Fragment, das diese unter Einbau von radioaktiven dCTP innerhalb von 1 h bei 37°C verlängerte (Tab. 6; Multiprime DNA labelling System RPN1601, Amersham-Pharmacia). Die markierte DNA-Sonde wurden mit der G50 Säule von dem Überschuß an nicht eingebauten Nukleotiden bereinigt (siehe 2.2). Der Einbau der radioaktiven Nukleotide wurde in dem L1701 Liquid Scintillation System (Beckman) gemessen. Es wurden spezifische Aktivitäten von $1 \cdot 10^8$ bis $3 \cdot 10^8$ cpm/µg DNA erreicht.

zu markierende DNA	50 ng - 100 ng in 28 µl
(N) ₆ Primer/BSA Mix	5 µl
Klenow Puffer (50 mM TrisHCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT)	10 µl
³² Phosphor-α-dCTP (50 µCi)	5 µl
Klenow-Enzym	1 µl
Wasser (Millipore)	auf 100 µl

Tab. 6: Ansatz zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten.

3.10 Subtraktion von Klonen durch Kolonie-Hybridisierung

Um Gene, die sowohl in der früh - als auch in der spät-exprimierten cDNA-Probe in hohem Ausmaß vorkamen, zu unterdrücken, wurden von der ausplattierten Plasmid-Bank der spät-exprimierten cDNAs Filter gezogen und diese mit der radioaktiv-markierten früh-exprimierten cDNA hybridisiert. Von den Filtern wurde eine Autoradiographie erstellt. Anschließend wurden nur die Klone analysiert, die nach einer Autoradiographie negativ waren. Diese Klone enthielten Gene, die entweder in beiden cDNA-Proben in nur geringer Menge oder aber nur in der späteren cDNA-Probe vorhanden waren. Die Kolonien wurden in einer Dichte von etwa 35000 Kolonien pro 24 cm mal 24 cm Bakterienplatte ausplattiert. Die Klone wurden bis zu einem Koloniedurchmesser von etwa 0,5 mm bei 37°C inkubiert und anschließend für mindestens 1 h bei 4°C gelagert. Es wurden Qiabrane Membranen (Qiagen) auf die Platten aufgelegt und die Position der Membran auf der Platte wurde durch Durchstechen von Membran und Agarplatte mit einer in Tusche geschwärzten Kanüle markiert. Die Membranen wurden nach etwa einer Minute von der Bakterienplatte abgezogen und mit der Bakterienseite nach oben für 4 min auf Filterpapier inkubiert, das mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) getränkt war. Anschließend erfolgte je eine vierminütige Inkubation auf in Neutralisierungslösung getränktem Filterpapier (0,5 M TrisHCl pH 7,4, 1,5 M NaCl) und auf in 2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Natriumzitat, pH 7,0 mit Zitronensäure eingestellt) getränktem Filterpapier. Dann wurden die Membranen getrocknet und für 1,5 h bei 80°C gebacken.

Zur Hybridisierung von radioaktiv markierten DNA-Sonden auf die an die Membranen gebundene DNA wurden die Membranen zunächst für 1 h mit der Prähybridisierungslösung (0,5 M Na₂HPO₄ mit H₃PO₄ auf pH 7 eingestellt, 7% SDS) bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Anschließend wurde die für 5 min bei 95°C denaturierte, radioaktiv markierte DNA Sonde in Prähybridisierungslösung zugegeben und über Nacht bei 65°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen bei 65°C für je 20 min zweimal mit 2 x SSC/0,1 % SDS, einmal mit 1 x SSC/0,1 % SDS bei 65°C für 20 min und einmal mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS gewaschen, um überschüssige und unspezifisch bindende Sonden zu entfernen. Die Membranen wurden in Folie eingeschlagen und in einer Röntgenkassette auf einem XOMAT-Film (Kodak) gelegt. Der Film wurde je nach Stärke des Signals über Nacht bzw. bis zu drei Tagen exponiert.

3.11 cDNA Erststrang-Synthese für die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die reverse Transkription wurde mit dem „First-Strand cDNA Synthesis Kit“ (Pharmacia)

durchgeführt. Dazu wurden 3 bis 5 µg Gesamt-RNA in 20 µl Wasser (Millipore) aufgenommen und anschließend bei 65°C für 10 min denaturiert. Zu dem Reaktionsansatz wurde weiterhin folgendes hinzupipettiert (Tab. 7):

Gesamt-RNA (3 bis 5 µg)	20 µl
Random Hexanukleotid Primer (pd(N) ₆ Primer 0,2µg/ml)	1 µl
DTT (100 mM)	1 µl
Bulk first-strand cDNA Reaction Mix	11 µl

Tab. 7: Ansatz zur cDNA-Synthese.

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Teile des Reaktionsansatzes wurden direkt in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1988) wurde sowohl analytisch zur Orientierungsüberprüfung von DNA-Fragmenten in Vektoren und zur Expressionsanalyse in Form der Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) als auch präparativ zur Herstellung von DNA-Konstrukten und zur Amplifikation der cDNA für die Plasmid-cDNA-Banken verwendet.

3.12.1 Standard Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR zum Nachweis eines DNA-Fragments in einem Vektor bzw. die Überprüfung der Orientierung von klonierten DNA-Fragmenten in Vektoren wurde mit der Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) durchgeführt. Dazu wurden 1 bis 10 pg der Plasmid DNA, 0,4 µM je Primer, 200 µM je Desoxynukleotid, 1 U Taq-Polymerase und entsprechender Puffer (10 mM TrisHCl pH8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) verwendet. Es wurde das folgende Temperaturprofil entweder in einem Mastercycler (Eppendorf) oder in einem Trio-Thermoblock (Biometra) durchfahren (Tab. 8).

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	94°C	3 min
2. Denaturierung	94°C	30 sec

3. Annealing	45°C bis 65°C	30 sec
4. Synthese	72°C	1 min pro kb
5. Endsynthese	72°C	5 min

Tab. 8: Protokoll eine Standard-PCR. Die Schritte 2. bis 4. wurden in der Regel 30 mal wiederholt.

3.12.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Zur Analyse der Genexpression von Markergenen in transfizierten embryonalen Hühnerfibroblasten wurde die RT-PCR angewandt. Dazu wurde aus nicht-transfizierten Kontrollzellen und den mit *Cresto* transfizierten Fibroblasten Gesamt-RNA gewonnen (siehe 2.3) und daraus cDNA synthetisiert (siehe 3.11). Für jeden PCR-Nachweis wurde cDNA von rechnerisch 220 ng der Gesamt-RNA verwendet. Die günstigsten Annealingtemperaturen der verwendeten Primer wurden zunächst näherungsweise berechnet (Baldino et al., 1989) und dann experimentell überprüft und verbessert. Die benötigte Zyklenanzahl wurde für jedes Primerpaar (Tab. 9) ebenfalls empirisch bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel.

GAPDH	aufwärts ACGCCATCACTATCTTCCAG abwärts CAGCCTTCACTACCCTCTTG
SLUG	aufwärts 1. TATCATAACCGCAGCCAGAGA aufwärts 2. CTGCTACCGTCTCCTCTACC abwärts 1. ACTCAGTGTGCTACGCAGCA abwärts 2. CTACGCAGCAGCCAGATTCC
MSX1	aufwärts 1. CTCCAGGAACCTGCTGCTGC aufwärts 2. ACCTTCGACACCGCTTCGGT abwärts 1. AGTAGCATAGAGTCCAACGG abwärts 2. ATCCACCAGGAAGTCTCTCT
DLX5	aufwärts 1. GGCTACTGCTCGCCTACCTC aufwärts 2. AGTACCAGTACGGCATGAAC abwärts 1. CAGCGCCAAGGGATGCTGTA abwärts 2. CCCTCAGTAGATCGTCCCGA
Cresto	aufwärts CAGTGATCTGATGAATTCCAA abwärts CTCCTTGAAGCAAGATCTG

Tab. 9: Übersicht der Primer, die zu dem Nachweis der Genexpression mit Hilfe der RT-PCR verwendet wurden. Als Annealing-Temperatur dienen 55°C für *GAPDH*, 52°C für *Cresto*, 45°C für *MSX1*, für *SLUG* und für *DLX5*.

3.12.3 Herstellung von DNA-Fragmenten mit modifizierter Basenabfolge

Mit Hilfe der PCR wurden unter anderem Restriktionsschnittstellen oder Start- oder Stopcodons für Deletionsmutanten in DNA-Konstrukte eingeführt. Dazu wurden spezifische Primer verwendet, die am 5'-Ende um eine entsprechende Basenabfolge ergänzt worden waren. Derartige PCR-Reaktionen wurden mit der DNA-Polymerase Pwo (aus *Pyrococcus woesei*, Roche) in entsprechendem Puffer (10 mM TrisHCl pH 8,85, 25 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄) durchgeführt. Diese DNA-Polymerase erreicht durch ihre 3'-5' Exonuklease-Aktivität („Proofreading activity“) eine höhere Genauigkeit bei der DNA-Synthese. Außerdem erzeugt die Pwo Polymerase DNA-Doppelstränge mit glatten Enden, die nach einem Phosphorylierungsschritt einfach kloniert werden konnten. Aufgrund der geringeren Prozessivität und Syntheserate wurde die Synthesezeit im Gegensatz zur Standard-PCR auf 2 min pro kb erhöht und 2,5 bis 5 U Enzym verwendet.

3.12.4 Amplifikation des Gens *SLUG* aus cDNA

Das Gen *SLUG* wurde mit Hilfe von spezifischen Primern in voller Länge kloniert. Dazu wurde die cDNA aus den embryonalen Hühnerfibroblasten (siehe 2.3 und 3.11) verwendet. Die Primer wurden nach der in der Datenbank verfügbaren Sequenz des Gens *SLUG* entworfen (Tab. 10). Der erste Primer aus Tab. 10 ist komplementär zu dem 1. bis 24. Nukleotid der in der Datenbank gespeicherten *SLUG* cDNA. Das Startkodon beginnt an Position 12. Der zweite Primer ist komplementär zum 844. bis 866. Nukleotid der *SLUG* cDNA. Das Stopkodon beginnt an Position 818 der cDNA. Für die Amplifikation wurde die Pwo-DNA-Polymerase verwendet (siehe 3.12.3).

SLUG	aufwärts CTGCCTTCAAAATGCCACGCTCCT abwärts GGAGTGGAGACAAATGCATTGAG
------	--

Tab. 10: Übersicht der Primer, die zur Amplifikation des kompletten Gens *SLUG* aus cDNA eingesetzt wurden.

4. Analyse von Nukleinsäuren

4.1 Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen erfolgten als Service durch technische Angestellte der Abteilung Molekulare Zellbiologie mittels des Taq-Dye-Deoxy Terminator Kits (Perkin Elmer-ABI) auf ABI 377 Sequenziergeräten.

4.2 In-situ-Hybridisierung am ganzen Embryo

Die transkriptionelle Aktivität eines Genes wurde zum einen mit Hilfe der RT-PCR (siehe 3.12.2) und zum anderen durch die In-situ-Hybridisierung am ganzen Hühnerembryo nachgewiesen. Die Expression einzelner Gene wurde wie beschrieben analysiert (Wilkinson, 1992). Die gleichzeitige Detektion der Expression zwei verschiedener Gene in einem Embryo wurde wie beschrieben unternommen (Dietrich, 1997). Dabei wurden die Embryonen gleichzeitig mit einer Digoxigenin- und mit einer Fluoreszein-markierten RNA-Sonden (siehe 3.8) hybridisiert, die dann in zwei getrennten Schritten mit Hilfe von Digoxigenin- bzw. Fluoreszein-spezifischen Antikörpern (Roche) detektiert wurden.

Die Hühnerembryonen wurden zunächst in PBS präpariert und in 4 %iger Lösung (w/v) aus Paraformaldehyd (PFA) in PBS über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Embryonen entweder einzeln in Netze in 24-Titerplatten oder zu mehreren in Netze in 6-Titerplatten überführt und durch Umsetzen der Netze durch die unten tabellarisch aufgeführten Schritte geführt. Die Embryonen konnten wahlweise in 100%igen Methanol während der Methanol-Reihe (Tab. 11) bei -20°C für einige Tage oder vor der Hybridisierung im Lagermix (s.u.) für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden. Zur Prähybridisierung, Hybridisierung und den Waschschrinen in der Lösung 1 und 3 wurden die Embryonen mit einem kleinen Löffel in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und dann in einem Thermoblock (Eppendorf) inkubiert. Der Wechsel der Lösung erfolgte durch vorsichtige Abnahme der alten und Zugabe der neuen Flüssigkeit mit einer Mikropipette. Nach dem zweiten Waschen in Lösung 3 wurden die Embryonen zusammen mit der Lösung 3 aus dem Eppendorfreaktionsgefäß in eine 6- bzw. 24-Titerplatte mit 2% BBR in MAB ausgeschüttet.

Die Inkubationsdauer der Behandlung mit Proteinase K wurde mit dem Entwicklungsstadium der Embryonen variiert. Für Entwicklungsstadien jünger als HH7 wurde sie für 1 min durchgeführt und für spätere Stadien auf 3 min verlängert.

Tabellarische Übersicht der Waschschrine und Inkubationen, während insgesamt 5 Tagen (Tab. 11 bis Tab. 15)

PBT	2 x 5 min
25% Methanol in PBT	5 min
50% Methanol in PBT	5 min
75% Methanol in PBT	5 min
100% Methanol	5 min

75% Methanol in PBT	5 min
50% Methanol in PBT	5 min
25% Methanol in PBT	5 min
PBT	2 x 5 min
6% H ₂ O ₂ /PBT	30 min
PBT	3 x 5 min
10 µg/ml ProtK/PBT	1 - 3 min
2 mg/ml Glyzin/PBT	5 min
PBT	2 x 5 min
0,2% Glutaraldehyde/4% PFA/PBT	20 min, 4°C
PBT	2 x 5 min
Optional: 50% Formamid, 5x SSC pH 4,5	Lagern bei -20°C
Prähybridisierungslösung	5 min
Prähybridisierungslösung	1 h, 70°C
Hybridisierungslösung	über Nacht, 70°C

Tab. 11: Übersicht der Waschschritte und Inkubationen am ersten Tag der In-situ-Hybridisierung. (PBT (0,1% Tween-20 in PBS); Prähybridisierungslösung (50 % Formamid, 5 x SSC pH 4,5, 1 % SDS, 50 µg/ml Hefe tRNA, 50 µg/ml Heparin); Hybridisierungslösung (Prähybridisierungslösung mit 1 µg/ml Gegenstrang-RNA (siehe 3.8) je Probe)).

Lösung 1 (50% Formamid, 5x SSC pH 4,5, 1% SDS)	2 x 30 min, 70°C
Lösung 3 (50% Formamid, 2x SSC pH 4,5)	2 x 30 min, 70°C
2% BBR/MAB	waschen
2% BBR/MAB	1 h
20% FCS/2% BBR/MAB	1 h
anti Fluoreszein Antikörper (1:2000) in 20% FCS/2% BBR/MAB	über Nacht, 4°C

Tab. 12: Übersicht der Waschschritte und Inkubationen am zweiten Tag der In-situ-Hybridisierung. (MAB (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5, mit NaOH eingestellt); BBR (Boehringer Blockierungsreagens in MAB, Roche)).

MAB	3 x Waschen
MAB	5 x 1 h
NTMT pH 8,0	Waschen
NTMT pH 8,0	3 x 30 min
Fast Red in NTMT pH 8,0*	45 min bis 5 h
PBT	2 x 10 min
0,1 M Glyzin/HCl pH 2,2	10 min
PBT	5 x 10 min
4% PFA/PBS	über Nacht, 4°C

Tab. 13: Übersicht der Waschschritte und Inkubationen am dritten Tag der In-situ-Hybridisierung. (* Fast Red TR/ Naphtol AS-MX Tabletten (Sigma) in je 1 ml Wasser (Millipore) gelöst (1 mg/ml 4-Chlor-2-methylbenzendiazonium, 0,4 mg/ml 3-Hydroxy-2-naphtholsäure-2,4-dimethylanilidphosphat, 0,15 mg/ml Levamisol, 100 mM TrisHCl pH8,0), vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Spritzenaufsatzfilter (Millipore) von unlöslichen Bestandteilen gereinigt; NTMT pH 8,0 (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM MgCl₂, 1% Tween-20, 2 mM Levamisol)).

PBT	2 x 5 min
MAB	3 x Waschen
MAB	2 x 30 min
2% BBR/MAB	1 h
20% FCS/2% BBR/MAB	1 h
anti Digoxigenin Antikörper (1:2000) in 20% FCS/2% BBR/MAB	über Nacht, 4°C

Tab. 14: Übersicht der Waschschritte und Inkubationen am vierten Tag der In-situ-Hybridisierung.

MAB	3 x Waschen
MAB	5 x 1 h
NTMT pH 9,5	Waschen
NTMT pH 9,5	3 x 30 min

NBT/BCIP in NTMT pH 9,5*	2 bis 24 h, im Dunkeln, mit mehrfachen Lösungswechsel
PBT	2 x 10 min
50 % Glycerin/PBT	1h
80 % Glycerin/PBT	1 h, dann bei 4°C lagern

Tab. 15: Übersicht der Waschschritte und Inkubationen am fünften Tag der In-situ-Hybridisierung. (* 200 µl NBT/BCIP Stammlösung (18,75 mg/ml NBT, 9,4 mg/ml BCIP in 67% DMSO (v/v), Roche) pro 10 ml NTMT pH 9,5, Reaktion vor Licht schützen und Färbelösung alle 3 h wechseln; NTMT pH 9,5 (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl₂, 1% Tween-20, 2 mM Levamisol)).

5. Molekularbiologische Methoden (Sambrook et al., 1989)

5.1 Herstellung von kompetenten Bakterien für die Transfektion durch Elektroporation

Zur Präparation von „elektrokompetenten“ Bakterien wurde eine Vorkultur DH5α Bakterien aus einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 bis 250 rpm) inkubiert. 2,5 ml der Vorkultur wurden in 500 ml LB-Medium überimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Die Kultur wurde 10 bis 15 min auf Eis gekühlt, dann zentrifugiert (15 min, 2000 xg, Sorvall GS-3 Rotor) und das Pellet in 10 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Anschließend wurden 250 bis 500 ml eiskaltes Wasser zugeben, gemischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in der übrigen Flüssigkeit resuspendiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Dann wurde das Bakterienpellet in 10%igem Glycerol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und etwa ein Pelletvolumen 10%iges Glycerin zugeben. Die Bakterien wurden resuspendiert, in 50 µl Aliquots auf Eppendorf-Reaktionsröhrchen aufgeteilt und auf Trockeneis eingefroren. Die Bakterien wurden anschließend bei -80°C aufbewahrt.

5.2 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Zur Transformation der elektrokompetenten Bakterien wurde ein Gene Pulser mit Pulscontroller verwendet (BioRad). Um die Effizienz der Transformation zu erhöhen, wurde der Ligationsansatz vor der Elektroporation entsalzt. Dazu wurde der gesamte Ligationsansatz für 20 min auf einen auf Wasser (Millipore) schwimmenden Filter mit einer Porengröße von 0,025 µm gegeben (Filter VS 0,025 µm, Millipore). Anschließend wurde 1 µl Ligationsansatz zu 50 µl kompetenten Bakterien gegeben und in eine Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand)

überführt. Der Elektroporationsapparat wurde auf eine Spannung von 1,8 kV, eine Kapazität von 25 μ F und einen Widerstand von 200 Ohm eingestellt und der Spannungspuls ausgelöst. Im Anschluß wurden unmittelbar 300 μ l warmes SOC-Medium (20 g/l Tryptone, 5 g/l Hefe Extrakt, 0,5 g/l NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) zugeben und für 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Volumina des Transformationsansatzes auf LB-Ampicillin-Agar Platten (100 μ g/ml Ampicillin) ausplattiert.

6. Kultivierung von embryonalen Hühnerfibroblasten (Morgan und Fekete, 1996)

6.1 Auftauen von embryonalen Hühnerfibroblasten

In flüssigem Stickstoff tiefgefrorene primäre embryonale Hühnerfibroblasten wurden im Wasserbad aufgetaut und im Nährmedium (DMEM mit 1000 mg/l Glucose (Gibco BRL), 10% inaktiviertes fötales Kälberserum (Gibco BRL), 2% Hühnerserum (Sigma), 2 mM L-Glutamin (Gibco BRL), 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin (Gibco BRL)) aufgenommen und für 5 min bei 1000 rpm (170 xg) in einer Labofuge GL (Heraeus) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert, in eine 5,3 cm Zellkulturschale (Greiner) gegeben und diese bei 37°C und 5% CO₂ in einem Zellkulturschrank (Heraeus BBD 6220) inkubiert. Sobald die Zellen eine konfluente Einzelzellschicht bildeten, wurden sie passagiert.

6.2 Passagieren

Von konfluent mit embryonalen Hühnerfibroblasten bewachsenen Zellkulturschalen wurde das Medium abgesaugt und zweimal durch je 4 ml PBS ersetzt. Anschließend wurde das PBS durch 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL, 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA) ausgetauscht und für etwa 3 min bei 37°C bis zum vollständigen Ablösen der Zellen von der Kulturschale inkubiert. Die Proteolyse der Zellen wurde durch Zugabe von 4 ml Medium abgestoppt und die abgelösten Zellen pelletiert (3 min bei 1000 rpm, 170 xg, in einer Labofuge GL, Heraeus). Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und die Suspension auf neue Zellkulturschalen so aufgeteilt, daß die Zellen im Vergleich zur Ausgangskultur drei- bis zehnfach verdünnt wurden.

6.3 Transfektion der embryonalen Hühnerfibroblasten

Die embryonalen Hühnerfibroblasten wurden auf 5,3 cm Platten bis zu einer Dichte von etwa 50 bis 80 % kultiviert. In einem Eppendorfgefäß wurden 88 μ l serumfreies DMEM Medium (Gibco BRL) mit 12 μ l des FuGene Reagenzes (Roche) versetzt. Nach 5 min wurde diese Mischung tropfenweise zu 4 μ l einer 1 μ g/ μ l der zu transfizierenden DNA-Lösung hinzuge-

geben und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach weiteren 15 min wurde die hergestellte Mischung tropfenweise in das Medium der Zellkulturschale gegeben und diese weiter inkubiert.

6.4 Kultivierung der transfizierten embryonalen Hühnerfibroblasten auf Objektträgern

Etwa 7 h nach der Transfektion werden die embryonalen Fibroblasten von den Petrischalen abgelöst (siehe 5.2) und auf Objektträgern („Chamber-Slides“), die zuvor für 1 h mit einer 0,1%igen Gelatine-Lösung beschichtet wurden, ausplattiert.

7. Embryologische Manipulationen

7.1 In-vitro-Kultivierung von Hühnerembryonen (New Kultur)

Die Kultivierung von Hühnerembryonen wurde wie beschrieben (New, 1955, Stern, 1993) durchgeführt. Die bebrüteten Eier wurden mit einer kleinen Schere am stumpfen Ende geöffnet. Das dickflüssige Eiweiß wurde verworfen. Das dünnflüssige Eiweiß wurde in einer Petrischale aufgefangen. Das von der Vitellinmembran umhüllte Eigelb wurde in eine Schale mit Pannett-Compton Saline gegeben (PC-Puffer: 4% (v/v) Stammlösung A und 6% (v/v) Stammlösung B in Wasser (Millipore) (Stammlösung A: 121 g/l NaCl, 15,5 g/l KCl, 10,4 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 12,7 g/l $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ bzw. Stammlösung B: 2,365 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,188 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$); Pannett und Compton, 1924). Mit einer Pasteurpipette wurde die Vitellinmembran von anhaftenden Eiweiß befreit. Das Eigelb wurde so orientiert, daß der Embryo oben auflag. Dann wurde das Eigelb am Äquator mit einer gebogenen Schere aufgeschnitten. Anschließend wurde die Vitellinmembran so vorsichtig vom Eigelb gezogen, daß der Embryo an der Vitellinmembran haften blieb. Die Vitellinmembran wurde mit dem Embryo nach oben auf eine im Puffer liegende Uhrglasschale gelegt. Ein Glasring mit einem Innendurchmesser von 22 mm wurde auf die Vitellinmembran gelegt, so daß der Embryo in der Mitte des Glasring lag. Darauf wurde überschüssiger Puffer und verbliebenes Eigelb mit einer Mikropipette entfernt. Eine 3,5 cm Zellkulturschale wurde mit 4 ml des gesammelten dünnflüssigen Eiweißes gefüllt. Der Glasring wurde nun von dem Uhrglas zusammen mit dem Embryo in die Zellkulturschale überführt. Anschließend wurde der Glasring mit zwei Spateln an der Zellkulturschale festgedrückt. Außerhalb des Glasringes befindliches Eiweiß wurde abgesaugt, und der auf der Vitellinmembran liegende Embryo und die Vitellinmembran wurden von Puffer, Eiweiß und Eigelb befreit. Die Kulturschale wurde in einem 38°C Brutschrank zum gewünschten Entwicklungsstadium inkubiert.

7.2 Transplantationen

7.2.1 Transplantation von Kaninchengewebe in Hühnerembryonen

Das induktive Potential von verschiedenen Zellen aus dem Kaninchenembryo wurde in in-vitro kultivierten Hühnerembryonen analysiert. Zur Gewinnung des primitiven Endoderms wurden die 15 bis 18-Wochen-alten Kaninchen am Tag 6,0 bis 6,5 nach der Besamung bzw. zur Gewinnung von Zellen des Primitivstreifens am Tag 7,0 nach der Besamung durch die Injektion von 450 mg Phenobarbital (Nembutal, Bayer) in die Ohrvene getötet. Die zu diesem Zeitpunkt noch nicht implantierten Embryonen konnten durch Spülen der Uteri mit auf 37°C angewärmten Medium (DMEM, Gibco BRL) ausgespült werden.

Die Kaninchenembryonen im Vorprimitivstreifenstadium (Tag 6,0 bis 6,5 nach der Besamung) wurden in DMEM Medium mit 20% FCS überführt. Der anterioren Pol der embryonalen Scheibe wurde durch Einstechen einer Wolframdrahtnadel in die azelluläre Blastozystenhülle unmittelbar neben der morphologisch sichtbaren anterioren Sichel (siehe Abb. 8 H, Viebahn 1995) markiert. Darauf wurde der Embryo aus der Blastozystenhülle präpariert und mit Hilfe der anterioren Markierung in eine anteriore und in eine posteriore Hälfte zerschnitten. Nun wurde das anteriore oder das posteriore, primitive Endoderm mit Hilfe von Wolframnadeln isoliert, mit Partikeln des wasserunlöslichen roten Farbstoffs Carmin (Sigma) markiert und auf das Blastoderm eines kultivierten Hühnerembryos mit Hilfe einer Mikropipette übertragen. Die Transplantate wurden mit einer gebogenen Insektennadel am anterioren Rand der *Area pellucida* zur *Area opaca* zwischen das primitive Endoderm und das Ektoderm des Hühnerembryos implantiert (siehe Abb. 8 L). Die Hühnerembryonen wurden für 6 bis 10 h inkubiert. Die Knoten bzw. Primitivstreifenstücke der Kaninchenembryonen wurden mit Wolframdrahtnadeln aus den am Tag 7,0 nach der Besamung gewonnenen Embryonen ausgeschnitten, ebenfalls mit Carmin markiert und wie oben in die Hühnerembryonen transplantiert. Die Hühnerembryonen wurden über Nacht für etwa 20 h inkubiert.

7.2.2 Transplantation von Hühnergewebe

Zum Vergleich zu den transplantierten Geweben des Kaninchenembryos (6.2.1) wurden die topologisch identischen Gewebe aus Hühnerembryonen in gleicher Weise transplantiert. Zum einen wurde das anteriore, primitive Endoderm, der anteriore Hypoblast, aus dem Vorprimitivstreifen- (EK XII/XIII) bzw. aus dem mittleren Primitivstreifenstadium (HH3) transplantiert (Abb. 8 A - D). Vor der Entnahme aus den Spenderembryonen wurde das Gewebe durch Mikroinjektion des lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs CM-DiI (chlormethyliertes 1,1'- Dioctadecyl-

3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninchlorat, Cell Tracker, Molecular Probes) markiert. 50 µg CM-DiI wurden zunächst in 10 µl Ethanol gelöst und darauf 1:10 in 0,3 M Saccharose-Lösung verdünnt. Dann wurde mit Hilfe eines Mikroinjektors (Eppendorf Microinjector 5242) das primitive Endoderm des Spenderembryos durch mehrfache Injektion in das Gewebe markiert. Nach der Transplantation konnten die markierten Zellen des Spenderembryos durch Einstrahlung von Licht mit einer Wellenlänge von 550 nm *in vivo* oder auch nach der In-situ-Hybridisierung zur Fluoreszenz (bei 570 nm) angeregt werden.

Der Knoten des Hühnerembryos wurde aus den Stadien HH3+ bis HH4 wie für den Kaninchenknoten beschreiben transplantiert (Abb. 8 E,F; 6.2.1).

7.3 Gen-Transfer in Hühnerembryonen durch Elektroporation

Zur Analyse der Funktion der im Screen identifizierten Genen wurden diese im sich entwickelnden Hühnerembryo überexprimiert. Dazu wurde eine neue Anwendung der Elektroporation eingesetzt (Muramatsu et al., 1997; Itasaki et al., 1999; Momose et al., 1999). Die Hühnerembryonen wurden zunächst in der New Kultur präpariert (6.1). Im Primitivstreifenstadium (HH3 bis HH4) wurde ihnen dann eine konzentrierte Lösung des Expressionsvektors (5 µg/µl in PBS) mit Hilfe einer Mikropipette (Eppendorf Microinjector 5242) injiziert. Dabei wurden einige Nanoliter der Lösung zwischen das Endoderm und das Ektoderm gegeben, so daß sich das Endoderm sichtbar während der Injektion aufwölbte. Auf die Vitellinmembran wurden parallel zum Embryo Filterpapiere (Whatman), die in etwa die Größe der Elektroden hatten, aufgelegt (siehe Abb. 7). Die Platinelektroden wurden so auf diese Filterpapiere aufgesetzt, daß sich die Anode unterhalb und die Kathode oberhalb der Ebene des Embryos befand. Die Embryonen wurden dann einem elektrischen Feld ausgesetzt (90 bis 120 V/cm, fünf Rechteckpulse von je 50 msec Länge, BTX Electro Square Porator T820 mit BTX Enhancer 400). Die Elektrolyse während des Spannungspulses führte neben der Wasserstoffentwicklung an der Kathode und Sauerstoffentwicklung an der Anode auch zur Freisetzung von toxischen Radikalen. Um Schäden am Embryo zu vermeiden, wurden die Elektroden von der New Kultur entfernt und dabei das überschüssige PBS mit einer Mikropipette abgenommen. Die an die Filterpapiere der Elektroden angrenzende *Area opaca* entwickelte sich trotz dieser Maßnahmen in den meisten Fällen nicht weiter und mußte durch neue, trockene Filterpapiere auf der Vitellinmembran fixiert werden, um ein Abrutschen des Embryos von der Vitellinmembran zu verhindern. Der Embryo wurde danach wieder bei 38°C inkubiert.

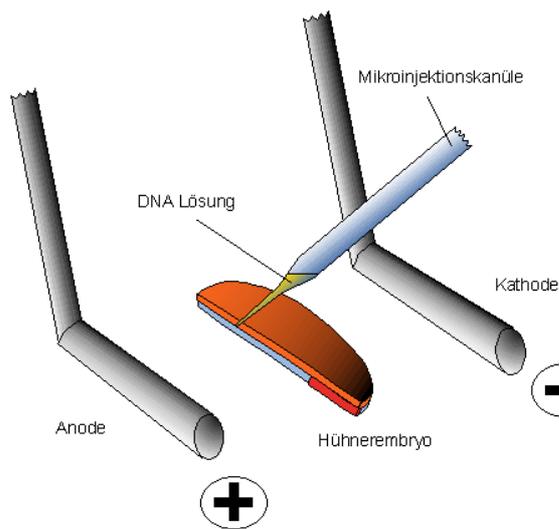


Abb. 7: Schematische Darstellung der Elektroporation von Hühnerembryonen. Der Hühnerembryo wurde mit seiner ventralen Seite nach oben auf der Vitellinmembran kultiviert. Die DNA-Lösung wurde zwischen das Ektoderm (blau) und das Endoderm (orange) an verschiedenen Stellen mikroinjiziert. Zwei Elektroden aus Platin wurden auf beiden Seiten des Embryos platziert und nach der Injektion der DNA-Lösung der Embryo dem elektrischen Feld ausgesetzt. Zur Vereinfachung ist der Embryo sagittal aufgeschnitten dargestellt und die *in vitro*-Kultur nicht gezeigt.

7.4 Gen-Transfer in Explantate

Aus dem ventralen Teil der Neuralplatte im Entwicklungsstadium HH10 wurden mit Hilfe von Wolframdrahtnadeln Stücke isoliert. Zuvor wurde der Embryo mit 1% (w/v) Dispase II (Roche) in PBS behandelt und Mesoderm und Endoderm von der Neuralplatte mit Insektennadeln entfernt. Die Explantate der ventralen Neuralplatte wurden mit einer Mikropipette in PBS zwischen zwei auf eine Petrischale aufgeklebte Netze pipettiert. Zwischen den Netzen befand sich eine PBS-Lösung mit 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ der zu transfizierenden DNA. Die Netze hatten einen Abstand von 2 mm voneinander. Außerhalb der Netze befanden sich eine stabförmige Platinanode und eine punktförmige Platinkathode. Nachdem das Explant zwischen die Netze gegeben worden war, wurden drei Spannungspulse (70 V, drei Rechteckpulse von je 50 msec Länge, BTX Electro Square Porator T820 mit BTX Enhancer 400) appliziert. Anschließend wurden die Explantate mit einer Mikropipette in Nährmedium (DMEM mit 10% FCS, Gibco) überführt und dann in einer Petrischale, die zuvor mit Fibronectin beschichtet wurde (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronectin (F2006, Sigma) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur) im gleichen Medium bei 37°C und 5% CO₂ in einem Zellkulturschrank (Heraeus BBD 6220) kultiviert.

8. Immunhistochemie

Die Fusionsproteine von Cresto mit dem His- bzw. dem Myc-Tag wurden mit Hilfe von kommerziellen monoklonalen Antikörpern detektiert. Dazu wurden die auf den Objektträgern kultivierten embryonalen Hühnerfibroblasten für 1 h in 4%iger PFA-Lösung in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in PBT-Lösung gewaschen und dann für 1 h in 20%

FCS in PBT überführt. Darauf wurden sie über Nacht mit dem monoklonalen Anti-Myc Antikörper (IgG1, R950-25, Invitrogen) bzw. dem monoklonalen Anti-His Antikörper (IgG2b, R930-25, Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:500 in 20% FCS in PBT bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen viermal mit PBT und zweimal mit 20% FCS in PBT für je 20 min gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Maus, Alexa 488, MoBiTec) in einer Verdünnung von 1:2000 in 20% FCS in PBT für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde fünfmal in PBT für je 30 min gewaschen. Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hilfe von DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, 1 µg/ml in PBT).

Ergebnisse

1. Analyse der neuralinduzierenden Fähigkeiten verschiedener Gewebe im Transplantationsexperiment

Um der Frage nachzugehen, von welchen Zellen die Signale zur Ausbildung der anterioren Neuralstrukturen während der frühen Embryonalentwicklung im Wirbeltierembryo ausgehen, wurde das neuralinduzierende Potential verschiedener Gewebetypen aus dem Hühner- und dem Kaninchenembryo in Transplantationsexperimenten untersucht. Das zu analysierende Gewebe wurde aus Hühner- bzw. Kaninchenembryonen isoliert und in Kontakt zu naivem Ektoderm des Hühnerembryos gebracht (Abb. 8 A,C,E,G). Als reagierendes Gewebe wurde das Ektoderm des Hühnerembryos an der Grenze der *Area pellucida* zur *Area opaca*, dem Übergang von embryonalen zum extraembryonalen Bereich im Primitivstreifenstadium ausgewählt (Abb. 8 L). Diese Region des Ektoderms ist zum Zeitpunkt der Transplantation kompetent, in neurales Gewebe umprogrammiert zu werden, wenngleich sie normalerweise zur Epidermis bzw. zum extraembryonalen Ektoderm differenziert (Spratt, 1952; Rosenquist, 1966; Schoenwolf und Sheard, 1990; Garcia-Martinez et al., 1993).

Es wurden zwei prinzipiell unterschiedliche Gewebetypen des Kaninchen- bzw. Hühnerembryos auf ihr neuralinduzierendes Potential untersucht. Zum einem wurde das anteriore, primitive Endoderm analysiert, zum anderen wurde die Spitze des Primitivstreifens, der Knoten, transplantiert. Das primitive Endoderm unterliegt vor dem Beginn der Gastrulation dem anterioren Ektoderm und kommt daher als frühester Kandidat für neuralinduzierende Signale in Betracht. Vom Knoten gehen zum einen direkt neuralinduzierende Signale (Ruiz i Altaba, 1993) aus und zum anderen wandern Zellen des Ektoderms am Knoten ein und bilden das anteriore, definitive Endoderm und später das prächordale Mesoderm, die beide zeitlich nach dem primitiven Endoderm dem anterioren Ektoderm unterliegen und deshalb ebenfalls Kandidaten für das gesuchte Signal waren.

Das anteriore, primitive Endoderm und der Knoten wurden jeweils aus dem Hühner- und aus dem Kaninchenembryo gewonnen und in ihrer induktiven Kapazität auf das naive Ektoderm analysiert. Aus dem Hühnerembryo wurde das anteriore, primitive Endoderm, das dort als der anteriore Hypoblast (ah) bezeichnet wird, aus dem Vorprimitivstreifenstadium (EKXII/XIII, Eyal-Giladi und Kochav, 1976; Abb. 8 A,B) und aus dem frühen Primitivstreifenstadium (HH3, Abb. 8 C,D) isoliert und in einen Wirtsembryo im Primitivstreifenstadium implantiert (HH3 bis HH4, Abb. 8 L). Das anteriore, primitive Endoderm des Kaninchenembryos im Vorprimitivstreifenstadium, das anteriore, viszerale Endoderm (ave), wurde in gleicher Weise manipuliert

(Abb. 8 G,H). Der Knoten des Hühnerembryos (n; Abb. 8 E,F) und der Knoten des Kaninchenembryos (n; Abb. 8 J,K) wurden beide im voll ausgebildeten Primitivstreifenstadium transplantiert. Zur Kontrolle wurde auch der Teil des Primitivstreifens, der sich unmittelbar hinter dem Knoten befindet, transplantiert (pn; Abb. 8 J,K).

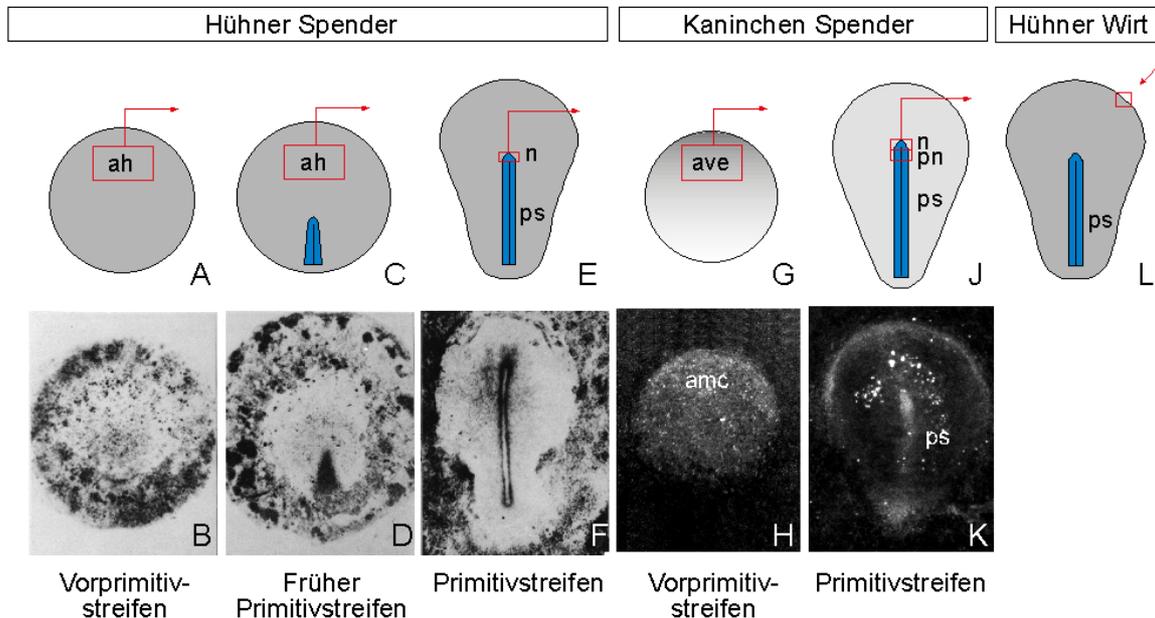


Abb. 8: Übersicht der Spender- und Empfängerembryonen des Transplantationsexperiments zur Analyse der neuralinduzierenden Fähigkeit. (A-D) Im Vorprimitivstreifenstadium (A,B) und im frühen Primitivstreifenstadium (C,D) wurde aus dem Hühnerembryo das anteriore, primitive Endoderm (der anteriore Hypoblast, ah) transplantiert. (E,F) Im Primitivstreifenstadium wurde aus dem Hühnerembryo die Spitze des Primitivstreifens, der Knoten (n), transplantiert. (G,H) Im Vorprimitivstreifenstadium wurde aus dem Kaninchenembryo das anteriore, primitive Endoderm (das anteriore, viszerale Endoderm, ave) transplantiert. Das anteriore Ende des Kaninchenembryos ist in diesem Stadium verdickt und wird auch anteriore Randsichel genannt (amc). (J,K) Im Primitivstreifenstadium wurde aus dem Kaninchenembryo die Spitze des Primitivstreifens, der Knoten (n), und der unmittelbar dahinterliegende Teil des Primitivstreifens (pn) transplantiert. (L) Schematische Darstellung der Implantationsstelle im Hühnerembryo an der anterioren Grenze zwischen der extraembryonalen und embryonalen Region. (B,D,F aus Hamburger und Hamilton, 1951).

Die durch die Transplantate im Hühnerembryo hervorgerufenen Strukturen wurden mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung auf die Expression der folgenden Markergenen untersucht (Abb. 9). Das Homeoboxgen *OTX2* diente als Marker für das Vorderhirn und das Mittelhirn (Bally-Cuif et al., 1995), das Homeoboxgen *GANF* für das anteriore Vorderhirn (Kazanskaya et al., 1997; Knoetgen et al., 1999b), das Homeoboxgen *GBX2* für das anteriore Hinterhirn (für Rhombomere 1 bis 3; Niss und Leutz, 1998), das Homeoboxgen *KROX20* für das posteriore Hinterhirn (für die Rhombomere 3 und 5; Sham et al., 1993) und das Homeoboxgen *HOXB1* für das posteriore Hinterhirn und Rückenmark (posterior vom Rhombomer 3; Guthrie et al., 1992). Das Homeoboxgen *CNOT1* diente als Marker für zwei Regionen, für das dorsale Vorderhirn

(*CNOT1-fb*) und für den Knoten und das Notochord (*CNOT1-n*; Stein und Kessel, 1995). Das T-Box-Gen *CH-T* (*Brachyury*) wurde als Marker für die zukünftigen, mesodermalen Zellen des Primitivstreifens und das Notochord benutzt (Kispert et al., 1995). Mit den HMG-Transkriptionsfaktoren *SOX2* und *SOX3* wurde eine generelle, neurale Identität nachgewiesen (Rex et al., 1997), wobei *SOX3* zu Beginn der Gastrulation auch das gesamte Ektoderm markiert, später jedoch wie *SOX2* auf das neurale Gewebe beschränkt ist.

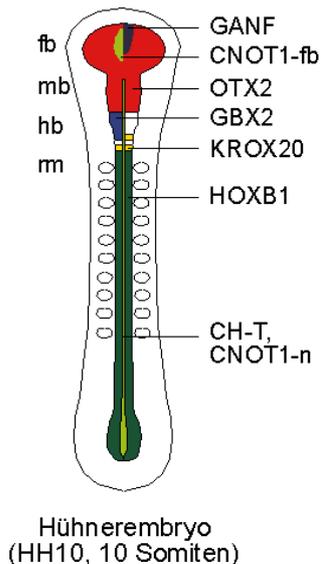


Abb. 9: Schematische Darstellung der Expression der Markergene in einem Hühnerembryo im 10-Somiten-Stadium (HH10). *OTX2* diente als Marker für das Vorder- und das Mittelhirn (rot), *GANF* für das anteriore Vorderhirn (dunkelgrau), *GBX2* für das anteriore Hinterhirn (blau), *KROX20* für das posteriore Hinterhirn (gelb) und *HOXB1* für das posteriore Hinterhirn und Rückenmark (dunkelgrün). *CNOT1* diente als Marker für zwei Domänen, für das dorsale Vorderhirn (*CNOT1-fb*; hellgrün) und für den Knoten und das Notochord (*CNOT1-n*; hellgrün). *CH-T* (*Brachyury*) wurde zum Nachweis der später mesodermalen Zellen des Primitivstreifens bzw. des Notochord verwendet. *SOX2* und *SOX3* dienen als pan-neurale Marker.

1.1 Transplantation des anterioren, primitiven Endoderms

Das anteriore, primitive Endoderm des Hühnerembryos, der anteriore Hypoblast (ah), wurde in 19 Fällen transplantiert, wobei es in 15 Fällen aus dem Vorprimitivstreifenstadium (EKXII/XIII) und in 4 Fällen aus dem mittleren Primitivstreifenstadium (HH3) entnommen wurde (Tab. 16). Da das transplantierte Hühnergewebe nach der Transplantation in den Wirtsembryo integrierte, wurde es vor der Entnahme aus dem Spenderembryo mit dem Fluoreszenzfarbstoff CM-DiI (Molecular Probes) markiert, so daß es im Anschluß an die Inkubation nach Anregung mit Licht (Wellenlänge 550 nm) sichtbar gemacht werden konnte. Die Implantation des anterioren Hypoblasten führte in keinem Fall zu einer Induktion des anterioren Neuralmarkers *GANF* oder zu einer morphologischen Veränderung des überliegenden Ektoderms (Abb. 10 A,E). Das über dem implantierten, primitiven Endoderm liegende Ektoderm wies in allen Fällen eine im Vergleich zur Umgebung unveränderte Morphologie auf.

Das anteriore, primitive Endoderm des Kaninchenembryos, das anteriore, viszerale Endoderm (ave), führte jedoch im gleichen Experiment an der Transplantationsstelle zu der Ausbildung

einer ektoischen Verdickung des benachbarten Ektoderms (Abb. 10 B-D,F-H). Dieses pseudostratifizierte, kolumnare Epithel (Abb. 10 F-H) in Kombination mit der ektoischen Expression des panneuralen Markergens *SOX3* (zu 100%, n = 3, Abb. 10 B,F) wie auch der beiden anterioren Neuralmarker *OTX2* (zu 60%, n = 6, Abb. 10 C) und *GANF* (zu 67%, n = 9, Abb. 10 D) wiesen die induzierte Struktur als anteriore Neuralplatte aus. Allerdings exprimierten die induzierten Strukturen nicht den panneuralen Marker *SOX2* (zu 0%, n = 10), der jedoch auch als Antwort auf starke Neuralinduktoren erst nach 9 h induziert wird (Streit und Stern, 1999b). Darüber hinaus differenzierten diese ektoischen Neuralplatten weder zu Neuralfalten noch zu Neuralrohren aus, sondern blieben auf dem Stand einer Neuralplatte bzw. bildeten sich bei längeren Inkubationszeiten wieder zurück.

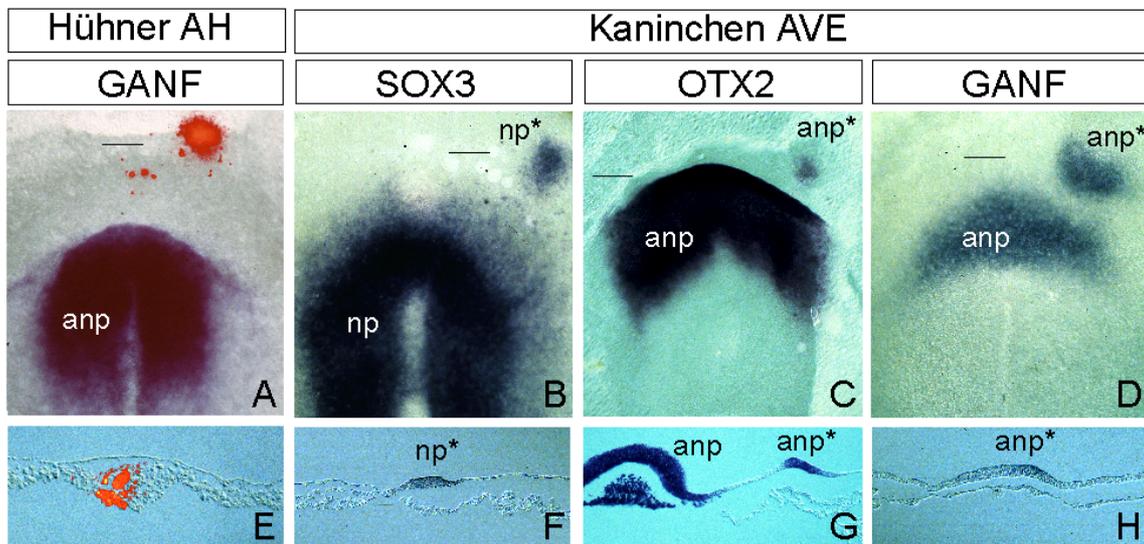


Abb. 10: Vergleich des anterioren, primitiven Endoderms aus dem Hühner- und Kaninchenembryo im Transplantationsexperiment. (A,E) Durch die Implantation von anteriorem Hypoblast aus dem Hühnerembryo (ah) wurde keine Induktion einer ektoischen anterioren Neuralplatte im Empfängerembryo hervorgerufen. Die Expression des Gens *GANF* (blau) ist an der Transplantationstelle nicht induziert und das Ektoderm des Empfängerembryos über den implantierten Zellen nicht verdickt. Die transplantierten Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI markiert (rot). (B-H) Eine Induktion einer ektoischen Neuralplatte (np*) bzw. einer anterioren Neuralplatte (anp*) wurde durch das transplantierte anteriore, viszerale Endoderm des Kaninchenembryos (ave) hervorgerufen. Die ektoische, neurale Verdickung exprimiert die Markergene *SOX3* (B,F), *OTX2* (C,G) und *GANF* (D,H). In den histologischen Schnitten ist die ektoische Verdickung des Ektoderms erkennbar (F,G,H). (Die Ebene der abgebildeten histologischen Schnitte ist durch eine schwarze Linie angedeutet. Neuralplatte (np) bzw. anteriore Neuralplatte des Empfängers (anp); induzierte Neuralplatte (np*) bzw. induzierte anteriore Neuralplatte (anp*)).

	Hühner AH		Kaninchen AVE	
	n=19*		n=27	
OTX2	-		3/5	60%
GANF	0/19	0%	6/9	67%
SOX3	-		3/3	100%
SOX2	-		0/10	0%

Tab. 16: Zusammenfassung der Transplantationen des anterioren, primitiven Endoderms aus dem Hühner- und dem Kaninchenembryo. *Vorprimitivstreifenstadium (EK XII/XIII) n=15, mittleres Primitivstreifenstadium (HH3) n=4.

1.2 Transplantation des Knotens aus dem Hühnerembryo

Das induktive Potential des Hühnerknotens wurde bereits von anderen Autoren intensiv studiert (z.B. Waddington, 1932; Gallera und Nicolet, 1969; Dias und Schoenwolf, 1990; Storey et al., 1992). Als Kontrolle wurden diese Experimente hier zunächst wiederholt. Dabei wurde bestätigt, daß der Knoten aus dem Hühnerembryo im mittleren bis vollständigen Primitivstreifenstadium (HH3+/HH4) eine ektopische Neuralachse induzieren kann, welche sowohl aus anterioren als auch aus posterioren Identitäten besteht (Abb. 11; Tabelle 17). In 79% der Fälle ergab die Transplantation eines Hühnerknotens eine ektopische, morphologische Veränderung (n=24). In fast allen Fällen waren diese ektopischen Neuralachsen positiv für den Vorderhirn- und Mittelhirnmarker *OTX2* (94%, n=16, Abb. 11 A,B,E,F) und den Vorderhirnmarker *CNOT1*-fb (100%, n=6, Abb. 11 C). Der anteriore Marker *GANF* trat mit einer geringeren Häufigkeit von 67% auf (n=6, nicht abgebildet), möglicherweise, weil das Gen *GANF* nur vorübergehend im Vorderhirn exprimiert ist und im hier analysierten Stadium bereits wieder abgeschaltet wird (Knoetgen et al., 1999b). Von den Knotentransplantaten war bekannt, daß sie in notochord-ähnliche Gewebe differenzieren (Dias und Schoenwolf, 1990; Stein et al., 1996). Diese Derivate des Transplantats waren stets positiv für die beiden mesodermalen Marker *CNOT1*-n (100%, n=5, Abb. 11C,G) und *CH-T* (100%, n=5, Abb. 11 D,H). Allerdings wurde die Expression beider Gene *CH-T* und *CNOT1*-n nicht im Ektoderm des Wirtsembryos induziert. Außerdem fand sich kein Anzeichen für eine Deepithelisierung von mesodermalen Zellen aus dem Ektoderm des Wirts an der Implantationsstelle. Dies deutet darauf hin, daß an der Transplantationsstelle die Ausbildung eines Hühnerorganisators, der dann selbst notochord-ähnliche Strukturen aus dem Ektoderm hervorbringt, nicht auftritt, während das transplantierte Knotengewebe entsprechend seinem normalen Schicksal in notochord-ähnliche Strukturen differenziert.

In den meisten Fällen waren die induzierten Achsen Kopf-an-Kopf zu der endogene Achse orientiert, wobei sich zwei unabhängige Köpfe in unmittelbarer Nachbarschaft entwickelten (Abb. 11 A). In einigen Fällen wurden jedoch auch Beispiele für eine entgegengesetzte Orientierung der beiden Achsen gefunden, bei denen die sekundäre *OTX2*-Domäne zur *Area opaca* orientiert war (Abb. 11 B). Da in das mesodermfreie, zukünftig extraembryonale bzw. zum Teil noch epidermale Ektoderm transplantiert wurde, wurde die Ausbildung von Derivaten des Mesoderms wie Somiten nicht beobachtet, die aus einer Umprogrammierung des paraxialen und lateralen Mesoderms hätten resultieren können.

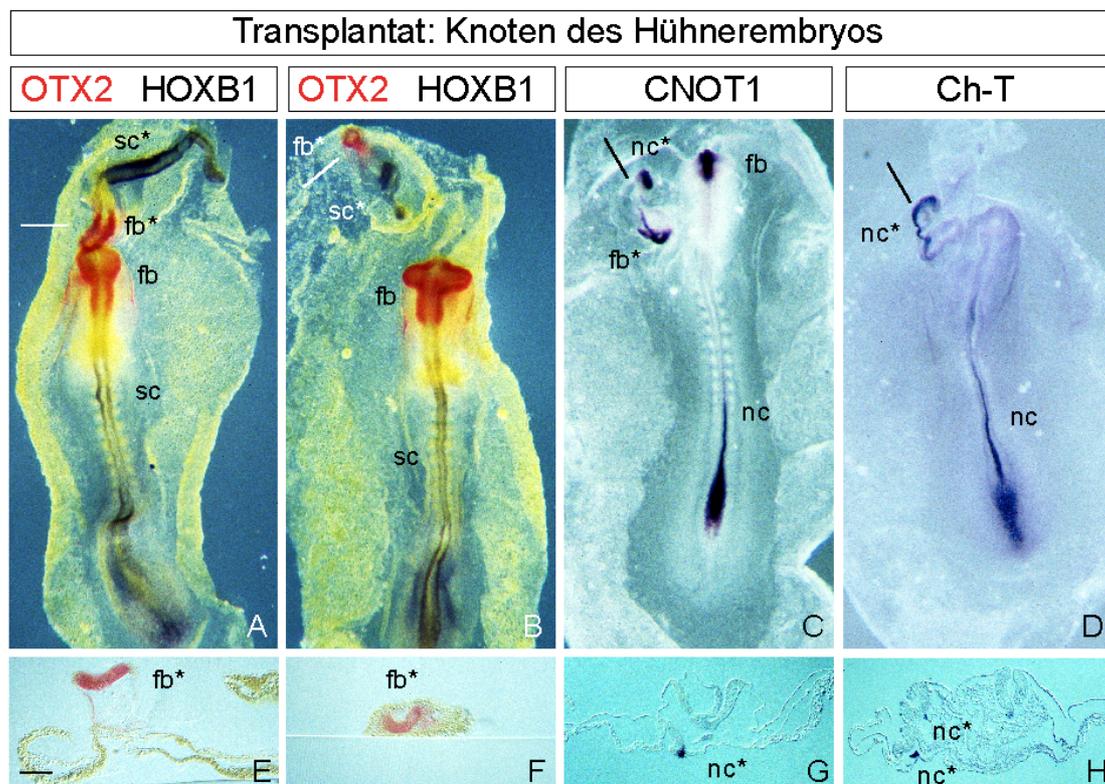


Abb. 11: Induktion einer kompletten Neuralachse durch die Transplantation eines Hühnerknotens aus dem Primitivstreifenstadium. (A-F) Die induzierten Neuralachsen bestanden sowohl aus anterioren Identitäten (Expression des Vorder- und Mittelhirnmarkers *OTX2* in rot) als auch aus posterioren Identitäten (Expression des posterioren Hinterhirn und Rückenmarkmarkers *HOXB1* in blau). In den meisten Fällen waren die Achsen Kopf-an-Kopf orientiert (A). In einigen Fällen fand sich aber auch die entgegengesetzte Orientierung (B). (C-H) Die ektopische Neuralachse exprimierte auch den Vorderhirnmarker *CNOT1*-fb (C). Unter der induzierten Neuralachse fand sich ein Notochord, das *CNOT1*-n und *CH-T* exprimierte (C,G bzw. D,H). In D wurden durch das Transplantat zwei unabhängige Neuralfalten induziert, unter denen jeweils eine notochord-ähnlichen Struktur lag (H).

In A und B sind Embryonen dargestellt, die mit einer Doppel-*in situ*-Hybridisierung auf die Expression von *OTX2* und *HOXB1* untersucht wurden. In C und D sind Embryonen abgebildet, die mit einer einfachen *in situ*-Hybridisierung auf die Expression von *CNOT1* bzw. *CH-T* untersucht wurden. Das Vorderhirn (fb), das Rückenmark (sc) und das Notochord (nc) der Empfängerembryonen sind in der Abbildung markiert. Die entsprechenden ektopischen Strukturen sind mit einem Stern versehen (*). Die Ebene der histologischen Schnitte ist durch eine Linie angedeutet.

	Hühnerknoten		Kaninchen- knoten		Kaninchen anteriorer Primitivstreifen	
	n=24		n=122		n=40	
Ektopische Strukturen	19/24	79%	66/122	54%	28/40	70%
OTX2	15/16	94%	18/23	78%	0/8	0%
GANF	4/6	67%	6/15	40%	0/4	0%
CNOT1-fb	5/5	100%	6/6	100%	0/6	0%
CNOT1-n	5/5	100%	4/6	67%	4/6	67%
GBX2	-		7/7	100%	2/2	100%
KROX20	-		2/6	33%	1/2	50%
HOXB1	5/6	83%	20/28	71%	6/6	100%
SOX3	-		-		-	
SOX2	-		-		-	
Ch-T	5/5	100%	4/12	33%	4/4	100%

CNOT1 wird in zwei unabhängigen Regionen exprimiert: fb: im dorsalen Vorderhirn; n: in einer Domäne um den Knoten.

Tab. 17: Zusammenfassung der Transplantationsexperimente des Knotens und des hinter dem Knoten gelegenen Teils des Primitivstreifens.

1.3 Transplantation des Knotens aus dem Kaninchenembryo

Die Analyse der induktiven Eigenschaften wurde auf den Knoten des Kaninchens ausgedehnt (Abb. 8 J). Da die Kaninchenknoten im Vergleich zu dem anterioren, primitiven Endoderm des Kaninchens eine viel ausgeprägtere Neuralinduktion hervorriefen, wurde die Inkubationszeit der Wirtsembryonen von 10 h auf 20 h verlängert, was den ektopischen Strukturen erlaubte, sich bis in die Neurulationsstadien zu entwickeln. Das transplantierte Kaninchengewebe überlebte aufgrund der für die Hühnerembryonen optimierten Kulturbedingungen wie dem hohen pH-Wert von 9,2 diese Inkubationszeit nicht. Daher konnte es nach der Inkubation nicht wiedergefunden werden, so daß eventuelle Signale unmittelbar nach der Transplantation emittiert worden sein mußten. Aus den Transplantationen von Hühnerknoten ist bekannt, daß das transplantierte Gewebe nur für wenige Stunden vorhanden sein muß, um einen Effekt auf das Ektoderm zu haben (Streit et al., 1998). Der transplantierte Kaninchenknoten konnte daher auch nicht zu den induzierten Achsen beitragen, so daß die bei der Transplantation der Hühnerknoten beobachtete, auffällige Selbstdifferenzierung in notochord-ähnliche Strukturen ausblieb (siehe Ergebnisse 1.2). In den Transplantationsexperimenten führten die Kaninchenknoten in 54% der

Fälle zu einer ektopischen, morphologischen Veränderung (n=122, Tab. 17). Mit großer Häufigkeit wurden Vorderhirnidentitäten induziert, die *OTX2* (78%, n=23, Abb. 12 A,B,M,N) und *CNOT1*-fb (100%, n=6; Abb. 12 O,P) exprimierten. Mit einer etwas verringerten Häufigkeit trat der Vorderhirnmarker *GANF* (40%, n=15, Abb. 12 C) auf. Die ektopischen Neuralachsen entwickelten typische Neuralfalten, die sich teilweise zu Neuralrohren geschlossen hatten (Abb. 12 B,G). Dies und die dorsale Expression von *CNOT1*-fb, deuteten an, daß auch eine ausgeprägte dorso-ventrale Musterbildung, vermutlich durch Faktoren wie Sonic hedgehog, das vom Knoten sezerniert wird (Roelink et al., 1995), erfolgte. Auch der anteriore Hinterhirnmarker *GBX2* (100%, n=7, Abb. 12 E,K) sowie der posteriore Hinterhirnmarker *HOXB1* (71%, n=28, Abb. 12 B,G,L,Q) wurden häufig von den induzierten Strukturen exprimiert. Die Expression des posterioren Hinterhirnmarkers *KROX20* wurde seltener detektiert (33%, n=6, Abb. 12 D,J), was möglicherweise auf den Umstand zurückzuführen ist, daß *KROX20* im Vergleich zu den anderen Markern erst recht spät während der Entwicklung ab dem Stadium HH10 (Sham et al., 1993) exprimiert wird.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die bisher beschriebenen ektopischen Neuralachsen nicht direkt auf neuralinduzierende Faktoren vom transplantierten Kaninchenknoten, sondern sekundär von einem durch den Kaninchenknoten induzierten Hühnerorganisator herrührten, wurden die beiden mesodermalen Marker *CNOT1*-n und *CH-T* in die Untersuchung eingeschlossen. Bei beiden Genen handelt es sich um Marker für zukünftige und frühe mesodermale Zellen, die für den Knoten typisch sind. Das Gen *CH-T* wurde in 33% der Fälle aktiviert (n=12, Abb. 12 N,S), wohingegen eine Expression des Gens *OTX2* in 78% der Fälle beobachtet wurde (n=23). Das Verhältnis dieser Häufigkeiten demonstriert, daß die Vorderhirnmarker zu einem deutlich höheren Prozentsatz induziert wurden, ohne daß gleichzeitig die Expression von *CH-T* beobachtet wurde. Diese Beobachtung wurde auch durch die Auswertung der Wirtsembryonen mit Hilfe der Doppel-in-situ-Hybridisierung unterstützt. Dabei wurde die Expression von *OTX2* in Abwesenheit des mesodermalen Markers *CH-T* gefunden (n=4, Abb. 12 M,R). Darüber hinaus wurde die Vorderhirnexpressionsdomäne des Gens *CNOT1* (*CNOT1*-fb) in jedem Fall detektiert (100%, n=6, Abb. 12 O,P), während die posteriore Domäne (*CNOT1*-n) seltener auftrat (67%, n=6, Abb. 12 P).

Die Ergebnisse, die bei der Transplantation der Kaninchenknoten erhalten wurden, differierten in einem weiteren Aspekt von denen der Transplantation des Hühnerknotens. Wenn ein Kaninchenknoten verpflanzt wurde, exprimierten einige der Wirtsembryonen *CH-T* und *CNOT1*-n in einer posterioren Domäne der sekundären Neuralachse, die immer auf das Ektoderm begrenzt

war (Abb. 12 S,U). Im Gegensatz dazu ergaben die gleichen Transplantationen bei den Hühnerknoten in jedem Fall eine posteriore *CH-T* oder *CNOT1-n* Expressionsdomäne, die auf das selbstdifferenzierende Transplantat zurückging (Abb. 11 G,H). Die Instabilität des Kaninchenorganisators nach der Transplantation im Hühnerembryo könnte möglicherweise die Aktivierung von *CH-T* und *CNOT1-n* im benachbarten Ektoderm erlauben, während der sich weiter entwickelnde Hühnerembryo selbst zwar *CH-T* und *CNOT1-n* exprimierte, gleichzeitig aber deren Expression im benachbarten Ektoderm unterdrückte. Dies geschah wahrscheinlich durch die „anti-dorsalisierende Aktivität“ des Knotens, die eine Ausbreitung der Organisatorqualitäten auf die umliegende Region durch den TGF β -Faktor ADMP verhindert (Yuan et al., 1995; Joubin und Stern, 1999). Der Hühner- und der Kaninchenknoten hatten jedoch gemeinsam, daß in beiden Fällen die Basalmembran an der Transplantationsstelle intakt blieb und daß sie keine Deepithelialisierung des der Implantationsstelle überliegenden Ektoderms bewirkten.

Insgesamt wurde beobachtet, daß der Knoten aus dem Kaninchenembryo eine sekundäre Neuralachse in Hühnerembryonen, die immer eine Vorderhirnidentität ausbildete, induzieren konnte. Die Vorderhirnidentität wurde auch in Abwesenheit der Organismarker des Hühnerembryos gefunden.

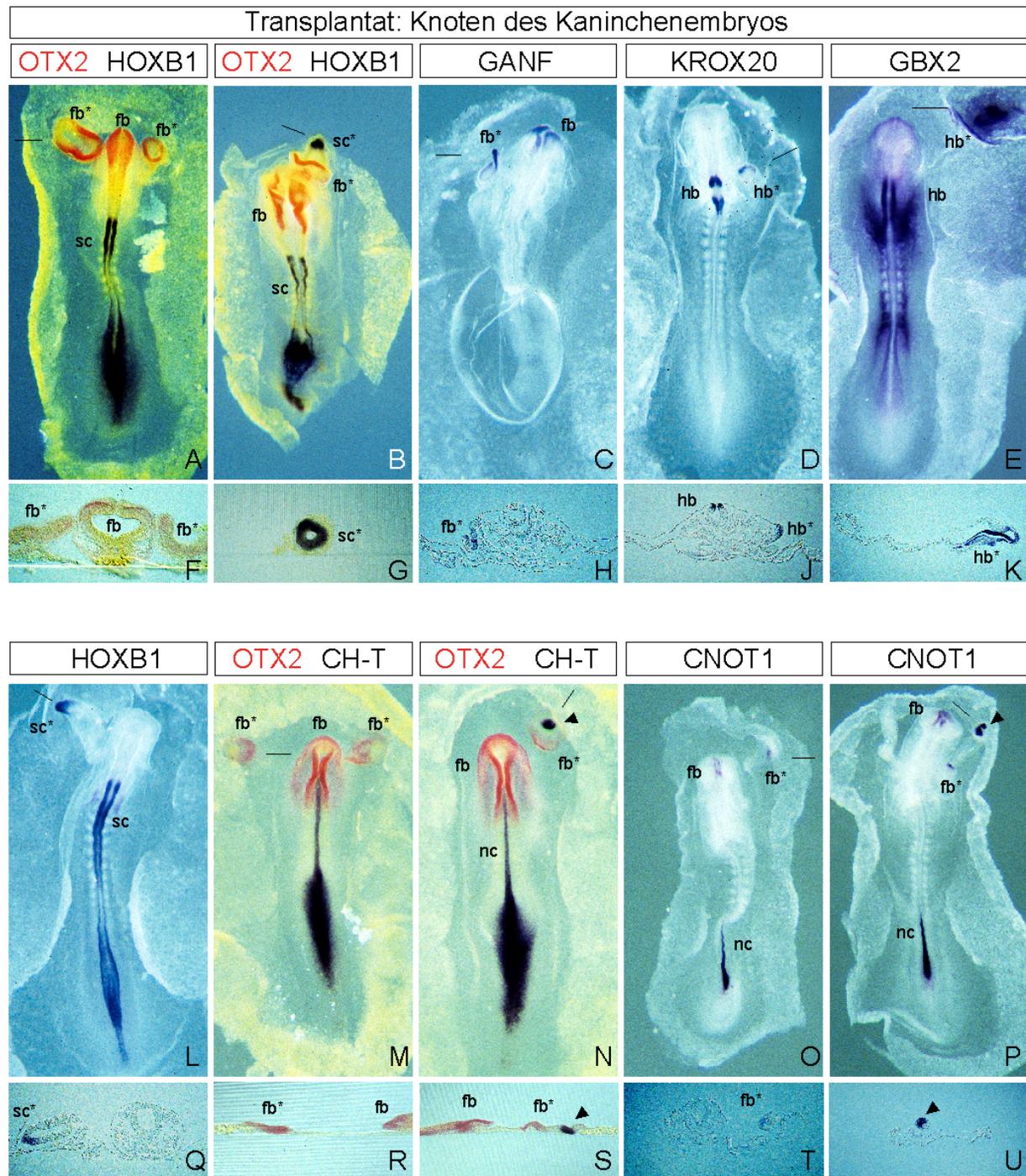


Abb. 12: Induktion einer kompletten Neuralachse durch die Transplantation eines Kaninchenknotens in einer Hühnerembryo. In **A** und **B** bzw. **M** und **N** sind Embryonen dargestellt, die mit einer Doppel-in-situ-Hybridisierung auf die Expression von *OTX2* und *HOXB1* bzw. *OTX2* und *CH-T* untersucht wurden. In **C**, **D**, **E**, **F**, **O** und **P** sind Embryonen abgebildet, die mit einer einfachen In situ-Hybridisierung auf die Expression von *GANF*, *KROX20*, *GBX2*, *HOXB1* bzw. *CNOT1* untersucht wurden. Das Vorderhirn (fb), das Hinterhirn (hb), das Rückenmark (sc) und das Notochord (nc) der Empfängerembryonen sind in der Abbildung markiert. Die entsprechenden ektopischen Strukturen sind mit einem Stern versehen (*). Die Ebene der histologischen Schnitte ist durch eine Linie angedeutet. Die ektopischen Strukturen waren für alle neuronalen Marker positiv. In einigen Fällen exprimierten sie *OTX2* in Abwesenheit von *CH-T* (**M,R**) bzw. nur die Vorderhirndomäne von *CNOT1* (*CNOT1*-fb) in Abwesenheit von der zweiten Domäne im Knoten (*CNOT1*-n; **O**). Die ektopische Expression von *CNOT1* und *CH-T* wurde nur im Ektoderm beobachtet. Es bildeten sich keine notochordartige Strukturen aus (**S,U**).

1.4 Transplantation des hinter dem Knoten liegenden Teils des Primitivstreifens aus dem Kaninchenembryo

Als Kontrolle, ob jedes Transplantat des Kaninchenprimitivstreifens im Hühnerembryo unspezifisch die Ausbildung einer kompletten, sekundären Neuralachse hervorrief, wurde der unmittelbar hinter dem Knoten liegende Teil des Kaninchenprimitivstreifens ebenfalls transplantiert (Abb. 8 J). Derartige Transplantate ergaben in 70% der Fälle eine morphologische Veränderung (n=40, Tab. 17, Abb. 13). Keine dieser ektopischen Neuralachsen exprimierte die anterioren Marker *OTX2* (0%, n=8, Abb. 13 A,L), *GANF* (0%, n=4, Abb. 13 B,G), oder *CNOT1*-fb (0%, n=6, Abb. 13 M). Die Häufigkeiten, mit der die posterioren Marker wie die Hinterhirnmarker *GBX2* (100%, n=2, Abb. 13 D,J) und *KROX20* (50%, n=2, Abb. 13 C,H) und der posteriore Hinterhirn- und Rückenmarkmarker *HOXB1* (100%, n=6, Abb. 13 A,B,E,F,K) beobachtet wurden, waren jedoch im Vergleich zu den Ergebnissen der Knotentransplantationen unverändert. Auch die Induktion der mesodermalen Marker *CH-T* und *CNOT1*-n trat mit großer Häufigkeit im Ektoderm an der Transplantationsstelle auf (100%, n=4, Abb. 13 L,N und 67%, n=6, Abb. 13 M,O). Diese Ergebnisse legten nahe, daß die Induktion der mesodermalen Marker durch die Knotentransplantate (siehe Ergebnisse 1.3) auf die Gegenwart von hinter dem Knoten liegenden Primitivstreifenanteilen in den transplantierten Gewebestücken zurückzuführen waren.

Insgesamt erwies sich auch der hinter dem Knoten liegende Primitivstreifenabschnitt des Kaninchens als potenter Induktor von ektopischen Neuralachsen, die jedoch stets unvollständig waren und denen die anterioren Identitäten fehlten.

1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Transplantationsexperimente

Mit den durchgeführten Transplantationsexperimenten wurde in dem primitiven Endoderm des Hühnerembryos kein Signal gefunden, daß die Vorderhirnanlage im Ektoderm induzieren konnte. Das primitive Endoderm des Kaninchenembryos dagegen enthielt ein solches Signal, das zur Induktion einer Neuralplatte mit einer anterioren Identität, dem frühesten Anzeichen der Vorderhirnanlage, befähigt war. Die Transplantation des Knotens (der anterioren Spitze des Primitivstreifens) des Hühner- bzw. Kaninchenembryos ergab für beide Spezies das gleiche Ergebnis. Der Knoten induzierte im Transplantationsexperiment die Ausbildung einer kompletten, sekundären Neuralachse, die immer eine Vorderhirnanlage enthielt. Das Signal zur Anlage des Vorderhirns fand sich daher in den Hühnerembryonen ausschließlich im Knoten bzw. dessen Drivaten, während es im Kaninchenembryo sowohl im primitiven

Endoderm als auch im Knoten enthalten war.

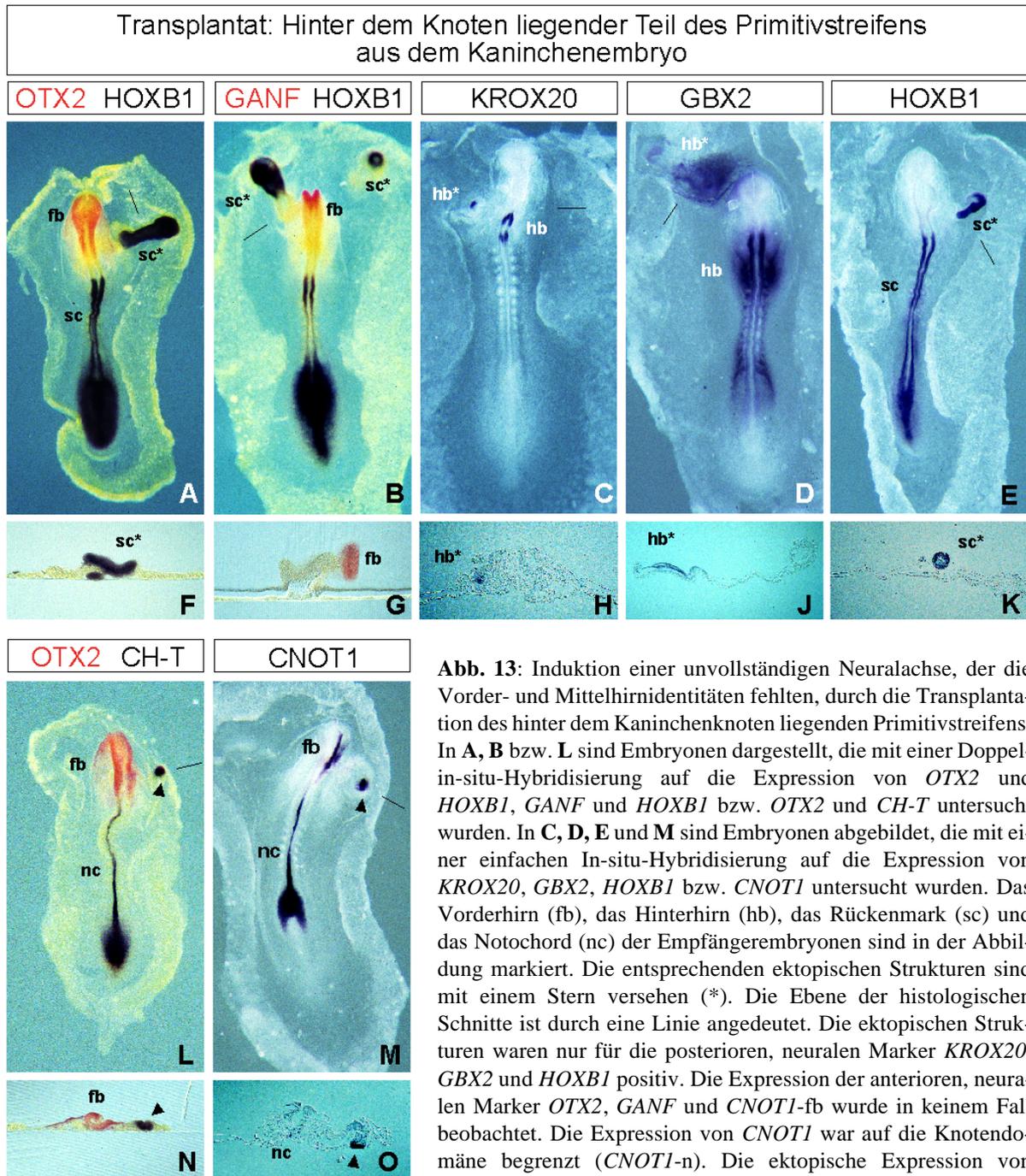


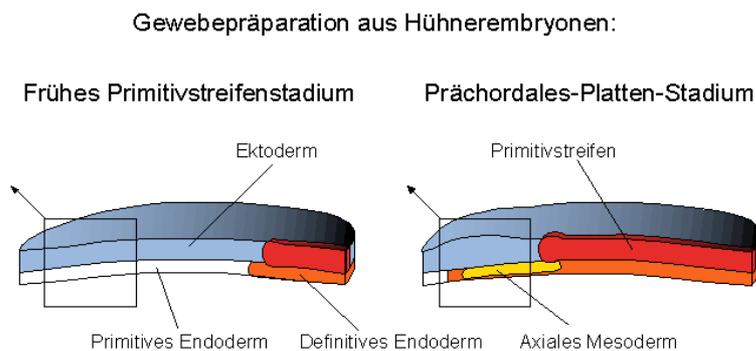
Abb. 13: Induktion einer unvollständigen Neuralachse, der die Vorder- und Mittelhirnidentitäten fehlten, durch die Transplantation des hinter dem Kaninchenknoten liegenden Primitivstreifens. In **A, B** bzw. **L** sind Embryonen dargestellt, die mit einer Doppelin-situ-Hybridisierung auf die Expression von *OTX2* und *HOXB1*, *GANF* und *HOXB1* bzw. *OTX2* und *CH-T* untersucht wurden. In **C, D, E** und **M** sind Embryonen abgebildet, die mit einer einfachen In-situ-Hybridisierung auf die Expression von *KROX20*, *GBX2*, *HOXB1* bzw. *CNOT1* untersucht wurden. Das Vorderhirn (fb), das Hinterhirn (hb), das Rückenmark (sc) und das Notochord (nc) der Empfängerembryonen sind in der Abbildung markiert. Die entsprechenden ektopischen Strukturen sind mit einem Stern versehen (*). Die Ebene der histologischen Schnitte ist durch eine Linie angedeutet. Die ektopischen Strukturen waren nur für die posterioren, neuronalen Marker *KROX20*, *GBX2* und *HOXB1* positiv. Die Expression der anterioren, neuronalen Marker *OTX2*, *GANF* und *CNOT1*-fb wurde in keinem Fall beobachtet. Die Expression von *CNOT1* war auf die Knotendomäne begrenzt (*CNOT1*-n). Die ektopische Expression von *CNOT1* und *CH-T* wurde nur im Ektoderm beobachtet. Es bildeten sich keine notochordartigen Strukturen aus.

2. Identifikation des Gens *Cresto* im Sequenzierungs/Expressionsscreen

Um bisher unbekannte Gene, die an der Differenzierung des Ektoderms in seine verschiedenen Derivate beteiligt waren, zu identifizieren, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit ein Sequenzierungs/Expressionsscreen durchgeführt. Dazu wurden zunächst cDNA-Banken angelegt, aus denen nach einer einfachen Subtraktion (s.u.) zufällig Klone ausgewählt wurden. Die DNA dieser Klone wurden sequenziert und die Expression von dabei gefundenen, unbekannt Genen im Hühnerembryo bestimmt. Zur Funktionsanalyse wurden einige dieser Gene anschließend im Hühnerembryo überexprimiert und ihr Effekt auf die Entwicklung des Hühnerembryos analysiert.

2.1 Herstellung der cDNA-Plasmid-Banken

Zur Herstellung der cDNA-Banken wurde Gewebe aus zwei verschiedenen Entwicklungsstadien des Hühnerembryos präpariert. Dazu wurde jeweils die Region vor dem Primitivstreifen aus dem frühen Primitivstreifen- bzw. aus dem prächordalen Plattenstadium isoliert (Abb. 14). Aus dem frühen Primitivstreifenstadium wurde anteriores Ektoderm zusammen mit dem darunterliegenden, anterioren, primitiven Endoderm präpariert. Aus dem Prächordalplatten-Stadium wurde anteriores Ektoderm zusammen mit anteriorem, definitiven Endoderm und axialem Mesoderm gewonnen.



dem axialen Mesoderm exprimiert wurden. Das Ektoderm ist in blau, das primitive Endoderm in weiß, das definitive Endoderm in orange, das axiale Mesoderm in gelb und der Primitivstreifen in rot dargestellt. Das explantierte Gewebe ist mit einer schwarzen Linie umzeichnet.

Abb. 14: Schematische Darstellung der Gewebe, die für die Herstellung der cDNA-Banken aus den Hühnerembryonen isoliert wurden. Die frühe cDNA-Bank enthielt Gene, die im anterioren Ektoderm und dem darunterliegenden primitiven Endoderm im frühen Primitivstreifenstadium exprimiert wurden. Die späte cDNA-Bank enthielt Gene, die im anterioren Ektoderm, dem anterioren definitiven Endoderm und

Aus jeweils zehn Hühnerembryonen der beiden Entwicklungsstadien wurden etwa 3 bis 4 µg Gesamt-RNA gewonnen. Davon wurde 1 µg zur Herstellung von cDNA verwendet. Ein Fünftel der Erststrang-cDNA wurde darauf mit Hilfe der PCR innerhalb von 20 Zyklen amplifiziert und ein Zwanzigstel der amplifizierten cDNA auf einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 15). Es

wurde stets das gleiche Bandenmuster, unabhängig von dem Entwicklungsstadium der Embryonen gefunden. Dies deutete darauf hin, daß nur wenige Gene unterschiedlich exprimiert wurden und in der Gesamtheit ein sehr ähnliches Expressionsprofil vorlag.

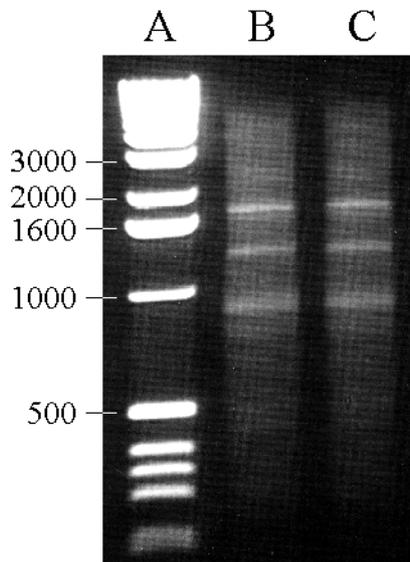


Abb. 15: Elektrophoretisch aufgetrennte, amplifizierte cDNA. (A) Größenmarker in bp. (B) cDNA aus dem frühen Primitivstreifenstadium. (C) cDNA aus dem prächordalen Plattenstadium. Das Bandenmuster ist in beiden Proben sehr ähnlich.

Die cDNA-Fragmente, die größer als 1.000 Basenpaare waren, wurden anschließend in den Expressionsvektor pCMV3 ligiert und in Bakterien transformiert. Die Ligation in den Expressionsvektor ergab etwa 40.000 Klone je Ligationsansatz. Es wurden zunächst ohne einen Subtraktionsschritt 100 zufällig ausgewählte Klone sequenziert und mit den Sequenzen der Datenbank verglichen. Dabei wurden in über 80% der Fälle Sequenzen von bereits aus dem Huhn oder aus einer anderen Spezies bekannte, sogenannte House-Keeping-Gene identifiziert, die unter anderem am Grundstoffwechsel, am Aufbau des Zellskeletts und am Aufbau und Abbau von Proteinen beteiligt waren. Etwa 25% der cDNA-Fragmente von bereits bekannten Genen mit einer Länge von 1.000 bis 3.000 bp enthielt die kompletten Gensequenz. Um die entwicklungsbiologisch uninteressanten House-Keeping-Gene bei der Auswahl der Klone zu unterdrücken, wurde eine einfache Subtraktion der unabhängig vom Entwicklungsstadium stark exprimierten Gene vorgenommen (Material und Methoden 3.10). Dadurch wurden etwa 90% der Klone von der weiteren Analyse ausgeschlossen, so daß etwa 4.000 Klone je Ligationsansatz übrig blieben. Davon wurden 400 zufällig ausgewählte Klone sequenziert und mit den Sequenzen der Datenbanken verglichen. Die Expression von 25 cDNA-Fragmenten, die aufgrund ihrer Sequenz vermutlich für ein komplettes Protein kodierten, wurde mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung analysiert. 21 der analysierten Gene wiesen ein restriktives Expressions-

muster auf (Tab. 18). Ein Gen aus diesem Screen wurde im Detail untersucht (Nummer 75; Tab. 18). Da sich im Verlauf dieser Arbeit für dieses Gen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Neuralleistenzellen (engl. neural crest cells) ergab, wurde dieses Gen „*Cresto*“ genannt.

Nummer der cDNA	Länge der cDNA (bp)	Homologie der cDNA	Expression der cDNA
54	1060	humanes Phosphatidylinositol-Transfer-Protein	anteriore Neuralfalten (HH7), Neuralrohr und Kopfmesoderm (HH10)
75	1100	Frosch Geminin	siehe Abb. 17; Cresto
81	1900	keine	gesamte Neuralfalten (HH7), Vorderhirn (HH10)
82	1100	nierenspezifischer Phosphatase Inhibitor der Ratte	Neuralplatte und Neuralrohr
83	1800	keine	Kopfmesoderm
92	1000	keine	Neuralplatte bis HH5
102	1400	keine	Neuralplatte ab HH6 und Neuralrohr (HH10)
103	1300	keine	schwach in anterioren Neuralfalten
104	1800	keine	anteriore Neuralfalten
105	2500	keine	schwach im Kopfmesoderm
106	1800	keine	anteriore Neuralplatte (HH5), anteriore Neuralfalten (HH7)
109	1050	humane Protein Kinase, die an der Zellteilung beteiligt ist.	Kopfmesoderm
112	1200	keine	anteriore Neuralplatte (HH5)
132	3000	keine	schwach um Neuroporus (HH10)
134	1300	keine	Neuralplatte (HH5) und Neuralrohr (HH10)
136	1600	Zink-Finger-Protein	Endodermportal (HH10)
140	1600	keine	kein Signal nach In-situ-Hybridisierung
141	1100	keine	kein Signal nach In-situ-Hybridisierung
144	1100	keine	schwach im Mittelhirn
151	1000	keine	kein Signal nach In-situ-Hybridisierung
153	2000	GTPase Domäne des Myosins	schwach in anteriorer Spitze des Neuralrohrs
157	1200	keine	schwach im Primitivstreifen, v.a. posterior
162	1050	Kernprotein aus dem Frosch	kein Signal nach In-situ-Hybridisierung
166	2000	hypothetisches 52,9 kDa Protein aus der Hefe	im extraembryonalen Bereich, <i>Area opaca</i>

186	1300	humanes GTP-bindendes Protein	schwach in Neuralplatte (HH4), dorsale Neuralfalten (HH7)
190	1600	humane Protein Kinase	anteriore Neuralfalten

Tab. 18: Übersicht der mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung analysierten Klone aus dem Sequenzierungs/Expressionsscreen. Es sind die im Screen verwendete Nummer des cDNA-Klons, die Länge der cDNA in Basenpaaren (bp) sowie zur jeweiligen cDNA gefundene Homologien und eine Beschreibung der Expressionsdomänen der cDNA im Hühnerembryo angegeben.

2.2 Das Gen *Cresto*

Das Gen *Cresto* kodiert für ein Protein, das aus 223 Aminosäuren mit einem rechnerischen Molekulargewicht von 24989 g/mol (25 kDa) bestand. Die Primärstruktur des Proteins wies eine Coiled-Coil-Domäne (s.u.) und ein mögliches Kernexportsignal (NES) (s.u.) auf. Der Vergleich mit den Sequenzen der Datenbanken ergab eine Verwandtschaft der abgeleiteten Proteinsequenz des Gens *Cresto* zu Proteinen aus dem Frosch *Xenopus laevis*, dem Menschen, der Maus *Mus musculus* und der Fliege *Drosophila melanogaster* (Abb. 16).

Hühner Cresto	MN SKMKQSLN V	ENPSGSLQ	KYLTDTACSA	APRRTLKMIQ	PSAKGFLVGR	
Humaner EST	.. PS...KQEEI	K...I	.N...S	V.....	...S.S...	
Maus EST	.. LS...KQEGA	Q...V	.N...P	V.....	...D.S...	
Xenopus Geminin H	.. TNK..R.DME	KPTM.IKNY	FVDKTNE.LV..	...S.C....	
Xenopus Geminin L	.. NM..RSDVE	NPSM.IKNY	IVDKTNE.ALV..	Q..S.C....	
Drosophila EST	MSSSAARVYI	QVETEAEQKE	HLKQQRQTL	KPLQGNVNDK	ENLTGSGRAS	IVDQLSRLKA
Hühner Cresto	CNEKSSV	K RKLWNNRL	TSSACKAEA	SVDKEQENE	NTDDVIQAI	LIKK S PSS
Humaner EST	E..L.AGLS.	..HR.DH.TS	T...PG.IVP	ESS..K.L	GGVTQ.ESF.	.M..EN...
Maus EST	E..LPKGLF.DDQ.AS	Q...CG.P	EANENK.DV	GDLTQ.E.F.	.IS.EN...
Xenopus Geminin H	TK.PVKNST.DQ.	..KKA.V.V	A..P.HR.	.K.CSSE.Y.	.MV.ET.TC
Xenopus Geminin L	TK.PAKNST.DQ.	..KKA.V.V	A..P.HQ.	.K.CPSE.Y.	.MV.ET.TC
Drosophila EST	GVQVAPKYG.	..CVDTAP	..AI.TKD.DT	QT.A.AVPLG	.A.KP.T.E.	.TSTAE.GE
Hühner Cresto	QYWKEVAEER	RKALYEVLQE	NEKLHKEIEQ	KDGEIARLKE	ENEELMSLAE	HVHYLTSMIE
Humaner ESTK.A.K.N.....K	..K.AEV..	..Q.MAEL..
Maus ESTQ.A.K.S.....RK	..KD.AEV..	..Q.MAEV..
Xenopus Geminin H	L.....A..L	..E.....Q	..D...E..G	..Q.MAN...
Xenopus Geminin L	L...D....A...Q...L	..E.....Q	..D...E..G	..Q.MAN...
Drosophila EST	N.Y.LL..Q.	.L..EDS.T.	.RH..ER..G	LEE.MDTMRQ	.LD.AKN.V.	VLKEICEEDN
Hühner Cresto	RLTGQESDNL	EALSLALDE	SNQENEDLNL	GGDADSTSEG	PSQVSCDLRK	SVSDLASSEG
Humaner EST	..N.EPL..F	.S.DNQEF.	.EE.TV..S	VE.SEIG.CA	EGT...STDA	.PCI
Maus EST	..SNEPL..F	.SPD.QEF.	.EE.AV.YSE	LE.SGAG.CA	EET...STDA	RPCT
Xenopus Geminin H	...NAPRS.	.D.KD.D.E.	ARF.D.ADMA	EARIEDETDM	ARPSNS.QNM	DAHTV
Xenopus Geminin L	...NAPQS.	.D.KN.D.E.	ARF.D.AESR	IE.ETDMTQ	__PS.S.QNM	DKQTV
Drosophila EST	SEVEEDDTTG	DEDKVNA				
Hühner Cresto	NY					

Abb. 16: Vergleich der Proteinsequenz von Cresto mit den in den Datenbanken gefundenen Sequenzen aus dem Menschen, der Maus, dem Frosch und der Fliege. Identische Aminosäuren sind als Punkte und fehlende Aminosäuren als tiefgestellter Strich dargestellt. Die konservierten Bereiche sind mit rot (Domäne A) bzw. blau (Domäne B) unterlegt. Das mögliche Kernexportsignal (NES) ist hellgrau unterlegt.

Das Gen *Cresto* wies insgesamt eine geringe Homologie zu anderen Genen und sequenzierten

Genfragmenten (ESTs, engl. expressed sequence tags) in den Datenbanken auf (Tab. 19). Die Identität des Proteins Cresto zu dem humanen EST (AF067855) und dem EST aus der Maus (AF068780) betrug nur 54% bzw. 50% (Tab. 18). Zu den Proteinen Geminin H (AF067856) und Geminin L (AF067881) des Frosches *Xenopus laevis* bestand eine Identität von weniger als 50%. Im komplett sequenzierten Genom der Fliege *Drosophila melanogaster* wurde der engste Verwandte des Proteins Cresto mit einer Homologie von 19% gefunden (AE003789). Allerdings waren zwei Domänen des Proteins Cresto stärker konserviert (Abb. 16, rot und blau unterlegt). Diese Domänen A und B (A: 29 aa in rot und B: 75 aa in blau) wiesen eine höhere Homologie zu den anderen Proteinen auf. Die A-Domäne war zum humanen EST zu 72%, zum EST der Maus zu 69%, zu Geminin H zu 62% und zu Geminin L zu 58% identisch. Zu dem verwandten Protein aus der Fliege zeigte sich allerdings nur eine geringe Übereinstimmung (10%). Die B-Domäne war zum humanen EST zu 76%, zum EST der Maus zu 71%, zu Geminin H zu 73%, zu Geminin L zu 73% und zum EST der Fliege zu 32% identisch.

	Mensch 209 aa	Maus 206 aa	Frosch H 219 aa	Frosch L 216 aa	Fliege 192 aa
Huhn (223 aa)	54 %	50 %	48 %	47 %	18 %
Mensch		78 %	42 %	42 %	15 %
Maus			41 %	43 %	17 %
Frosch H				87 %	18 %
Frosch L					19 %

Tab. 19: Übersicht der prozentualen Übereinstimmung der Proteine Cresto aus dem Huhn, Geminin H und L aus dem Frosch und der aus den Datenbanken abgeleiteten Proteine aus der Maus, dem Menschen und der Fliege.

Der konservierte c-terminale Teil des Proteins Cresto (105. bis 149. aa) enthielt ein sogenanntes „Coiled-coil“-Motiv (McLachlan und Stewart, 1975), das aus einer Wiederholung von sieben Aminosäureresten besteht, die jeweils an den Positionen eins und vier hydrophobe Reste enthält. Diese hydrophoben Reste bilden in einer α -Helix einen hydrophoben Streifen entlang der Helix aus, der mit anderen Coiled-coil-Domänen interagieren kann und häufig als Proteininteraktionsdomäne beobachtet wird. Die Vorhersage der Coiled-coil-Domäne erfolgte mit Hilfe des Programms „Coils Prediction 2.2“ (Lupas et al., 1991).

Die Proteinsequenz von der 170. bis 178. aa des Proteins Cresto (LEALESLAL) enthielt ein mögliches Kernexportsignal (Görlich und Kutay, 1999), das der bekannten Konsensus-Sequenz

(L-x₂₋₃-L-x₂₋₃-L-x-L) exakt entspricht (Bogerd et al., 1996).

2.3 Die Expression des Gens *Cresto* in der frühen Entwicklung des Hühnerembryos

Das Gen *Cresto* wurde bereits während der Gastrulation im Primitivstreifenstadium (HH4) im Ektoderm transkribiert (Abb. 17 A). In diesem Stadium wurden Transkripte entlang des Primitivstreifens, in der gesamten Neuralplatte (np) und in geringerem Ausmaß auch in dem peripheren Ektoderm, das später zur Epidermis wird, gefunden. Im Kopffaltenstadium (HH6) blieb dieses Expressionsmuster erhalten, allerdings wurde *Cresto* in der Mitte des Embryos über dem Notochord nicht mehr exprimiert (Abb. 17 B, Pfeil). Während der Neurulation (ab HH7) konzentrierte sich die Expression von *Cresto* auf die dorsalen Neuralfalten (Abb. 17 C, E, Pfeil). Nach dem Schließen des Neuralrohrs (HH10) wurde *Cresto* im dorsalen Neuralrohr und in den auswandernden Neuralleistenzellen exprimiert (Abb. 17 D, F, Pfeil).

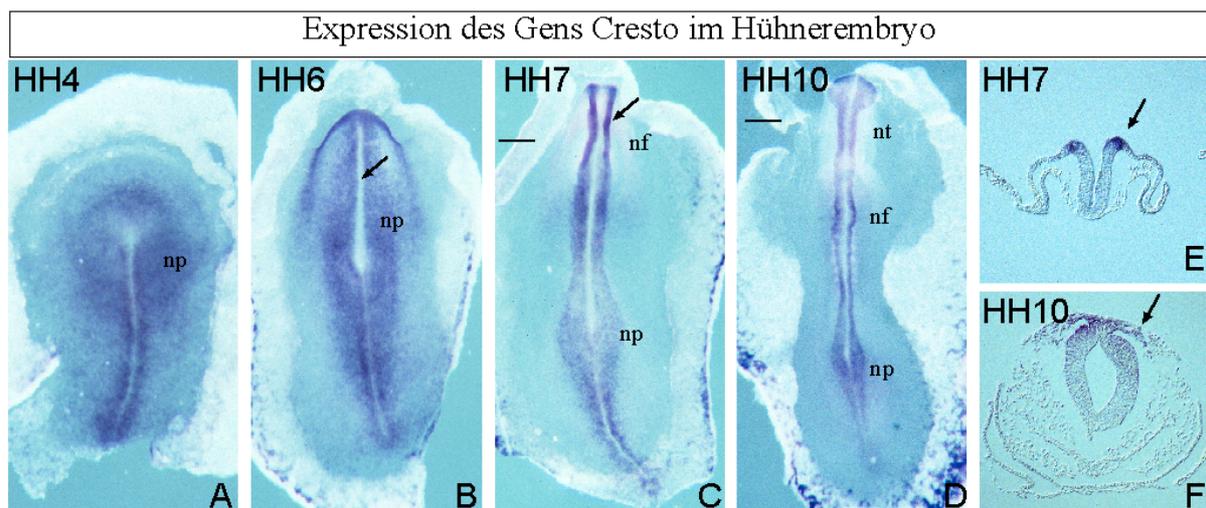


Abb. 17: Expression des Gens *Cresto* im Hühnerembryo. (A) Im Primitivstreifenstadium (HH4) wurde *Cresto* in einer breiten Domäne im Ektoderm und entlang des gesamten Primitivstreifens exprimiert. (B) Im Kopffaltenstadium wurde *Cresto* in der Neuralplatte und im angrenzenden Ektoderm transkribiert. Das Ektoderm oberhalb des Notochords war frei von Transkripten (Pfeil). (C,E) Zu Beginn der Neurulation (HH7) fand sich *Cresto* RNA in den dorsalen Neuralfalten (Pfeil) und weiter posterior in der Neuralplatte. (D,F) Nachdem sich das Neuralrohr anterior geschlossen hatte (HH10), wurde *Cresto* im dorsalen Neuralrohr und in den auswandernden Neuralleistenzellen (Pfeil) exprimiert. Weiter posterior fanden sich Transkripte in den dorsalen Neuralfalten und noch weiter posterior in der Neuralplatte. (Neuralplatte (np); Neuralfalten (nf); Neuralrohr (nt)).

2.4 Überexpression des Gens *Cresto* im Hühnerembryo durch Elektroporation

Zur Überexpression des Gens *Cresto* bzw. der konservierten Bereiche des Gens *Cresto* im sich entwickelnden Hühnerembryo wurden verschiedene DNA-Konstrukte hergestellt (siehe Material und Methoden 3.6.2; Abb. 18). Alle wurden von dem starken viralen CMV-Promotor getrieben (Boshart et al., 1985). Zuerst wurde das klonierte Gen *Cresto* in unveränderter Form

überexprimiert (Abb. 18 „Cresto“). Dann wurden die Deletionmutanten „Cresto A“, „Cresto B“ und „Cresto C“ untersucht. Das Protein Cresto wurde außerdem mit einem Myc- bzw. His-Epitop am C-Terminus versehen, „Cresto-myc“ bzw. „Cresto-his“ (Abb. 18, in dunkel- bzw. hellgrau). Darüber hinaus wurden verschiedene Fusionsproteine aus Cresto, verschiedenen Linkern (Hämagglutinin bzw. (Glyzin-Glyzin-Serin)-Linker; dunkelblau) und GFP bzw. EGFP (grün) erstellt (Abb. 18; „Cresto-GFP“, „Cresto-HA-GFP“, „Cresto-GS-GFP“, „GFP-Cresto“, „EGFP-HA-Cresto“).

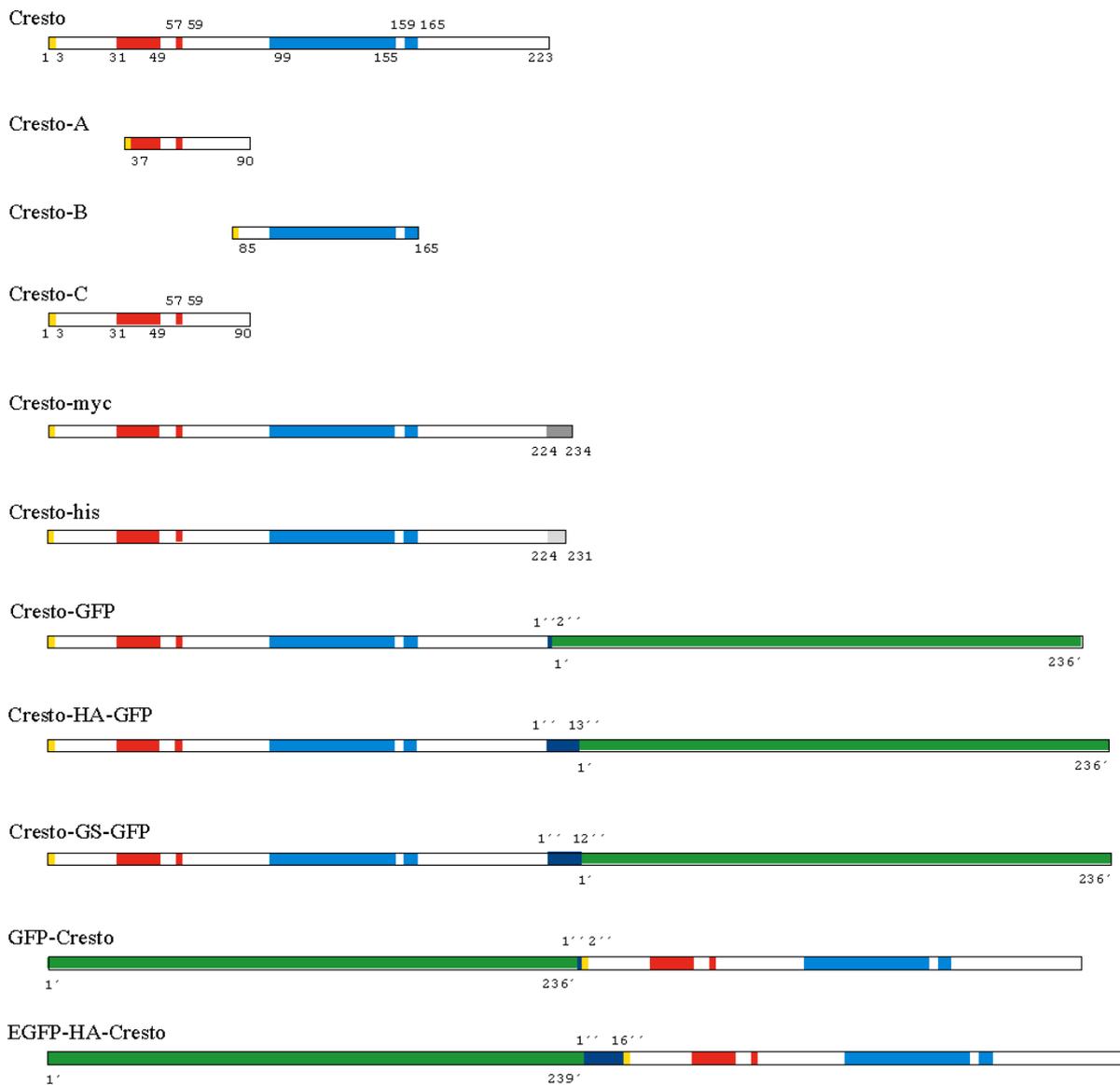


Abb. 18: Übersicht der im Hühnerembryo überexprimierten Konstrukte des Gens *Cresto*. Die konservierten Regionen des Gens *Cresto* sind wie in Abb. 16 in rot bzw. blau dargestellt. Der am 5'-Ende nicht-translationale Bereich des Gens *Cresto* einschließlich der Sequenz, die für die ersten drei Aminosäuren kodiert (in gelb), wurde mit den Deletionsmutanten Cresto A und Cresto B fusioniert. Die Deletionsmutante Cresto A bestand aus den ersten drei Aminosäuren von Cresto, die mit den Aminosäuren 37. bis 90. fusioniert wurden. Cresto A enthielt daher die erste konservative Domäne A des Proteins Cresto (in rot). Die Mutante Cresto B umfaßte ebenfalls die

ersten drei Aminosäuren und die Aminosäuren 85. bis 165. des Proteins Cresto. Cresto B enthielt die zweite konservierte Domäne B des Proteins Cresto (in blau). Die Mutante Cresto C bestand aus den ersten 90 Aminosäuren des Proteins Cresto und enthielt die erste konservierte Region des Proteins Cresto (rot). Die Konstrukte Cresto-myc und Cresto-his kodierten ein c-terminal mit einem Myc- bzw. His-Tag (dunkelgrau bzw. hellgrau) versehenes Fusionsprotein. Das Konstrukt Cresto-GFP bestand aus einer c-terminalen Fusion von Cresto mit GFP (grün). Bei den Konstrukten Cresto-HA-GFP und Cresto-GS-GFP wurde ein Hämagglutinin-Linker (HA) bzw. ein Glyzin-Glyzin-Serin-Linker (GS) zwischen Cresto und GFP eingefügt (jeweils dunkelblau). Das Konstrukt GFP-Cresto bestand aus einer n-terminalen Fusion von Cresto mit GFP (grün). Bei dem Konstrukt EGFP-HA-Cresto wurde das EGFP (enhanced GFP) über einen Hämagglutinin-Linker mit Cresto am c-terminalen Ende verbunden. Die Anzahl der Aminosäuren ist jeweils angegeben.

2.4.1 Überexpression des Gens *Cresto* und der Konstrukte für Fusionsproteine aus Cresto und GFP im Hühnerembryo

Um die Funktion des Gens *Cresto* in vivo zu analysieren, wurde es mit Hilfe der Elektroporation im Hühnerembryo überexprimiert. Die Embryonen wurden im Primitivstreifenstadium HH3+ bis HH4 elektroporiert und darauf für weitere 12h bis 24h kultiviert. Anschließend wurden die Embryonen mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung gleichzeitig auf die Expression des Transgens und auf die Expression eines Markergens untersucht. Für das Gen *Cresto* und für die Fusionsproteine EGFP-HA-Cresto bzw. EGFP-GS-Cresto wurden identische Ergebnisse erhalten. Die anderen GFP-Fusionsproteine erwiesen sich als inaktiv (Daten nicht abgebildet). Entweder zeigten sie weder eine Fluoreszenz des GFPs noch einen Effekt von *Cresto* (Cresto-GFP, Cresto-HA-GFP, Cresto-GS-GFP) oder sie wiesen zwar ein funktionstüchtiges Cresto aber ein inaktives GFP auf (GFP-Cresto).

Der HMG-Transkriptionsfaktor *SOX2* (Rex et al., 1997), der früh das neurale Ektoderm markiert, der Pax-Transkriptionsfaktor *PAX3* (Goulding et al., 1991) und der früh im nicht-neuralen Ektoderm und später im dorsalen Neuralrohr exprimierte TGF β -Faktor *BMP4* (Schultheiss et al., 1995; Liem et al., 1995) wurden durch die Überexpression von *Cresto* nicht induziert (n=5; n=5; Daten nicht abgebildet; n=5, Abb. 19 J,K,P). Die Überexpression von *Cresto* führte jedoch in jeder transfizierten Zelle zur Induktion des Homeoboxgens *DLX5*, das normalerweise früh im nicht-neuralen Ektoderm am Rand der Neuralplatte exprimiert ist (n=13, Abb. 19 A,B,G). Die Überexpression von Cresto war in gleicher Weise ausreichend, um die Expression des Homeoboxgens *MSX1* in jeder transfizierten Zelle zu induzieren (n=9, Abb. 19 C,D,H). Interessanterweise waren alle Zellen zu dieser Reaktion unabhängig von ihrer Herkunft fähig. Die histologische Untersuchung der Embryonen ergab, daß beispielsweise *MSX1* in allen ektodermalen Regionen durch die Überexpression von *Cresto* induziert werden konnte (Abb. 19 H, ecto). Darüber hinaus wurde *MSX1* auch in mesodermalen Strukturen wie dem Notochord und dem paraxialen Mesoderm und in endodermalem Gewebe des Embryos induziert (Abb. 19

H, meso bzw. endo). Unter normalen Bedingungen ist *MSX1* im Ektoderm am Rand der Neuralplatte und zu keinem Zeitpunkt in endo- oder mesodermalen Zellen exprimiert (Streit und Stern, 1999a). Dieselbe uneingeschränkte Antwort auf die Überexpression von *Cresto* wurde auch für den Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *SLUG* (n=11, Abb. 19 E,F,I) und das Zelladhäsionsprotein Cadherin-6b (n=5, Abb. 19 L,M,Q) gefunden. Cadherin-6b ist normalerweise in den dorsalen Neuralfalten vor der Auswanderung der Neuralleistenzellen exprimiert (Nakagawa und Takeichi, 1995). Der Transkriptionsfaktor *SLUG* wird dagegen sowohl in noch nicht wandernden Neuralleistenzellen in den dorsalen Neuralfalten als auch in bereits wandernden Neuralleistenzellen transkribiert (Nieto et al., 1994). Die durch die Überexpression des Gens *Cresto* ausgelöste Induktion der oben genannten Markergene war zellautonom, da nur die transfizierten Zellen nicht aber die umliegenden Nachbarzellen auf die Überexpression von *Cresto* reagierten (siehe Vergrößerung in Abb. 19 C und D).

Die Überexpression des Gens *Cresto* war darüber hinaus auch ausreichend, um die Expression des Repressors von bHLH-Transkriptionsfaktoren *ID2* (n=5, Daten nicht gezeigt), des HMG-Transkriptionsfaktor *SOX10* (n=5, Daten nicht gezeigt) und des Zelloberflächenproteins *Cadherin-7* (n=16, Abb. 19 N,O,R) zu aktivieren. Obwohl die Aktivierung wieder unabhängig von der Zellschicht der transfizierten Zellen war (Abb. 19 R), fand die Induktion dieser Gene nicht in allen transfizierten Zellen statt (Abb. 19 N,O). *ID2* ist normalerweise in den anterioren, dorsalen Neuralfalten und in anterioren, wandernden Neuralleistenzellen exprimiert und vermag ektodermale Zellen an der Grenze von nicht-neuralem und neuralem Ektoderm in Neuralleistenzellen umzuprogrammieren (Martinsen und Bronner-Fraser, 1998). Der Transkriptionsfaktor *SOX10* ist erst in auswandernden Neuralleistenzellen nach dem Stadium HH9 exprimiert (Cheng et al., 2000). Das Zelladhäsionsprotein Cadherin-7 ist ein Marker für einen Teil der wandernden Neuralleistenzellen (Nakagawa und Takeichi, 1995). Keiner der elektroporierten Embryonen wies jedoch mit *Cresto* transfizierte Zellen auf, die das Epitop HNK-1 besaßen (n=15, Daten nicht gezeigt), das auf wandernden Neuralleistenzellen, nachdem sie das Neuralrohr verlassen haben und bereits über die Breite des Neuralrohrs hinausgewandert sind, exprimiert wird (Vincent und Thiery, 1984).

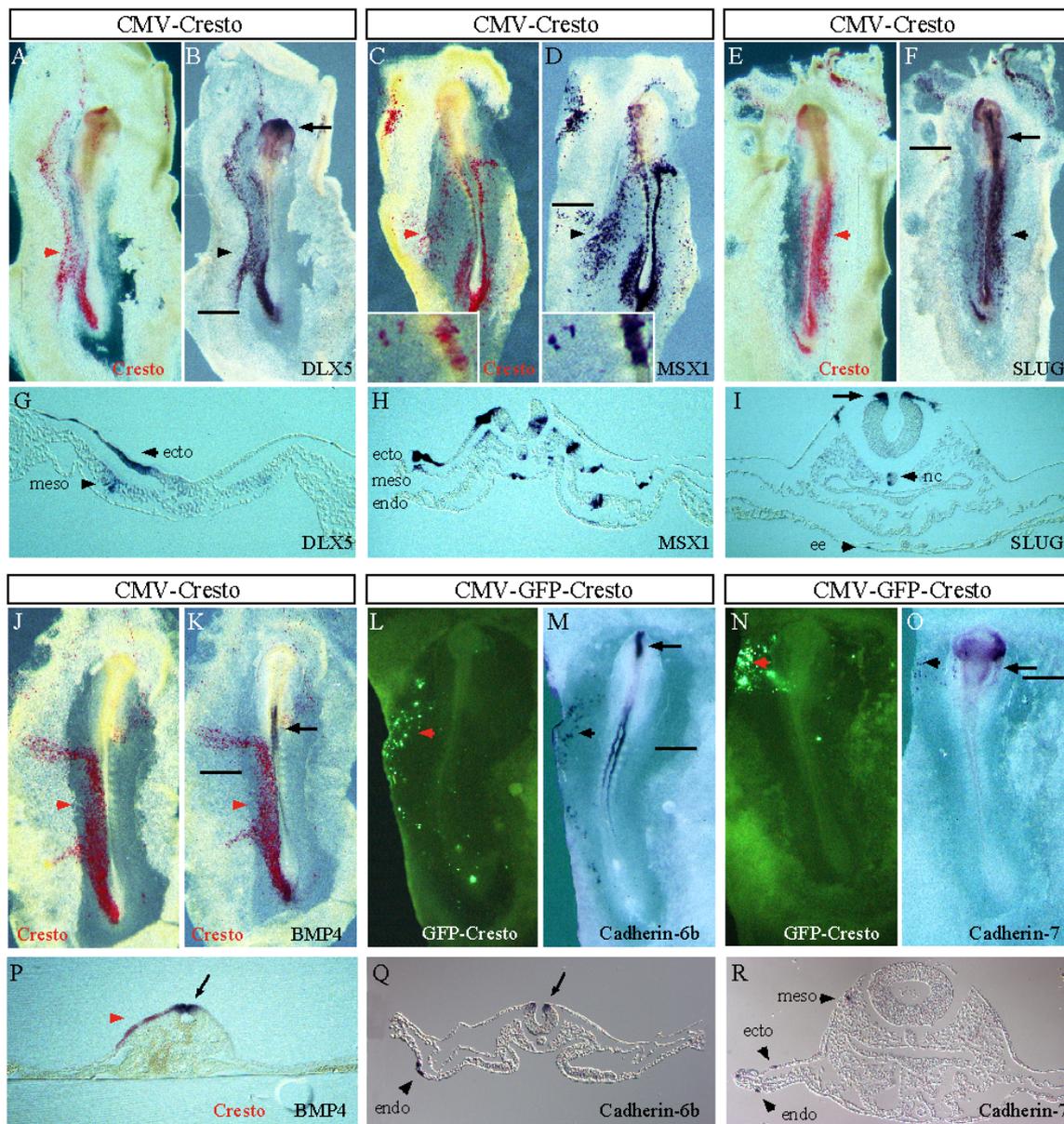


Abb. 19: Überexpression des Gens *Cresto* in kultivierten Hühnerembryonen. Die detektierten Genprodukte sind unter jedem Embryo angegeben. Die Expression des Transgens *Cresto* ist in rot angefärbt. Die blaue Färbung markiert die analysierte Expression der Markergene. In L und N ist die Fluoreszenz des Fusionsproteins EGFP-HA-*Cresto* abgebildet. Die Expression des Transgens *Cresto* bzw. des Fusionsproteins EGFP-HA-*Cresto* ist mit einem Pfeilkopf in rot markiert. Eine induzierte Markergenexpression ist mit einem schwarzen Pfeilkopf markiert. Die normalen Expressionsdomänen der Markergene sind mit einem schwarzen Pfeil markiert. Die Schnittebene ist durch eine schwarze Linie angedeutet. **(A,B,G)** Jede Zelle, die *Cresto* exprimierte (A), exprimierte auch *DLX5* (B). *DLX5* wurde auch in mesodermalen Zellen induziert (G, meso). **(C,D,H)** Jede Zelle, die *Cresto* exprimierte (C), exprimierte auch *MSX1* (D). *MSX1* wurde sowohl in ektodermalen (H, ecto), als auch in mesodermalen (H, meso) und endodermalen Zellen induziert (H, endo). Die Vergrößerungen in C und D zeigen, daß nur transfizierte Zellen diese Reaktion aufwiesen. Auch unmittelbar benachbarte Zellen exprimierten kein *MSX1*. **(E,F,I)** Jede Zelle, die mit *Cresto* transfiziert wurde (E), exprimierte auch *SLUG* (F). *SLUG* wurde auch in den mesodermalen Zellen des Notochords (nc) und in extraembryonalen Endodermzellen (ee) induziert (I). **(J,K,P)** Die *Cresto*-exprimierenden Zellen (J) exprimierten nicht *BMP4* (K,P). **(L,M,Q)** Die Zellen, die das Fusionsprotein EGFP-HA-*Cresto* exprimierten (L), exprimierten auch *Cadherin-6b*. In dem histologischen Schnitt sind endodermale Zellen, die *Cadherin-6b* exprimieren gezeigt (Q, endo). **(N,O,R)** Nur ein Teil der Zellen, die das Fusionsprotein EGFP-HA-

Cresto exprimierten (N), exprimierte auch *Cadherin-7* (O), jedoch wieder unabhängig von der Position im Embryo (R, ecto, meso, endo).

Transgene	Expression der Markergene												
	DLX5	MSX1	Cresto	Slug	Cad-6b	ID2	Cad-7	SOX10	HNK-1	BMP4	BMP2	SOX2	PAX3
Cresto	+	+		+	+	+	+		-	-	-	-	-
EGFP-HA-Cresto	+	+		+	+	+	+	+	-				
Cresto-A	+	+		(+)	(+)								
Cresto-B	-	-		+	+				-				
Cresto-C	(+)	(+)											
Cresto-Myc	+												
Cresto-His	+												
Slug	-	+	+		+		-	+	-	-			

Tab. 20: Zusammenfassung der Überexpressionsexperimente der durch den CMV-Promotor angetriebenen Expression von *Cresto*, von dem Fusionsprotein EGFP-HA-Cresto, von den Deletionsmutanten Cresto A, Cresto B und Cresto C, sowie von den Fusionsproteinen Cresto-myc bzw. Cresto-his und von dem Gen *SLUG*, entsprechend der jeweils analysierten Markergene. Eine uneingeschränkte Induktion ist mit einem „+“, eine Induktion in einem Teil der transfizierten Zellen ist mit einem „+ *“, eine schwache Induktion ist mit einem „(+“ und keine Induktion ist mit einem „-“ angedeutet.

Insgesamt führte die Überexpression des Gens *Cresto* im Hühnerembryo in jeder transfizierten Zelle zur Induktion eines Expressionsprofils, das mit den Markern *DLX5*, *MSX1*, *Cadherin-6b* und *SLUG* charakteristisch für frühe Neuralleistenzellen war. Ein Teil der transfizierten Zellen exprimierte darüber hinaus auch spätere Neuralleistenzellmarkergene wie *ID2*, *SOX10*, *Cadherin-7*. Die Expression des späten Markers HNK-1 wurde jedoch nicht durch die Überexpression des Gens *Cresto* induziert.

2.4.2 Die Überexpression des Gens *Cresto* löste bei neuralen Zellen Wanderungen aus

Die Überexpression von *Cresto* in vivo verstärkte das Auswandern von Zellen aus dem dorsalen Neuralrohr. Embryonen, die vor allem einseitig elektroporiert worden waren (n=4; Abb. 20 A), wiesen eine verstärkte einseitige Auswanderung von *SLUG*-positiven Zellen aus dem dorsalen Neuralrohr auf der elektroporierten Seite auf (Abb. 20 B, Pfeilspitze). Zur Überprüfung, ob die Überexpression des Gens *Cresto* Zellen des Neuralrohrs zum Auswandern veranlassen konnte, wurden die Wanderungseigenschaften der transfizierten Zellen in vitro untersucht. Die Zellen der dorsalen Neuralfalten oder des dorsalen Neuralrohrs wandern nicht nur im Embryo, sondern auch in vitro aus, wenn die dorsalen Neuralfalten oder die dorsalen Neuralrohre auf mit Fibronektin beschichteten Gewebekulturschalen explantiert werden (Dupin und Le Douarin, 1993). Dagegen bringen ventrale Explantate keine wandernden Zellen hervor (Liem et al., 1995).

Daher wurden ventrale Neuralplatten-Explantate aus Embryonen im 10-Somiten-Stadium (HH10) mit dem Fusionsprotein EGFP-HA-Cresto bzw. zur Kontrolle mit einfachem EGFP elektroporiert und anschließend auf mit Fibronektin beschichteten Gewebekulturschalen kultiviert. Während die mit EGFP elektroporierten Explantate keine auswandernden Zellen hervorbrachten (Abb. 20 C-F), wanderte ein Großteil der mit EGFP-HA-Cresto transfizierten Zellen der Explantate in einem Zeitraum von 12 h bis 36 h aus (Abb. 20 G-J).

Neurale Zellen erhielten daher durch die Überexpression des Gens *Cresto* die Eigenschaft, sich aus dem neuralen Ektoderm zu lösen und als einzelne Zellen zu wandern.

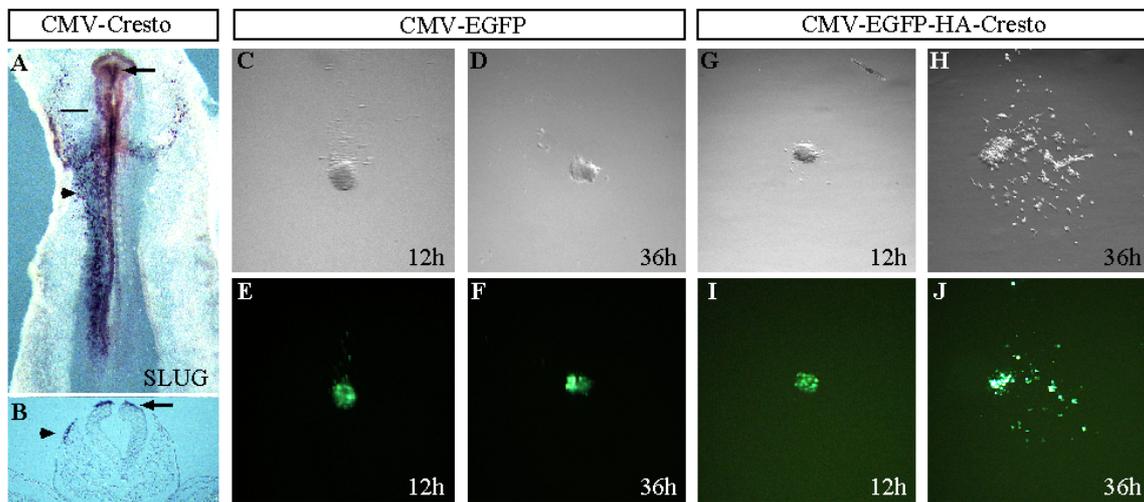


Abb. 20: Die Induktion von Zellwanderung durch die Überexpression des Gens *Cresto*. (A,B) Die Expression von *SLUG* ist nach der Überexpression des Gens *Cresto* in dem Embryo angefärbt. Die endogene Expression von *SLUG* im dorsalen Neuralrohr ist auf der Höhe des Mittelhirns durch einen Pfeil angedeutet. Die einseitig induzierte Expression von *SLUG* ist durch einen Pfeilkopf markiert. Auf der elektroporierten Seite wanderten *SLUG*-positive Zellen verfrüht aus dem dorsalen Neuralrohr aus (B). (C-J) Kulturen von ventralen Neuralplatten-Explantaten aus 10-Somiten-Embryonen auf Fibronektin beschichteten Kulturschalen nach 12 h bzw. 36 h. (C-F) Keine Zellen wanderten aus dem Explantat aus, nachdem diese mit dem Kontrollvektor CMV-EGFP elektroporiert worden waren. (G-J) Nach der Elektroporation des Explantats mit dem Vektor CMV-EGFP-HA-Cresto wanderten nach 12 h viele der elektroporierten Zellen aus dem Explantat.

2.4.3 Die Überexpression der Deletionskonstrukte Cresto A, Cresto B und Cresto C

Um zu überprüfen, ob die beiden konservierten Domänen des Gens *Cresto* (Abb. 16 und 18 in rot und blau) unabhängig voneinander eine Funktion ausüben konnten, wurden die Deletionsmutanten Cresto A, Cresto B und Cresto C erstellt und im Hühnerembryo überexprimiert. Die Überexpression der Deletionsmutante Cresto A, die den Großteil der ersten konservierten Domäne umfaßte (Abb. 18), induzierte die Expression von *DLX5* (n=6; Abb. 21 A,B) und *MSX1* (n=5; Daten nicht gezeigt) in vollem Umfang wie bei der Überexpression des normalen Gens *Cresto*. Die Expression der Marker *Cadherin-6b* und *SLUG* (n=6 bzw. n=4) wurde jedoch von Cresto A nur in einem geringen Umfang und auch nicht in allen Zellen induziert (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression der Deletionsmutante Cresto B, die die zweite konservierte Domäne enthielt (Abb. 16 und 18 in blau), konnte die Expression von *DLX5* (n=4; Abb. 21 C,D) und *MSX1* (n=4; Daten nicht gezeigt) nicht induzieren. Die Expression der späteren Neuralleistenzellmarker *Cadherin-6b* (n=8; Abb. 21 E,F) und *SLUG* (n=5; Abb. 21 G,H) wurde jedoch von Cresto B in vollem Umfang wie durch das vollständige Gen *Cresto* angeschaltet. Wie bei der Überexpression des Gens *Cresto* wurde aber auch durch Cresto B das Epitop HNK-1 nicht induziert (n=6, Daten nicht gezeigt). Die Überexpression der Deletionsmutante Cresto C führte nur zu einer schwachen Aktivierung von *DLX5* (n=4, Abb. 21 I,J) und *MSX1* (n=4, Daten nicht gezeigt), obwohl Cresto C wie Cresto A die erste konservierte Domäne von Cresto einschloß. Die Überexpression der Deletionsmutanten Cresto A, Cresto B und Cresto C ergab, daß Cresto A vor allem *DLX5* und *MSX1* und nur schwach *Cadherin-6b* und *SLUG*, während Cresto B nur *Cadherin-6b* und *SLUG*, nicht aber *DLX5* und *MSX1* induzierte. Cresto C erwies sich im Überexpressionsexperiment als inaktiv.

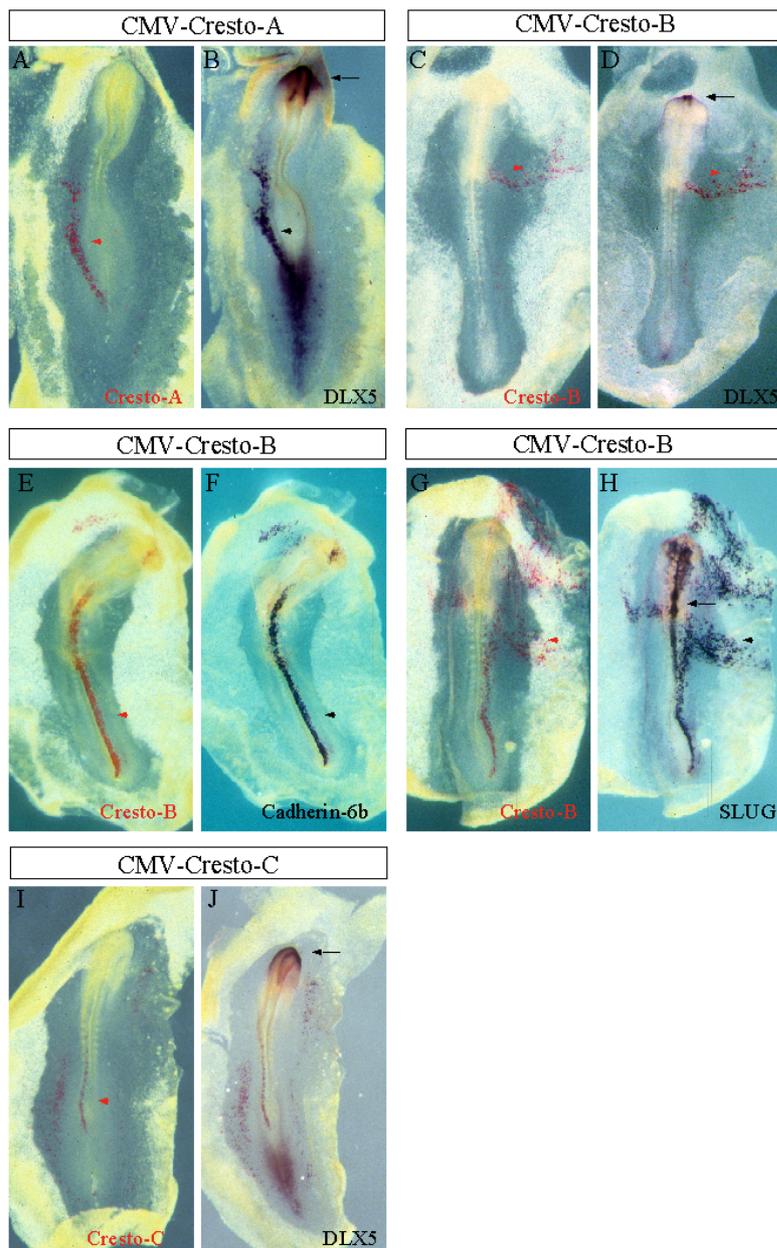


Abb. 21: Überexpression der Deletionsmutanten des Gens *Cresto*, Cresto A, Cresto B und Cresto C in Hühnerembryonen. Die detektierten Genprodukte sind unter jedem Embryo angegeben. Die Expression des Transgens ist in rot angefärbt. Die blaue Färbung markiert die analysierte Expression der Markergene. Die Expression des Transgens ist mit einem Pfeilkopf in rot markiert. Eine induzierte Markergenexpression ist mit einem schwarzen Pfeilkopf markiert. Die endogenen Expressionsdomänen der Markergene sind mit einem schwarzen Pfeil markiert. (A,B) Jede Zelle, die Cresto A exprimiert (A), exprimiert auch *DLX5* (B). (C,D) Keine Zelle, die Cresto B exprimiert (C), exprimiert dagegen *DLX5* (D). (E,F) Die Überexpression von Cresto B induzierte die Expression von *Cadherin-6b*. (G,H) Die Überexpression von Cresto B schaltete auch die Expression von *SLUG* an. (I,J) Die Überexpression von Cresto C induziert die Expression von *DLX5* nur sehr schwach.

2.5 Die Überexpression des Gens *Cresto* in embryonalen Hühnerfibroblasten

2.5.1 Die zelluläre Lokalisation der überexprimierten Proteine EGFP-HA-Cresto, Cresto-his und Cresto-myc

Zur Überprüfung der zellulären Lokalisation des überexprimierten Proteins Cresto wurden embryonale Hühnerfibroblasten transfiziert und auf einem Objektträger kultiviert. Zum einen wurde das am N-Terminus mit EGFP fusionierte Cresto, EGFP-HA-Cresto, direkt durch die Fluoreszenz des grün-fluoreszierenden Proteins nachgewiesen. Zum anderen wurde ein am C-Terminus mit einem Myc- bzw. mit einem His-Tag fusioniertes Protein Cresto mit Hilfe von

monoklonalen Antikörpern untersucht. Es erfolgte eine Anfärbung des Zellkerns mit dem blaufluoreszierenden Farbstoff DAPI.

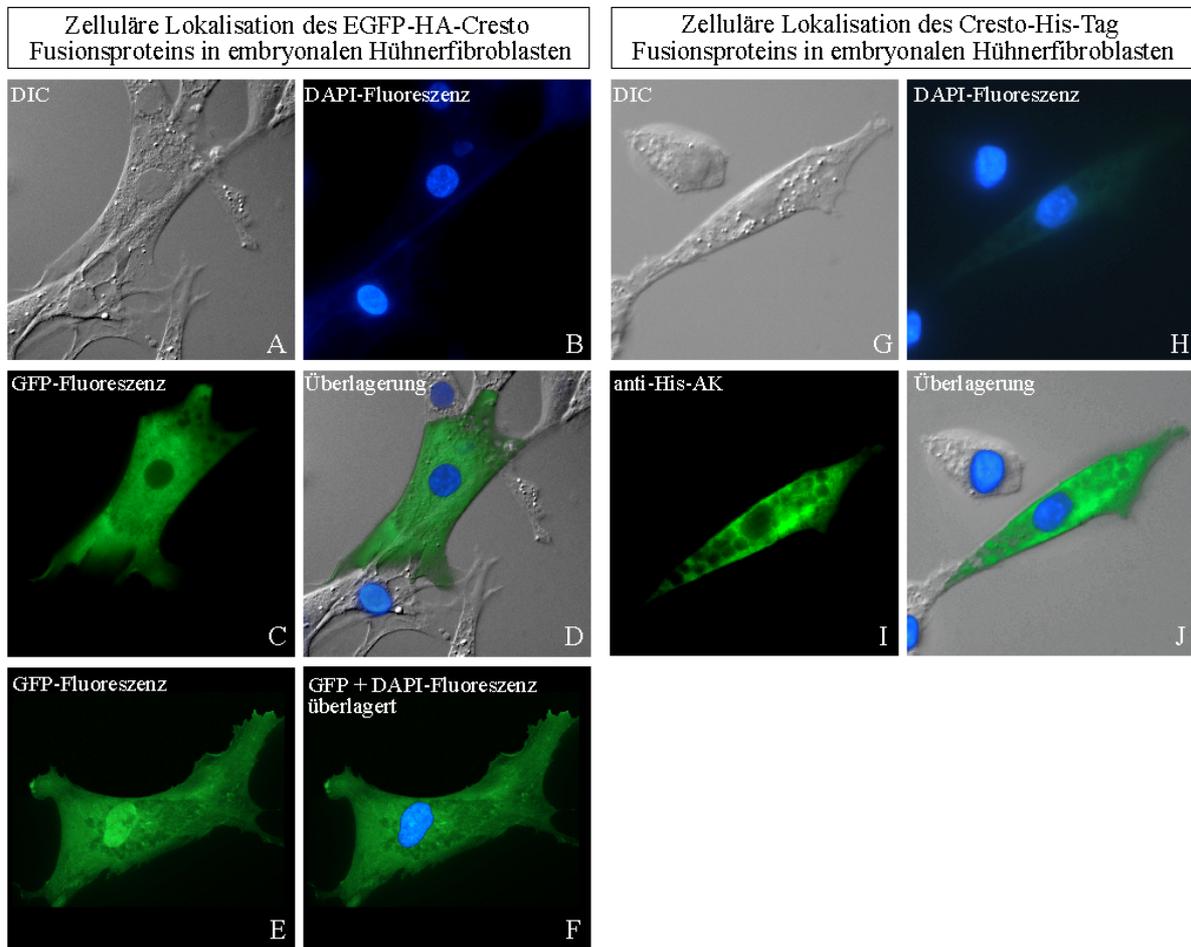


Abb. 22: Zelluläre Lokalisation der Fusionsproteine EGFP-HA-Cresto bzw. Cresto-his nach Überexpression in embryonalen Hühnerfibroblasten. (A) Abbildung einer embryonalen Hühnerfibroblastenzelle, die mit dem Vektor für die Überexpression des Fusionsproteins EGFP-HA-Cresto transfiziert wurde, im Interferenz-Kontrast. (B) Die Zellkerne sind durch den DAPI-Farbstoff sichtbar gemacht. (C) Die Fluoreszenz des Fusionsproteins EGFP-HA-Cresto ist zum größten Teil auf das Zytosol der Zelle beschränkt. (D) Überlagerung der drei ersten Bilder (A-C). (E) In einem Teil der transfizierten Zellen findet sich das Fusionsprotein EGFP-HA-Cresto wie in der abgebildeten Zelle auch im Zellkern. (F) Überlagerung der GFP- und DAPI-Fluoreszenz der in E abgebildeten Zelle. (G) Abbildung einer embryonalen Hühnerfibroblastenzelle, die mit dem Vektor für das Fusionsprotein Cresto-his transfiziert wurde, im Interferenz-Kontrast. (H) Die Zellkerne sind durch den DAPI-Farbstoff sichtbar gemacht. (I) Die Fluoreszenz des Antikörpers gegen den His-Teil des Fusionsproteins Cresto-his ist zum größten Teil auf das Zytosol der Zelle beschränkt. (J) Überlagerung der drei ersten Bilder (G-I).

Sowohl das GFP-Fusionsprotein als auch die mit dem Myc- bzw. His-Tag fusionierten Varianten wurden in den meisten transfizierten Zellen im Zytosol detektiert (Abb. 22 A-D,G-J). In einem kleinen Teil der transfizierten Zellen wurden die Proteine neben dem Zytoplasma auch im Zellkern beobachtet (Abb. 22 E,G, 1 bis 3% der transfizierten Zellen).

2.5.2 Der Einfluß von *Cresto* in embryonalen Hühnerfibroblasten auf die Expression der Gene *MSX1*, *SLUG* und *DLX5*

Die Überexpression von *Cresto* im sich entwickelnden Hühnerembryo war ausreichend, um in jeder transfizierten Zelle ein Expressionsprofil hervorzurufen, das charakteristisch für frühe Neuralleistenzellen ist (Tab. 20). Um zu untersuchen, ob auch andere Zellen die Kompetenz aufwiesen, in dieser Form auf eine Überexpression von *Cresto* zu reagieren, wurden die mit dem EGFP-HA-*Cresto* transfizierten, embryonalen Hühnerfibroblasten auf die Expression der Markergene *MSX1*, *SLUG* und *DLX5* mit Hilfe der RT-PCR untersucht.

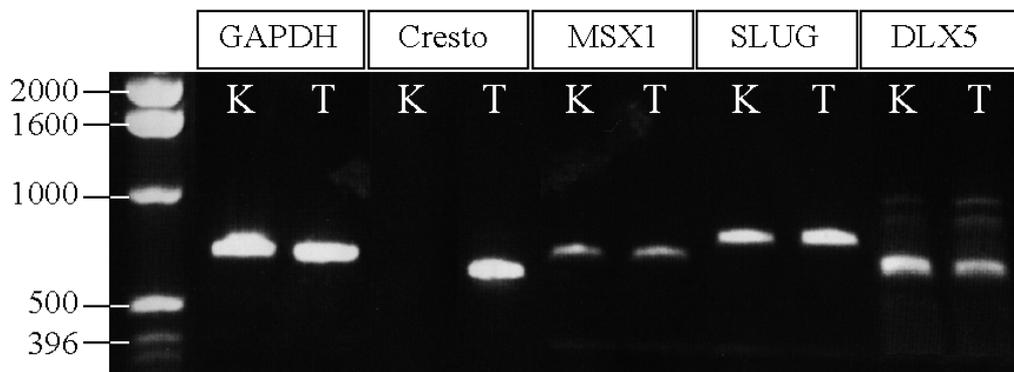


Abb. 23: Analyse der Genexpression der transfizierten embryonalen Hühnerfibroblasten mit Hilfe der RT-PCR. Die PCR wurde zur Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge für die Amplifikation von *GAPDH* mit 22 Zyklen durchgeführt. Die Amplifikation von *Cresto*, *MSX1*, *SLUG* und *DLX5* erfolgte mit je 30 Zyklen. Links ist der Größenmarker aufgetragen (Angaben in bp). Die Spuren mit cDNA der nicht-transfizierten Zellen sind mit (K) und die der mit EGFP-HA-*Cresto* transfizierten Zellen mit (T) markiert.

Aus einer konfluenten Zellkulturschale (Durchmesser 5,3 cm) wurden 20 bis 40 µg Gesamt-RNA isoliert. Als Kontrolle für die Menge an eingesetzter RNA bzw. cDNA wurden Transkripte für die Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (*GAPDH*) mit spezifischen Primern nachgewiesen (Abb. 23, *GAPDH*). Die unbehandelten, embryonalen Hühnerfibroblasten exprimierten das Gen *Cresto* nicht (Abb. 23, *Cresto*, K). Die Expression von *Cresto* konnte nur in den transfizierten Zellen detektiert werden (Abb. 23, *Cresto*, T). Die Analyse der Markergene *MSX1*, *SLUG* und *DLX5* ergab keine signifikante Veränderung gegenüber den nicht-transfizierten Zellen (Abb. 23, *MSX1*, *SLUG*, *DLX5*, K und T). Überraschenderweise exprimierten die embryonalen Hühnerfibroblasten allerdings alle drei Markergene bereits im nicht-transfizierten Zustand. Dennoch war eine Verstärkung der Expression dieser Gene in den transfizierten Zellen nicht zu beobachten.

Insgesamt hatte die Überexpression des Gens *Cresto* in den embryonalen Hühnerfibroblasten keinen Einfluß auf die Expression der frühen Neuralleistemarkergene wie *DLX5*, *MSX1* und

SLUG.**2.6 Die Überexpression des Gens *SLUG* im Hühnerembryo**

Die funktionelle Inaktivierung des Gens für den Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *SLUG* durch Gegenstrang-Oligonukleotide verhindert die normale Entwicklung der Neuralleistenzellen (Nieto et al., 1994). Um die Funktion des Gens *SLUG* im Überexpressionsexperiment zu analysieren, wurde ein vom CMV-Promoter kontrollierter Expressionsvektor für *SLUG* in Hühnerembryonen im Primitivstreifenstadium HH3+ bis HH4 überexprimiert. Anschließend wurden die Embryonen mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung gleichzeitig auf die Expression des Transgens und auf die Expression eines Markergens untersucht (Tab. 20).

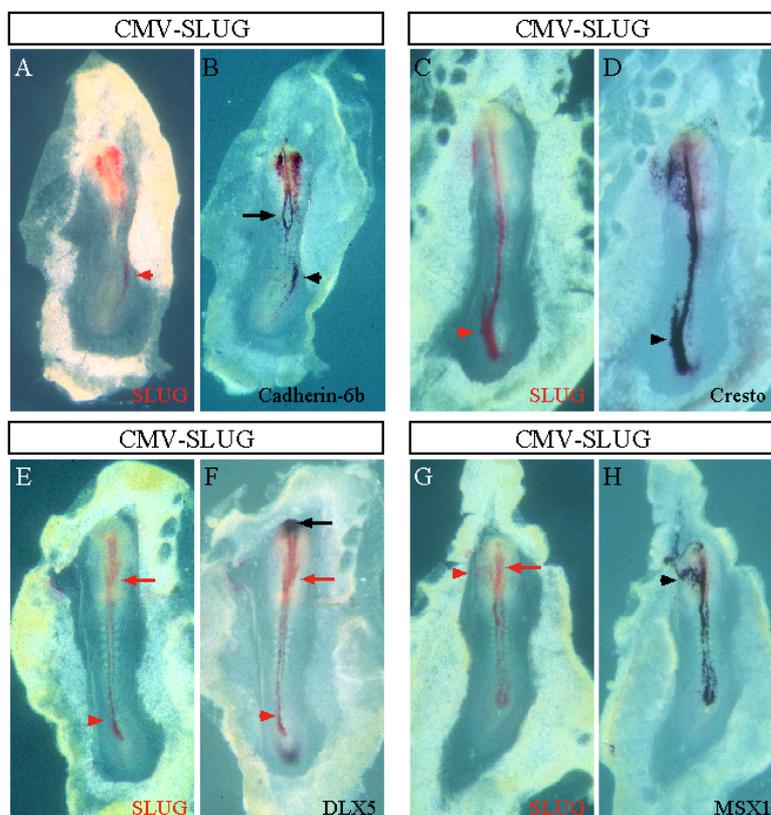


Abb. 24: Überexpression des Gens *SLUG* in Hühnerembryonen. Die detektierten Genprodukte sind unter jedem Embryo angegeben. Die Expression des Transgens *SLUG* ist in rot angefärbt. Die blaue Färbung markiert die analysierte Expression der Markergene. Die Expression des Transgens *SLUG* ist mit einem rotem Pfeilkopf markiert. Eine induzierte Markergenexpression ist mit einem schwarzen Pfeilkopf markiert. Die normalen Expressionsdomänen der Markergene sind mit einem schwarzen Pfeil markiert. (A,B) Jede Zelle, die *SLUG* exprimierte (A), exprimierte auch *Cadherin-6b* (B). (C,D) Jede Zelle, die *SLUG* exprimierte (C), exprimierte auch *Cresto* (D). (E,F) Die Überexpression von *SLUG* (E) induzierte nicht die Expression von *DLX5* (F). (G,H) Jede Zelle, die *SLUG* exprimierte (G), exprimierte auch *MSX1* (H).

Die Überexpression des Gens *SLUG* führte nicht zur Induktion von *BMP4* (n=3, Daten nicht gezeigt) oder *DLX5* (n=4, Abb. 24 E,F). Die Überexpression von *SLUG* schaltete die Expression des Gens *Cresto* in jeder elektroporierten Zellen an (n=8, Abb. 24 C,D). Darüber hinaus induzierte die Überexpression von *SLUG* auch die Expression von *MSX1* (n=4, Abb. 24 G,H) und von *Cadherin-6b* (n=5, Abb. 24 A,B) in jeder transfizierten Zelle. Die Expression von *SOX10* (n=5, Daten nicht gezeigt) wurde in einem Teil der transfizierten Zellen induziert. Die

Expression der späteren Neuralleistenzellmarker wie *Cadherin-7* (n=3, Daten nicht gezeigt) und HNK-1 (n=3, Daten nicht gezeigt) wurde dagegen durch die Überexpression von *SLUG* nicht erreicht.

Insgesamt induzierte die Überexpression des Transkriptionsfaktors *SLUG* ein ähnliches Expressionsprofil wie *Cresto* mit der Ausnahme von *DLX5* und *Cadherin-7*.

Diskussion

Das Ektoderm der Wirbeltierembryonen untergliedert sich in drei verschiedene Regionen, dem späteren zentralen Nervensystem, den Neuralleistenzellen und dem Oberflächenektoderm (der Epidermis). Die hier vorgestellten Experimente konzentrierten sich auf die ersten beiden Aspekte dieser ektodermalen Differenzierung. Der erste Teil der Arbeit beschreibt die zellulären Interaktionen, die bei der Induktion des anterioren Teils des zentralen Nervensystems, des Vorderhirns, im Wirbeltierembryo beteiligt sind und vergleicht dabei die Vögel und die Säugetiere am Beispiel der Hühner- bzw. der Kaninchenembryonen. Im zweiten Teil der Arbeit wird die Rolle des Zink-Finger-Transkriptionsfaktors *SLUG* und des in dieser Arbeit identifizierten Gens *Cresto* bei der Induktion der Neuralleistenzellen im Hühnerembryo mit Hilfe von Überexpressionsexperimenten analysiert.

1. Die Induktion der Vorderhirnanlage im Wirbeltierembryo

1.1 Die Induktion der Vorderhirnanlage im Hühnerembryo

Der zentrale/mediale Teil des Ektoderms entwickelt sich zum zentralen Nervensystem, das zunächst als Verdickung des Ektoderms in Form der Neuralplatte erkennbar wird und sich dann zum Neuralrohr einrollt und abschnürt. Die Anlage des Vorderhirns findet sich bei dem Hühnerembryo wie bei allen Wirbeltieren in dem anterioren Teil der Neuralplatte (Spratt, 1952; Garcia-Martinez et al., 1993), die sich im Hühnerembryo bereits vor dem vollendeten Primitivstreifenstadium auszubilden beginnt (Schoenwolf, 1991). Erste Anzeichen für die Induktion der Vorderhirnanlage finden sich wenig später in der ersten Expression des Homeoboxgens *GANF* in der anterioren Neuralplatte im frühen prächordalen Plattenstadium (Kazanskaya et al., 1997; Knoetgen et al., 1999b).

Die Induktion der anterioren Identität in der Neuralplatte geht vor allem auf vertikale Signale aus der dem Ektoderm unterliegenden Zellschicht zurück (zur Übersicht: Ruiz i Altaba, 1993). Als mögliche Kandidaten für die Quelle des anteriorisierenden Signals kommen daher die Gewebe in Betracht, die in der zeitlichen Abfolge dem anterioren Ektoderm unterliegen, also zunächst die Zellen des anterioren, primitiven Endoderms und nach dem Beginn der Gastrulation die Zellen des definitiven Endoderms und des axialen Mesoderms, der prächordalen Platte (Abb. 3).

Die Rolle, die das primitive Endoderm bei der frühen Entwicklung des Ektoderms hat, wurde bereits in mehreren Studien untersucht. In Experimenten, in denen der gesamte Hypoblast rotiert wurde, zeigte sich, daß die Orientierung des Hypoblasts unter dem Ektoderm die Orien-

tierung des Primitivstreifens beeinflussen kann (Waddington, 1932; Waddington, 1933; Azar und Eyal-Giladi, 1981; Foley et al., 2000). Der posteriore Hypoblast spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Primitivstreifens (Spratt, 1946; Khaner, 1995; Bachvarova et al., 1998; Böttger et al., 2000). In allen bisher durchgeführten Untersuchungen sind jedoch keine eindeutigen Induktionen von neuralem Ektoderm, die durch Zellen des Hypoblasten im Hühnerembryo hervorgerufen wurden, berichtet worden (Callebaut et al., 1999). Insbesondere ist auch die Rolle des Hypoblasten bei der Induktion der anterioren Neuralplatte bisher nicht nachgewiesen worden. Die hier durchgeführten Transplantationsexperimente von Zellen des anterioren Hypoblasten führten weder zu einer morphologischen Verdickung des Ektoderms noch zu einer Induktion des Gens *GANF* (Abb. 10 A,E). Auch das definitive Endoderm erwies sich in dieser Hinsicht als negativ. Diese Experimente belegen, daß das anteriore, primitive Endoderm wie auch das anteriore, definitive Endoderm im Hühnerembryo nicht das induzierende Signal für die Anlage des Vorderhirns enthalten. Das anteriore, primitive Endoderm ist nicht hinreichend, um die Vorderhirnanlage zu induzieren.

Allerdings ist eine intakte untere Zellschicht, bestehend aus den Zellen des Hypoblasten und des definitiven Endoderms, für eine Ausbildung und richtige Positionierung des prächordalen Mesoderms unter dem anterioren Ektoderm erforderlich. In Experimenten, in denen der Hypoblast und das anteriore, definitive Endoderm entfernt wurden, konnten die Zellen des prächordalen Mesoderms nicht an ihre normale Position wandern (Knoetgen et al., 1999b). Die Anlage des Vorderhirns wurde damit gemessen an der Expressionsdomäne des Gens *GANF* verkleinert. Das primitive und definitive Endoderm ist daher notwendig aber nicht ausreichend für eine normale Entwicklung der Vorderhirnanlage, da es das induzierende Signal selbst nicht enthält. Dieses wird vielmehr von den Zellen des prächordalen Mesoderms, der prächordalen Platte ausgesendet, wie bereits durch mehrere Arbeiten bestätigt wurde (Dale et al., 1997; Foley et al., 1997; Li et al., 1997; Pera und Kessel, 1997; Shimamura und Rubenstein, 1997; Knoetgen et al., 1999b). Die Transplantationsexperimente des prächordalen Mesoderms ergaben, daß das prächordale Mesoderm sowohl erforderlich als auch ausreichend ist für die Induktion des Gens *GANF* in der anterioren Neuralplatte.

Die Zellen des prächordalen Mesoderms wandern während der Gastrulation aus der Spitze des Primitivstreifens, dem Hensenschen Knoten, unter die zukünftige Vorderhirnanlage. Die Spitze des Primitivstreifens enthält daher, bevor die prächordalen Zellen auswandern, noch das Signal die Anlage eines Vorderhirns zu induzieren. Nachdem die Zellen des prächordalen Mesoderms ausgewandert sind, verliert der Knoten dieses Potential und induziert nur noch posteriores

Neuralgewebe (Dias und Schoenwolf, 1990; Storey et al., 1992).

Die Spitze des Primitivstreifens des Hühnerembryos, der Hensensche Knoten, kann daher zu Recht auch als Organisator im Spemannschen Sinne bezeichnet werden. Die Transplantation des Knotens im Entwicklungsstadium HH3+ und HH4, bevor das axiale Mesoderm den Knoten verlassen hat, führt zu der ektopischen Ausbildung einer Neuralachse, die sowohl anteriore als auch posteriore Identitäten aufweist (Abb. 11 A,B,E,F).

Die Orientierung der ektopischen Achse ist in den meisten Fällen Kopf an Kopf zu der des Wirtsembryos wie in Abb. 11 A,E ausgebildet. Dies könnte dafür sprechen, daß der Hypoblast schon vor der Gastrulation einen Einfluß auf das Ektoderm ausübt und die induzierte ektopische Achse auf den Hypoblasten zuwächst. Allerdings tritt in einigen Fällen auch die umgekehrte Orientierung der induzierten Achse auf, wobei sie in den extraembryonalen Teil hineinwächst, der zu keinem Zeitpunkt mit primitivem Endoderm in Kontakt stand (Abb. 11 B,F). Diese Fälle belegen, daß die Anlage des Vorderhirns durch den Knoten auch im naiven Ektoderm erfolgen kann und daß der Hypoblast dafür nicht notwendig ist. Allerdings waren diese induzierten Vorderhirnanlagen im Vergleich zu den Vorderhirnanlagen in den Kopf-an-Kopf-orientierten Achsen wesentlich kleiner (zum Vergleich Abb. 11 A und B). Dies könnte wieder auf die unterstützende Funktion des primitiven Endoderms zurückzuführen sein, so daß im Ektoderm, das Signale vom primitiven Endoderm erhalten hat, die Induktion der Vorderhirnanlage durch das prächordale Mesoderm aus dem Knoten viel ausgeprägter ist als im naiven Ektoderm, das nie unter dem Einfluß des primitiven Endoderms stand.

Die Induktion der Vorderhirnanlage im Hühnerembryo entspricht insgesamt der der Amphibien (zusammengefaßt in Harland und Gerhart, 1997; Abb. 25). Die Induktion wird bei den Hühnerembryonen wie bei den Amphibien während der Gastrulation durch die Zellen des prächordalen Mesoderms unter das anteriore Ektoderm getragen. Das anteriore, definitive Endoderm trägt zu dieser Induktion weder in den Hühnerembryonen noch in den Amphibienembryonen bei (Bouwmeester et al., 1996). Insbesondere hat das primitive Endoderm, über das die Vögel wie alle Amnioten nicht aber die Amphibien verfügen, nicht das Signal, das die Vorderhirnanlage induziert, übernommen (Abb. 25). Das für die Amphibien aufgestellte Spemannsche Konzept über das organisierende Zentrum in der dorsalen Blastoporenlippe und deren Derivate, das sowohl den Kopf als auch den Rumpf induziert, trifft daher auch für die Vögelembryonen zu.

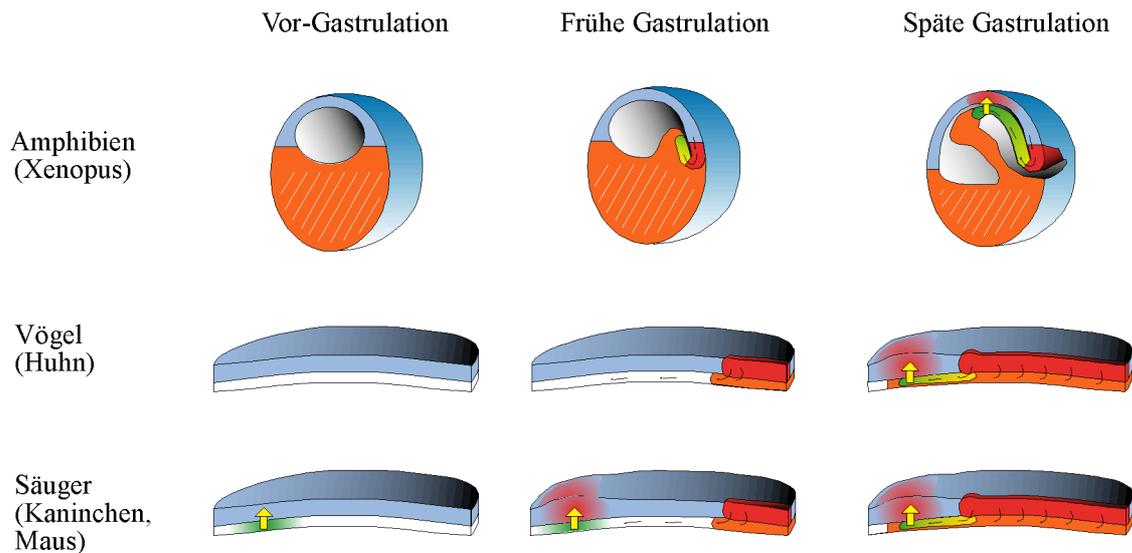


Abb. 25: Schematischer Vergleich der Induktion der Vorderhirnanlage zwischen dem Amphibienembryo (*Xenopus laevis*), dem Hühnerembryo und dem Säugerembryo (Kaninchen und Maus). Der Ursprung des induzierenden Signals (gelber Pfeil) liegt sowohl bei den Amphibien als auch bei den Vögeln in dem anterioren, axialen Mesoderm (der prächordalen Platte; in grün dargestellt). Im Unterschied dazu gehen induzierende Signale bei den Säugerembryonen bereits von dem anterioren, primitiven Endoderm aus, die von Signalen aus dem axialen Mesoderm jedoch wiederholt werden. Die induzierte Vorderhirnanlage ist in hellrot unterlegt. Das Ektoderm ist hellblau, die dorsale Blastoporenlippe im Froschembryo und der HensenHensensche Knoten im Hühner- bzw. Säugerembryo rot, das primitive Endoderm weiß, das definitive Endoderm orange und das axiale Mesoderm gelb gefärbt.

1.2 Induktion der Vorderhirnanlage im Säugerembryo

1.2.1 Die Induktion der Vorderhirnanlage im Säugerembryo durch das anteriore, primitive Endoderm

Im Mausembryo scheint die Induktion der Vorderhirnanlage zeitlich früher als im Hühnerembryo stattzufinden (siehe Einleitung). Dies scheint auch für den Kaninchenembryo zuzutreffen, da das Ortholog des anterioren Neuralplattenmarkergens *GANF*, das in der Maus wie im Kaninchen *HESX-1* heißt, sowohl in der Maus (Thomas und Beddington, 1996) als auch im Kaninchen (persönliche Mitteilung von C. Viebahn) zu Beginn der Gastrulation im anterioren, primitiven Endoderm und dann wenig später im anterioren Ektoderm exprimiert ist, während es im Hühnerembryo erst im prächordalen Plattenstadium exprimiert wird. Außerdem ist das anteriore Ende der Kaninchenembryonen im Vorprimitivstreifen, morphologisch erkennbar, verdickt (Viebahn et al., 1995; Abb. 8H), was möglicherweise ein weiteres Anzeichen für den frühen Induktionsprozeß ist.

Das anteriore, primitive Endoderm des Kaninchenembryos aus dem Vorgastrulations- bzw. frühen Gastrulationsstadium rief eine bemerkenswerte Neuralinduktion im naiven Ektoderm

des Hühnerembryos, die von der Expression von neuralen und anterioren Markern begleitet wurde, hervor. Damit konnte erstmalig in einem direkten Transplantationsexperiment das induktive Potential des anterioren, primitiven Endoderms eines Säugetierembryos nachgewiesen werden. Gleichzeitig warfen diese Ergebnisse jedoch die Frage auf, ob das anteriore, primitive Endoderm die Induktion der Vorderhirnanlage vom Knoten und seinem Derivat, dem prächordalen Mesoderm, übernommen hatte, oder ob das anteriore, primitive Endoderm zusätzlich zu den Signalen aus dem Knoten agierte.

1.2.2 Der Einfluß des Knotens des Kaninchenembryos auf die Anlage des Vorderhirns

Die Transplantation des Knotens aus dem Kaninchenembryo unter das naive Ektoderm des Hühnerembryos ergab ein mit der Transplantation des Hühnerknotens weitgehend vergleichbares Ergebnis. Der Knoten aus dem Kaninchenembryo konnte eine komplette, sekundäre Neuralachse induzieren, die immer aus anterioren Identitäten (dem Vorderhirn) und aus posterioren Identitäten (dem Mittelhirn, Hinterhirn und Rückenmark) bestand. Auch die Größe der induzierten, sekundären Neuralachsen war mit denen der durch den Hühnerknoten hervorgerufenen vergleichbar. Dies beweist, daß die Signale, die zur Induktion der Vorderhirnanlage führen, auch im Knoten der Kaninchenembryonen enthalten sind und daß diese Signale zwischen dem Kaninchen und dem Huhn so weit konserviert worden sind, daß sie untereinander austauschbar sind. Die gleichen Ergebnisse wurden auch durch L. Wittler und U. Teichmann bei den Transplantationen von Knoten aus Mäuseembryonen in Hühnerembryonen erhalten (Knoetgen et al., 2000).

Damit scheint das Fehlen der anterioren Strukturen, das bei den Transplantationen der Knoten der Maus in den Mausembryo beobachtet worden war (Beddington, 1994; Tam et al., 1997; Tam und Steiner, 1999), an der fehlenden Kompetenz des Ektoderms an der Implantationsstelle statt auf ein Fehlen des induzierenden Signals im Knotengewebe der Maus zurückzuführen zu sein. Die Transplantationen wurden in die Region des zukünftigen Hinterhirns und des Rückenmarks durchgeführt, die schon unter dem Einfluß von posteriorisierenden Signalen gestanden hatte (Muhr et al., 1999). In diesem Fall scheint das anteriorisierende Signal des Knotens nicht mehr ausreichend zu sein, um die an der Implantationsstelle vorherrschenden posteriorisierenden Signale zu neutralisieren.

Im Unterschied zu den sekundären Neuralachsen, die mit dem Hühnerknoten induziert wurden, unterblieb bei den Transplantationen des Kaninchenknotens jedoch die Selbstdifferenzierung des Transplantats, da die Zellen des Kaninchenembryos zwar lange genug im Wirtsembryo

überlebten, um die sekundären Achsen zu induzieren, aber nicht lange genug, um sich zu chimären, ektopischen Neuralachsen aus Kaninchen- und Hühnerzellen zu entwickeln. Bei den Transplantationen des Hühnerknotens entwickelte sich das transplantierte Knotengewebe entsprechend seinem normalen Schicksal in axiales Mesoderm, das die Marker *CH-T* und *CNOT1* exprimierte und zwischen Endoderm und Ektoderm einwanderte. Gleichzeitig verhinderte der transplantierte Knoten vermutlich durch „anti-dorsalisierende“ Signale wie dem TGF β Faktor ADMP die Induktion von Organisatorqualitäten im Ektoderm des Wirtsembryos an der Transplantationsstelle (Yuan et al., 1995; Joubin und Stern, 1999). Dadurch, daß sich das transplantierte Kaninchengewebe allerdings nicht im Hühnerembryo etablieren konnte, blieb diese Unterdrückung aus. Im Gegensatz zu den transplantierten Hühnerknoten konnte die Expression von *CH-T* und *CNOT1* an der Implantationsstelle des Kaninchenknotens deswegen im Hühnerektoderm induziert werden.

Insgesamt zeigen die hier vorgestellten Experimente, daß das Signal zur Induktion der anterioren, neuralen Identität auch im Organisator des Kaninchenembryos enthalten ist und nicht ausschließlich in das anteriore, primitive Endoderm vorverlagert wurde. Während jedoch das anteriore, primitive Endoderm des Kaninchenembryos die Ausbildung einer Neuralplatte mit anteriorem Charakter induziert, ist die durch den Knoten hervorgerufene Induktion viel weitreichender. Der durch das anteriore, primitive Endoderm hervorgerufenen anterioren Neuralplatte fehlten offensichtlich die Signale, die sie in Neuralfalten oder gar in ein Neuralrohr differenzieren ließen. So wurde auch die Expression des späten Neuralmarkers *SOX2* nicht durch die Transplantate des primitiven Endoderms erreicht. Die durch den Knoten hervorgerufenen neuralen Strukturen bildeten dagegen Neuralfalten und gelegentlich auch geschlossene Neuralrohre. Der Knoten ist damit auch für die Säugetiere von entscheidender Bedeutung für die Induktion der Vorderhirnanlage, wie dies auch kürzlich an Mäuseembryonen durch die gleichzeitige genetische Inaktivierung der vom Knoten und der prächordalen Platte sezernierten Faktoren Chordin und Noggin deutlich wurde. Diese Mutanten können zwar über das anteriore, primitive Endoderm die Induktion der Vorderhirnanlage initiieren, verlieren aber dennoch anteriore, neurale Strukturen, da die zweite Induktion durch den Knoten ausbleibt (Bachiller et al., 2000).

1.2.3 Das induktive Potential entlang des Primitivstreifens

Verschiedene Abschnitte des Primitivstreifens besitzen unterschiedliche induktive Eigenschaften, die wiederum zwischen dem Kaninchen und den Hühnern konserviert zu sein

scheinen (Gallera und Nicolet, 1969; Storey et al., 1992; Lemaire et al., 1997; Joubin und Stern, 1999). Die anteriore Spitze des Primitivstreifens induzierte anteriores Neuroektoderm in Abwesenheit von mesodermalen Markern, wie dies in den Fällen in Abb. 12 A,M,O dargestellt ist, während die hinter dem Knoten entnommenen Transplantate neurales Gewebe von Hinterhirn und Rückenmarkqualität und immer auch mesodermale Marker induzierten (Abb. 13 A,B,L,M). Vermutlich führte daher die Transplantation eines Primitivstreifentransplantats, das neben der Spitze des Primitivstreifens auch noch einen weiter posterior gelegenen Teil des Primitivstreifens einschloß, zu der Induktion einer sekundären Achse, die sowohl aus anteriorem und posteriorem Neuroektoderm als auch aus mesodermalen Vorläuferzellen bestand (Abb. 12 B,N,P).

Der noch weiter posteriore Teil des Primitivstreifens, der etwa der Mitte des Primitivstreifens entspricht, induziert dagegen einen sekundären Primitivstreifen in Abwesenheit von neuronalen und anterioren Primitivstreifenmarkern (Lemaire et al., 1997). Reine Neuralinduktion ist damit auf die anteriore Spitze des Primitivstreifens beschränkt, während reine Mesoderminduktion auf die Mitte des Primitivstreifens beschränkt ist. Dazwischen findet sich eine von anterior nach posterior verlaufende Abnahme der neuralinduzierenden Qualität und eine Zunahme an mesoderminduzierender Qualität. Außerdem induzieren weiter anteriore Transplantate weiter anterior gelegene Marker des Ektoderms und des Mesoderms.

1.3 Vergleich des primitiven Endoderms von Säugetier- und Vogelembryonen

Sowohl die Säugetier- als auch die Vogelembryonen verfügen über primitives Endoderm. Allerdings wird nur in Säugetierembryonen das anteriore, primitive Endoderm als Signalzentrum zur Induktion der anterioren, neuronalen Identität herangezogen (s.o.). Dennoch weisen das primitive Endoderm der Säugetier- und der Vogelembryonen neben ihrem extraembryonalen Zellschicksal zahlreiche Gemeinsamkeiten auf. Viele molekulare Marker wie die Gene *Lim1*, *HNF3b*, *Cer-1*, *Otx2*, *Gsc* und *Hex* sind im anterioren, primitiven Endoderm der Mäuse- (Shawlot et al., 1999; Filosa et al., 1997; Belo et al., 1997; Biben et al., 1998; Shawlot et al., 1998; Ang et al., 1994; Thomas et al., 1998) und des Hühnerembryos exprimiert (eigene Beobachtung; Ruiz i Altaba et al., 1995; Rodriguez-Esteban et al., 1999; Bally-Cuif et al., 1995; Izpisua-Belmonte et al., 1993; Yatskievych et al., 1999).

Es bestehen jedoch auch einige Unterschiede zwischen dem Mäuse- und dem Hühnerembryo, die vor allem auf der unterschiedlichen Herkunft des primitiven Endoderms beruhen. Das primitive Endoderm der Mäuseembryonen entsteht aus den Zellen, die den Epiblasten bereits bei dessen Entstehung umhüllen und daher vom Beginn an dem Epiblasten benachbart sind

(Kaufmann, 1992). Früh in der Entwicklung ist der Epiblast im Hühnerembryo nicht von primitivem Endoderm unterlegen. Das primitive Endoderm entsteht in zwei Schritten aus dem Epiblasten. Zunächst delaminieren einige Epiblastzellen und bilden den primären Hypoblast (Eyal-Giladi und Kochav, 1976). Danach schieben sich vom posterioren Pol weitere Hypoblastzellen unter den Epiblasten. Erst dann ist der Epiblast von einer geschlossenen Hypoblastschicht unterlegen. Die im Vergleich zu dem Mäuseembryo späte Entstehung des primitiven Endoderms schließt eine frühe induktive Rolle des primitiven Endoderms im Hühnerembryo aus. So ist das Gen *OTX2* bereits zu einem Zeitpunkt im Epiblasten des Hühnerembryos exprimiert, zu dem der Hypoblast noch nicht unter dem Epiblasten entstanden ist (Bally-Cuif et al., 1995). Dies schließt aus, daß der Hypoblast ein Signal aussendet, daß für die Induktion von *OTX2* im Epiblasten benötigt wird, wie dies für den Mausembryo angenommen wird. Die Expression des Gens *Otx2* im primitiven Endoderm der Maus ist essentiell für dessen Induktion im Ektoderm (Rhinn et al., 1998). Ein weiterer Unterschied äußert sich in der Expression des Vorderhirnmarkers der ANF-Familie. Das Gen *Hesx1/Rpx* der Maus ist zu Beginn der Gastrulation im anterioren, primitiven Endoderm exprimiert, während das Ortholog der Hühner, das Gen *GANF*, erst nach der Einwanderung des prächordalen Mesoderms transkribiert wird.

Insgesamt zeigen sich neben einigen Gemeinsamkeiten wichtige Unterschiede in der Genexpression, Herkunft und Funktion des primitiven Endoderms zwischen den Säugetier- und Hühnerembryonen.

1.4 Vergleich der anterioren Neuralinduktion in Amphibien, Vögeln und Säugern

Im Embryo der Amphibien stammen die Signale der anterioren Neuralinduktion vom Organisator, der dorsalen Blastoporenlippe, dessen anteriorem Derivat, dem prächordalen Mesoderm (Abb. 25). Die Amnioten besitzen mit dem primitiven Endoderm eine neue Struktur, die vor der Gastrulation dem späteren Vorderhirn unterliegt und daher prinzipiell als vom Organisator unabhängiges Signalzentrum zur Induktion der Vorderhirnanlage eingebunden werden könnte. Allerdings zeigt sich, daß das primitive Endoderm der Hühnerembryonen nicht dazu verwendet wird, so daß die Induktion der anterioren Neuralplatte und des späteren Vorderhirns ausschließlich von einem Signalzentrum, dem Organisator, wie bei den Amphibien abhängt (Abb. 25). Die Säugetierembryonen haben dagegen ihr primitives Endoderm in den Dienst der anterioren Neuralinduktion gestellt. Aus diesem Grund trifft das klassische Organisatorexperiment nicht für die Säugetierembryonen zu. Die initiale Induktion der anterioren Neuralplatte wird zu einem früheren Zeitpunkt und unabhängig von dem Organisator geschaffen. Aller-

dings haben die Säugetierembryonen den Organisator als Signalzentrum zur Induktion der Vorderhirnanlage nicht gänzlich aufgegeben. Der Organisator der Säugetierembryonen ist ein starker, anteriorer Neuralinduktor geblieben. Die doppelte Anlage des Kopforganisators bei den Säugetierembryonen steht im Widerspruch zur einfachen Anlage in Frosch- und Hühnerembryonen, in denen sie ausschließlich auf Signale aus dem klassischen Organisator, der dorsalen Blastoporenlippe bzw. dem Hensenschen Knoten, und dessen Derivat, dem prächordalen Mesoderm, zurückgeht.

Aufgrund der Verlagerung des Signalzentrums in das anteriore, primitive Endoderm können die Säugetierembryonen schon vor dem Einwandern des axialen Mesoderms mit der Anlage der anterioren Neuralplatte beginnen. Die zeitliche Verschiebung eines entwicklungsbiologischen Prozesses, die Heterochronie, ist als ein evolutionärer Mechanismus bekannt (Gould, 1977). Im hier diskutierten Fall bezieht sich der heterochrone Prozeß auf die Anlage der anterioren Neuralplatte, die die Anlage des Telenzephalons einschließt. Ob die Größen und prinzipiellen Unterschiede zwischen dem Telenzephalon des Vogels und der Säuger auf diese heterochrone Verschiebung zurückgehen könnten, bleibt aber weiterhin fraglich, zumal wenig später die Entwicklungsstadien über gut vergleichbare Zwischenstufen verfügen und die ersten morphologischen Unterschiede des Telenzephalons erst sehr viel später hervortreten (Fernandez et al., 1998).

2. Die Rolle der Gene *Cresto* und *SLUG* bei der Entwicklung der Neuralleistenzellen im Hühnerembryo

2.1 *Cresto* und *Geminin*

Die aus der cDNA abgeleitete Primärstruktur des Proteins *Cresto* ist mit dem bereits beschriebenen Protein *Geminin* aus dem Frosch *Xenopus laevis* und mit Proteinen aus dem Menschen, der Maus und der Fliege *Drosophila melanogaster*, die in Datenbanken gefunden wurden, verwandt (Abb. 16; Kroll et al., 1998; McGarry und Kirschner, 1998). Allerdings ist die Homologie mit etwa 50% für den Frosch, die Maus und den Menschen bzw. 19% für die Fliege vergleichsweise gering. Auch die für das Gen *Geminin* bekannten Daten weisen deutliche Abweichungen zu dem Gen *Cresto* auf. Nur die frühe Expression von *Cresto* und *Geminin* in der Neuralplatte ist ähnlich (Abb. 17; Kroll et al., 1998). Während der weiteren Entwicklung differieren die Expressionsdomänen erheblich. Nachdem sich das Neuralrohr geschlossen hat, ist *Geminin* sowohl ventral als auch dorsal im Neuralrohr, im anterioren Gehirn, in den Augen- und Gehörvesikeln, in der Nase und in Neuralleistenzellen im Kopf exprimiert (Kroll et al., 1998). Die Expression des Gens *Cresto* ist dagegen auf das dorsale Neuralrohr und die auswandernden Neuralleistenzellen beschränkt (Abb. 17). Darüber hinaus ist die zelluläre Lokalisation beider Proteine unterschiedlich. *Geminin* ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, während *Cresto* vor allem im Zytosol und nur selten neben dem Zytosol auch im Zellkern gefunden wurde (Abb. 22). Auch die funktionellen Daten aus den Überexpressionsexperimenten unterscheiden sich für die beiden Gene signifikant. Während *Geminin* bei der Überexpression im Frosch neurale Identität etabliert (Kroll et al., 1998), zeigt *Cresto* keine neural-induzierenden Eigenschaften, wie das Ausbleiben des neuralen Markers *SOX2* nach der Überexpression von *Cresto* belegt (Ergebnisse 2.4.1). *Cresto* aktiviert stattdessen typische Marker von Neuralleistenzellen (Tab. 20).

Insgesamt scheinen daher *Cresto* und *Geminin* keine orthologen Gene zu sein und in den verschiedenen Spezies unterschiedliche biologische Funktionen zu haben.

2.2 Die Expression des Gens *Cresto* im Hühnerembryo impliziert eine Rolle bei der Entwicklung der Neuralleistenzellen

Das Gen *Cresto* ist zuerst in der gesamten Neuralplatte bis in das nicht-neurale Ektoderm hinein und entlang des Primitivstreifens exprimiert. Im Verlauf der weiteren Entwicklung wird die Expression auf die dorsalen Neuralfalten, das dorsale Neuralrohr und die wandernden Neuralleistenzellen eingeschränkt (Abb. 17). Sobald das Notochord unter der anterioren Neuralplatte

gebildet wird, wird die Expression von *Cresto* in dem benachbarten Teil der Neuralplatte eingestellt (Abb. 17 B, Pfeil). Dies geschieht vermutlich durch den Faktor Sonic hedgehog, der von den Notochordzellen sezerniert wird und für die Differenzierung des neuralen Ektoderms in ventrale und dorsale Qualitäten verantwortlich ist (Roelink et al., 1995).

Wie der an der Entstehung der Neuralleistenzellen beteiligte Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *SLUG* (Nieto et al., 1994) ist das Gen *Cresto* auch entlang des Primitivstreifens exprimiert (Abb. 17). Am Primitivstreifen erfahren Zellen wie bei der Entwicklung der Neuralleistenzellen einen epithelialen-mesenchymalen Übergang, indem sie aus dem Epithel des Epiblasten bei der Einwanderung durch den Primitivstreifen in mesenchymale Zellen des Mesoderms übergehen (Schoenwolf, 1991). Aus diesem Grund könnte ähnlich wie *SLUG* auch *Cresto* allgemein an epithelialen-mesenchymalen Differenzierungsschritten beteiligt sein.

Das Gen *Cresto* ist im Vergleich zu anderen Neuralleistenmarkern bereits sehr früh exprimiert. Die Expressionsdomäne überlappt bereits während der Gastrulation mit der der Homeoboxgene *MSX1* und *DLX5*. *MSX1* und *DLX5* sind früh am Rand der zukünftigen Neuralplatte exprimiert (Pera et al., 1999; Streit und Stern, 1999a). Während der Neurulation bleibt die Expression beider Gene in den dorsalen Neuralfalten bestehen. Allerdings ist die Expressionsdomäne von *Cresto* im Neuralplattenstadium viel breiter als die von *MSX1* und *DLX5* und wird erst mit der Einschränkung von *Cresto* auf den Rand der Neuralplatte nach dem Kopffaltenstadium mit *MSX1* und *DLX5* sehr ähnlich. Ab dem Kopffaltenstadium beginnen die Vorläufer der Neuralleistenzellen am Rand der Neuralplatte mit der Expression des Zelladhäsionsproteins *Cadherin-6b* (Nakagawa und Takeichi, 1995) und wenig später, ab dem 3-Somitenstadium, tritt in den dorsalen Neuralfalten erstmals die Expression des Zink-Finger-Transkriptionsfaktors *SLUG* auf (Nieto et al., 1994). Die Expressionsdomänen von *Cresto*, *Cadherin-6b* und *SLUG* sind bereits bei deren ersten Auftreten sehr ähnlich. Allerdings ist *Cresto* in den gesamten Neuralfalten bzw. dem gesamten Neuralrohr entlang der anterior-posterioren Achse exprimiert, während *SLUG* nur bis auf die Höhe des Mittelhirns exprimiert ist.

Mit dem Beginn des Auswanderns der Neuralleistenzellen ändert sich auch deren Genexpression. Die Neuralleistenzellen stellen vor dem Auswandern die Expression von *Cadherin-6b* ein und exprimieren dagegen den HMG-Transkriptionsfaktor *SOX10* und zum Teil das Zelladhäsionsprotein *Cadherin-7* (Cheng et al., 2000; Nakagawa und Takeichi, 1995). Nach dem Auswandern exprimieren die Neuralleistenzellen noch für eine kurze Zeit *Cresto* (Abb. 17), bevor es während der Wanderung endgültig abgeschaltet wird. Auch *SLUG* wird zunächst noch von den wandernden Neuralleistenzellen exprimiert und später als *Cresto* abgeschaltet (Nieto

et al., 1994). Erst nachdem die Neuralleistenzellen sich auf ihrer Wanderung vom Neuralrohr entfernt haben, weisen sie das Epitop HNK-1 auf ihrer Zelloberfläche auf (Bronner-Fraser, 1986; Vincent und Thiery, 1984). Zu diesem Zeitpunkt wird die Expression des Gens *Cresto* gerade eingestellt.

Insgesamt ist das Gen *Cresto* bereits in den Vorläufern der Neuralleistenzellen am Rand der Neuralplatte exprimiert und begleitet die Entwicklung der Neuralleistenzellen bis kurz nach ihrem Auswandern. Die Expression von *Cresto* überlappt mit den frühen Neuralleistenmarkern und geht den Markern *Cadherin-6b*, *SLUG*, *SOX10* und *Cadherin-7* voraus.

2.3 Die Überexpression des Gens *Cresto* induziert die frühe Entwicklung von Neuralleistenzellen

Die Elektroporation von sich entwickelnden Embryonen erlaubt seit kurzem die Überexpression von Genen im Hühnerembryo (Muramatsu et al., 1997; Itasaki et al., 1999; Momose et al., 1999). Zuvor konnten Gene nur mit Hilfe rekombinanter Viren im Hühnerembryo überexprimiert werden (Morgan und Fekete, 1996). Neben der recht aufwendigen Herstellung und Aufreinigung der Viren ist dabei vor allem problematisch, daß die Infektion und die Ausbreitung der Viren einen recht langen Zeitraum von mehr als 48 h beansprucht. Die frühen Entwicklungsstadien sind aufgrund der raschen Entwicklung des Embryos in diesem Zeitraum nicht zugänglich. Die hier vorgestellte Elektroporation der Hühnerembryonen in der *in vitro* Kultur erlaubt nun auch Überexpressionsanalysen für frühe Entwicklungsstadien (Material und Methoden 7.3).

Die Überexpression des Gens *Cresto* im Hühnerembryo aktivierte in den transfizierten Zellen ein Expressionsprofil, das mit den Markern *MSX1*, *DLX5*, *Cadherin-6b*, *SLUG*, *ID2*, *SOX10* und *Cadherin-7* typisch für frühe bzw. gerade auswandernde Neuralleistenzellen ist (Tab. 20; LaBonne und Bronner-Fraser, 1999). Obwohl *Cresto* im dorsalen Neuralrohr exprimiert ist, unterstützte es nicht die Expression von reinen neuralen Markern wie *SOX2* (Rex et al., 1997) oder des dorsalen Neuralmarkers *PAX3*, der zwar für die Entwicklung des dorsalen Neuralrohrs benötigt wird, nicht aber spezifisch an der Differenzierung von Neuralleistenzellen beteiligt ist (Goulding et al., 1991; Franz, 1990; Epstein et al., 1991; Selleck und Bronner-Fraser, 1995; Serbedzija und McMahon, 1997).

Die Marker *MSX1*, *DLX5*, *Cadherin-6b* und *SLUG* wurden dagegen durch die Überexpression des Gens *Cresto* in jeder transfizierten Zelle induziert. Einige der transfizierten Zellen exprimierten auch die Gene *ID2*, *SOX10* und *Cadherin-7*. Auch diese Marker wurden unabhängig

von der Herkunft der transfizierten Zellen im Hühnerembryo aktiviert. Bemerkenswert ist, daß offensichtlich alle Zellen im frühen Hühnerembryo die Kompetenz haben, mit der Expression dieser Gene auf die Überexpression von *Cresto* zu reagieren. Dennoch ist diese Fähigkeit nicht universell, da embryonale Hühnerfibroblasten auf die Überexpression des Gens *Cresto* nicht mit der Expression bzw. verstärkten Expression der Marker *MSX1*, *DLX5* und *SLUG* reagierten (Abb. 23). In diesen Zellen scheinen die für die Funktion von *Cresto* notwendigen Interaktionspartner nicht aktiv zu sein.

Da alle transfizierten Zellen *Cadherin-6b* induzierten und ein Teil der transfizierten Zellen auch *Cadherin-7* exprimierten, mußten einige der transfizierten Zellen für beide Cadherine positiv sein. Unter normalen Bedingungen wird die Expression von *Cadherin-6b* von Neuralleistenzellen eingestellt, bevor sie *Cadherin-7* exprimieren und sich aus dem Epithel lösen (Nakagawa und Takeichi, 1995). Die Überexpression von *Cadherin-6b* im dorsalen Neuralrohr verhindert das Auswandern der Neuralleistenzellen, ohne jedoch die Beweglichkeit der Zellen *in vitro* einzuschränken (Nakagawa und Takeichi, 1998). Die normale Differenzierung von Neuralleistenzellen wird daher durch die gleichzeitige Expression von *Cadherin-6b* und *Cadherin-7* behindert. Durch die Überexpression von *Cresto* wurden einige, für beide Cadherine positive Zellen erzeugt. Dies deutet darauf hin, daß die Überexpression von *Cresto* die Induktion von Neuralleistenzellen zwar auslöst, aber die weitere Differenzierung auch behindert, da ein korrektes Abschalten von *Cadherin-6b* unterbleibt. In diesen Zusammenhang paßt auch, daß die Überexpression von *Cresto* nicht zu einer Induktion von HNK-1 positiven Zellen führt. Unter normalen Bedingungen wird die Expression von *Cresto* in den wandernden Neuralleistenzellen etwa zu dem Zeitpunkt abgeschaltet, wenn sie das Epitop HNK-1 auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. Unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen wird die Expression von *Cresto* durch den CMV-Promotor ununterbrochen angetrieben, was die normale Differenzierung der Neuralleistenzellen behindern könnte. Die durch die Überexpression von *Cresto* erzeugten Zellen exprimierten ein Profil an frühen Neuralleistenmarkergenen und zeigten darüber hinaus Eigenschaften von wandernden Neuralleistenzellen. Dies belegen sowohl die Wanderung der transfizierten Neuralplatten *in vitro* (Abb. 20 G-J) als auch das verfrühte einseitige Auswandern von *SLUG*-positiven Zellen aus dem Neuralrohr (Abb. 20 A,B). Die weitere Entwicklung ist jedoch vermutlich durch das fehlende Abschalten von *Cresto* im Überexpressionsexperiment inhibiert.

Die Überexpression von *Cresto* führte nicht zu einer Aktivierung von *BMP4*. Zuerst ist *BMP4* im nicht-neuralen Ektoderm um die Neuralplatte exprimiert (Liem et al., 1995; Schultheiss et

al., 1995) und findet sich später im dorsalen Neuralrohr (Liem et al., 1995; 1997). Die Funktion von *BMP4* bei der Differenzierung von Neuralleistenzellen ist aufgrund des komplexen Expressionsmusters nicht eindeutig (LaBonne und Bronner-Fraser, 1999). In Kokulturen aus Explantaten der Neuralplatte und der späteren Epidermis werden Neuralleistenzellen induziert. Zu Neuralplattenexplantaten hinzugefügtes Protein *BMP4* kann die Epidermis dabei ersetzen, so daß bisher angenommen wurde, daß *BMP4* das epidermale Signal ist, das am Rand der Neuralplatte die Entstehung von Neuralleistenzellen induziert (Liem et al., 1995). Da *BMP4* allerdings später in dem dorsalen Neuralrohr, dem Ursprungsort der Neuralleistenzellen, stark exprimiert ist, könnte das hinzugefügte *BMP4* auch die Interaktion von der Neuralplatte mit der Epidermis überflüssig machen und direkt die Differenzierung von Neuralleistenzellen bewirken (LaBonne und Bronner-Fraser, 1999). Eine weitere Rolle kommt *BMP4* bei dem Auslösen der Wanderung der Neuralleistenzellen zu. Das Protein *BMP4* wird im dorsalen Neuralrohr durch die Gegenwart von dem *BMP4*-bindenden Faktor *Noggin* so lange neutralisiert, bis die Expression von *Noggin* von anterior nach posterior herunterreguliert wird und dadurch das freie *BMP4* das Auswandern der Neuralleistenzellen auslösen kann (Sela-Donenfeld und Kalcheim, 1999). Dabei ist *BMP4* nur für das Auswandern, nicht aber für die Differenzierung der Neuralleistenzellen im dorsalen Neuralrohr erforderlich. In Gegenwart von ektopisch hinzugefügtem Protein *Noggin* differenzieren die Zellen im dorsalen Neuralrohr zu HNK-1-positiven Neuralleistenzellen, die jedoch im dorsalen Neuralrohr verbleiben und nicht auswandern können (Sela-Donenfeld und Kalcheim, 1999). Daher ist es denkbar, daß die von *Cresto* ausgelöste Induktion von Neuralleistenzellen ohne die Aktivierung durch *BMP4* auskommt. Auch bei der Regeneration von Neuralleistenzellen nach der Ablation von dorsalem Neuralrohr wird zwar die erneute Expression von *SLUG* nicht aber von *BMP4* beobachtet (Buxton et al., 1997). Die mit *Cresto* transfizierten Zellen im Hühnerembryo wandern in vivo nur aus dem dorsalen Neuralrohr aus (Abb. 20 A,B), d.h., daß sie nur in ihrer normalen Umgebung zu einem etwas verfrühten Zeitpunkt auswandern. Dies deutet darauf hin, daß die transfizierten Zellen vermutlich das Signal von *BMP4* im dorsalen Neuralrohr wie die normalen Neuralleistenzellen benötigen, um in vivo auswandern zu können.

Obwohl die Überexpression des Gens *Cresto* die Expression von *BMP4* nicht aktivierte (Abb. 19), induzierte sie die funktionell eng mit *BMP4* verbundenen Gene *DLX5* und *MSX1* (Streit und Stern, 1999a). Falls *BMP4* aber entgegen den obigen Überlegungen doch an der Induktion und Differenzierung von Neuralleistenzellen beteiligt ist, könnte dies bedeuten, daß *Cresto* in einer Signalkaskade unter *BMP4* steht. Die Implantation von *BMP4*-beladenen Beads führte im

Hühnerembryo zwar zu einer Verengung der Neuralplatte (Knoetgen et al., 1999b), nicht aber zu einer Aktivierung von *Cresto* (Daten nicht gezeigt), so daß *Cresto* nicht unmittelbar in der Kaskade unter *BMP4* zu stehen scheint. Möglicherweise sind allerdings weitere Signale in Kombination zu *BMP4* nötig, um das Gen *Cresto* zu aktivieren.

Insgesamt löste die Überexpression des Gens *Cresto* die ektopische Induktion von frühen Neuralleistenzellen unabhängig von der Herkunft der transfizierten Zellen im frühen Hühnerembryo aus. In vivo erreichten die transfizierten Zellen den Status von wandernden Neuralleistenzellen nur in ihrer natürlichen Umgebung, dem dorsalen Neuralrohr, da sie möglicherweise den Faktor *BMP4* als Signal zum Wandern benötigen. Die weitere Differenzierung der transfizierten Zellen ist vermutlich durch das unter den experimentellen Bedingungen fehlende Abschalten des Gens *Cresto* inhibiert.

2.4 Die unterschiedlichen Domänen des Proteins Cresto aktivieren unterschiedliche Markergene

Die Überexpression der Deletionsmutanten des Gens *Cresto* deutet darauf hin, daß verschiedene Domänen des Proteins Cresto unabhängig voneinander an unterschiedlichen Signalwegen beteiligt zu sein scheinen. Das DNA-Konstrukt Cresto B, das für die 85. bis 165. Aminosäure des Proteins Cresto kodierte (Abb. 18), induzierte nur die Expression von *SLUG* und *Cadherin-6b*, ohne gleichzeitig auch *MSX1* und *DLX5* zu aktivieren (Tab. 20; Abb. 21 C-H). Das Konstrukt Cresto A, das für die 37. bis 90. Aminosäure von Cresto kodierte (Abb. 18), induzierte dagegen *MSX1* und *DLX5* in vollem Umfang und *SLUG* und *Cadherin-6b* nur schwach. Dies könnte bedeuten, daß die Domäne von Cresto B (85. bis 165. aa) mit einem Signalweg interagiert, der zur Aktivierung von *SLUG* und *Cadherin-6b* führt und der unabhängig von einem Signalweg ist, der *MSX1* und *DLX5* induziert. Auf der anderen Seite interagiert die Domäne von Cresto A (37. bis 90. aa) vermutlich mit beiden Signalwegen, wenn sie auch zur vollständigen Aktivierung von *SLUG* und *Cadherin-6b* auf die B-Domäne angewiesen ist. Obwohl das Konstrukt Cresto C (1. bis 90. aa) für die komplette Region des Konstruktes Cresto A (37. bis 90. aa) kodierte, führte die Überexpression von Cresto C nur zu einer schwachen Induktion von *MSX1* und *DLX5*, was möglicherweise darauf zurück zu führen ist, daß sich die *MSX1*- und *DLX5*-aktivierende Domäne, die sich zwischen den Aminosäuren 37 und 90 zu befinden scheint, nicht korrekt falten konnte und daher nicht funktionstüchtig war.

2.5 Zelluläre Lokalisation des Proteins Cresto

Nur Proteine bis zu einer Größe von 20 bis 30 kDa können mit einer hohen Austauschrate durch die Kernporen über die freie Diffusion vom Zytosol in den Zellkern gelangen (Görlich und Kutay, 1999). Größere Proteine werden nur durch einen aktiven Transport über die Kernporen in den Zellkern transportiert. Kleinere Proteine, wie zum Beispiel GFP, sind in der Regel sowohl im Kern als auch im Zytosol lokalisiert, sofern sie nicht ein Kernlokalisierungs- bzw. ein Kernexportsignal enthalten, so daß sie ausschließlich im Zellkern bzw. ausschließlich im Zytosol vorkommen (Görlich und Kutay, 1999). Das mit EGFP fusionierte Cresto (EGFP-HA-Cresto) kann aufgrund seiner Größe von etwa 50 kDa den Zellkern nicht durch einfache Diffusion erreichen. In den meisten transfizierten Zellen findet es sich übereinstimmend damit auch ausschließlich im Zytosol (Abb. 22 A-D). Die mit dem His- bzw. Myc-Tag fusionierten Varianten des Proteins Cresto können aufgrund ihrer Größe von etwa 25 kDa prinzipiell durch einfache Diffusion in den Zellkern gelangen. Allerdings findet sich auch das mit dem His- bzw. mit dem Myc-Tag fusionierte Cresto im Zytosol der transfizierten Zellen (Abb. 22 G-J, Daten nicht gezeigt). Daher scheint Cresto aktiv aus dem Zellkern transportiert zu werden, wofür vermutlich das in der Primärsequenz von Cresto vorhandene Kernexportsignal (NES, Bogerd et al., 1996; Abb. 16) verantwortlich sein könnte.

In einem Teil der transfizierten Zellen ist EGFP-HA-Cresto bzw. Cresto-his aber auch in dem Zellkern angereichert (Abb. 22 E,F). Dies deutet darauf hin, daß Cresto unter bestimmten Bedingungen, möglicherweise durch eine Unterbrechung des Export aus dem Zellkern oder aber durch einen aktiven Transport, in den Zellkern gelangen kann. Die zweite Möglichkeit ist allerdings wahrscheinlicher, da das Fusionsprotein EGFP-HA-Cresto aufgrund seiner Größe nur aktiv in den Zellkern gelangen kann.

Das Protein Cresto scheint daher unter bestimmten Umständen aktiv aus dem Zellkern bzw. aktiv in den Zellkern transportiert zu werden. Unter welchen Bedingungen welche Transportrichtung bevorzugt ist und in welcher Lokalisation Cresto seine biologische Funktion erfüllt, ist allerdings bisher nicht geklärt und Gegenstand weiter zu verfolgender Experimente.

2.6 Die Überexpression des Gens *SLUG*

Der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *SLUG* ist für die Differenzierung von Neuralleistenzellen notwendig, da seine funktionelle Inaktivierung durch Gegenstrang-Oligonukleotide die normale Entwicklung von Neuralleistenzellen verhindert (Nieto et al., 1994). Das Gen *SLUG* ist allerdings nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend für die Induktion von typischen

Neuralleistenmarkern wie *Cadherin-6b*, *MSX1* und *SOX10* (Abb. 24, Tab. 20). Darüber hinaus aktivierte *SLUG* auch die Expression von *Cresto* (Abb. 24, Tab. 20), obwohl in der normalen Entwicklung der Neuralleiste *Cresto* vor *SLUG* exprimiert wird. Da *Cresto* auch *SLUG* aktiviert, ist anzunehmen, daß normalerweise *Cresto* zuerst *SLUG* induziert und anschließend *SLUG* durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus die Expression von *Cresto* unterstützt. Auf diese Weise könnte das Neuralleistenschicksal stabilisiert werden (Abb. 26). Die Überexpression von *SLUG* führte aber im Vergleich zu *Cresto* nicht zu einer Aktivierung von *DLX5* und *Cadherin-7* (Tab. 20). Der Marker *Cadherin-7* ist der späteste Neuralleistenmarker, der durch eine Überexpression von *Cresto* induziert wurde. Die Überexpression von *SLUG* scheint daher die Induktion der Neuralleistenzellen nicht so weit wie *Cresto* voranzutreiben. Bemerkenswert ist auch, daß trotz der Aktivierung von *Cresto* durch die Überexpression von *SLUG* nicht alle der durch die Überexpression von *Cresto* alleine aktivierten Marker induziert werden. Dies deutet darauf hin, daß die Reihenfolge der Aktivierung der einzelnen Gene auch für die Aktivierung der Neuralleistenzellen wichtig ist. Wenn zuerst *Cresto* überexprimiert wurde, wurden mehr und spätere Neuralleistenmarker angeschaltet, als wenn zuerst *SLUG* überexprimiert wurde.

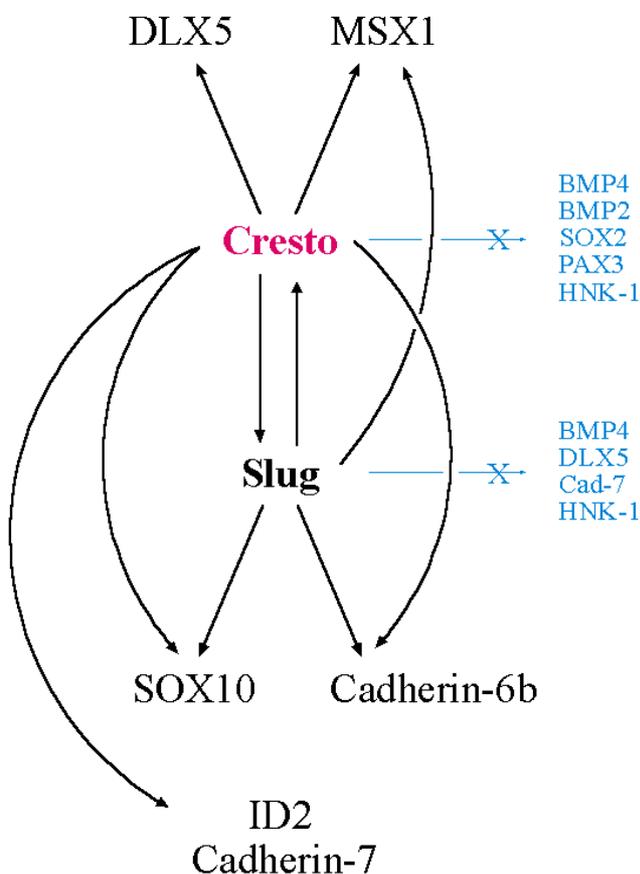


Abb. 26: Schematische Darstellung der durch die Überexpression der Gene *Cresto* und *SLUG* induzierten Marker. Die Aktivierung einer Genexpression ist durch einen schwarzen Pfeil dargestellt. Das Ausbleiben einer Induktion ist mit einem blauen, durchgekennzeichneten Pfeil angedeutet. Im Zentrum der Aktivierungskaskade steht das Gen *Cresto*. Die Überexpression des Gens *Cresto* aktivierte die Expression der Gene *DLX5*, *MSX1*, *SOX10*, *Cadherin-6b*, *SLUG*, *ID2* und *Cadherin-7*, aber nicht die Expression von *BMP4*, *BMP2*, *SOX2*, *PAX3* bzw. des HNK-1-Epitops. Die Überexpression des Gens *SLUG*, das in der Entwicklung des Hühnerembryos später als *Cresto* in den Neuralleisten exprimiert wird, induzierte die Expression von *Cresto*, *MSX1*, *Cadherin-6b* und *SOX10*. Die Gene *BMP4*, *DLX5* und *Cadherin-7* sowie das HNK-1-Epitop wurden durch die Überexpression von *SLUG* nicht induziert.

2.7 Die Signalkaskade zur Induktion von frühen Neuralleistenzellen

Das Gen *Cresto* ist bereits sehr früh im Ektoderm des Hühnerembryos exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt sind auch die Gene *MSX1* und *DLX5* im Ektoderm aktiv. Da *Cresto* jedoch in einer viel ausdehnteren Region des Ektoderms exprimiert ist, führt die Expression von *Cresto* zu diesem Zeitpunkt nicht zwangsläufig zu der Induktion von *MSX1* und *DLX5*. Daher könnte die Expression von *MSX1* und *DLX5* zu diesem frühen Zeitpunkt unabhängig von *Cresto* sein und erst später während der Neurulation von *Cresto* abhängen, wenn die Expressionsdomänen von *Cresto*, *MSX1* und *DLX5* komplett überlappen. Andererseits könnte das Protein Cresto aber auch nur in dem mit der Expression von *MSX1* und *DLX5* überlappenden Bereich aktiv sein. Während der Neurulation scheint *Cresto* die Gene *Cadherin-6b*, *ID2* und *SLUG* in den dorsalen Neuralfalten zu induzieren. Der Transkriptionsfaktor *SLUG* stabilisiert durch eine positive Rückkopplung die Expression von *Cresto* und möglicherweise auch direkt die Expression von *Cadherin-6b* und *MSX1* (Abb. 26). Zu diesem Zeitpunkt wird die Expression von *Noggin* in den dorsalen Neuralfalten eingestellt, und durch das dadurch nicht mehr gebundene BMP4 erhalten die Neuralleistenzellen das Signal zum Auswandern aus dem dorsalen Neuralrohr (Seldonenfeld und Kalcheim, 1999). Anschließend schalten die wandernden Neuralleistenzellen die Expression von *SOX10* und zum Teil von *Cadherin-7* an, woran *Cresto* ebenfalls noch beteiligt zu sein scheint. Sobald die Neuralleistenzellen über die Breite des Neuralrohrs hinaus gewandert sind, stellen sie die Expression von *Cresto* ein und weisen etwa zur gleichen Zeit das Epitop HNK-1 auf ihrer Zelloberfläche auf. An diesem und weiteren Differenzierungsschritten der Neuralleistenzellen ist *Cresto* nicht mehr beteiligt, und das Abschalten seiner Expression scheint darüber hinaus für die weitere Differenzierung notwendig zu sein.

Zusammenfassung

Das Ektoderm erfährt während der Entwicklung von Wirbeltierembryonen drei verschiedene Zellschicksale. Die Zellen des zentralen Teils des Ektoderms bringen das zentrale Nervensystem, die Zellen des peripheren Teils die Epidermis und die Zellen zwischen dem zentralen und dem peripheren Teil die Neuralleistenzellen hervor. Zu Beginn der Gastrulation finden dynamische Zellwanderungen und die für die Unterteilung des Ektoderms notwendigen Interaktionsprozesse statt. Dabei kommt das Ektoderm der zukünftigen Vorderhirnanlage mit zwei grundsätzlich verschiedenen Zellpopulationen, dem anterioren, primitiven Endoderm und dem aus dem Primitivstreifen kommenden, axialen Mesoderm, in Kontakt. Beide Gewebe kommen als Signalzentrum für die Anlage des Vorderhirns in Vögeln und Säugern in Frage.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der zelluläre Ursprung der Signale zur Induktion der Vorderhirnanlage charakterisiert. In Kaninchenembryonen wurden zwei unabhängige Induktionszentren, die zeitlich nacheinander agieren, gefunden. Die Initiierung der Vorderhirnanlage beruhte auf Signalen aus dem anterioren, primitiven Endoderm. Diese Induktion wurde durch Signale aus der Spitze des Primitivstreifens, aus der die Zellen des axialen Mesoderms unter das anteriore Ektoderm wandern, wiederholt. In Hühnerembryonen ging dagegen von dem anterioren, primitiven Endoderm kein Signal zur Induktion der Vorderhirnanlage aus. Sie basierte im Hühnerembryo ausschließlich auf Signalen aus der Spitze des Primitivstreifens. Damit konnte erstmalig belegt werden, daß die Induktion der Vorderhirnanlage zwischen den Hühner- und den Kaninchenembryonen nicht konserviert ist. Durch eine zeitliche Verschiebung ist dieser Prozeß im Kaninchenembryo im Vergleich zum Hühnerembryo vorverlagert und in das primitive Endoderm übertragen worden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Gen *Cresto* identifiziert und seine maßgebliche Rolle bei der Induktion der Neuralleistenzellen nachgewiesen. Mit Hilfe einer im Rahmen dieser Arbeit modifizierten Elektroporationsmethode konnten erstmals Überexpressionsanalysen im frühen Hühnerembryo durchgeführt werden. Die ektopische Expression des Gens *Cresto* aktivierte ohne besondere Kompetenzanforderung in jeder transfizierten Zelle ein für die frühe Neuralleiste charakteristisches Expressionsprofil und konnte für Neuralleistenzellen typische Wanderungen auslösen. Die Funktion des Proteins Cresto scheint modular aufgebaut zu sein, da verschiedene Domänen der Proteins unterschiedliche Gene induzieren konnten.

Die Überexpression des durch Cresto induzierten Zink-Finger-Transkriptionsfaktors SLUG führte zu einer Aktivierung des Gens *Cresto* sowie weiterer Neuralleistenzellmarker. Diese positive Rückkopplung deutet auf eine vernetzte Aktivierungskaskade bei der Induktion der Neuralleistenzellen hin.

Schlagwörter: Entwicklungsbiologie, Vorderhirn, Neuralleiste.

Summary

The ectoderm gives rise to three distinct cell fates during the development of a vertebrate embryo. The medial part develops into the central nervous system, the distal part into the epidermis. The intermediate region between the medial and the distal part is the origin of the neural crest cells. At the onset of gastrulation dynamic cell movements and interactions occur which lead to the differentiation of the ectoderm. The ectoderm of the prospective anlage of the forebrain comes into contact with two different cell types, the anterior primitive endoderm and the axial mesoderm which ingresses via the primitive streak during gastrulation. In principle both of these tissues could function as a signalling center for the induction of the forebrain in birds and mammals.

In the first part of this thesis the cellular origin of the signalling center involved in the induction of the forebrain was analysed. Two independent signalling centers which act sequentially were identified in rabbit embryos. The initiation of the anlage of the forebrain was based on signals from the anterior, primitive endoderm. This induction was reinforced by signals from the anterior tip of the primitive streak, from which the cells of the axial mesoderm migrate below the prospective forebrain. In chick embryos the anterior, primitive endoderm lacked these inductive signals. The induction of the anlage of the forebrain was exclusively based on signals from the tip of the primitive streak. These results indicate for the first time that the induction of the anlage of the forebrain is not conserved between the chick- and the rabbit embryo. This developmental process is shifted to an earlier developmental stage and move into the primitive endoderm in the rabbit embryo in comparison to the chick embryo.

In the second part of this thesis the gene *Cresto* was identified and its important role for the induction of neural crest cells was shown. A modified electroporation technique allowed overexpression studies in early chick embryos for the first time. The ectopic expression of *Cresto* triggered in every transfected cell irrespective of its origin the induction of an expression profile typical of early neural crest cells and forced migration typical of neural crest cells. Distinct parts of *Cresto* are responsible for distinct activities since different domains can carry out subsets of the activity of the entire protein.

The overexpression of one of *Cresto*'s target genes, the zinc-finger-transcription factor SLUG, led to the activation of *Cresto* and some other neural crest marker genes. This positive backloop indicates the existence of a network in the cascade of the induction of neural crest cells.

Keywords: Developmental Biology, Forebrain, Neural Crest.

Abkürzungen

A	Adenin
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ADMP	Anti-dorsalisierendes, morphogenetisches Protein
ah	anteriorer Hypoblast, anteriores, primitives Endoderm des Hühnerembryos
amc	anteriore Randsichel, die morphologisch erkennbare Verdickung des später anterioren Endes des Kaninchenembryos vor der Gastrulation (engl. anterior marginal crescent)
ATP	Adenosintriphosphat
ave	anteriores, viszerales Endoderm, das anteriore, primitive Endoderm der Säugetierembryonen
BBR	Boehringer-Blockierungs-Reagenz
BGH	Rinder Wachstumshormon (engl. bovine growth hormon)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CEF	embryonale Hühnerfibroblasten
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (engl. counts per minute)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DiI	1,1'-Diiodo-3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DMEM	Zellkulturnährmedium (Dulbeccos modified eagle medium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	verstärkt grün-fluoreszierendes Protein (engl. enhanced green fluorescent protein)
EK	Einteilung der frühen Entwicklungsstadien des Hühnerembryos nach Eyal-Giladi und Kochav, 1976.
EST	Sequenzierter Abschnitt einer cDNA (engl. expressed sequence tag)
fb	Vorderhirn (engl. forebrain)
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanin
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
hb	Hinterhirn (engl. hindbrain)
HH	Stadien der Entwicklung des Hühnerembryos (Hamburger und Hamilton, 1951)
HMG	DNA-bindende Proteindomäne (engl. high mobility group)

kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
LB	Bakterienmedium (Luria Broth)
MAB	Maleinsäurepuffer
MCS	Multiple Klonierungsstelle in Vektoren (engl. multiple cloning site)
min	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	Knoten (engl. node), die anteriore Spitze des Primitivstreifens
NBT-BCIP	Nitroblautetrazolium mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
nc	Notochord
NES	Kernexportsignal (engl. nuclear export signal)
nf	Neuralfalten
np	Neuralplatte
nt	Neuralrohr (engl. neural tube)
NTMT	Natriumchlorid-Tris-Magnesium-Tween-Puffer
OD 600	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
PBT	Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung mit Tween
PC	Pannett-Compton-Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	4% Paraformaldehyd in PBS
PNK	Polynukleotidkinase
pp	prächordale Platte
ps	Primitivstreifen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rotations per minute)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
sc	Rückenmark (engl. spinal cord)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
T	Thymin
T3	RNA-Polymerase
T7	RNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten (engl.: units)
UV	Ultraviolett
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
ZNS	zentrales Nervensystem
µF	Elektrische Kapazität in 10 ⁻⁶ Faraday

Literaturverzeichnis

- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A. and Brulet, P. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *otx2* *-/-* mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121, 3279-3290.
- Adelmann, H. B. (1922). The significance of the prechordal plate. *American Journal of Anatomy* 31, 55-101.
- Ang, S. L., Conlon, R. A., Jin, O. and Rossant, J. (1994). Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse *Otx2* in ectoderm explants. *Development* 120, 2979-2989.
- Ang, S. L., Jin, O., Rhinn, M., Daigle, N., Stevenson, L. and Rossant, J. (1996). A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* 122, 243-252.
- Arendt, D. and Nübler-Jung, K. (1999). Rearranging gastrulation in the name of yolk: evolution of gastrulation in yolk-rich amniote eggs. *Mechanisms of Development* 81, 3-22.
- Azar, Y. and Eyal-Giladi, H. (1981). Interaction of epiblast and hypoblast in the formation of the primitive streak and the embryonic axis in chick, as revealed by hypoblast-rotation experiments. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 61, 133-144.
- Bachiller, D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J. A., Anderson, R. M., May, S. R., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Harland, R. M., Rossant, J., and De Robertis, E. M. (2000). The organizer factors *Chordin* and *Noggin* are required for mouse forebrain development. *Nature* 403, 658-661.
- Bachvarova, R. F., Skromne, I. and Stern, C. D. (1998). Induction of the primitive streak and Hensen's node by the posterior marginal zone. *Development* 125, 3521-3534.
- Baldino, F., Chesselet, M. F. and Lewis, M. E. (1989). High-resolution in situ hybridization histo-chemistry. *Methods in Enzymology* 168, 761 - 777.
- Bally-Cuif, L., Gulisano, M., Broccoli, V. and Boncinelli, E. (1995). *c-Otx2* is expressed in two different phases of gastrulation and is sensitive to retinoic acid treatment in chick embryos. *Mechanism of Development* 49, 49-63.
- Bang, A. G., Papalopulu, N., Kintner, C. and Goulding, M. D. (1997). Expression of *Pax3* is initiated in the early neural plate by posteriorizing signals produced by the organizer and by posterior non-axial mesoderm. *Development* 124, 2075-2085.
- Barembaum, M., Moreno, T. A., LaBonne, C., J., S. and Bronner-Fraser, M. (2000). *Noelin-1* is a secreted glycoprotein involved in generation of the neural crest. *Nature Cell Biology* 2, 2219-2225.
- Beddington, R. S. (1982). An autoradiographic analysis of tissue potency in different regions of

the embryonic ectoderm during gastrulation in the mouse. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 69, 265-285.

Beddington, R. S. P. (1994). Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* 120, 613-20.

Beddington, R. S. P. and Robertson, E. (1998). Anterior patterning in mouse. *Trends in Genetics* 14, 277-284.

Beddington, R. S. P. and Robertson, E. J. (1999). Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96, 195-209.

Bellairs, R. and Osmond, M. (1998). *The atlas of chick development*. Academic Press: San Diego, London, Boston.

Belo, J. A., Bouwmeester, T., Leyns, L., Kertesz, N., Gallo, M., Follettie, M. and De Robertis, E. M. (1997). Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mechanisms of Development* 68, 45-57.

Biben, C., Stanley, E., Fabri, L., Kotecha, S., Rhinn, M., Drinkwater, C., Lah, M., Wang, C. C., Nash, A., Hilton, D., Ang, S. L., Mohun, T. and Harvey, R. P. (1998). Murine cerberus homologue mCer-1: a candidate anterior patterning molecule. *Developmental Biology* 194, 135-151.

Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J. and Cullen, B. R. (1996). Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Molecular and Cellular Biology* 16, 4207-4214.

Böttger, T. (1999). *Molekulare Spezifikation von Körperachsen im Wirbeltierembryo*. Dissertation, ISBN 3-89712-621-4

Böttger, T., Knoetgen, H., Wittler, L., und Kessel, M. (2000). The avian organizer. *International Journal of Developmental Biology*. In press.

Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K., Fleckenstein, B. and Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of the human cytomegalovirus. *Cell* 41, 521 - 530.

Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382, 595-601.

Bouwmeester, T. and Leyns, L. (1997). Vertebrate head induction by anterior primitive endoderm. *Bioessays* 19, 855-863.

Bronner-Fraser, M. (1986). Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Developmental Biology* 115, 44-55.

Buxton, P., Hunt, P., Ferretti, P. and Thorogood, P. (1997). A role for midline closure in the

reestablishment of dorsoventral pattern following dorsal hindbrain ablation. *Developmental Biology* 183, 150-165.

Callebaut, M., van Nueten, E., Harrisson, F., van Nassauw, L. and Bortier, H. (1999). Endophyll orients and organizes the early head region of the avian embryo. *European Journal of Morphology* 37, 37-52.

Cheng, Y., Cheung, M., Abu-Elmagd, M. M., Orme, A., and Scotting, P. J. (2000). Chick Sox10, a transcription factor expressed in both early neural crest cells and central nervous system. *Brain Research and Developmental Brain Research* 121, 233-241.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159

Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.

Couly, G. F. and Le Douarin, N. M. (1987). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Developmental Biology* 120, 198-214.

Couly, G. F., Coltey, P. M. and Le Douarin, N. M. (1992). The developmental fate of the cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Development* 114, 1-15.

Dale, J. K., Vesque, C., Lints, T. J., Sampath, T. K., Furley, A., Dodd, J. and Placzek, M. (1997). Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell* 90, 257-29.

Dattani, M. T., Martinezbarbera, J. P., Thomas, P. Q., Brickman, J. M., Gupta, R., Martensson, I. L., Toresson, H., Fox, M., Wales, J. K. H., Hindmarsh, P. C., Krauss, S., Beddington, R. S. P. and Robinson, I. (1998). Mutations in the homeobox gene *Hesx1/Hesx1* associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nature Genetics* 19, 125-133.

Dias, M. S. and Schoenwolf, G. C. (1990). Formation of ectopic neuroepithelium in chick blastoderms: age related capacities for induction and self-differentiation following transplantation of quail Hensen's node. *Anatomical Records* 229, 437-448.

Dietrich, S., Schubert, F. R. and Lumsden, A. (1997). Control of dorsoventral pattern in the chick paraxial mesoderm. *Development* 124, 3895-3908.

Ding, J. X., Yang, L., Yan, Y. T., Chen, A., Desai, N., Wynshawboris, A. and Shen, M. M. (1998). *Cripto* is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo. *Nature* 395, 702-707.

Dunwoodie, S. L., Rodriguez, T. A. and Beddington, R. S. P. (1998). *Msg1* and *Mrg1*, founding members of a gene family, show distinct patterns of gene expression during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development* 72, 27-40.

Dupin, E. and Le Douarin, N. M. (1993). Culture of avian neural crest cells. In *Essential Developmental Biology - A Practical Approach* (eds. Stern, C. D. and Holland, P. W. H.), IRL

Press, Oxford.

Epstein, D. J., Vekemans, M. and Gros, P. (1991). Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax3. *Cell* 67, 767-774.

Eyal-Giladi, H. and Kochav, S. (1976). From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Developmental Biology* 49, 321- 337.

Fernandez, A. S., Pieau, C., Reperant, J., Boncinelli, E. and Wassef, M. (1998). Expression of the Emx-1 and Dix-1 homeobox genes define three molecularly distinct domains in the telencephalon of mouse, chick, turtle and frog embryos - Implications for the evolution of telencephalic subdivisions in amniotes. *Development* 125, 2099-2111.

Filosa, S., Riveraperez, J. A., Gomez, A. P., Gansmuller, A., Sasaki, H., Behringer, R. R. and Ang, S. L. (1997). Goosecoid and Hnf-3-beta genetically interact to regulate neural tube patterning during mouse embryogenesis. *Development* 124, 2843-2854.

Foerst-Potts, L. and Sadler, T. W. (1997). Disruption of Msx-1 and Msx-2 reveals roles for these genes in craniofacial, eye, and axial development. *Developmental Dynamics* 209, 70-84.

Foley, A. C., Storey, K. G. and Stern, C. D. (1997). The prechordal region lacks neural inducing ability, but can confer anterior character to more posterior neuroepithelium. *Development* 124, 2983-2996.

Foley, A. C., Skromne, I. and Stern, C. D. (2000). Reconciling different models of forebrain induction and patterning: A dual role for the hypoblast. *Development* 127, 3839-3854.

Franz, T. (1990). Defective ensheathment of motoric nerves in the Splotch mutant mouse. *Acta Anatomica* 138, 246-253.

Gallera, J. and Nicolet, G. (1969). Le pouvoir inducteur de l'endoblaste presomptif contenu dans la ligne primitive jeune de poulet. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 21, 105-18.

Gallera, J. (1971). Primary induction in birds. *Advance in Morphology* 9, 149-180.

Garcia-Martinez, V., Alvarez, I. S. and Schoenwolf, G. C. (1993). Locations of the ectodermal and nonectodermal subdivisions of the epiblast at stages 3 and 4 of avian gastrulation and neurulation. *Journal of Experimental Zoology* 267, 431-446.

Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C. and Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357-362.

Görlich, D. and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15, 607-660.

Gould, S. J. (1977). *Ontogeny and Phylogeny*. Cambridge, Mass: Harvard University Press.

- Goulding, M. D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J. R. and Gruss, P. (1991). Pax3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO Journal* 10, 1135-1147.
- Guthrie, S., Muchamore, I., Kuroiwa, A., Marshall, H., Krumlauf, R. and Lumsden, A. (1992). Neuroectodermal autonomy of Hox-2.9 expression revealed by rhombomere transpositions. *Nature* 356, 157-159.
- Haas, J., Park, E.C. and Seed B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Current Biology* 6, 315-324.
- Hanahan, D. J. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning*, D. M. Glover, ed. Oxford, IRL Press, 109-135.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88, 49-92.
- Hara, K. (1961). Regional neural differentiation induced by prechordal and presumptive chordal mesoderm in the chick embryo. Ph.d. Thesis, Utrecht
- Harland, R. and Gerhart, J. (1997). Formation and function of Spemann's organizer. *Annual Review of Cellular and Developmental Biology* 13, 611-667.
- Hausen, P. and Riebesell, M. (1991). The early development of *Xenopus laevis*. Springer Verlag: Berlin.
- Hensen, V. (1876). Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kaninchens und Meerschweinchens. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 1, 353-423.
- Hermesz, E., Mackem, S. and Mahon, K. A. (1996). Rpx - a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* 122, 41-52.
- Itasaki, N., Bel-Vialar, S. and Krumlauf, R. (1999). 'Shocking' developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. *Nature Cell Biology* 1, 203-207.
- Izpisúa-Belmonte, J. C., De Robertis, E. M., Storey, K. G. and Stern, C. D. (1993). The homeobox gene goosecoid and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm. *Cell* 74, 645-659.
- Joubin, K. and Stern, C. D. (1999). Molecular interactions continuously define the organizer during the cell movements of gastrulation. *Cell* 98, 559-571.
- Kazanskaya, O. V., Severtzova, E. A., Barth, K. A., Ermakova, G. V., Lukyanov, S. A., Benyumov, A. O., Pannese, M., Boncinelli, E., Wilson, S. W. and Zaraty, A. G. (1997). Anf: a novel class of vertebrate homeobox genes expressed at the anterior end of the main embryonic axis. *Gene* 200, 25-34.
- Kaufman, M. (1992). The atlas of mouse development. Academic Press: New York.

- Khaner, O. (1995). The rotated hypoblast of the chicken embryo does not initiate an ectopic axis in the epiblast. *Proceedings of National Academy of Science USA* 92, 10733- 10737.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203, 253-310.
- Kispert, A., Ortner, H., Cooke, J. and Herrmann, B. G. (1995). The chick *Brachyury* gene: developmental expression pattern and response to axial induction by localized activin. *Developmental Biology* 168, 406-415.
- Knoetgen, H., Teichmann, U. and Kessel, M. (1999a). Head-organizing activities of endodermal tissues in vertebrates. *Cellular and Molecular Biology* 45, 481-492.
- Knoetgen, H., Viebahn, C. and Kessel, M. (1999b). Head induction in the chick by primitive endoderm of mammalian, but not avian origin. *Development* 126, 815-125.
- Krieg, P. A. and Melton, D. A. (1984). Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Research* 12, 7057-7070.
- Kroll, K. L., Salic, A. N., Evans, L. M. and Kirschner, M. W. (1998). Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development* 125, 3247-3258.
- Kuratani, S., Horigome, N., and Hirano, S. (1999). Developmental morphology of the head mesoderm and reevaluation of segmental theories of the vertebrate head: Evidence from embryos of an agnathan vertebrate, *Lampetra japonica*. *Developmental Biology* 210, 381-400.
- LaBonne, C. and Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two signal model. *Development* 125, 2403- 2414.
- LaBonne, C. and Bronner-Fraser, M. (1999). Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15, 81-112.
- Lawson, K. A., Meneses, J. J. and Pedersen, R. A. (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113, 891-911.
- Lawson, K. A. and Pedersen, R. A. (1992). Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse in postimplantation development in the mouse. 165 ed. 3-26. Wiley: Chichester.
- Le Douarin, N. (1982). *The neural crest*. Cambridge, UK; Cambridge University Press.
- Lemaire, L., Roeser, T., Izpisua-Belmonte, J.-C. and Kessel, M. (1997). Segregating expression domains of two gooseoid genes during the transition from gastrulation to neurulation in chick embryos. *Development* 124, 1443-1452.
- Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y. and Rao, Y. (1997). A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development* 124, 603-615.

- Liem, K. F., Tremmi, G. and Jessell, T. M. (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91, 127-138.
- Liem, K. F., Tremmi, G., Roelink, H. and Jessell, T. M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969-979.
- Liu, P. T., Wakamiya, M., Shea, M. J., Albrecht, U., Behringer, R. R. and Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature Genetics* 22, 361-365.
- Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J. (1991). Predicting Coiled Coils from protein sequences. *Science* 252, 1162-1164.
- Martinsen, B. J. and Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2. *Science* 281, 988-991.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N. and Aizawa, S. (1995). Mouse otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes and Development* 9, 2646-2658.
- McGarry, T. J. and Kirschner, M. W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* 93, 1043-1053.
- McLachlan, A. D. and Stewart, M. (1975). Tropomyosin coiled-coil interactions: Evidence for an unstaggered structure. *Journal of Molecular Biology* 98, 293-304.
- Meier, S. (1981). Development of the chick embryo mesoblast: morphogenesis of the prechordal plate and cranial segments. *Developmental Biology* 83, 49-61.
- Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umezono, K. and Yasuda, K. (1999). Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Development Growth and Differentiation* 41, 335-344.
- Morgan, B. A. and Fekete, D. A. (1996). Manipulating gene expression with replication competent retrovirus. in *Methods in Avian Embryology (Methods in Cell Biology)*, M. Bronner-Fraser, ed. (London: Academic Press), 189-219.
- Muhr, J., Graziano, E., Wilson, S., Jessell, T. M. and Edlund, T. (1999). Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in gastrula stage chick embryos. *Neuron* 23, 689-702.
- Muramatsu, T., Mizutani, Y., Ohmori, Y. and Okumura, J. (1997). Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 230, 376-380.
- Nakagawa, S. and Takeichi, M. (1998). Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development* 125, 2963-2971.
- Nakagawa, S. and Takeichi, M. (1995). Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development* 121, 1321-1332.

- New, D. A. T. (1955). A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 3, 320-331.
- Newman, C. S., Chia, F. and Krieg, P. A. (1997). The Xhex homeobox gene is expressed during development of the vascular endothelium - overexpression leads to an increase in vascular endothelial cell number. *Mechanisms of Development* 66, 83-93.
- Niehrs, C. (1999). Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends in Genetics* 15, 314-319.
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G. and Cooke, J. (1994). Control of cell behaviour during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835-839.
- Niss, K. and Leutz, A. (1998). Expression of the homeobox gene Gbx2 during chicken development. *Mechanisms of Development* 76, 151-155.
- Oppel, A. (1890). Über Vorderkopfsomiten und die Kopfhöhle von *Anguis fragilis*. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 36, 603-627.
- Pannett, C. A. und Compton, A. (1924). The cultivation of tissues in saline embryonic juice. *Lancet* 205, 381-384.
- Pearse, R. V. and Tabin, C. J. (1998). The molecular ZPA. *Journal of Experimental Zoology*. 282, 677-690.
- Pera, E., Stein, S. and Kessel, M. (1999). Ectodermal patterning in the avian embryo: Epidermis versus neural plate. *Development* 126, 63-73.
- Pera, E. M. and Kessel, M. (1997). Patterning of the chick forebrain anlage by the prechordal plate. *Development* 124, 4153-4162.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: Inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86, 589-598.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V.K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111,229-233.
- Rex, M., Orme, A., Uwanogho, D., Tointon, K., Wigmore, P. M., Sharpe, P. T. and Scotting, P. J. (1997). Dynamic expression of chicken Sox2 and Sox3 genes in ectoderm induced to form neural tissue. *Developmental Dynamics* 209, 323- 332.
- Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Le Meur, M. and Ang, S. L. (1998). Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* 125, 845-856.
- Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M. and Pozzan, T. (1995). Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Current Biology* 5, 635-642.
- Rodriguez-Esteban, C., Capdevila, J., Economides, A. N., Pacual, J., Ortiz, A. and Izpisua, B.

- J. (1999). The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of left-right asymmetry. *Nature* 401, 243-251.
- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A. and 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.
- Rosenquist, G. C. (1966). A radioautographic study of labeled grafts in the chick blastoderm. Development from primitive-streak stages to stage 12. *Carn Contr. Embryol.* 38, 31-110.
- Ruiz i Altaba, A. (1993). Induction and axial patterning of the neural plate: planar and vertical signals. *Journal of Neurobiology* 24, 1276-1304.
- Ruiz i Altaba, A., Placzek, M., Baldassare, M., Dodd, J. and Jessell, T. M. (1995). Early stages of notochord and floor plate development in the chick embryo defined by normal and induced expression of HNF-3 beta. *Developmental Biology* 170, 299-313.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Schoenwolf, G. C. (1991). Cell movements in the epiblast during gastrulation and neurulation in avian embryos. In *Gastrulation* (ed. R. Keller et al.). p. 1-28. New York: Plenum Press.
- Schoenwolf, G. C. and Sheard, P. (1990). Fate mapping the avian epiblast with focal injections of a fluorescent-histochemical marker: ectodermal derivatives. *Journal of Experimental Zoology* 255, 323-339.
- Schultheiss, T. M., Xydas, S. and Lassar, A. B. (1995). Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development* 121, 4203-4214.
- Seifert, R., Jacob, M. and Jacob, H. J. (1993). The avian prechordal head region: a morphological study. *Journal of Anatomy* 183, 75-89.
- Sela-Donenfeld, D. and Kalcheim, C. (1999). Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development* 126, 4749-4762.
- Selleck, M. A. J. and Bronner-Fraser, M. (1995). Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development* 121, 525-538.
- Selleck, M. A. and Stern, C., D. (1991). Fate mapping and cell lineage analysis of Hensen's node in the chick embryo. *Development* 112, 615-626.
- Serbedzija, G. N. and McMahon, A. P. (1997). Analysis of neural crest cell migration in *Spotch* mice using a neural crest-specific LacZ reporter. *Developmental Biology* 185, 139-147.

Sham, M. H., Vesque, C., Nonchev, S., Marshall, H., Frain, M., Gupta, R. D., Whiting, J., Wilkinson, D., Charnay, P. and Krumlauf, R. (1993). The zinc finger gene *Krox20* regulates *HoxB2* (*Hox2.8*) during hindbrain segmentation. *Cell* 72, 183-96.

Shawlot, W. and Behringer, R. R. (1995). Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* 374, 425-430.

Shawlot, W., Deng, J. M. and Behringer, R. R. (1998). Expression of the mouse cerberus-related gene, *Cerr1*, suggests a role in anterior neural induction and somitogenesis. *Proceedings of National Academy of Science USA* 95, 6198-6203.

Shawlot, W., Wakamiya, M., Kwan, K. M., Kania, A., Jessell, T. M. and Behringer, R. R. (1999). *Lim1* is required in both the primitive streak-derived tissues and visceral endoderm for head formation in the mouse. *Development* 126, 4925-4932.

Shih, J. and Fraser, S. E. (1996). Characterizing the zebrafish organizer - Microsurgical analysis at the early-shield stage. *Development* 122, 1313-1322.

Shimamura, K. and Rubenstein, J. L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124, 2709-2718.

Spemann, H. (1931). Über den Anteil von Implantat und Wirtskeim an der Orientierung und Beschaffenheit der induzierten Embryonalanlage. *Archiv für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik* 123, 390-516.

Spemann, H. and Mangold, H. (1924). Über die Induktion von Embryoanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux Archiv Entwicklungsmechanik* 100, 599-638.

Spratt, N. T. (1952). Localization of the prospective neural plate in the early chick blastoderm. *Journal of Experimental Zoology* 120, 109-130.

Spratt, N. T. J. (1946). Formation of the primitive streak in the explanted chick blastoderm marked with carbon particles. *Journal of Experimental Zoology* 103, 259-304.

Stein, S. and Kessel, M. (1995). A homeobox gene involved in node, notochord and neural plate formation of chick embryos. *Mechanisms of Development* 49, 37- 48.

Stein, S., Niß, K. and Kessel, M. (1996). Differential activation of the clustered homeobox genes *CNOT2* and *CNOT1* during notogenesis in the chick. *Developmental Biology* 180, 519-533.

Stern, C. D. (1993). Avian Embryos. In *Essential Developmental Biology-A Practical approach*. (ed. Stern, C. D. and Holland, P. W. H.) IRL Press: Oxford 45-54.

Storey, K. G., Crossley, J. M., De Robertis, E. M., Norris, W. E. and Stern, C. D. (1992). Neural induction and regionalisation in the chick embryo. *Development* 114, 729-741.

Streit, A. and Stern, C. D. (1999a). Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. *Mechanisms of Development* 82, 51-66.

- Streit, A. and Stern, C. D. (1999b). More to neural induction than inhibition of BMPs in cell lineage and fate determination. (ed. Moody, S., A.) Academic Press: San Diego.
- Streit, A., Lee, K. J., Woo, I., Roberts, C., Jessell, T. M. and Stern, C. D. (1998). Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo. *Development* 125, 507-519.
- Streit, A., Sockanathan, S., Perez, L., Rex, M., Scotting, P. J., Sharpe, P. T., Lovell-Badge, R. and Stern, C. D. (1997). Preventing the loss of competence for neural induction: HGF/SF, L5 and Sox-2. *Development* 124, 1191-1202.
- Sulik, K., Dehart, D. B., Iangaki, T., Carson, J. L., Vrablic, T., Gesteland, K. and Schoenwolf, G. C. (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Developmental Dynamics* 201, 260-278.
- Tam, P. P. L. (1989). Regionalisation of the mouse embryonic ectoderm: allocation of prospective ectodermal tissues during gastrulation. *Development* 107, 55-67.
- Tam, P. P. L. and Beddington, R. S. P. (1987). The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis. *Development* 99, 109-126.
- Tam, P. P. L. and Behringer, R. R. (1997). Mouse gastrulation - The formation of a mammalian body plan. *Mechanisms of Development* 68, 3-25.
- Tam, P. P. L. and Steiner, K. A. (1999). Anterior patterning by synergistic activity of the early gastrula organizer and the anterior germ layer tissues of the mouse embryo. *Development* 126, 5171-5179.
- Tam, P. P. L., Steiner, K. A., Zhou, S. X. and Quinlan, G. A. (1997). Lineage and functional analyses of the mouse organizer. *CSH Symposium of Quantitative Biology* 62, 135-144.
- Thomas, P. and Beddington, R. S. P. (1996). Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Current Biology* 6, 1487-1496.
- Thomas, P., Brickman, J. M., Popperl, H., Krumlauf, R. and Beddington, R. S. P. (1997). Axis duplication and anterior identity in the mouse embryo. *CSH Symposium of Quantitative Biology* 62, 115-125.
- Thomas, P. Q., Brown, A. and Beddington, R. S. P. (1998). Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* 125, 85- 94.
- Tremblay, P., Kessel, M. and Gruss, P. (1995). A transgenic neuroanatomical marker identifies cranial neural crest deficiencies associated with the Pax3 mutant *Splotch*. *Developmental Biology* 171,317- 329.
- Tsang, T. E., Kinder, S. J. and Tam, P. P. L. (1999). Experimental analysis of the emergence of left-right asymmetry of the body axis in early postimplantation mouse embryos. *Cellular and Molecular Biology* 45, 493-503.

- Varlet, I., Collignon, J. and Robertson, E. J. (1997). Nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development* 124, 1033-1044.
- Viebahn, C., Mayer, B. and Hrabe de Angelis, M. (1995). Signs of the principle body axes prior to primitive streak formation in the rabbit embryo. *Anatomical Embryology* 192, 159-169.
- Vincent, M. and Thiery, J. P. (1984). A cell surface marker for neural crest and placodal cells: further evolution in peripheral and central nervous system. *Developmental Biology* 103, 468-81.
- Wachtler, F., Jacob, H. J., Jacob, M. and Christ, B. (1984). The extrinsic ocular muscles in birds are derived from the prechordal plate. *Naturwissenschaften* 71, 379-380.
- Waddington, C. H. (1932). Experiments on the development of chick and duck embryos, cultivated in vitro. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 221, 179- 230.
- Waddington, C. H. (1933). Induction by the endoderm in birds. *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org.* 128, 502-521.
- Waddington, C. H. (1936). Organizers in mammalian development. *Nature* 138, 125.
- Waddington, C. H. (1937). Experiments on determination in the rabbit embryo. *Archives Biology* 48, 273-290.
- Weinstein, D. C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W. S., Hoodless, P., Prezioso, V. R., Jessell, T. M. and Darnell, J. E. Jr. (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78, 575-588.
- Wilkinson, D. G. (1992). *In Situ Hybridisation: a Practical Approach*. London: Oxford University Press.
- Yang, T. T., Cheng, L. and Kain, S. R. (1996). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Research* 24, 4592-4593.
- Yatskievych, T. A., Pascoe, S. and Antin, P. B. (1999). Expression of the homeobox gene *Hex* during early stages of chick embryo development. *Mechanisms of Development* 80, 107-109.
- Yuan, S., Darnell, D. K. and Schoenwolf, G. C. (1995). Mesodermal patterning during avian gastrulation and neurulation: experimental induction of notochord from non-notochordal precursor cells. *Dev. Gen.* 17, 38-54.
- Zaraisky, A. G., Ecochard, V., Kazanskaya, O. V., Lukyanov, S. A., Fesenko, I. V. and Duprat, A. M. (1995). The homeobox-containing gene *XANF-1* may control development of the Spemann organizer. *Development* 121, 3839-3847.
- Zimmermann, L. B., De Jesus-Escobar, J. M. and Harland, R. (1996). The Spemann organizer signal *noggin* binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599-606.

Anhang

1. Danksagung

An erster Stelle danke ich Priv. Doz. Dr. Michael Kessel für seine uneingeschränkte, geistige wie tatkräftige Unterstützung, seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft, seinen unermüdlischen Experimentieretifer (bis in die Nacht hinein), seinen Weit- und Überblick, sowie für seine Bereitschaft, auch die überraschendsten Ergebnisse mit ausgefeilten Hypothesen zu deuten. Die Kombination dieser Eigenschaften hat das Erstellen dieser Arbeit zu einem angenehmen und produktiven Unterfangen werden lassen.

Priv. Doz. Dr. W. H. Müller danke ich für die hilfsbereite und freundliche Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Referates.

Wiebke Behrens danke ich nicht nur für ihre fachkundige, hilfsbereite und umsichtige Unterstützung, ohne die diese Arbeit vermutlich Jahre mehr beansprucht hätte, sondern auch für das lächelnde Ertragen laboralltäglicher Fatuitäten.

Dieter Treichel danke ich für eine schier unendliche Menge an unverzichtbaren, detaillierten und hochqualifizierten Antworten zu allen nur erdenklichen Fragen der Biologie, Chemie und weit darüber hinaus. Seine Bereitschaft sich uneigennützig zur Problemlösung einzusetzen, ist einzigartig.

Dr. Thomas Böttger, Dr. Edgar Pera und Dr. Lydia Lemaire danke ich dafür, daß sie mir den Anfang meiner Zeit in der Abteilung durch große Hilfsbereitschaft sehr erleichtert haben.

Dr. Ulrike Teichmann danke ich für ihre unverzichtbare, tatkräftige Unterstützung nicht zuletzt bei der weniger schönen Aufgabe an die Kaninchenembryonen zu gelangen.

Priv. Doz. Dr. Christoph Viebahn danke ich für die effektive Zusammenarbeit bei der Durchführung des Kaninchenprojekts.

Lars Wittler danke ich für das aktive Ausleben seiner fatalistischen, mit humanistischer Bildung und strenger Prinzipientreue gepaarten Lebenseinstellung, die jeglichen Bodenverlust durch verfrühte Freude, leichtfertige Illusion oder Euphorie über fragwürdige wissenschaftliche Durchbrüche zu verhindern wußte.

Wolfgang Vukovich danke ich für die Einführung in die wenig dokumentierte und immer noch etwas geheimnisvoll anmutende Elektroporation der Hühnerembryonen.

Derek Spieler danke ich für seine überschwengliche Begeisterungsfähigkeit, die nur noch beiläufig wahrgenommene Vorgänge des Laboralltags in einem anderen Licht erscheinen ließen.

Petros Petrou danke ich für seine hilfsbereiten Ratschläge und Diskussionen um zelluläre

Lokalisationen und in vitro-Translationen.

Für die effektive Erweiterung meiner Sprachkenntnisse und stetes Interesse an dem Verlauf der Arbeit danke ich Ahmed Mansouri.

Prof. Dr. Peter Gruss danke ich für die exzellenten Laborbedingungen und die Durchführung der Ringbergseminare.

Mein besonderer Dank gilt auch dem Boehringer Ingelheim Fonds, insbesondere Dr. Fröhlich, Monika Beutelspacher und Dr. Claudia Walther für ihren engagierten Einsatz.

Zuletzt danke ich Daniela für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihre Geduld, ihre engagierte Sorge und Anteilnahme an den Höhen und Tiefen, die diese Arbeit begleitet haben. Daniela wird vermutlich eine der weniger Betriebswirte sein, die sich unter dem Animpfen von Bakterienkulturen und der In-situ-Hybridisierung von Embryonen nicht nur etwas vorstellen können, sondern sie auch selbst durchgeführt haben.

2. Liste der aus Prioritätsgründen bereits veröffentlichten Teile dieser Arbeit

Knoetgen, H., Teichmann, U. and Kessel, M. (1999). Head-organizing activities of endodermal tissues in vertebrates. *Cell. Mol. Biol.* **45**, 481-492.

Knoetgen, H., Viebahn, C. and Kessel, M. (1999). Head induction in the chick by primitive endoderm of mammalian, but not avian origin. *Development* **126**, 815-125.

Knoetgen, H., Teichmann, U., Wittler, L., Viebahn, C. and Kessel, M. (2000). Anterior neural induction by the nodes from rabbits and mice. *Developmental Biology* **225**, 370-380.

Knoetgen, H., Vukovich, W. and Kessel, M. Cresto triggers early neural crest development. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Böttger, T., Knoetgen, H., Wittler, L., and Kessel, M. (2000). The avian organizer. *International Journal of Developmental Biology*. In press.

3. Lebenslauf

Name: Knötgen

Vorname: Hendrik

Geburtsort: Münster in Westfalen

Geburtstag: 30.08.1971

Familienstand: verheiratet mit Daniela Meßmann

Schulbildung: 1978 - 1981 Paul-Gerhardt-Grundschule, Münster
1981 - 1991 Kardinal-von-Galen-Gymnasium, Münster

Schulabschluß: Abitur

Wehrdienst: Juli 1991 - Juni 1992
Protokollsoldat im 6./Wachbataillon beim Bundesministerium der
Verteidigung, Siegburg

Studium: Oktober 1992 - November 1997
Biochemie (Diplom) an der Universität Hannover und Medizini-
schen Hochschule Hannover

Studienabschluß: Diplom-Biochemiker
November 1997

Diplomarbeit: Molekulare Anlage der Hypophyse
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie,
Göttingen, bei Priv. Doz. Dr. Michael Kessel

Förderungen: Juli 1995 - Juli 1997
Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
Mai 1998 - November 2000
Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds