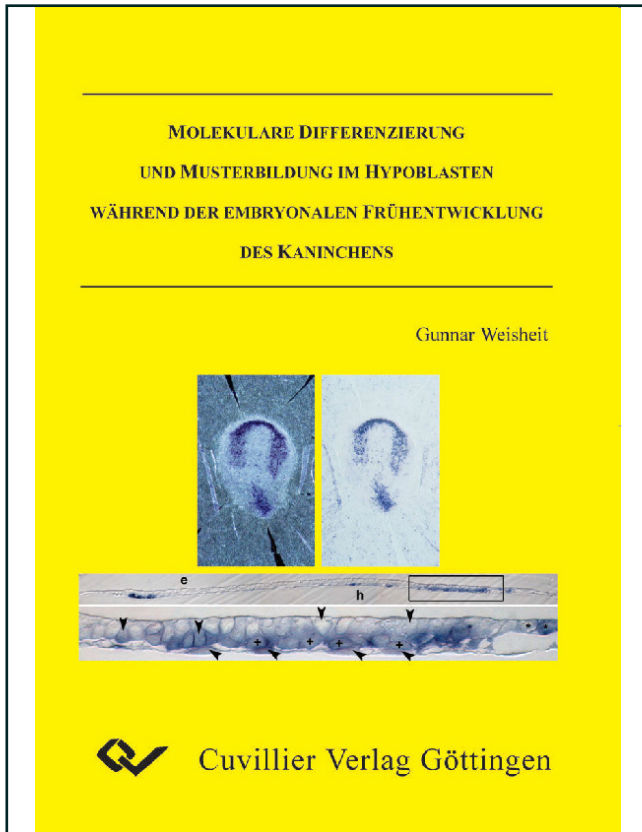




Gunnar Weisheit (Autor)

Molekulare Differenzierung und Musterbildung im Hypoblasten während der embryonalen Frühentwicklung des Kaninchens



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3148>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

INHALTSVERZEICHNIS

VORWORT	V
VORVERÖFFENTLICHUNGEN	VII
PUBLIKATIONEN	VII
ABSTRACTS UND VORTRÄGE	VII
POSTERBEITRÄGE	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
INHALTSVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 GASTRULATION	3
1.2 KOPF- UND RUMPFDIFFERENZIERUNG	3
1.3 ACHSENBILDUNG VOR DER GASTRULATION	4
1.4 MARKERGENE DER FRÜHEN ENTWICKLUNG	6
1.5 MODELLORGANISMUS KANINCHEN	10
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	11
2 MATERIAL & METHODEN	13
2.1 GERÄTE	13
2.2 VERBRAUCHSMATERIAL	14
2.3 CHEMIKALIEN	15
2.3.1 Laborchemikalien	15
2.3.2 Chemikalien und Substanzen für ISH	15
2.3.3 Reagenzien für die Molekularbiologie	16
2.3.4 Betäubungsmittel	16
2.3.5 Reagenzien für die Elektrophorese	16
2.3.6 Färbereagenzien	16
2.3.7 Antikörper	16
2.3.8 Antibiotika	16
2.3.9 Substanzen für Nährmedien	17
2.4 BAKTERIENSTÄMME UND VEKTOREN	17
2.5 NÄHRMEDIEN	17
2.6 PUFFER UND LÖSUNGEN	18
2.6.1 Agarosegel-Elektrophoresepuffer	18
2.6.2 Puffer einiger modifizierender Enzyme	18
2.6.3 Puffer und Lösungen für ISH	19
2.6.4 Northern-Blot Puffer	20
2.6.5 Sonstige Puffer und Lösungen	21
2.7 MODIFIZIERENDE ENZYME	23
2.8 AUSGEWÄHLTE RESTRIKTIONSENZYME	23
2.9 KITS	23
2.9.1 Kits für gRNA Gewinnung aus Geweben und Zellen	23
2.9.2 Kits für Extraktionen von DNA aus Agarosegelen	24
2.9.3 Kits für die Gewinnung von gesamt-cDNA	24
2.9.4 Kits für die Polymerase Chain Reaction (PCR)	24
2.9.5 Kits für die Plasmidaufreinigung	24
2.10 PRIMER	24
2.10.1 Gegenprimer für PCR-Amplifikationen	24
2.10.2 Colony-PCR- und Sequenzierungsprimer	24
2.10.3 <i>Anf</i> -Primer für interne Sequenz und 3'-RACE	25
2.10.4 <i>Chd</i> -Primer für interne Sequenz und 3'-RACE	25
2.10.5 <i>Chd</i> -Primer mit T3 oder T7 Promotorsequenz	25
2.10.6 <i>Dkk1</i> -Primer für interne Sequenz und 3'-RACE	25
2.10.7 <i>Dkk1</i> -Primer mit T3 oder T7 Promotorsequenz	25
2.10.8 <i>Dkk1</i> -Primer für 5'-RACE	25
2.10.9 <i>Dkk1</i> -Primer zur Herstellung eines Expressionsvektors	26

2.10.10	<i>Lim1</i> -Primer für interne Sequenz und 3'-RACE.....	26
2.10.11	<i>Lim1</i> -Primer mit T3 oder T7 Promotorsequenz.....	26
2.10.12	<i>Otx2</i> -Primer für interne Sequenz und 3'-RACE.....	26
2.10.13	<i>Otx2</i> -Primer mit T3 oder T7 Promotorsequenz.....	26
2.11	AMPLIFIKATLÄNGEN.....	27
2.12	SICHERHEITSBESTIMMUNGEN.....	28
2.13	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN.....	28
2.13.1	Allgemeine Bemerkungen.....	28
2.13.2	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	28
2.13.3	Agarose-Gelelektrophorese von RNA.....	28
2.13.4	Alkoholfällung und Waschen von DNA bzw. RNA.....	29
2.13.5	Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	29
2.13.6	Elution von DNA aus Agarosegelen.....	31
2.13.7	Geldokumentation und Gelquantifizierung von DNA und RNA.....	31
2.13.8	Gießen von Agarplatten.....	32
2.13.9	Herstellung von Übernachtskulturen.....	32
2.13.10	Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA.....	32
2.13.11	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	32
2.14	RNA-PRÄPARATIONEN.....	33
2.14.1	Allgemeine Maßnahmen beim Umgang mit RNA.....	33
2.14.2	Präparation von Gesamt-RNA.....	33
2.15	REVERSE TRANSKRIPTION FÜR CDNA-SYNTHESE.....	34
2.16	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR).....	35
2.16.1	Ableitung von degenerierten Primern.....	35
2.16.2	PCR-Amplifikationen.....	36
2.16.3	PCR-Amplifikationsansätze für verschiedene DNA-Polymerasen.....	37
2.16.4	Standard-PCR-Bedingungen.....	38
2.16.5	Colony-PCR.....	38
2.16.6	Gradienten-PCR.....	39
2.16.7	Nested-PCR.....	39
2.16.8	Hot-Start-PCR.....	39
2.16.9	Touch-Down-PCR.....	39
2.17	5'-RACE.....	40
2.17.1	Nukleotidtransferasereaktion / Polyadenylierung.....	40
2.17.2	Zweitstrangsynthese und PCR in einem Schritt.....	40
2.18	KLONIERUNG VON CDNA.....	41
2.18.1	Dephosphorylieren der Vektor-DNA.....	41
2.18.2	Vorbehandlung des Inserts.....	42
2.18.3	Ligation.....	43
2.18.4	Elektrotransformation.....	44
2.19	PLASMIDPRÄPARATION.....	45
2.19.1	Minipräparation.....	45
2.19.2	Maxipräparation.....	45
2.20	GEWEBEPRÄPARATIONEN.....	45
2.20.1	Gewinnung von Kaninchenembryonen.....	45
2.20.2	Einbettung und Anfertigung von Semidünnschnitten.....	46
2.21	<i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNGEN.....	47
2.21.1	Sondenherstellung.....	47
2.21.2	ISH an <i>whole mounts</i>	49
2.21.3	ISH an Kryoschnitten.....	51
2.22	NICHRADIOAKTIVES NORTHERNBLOTTING.....	52
2.22.1	Sondenpräparation, Gelsystem und Probenvorbereitung.....	52
2.22.2	Blotten.....	53
2.22.3	Detektion.....	54
2.23	ZELLKULTURMETHODEN.....	55
2.23.1	Kulturbedingungen für CHO-Zellen.....	55
2.23.2	Trypsinisierung der Zellen.....	55
2.23.3	Transfektion von CHO-Zellen.....	55
2.23.4	Klonierung transgener Zellen.....	55
2.23.5	Flachkulturen auf Agarosehügeln.....	56

3	ERGEBNISSE	57
3.1	ENTWICKLUNGSGENE: ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND EXPRESSIONSMUSTER	57
3.1.1	cDNA- und Proteinsequenz des <i>Lim1</i> -Gens.....	58
3.1.2	<i>Lim1</i> -Expressionsmuster	58
3.1.3	cDNA- und Proteinsequenz des <i>Otx2</i> -Gens	61
3.1.4	<i>Otx2</i> -Expressionsmuster	61
3.1.5	cDNA- und Proteinsequenz des <i>Anf</i> -Gens	64
3.1.6	<i>Anf</i> -Expressionsmuster.....	64
3.1.7	cDNA- und Proteinsequenz des <i>Dkk1</i> -Gens	65
3.1.8	<i>Dkk1</i> -Expressionsmuster.....	66
3.1.9	cDNA- und Proteinsequenz des Gens <i>Chordin</i>	72
3.1.10	<i>Chd</i> -Expressionsmuster.....	72
3.2	ISOLIERUNG DIFFERENTIELL EXPRIEMTER GENE	74
3.3	<i>ISH</i> -METHODE AN MINIATUROBJEKTTRÄGERN	74
3.4	FLACHKULTUREXPERIMENTE MIT TRANSPLANTierten DKK1-EXPRIMIERENDEN ZELLEN	76
4	DISKUSSION	79
4.1	DISKUSSION DER METHODEN	79
4.1.1	Kaninchen als Modellorganismus	79
4.1.2	Sondenherstellung.....	79
4.1.3	cDNA-Gewinnung für Subtraktionsexperimente.....	80
4.1.4	Transplantationsversuche mit transgenen Zellen	81
4.1.5	<i>In situ</i> Hybridisierungen an Miniaturobjektträgern	82
4.2	DISKUSSION DER SEQUENZEN	83
4.2.1	<i>Lim1</i> -Sequenzanalyse.....	83
4.2.2	<i>Otx2</i> -Sequenzanalyse	84
4.2.3	<i>Anf</i> -Sequenzanalyse	85
4.2.4	<i>Dkk1</i> -Sequenzanalyse	87
4.2.5	<i>Chd</i> -Sequenzanalyse	87
4.3	DISKUSSION DER EXPRESSIONSMUSTER	89
4.3.1	Vergleich der Expressionsmuster in verschiedenen Spezies.....	89
4.3.2	Topographischer Vergleich der untersuchten Entwicklungsgene	92
4.3.3	Funktioneller Vergleich der untersuchten Entwicklungsgene.....	95
4.3.4	Modell zur Funktion des Hypoblasten	96
5	ZUSAMMENFASSUNG	99
6	ANHANG	101
6.1	CDNA UND PROTEINSEQUENZEN	101
6.2	SEQUENZVERGLEICHE	106
7	LITERATURVERZEICHNIS	111