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 *Anf*-Primer für interne Sequenz und 3'-RACE 25
2.10.4 *Chd*-Primer für interne Sequenz und 3'-RACE 25
2.10.5 *Chd*-Primer mit T3 oder T7 Promotorsequenz 25
2.10.6 *Dkk1*-Primer für interne Sequenz und 3'-RACE 25
2.10.7 *Dkk1*-Primer mit T3 oder T7 Promotorsequenz 25
2.10.8 *Dkk1*-Primer für 5'-RACE 25
2.10.9 *Dkk1*-Primer zur Herstellung eines Expressionsvektors 26

2.10.10 *Lim1*-Primer für interne Sequenz und 3'-RACE 26
2.10.11 *Lim1*-Primer mit T3 oder T7 Promotorsequenz 26
2.10.12 *Otx2*-Primer für interne Sequenz und 3'-RACE 26
2.10.13 *Otx2*-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 Übernachtkulturen 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 *IN SITU* HYBRIDISIERUNGEN 47
2.21.1 Sondenherstellung 47
2.21.2 ISH an *whole mounts* 49
2.21.3 ISH an Kryoschnitten 51
2.22 NICHTRADIOAKTIVES 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 *Lim1*-Gens ... 58
3.1.2 *Lim1*-Expressionsmuster ... 58
3.1.3 cDNA- und Proteinsequenz des *Otx2*-Gens ... 61
3.1.4 *Otx2*-Expressionsmuster ... 61
3.1.5 cDNA- und Proteinsequenz des *Anf*-Gens ... 64
3.1.6 *Anf*-Expressionsmuster ... 64
3.1.7 cDNA- und Proteinsequenz des *Dkk1*-Gens ... 65
3.1.8 *Dkk1*-Expressionsmuster ... 66
3.1.9 cDNA- und Proteinsequenz des Gens *Chordin* ... 72
3.1.10 *Chd*-Expressionsmuster ... 72
3.2 ISOLIERUNG DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE ... 74
3.3 *ISH*-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 *In situ* Hybridisierungen an Miniaturobjektträgern ... 82
4.2 DISKUSSION DER SEQUENZEN ... 83
4.2.1 *Lim1*-Sequenzanalyse ... 83
4.2.2 *Otx2*-Sequenzanalyse ... 84
4.2.3 *Anf*-Sequenzanalyse ... 85
4.2.4 *Dkk1*-Sequenzanalyse ... 87
4.2.5 *Chd*-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