1 EINLEITUNG

Die moderne Entwicklungs- und Evolutionsbiologie hat ihre Anfänge in den Ideen von Charles Darwin, die zu der Theorie über die Entwicklung der Arten führten. Die Kombination der evolutionären und entwicklungsbiologischen Betrachtungsweisen führte in den sechziger Jahren des 19. Jahrhunderts zu dem von Ernst Haeckel postulierten biogenetischen Grundgesetz, demzufolge die Ontogenese eine zeitverkürzte Rekapitulation der Phylogenese ist. Nach heutigem Verständnis trifft diese Betrachtungsweise allerdings nur auf einzelne Strukturen des sich entwickelnden Gesamtorganismus zu, die für embryonale Entwicklungsvorgänge grundlegende funktionelle Bedeutung haben und auf diese Weise verschiedenen Spezies in ihrer Embryogenese vergleichbar machen, auch wenn in der weiteren Entwicklung divergente adulte Muster entstehen. Solche Strukturen werden in der Regel nur vorübergehend ausgebildet und folgen in der Ontogenese in derselben Reihenfolge aufeinander, in der sie in der Phylogenese auftreten.

Ein Beispiel hierfür ist die Ausbildung des Primitivstreifens bei Amnioten (Reptilien, Vögel und Säugetiere): Der Primitivstreifen ist als erstes Achsenorgan ein indirekter Vorläufer der Wirbelsäule und legt initial die anteroposteriore Körperachse fest; er wird zunächst als Streifen mit hoher Zelldichte im posterioren Drittel einer runden, zunächst punktsymmetrischen Keimscheibe sichtbar und bildet sich im Verlauf der Embryogenese vollständig zurück. Der Primitivstreifen sieht bei Vogel und Säuger ähnlich aus und hat bei beiden Spezies eine entscheidende Funktion für die korrekte Entwicklung des Körperbauplanes. Wegen dieser grundlegenden Funktion, und nicht allein wegen der Form, folgt im Fall des Primitivstreifens die Ontogenese der Haeckelschen Regel, ohne daß sich der Säuger während der embryonalen Entwicklung vorübergehend zu einem Vogel entwickelt.

Eine weitere Struktur, die bei Vogel und Säuger eine ähnliche Form und möglicherweise grundlegende Bedeutung für die Entwicklung des Körperbauplanes hat, ist der sogenannte Hypoblast. Dabei handelt es sich um eine extraembryonale Zellschicht, die vor und während der Primitivstreifenbildung vorhanden ist. Sie liegt unter dem sogenannten Epiblasten, der Zellschicht, aus der sich der eigentliche Embryo entwickelt. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf Genexpressionsmuster im Hypoblasten, da von ihm angenommen werden kann, besondere funktionelle Bedeutung bei der Bildung des Primitivstreifens im Epiblasten, und damit der großen Körperachsen, zu besitzen. Der Vergleich der Genexpressionsmuster mit denjenigen im Hypoblasten anderer Spezies könnte dann eine phylogenetische Bedeutung des Hypoblasten im Sinne Haeckels aufdecken.

Die Festlegung der drei Körperachsen höherer Tiere folgt den Anforderungen einer komplexen dreidimensionalen Umwelt und gliedert den Körper zunächst in ventral und dorsal und schließlich auch in anterior und posterior sowie rechts und links liegende Abschnitte. Damit sind die Körperachsen ein frühes morphologisches Anzeichen des adulten Körperbauplanes. Die Hauptkörperachse, die sowohl bei Tieren (anteroposteriore Achse), als auch bei Pflanzen (Achse von der Wachstumsspitze zur Wurzel) gebildet wird, geht mit der Entstehung einer bilateralen Symmetrie einher.

Der durch die Festlegung von Achsen und Zellschichten strukturierte Embryo wird in den folgenden Absätzen eingehender betrachtet, um die funktionelle Bedeutung des Hypoblasten beschreiben zu können. Lange Zeit stützte sich ein großer Teil der Erkenntnis der Entwicklungsbiologie auf morphologische Untersuchungen. In der Verknüpfung dieser klassischen Vorstellungen mit neueren Erkenntnissen der Genetik stellt sich die Entwicklung eines Körperbauplanes als ein Musterbildungsprozeß dar, bei dem innerhalb des Embryos ein räumliches und zeitliches Muster von Zellaktivitäten aufgebaut wird. Eine Aufgabe der heutigen Entwicklungsbiologie besteht darin, die molekularen Mechanismen aufzuklären, die diesen Musterbildungsprozessen zugrunde liegen und sie steuern.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung von Genaktivitätsmustern im Hypoblastgewebe, der unteren von zwei Zellschichten (vorläufigen Keimblättern) im frühen Säugerembryo (vgl. **Abb. 1**). Die zellulären Bestandteile des Hypoblasten tragen selbst nicht zu den Geweben des Embryos bei; deshalb wird der Hypoblast auch zu den extraembryonalen Geweben gezählt. Trotzdem finden sich im Hypoblasten zwei Klassen von Molekülen, die für die Entwicklung eines Körperbauplanes besonders wichtig sind: Wachstumsfaktoren, die als sogenannte Morphogene Positions- und Determinationsinformationen von Zelle zu Zelle vermitteln können, und Transkriptionsfaktoren, die die Aktivierung oder Repression von Genen bewirken. Die Expression dieser Entwicklungsgene wirkt sich in der Regel auf Zelldiversifikation und Musterbildung aus, d. h. unter ihrer Wirkung entwickeln sich aus einer einzelnen Zelle verschiedene Zelltypen, die darüber hinaus im Raum eine bestimmte Anordnung annehmen. Dies führt zu zwei Fragen: In welchem Maß nimmt der morphologisch ebenmäßige Hypoblast auf molekularer Ebene als Induktor die Ausbildung einer anteroposterioren Achse vorweg? Trägt der Hypoblast dadurch zur Musterbildung im über ihm liegenden, sich allein zum embryonalen Gewebe entwickelnden Epiblasten bei? Die Phase in der Entwicklung des Embryos, in der sich diese Vorgänge abspielen, ist die Gastrulation.

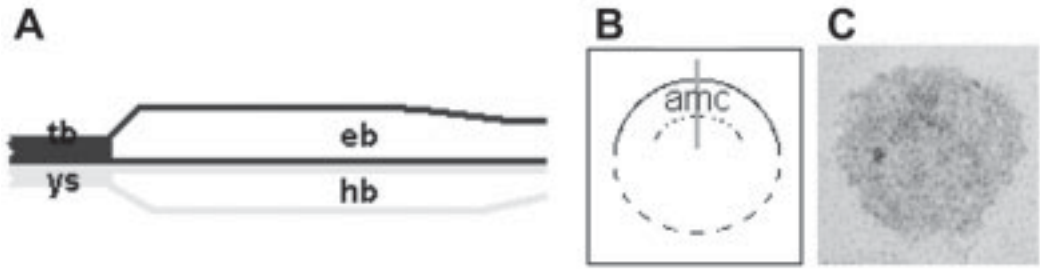

Abb. 1: Kompartimentierung der frühen Säugerkeimscheibe. Schematischer Sagittalschnitt im Bereich des Vorderen Randbogens (**A**) und Aufsicht auf eine Keimscheibe (**B**). Die Position des Sagittalschnittes ist durch eine rote Linie in B hevorgehoben. Zum Vergleich eine mit OsO_4 gefärbte Keimscheibe in der Aufsicht im Stadium 1 (**C**). **amc** (Vordere Randbogen, engl. für *anterior marginal crescent*), **eb** (Epiblast), **hb** (Hypoblast), **tb** (Trophoblast) und **ys** (*yolk sack*, engl. für Dottersackepithel). Abbildung verändert aus Viebahn, 1999.

1.1 Gastrulation

Bei der Gastrulation handelt es sich um den ersten großen morphologisch sichtbaren Prozeß der Musterbildung in der Entwicklung der Amnioten, ein Entwicklungsschritt, in dem die Anordnung der Organanlagen festgelegt wird. Die Gastrulation beginnt damit, daß sich aus der zweiblättrigen Keimscheibe, bestehend aus einer Epiblast- und Hypoblastschicht, ein dreiblättriger Embryo entwickelt, wobei sich die radiäre Symmetrie zu einer bilateralen wandelt: Es bildet sich die anteroposteriore Achse, also eine morphologische Unterscheidung von anterior und posterior, die der kraniokaudalen, sich von Kopf zu Schwanz spannenden Körperachse des weiterentwickelten Embryos, entspricht. Nach klassischen Vorstellungen beginnt die Achsenbildung durch Ausbildung des Primitivstreifens im hinteren Drittel der Keimscheibe: Der Primitivstreifen entwickelt sich dabei ausgehend vom kaudalen Rand der Keimscheibe entlang der medianen anteroposterioren Achse, als längliche Verdickung des Epiblasten. Im Bereich des Primitivstreifens verlassen Zellen den epithelialen Verband des Epiblasten, durchbrechen die Basalmembran und wandern zwischen Epiblast und Hypoblast ein. Als Ergebnis dieser Zellwanderung bilden sich die definitiven Keimblätter: zuerst durch epitheliomesenchymale Transformation das Mesoderm (mittleres Keimblatt) und darauffolgend durch Verdrängung der Hypoblastzellen das Endoderm (analoge Bezeichnungen: Entoderm, inneres Keimblatt). Aus den verbleibenden Epiblastzellen entwickelt sich schließlich das Ektoderm (äußeres Keimblatt).

1.2 Kopf- und Rumpfdifferenzierung

Kopf- und Rumpfbildung stellen weitere entscheidende Entwicklungsschritte in der Kompartimentierung des Embryos dar und werden ebenfalls während der Gastrulation manifest. In Amphibienembryonen induzieren Transplantate der oberen Urmundlippe, der sogenannten Organisator-Region, an einen Ort in Wirtsembryonen, aus dem sich normalerweise Bauchhaut gebildet hätte, eine komplette sekundäre Achse mit Urwirbeln und Neuralstrukturen (Spemann und Mangold, 1924). Analoge Experimente mit dem Primtivknoten der Maus bestätigen zwar die Ausbildung einer sekundären Achse, aber keine erkennbaren anterioren Neuralgewebe (Beddington, 1994). Der Primitivknoten besitzt somit nicht das volle Induktionspotential wie der Organisator aus Amphibien. Es könnte also einen separaten Induktor mit einem eigenständig zwischen Kopf und Rumpf unterscheidenden Signalsystem geben, der die Kopfbildung und Neurulation steuert. Neuere Experimente zeigen, daß es sich bei diesem induktiven Gewebe um den Hypoblasten handeln könnte, da bei der Maus nach der Abtrennung des visceralen Endoderms (analoger Begriff zu Hypoblast im Kaninchen) die Kopfentwicklung deutlich beeinträchtigt ist (Thomas und Beddington, 1996).

Wenn der Hypoblast eine induktive Funktion auf den Epiblasten ausübt, dann müssen bei der Bildung und Entwicklung der Keimscheibe Interaktionen zwischen den beiden Keimblättern bestehen (zum Aufbau der zweiblättrigen Keimscheibe vgl. **Abb. 1**). Hinweise auf Interaktionen fanden Waddington, 1933 sowie Azar und Eyal-Giladi, 1981 bei Rotationsversuchen an der Keimscheibe

des Huhns im Stadium des Primitivstreifens, die allerdings von Khaner, 1995 nicht bestätigt werden konnten. Neuere Untersuchungen an Hühnerembryonen bestätigen, daß der Hypoblast in Transplantationsexperimenten keine neuralen Gewebetypen induzieren kann, aber in der Lage ist, die Zellwanderung im darüber liegenden Epiblasten zu beeinflussen (Foley et al., 2000). Auch morphologische Daten aus Kaninchen zeigen, daß der Hypoblast für eine induktive Funktion prädestiniert ist, da er früher als andere Gewebe des Embryos anteroposteriore Differenzierungen zeigt.

1.3 Achsenbildung vor der Gastrulation

Neuere morphologische Untersuchungen zeigen, daß die anteroposteriore Achse beim Säuger bereits vor der Primitivstreifenbildung sichtbar ist. Dies zeigt sich besonders deutlich bei Keimscheiben vom Kaninchen, die mit einer Mischung aus Glutaraldehyd und Osmium fixiert und in einem durchsichtigen Medium eingebettet wurden, wobei ein hoher Kontrast zwischen Geweben unterschiedlicher Dichte entsteht (Viebahn et al., 1995). In der Aufsicht von dorsal werden dadurch in embryonalem und extraembryonalem Gewebe der frühen Gastrulastadien auch feine morphologische Strukturunterschiede sichtbar (**Abb. 2**). Um die Beschreibung der Aufgabenstellung für die vorliegende Arbeit, insbesondere die Beschreibung der zu untersuchenden Gene zu erleichtern, werden im folgenden die Gastrulationsvorgänge des Säugers anhand von morphologischen Stadien skizziert, die denjenigen des Huhnes ähnlich sind (Hamburger und Hamilton, 1993). Die Stadieneinteilung früher Stadien (Liebke, 1996 und Viebahn, pers. Mitteilung) wurde zum Teil erst in der vorliegenden Arbeit deutlich und deshalb die Skala um das Stadium 0 erweitert.

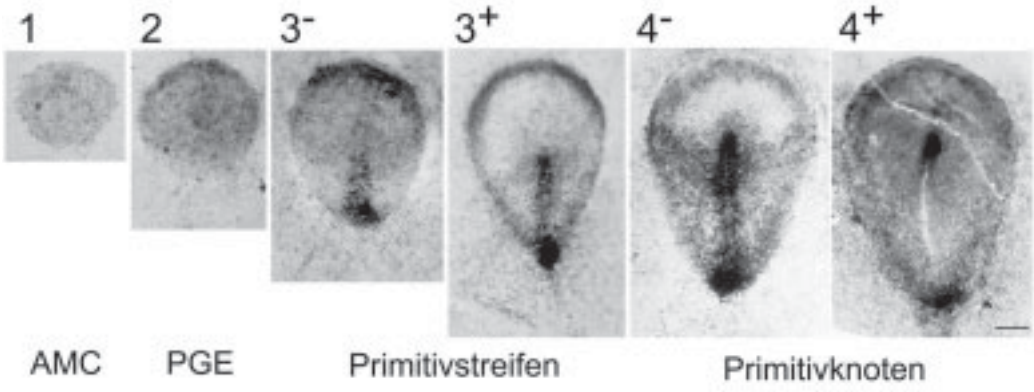

Abb. 2: Morphologische Veränderungen der Keimscheiben während der frühen Embryogenese am Beispiel von OsO_4-gefärbten Präparaten des Kaninchens. Über den in der Aufsicht von dorsal gezeigten Keimscheiben sind die Stadien angegeben, **AMC** (*anterior marginal crescent*), **PGE** (*posterior gastrula extension*). Maßstab: 200µm. (Abbildung von C. Viebahn, unveröffentlichte Ergebnisse)

In Stadium 0^- und früher liegt der Epiblast als Zellage zwischen Rauberscher Deckschicht (polarer Trophoblast) und Hypoblast und besteht aus flachen, lückenhaft angeordneten Zellen. In Stadium 0 ist die runde Keimscheibe mit dem umgebenden extraembryonalen Gewebe unregelmäßig verzahnt

(vgl. **Abb. 3**); eine Achsensymmetrie läßt sich nicht erkennen. Ab Stadium 0, endgültig in 0^+, bildet der Epiblast eine lückenlose Zellage aus, wobei die rundlichovale Form der Keimscheibe erhalten bleibt.

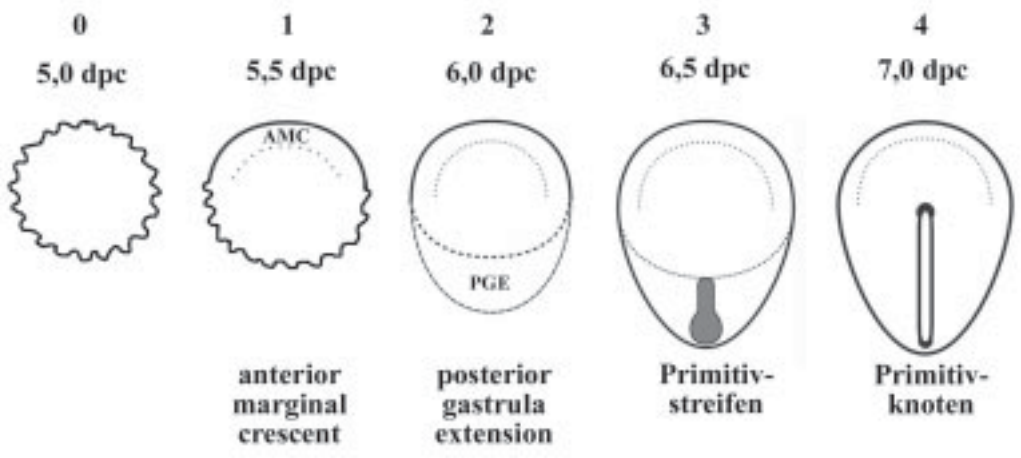

Abb. 3: Schematische Darstellung der morphologischen Merkmale der Kaninchenkeimscheibe in frühen Stadien vor und während der Gastrulation. Die Stadienangabe befindet sich in der obersten Zeile, darunter das Alter der Embryonen in *dies post conceptionem* (dpc). AMC (*anterior marginal crescent*, engl. für Vorderer Randbogen), PGE (*posterior gastrula extension*)

Im Stadium 1^- besitzt die Keimscheibe anterior einen kleinen Bereich, in dem der Keimscheibenrand eine glattrandige Begrenzung zum extraembryonalen Gewebe aufweist Liebke (1996). Im Stadium 1 hat die Keimscheibe immer noch eine rundlich-ovale Form, zeigt aber nunmehr bis zur Hälfte des Keimscheibenumfanges eine glattrandige Begrenzung, die dann im Stadium 1^+ die Hälfte bis drei Viertel des Keimscheibenumfanges einnimmt. In dem glattrandig begrenzten Teil der Keimscheibe bildet sich, beginnend in Stadium 1, eine band- bis sichelartige Zone, die eine erhöhte Zellzahl im Epiblasten und Hypoblasten aufweist und vom übrigen Gewebe unterschieden werden kann (Viebahn et al., 1995). Dieser Bereich wird, in Anlehnung an einen Begriff von Kölliker (1880), als Vorderer Randbogen (AMC, engl. *anterior marginal crescent*, Viebahn, 1995) bezeichnet. Kölliker fand die gleiche anteriore Struktur im Kaninchen in einem späteren Primitivstreifenstadium. Der Vordere Randbogen stellt ein entscheidendes Indiz für die frühe Ausbildung einer anteroposterioren Achse in Säugern dar (Kölliker, 1880; Viebahn, 1999).

Hingegen findet sich im Stadium 2 am posterioren Pol der Keimscheibe ein Bereich mit besonders geringer Zelldichte, die sogenannte Zone der *posterior gastrula extension* (PGE, Viebahn et al., 2002). Morphologisch ist somit mit Ausbildung einer glattrandigen Begrenzung am anterioren Pol der Keimscheibe in Stadium 1^- die anteroposteriore Achse definiert, die durch Entstehung des AMC im weiteren Verlauf des Stadiums 1 und der PGE im Stadium 2 zwei weitere Merkmale erhält.

Histologische Untersuchungen an frühen Embryonen des Kaninchens zeigen weiterhin, daß der Hypoblast in der undifferenzierten Keimscheibe des Stadiums 0^- die gleiche Form wie das parietale

Endoderm (Dottersackepithel) der übrigen Blastozyste hat und aus flachen Zellen besteht, die sich gut von den großen Zellen des Epiblasten unterscheiden lassen. In der anterioren Hälfte der Keimscheibe verändern sich die Zellen morphologisch kontinuierlich, bis sich im Stadium 1 eng benachbarte, isoprismatische Hypoblastzellen finden (Liebke M, 1996).

1.4 Markergene der frühen Entwicklung

Die vorgestellten morphologischen Daten wurden bereits früh durch Genexpressionsmuster in Maus unterstützt (Rosenquist und Martin, 1995; Hermesz et al., 1996; Thomas und Beddington, 1996). Diese Ergebnisse und der Vergleich der Morphologie verschiedener Säugerembryonen einschließlich der Maus legen eine frühe anteroposteriore Differenzierung vor Ausbildung des Primitivstreifens als grundlegenden Mechanismus in Säugern nahe (Viebahn, 1999) und weisen dem Hypoblasten eine wichtige Rolle bei diesem Prozeß zu (Beddington und Robertson, 1999). Einige Gene, die früh in der Achsenentwicklung im vorderen Abschnitt des Hypoblasten exprimiert werden und außerdem in Rechts-Links-Differenzierungsprozessen entscheidende Funktionen haben, sind in **Tab. 1** aufgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene werden in den nachfolgenden Abschnitten näher erläutert:

Transkriptionsfaktoren	
Gen	Referenzen
Gsc	Belo et al., 1997; Filosa et al., 1997
Hex	Thomas et al., 1998
HNF3β	Belo et al., 1997
Lim1, Lhx1	Shawlot und Behringer, 1995; Belo et al., 1997; Perea-Gomez et al., 1999
Otx2	Simeone et al., 1992; Ang et al., 1994
Rpx, Hesx1	Hermesz et al., 1996; Thomas und Beddington, 1996; *Anf*, Kazanskaya et al., 1997
Signalmoleküle	
Cer1	Cerberus like, Belo et al., 1997; Biben et al., 1998; Shawlot et al., 1998
Chd	Sasai et al., 1994; Larrain et al., 2000
Dkk1	*Dickkopf 1*, Glinka et al., 1998; *Mdkk1*, Pearce und Evans, 1999
Fgf8	Crossley und Martin, 1995
Lefty	*Lefty1 Ebaf*, Oulad-Abdelghani et al., 1998

Tab. 1: Frühe Entwicklungsgene mit ausgewählten Referenzen

Lim1 ist ein Mitglied der *Lim*-Klasse-Homeoboxgene und wird in der späteren Entwicklung im Bereich des Primitivknotens, der „mesodermalen Flügel“ und dem definitiven Mesendoderms, dem Vorläufer der Prächordalplatte des Mausembryos, exprimiert. Chimärenexperimente, bei denen sich der Hypoblast aus normalen Wildtypzellen (wt-Zellen) zusammensetzte, zeigen in der darüber