

Aus dem Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Dreidimensionale Darstellung der Schilddrüse und  
benachbarter arterieller Gefäße während der  
Embryogenese:  
Vergleich von Wildtyp- und Sonic-hedgehog-defizienten  
Mausembryonen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Pamela Schrupf

aus Berlin

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. H. Krude  
                          2. Prof. Dr. med. T. Schöneberg  
                          3. Prof. Dr. L. Schomburg

Datum der Promotion: 16. Mai 2010

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	KONGENITALE HYPOTHYREOSE .....	1
1.2	DIE SCHILDDRÜSE UND IHRE EMBRYONALE ENTWICKLUNG .....	3
1.3	DIE FRÜHE ORGANOGENESE DER ENDODERMALEN ORGANE LEBER UND PANKREAS.....	6
1.4	ENTWICKLUNG DER KIEMENBOGENARTERIEN.....	9
1.5	SONIC HEDGEHOG-DEFIZIENZ.....	10
1.5.1	Sonic hedgehog-Signalweg.....	10
1.5.2	Die Mausmutante Short Digits (Dsh).....	12
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	12
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>14</b>
2.1	MATERIAL .....	14
2.1.1	Geräte.....	14
2.1.2	Chemikalien und Substanzen .....	15
2.1.3	Verwendete Kits .....	16
2.1.4	Verwendete Enzyme .....	16
2.1.5	Verwendete Primer .....	16
2.1.6	Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	17
2.1.7	Sonstiges verwendetes Material.....	17
2.2	METHODEN.....	18
2.2.1	Mausarbeiten .....	18
2.2.1.1	Maushaltung und -zucht.....	18
2.2.1.2	Mauspräparation.....	18
2.2.1.3	Genotypisierung .....	19
2.2.2	Histologie .....	20
2.2.2.1	Herstellung silanisierter Objektträger .....	20
2.2.2.2	Entwässerung der Embryonen für die Einbettung in Paraffin .....	20
2.2.2.3	Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten .....	21
2.2.2.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	21
2.2.2.5	NKX2.1-Antikörperfärbung.....	21
2.2.3	Molekularbiologische Methoden .....	22
2.2.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe .....	22
2.2.3.2	Isolation von Gesamt-RNA aus Mausgewebe.....	22
2.2.3.3	Herstellung von cDNA .....	22
2.2.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	23
2.2.3.5	Agarose-Gel-Elektrophorese .....	23
2.2.3.6	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	24

2.2.3.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel .....	24
2.2.3.8	TOPO-Klonierung .....	24
2.2.3.9	Transformation und Bakterienanzucht .....	24
2.2.3.10	Plasmidpräparation .....	25
2.2.3.11	Plasmidverdau mit Restriktionsenzymen .....	26
2.2.3.12	Sequenzierung .....	27
2.2.4	In-situ-Hybridisierungen .....	28
2.2.4.1	Verwendete Sonden .....	28
2.2.4.2	Whole-mount in-situ-Hybridisierung .....	29
2.2.4.3	Radioaktive in-situ-Hybridisierung .....	31
2.2.5	Sonstige verwendete Methoden .....	33
2.2.5.1	Photodokumentation .....	33
2.2.5.2	3-dimensionale Rekonstruktion .....	33
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>35</b>
3.1	DIE SCHILDDRÜSENENTWICKLUNG IN WILDTYPEEMBRYONEN DER MAUS .....	35
3.1.1	Histologische Darstellung .....	35
3.1.1.1	Stadium E9.5 .....	35
3.1.1.2	Stadium E10.5 .....	36
3.1.1.3	Stadium E11.5 .....	37
3.1.1.4	Stadium E12.5 .....	38
3.1.1.5	Stadium E13.5 .....	38
3.1.1.6	Stadium E14.5 .....	39
3.1.2	3-dimensionale Rekonstruktion .....	40
3.1.2.1	Stadium E9.5 .....	40
3.1.2.2	Stadium E11.5 .....	40
3.1.2.3	Stadium E12.5 .....	41
3.1.2.4	Stadium E13.5 .....	42
3.1.2.5	Stadium E14.5 .....	43
3.2	DIE ENTWICKLUNG DER SCHILDDRÜSE IN HOMOZYGOTEN DSH/DSH-EMBRYONEN .....	44
3.2.1	Histologie .....	44
3.2.1.1	Stadium E11.5 .....	44
3.2.1.2	Stadium E12.5 .....	45
3.2.1.3	Stadium E13.5 .....	46
3.2.1.4	Stadium E14.5 .....	46
3.2.2	3-dimensionale Rekonstruktion .....	47
3.2.2.1	Stadium E11.5 .....	47
3.2.2.2	Stadium E12.5 .....	48
3.2.2.3	Stadium E13.5 .....	49
3.2.2.4	Stadium E14.5 .....	49

---

3.3	DIE MORPHOLOGIE DER SCHILDDRÜSE IN DSH/DSH $X^{T^J}/X^{T^J}$ DOPPELT HOMOZYGOTEN EMBRYONEN IM STADIUM E13.5 .....	51
3.3.1	Phänotyp der doppelt homozygoten Mausembryonen .....	51
3.3.2	Histologie .....	53
3.3.3	3-dimensionale Rekonstruktion .....	54
3.4	DIE EXPRESSION SCHILDDRÜSENSPEZIFISCHER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN IN DSH/DSH-EMBRYONEN .....	56
3.4.1	Shh und Ptch1 .....	56
3.4.2	Nkx2.1 .....	57
3.4.3	Pax8 .....	59
3.4.4	FoxE1 .....	62
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
4.1	DIE GEMEINSAME ENTWICKLUNG VON SCHILDDRÜSENANLAGE UND ARTERIELLEN GEFÄßEN.....	64
4.2	EINE GESTÖRTE ENTWICKLUNG DER ZERVIKALEN GEFÄßE FÜHRT ZU EINER STÖRUNG DER SCHILDDRÜSEN MORPHOGENESE.....	67
4.3	NEUE ASPEKTE FÜR DIE ÄTIOLOGIE DER SCHILDDRÜSENDYSGENESIE .....	72
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>87</b>
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	87
7.2	HERSTELLERVERZEICHNIS .....	90
7.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	92

# 1 Einleitung

## 1.1 Kongenitale Hypothyreose

Die kongenitale Hypothyreose (CH) stellt mit einer Inzidenz von 1:3000 bis 1:4000 die häufigste angeborene endokrine Erkrankung des Neugeborenen dar [1]. Ohne Substitution von Schilddrüsenhormonen führt die kongenitale Hypothyreose zu einer eingeschränkten körperlichen und geistigen Entwicklung, mit der Folge des schweren Kretinismus mit Kleinwuchs und mentaler Retardierung [2].

Die Ätiologie der Erkrankung ist vielfältig. Neben den seltenen Fällen, bei denen die Einschränkung der Schilddrüsenfunktion sekundär aus maternalen Schilddrüsenautoantikörpern oder zentralnervösen Störungen resultiert, kann die überwiegende Mehrheit der Fälle zwei Entitäten zugeordnet werden: Defekte in der Hormonbiosynthese einerseits sowie Störungen der Organogenese andererseits [3-5].

In ca. 15-20% der Patienten beruht die CH auf einer Störung der Hormonbiosynthese.

In diesen Fällen ist häufig ein familiäres Auftreten zu beobachten. Insbesondere werden hierbei autosomal-rezessiv Mutationen vererbt, die an der Biosynthese der Schilddrüsenhormone Tetra- ( $T_4$ ) und Triiodthyronin ( $T_3$ ) beteiligte Proteine betreffen [4]. Für die Schilddrüsenhormonsynthese wird Iodid über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) in die Thyreozyten aufgenommen. Im Follikellumen wird das Iodid durch die Schilddrüsenperoxidase (TPO) oxidiert, an die Tyrosinreste des Thyroglobulin (TG) gebunden und die iodierten Tyrosinreste verknüpft. Schließlich werden  $T_3$  und  $T_4$  aus dem TG-Molekül durch Proteolyse freigesetzt und in den Blutkreislauf abgegeben [6].

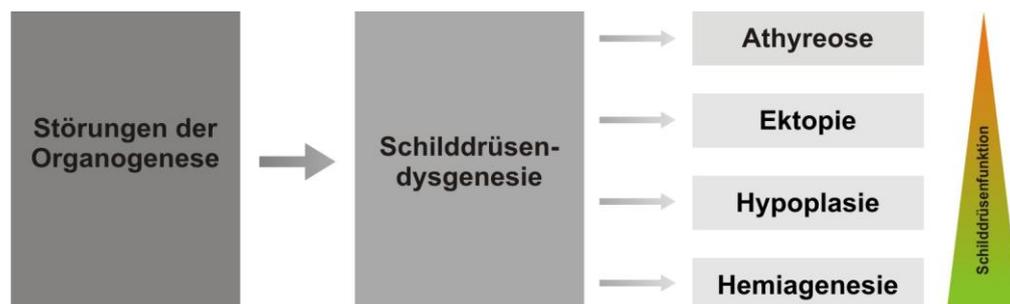
Die Schilddrüse der Patienten mit Störungen der Hormonbiosynthese ist orthotop lokalisiert und vom Volumen normal bis vergrößert (Struma). In der Szintigraphie zeigt sich häufig eine gestörte Iodidaufnahme bzw. -speicherung. Abhängig von der Patientenauswahl konnten in derartigen Patientenkollektiven am häufigsten Mutationen im NIS (ca. 40% der betroffenen Familien) und der TPO (22 – 76% der betroffenen Familien) nachgewiesen werden [7-9].

In 80 - 85% der Patienten kann die CH auf eine Störung der Organogenese zurückgeführt werden. Dabei werden verschiedene Ausprägungen der Dysgenese beobachtet:

- Athyreose: das vollständige Fehlen von Schilddrüsengewebe (15 - 48%)
- Ektopie: Fehllokalisierung der Schilddrüse (18 - 61%) , zumeist im Bereich des Zungengrundes (Thyreoidea lingualis)
- Hypoplasie: orthotop lokalisiertes Schilddrüsengewebe mit verringertem Volumen (5 – 17%)

Die relativen Anteile dieser 3 Entitäten sind abhängig von der zur Klassifizierung verwendeten Untersuchungsmethode: Die  $^{99}\text{Tc}$ -Szintigraphie ist sensitiver im Nachweis von Schilddrüsengewebe, jedoch abhängig von dessen metabolischer Aktivität. Dies führt einerseits zu einem besseren Nachweis ektopen Schilddrüsengewebes, andererseits jedoch zu einer Einordnung metabolisch inaktiven Gewebes als Athyreose und zur Unterschätzung der Hypoplasien. Die Sonographie hingegen hat eine geringere Sensitivität bezüglich des ektopen Schilddrüsengewebes, weist jedoch besser Hypoplasien und metabolisch inaktives Gewebe nach. Studien auf der Basis von Szintigraphien unterschätzen daher v.a. den Anteil der Hypoplasien, die auf Sonographie basierenden Studien eher den Anteil der Ektopien [10-12].

Desweiteren kann zur Gruppe der Schilddrüsendysgenesien auch die Hemithyroidea gerechnet werden, die mit einer Häufigkeit von bis zu 1:2000 die am weitesten verbreitete Störung der Schilddrüsenorganogenese darstellt. Sie ist zwar mit tendenziell etwas höheren, aber noch im Normalbereich gelegenen TSH-Werten verbunden, die Schilddrüsenfunktion ist jedoch nur in Einzelfällen eingeschränkt [13, 14].



**Abbildung 1.1: Entitäten der Schilddrüsendysgenese**

Störungen der Organogenese führen zur Schilddrüsendysgenese, die morphologisch in 4 Entitäten unterschieden werden kann. Abhängig von der Form der Schilddrüsendysgenese kann eine Restfunktion der Schilddrüse vorhanden sein (farbiger Pfeil).

Im Gegensatz zu Störungen der Schilddrüsenhormonbiosynthese treten Schilddrüsendysgenesien überwiegend sporadisch auf. Bislang gelang nur in einzelnen Patienten der Nachweis einer Mutation in einem der derzeit bekannten Kandidatengene PAX8, NKX2.1 oder FOXE1[15]. Diese Gene sind während der Embryonalentwicklung

in der Schilddrüse exprimiert, zusätzlich jedoch auch in anderen Geweben, so dass Mutationen bei den Patienten häufig auch zu Störungen weiterer Organe führen [10]. FOXE1 ist embryonal neben der Schilddrüse im gesamten Vorderdarm und den Haarfollikeln exprimiert. FOXE1-Mutationen führen zum Bamforth-Syndrom, bei dem neben einer Athyreose zusätzlich Gaumenspalten, Choanalatresien und Haarauffälligkeiten auftreten [16, 17]. Entsprechend dem Expressionsmuster von NKX2.1 in Schilddrüse, Basalganglien und Lunge zeigen Patienten mit NKX2.1-Mutationen besonders häufig gleichzeitig neurologische Auffälligkeiten sowie Anomalien im Bereich der Lungen [10, 18]. PAX8 ist embryonal insbesondere an der Entwicklung von Schilddrüse und Nieren beteiligt. Mutationen im PAX8-Gen führen autosomal dominant überwiegend zur Hypoplasie der Schilddrüse, das kombinierte Auftreten mit einer unilateralen Nierenagenesie ist beschrieben [19]. Eine erhöhte Prävalenz zusätzlicher kongenitaler Malformationen bei CH ist bekannt. Bei bis zu 50% der Patienten mit assoziierten Malformationen, was etwa 5% der Patienten mit CH entspricht, betreffen diese das Herz bzw. die großen Gefäße, gefolgt von muskuloskeletalen und zentralnervösen Anomalien [12, 14, 20].

## 1.2 Die Schilddrüse und ihre embryonale Entwicklung

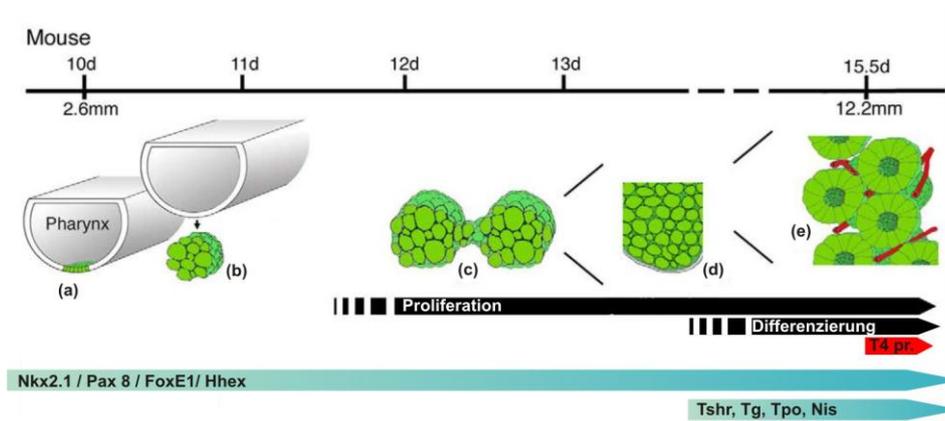
Trotz der hier angeführten Mutationen in bekannten Kandidatengenen ist bei der großen Mehrheit der Patienten die Ursache der Schilddrüsendysgenese derzeit unbekannt. Ein gutes Verständnis der embryonalen Schilddrüsenentwicklung bildet die Grundlage für die weitere ätiologische Aufklärung der Schilddrüsendysgenese.

Die Schilddrüse ist ventrolateral der Trachea knapp unterhalb des Larynx lokalisiert und besteht aus zwei Lappen, die im distalen Anteil über einen schmalen Isthmus verbunden sind. Das Parenchym ist aus 2 endokrin aktiven Zelltypen aufgebaut, den C-Zellen und den Thyreozyten. Die parafollikulär lokalisierten C-Zellen produzieren Calcitonin, das auf den Kalzium- und Knochenstoffwechsel einwirkt. Die Thyreozyten sind zu Schilddrüsenfollikeln zusammengelagert, in denen die Synthese der Schilddrüsenhormone Tetrajodthyronin (Thyroxin,  $T_4$ ) und dessen biologisch aktiven Derivats Trijodthyronin ( $T_3$ ) stattfindet.  $T_4$  bzw.  $T_3$  beeinflussen eine Vielzahl physiologischer Prozesse des Stoffwechsels. Desweiteren haben sie eine zentrale Bedeutung für entwicklungsbiologische Prozesse wie pränatale Entwicklung, Wachstum und Gehirnentwicklung [6]. Der Phänotyp der kongenitalen Hypothyreose beruht auf einem Mangel an Schilddrüsenhormon auf Grund eines Defektes der Thyreozyten.

Thyreozyten und C-Zellen gehen aus unterschiedlichen embryonalen Anlagen hervor. Die Thyreozyten entwickeln sich aus den Zellen der medianen Schilddrüsenanlage, wohingegen die C-Zellen dem 4. Kiemenbogen entstammen, von wo sie in den Ultimobronchialkörpern zur Schilddrüse wandern. Im Verlauf der Embryonalentwicklung verschmelzen Schilddrüsenanlage und Ultimobronchialkörper und die C-Zellen verteilen sich interfollikulär [6].

Aufgrund der relativ nahen Verwandtschaft von Mensch und Maus und dem hohen Grad der Konservierung der an der Entwicklung beteiligten Gene und Signalwege bietet die Maus die Möglichkeit, die Bedeutung von Genen für die Embryonalentwicklung durch ihr gezieltes Ausschalten (Knockout) zu untersuchen. Bezüglich der Schilddrüsenentwicklung konnte gezeigt werden, dass die Prinzipien des Aufbaus, der Funktion und der Entwicklung zwischen Mensch und Maus hoch konserviert sind. Darauf basierend sind die wesentlichen Erkenntnisse über die Schilddrüsenentwicklung und deren molekulare Grundlagen in der Maus erarbeitet worden [10].

In der Maus beginnt die Entwicklung der Schilddrüse im Stadium E8.5 mit der Induktion und Bildung des Schilddrüsenprimordiums, einer Verdickung des endodermalen Epithels in der Mittellinie des ventralen Pharynx knapp unterhalb des 1. Kiemenbogens. Dieses entwickelt sich zum Schilddrüsendivertikel, welches sich relativ zur Umgebung nach kaudal verlagert und den Ductus thyroglossus bildet. Ungefähr im Stadium E11 verliert der Ductus thyroglossus den Kontakt zum Pharynx. Im Stadium E12.5 kommt es zur Bifurkation in 2 Schilddrüsenlappen, die seitlich des primitiven Larynx gelegen sind, von wo aus sie sich nach kaudal bis zum Schild- und Ringknorpel ausdehnen [21]. Etwa im Stadium E14.5 verschmelzen die Schilddrüsenanlage und die Ultimobronchialkörper, denen die C-Zellen entstammen [22]. Gleichzeitig beginnt die funktionelle Differenzierung der Schilddrüse. Histologisch bilden sich kolloidgefüllte Follikel, die die schilddrüsenspezifischen Funktionsproteine TSH-Rezeptor (Tshr), Thyroglobulin (Tg), Schilddrüsenperoxidase (Tpo) und Natrium-Iodid-Symporter (Nis) exprimieren [10].



**Abbildung 1.2: Schematische Übersicht über die Schilddrüsenentwicklung in der Maus.**

Der Balken gibt den Zeitpunkt der Embryonalentwicklung an (d=dpc). Die schwarzen Pfeile markieren den Zeitraum von Größenwachstum und Differenzierung der Schilddrüse, die blauen Pfeile die Expression von Genen der Schilddrüsenentwicklung [10], der rote Pfeil die T<sub>4</sub>-Produktion. (a) Bildung des Schilddrüsenprimordiums in der Mittellinie des Pharynx, (b) Evagination und Relokalisation, (c) Bifurkation des Primordiums, (d) Größenwachstum, (e) Follikelbildung. Abbildung abgewandelt aus [23]

Die frühe Schilddrüsenanlage ist durch die gleichzeitige Expression der Transkriptionsfaktoren Nkx2.1, Pax8, FoxE1 und Hhex charakterisiert. Diese Gene sind bereits im Stadium E8.5 nachweisbar und essentiell für die regelgerechte Entwicklung der Schilddrüse.

Nkx2.1 (früher Ttf1, thyroid transcription factor 1) ist insbesondere für das Überleben des Schilddrüsenprimordiums von Bedeutung: Die gezielte Inaktivierung (knockout) von Nkx2.1 in Mäusen führt im homozygoten Zustand (Nkx2.1<sup>-/-</sup>) zu einer Störung der Schilddrüsenentwicklung. Nkx2.1<sup>-/-</sup>-Embryonen bilden zwar initial ein Schilddrüsenprimordium aus, dieses bleibt jedoch bereits im Stadium E10.5 im Größenwachstum zurück und zeigt Apoptose. Im Stadium E13 und auch in neugeborenen Mäusen zeigt sich histologisch eine Athyreose [24].

Pax8 beeinflusst sowohl das Überleben der Schilddrüsenzellen wie auch deren Differenzierung. Zwar ist in Pax8<sup>-/-</sup>-Embryonen morphologisch eine verkleinerte Schilddrüse nachweisbar, diese ist jedoch vollständig aus C-Zellen aufgebaut. Vorläuferzellen der Thyreozyten sind nur bis zum Stadium E11.5 nachweisbar [25]. In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass Pax8 an die Promotorregionen von Funktionsproteinen, z.B. Tg, Tpo und Nis, bindet und deren Transkription aktiviert [26].

Foxe1 (früher Ttf2, thyroid transcription factor 2) hingegen ist sowohl für das Überleben der Schilddrüsenzellen als auch für die Migration des Schilddrüsenprimordiums wichtig. Bei den Foxe1<sup>-/-</sup>-Embryonen treten Ektopie und Athyreose in einem Verhältnis von 1:1 auf [27].

Hhex wird während der Embryonalentwicklung in mehreren Organen endodermalen Ursprungs, z.B. Lunge, Leber und Pankreas exprimiert, am stärksten jedoch in der Schilddrüse. Der Knockout von Hhex ist im homozygoten Zustand intrauterin ab E11.5 letal. Hhex<sup>-/-</sup>-Embryonen zeigen an E9 eine regelrechte Spezifizierung der Schilddrüsenanlage mit Expression von Nkx2.1, Pax8 und Foxe1. Kurz darauf an E10 jedoch ist eine starke Beeinträchtigung der Schilddrüse mit Hypoplasie bzw. Athyreose zu beobachten, gleichzeitig ist die Expression von Nkx2.1, Pax8 und Foxe1 in der Schilddrüsenanlage gestört. Die Bedeutung von Hhex für die Entwicklung der Schilddrüse scheint also weniger in der Spezifikation, sondern vielmehr in der Proliferation der Zellen und der Aufrechterhaltung der Expression von Nkx2.1, Pax8 und Foxe1 zu bestehen [28, 29].

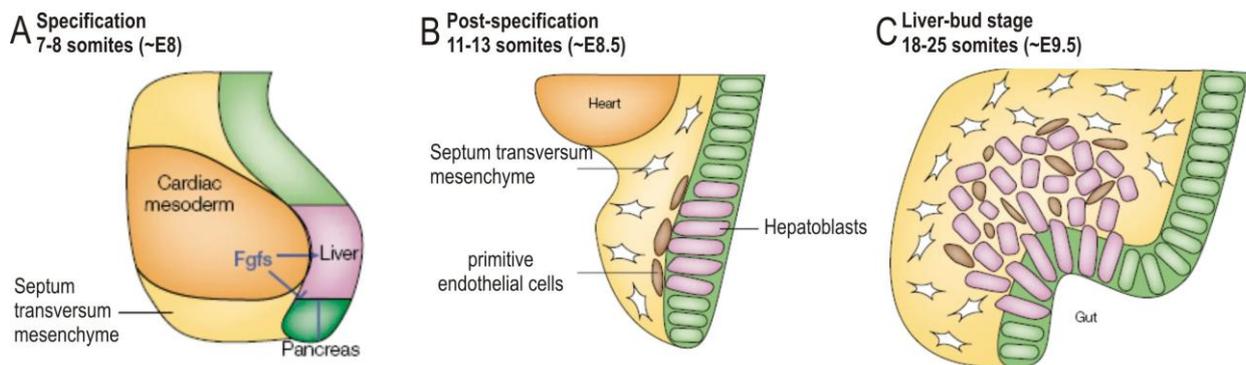
Das Wissen über die Funktion der in der Schilddrüsenanlage exprimierten Transkriptionsfaktoren Nkx2.1, Pax8, Foxe1 und Hhex beschreibt die zellautonome Regulation der Morphogenese der Schilddrüse bereits recht gut. Jedoch ist wenig bekannt über Faktoren, die parakrin auf die Entwicklung und Morphogenese der Schilddrüse einwirken. Darüber hinaus ist unklar, welche Faktoren zur Induktion der Schilddrüsenanlage führen.

### **1.3 Die frühe Organogenese der endodermalen Organe Leber und Pankreas**

Wie die Schilddrüse sind auch Leber und Pankreas Organe endodermalen Ursprungs. Sie entstammen dem kaudal der Schilddrüse gelegenen primitiven Darmrohr und sind hinsichtlich der frühen Organogenese besser untersucht als die Schilddrüse.

Die Leber entwickelt sich auf der Höhe des Übergangs des Vorderdarms in den Mitteldarm [30]. Als erstes morphologisch sichtbares Merkmal der Organogenese bildet sich im Stadium E8.5 eine Epithelverdickung, die Leberknospe [31]. Schon die Zellen der Leberknospe sind bezüglich ihrer weiteren Entwicklung hin zu Leberzellen spezifiziert. Auf Ebene der mRNA ist es bereits in diesem Stadium gelungen, die Expression leberspezifischer Gene wie Albumin und  $\alpha$ -Fetoprotein nachzuweisen. Versuche, bei denen der ventrale Vorderdarm vor dem Zeitpunkt der ersten Expression von Albumin explantiert und in vitro kultiviert wurde, haben gezeigt, dass die Expression von Albumin in den Endodermzellen und somit die Spezifizierung der Endodermzellen zu primitiven Leberzellen von einem engem Kontakt zum kardiogenen Mesoderm und aus diesem stammenden Faktoren, z.B. Fibroblast growth factors (Fgf), abhängig ist

[32]. Im weiteren Verlauf der Leberentwicklung migrieren die Zellen der Leberknospe in das Mesenchym des Septum transversum (*siehe Abbildung 1.3*). Die Migration der Zellen ist abhängig von der Anwesenheit endothelialer Zellen. Ein Knockout von Flk1 (Vegf-Rezeptor 2) in der Maus führt im homozygoten Zustand zu einer gestörten Reifung und Migration der Angioblasten und daraus resultierend zu Defekten in der embryonalen Gefäßentwicklung; im Septum transversum der homozygoten Embryonen sind weder Endothelzellen noch ihre Vorläufer nachweisbar. Die Entstehung der Leberknospe erscheint unauffällig, die Migration der primitiven Leberzellen in das Septum transversum hingegen bleibt aus. Weitergehende Versuche mit Gewebe-Explantaten haben gezeigt, dass die Endothelzellen selbst und nicht im Blut zirkulierende Faktoren für die Migration notwendig sind [31, 33].



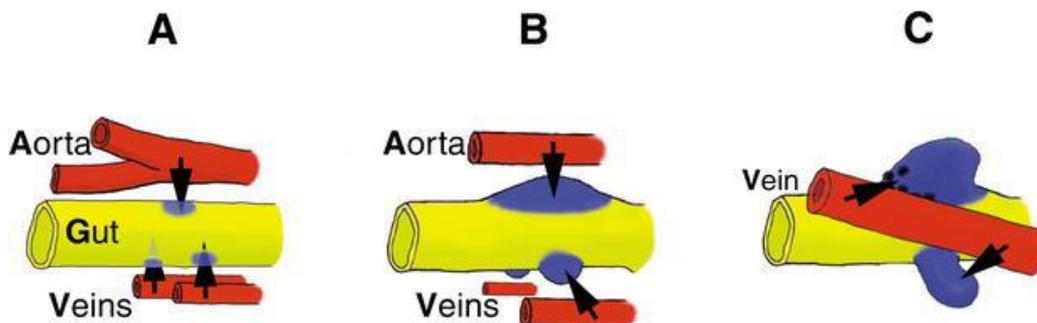
### Abbildung 1.3: Überblick über die frühe Leberentwicklung

(A) Im kompetenten Endoderm werden durch aus dem kardiogenen Mesoderm sezernierte Fgfs die Leberzellen spezifiziert. (B) Im Septum transversum entwickeln sich in enger Nachbarschaft zur Leberanlage Endothelzellen. (C) Migration der Leberanlage in das Septum-transversum-Mesenchym. Abbildung abgewandelt aus [34]

Das Pankreas besteht aus verschiedenen endokrin und exokrin aktiven Zelltypen. Ebenso wie die Leber ist auch das Pankreas endodermalen Ursprungs und entwickelt sich auf Höhe des Übergangs des Vorder- in den Mitteldarm. Während der frühen Organogenese bilden sich zunächst 3 Anlagen, die im weiteren Verlauf verschmelzen [30]. Dorsal, im Bereich des direkten Kontaktes zwischen den fusionierenden dorsalen Aorten und dorsalem Endoderm, bildet sich eine Pankreasknospe, ventrolateral treten symmetrisch in Nachbarschaft zu den beiden Vv. omphaloenterici zwei Knospen auf. Die Pankreasanlagen sind charakterisiert durch die Expression des Transkriptionsfaktors Pdx1. Die Expressionsdomänen von Pdx1 sind in diesem Stadium auf die Kontaktbereiche mit den benachbarten Gefäßen begrenzt. Gleichzeitig mit der

Umgestaltung des symmetrischen embryonalen Gefäßsystems zu einem asymmetrischen Gefäßsystem vollzieht sich auch eine Wandlung der Pankreasanlagen: die links-ventrale Pankreasanlage sowie die linke V. omphaloentericus degenerieren, die rechts-ventrale Anlage bildet den späteren ventralen Pankreasanteil und die singuläre dorsale Anlage entwickelt sich zum dorsalen Pankreasanteil weiter (siehe *Abbildung 1.4*) [33, 35].

Die Bedeutung des Kontaktes zwischen dem Endothel der dorsalen Aorta und dem Endoderm des Vorderdarms für die Differenzierung der Endodermzellen zu endokrin aktiven Pankreaszellen konnte in mehreren Experimenten nachgewiesen werden. Insbesondere die Expression von Insulin sowie die Proliferation der Zellen können nur durch das vaskuläre Endothel induziert werden [33, 36].



**Abbildung 1.4: Koinzidenz der Entwicklung von Pankreas und Gefäßen.**

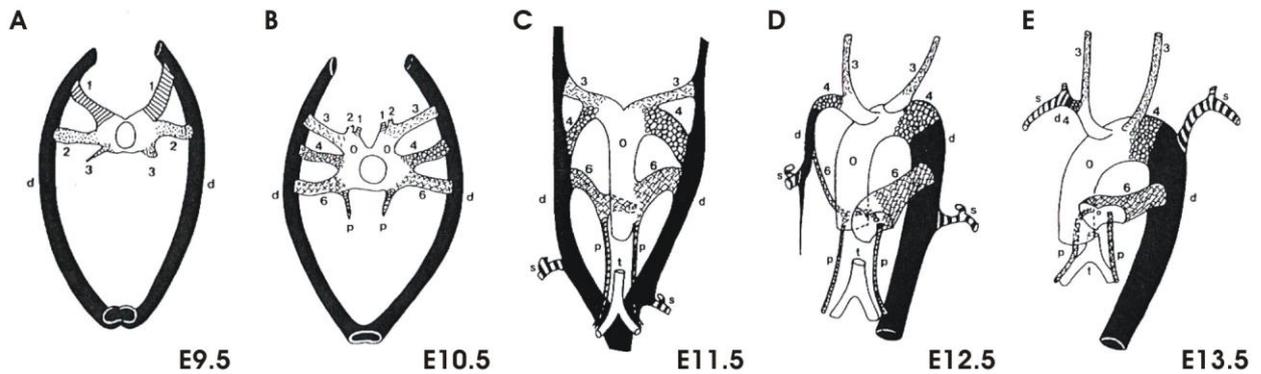
Die Pankreasentwicklung beginnt mit der Ausbildung dreier Knospen in engem Kontakt zur dorsalen Aorta bzw. den Vv. omphaloenterici. Mit der sich entwickelnden Asymmetrie der Venen geht eine asymmetrische Entwicklung der beiden ventralen Pankreasanlagen einher. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Interaktionen von Blutgefäßen und primitivem Darm in den Embryonalstadien (A) E8.5, (B) E9.5 und (C) 10.5. Gelb = Darm, rot = Blutgefäßendothel, blau = Pankreasanlage. Aus [37]

Anhand der Beispiele von Leber und Pankreas ist es gelungen, die Bedeutung des vaskulären Endothels für die Organogenese endodermaler Organe nachzuweisen. Die Spezifizierung der Leberzellen ist vom Kontakt zum kardiogenen Mesoderm abhängig, die des Pankreas erfolgt im engen Kontakt zu vaskulärem Endothel. Auch die weitere Organogenese ist bei beiden Organen eng mit dem Kontakt zu Blutgefäßen bzw. dessen Endothel verbunden [31, 33, 36].

## 1.4 Entwicklung der Kiemenbogenarterien

Die Schilddrüsenanlage entsteht weiter kranial als Leber und Pankreas im Bereich der Kiemenbögen und Schlundtaschen [10]. Die 6 Kiemenbögen sind eine in der Wirbeltierentwicklung phylogenetisch konservierte Struktur. Im Fisch bilden sie den Ursprung der Kiemen. In höheren Wirbeltieren dienen sie nicht länger respiratorischen Funktionen, sondern stellen transiente Strukturen während der Embryonalentwicklung dar. Alle Kiemenbögen enthalten knorpelige, muskuläre, nervale und vaskuläre Komponenten, aus denen sich verschiedenste Derivate wie Kieferknochen, mimische Muskulatur, Gehirnnerven und Aa. carotideae entwickeln [35].

Die arteriellen Komponenten der Kiemenbögen bilden die Kiemenbogenarterien, aus denen sich im Laufe der Embryonalentwicklung höherer Wirbeltiere wie der Maus Teile des arteriellen Gefäßsystem, z.B. Aorta und Aa. carotideae, entwickeln. Primär formt sich ein transientes, symmetrisch organisiertes arterielles Gefäßsystem, das im Wesentlichen aus der ventralen Aorta, die aus dem Herzschlauch entspringt, sowie den beiden dorsalen Aorten besteht. Die ventrale und die dorsalen Aorten sind bis zum Stadium E8.5 symmetrisch über die primitiven Aortenbögen miteinander verbunden, die sich im weiteren Verlauf in die 1. Kiemenbogenarterien (pharyngeal arch arteries, PAA) umwandeln. Dies wird gefolgt vom sequentiellen Auftreten der 2 - 6. PAA; eine 5. PAA ist in Mausembryonen zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung nachweisbar [38]. Durch die folgende Umgestaltung der Kiemenbogenarterien entwickelt sich bis zum Stadium E12.5 ein asymmetrisches arterielles Gefäßsystem. Hierbei bildet die 3. PAA Anteile der A. carotis communis und ihrer Äste. Aus der linken 4. PAA geht der Aortenbogen hervor und die linke dorsale Aorta bildet die Aorta descendens. Die rechte 4. PAA hingegen wandelt sich in den Truncus brachiocephalicus um. Aus den 6. PAA entwickeln sich die Aa. pulmonales und links zusätzlich der Ductus arteriosus. Ab dem Stadium E13.5 entspricht das nun vorliegende Gefäßsystem der Mausembryonen annähernd dem bei Geburt (*siehe Abbildung 1.5*) [38, 39].



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Entwicklung der Kiemenbogenarterien.**

Die symmetrisch angelegten Kiemenbogenarterien wandeln sich in Aorta, Ductus arteriosus, Aa. carotidea, Truncus brachiocephalicus und A. subclavia um und bilden ein asymmetrisches Gefäßsystem aus.

Die Ziffern 1 - 6 bezeichnen die Kiemenbogenarterien, d = dorsale Aorta, o = Derivat der ventralen Aorta bzw. Aorta ascendens, p = A. pulmonalis, s = A. subclavia, t = Trachea. Aus [39]

Anhand der Entwicklung von Leber und Pankreas konnte die Bedeutung vaskulärer Strukturen für die Spezifizierung und weitere embryonale Entwicklung endodermaler Organe gezeigt werden. Eine Störung der Gefäßentwicklung führt hierbei sekundär zu einer Störung der Organogenese von Leber und Pankreas (*siehe Kapitel 1.3*). Unter diesem Aspekt stellen insbesondere Mausmodelle, die sowohl mit Entwicklungsstörungen endodermaler Organe als auch der Kiemenbogenarterien einhergehen, interessante Modelle auch in Bezug auf die Schilddrüsenentwicklung dar.

## 1.5 Sonic hedgehog-Defizienz

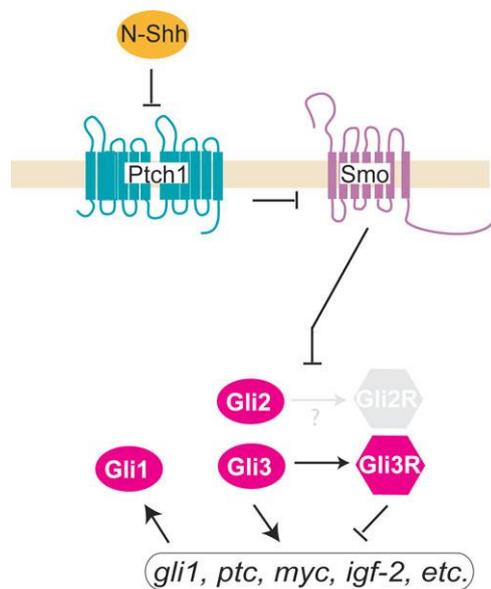
Die Shh-Defizienz stellt ein Mausmodell dar, für das eine Kombination aus gestörter Entwicklung endodermaler Organe und Anomalien der Gefäße, insbesondere eine gestörte Entwicklung der Kiemenbogenarterien, beschrieben ist [40, 41].

### 1.5.1 Sonic hedgehog-Signalweg

Sonic hedgehog (Shh) ist eines der drei in Säugetieren identifizierten homologen Gene des 'hedgehog'-Gens der *Drosophila*. In *Drosophila* wurde 'hedgehog' erstmals im Zusammenhang mit der Polarität der Larvensegmente beschrieben. Knockout-Studien in Mäusen haben die Bedeutung von Shh für das „Patterning“ verschiedener Organsysteme wie ZNS und Vorderdarm gezeigt [42].

Shh ist ein extrazelluläres Signalmolekül, das an den Rezeptor Patched (Ptch) bindet. In Abwesenheit von Shh inhibiert Ptch die Aktivität des G-Protein-gekoppelten

Rezeptors Smoothened (Smo). Die Bindung von Shh führt über die Aktivierung von Smo und die Transkriptionsfaktoren Gli1 – Gli3 indirekt zur Beeinflussung von Zielgenen. Der Effekt der Gli-Wirkung ergibt sich aus der Summe der partiellen Aktivierung und Repression von Zielgenen. Die proteolytische Spaltung der Gli-Proteine kann hierbei einen Übergang von aktivierenden in repressive Varianten herbeiführen. In Folge dessen ist für jedes Zielgen eine spezifische Wirkung der Shh-Signalkaskade zu erwarten (siehe *Abbildung 1.6*) [43].



**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Shh-Signalwegs.**

Durch die Bindung von Shh an den Rezeptor Ptch1 wird der inhibitorische Effekt von Ptch1 auf Smo aufgehoben. Über die Transkriptionsfaktoren Gli1-3 kommt es zur Aktivierung und Repression von Zielgenen. Aus [43]

Auch die verschiedenen Knockout-Modelle der Shh-Signalkaskade zeigen einen spezifischen Phänotyp und liefern Hinweise auf sich überlagernde Effekte der Shh-Wirkung. Während der Entwicklung der Extremitäten führt eine Shh-Defizienz ( $Shh^{-/-}$ ) zum Fehlen der Finger, wohingegen die homozygoten Gli3-knockout-Mäuse ( $Gli3^{-/-}$ ) eine Polydaktylie zeigen. Bei Verkreuzung dieser beiden Mausstämme führt der  $Shh^{-/-} Gli3^{-/-}$ -Genotyp zu einer Polydaktylie. Die Autoren postulieren, dass der  $Shh^{-/-}$ -Phänotyp aus einer erhöhten Konzentration von repressiv wirkendem Gli3 ( $Gli3R$ ) resultiert. In der  $Shh^{-/-} Gli3^{-/-}$  Konstellation wird dieser Effekt durch den Mangel an Gli3 aufgehoben und es kommt zu einem partiellen 'Rescue' des Shh-Phänotyps [44].

### 1.5.2 Die Mausmutante Short Digits (Dsh)

'Short Digits' (Dsh) ist eine durch Bestrahlung induzierte Mausmutante, bei der eine intrachromosomale Inversion zu einer Trennung des Shh-Gens von seinen Enhancer-Elementen geführt hat [45]. Dadurch tritt bei Homozygotie für die Mutation eine Shh-Defizienz auf. Im homozygoten Zustand (Dsh/Dsh) ist die Mutation intrauterin oder unmittelbar postnatal letal und die Dsh/Dsh-Embryonen sind durch einen ausgeprägten Phänotyp charakterisiert. Sie zeichnen sich durch ein geringere Größe und ausgeprägte Mittelliniendefekte, z.B. eine singuläre Hirnblase und Zyklopie, aus. Charakteristisch ist der von der rostralen Mittellinie entspringende Rüssel (Proboscis). Im Bereich der Extremitäten besteht eine deutliche Fehlbildung v.a. der distalen Anteile, so werden Radius und Ulna durch einen einzelnen, mit dem Humerus fusionierten Knochen ersetzt, die Finger bzw. Zehen fehlen nahezu vollständig. Insgesamt ist der Dsh/Dsh nahezu identisch mit dem von Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen [45].

Shh-defiziente Embryonen weisen außerdem multiple innere Fehlbildungen auf. Auf Grund einer gestörten Entwicklung des Vorderdarms treten Ösophagusstenosen, ösophagotracheale Fisteln und Fehlbildungen der Lunge auf [40, 46]. Des Weiteren sind auch die arteriellen Gefäße sowie der kardiale Ausflusstrakt von Fehlbildungen betroffen. Die Entwicklung der Kiemenbogenarterien ist gestört: 1. und 2. PAA sind hypoplastisch, 4. und 6. PAA sind nicht nachweisbar. Der Aortenbogen entstammt der 3. PAA, nicht der 4. PAA, und ist auf der rechten Seite lokalisiert. Der Ausflusstrakt des Herzens besteht nur aus einem einzelnen Gefäß [41]. Die Dsh-Mausmutante stellt ein in der AG Mundlos, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, etabliertes Mausmodell der Shh-Defizienz dar. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben ergeben, dass bei der Dsh-Mausmutante wahrscheinlich eine Störung der Schilddrüsenentwicklung vorliegt [47].

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Schilddrüsendysgenese in ihren unterschiedlichen Ausprägungen (Athyreose, Hypoplasie, Ektopie) stellt eine häufige Fehlbildung dar. Bisher ist es nur bei einem kleinen Anteil der Patienten gelungen, durch einen Mutationsnachweis in den bisher bekannten Kandidatengenen (NKX2.1, PAX8, FOXE1) die Ätiologie der Schilddrüsendysgenese zu klären [15].

Ein besseres Verständnis der Organo- und Morphogenese der Schilddrüse stellt eine wichtige Voraussetzung für die Klärung der Pathogenese der Schilddrüsendysgenese dar. Diesbezüglich können Leber und Pankreas, ebenfalls Organe endodermalen Ursprungs, wichtige Hinweise auf entwicklungsrelevante Strukturen und Signalwege liefern, die die frühe Organogenese beeinflussen.

Studien in verschiedenen Modellorganismen der Entwicklungsbiologie haben gezeigt, dass Herz- und Gefäßanlagen einen entscheidenden Einfluss auf die Leber- und Pankreasentwicklung ausüben [37]. Außerdem machen Fehlbildungen des Herzens und der großen Gefäße ca. die Hälfte der assoziierten Fehlbildung bei CH aus [12, 14, 20]. Daher kann postuliert werden, dass Herz und Gefäße auch die Schilddrüsenentwicklung beeinflussen. Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Hypothesen untersucht.

- Es besteht eine Ko-Entwicklung der arteriellen zervikalen Gefäße und der Schilddrüse
  - Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Entwicklung der Schilddrüse und benachbarter Gefäßstrukturen, insbesondere der Kiemenbogenarterien, in verschiedenen embryonalen Stadien mittels 3-dimensionaler Rekonstruktionen dargestellt.
  
- Eine gestörte Entwicklung der Gefäße führt zu einer Schilddrüsendysgenese.
  - Diese Hypothese wurde in der Shh-defizienten Dsh-Mausmutante untersucht, bei der sowohl eine Asymmetrie der Schilddrüse als auch der Halsgefäße besteht. Hierzu wurde die Entwicklung der Schilddrüse und der Gefäße 3-dimensional rekonstruiert.
  
- Eine Shh-Defizienz führt zu einer Störung des Expressionsprofils der zellautonomen Transkriptionsfaktoren Nkx2.1, Pax8, Foxe1 der Schilddrüsenanlage.
  - Dies wurde durch in-situ-Hybridisierungen in Wildtyp- und Dsh-homozygoten Embryonen überprüft.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Geräte verwendet:

Gerät	Hersteller
Biophotometer 6131	Eppendorf
Brutschrank B 6120	Heraeus
Digitalkameras HRc, MRc5	Zeiss
Eismaschine AF-30	Scotsman
Geldokumentationssystem E.A.S.Y. Win 32	Heraeus
Gelkammern und Spannungsquellen	Biometra, peqlab
Gewebeprozessor TP 1020	Leica
Heizblock DB 3	Techne
Heizplatte HI 1220	Leica
Hybridisierungsöfen OV2	Biometra
Kaltlichtquelle KL1500 LCD	Leica
Mikroskope:	
Axiostar plus	Zeiss
Leica DMR HC	Leica
Stereomikroskope MZ 6, MZ 12.5	Leica
Mikrotom 2050 Supercut	Reichert-Jung
Paraffindispenser EG 1120	Leica
Paraffinstreckbad Typ 1052	Gesellschaft für Labortechnik
pH-Meter MP 220	Mettler-Toledo
Pipetten Eppendorf research	Eppendorf
Sequenzier ABI 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Software	
Digitalphotographie Axiovision 4.5	Zeiss
3-dimensionale Rekonstruktion SURFdriver 3.5	Moody/Lozanoff
Thermocycler	
Gene Amp PCR System 2400, 2700, 9600	Applied Biosystems
MasterCycler Gradient	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Trockenschränke B15, T 6060	Heraeus
Vortexer K550 GE	Bender & Hobin

Gerät	Hersteller
Waagen	
FI 1500	Fischer
PM 200	Mettler
Wärmeschrank ULM 400	Memmert
Wasserbad W13 mit Erhitzer D6	Haake
Wipptisch WT 15	Biometra
Zentrifugen	
Biofuge A	Heraeus
Sorval	Heraeus
Typ 5415 C, 5415 D, 5415 M, 5417 R	Eppendorf

### 2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Folgende Substanzen und Chemikalien wurden verwendet:

Hersteller	Chemikalien und Substanzen
Fermentas	10x PCR-Puffer (KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> ), 10x Y+/Tango-Restriktionspuffer, 6x Ladepuffer, dNTPs, Gene Ruler 100 bp DNA ladder plus
Fluka	Betain, Nonidet 40
Invitrogen	50x Denhardt´s, Agarose, RNaseOUT™ (40 U/µl), TRIZOL®-Reagent
Kodak	Photoemulsion, Photo-Entwickler, Photo-Fixierer
Merck	3-(Triethoxysilyl)-propylamin, 30% Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), Aceton, Chloroform, Entellan®, Ethanol p.a., Ethidiumbromid, Extran® MA 01 alkalisch, Formamid, Glycerin, Glycin, HPLC-H <sub>2</sub> O, Isopropanol, Kaliumchlorid (KCl), Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), konzentrierte Essigsäure, Methanol p.a., Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), Natriumhydroxid (NaOH), Natriumacetat, Natriumcitrat, Natriumcitratdihydrat, Paraformaldehyd (PFA), Phenol, Salzsäure (HCl), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanacetat (Tris-Acetat), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl), Zitronensäure
Roche	Glycogen, NTPs, RNase Inhibitor (40 U/µl), 10x Transkriptionspuffer
Roth	Agar-Agar, Hefeextrakt, Isoamylalkohol, NaCl, 20% SDS, Xylol
Sigma	Ampicillin, Betain, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Dextran, EDTA, Eosin Y-Färbelösung, Glutaraldehyd, Harris Hämatoxylin-Färbelösung, Heparin, Levamisol, Lithiumchlorid (LiCl <sub>2</sub> ), Maleinsäure, Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ), Natrium-Deoxycholat, RNA Typ III von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Toluidine Blue O, Tween 20, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-Galactopyranosid (X-Gal)

Hersteller	Chemikalien und Substanzen
Sonstige	<sup>33</sup> P-UTP (Amersham), Agarose (Gibco RBL), Bacto™ Yeast extract (DIFCO), BigDye® Terminator v3.1-Sequenzier-Mix (Applied Biosystems), Paraffin (Leica), PE-Puffer (Qiagen), RNAlater® (Qiagen), Röntgenfilmentwickler (Agfa), Röntgenfilmfixierer (Agfa), Tryptone Pepton (Becton Dickinson),

### 2.1.3 Verwendete Kits

Folgende vorgefertigte Reaktionssysteme (Kits) wurden verwendet:

Kit	Hersteller
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Roche
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche
Omniscript™ RT Kit	Qiagen
Qiagen® Plasmid Mini/Maxi Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning® Kit (pCR®2.1-TOPO-Vektor)	Invitrogen

### 2.1.4 Verwendete Enzyme

Folgende Enzyme wurden verwendet:

Enzym	Hersteller
DNase I, RNase-frei (10 U/μl)	Roche
EcoRI-Restriktionsenzym und Puffer	New England Biolabs
Proteinase K (20 mg/ml)	Boehringer
RNase A (10 mg/ml)	Sigma
SpeI-Restriktionsenzym	Fermentas
T7 RNA-Polymerase	Roche
TAQ-Polymerase und Puffer	MPI für molekulare Genetik, Berlin Bioline

### 2.1.5 Verwendete Primer

Soweit nicht anders genannt, wurden die Oligonukleotide von Thermo Hybaid oder MWG Biotech AG bezogen. Folgende Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Primer	Sequenz bzw. Hersteller
D5Mit 72 F3	5'- TTC AAA CAC CCA GAA GAG TGG – 3'
D5Mit 72 R	5'- GGT CTG CAA CTG GGA CTT GT – 3'
mFuxe1-F	5'- GCA AGG AGC GAG CAG TGC GC - 3'
mFuxe1-3'UTR-R	5'- GCA AGA CAC CGA GCC TCC ACG - 3'
mNkx2.1-3'UTR-F	5'- GTG TCT TTC TGG TAG TTC AAA TGG - 3'
mNkx2.1-3'UTR-R	5'- GAT TGG TGC TGC AAA TAC CAA AC - 3'
mPax8-5-F	5'- CAT CCG GAC CAA AGT GCA GC - 3'
mPax8-7-R	5'- GCA TAG GCC TCC GGG TAA TG - 3'
M13 Forward	5'- GTA AAA CGA CGG CCA G - 3' , Invitrogen
M13 Reverse	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3' , Invitrogen
Xt C3 for	5'- GGC CCA AAC ATC TAC CAA CAC ATA G - 3'
Xt C3 rev	5'- GGT GGC TGC TGC ATG AAG ACT GAC - 3'
XtJ 580 for	5'- TAC CCC AGC AGG AGA CTC AGA TTA G - 3'
XtJ 580 rev	5'- AAA CCC GTG GCT CAG CAC AAG - 3'
Oligo-dT-Primer	Qiagen

### 2.1.6 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden häufiger eingesetzt:

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% DEPC in ddH <sub>2</sub> O, ü/N bei 37 °C inkubieren, autoklavieren
1x PBS, pH 7,4	3 mM KCl, 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl in ddH <sub>2</sub> O; 0,1% DEPC, ü/N bei 37 °C inkubieren, autoklavieren
PBST	0,1% Tween 20 in 1x PBS
4% PFA, pH 7,4	4% Paraformaldehyd in 1x PBS
20x SSC, pH 7,0	3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat

### 2.1.7 Sonstiges verwendetes Material

Außerdem wurden folgende Materialien verwendet:

Material	Hersteller
Deckgläser für Objektträger	Roth
Einbettkassetten ohne Deckel	Roth
Mikrotom-Klingen	Leica
Objektträger	Marienfeld

Material	Hersteller
Petrischalen	Falcon
Pipettenspitzen	Gilson, Biozym, Eppendorf
Reagenzgefäße	Eppendorf, Applied Biosystems
Röntgenfilm Biomax	Kodak
Tissue Loc Kassetten Histo Screen	Richard-Allan Scientific

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mausearbeiten

#### 2.2.1.1 *Maushaltung und –zucht*

Die Maushaltung erfolgte im institutseigenen Maushaus des Max-Planck-Institutes für molekulare Genetik, Berlin unter weitgehend sterilen Bedingungen in einem 12/12-Stunden Hell-/Dunkelrhythmus. Ein bei der täglichen Untersuchung der Weibchen vorhandener Vaginalpropf (Plug) zeigte eine stattgehabte Kohabitation an. Aufgrund des vorwiegend nachtaktiven Verhaltens der Mäuse wurde als Kohabitationszeitpunkt 0 Uhr der vergangenen Nacht angenommen, somit war am Mittag des Plugtages der Tag 0,5 p.c. Da dies aber nur eine ungefähre Angabe darstellte, wurde bei der Präparation der Embryonen das Embryonalstadium erneut überprüft und bei Bedarf korrigiert (*siehe Abschnitt 2.2.1.2*).

Die Dsh-Maus ist der AG Mundlos von Dr. P.B. Selby, Oakridge, TN, USA, überlassen worden. Es handelt sich um eine röntgenstrahlinduzierte Mausmutante, die erstmals in Nachfahren von (101 x C3H)<sub>F1</sub>-Hybridböcken aufgetreten ist und im Verlauf in den C57BL/10-Inzuchtstamm eingekreuzt wurde [45, 48].

Die X<sup>tJ</sup>-Mausmutante ist ein Mausmodell für das Greig-Cephaloploysyndactylie-Syndrom (GCPS). Sie beruht auf einer Deletion von Teilen des Gli3-Gens auf Chromosom 13. Das resultierende Fusionstranskript ist nicht funktionell, da ihm für DNA-Bindungselemente kodierende Sequenzen fehlen [49].

#### 2.2.1.2 *Mauspräparation*

Bei Erreichen der gewünschten Tragezeit wurde das Weibchen mittels Genickbruch getötet. Der Bauch wurde mit 70% Ethanol befeuchtet, die Bauchdecke sowie das Peritoneum eröffnet, der Uterus als Ganzes entnommen und in 1x PBS überführt. Unter dem Stereomikroskop erfolgte die Eröffnung der einzelnen Uterusabschnitte und die Trennung des Embryos mitsamt der ihn umgebenden Eihäute von der Plazenta.

Handelte es sich um Verpaarungen mutanter Mäusstämmen, wurden für eine spätere Genotypisierung die Eihäute des Embryos bei -20 °C konserviert. Für eine eindeutige Zuordnung wurden die Embryonen und Eihäute nummeriert und einzeln aufbewahrt. Während der Präparation erfolgte die Überprüfung des Entwicklungsstadiums der Embryonen anhand morphologischer Merkmale unter Zuhilfenahme des „Atlas of mouse development“ [50]. Als besonders geeignet erwies sich hierbei die Entwicklung der Extremitäten, die zwischen den Stadien E9.5 bis E14.5 ausgeprägten morphologischen Veränderungen unterliegen. Bereits bei der Präparation konnten Dsh-homozygote Embryonen auf Grund ihres Phänotyps identifiziert werden [45, 51]. Dies wurde zusätzlich durch Genotypisierung überprüft (*siehe Abschnitt 2.2.1.3*).

### 2.2.1.3 Genotypisierung

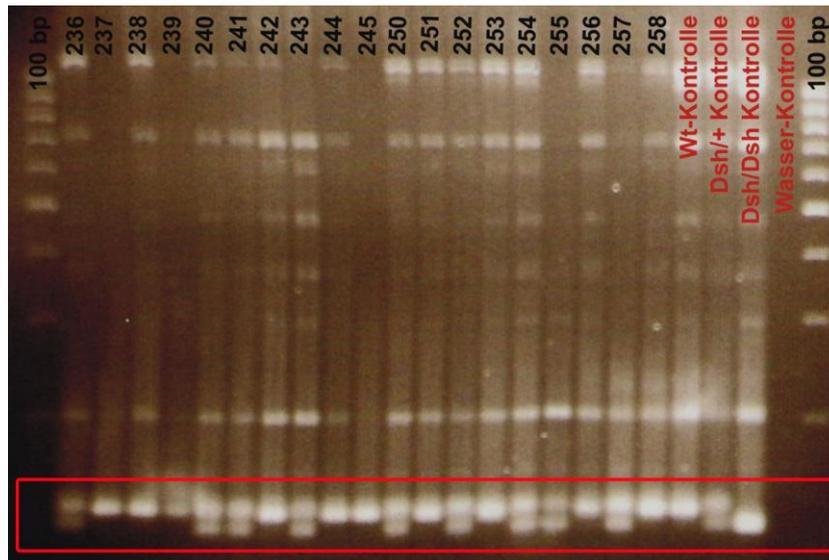
Die Genotypisierung der Dsh-Mausmutante erfolgte anhand des D5Mit72 Mikrosatelliten-Markers, welcher sich zwischen den Mausstämmen C57BL/10, in dem die Mutante gehalten wird, und 101, in dem die Mutante generiert worden ist, unterscheidet und zur Dsh-Mutation gelinkt ist [45].

Für die Genotypisierung der Xt<sup>J</sup>-Mutante wurden 2 Primerpaare verwendet, wobei das C3-Primerpaar innerhalb der Deletion lokalisiert ist, das XtJ 580-Primerpaar hingegen beidseits des Deletionsbruchpunktes bindet. Hierdurch ist es mittels zweier PCRs möglich, homozygote, heterozygote sowie Wildtyp-Individuen zu unterscheiden [49].

**Tabelle 2.1: Primer und PCR-Bedingungen der Genotypisierungen**

	Dsh-Genotypisierung	Xt <sup>J</sup> -Wildtyp-Genotypisierung	Xt <sup>J</sup> -Mutations-Genotypisierung
F-Primer	D5Mit 72 F3	Xt C3 for	XtJ 580-for
R-Primer	D5Mit 72 R	Xt C3 rev	XtJ 580-rev
Annealing-Temperatur	53 °C	60 °C	60 °C
Zyklen	35	30	35
Agarose-Gel	4%	1,5%	1,5%

Die mittels PCR (*siehe Tabelle 2.1 sowie Abschnitt 2.2.3.4*) aus genomischer DNA (*siehe Abschnitt 2.2.3.1*) amplifizierten PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und der Genotyp anhand der Bandenlänge bestimmt (*siehe Abbildung 2.1*).



**Abbildung 2.1: 4% Agarosegel einer Dsh-Genotypisierungs-PCR**

Der rote Rahmen markiert die Position der Banden des D5Mit72-Mikrosatelliten-Markers. Von den hier genotypisierten Mäusen entsprechen die Mäuse 237, 238, 239, 242, 244, 245, 251, 253, 256 und 258 dem Wildtyp, 236, 240, 241, 243, 250, 252, 254, 255 und 257 dem Dsh/+ heterozygoten Genotyp.

## 2.2.2 Histologie

### 2.2.2.1 Herstellung silanisierter Objektträger

Für eine bessere Haftung der Gewebedünnschnitte wurden die Objektträger silanisiert. Zur Reinigung wurden die Objektträger über Nacht in 15% Extran<sup>®</sup>-Lösung eingeweicht und gründlich mit Leitungswasser sowie Aqua dem. gespült. Eine Inaktivierung von RNasen wurde durch Backen (3 Std., 180 °C) der Objektträger erreicht. Der eigentliche Vorgang der Silanisierung beinhaltete das Tauchen der Objektträger in 2% 3-(Triethoxysilyl)-propylamin/Aceton (5 min), Aceton (2 x 5 min) und ddH<sub>2</sub>O (5 min). Abschließend wurden sie getrocknet (ü/N, 45 °C).

### 2.2.2.2 Entwässerung der Embryonen für die Einbettung in Paraffin

Für die Einbettung in Paraffin wurden die Embryonen nach der Präparation in 4% PFA-Lösung (ü/N, 4 °C) fixiert. Auf einem Wipptisch wurden die fixierten Embryonen mit 1x PBS (2 x 10 min, rt) gewaschen und mit 70% Ethanol/DEPC-H<sub>2</sub>O (60 min, Rt) entwässert. In frischem 70% Ethanol/DEPC-H<sub>2</sub>O konnten die Embryonen bei 4 °C bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden.

Abhängig von der Größe durchliefen die Embryonen im Gewebeprozessor vor der Einbettung in Paraffin zunächst eine aufsteigende Ethanolreihe (90%, 95%, 3 x 100%; je 60-120 min; 100% Ethanol unter Vakuum). Danach wurden sie in Xylol (2 x 15 min,

1 x 30 min, Vakuum), in 50% Xylol/Paraffin (3 Std., 58 °C, Vakuum) und in Paraffin (2 x 3 Std., 58 °C, Vakuum) inkubiert. Die Einbettung erfolgte mit 58 °C warmem Paraffin in vorgewärmten Einbettformen aus Metall. Während das Paraffin abkühlte und aushärtete, wurden die Embryonen ausgerichtet. Die Paraffinblöcke wurden bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.2.2.3 Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten**

Mit einem Mikrotom wurden 7 µm dicke Gewebedünnschnitte der in Paraffin eingebetteten Embryonen angefertigt. Zur Glättung wurden die Schnitte kurz in ddH<sub>2</sub>O (40 °C) überführt und auf vorgewärmte, silanisierte Objektträger aufgezogen. Diese wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung dunkel bei rt gelagert.

### **2.2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gehört zu den Standardmethoden zur Anfärbung von Gewebedünnschnitten. Insbesondere die Verwendung in Paraffin eingebetteter Embryonen ermöglicht hierbei eine gute morphologische Darstellung der verschiedenen Gewebe.

Das Paraffin wurde durch Erhitzen der Objektträger (10-15 min, 58 °C) aufgeweicht und mit Xylol (2 x 10 min) entfernt sowie die Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 90%, 70%, ddH<sub>2</sub>O; je 5 min) rehydriert. Als Erstes erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin (3 min). Die Schnitte wurden kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült und mit Leitungswasser gebläut (ca. 10 min). Als Zweites erfolgte nach erneuter Spülung mit ddH<sub>2</sub>O die Färbung mit frisch angesäuerter Eosin-Lösung (0,5% konzentrierte Essigsäure; 4 min). Es folgte eine kurze Spülung in ddH<sub>2</sub>O und 70% Ethanol sowie die Dehydrierung in Ethanol (90%, 100%; je 5 min) sowie Xylol (2 x 5 min). Für die Eindeckelung wurde Entellan<sup>®</sup> verwendet.

### **2.2.2.5 NKX2.1-Antikörperfärbung**

Die NKX2.1-Antikörperfärbung wurde vom Institut für Neuropathologie der Charité – Universitätsmedizin in Berlin, Campus Virchow Klinikum unter der Leitung von Dr. van Landeghem durchgeführt. Es wurde dabei das Standardprotokoll des Instituts unter Verwendung eines Antikörpers gegen humanes NKX2.1 angewendet.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe

Als Gewebe zur DNA-Isolation diente bei Embryonen die Eihaut, bei Jungtieren im Alter von wenigen Wochen gewonnene Schwanzspitzenbiopsien.

Zunächst wurde das Gewebe mit Proteinase K (20 µg/ml; ü/N, 55 °C) verdaut und die Zelltrümmer mit ½ Volumen 5 M NaCl gefällt. Nach je 10 min bei rt auf einem Wipptisch sowie auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 7000 rpm, 4 °C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit dem doppeltem Volumen eiskaltem 100% Ethanol p.a. und Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4 °C) gefällt und das DNA-Pellet mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl 1x TE gelöst. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei 4 °C.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
PK-SDS-Puffer, pH 7,5	17 mM Tris-HCl, 17 mM EDTA, 170 mM NaCl, 0,846% (w/v) SDS in ddH <sub>2</sub> O
1x TE, pH 8,0	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA in ddH <sub>2</sub> O

### 2.2.3.2 Isolation von Gesamt-RNA aus Mausgewebe

Zur Isolierung der Gesamt-RNA eines Embryos wurde dieser nach der Präparation sofort in RNeasy<sup>®</sup> überführt und bei –80 °C eingefroren.

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem TRIZOL<sup>®</sup>-Reagent entsprechend dem Standardprotokoll [52]. Die RNA wurde in 10-15 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und bei –80 °C gelagert.

### 2.2.3.3 Herstellung von cDNA

Unter cDNA versteht man eine zur mRNA komplementäre DNA. Durch Verwendung eines oligo-dT-Primers und einer Reversen Transkriptase kann cDNA aus Gesamt-RNA generiert werden. Hierzu wurde der Omniscript<sup>™</sup> RT Kit eingesetzt und das Standardprotokoll angewendet [53].

Die Aufbewahrung der cDNA erfolgte bei –20 °C. Für die PCR wurde ein Aliquot des Reaktionsgemisches eingesetzt.

### 2.2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die exponentielle Amplifikation ausgewählter DNA-Fragmente durch Verwendung zweier sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer sowie einer thermostabilen DNA-Polymerase (TAQ) [54].

Genotypisierungs-PCR		Sondenherstellung	
10x PCR-Puffer	2,5 µl	10x PCR-Puffer	5,0 µl
dNTPs (je 1,25 mM)	2,0 µl	dNTPs (je 2,5 mM)	0,5 µl
Forward-Primer (10 µM)	1,0 µl	Forward-Primer (25 µM)	1,0 µl
Reverse-Primer (10 µM)	1,0 µl	Reverse-Primer (25 µM)	1,0 µl
TAQ-Polymerase	0,5 µl	TAQ-Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	17,0 µl	H <sub>2</sub> O	41,0 µl
DNA	1,0 µl	DNA	1,0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>

Bei der PCR wurde die Doppelstrang-DNA zunächst denaturiert (5 min, 95 °C). Es folgten 30-40 Zyklen mit 3 Schritten:

- Denaturierung (1 min, 95 °C)
- Annealing der Primer (1 min, Temperatur abhängig vom Primer)
- Elongation durch die TAQ-Polymerase ( ~1 min pro 1000 bp, 72 °C).

Abschließend folgte eine finale Elongation für 8-10 min.

Bei der PCR für die Sonden Foxe1 und Pax8 wurde zusätzlich Betain (Endkonzentration 5 mM) eingesetzt. Die *Tabelle 2.1* und *Tabelle 2.2* geben einen Überblick über die PCR-Bedingungen.

### 2.2.3.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese (1-4% Agarose in 1x TAE-Puffer) diente der Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten in Abhängigkeit von ihrer Länge. Zur Darstellung der Fragmente wurde den Gelen Ethidiumbromid (0,4 µg/ml) zugesetzt, das mit Nukleinsäuren interagiert und unter UV-Licht fluoresziert. Das erhärtete Gel wurde in mit 1x TAE-Puffer gefüllte Horizontalkammern überführt. 5–10 µl des PCR-Produktes wurden mit 6x-Ladepuffer vermischt in die Geltaschen eingebracht. Es wurde eine Spannung von 80–120 V angebracht. Als Größenstandard wurde eine 100 bp-DNA-Leiter mitgeführt.

Die Auswertung der Gele erfolgte auf einem UV-Transluminator. Das Ergebnis wurde mit dem Geldokumentationssystem E.A.S.Y. Win 32 festgehalten.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
1x TAE, pH 8,3	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,3 in ddH <sub>2</sub> O

### **2.2.3.6 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Die Aufreinigung von PCR-Produkten vor der weiteren Verarbeitung erfolgte mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR-Purification Kit. Es wurde dabei das Standardprotokoll [55] mit folgenden Änderungen verwendet:

- Die Zentrifugationszeit in den Schritten 3 und 5 wurde auf 2 min, die in Schritt 6 auf 5 min verlängert.
- Die DNA wurde mit 30 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.2.3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel**

Für die Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit verwendet. Es wurde das Standardprotokoll [56] mit folgenden Änderungen verwendet:

- Die Zentrifugationszeit der Schritte 7, 9, 10 wurde auf 2 min, die des Schrittes 11 auf 5 min verlängert.
- Im Schritt 10 wurde zweimal mit je 500 µl QG-Puffer gewaschen.
- Die DNA wurde mit 20 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.2.3.8 TOPO-Klonierung**

Für die spätere Transkription und Markierung der Sonden wurden die PCR-Fragmente in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektor kloniert, der einen T7-Promoter enthält. Für die Klonierungsreaktion wurden 2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (*siehe Abschnitt 2.2.3.6 bzw. 2.2.3.7*) eingesetzt und das Standardprotokoll des TOPO-TA-Cloning-Kit verwendet [57].

### **2.2.3.9 Transformation und Bakterienanzucht**

Für die Transformation wurden *E.coli*-Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-T1<sup>®</sup> (Invitrogen) verwendet. Die Transformation der Bakterien erfolgte nach Protokoll [57].

Die Selektion der Bakterien erfolgte auf mit X-gal (40 µl à 40 mg/ml) bestrichenen, Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten (LBamp). Nur transformierte Bakterienklone können

auf Grund der auf dem pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektor kodierten Ampicillin-Resistenz wachsen. Bei orthotoper Klonierung wird das LacZ-Gen des Plasmids zerstört, die Bakterien können X-gal nicht mehr verstoffwechseln und die Kolonien erscheinen weiß.

Durch Animpfen von LBamp-Medium mit einem Bakterienklon und Inkubation im Brutschrank (ü/N, 37 °C, 220 rpm) wurde eine Amplifikation des Plasmides erreicht. Je nach zu erzielender Plasmidmenge wurden 4 ml (Mini) bzw. 250 ml (Maxi) LBamp-Medium verwendet.

Zum Anlegen eines Glycerolstocks wurde ein Aliquot der Bakterienkultur im Verhältnis 1:1 mit Glycerol vermischt und bei –80 °C gelagert.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
LB-Medium nach Miller, pH 7.0	1% Tryptone, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl in Aqua dem, autoklavieren
LBamp-Medium	LB-Medium, mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt
LB-Agar-Platten	1,5% Agar in LB-Medium, in Petrischalen gegossen, Lagerung bei 4 °C

### 2.2.3.10 Plasmidpräparation

#### *Mini-Präparation*

Zur Gewinnung kleinerer Mengen Plasmid-DNA wurde ein 4 ml-Kulturansatz verwendet. Die Bakterienkultur wurde zunächst zentrifugiert (10 min, 4 000 rpm) und der Überstand verworfen. Des Weiteren wurde das Standardprotokoll [58] des QIAprep<sup>®</sup> Miniprep Kit mit folgenden Änderungen verwendet:

- Die Zentrifugationszeit in Schritt 6, 8 und 10 wurde auf 2 min, in Schritt 9 auf 5 min verlängert
- Schritt 8 wurde wiederholt.

#### *Maxi-Präparation*

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde ein 250 ml Kulturansatz verwendet. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Qiagen<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit entsprechend dem Standardprotokoll [59].

### 2.2.3.11 Plasmidverdau mit Restriktionsenzymen

#### Überprüfen der Insertlänge

Die „cloning site“ des pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektors wird beidseits von EcoRI-Restriktionsstellen flankiert. Ein Restriktionsverdau mit EcoRI-Enzym (1 Std., 37 °C) führte zum Ausschneiden des orthotop inserierten DNA-Fragmentes. Die Fragmentlänge wurde durch Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft (*siehe Abschnitt 2.2.3.5*).

Eco-R1-Restriktionsverdau	
10x EcoRI-Puffer	2 µl
EcoRI-Restriktionsenzym (20 U/µl)	1 µl
Plasmid-DNA	17 µl
Gesamtvolumen	20 µl

#### Linearisierung

Um in der nachfolgenden Transkription eine einzelsträngige antisense-RNA zu erhalten, wurde zunächst das Plasmid linearisiert. Hierbei war sicherzustellen, dass das inserierte DNA-Fragment keine Restriktionsstellen des verwendeten Restriktionsenzymen enthielt. Der Restriktionsverdau erfolgte für mindestens 3 Std. bei 37 °C.

Linearisierung	
10x Restriktionspuffer Y+/Tango	10 µl
Restriktionsenzym Spel (10 U/µl)	5 µl
Plasmid-DNA: 30 µg	x µl
dH <sub>2</sub> O	(85 – x) µl
Gesamtvolumen	100 µl

Zur Inaktivierung von Restriktionsenzym und RNasen schloss sich ein Proteinase K-Verdau an (0,2 µg/µl; 1 Std., 37 °C).

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Schüttelextraktion. Hierzu wurde das Probenvolumen mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 500 µl aufgefüllt und in aufeinanderfolgenden Schritten je 500 µl

- Phenol
- Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)
- Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)

hinzugefügt, kräftig geschüttelt, zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4 °C) und die obere Phase in ein neues Reagenzgefäß überführt. Es folgte die Fällung der DNA mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,2 und doppeltem Volumen 100% Ethanol p.a. (30 min, -20 °C) und Zentrifugation (20 min, 13000 rpm, 4 °C). Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol/DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen und zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4 °C). Das luftgetrocknete Pellet wurde in 25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Kontrolle werden jeweils 1 µg unverdautes Plasmid sowie 1 µl des Linearisierungsproduktes auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

### 2.2.3.12 Sequenzierung

Um die Orientierung des inserierten DNA-Fragmentes im Plasmid zu bestimmen, wurde dieses mit den Standardprimern M13 Forward bzw. Reverse sequenziert.

Sequenzierung	
5x BigDye sequencing buffer	2 µl
BigDye®-Sequenziermix	1 µl
Primer (5 µM)	1 µl
Plasmid-DNA	1-5 µl
dH <sub>2</sub> O	0-4 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 µl</b>

Die Sequenzreaktion erfolgt einer 30-Zyklen-Reaktion:

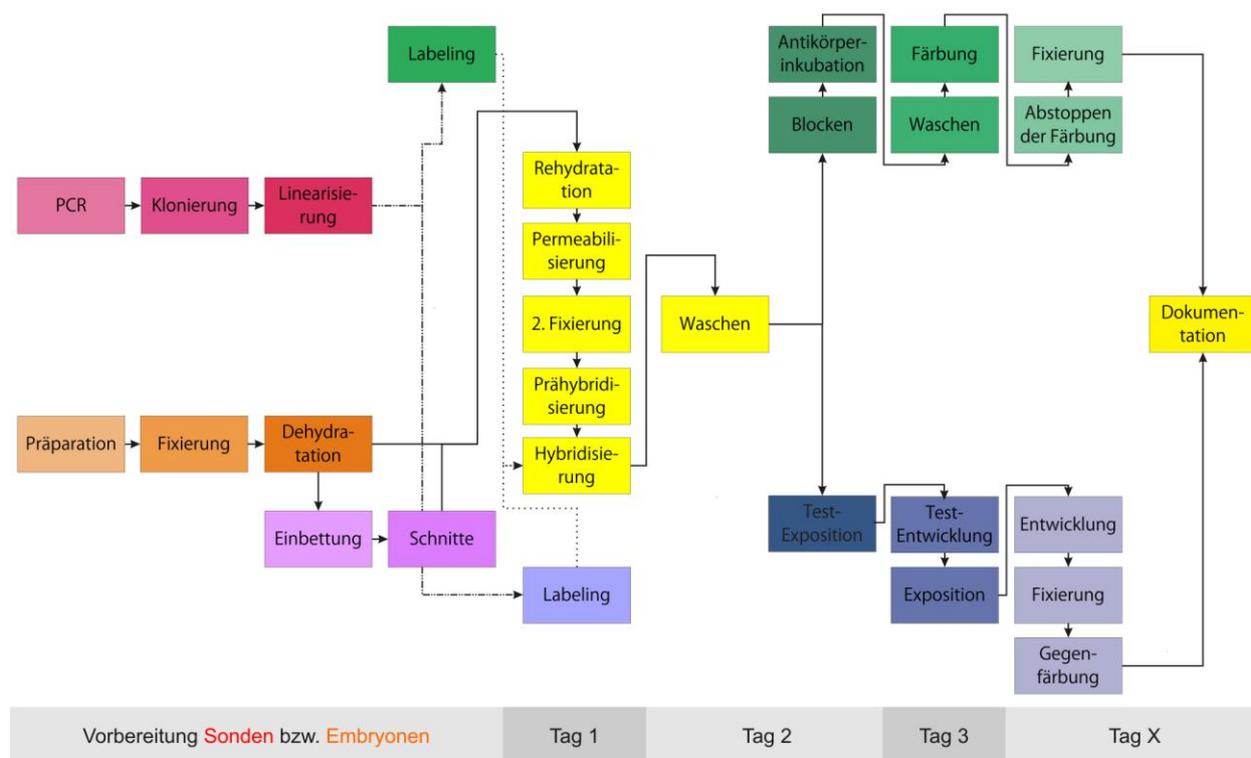
- Denaturierung: 95°C, 30 s (initial 1 min)
- Annealing: 55 °C , 15 s
- Elongation: 60 °C, 4 min (final 8 min)

Das Produkt wurde mit  $\frac{1}{5}$  Volumen 1,5 M Natriumacetat (pH 5,5) und doppeltem Volumen 100% Ethanol gefällt und zentrifugiert (30 min, maximale Geschwindigkeit, 4 °C). Das Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und zentrifugiert (15 min, maximale Geschwindigkeit) und 30 min bei 50 °C getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 10 µl HPLC-H<sub>2</sub>O.

Die Erstellung der Sequenzen erfolgte mit dem ABI 3130 Genetic Analyzer mittels Kapillargelelektrophorese.

## 2.2.4 In-situ-Hybridisierungen

Die in-situ-Hybridisierung ermöglicht es, die Expression eines Gens in bestimmten Geweben und Organen auf Ebene der mRNA nachzuweisen.



### Abbildung 2.2: Schematischer Überblick über die Arbeitsschritte der in-situ-Hybridisierungen

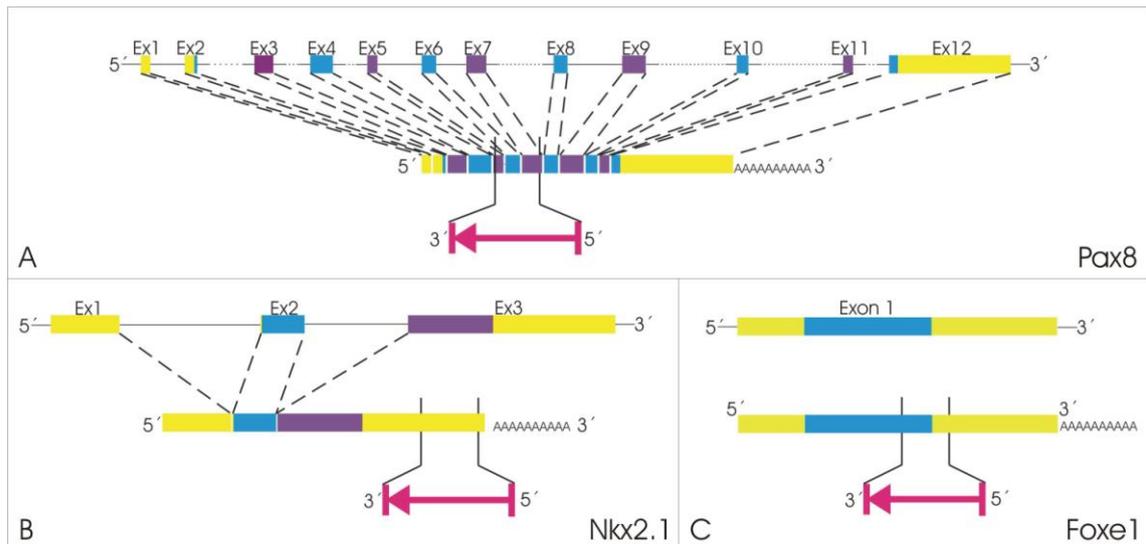
Das Flussdiagramm gibt einen Überblick über die Arbeitsschritte der beiden verwendeten in-situ-Hybridisierungsprotokolle. Beiden Protokollen gemeinsame Schritte sind in gelb dargestellt. Grün repräsentiert Arbeitsschritte der whole-mount in-situ-Hybridisierung, blau/lila der radioaktiven in-situ-Hybridisierung, magenta der Sondenherstellung und orange/lila der Embryonenverarbeitung.

#### 2.2.4.1 Verwendete Sonden

Tabelle 2.2: Sonden für die in-situ-Hybridisierungen

	Pax8	Nkx2.1	Foxe1
F-Primer	mPax8-5-F	mNkx2.1-3'UTR-F	mFoxe1-F
R-Primer	mPax8-7-R	mNkx2.1-3'UTR-R	mFoxe1-3'UTR-R
Annealing-Temperatur	58.5 °C	60.6 °C	61,5 °C
Template	cDNA, E10.5/11.5	genomische DNA	genomische DNA
Zyklen	40	30	30
Produktlänge	341 bp	499 bp	417 bp

Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die für die in-situ-Hybridisierungen generierten Sonden, *Abbildung 2.3* über deren Lage.



**Abbildung 2.3: Schematischer Überblick über die Lage der Sonden**

(A) Pax8, (B) Nkx2.1, (C) Foxe1. Untranslatierte Regionen sind gelb, translatierte Exons blau bzw. lila dargestellt. Die antisense-Sonde wird durch einen rosafarbenen Pfeil in entsprechender Orientierung dargestellt.

Die Sonden *Shh* und *Ptch1* wurden von der AG Mundlos, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik (Berlin), zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.4.2 Whole-mount in-situ-Hybridisierung

In den frühen Embryonalstadien E10.5 und E11.5 wurde das Expressionsmuster in ganzen Embryonen mittels whole-mount in-situ-Hybridisierung dargestellt.

##### *Digoxigenin(DIG)-Markierung der Sonden*

Für die Markierung der Sonden wurde der DIG RNA Labeling Kit verwendet. Die Transkription wurde entsprechend dem Standardprotokoll durchgeführt [60]. Die markierte RNA wurde mit  $\text{LiCl}_2$  und Ethanol gefällt, in 100  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Quantität und Qualität der Sonde wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese beurteilt.

##### *Fixierung und Entwässerung der Embryonen*

Die Embryonen wurden in 4% PFA (ü/N,  $4^\circ\text{C}$ ) fixiert und auf einem Wipptisch in PBST (2 x 10 min, rt) gewaschen. Die Entwässerung erfolgte mit 50% Methanol/PBST (2 x 10 min, rt) und 100% Methanol (10 min, rt). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Embryonen bei  $-20^\circ\text{C}$  in frischem 100% Methanol gelagert.

### *1. Tag: Vorbereitung der Embryonen und Hybridisierung*

Die Embryonen wurden in einer absteigenden Methanol-Reihe (75%, 50%, 25% in PBST; je 10 min, auf Eis) rehydriert, in PBST gewaschen (2 x 10 min) und mit 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebleicht (1 Std., rt). Danach wurden sie erneut in PBST gewaschen (3 x 10 min) und durch Proteinase-K-Verdau (10 µg/ml; 3 min) permeabilisiert. Sie wurden in 0,2% Glycin/PBST, PBST, RIPA-Puffer und nochmals PBST gewaschen (je 2 x 5 min) und in 0,2% Glutaraldehyd/PFA fixiert (20 min). Es folgte das erneute Waschen mit PBST (3 x 10 min), 50% WM-Hyb/PBST und WM-Hyb. Zur Prähybridisierung wurden die Embryonen zunächst in WM-Hyb inkubiert (1-3 Std., 65 °C).

Die DIG-markierte Sonde wurde 1:100 in WM-Hyb + RNA verdünnt, denaturiert (5 min, 85 °C) und dieser Sondenmix für die Hybridisierung (ü/N, 65 °C) verwendet.

### *2. Tag: Waschen und Antikörperinkubation*

Die Embryonen wurden mit WM-Hyb (2 x 30 min, 65 °C) und 50% WM-Hyb/RNase-Puffer (5 min, rt) gewaschen. Danach folgte der RNase-A-Verdau (100 µg/ml; 2 x 30 min, 37 °C) und das Waschen mit 50% (SSC/FA/T)/RNase-Puffer (5 min, rt). Die Embryonen wurden in SSC/FA/T auf 65 °C erwärmt, mit SSC/FA/T (2 x 5 min, 3 x 10 min, 6 x 30 min, 65 °C), 50% (SSC/FA/T)/MABT (10 min, rt) und MABT (2 x 10 min, rt) gewaschen. Die Embryonen wurden mit 10% Blocking Reagent/MABT präinkubiert. Die Antikörperinkubation erfolgte mit Anti-DIG-AP-Konjugat (1:5000 in MABT; ü/N, 4 °C).

### *3. Tag: Waschen und Färbung*

Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit 0,05% Levamisol/PBST (3 x 5 min, 8 x 30-60 min, rt sowie ü/N, 4 °C) entfernt. Die Embryonen wurden in AP-Puffer gewaschen (3 x 20 min). Die Farbreaktion erfolgte lichtgeschützt in AP-Färbelösung, wobei der Erfolg regelmäßig unter dem Stereomikroskop überprüft wurde.

### *x. Tag: Abstoppen der Farbreaktion und Fixierung*

Zum Abstoppen der Farbreaktion wurden die Embryonen in AP-Puffer gewaschen (3 x 20 min) und in 0,2% Glutaraldehyd/PFA fixiert (1 Std., rt) Danach wurden sie in 60-100% Glycerin überführt und bei 4 °C gelagert.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Proteinase-K-Puffer, pH 7,0	20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA in DEPC-H <sub>2</sub> O
RIPA-Puffer, pH 8,0 (nicht autoklavierbar)	0,05% SDS, 150 mM NaCl, 1% Nonidet 40, 0,5% Natrium-Deoxycholat, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, in DEPC-H <sub>2</sub> O, bei 4 °C lagern
WM-Hyb	50% Formamid, 5 x SSC, 0,005% Heparin, 0,1% Tween 20 in DEPC-H <sub>2</sub> O
WM-Hyb + RNA	100 µg/ml RNA Typ III in WM-Hyb
RNase-Puffer, pH 7,5	500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20 in DEPC-H <sub>2</sub> O
SSC/FA/T	2x SSC, 50% Formamid, 0,1% Tween 20 in DEPC-H <sub>2</sub> O
MABT, pH 7,5	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20 in DEPC-H <sub>2</sub> O,
AP-Puffer, pH 9,5	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1% Tween 20, 0,05% Levamisole in DEPC-H <sub>2</sub> O
AP-Farbelösung	0,045% NBT, 0,0175% BCIP in AP-Puffer

### 2.2.4.3 Radioaktive in-situ-Hybridisierung

In der späteren Embryonalentwicklung ist die whole-mount in-situ-Hybridisierung zur Darstellung der Genexpression auf Grund der Größe der Embryonen insbesondere zur Darstellung innerer Organe nicht mehr geeignet. Daher wurde ab dem Stadium E12.5 eine radioaktive in-situ-Hybridisierung auf Gewebedünnschnitten durchgeführt.

#### 1. Tag: Vorbereitung der Gewebeschnitte

Die Gewebedünnschnitte wurden mit Xylol (2 x 5 min) vom Paraffin befreit und die Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100%, 90%, 70%, 50%, 30%, 2 x 1x PBS; je 2 min) rehydriert. Um die Gewebeporosität zu verbessern, wurden die Schnitte mit Proteinase K (10 µg/ml in 1x PBS; 3 min) verdaut und anschließend in 4% PFA fixiert (10 min). In einer aufsteigenden Ethanolreihe (2 x 1x PBS, 30%, 50%, 70%, 90%, 2 x 100%) wurden die Schnitte erneut dehydriert.

### 1. Tag: Radioaktive Markierung der Sonden und Hybridisierung

Die radioaktive Markierung der Sonde wurde am 1. Tag der radioaktiven in-situ-Hybridisierung durchgeführt.

Radioaktive Markierung	
linearisierte Plasmid-DNA (1 µg)	x µl
10x Transkriptionspuffer	2 µl
NTPs (C,A,G) (je 250 pM)	2 µl
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
<sup>33</sup> P-UTP (10 mCi/ml)	4 µl
RNA-Polymerase (20 U/µl)	2 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	(9-x) µl
Gesamtvolumen	20 µl

Im Anschluss an die Transkription (1 Std., 40 °C) wurde die Template-DNA mit 20 U DNase I verdaut (20 min, 37 °C) und die markierte RNA mit LiCl<sub>2</sub>, Glycogen und Ethanol gefällt (30 min, -20 °C). Die Probe wurde zentrifugiert (15 min, 15000 rpm, 4 °C), das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

Die radioaktiv markierte RNA-Sonde wurde mit 1 ml Hybridisierungsmix gemischt, denaturiert (5 min, 90 °C) und pro Objektträger 50-70 µl des Sondenmixes aufgetragen. Die Proben wurden mit Folien bedeckt und in einer mit 50% Formamid/5x SSC angefeuchteten Kammer inkubiert (ü/N, 70 °C).

### 2. Tag: Waschen und Test-Exposition

Die Objektträger wurden mit 5x SSC und 2x SSC (je 30 min, 55 °C) gewaschen und die Folien entfernt. Es folgte ein RNase-A-Verdau (10 µg/ml; 30 min, 37 °C) sowie weitere Waschschrte mit 50% Formamid/2x SSC und zweimalig 2x SSC (je 30 min, 55 °C). Die Gewebedünnschnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (30%, 50%, 70%, 90%, 2 x 100%; je 1 min). Die Testexposition eines Röntgenfilmes erfolgte über Nacht in Röntgenplatten.

### 3. Tag: Test-Entwicklung und Exposition

Der Röntgenfilm wurde entwickelt. In der Dunkelkammer wurden die Objektträger in Photoemulsion (42 °C) gedippt und in Dunkelkästen gelagert (4 °C). Die Dauer der Exposition wurde abhängig von der Signalstärke der Testexposition festgelegt.

### x. Tag: *Entwicklung und Gegenfärbung*

In der Dunkelkammer wurden die Objektträger entwickelt (10 min, 14 °C), mit Aqua dem. gespült und fixiert (20 min, rt). Die Schnitte wurden in Leitungswasser gelagert (ü/N, rt) und die Photoemulsion mit einer Klinge von der Rückseite der Objektträger entfernt. Die Gegenfärbung erfolgte mit 0,5% Toluidinblau/H<sub>2</sub>O (5 min), danach wurden die Gewebedünnschnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 2x100%; kurz) dehydriert. Die Schnitte wurden kurz mit Xylol gespült, in frischem Xylol inkubiert (ü/N) und mit Entellan<sup>®</sup> eingedeckelt. Die Beurteilung der Signalintensität erfolgte im Hell- und Dunkelfeld des Durchlichtmikroskopes.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Hybridisierungsmix, pH 7,4	50% Formamid, 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10% Dextran, 1x Denhardt's, 0,05% RNA ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ), 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in DEPC-H <sub>2</sub> O
RNase-Puffer, pH 7,5	400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA in ddH <sub>2</sub> O

## 2.2.5 Sonstige verwendete Methoden

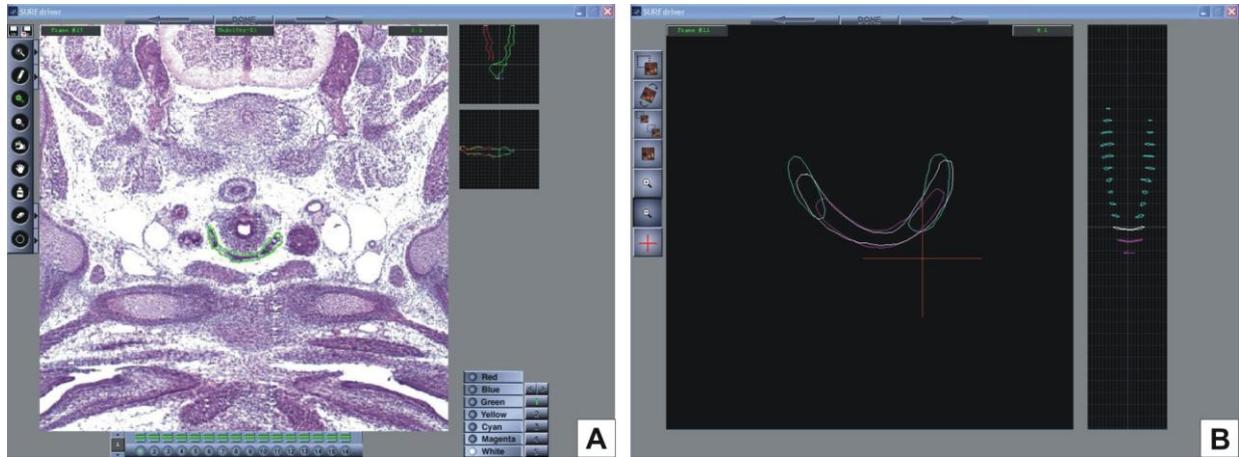
### 2.2.5.1 *Photodokumentation*

Die Photodokumentation der histologischen Schnitte erfolgte unter dem Leica DM R HC Durchlichtmikroskop, die ganzer Embryonen in 60-100% Glycerin unter dem Stereomikroskop MZ12.5, wobei die Digitalkamera über einen 0,63x Adapter am jeweiligen Mikroskop befestigt wurde. Es wurde die Axiovision 4.5-Software verwendet.

### 2.2.5.2 *3-dimensionale Rekonstruktion*

Die 3-dimensionale Rekonstruktionen wurden mit SURFdriver 3.5 erstellt, einer Software für die morphologische Rekonstruktion anatomischer Strukturen, basierend auf der Rekonstruktion von Oberflächen [61]. Serielle, HE-gefärbte Paraffinschnitte der Embryonen wurden photodokumentiert, in das Bitmap-Dateiformat konvertiert sowie fortlaufend nummeriert. Im Arbeitsbereich des Rekonstruktionssoftware wurden manuell die Konturen der entsprechenden Objekte markiert. Verschiebungen und Verdrehungen der Schnitte konnten durch die „Adjust“-Funktion ausgeglichen werden (*siehe Abbildung 2.4*). Basierend auf den Markierungen, angegebener Schnittdicke und Schnittabstand

wurde durch die Software das Oberflächenbild generiert. Dieses konnte im Ansichtsmodus geglättet sowie in allen 3 Achsen frei gedreht werden.



**Abbildung 2.4: SURFdriver 3.5**

(A) Arbeitsfläche zum Erstellen der Objekte: Es wird das Photo des histologischen Schnittes angezeigt, auf dem die Struktur identifiziert und markiert wird. (B) Arbeitsbereich zum Ausrichten der Markierungen: Durch Verschieben und Drehen der Konturen können bei der Verarbeitung der Schnitte entstandene Unterschiede zwischen den Ebenen ausgeglichen werden. Im rechten Abschnitt sind jeweils die weiteren Achsen abgebildet.

## 3 Ergebnisse

Entsprechend der Fragestellung wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Hypothesen untersucht:

- Es besteht eine Ko-Entwicklung der arteriellen zervikalen Gefäße und der Schilddrüse.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Entwicklung der Schilddrüse und der Kiemenbogenarterien in verschiedenen embryonalen Stadien mittels 3-dimensionaler Rekonstruktionen histologischer Schnitte beschrieben.

- Eine gestörte Entwicklung der Gefäße führt zu einer Schilddrüsendysgenese.

Dieser Aspekt wurde durch die Verwendung der Dsh-Mausmutante untersucht. Dabei wurde der Einfluss der Gefäßvariante auf die Schilddrüsenentwicklung dargestellt.

- Eine Shh-Defizienz führt zu einer Störung des Expressionsprofils der zellautonomen Transkriptionsfaktoren der Schilddrüsenanlage.

Hierzu wurde mittels in-situ-Hybridisierungen die Expression von Nkx2.1, Pax8 und Foxe1 in der Schilddrüsenanlage Dsh-homozygoter Embryonen untersucht.

### 3.1 Die Schilddrüsenentwicklung in Wildtypembryonen der Maus

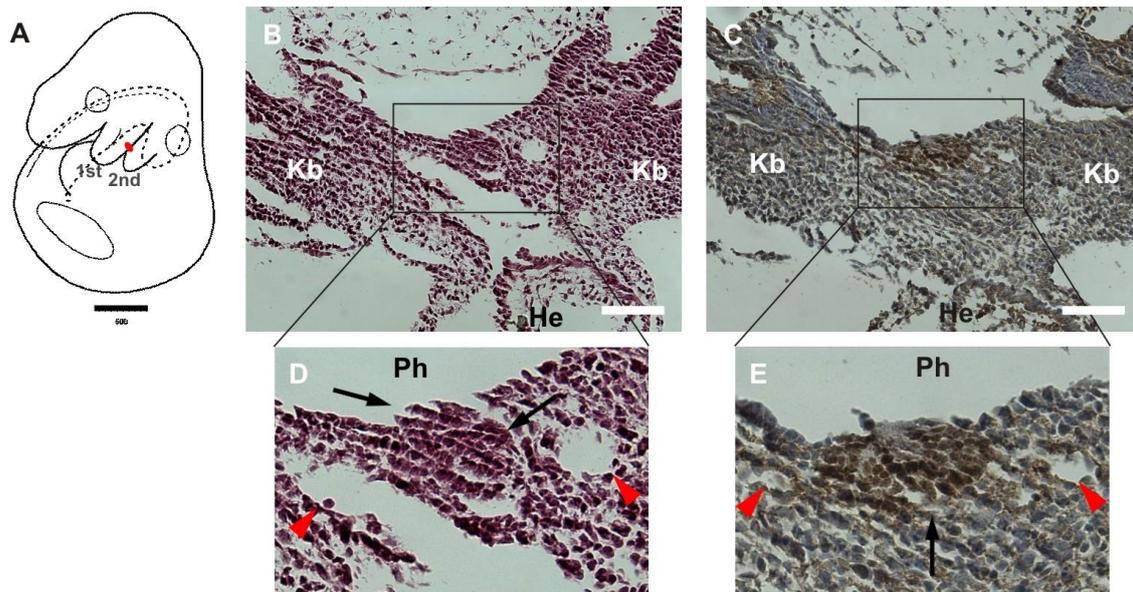
#### 3.1.1 Histologische Darstellung

Um die Entwicklung der Schilddrüse und Gefäße in der Maus zu untersuchen, erfolgte zunächst die histologische Darstellung der Schilddrüse anhand von Transversalschnitten in Paraffin eingebetteter Embryonen in verschiedenen Embryonalstadien. Durch eine NKX2.1-Antikörperfärbung wurde bestätigt, dass es sich bei der identifizierten Struktur um Schilddrüsengewebe handelt. Gefäße sind aufgrund des Lumens und ihres charakteristischen Wandaufbaus histologisch gut zu erkennen.

##### 3.1.1.1 Stadium E9.5

Im Stadium E9.5 ist das Schilddrüsenprimordium auf Höhe des 2. Kiemenbogens lokalisiert. Es stellt sich in diesem frühen Stadium seiner Entwicklung als eine Verdickung des ventralen Pharynxepithels mit kugelige Form dar. Vom umgebenden

Mesenchym unterscheiden sich die Zellen in der HE-Färbung durch eine kompaktere Anordnung sowie eine abgerundete Form, teilweise ist außerdem ein minimaler Spalt erkennbar. In der NKX2.1-Antikörper-Färbung ist eine deutlich positive Färbung des Schilddrüsenprimordiums zu erkennen. Etwas ventral des Schilddrüsenprimordiums ist der Ausflusstrakt des Herzens lokalisiert, lateroventral der Schilddrüse verlaufen Gefäße, streckenweise in direktem Kontakt zur Schilddrüse (*siehe Abbildung 3.1*).

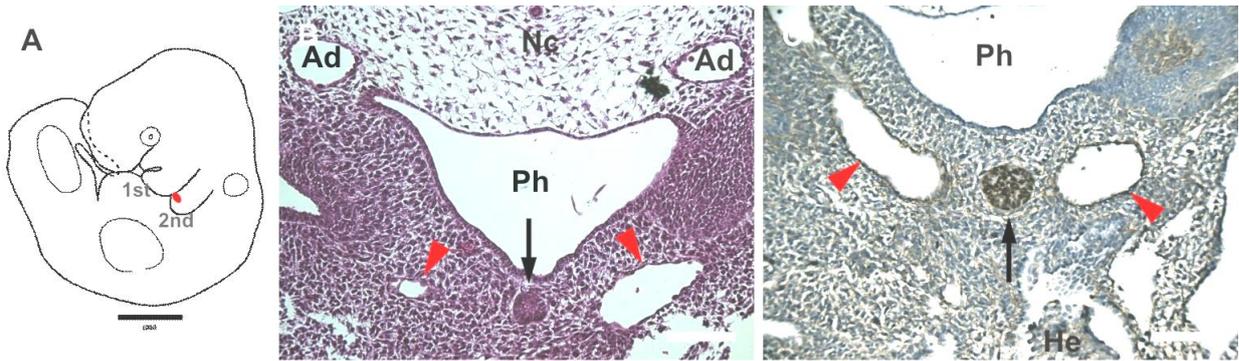


**Abbildung 3.1: Die Schilddrüse im Stadium E9.5.**

(A) Schematische Kennzeichnung der Schilddrüsenposition im Embryo [50, 62], (B) HE bzw. (C) NKX2.1-Antikörperfärbung von Transversalschnitten der Schilddrüsenregion, (D) bzw. (E) stellen Ausschnittsvergrößerungen aus (B) bzw. (C) dar. Oben entspricht im Embryo dorsal, links entspricht anatomisch rechts. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse, rote Pfeilspitze: Gefäß, 1st/2nd: 1./2. Kiemenbogen, He: Herz, Kb: Kiemenbogen, Ph: Pharynx; der schwarze Balken entspricht 500 µm, der weiße 100 µm

### 3.1.1.2 Stadium E10.5

Die Lage des Schilddrüsenprimordium im Stadium E10.5 entspricht dem Stadium E9.5. Im Querschnitt ist das Primordium rund und grenzt sich von der Umgebung morphologisch durch eine größere Zelldichte und eine abgerundete Form der Zellen deutlich ab. Am kranialen Pol ist das Primordium mit dem Pharynx verbunden, der dort eine kleine Ausbuchtung aufweist. Gegenüber dem Stadium E9.5 ist vor allem ein vertikal gerichtetes Größenwachstum zu erkennen. Lateral des Primordium sind symmetrisch die Kiemenbogenarterien lokalisiert. Ventrokaudal des Primordium ist weiterhin der Ausflusstrakt des Herzens benachbart, beide Strukturen sind nur durch eine dünne Mesenchymzellschicht getrennt (*siehe Abbildung 3.2*).

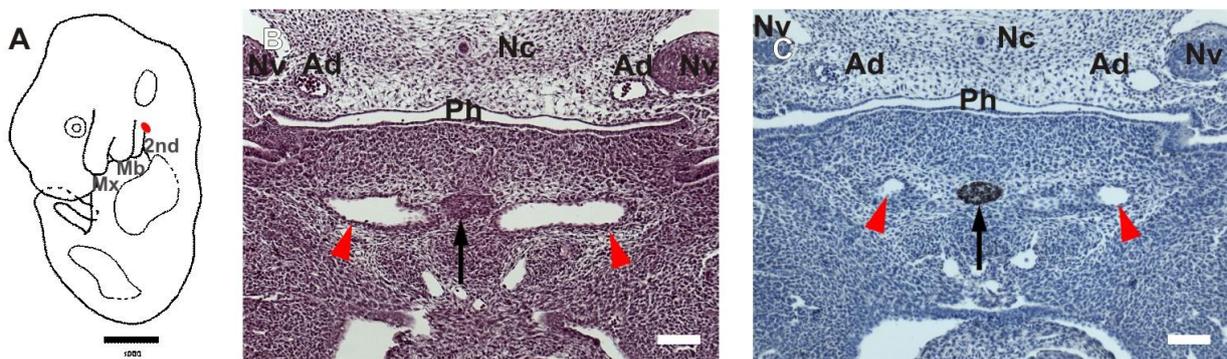


### Abbildung 3.2: Die Schilddrüse im Stadium E10.5.

(A) Schematische Kennzeichnung der Schilddrüsenposition im Embryo [50, 62], (B) HE bzw. (C) NKX2.1-Antikörperfärbung von Transversalschnitten der Schilddrüsenregion. (B) ist kranial von (C) gelegen. Oben entspricht im Embryo dorsal, links entspricht anatomisch rechts. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse, rote Pfeilspitze: Gefäß, 1st/2nd: 1./2. Kiemenbogen, Ad: Aorta dorsalis, Nc: Notochord, He: Herz Ph: Pharynx. Der schwarze Balken entspricht 1000  $\mu\text{m}$ , der weiße 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.1.3 Stadium E11.5

Im Stadium E11.5 ist das Schilddrüsenprimordium in Höhe des 2. Kiemenbogens gelegen. Das Primordium stellt sich als quer-ovale, Nkx2.1-positive Zellmasse ventral des spaltförmigen Pharynx dar. Verglichen mit dem Stadium E10.5 hat insbesondere ein kraniokaudal, aber auch laterale gerichtetes Wachstum stattgefunden. Das Schilddrüsenprimordium ist in der Mittellinie zwischen den symmetrisch angeordneten Kiemenbogenarterien positioniert, am kaudalen Pol des Primordiums beträgt der Abstand der beiden Strukturen nur wenige  $\mu\text{m}$  (siehe Abbildung 3.3).

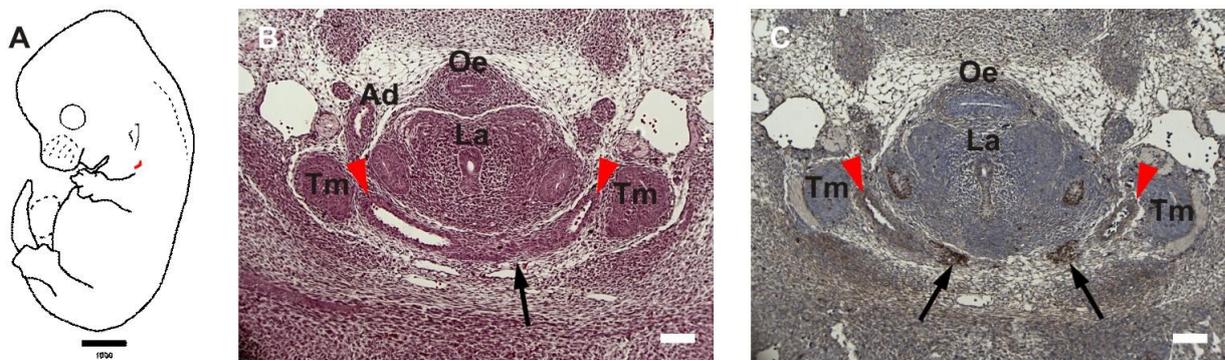


### Abbildung 3.3: Die Schilddrüse im Stadium E11.5.

(A) Schematische Kennzeichnung der Schilddrüsenposition im Embryo [50, 62], (B) HE bzw. (C) NKX2.1-Antikörperfärbung von Transversalschnitten der Schilddrüsenregion. (B) ist kaudal von (C) gelegen. Oben entspricht im Embryo dorsal, links entspricht anatomisch rechts. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse, rote Pfeilspitze: Gefäß, 2nd: 2. Kiemenbogen, Ad: Aorta dorsalis, Kb: Kiemenbogen, He: Herz, Mb: Processus mandibularis des 1. Kiemenbogens, Mx: Processus maxillaris des 1. Kiemenbogens, Nv: Ganglion inferius des N. vagus, Ph: Pharynx. Der weiße Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ , der schwarze 1000  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.1.4 Stadium E12.5

Histologisch zeigt sich eine deutliche morphologische Veränderung der Schilddrüsenanlage. Im Vergleich zum Stadium E11.5 ist jetzt deutlich eine Ausbreitung nach lateral nachweisbar. Im kranialen Anteil der Schilddrüsenanlage sind bereits Ansätze zweier Lappen zu erkennen. Dorsal zur Schilddrüse liegen der sich entwickelnde Larynx sowie der Ösophagus. Lateral sind in direktem Kontakt rechts der Truncus brachiocephalicus bzw. links die A. carotis lokalisiert. Kaudal ist der sich entwickelnde Aortenbogen positioniert. Weiter lateral befinden sich die Thymusprimordia, die dem 3. Kiemenbogen entstammen. In der NKX2.1-Antikörperfärbung stellen sich neben der Schilddrüse die Ultimobronchialkörper positiv dar (siehe *Abbildung 3.4*).

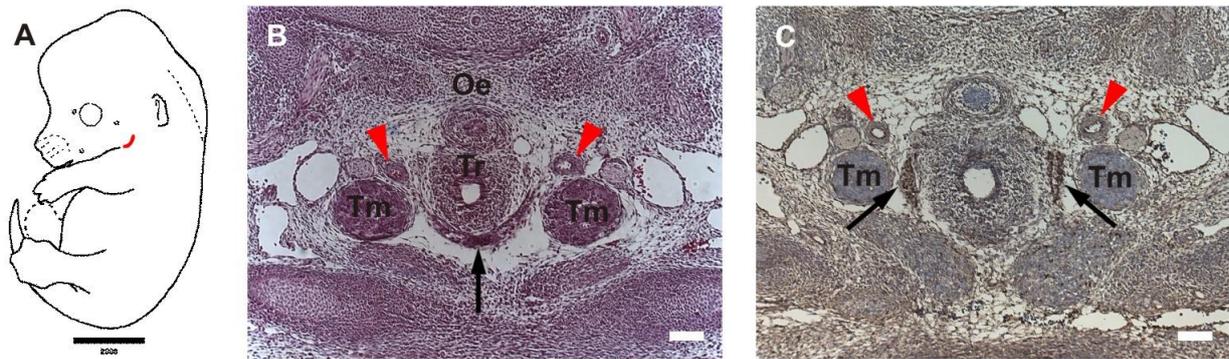


#### Abbildung 3.4: Die Schilddrüse im Stadium E12.5.

(A) Schematische Kennzeichnung der Schilddrüsenposition im Embryo [50, 62], (B) HE bzw. (C) NKX2.1-Antikörperfärbung von Transversalschnitten der Schilddrüsenregion. (C) ist kranial von (B) gelegen. Oben entspricht im Embryo dorsal, links entspricht anatomisch rechts. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse, rote Pfeilspitze: Gefäß, La: Larynx, Tm: Thymusprimordium. Der weiße Balken entspricht 100 µm, der schwarze 1500 µm

### 3.1.1.5 Stadium E13.5

Im Stadium E13.5 ist nun im Vergleich zum Stadium E12.5 ein deutliches Wachstum der Schilddrüse nach dorsolateral und kranial zu beobachten. Morphologisch besteht die Schilddrüse jetzt aus 2 Lappen, die kaudal über einen Isthmus verbunden sind. Der Isthmus ist ventral, die Lappen symmetrisch beidseits der Trachea gelegen. Weiter lateral ist der Thymus positioniert. Dorsolateral der Schilddrüse ist der Gefäß-Nervenstrang des Halses mit Aa. carotidae, Nn. vagi und Vv. jugulares positioniert. Die Aa. carotidae befinden sich hierbei in sehr enger Nachbarschaft zu den Schilddrüsenlappen (siehe *Abbildung 3.5*).

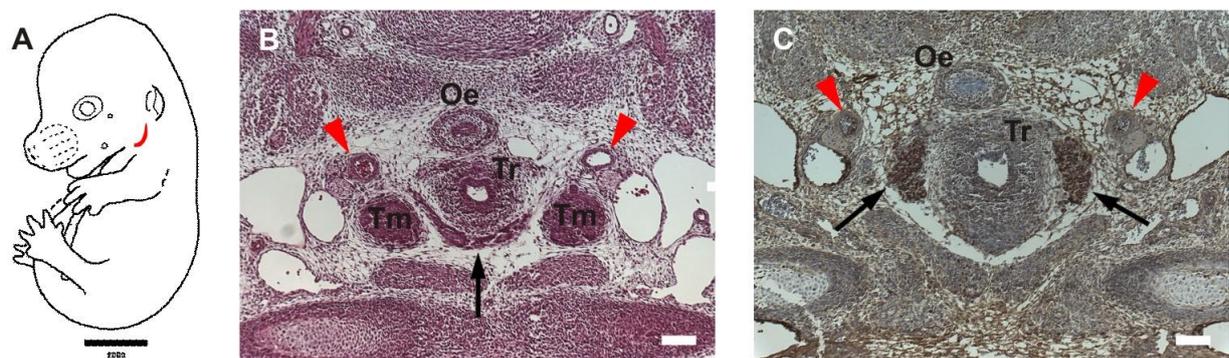


### Abbildung 3.5: Die Schilddrüse im Stadium E13.5.

(A) Schematische Kennzeichnung der Schilddrüsenposition im Embryo [50, 62], (B) HE bzw. (C) NKX2.1-Antikörperfärbung von Transversalschnitten der Schilddrüsenregion. (B) ist kaudal von (C) gelegen. Oben entspricht im Embryo dorsal, links entspricht anatomisch rechts. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse, rote Pfeilspitze: A. carotidea, Oe: Ösophagus, Tm: Thymus, Tr: Trachea. Der weiße Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ , der schwarze 2000  $\mu\text{m}$

#### 3.1.1.6 Stadium E14.5

Im Stadium E14.5 ist im Vergleich zum vorangehenden Embryonalstadium vor allem eine Größenzunahme der beiden Schilddrüsenlappen auffällig. Kaudal sind die beiden Schilddrüsenlappen weiterhin über den Isthmus verbunden, welchem der Thymus benachbart ist. Nach kranial erstreckt sie die Schilddrüse bis dorsal des Larynx. Die Aa. carotidea sind dorsolateral der Schilddrüse im Gefäß-Nerven-Strang des Halses gelegen (siehe Abbildung 3.6).



### Abbildung 3.6: Die Schilddrüse im Stadium E14.5.

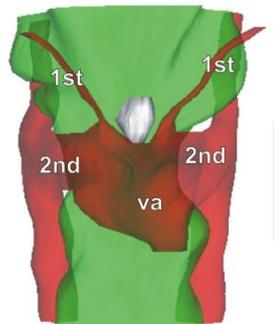
(A) Schematische Kennzeichnung der Schilddrüsenposition im Embryo [50, 62], (B) HE bzw. (C) NKX2.1-Antikörperfärbung von Transversalschnitten der Schilddrüsenregion. (C) ist kranial von (B) gelegen. Oben entspricht im Embryo dorsal, links entspricht anatomisch rechts. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse, rote Pfeilspitze: A. carotidea, Oe: Ösophagus, Tm: Thymus; Tr: Trachea, Der weiße Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ , der schwarze 2000  $\mu\text{m}$

### 3.1.2 3-dimensionale Rekonstruktion

Zur anschaulicheren Darstellung der räumlichen Beziehung von Schilddrüse und arteriellen Gefäßen in unterschiedlichen Stadien der Embryonalentwicklung erfolgte ausgehend von transversalen Gewebedünnschnitten die 3-dimensionale Rekonstruktion dieser Strukturen. Die Gefäße sind rot und die Schilddrüse grau dargestellt. Der Pharynx bzw. Ösophagus als Mittellinienstruktur dient der Orientierung und ist grün dargestellt.

#### 3.1.2.1 Stadium E9.5

Im Stadium E9.5 zeigt die 3-dimensionale Rekonstruktion den symmetrischen Aufbau des embryonalen arteriellen Gefäßsystems. Aus dem Ausflusstrakt des primitiven Herzschlauches entspringen die 1. und 2. Kiemenbogenarterien, die den Pharynx beidseits lateral passieren und in die symmetrisch angelegten dorsalen Aorten münden. Die Schilddrüsenanlage bildet ein ellipsoides Primordium, welches in der Mittellinie ventral des Pharynx gelegen ist. Kaudal besteht eine enge Nachbarschaft zum Ausflusstrakt des Herzens, lateral zu den 1. Kiemenbogenarterien (*siehe Abbildung 3.7*).



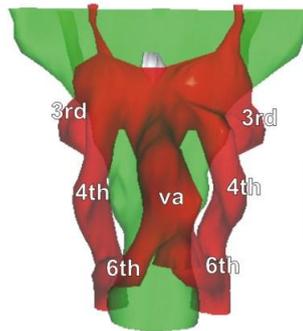
**Abbildung 3.7: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse im Stadium E9.5.**

Das Schilddrüsenprimordium liegt in der Mittellinie am Ausflusstrakt des Herzens. Grau: Schilddrüse, rot: arterielle Gefäße bzw. Ausflusstrakt des Herzens, grün: Pharynx, 1st/2nd: 1./2. Kiemenbogenarterie, va: ventrale Aorta. Der graue Balken entspricht 140 µm.

#### 3.1.2.2 Stadium E11.5

Im Stadium E11.5 besteht das arterielle Gefäßsystem aus der mittig gelegenen ventralen Aorta, aus der die 3., 4. und 6. Kiemenbogenarterien entspringen. Diese

münden beidseitig in die dorsalen Aorten. Der kraniale Anteil des Vorderdarms stellt sich breit und flach dar, kaudalwärts verjüngt er sich zum späteren Ösophagus. Das ellipsoide Schilddrüsenprimordium ist ventral des Pharynx in enger Nachbarschaft zum Übergang der ventralen Aorta in die 3. Kiemenbogenarterien lokalisiert (*siehe Abbildung 3.8*).



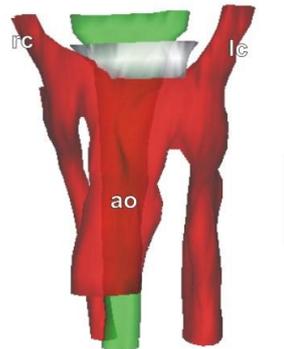
**Abbildung 3.8: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse im Stadium E11.5.**

Das Schilddrüsenprimordium liegt in der Mittellinie am Ausflusstrakt des Herzens. Grau: Schilddrüse, rot: arterielle Gefäße, grün: Pharynx, 3rd/4th/6th: 3./4./6. Kiemenbogenarterie, Ad: Aorta dorsalis, va: ventrale Aorta. Der graue Balken entspricht 140 µm.

### 3.1.2.3 Stadium E12.5

Im Stadium E12.5 beginnt der asymmetrische Umbau des arteriellen Gefäßsystems. Verglichen mit der linken dorsalen Aorta ist der Durchmesser der rechten deutlich geringer. Aus der linken Aorta dorsalis geht die Aorta descendens hervor, die über den Aortenbogen mit der Aorta ascendens verbunden ist. Der Aortenbogen hat sich aus der linken 4. Kiemenbogenarterie entwickelt, wohingegen die rechte 4. Kiemenbogenarterie den Truncus brachiocephalicus bildet. Die rechte und linke A. carotis, die aus dem Aortenbogen bzw. Truncus brachiocephalicus abgehen, stammen von den 3. Kiemenbogenarterien ab.

Die Schilddrüse hat sich nach lateral ausgebreitet und weist nun die Form einer Sichel auf, deren Basis dem Aortenbogen aufsitzt und deren Spitzen sich entlang der Karotiden erstrecken (*siehe Abbildung 3.9*).

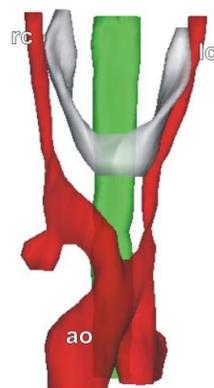


**Abbildung 3.9: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse im Stadium E12.5.**

Die Schilddrüse breitet sich nach lateral entlang der Karotiden aus. Grau: Schilddrüse, rot: Gefäße, grün: Pharynx. Ao: Aorta ascendens, lc: linke A. carotis, rc: rechte A. carotis. Der graue Balken entspricht 140 µm.

#### 3.1.2.4 Stadium E13.5

Im Stadium E13.5 hat sich das asymmetrische Gefäßsystem etabliert. Der Aortenbogen ist voll ausgebildet und verbindet die Aorta ascendens mit der Aorta descendens und kreuzt hierbei die Mittellinie. Die rechte A. carotis entspringt dem Truncus brachiocephalicus, die linke dem Aortenbogen (*siehe Abbildung 3.10*).



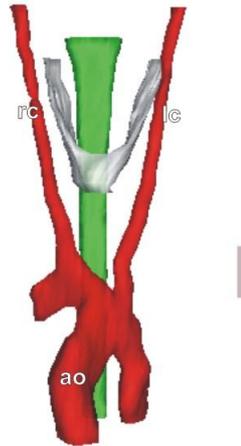
**Abbildung 3.10: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse im Stadium E13.5.**

Die Schilddrüse ist aus 2 über den Isthmus verbundenen Lappen aufgebaut. Grau: Schilddrüse, rot: Gefäße, grün: Pharynx, Ao: Aorta ascendens, lc: linke A. carotis, rc: rechte A. carotis. Der graue Balken entspricht 140 µm.

Die Schilddrüsenmorphologie hat im Vergleich zu Stadium E12.5 einen deutlichen Wandel durchlaufen. Sie ist nun aus 2 deutlich ausgebildeten Lappen aufgebaut, die kaudal über den Isthmus verbunden sind. Dieser hat nun den Kontakt zum Aortenbogen verloren, gleichzeitig erstrecken sich die Schilddrüsenlappen symmetrisch entlang der Karotiden (*siehe Abbildung 3.10*).

### 3.1.2.5 Stadium E14.5

Im Stadium E14.5 sind nur wenige morphologische Veränderungen gegenüber dem Stadium E13.5 zu beobachten. Das Gefäßsystem ist asymmetrisch aufgebaut, die Schilddrüse besteht aus 2 kaudal über einen Isthmus verbundene, langgestreckte Lappen. Die Schilddrüse zeigt im Vergleich zum Stadium E13.5 ein deutliches Größenwachstum mit einer Ausdehnung der Schilddrüsenlappen nach weiter kranial (*siehe Abbildung 3.11*).



**Abbildung 3.11: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse im Stadium E14.5.**

Die Schilddrüse als zweilappiges Organ spannt sich symmetrisch zwischen den Karotiden auf. Grau: Schilddrüse, rot: Gefäße, grün: Pharynx Ao: Aorta ascendens, lc: linke A. carotis, rc: rechte A. carotis. der graue Balken dient als Maßstab (140 µm).

## **3.2 Die Entwicklung der Schilddrüse in homozygoten Dsh/Dsh-Embryonen**

Der Dsh-Mausstamm ist eine durch Bestrahlung induzierte Mausmutante, bei der auf Grund einer den Shh-Genlocus betreffenden Inversion im homozygoten Zustand eine Defizienz für Shh besteht [45]. In Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Mundlos (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) ist eine Hemiagenese der Schilddrüse in den homozygoten Embryonen beobachtet worden.

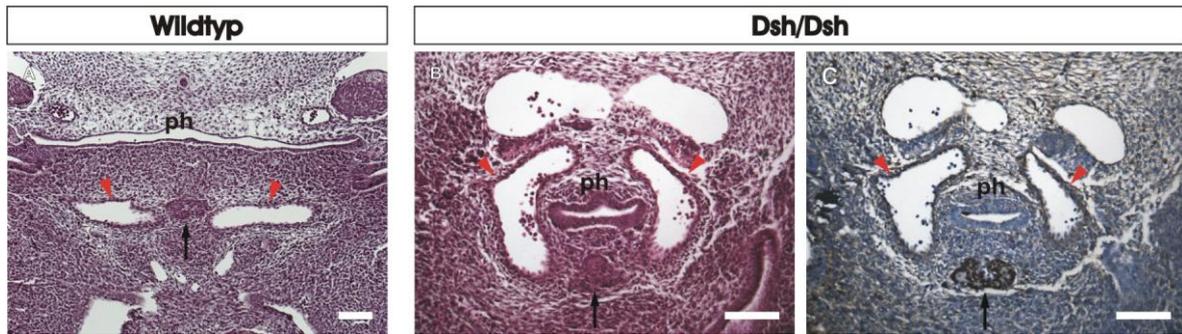
Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie die Schilddrüsenentwicklung in Dsh-homozygoten Embryonen verläuft und zu welchem Zeitpunkt während der Entwicklung die Dysgenese auftritt.

### **3.2.1 Histologie**

#### **3.2.1.1 Stadium E11.5**

Auf Transversalschnitten von Dsh/Dsh-Embryonen stellt sich die Schilddrüse im Stadium E11.5 als rundlich-ovale Struktur dar, die sich auf Grund der größeren Zelldichte und abgerundeten Zellform deutlich vom Umgebungsgewebe abgrenzt und in der Nkx2.1-Antikörperfärbung positiv reagiert. Im kaudalen Anteil steht das Schilddrüsenprimordium in engem Kontakt zu den symmetrisch angeordneten Kiemenbogenarterien sowie der ventralen Aorta.

Außerdem zeigt sich histologisch im Vergleich mit Wildtyp-Embryonen eine veränderte Morphologie des Vorderdarms: Die im Vergleich zum Wildtyp-Embryo schmale Ausdehnung und das hohe Epithel des Pharynx vermittelt einen ösophagus-ähnlichen Charakter. Dorsal des Pharynx und der Kiemenbogenarterien stellen sich große, mit Erythrozyten gefüllte Hohlräume dar, die den Vv. jugulares der Wildtypembryonen entsprechen (*siehe Abbildung 3.12*).



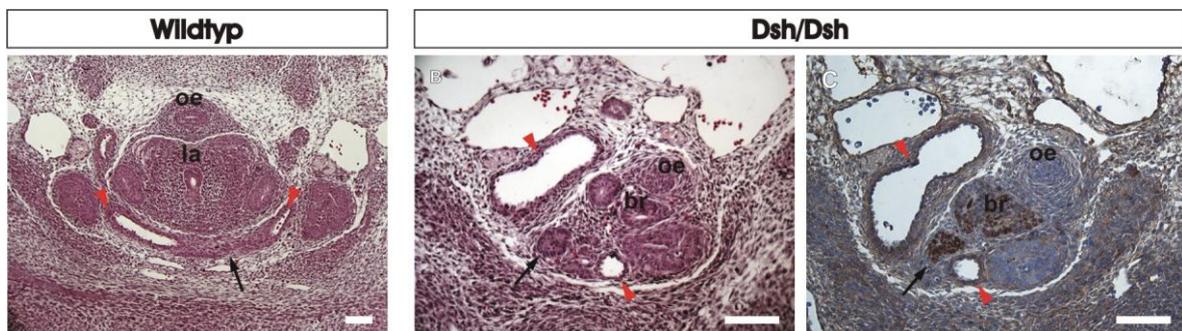
**Abbildung 3.12: Histologie der Schilddrüse in Dsh/Dsh-Embryonen des Stadium E11.5.**

Die Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E12.5 ist in der Mittellinie positioniert. (A), (B) HE-Färbung bzw. (C) Nkx2.1-Antikörperfärbung der Schilddrüsenregion. Oben entspricht im Embryo dorsal, links entspricht anatomisch rechts. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse, rote Pfeilspitze: Gefäß, ph: Pharynx, der weiße Balken entspricht 100 µm

### 3.2.1.2 Stadium E12.5

Im Stadium E12.5 ist in der Schilddrüsenmorphologie ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp- und Dsh/Dsh-Embryonen nachweisbar. Im Gegensatz zur Wildtyp-Schilddrüse, die sich nach lateral ausbreitet, bildet die Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen weiterhin eine kompakte rundliche Masse, die lateral der Mittellinie positioniert ist, ventrolateral zu Bronchen und Ösophagus. In der Nkx2.1-Antikörperfärbung stellen sich neben der Schilddrüse auch die Ultimobronchialkörper positiv dar. Im Vergleich zum Wildtyp weist die Schilddrüse eine in der rechts-links Achse, wie auch anterior-posterioren Achse veränderte Position im Embryo auf.

Histologisch auffällig ist des Weiteren der gestörte Wandaufbau von Bronchen und Ösophagus ohne bzw. mit minimalem Lumen. Der Aortenbogen liegt auf der rechten Seite des Embryos (siehe Abbildung 3.13).



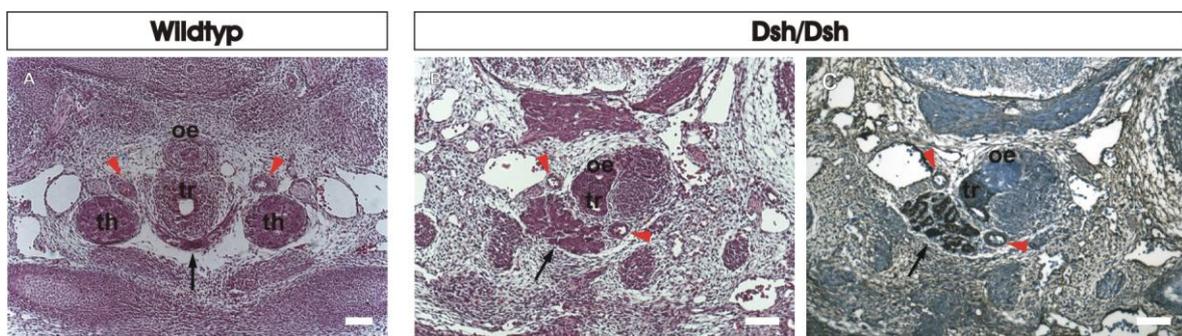
**Abbildung 3.13: Histologie der Schilddrüse im Dsh/Dsh-Embryo des Stadium E12.5.**

Die Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E12.5 ist asymmetrisch aufgebaut und rechts der Mittellinie positioniert. (A), (B) HE-Färbung bzw. (C) Nkx2.1-Antikörperfärbung der Schilddrüsenregion. Oben entspricht im Embryo dorsal, links entspricht anatomisch rechts. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse, rote Pfeilspitze: Gefäß, br: Bronchen, la: Larynx, oe: Ösophagus, der weiße Balken entspricht 100 µm.

### 3.2.1.3 Stadium E13.5

Die Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E13.5 ist im Vergleich mit dem vorangegangenen Stadium weiter kranial im Embryo positioniert. Sie besteht aus nur einem Lappen und ist ventrolateral der Trachea und des Ösophagus lokalisiert. Histologisch sind deutlich follikuläre Strukturen erkennbar.

Trachea und Ösophagus sind verbunden, der Wandaufbau beider Strukturen ist im Vergleich zu Wildtypembryonen deutlich gestört. Die Aa. carotideae sind asymmetrisch angeordnet und ventromedial sowie dorsal der Schilddrüse lokalisiert (*siehe Abbildung 3.14*).



**Abbildung 3.14: Histologie der Schilddrüse im Dsh/Dsh-Embryo des Stadium E13.5.**

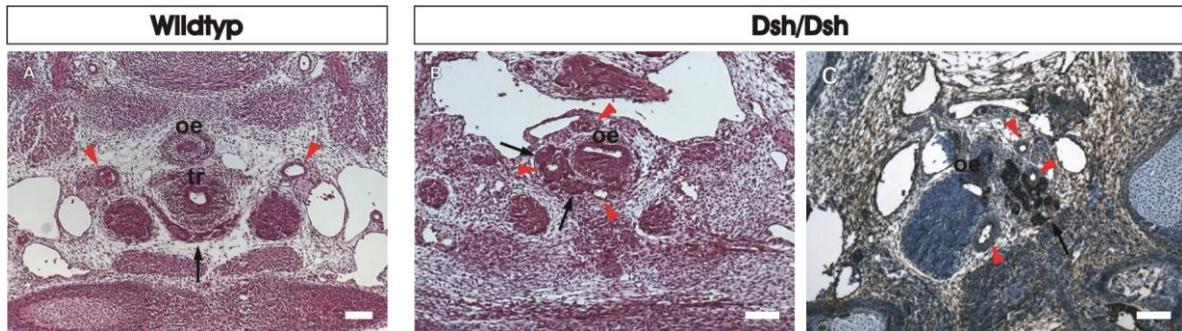
Die Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E13.5 ist asymmetrisch aufgebaut und rechts der Mittellinie positioniert. (A), (B) HE-Färbung bzw. (C) Nkx2.1-Antikörperfärbung der Schilddrüsenregion. Oben entspricht im Embryo dorsal, links entspricht anatomisch rechts. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse, rote Pfeilspitze: Gefäß, ph: Pharynx, der weiße Balken entspricht 100 µm

### 3.2.1.4 Stadium E14.5

Wie auch in der Schilddrüsenentwicklung in Wildtypembryonen sind in Dsh/Dsh-Embryonen histologisch nur wenige morphologische Veränderungen zwischen den Stadien E13.5 und E14.5 nachweisbar. Die Schilddrüse ist weiterhin aus nur einem Lappen aufgebaut, der lateral der Mittellinie lokalisiert ist. Bei insgesamt 8 untersuchten Embryonen der Stadien E13.5 und E14.5 war die Schilddrüse insgesamt 7-mal rechtsseitig und einmal linksseitig positioniert.

Ösophagus und Trachea sind nicht als getrennte Strukturen nachweisbar, möglicherweise besteht wie in den Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen eine Verschmelzung der beiden Strukturen [40]. Das Epithel dieser gemeinsamen Röhre ähnelt morphologisch dem der Trachea in Wildtyp-Embryonen. Ventromedial sowie dorsal der Schilddrüse sind wiederum 2 arterielle Gefäße lokalisiert, zusätzlich jedoch ist in den Embryonen ein im

Durchmesser kleineres 3. Gefäß nachweisbar, das durch das Schilddrüsenparenchym verläuft (siehe Abbildung 3.15).



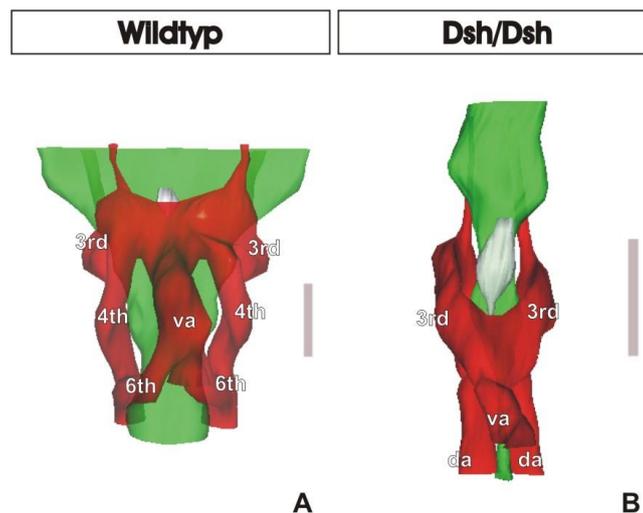
**Abbildung 3.15: Histologie der Schilddrüse im Dsh/Dsh-Embryo des Stadium E14.5.**

Die Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E14.5 ist asymmetrisch aufgebaut und lateral der Mittellinie positioniert. (C) In einem der untersuchten Embryonen war die Schilddrüse linksseitig positioniert. (A), (B) HE-Färbung bzw. (C) Nkx2.1-Antikörperfärbung der Schilddrüsenregion. Oben entspricht im Embryo dorsal, links entspricht anatomisch rechts. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse, rote Pfeilspitze: Gefäß, ph: Pharynx, der weiße Balken entspricht 100 µm

### 3.2.2 3-dimensionale Rekonstruktion

Zur besseren Anschaulichkeit und Darstellung der räumlichen Beziehung von Schilddrüse und arteriellen Gefäßen in den Dsh/Dsh-Embryonen erfolgte die 3-dimensionale Rekonstruktion in den Stadien E11.5 bis E14.5. Der Pharynx bzw. Ösophagus dient hierbei als Mittellinienstruktur zur Orientierung und ist grün dargestellt, die Gefäße sind rot und die Schilddrüse grau dargestellt.

#### 3.2.2.1 Stadium E11.5

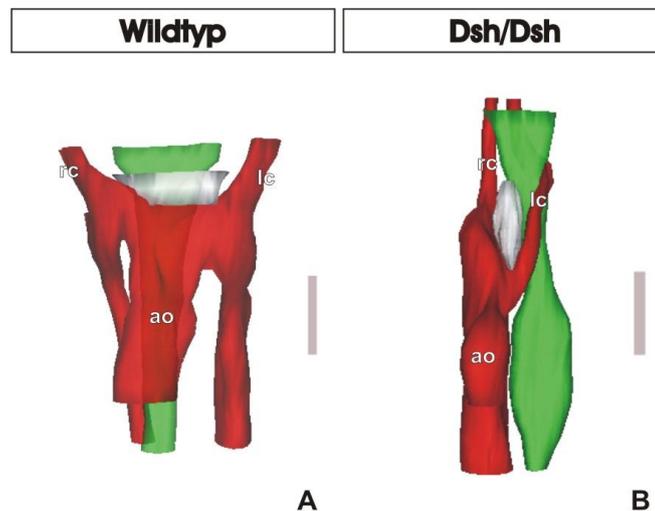


**Abbildung 3.16: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E11.5.**

Das Schilddrüsenprimordium liegt in der Mittellinie am Ausflusstrakt des Herzens. Grau: Schilddrüse, rot: Gefäße, grün: Pharynx, 3rd/4th/6th: 3./4./6. Kiemenbogenarterie, Ad: Aorta dorsalis, va: ventrale Aorta. Der graue Balken dient als Maßstab (140 µm).

Im Vergleich des Gefäßsystems von Dsh/Dsh- und Wildtyp-Embryonen fällt insbesondere die unterschiedliche Anzahl der Kiemenbogenarterien auf. Im Dsh/Dsh-Embryo verbindet pro Seite nur 1 Kiemenbogenarterie die ventrale Aorta mit den symmetrisch angeordneten dorsalen Aorten. Auf Grund von Erkenntnissen aus Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um die 3. Kiemenbogenarterien handelt [41]. Die Schilddrüse als ellipsenförmige Struktur ist in der Mittellinie ventral des Ösophagus lokalisiert und steht in Kontakt mit dem Ausflusstrakt des Herzens (*siehe Abbildung 3.16*).

### 3.2.2.2 Stadium E12.5



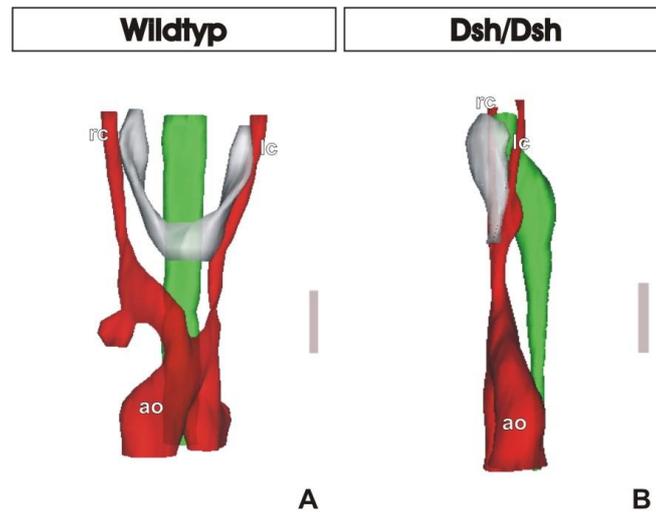
**Abbildung 3.17: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E12.5.**

Das Schilddrüsenprimordium liegt lateral der Mittellinie am Aortenbogen zwischen den fehllokalisierten Karotiden. Grau: Schilddrüse, rot: Gefäße, grün: Pharynx, Ao: Aorta ascendens, lc: linke A. carotis, rc: rechte A. carotis. Der graue Balken dient als Maßstab (140 µm).

Im Stadium E12.5 beginnt in den Wildtyp-Embryonen die Ausbildung des asymmetrischen Gefäßsystems mit Ausbildung des Aortenbogens und des Truncus brachiocephalicus. In den Dsh/Dsh-Embryonen erscheint diese Umwandlung verändert. Der Aortenbogen ist rechtsseitig lokalisiert und kreuzt nicht die Mittellinie. Da im Stadium E11.5 keine 4. Kiemenbogenarterie ausgebildet worden ist, geht der Aortenbogen, wie auch für die Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen beschrieben, aus der rechten 3. Kiemenbogenarterie hervor [41]. Die Schilddrüse zeigt kein Wachstum nach lateral mit Ausbildung zweier Lappen, sondern ihre Position im Embryo erfährt eine Veränderung aus der Mittellinie nach lateral. Dort liegt die Schilddrüse als noch immer einlappiges,

kompaktes Organ zwischen den beiden Karotiden, die im Vergleich mit dem Wildtyp fehllokalisiert und asymmetrisch angeordnet sind (siehe Abbildung 3.17).

### 3.2.2.3 Stadium E13.5



**Abbildung 3.18: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse der Dsh/Dsh–Embryonen im Stadium E13.5.**

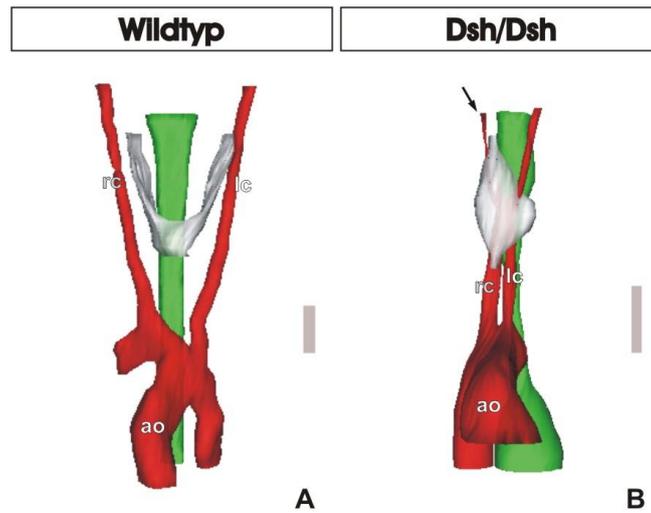
Das Schilddrüsenprimordium liegt lateral der Mittellinie zwischen den fehllokalisierten Karotiden. Grau: Schilddrüse, rot: Gefäße, grün: Pharynx, Ao: Aorta ascendens, lc: linke A. carotis, rc: rechte A. carotis. Der graue Balken dient als Maßstab (140 µm).

Wie im Stadium E12.5 ist die Schilddrüse im Stadium E13.5 ein einlappiges Organ, das aus der Mittellinie nach lateral verlagert ist. Es liegt in enger Nachbarschaft zu den beiden Karotiden. Gegenüber dem Stadium E12.5 hat sie den Kontakt zum Aortenbogen verloren und ist nun weiter kranial positioniert.

Der Aufbau des Gefäßsystems ist wie auch im Vorstadium gestört. Der Aortenbogen geht aus dem Truncus arteriosus hervor, kreuzt im Gegensatz zu den Wildtypembryonen jedoch nicht die Mittellinie, sondern mündet in eine rechtsseitig verlaufende Aorta descendens (siehe Abbildung 3.18).

### 3.2.2.4 Stadium E14.5

Die Morphologie und Position der Schilddrüse im Stadium E14.5 entspricht weitgehend den Verhältnissen im Vorstadium. Allerdings hat sich ein weiteres, kleinlumiges arterielles Gefäß entwickelt, das das Schilddrüsenparenchym durchdringt.



**Abbildung 3.19: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse der Dsh/Dsh–Embryonen im Stadium E14.5.**

Gefäße, grün: Pharynx, Ao: Aorta ascendens, schwarzer Pfeil: neu aufgetretenes, 3. Gefäß. lc: linke A. carotis, rc: rechte A. carotis. Der graue Balken dient als Maßstab (140 μm).

Bei insgesamt 8 untersuchten Dsh/Dsh - Embryonen der Stadien E13.5 und E14.5 war die Schilddrüse in 7 Embryonen rechtsseitig und in 1 Embryo linksseitig lokalisiert.

### **3.3 Die Morphologie der Schilddrüse in Dsh/Dsh Xt<sup>J</sup>/Xt<sup>J</sup> doppelt homozygoten Embryonen im Stadium E13.5**

Homozygote Dsh-Embryonen sind ebenso wie die Shh-knockout-Mäuse Shh-defizient und die Embryonen zeigen einen nahezu identischen Phänotyp, der unter anderem schwerwiegende Fehlbildungen der Extremitäten, aber auch von Trachea und Ösophagus umfasst [40, 45]. Die Verkreuzung der Shh-knockout-Mäusen mit Gli3-defizienten Mäusen (Xt<sup>J</sup>) konnte den Phänotyp der Shh<sup>-/-</sup> Embryonen in Teilaspekten kompensieren. Bezüglich der Entwicklung von Extremitäten und ZNS konnte eine Morphologie erreicht werden, die entweder der Situation im Wildtyp oder der von Gli3<sup>-/-</sup>-Embryonen entspricht [44, 63].

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Dsh-Stamm mit dem Xt<sup>J</sup>-Stamm verkreuzt. Durch Verkreuzung von Dsh/+, Xt<sup>J</sup>/+ - Individuen wurden doppelt homozygote Embryonen (Dsh/Dsh Xt<sup>J</sup>/Xt<sup>J</sup>) generiert und im Stadium E13.5 untersucht. Dieses Stadium wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die Entwicklung des asymmetrischen Gefäßsystems nahezu abgeschlossen ist und die Schilddrüse in Wildtyp-Embryonen bereits eine Morphologie und Position ähnlich der adulten Schilddrüse zeigt (*siehe Kapitel 3.1*). Außerdem war in diesem Entwicklungsstadium der gestörte Aufbau des arteriellen Gefäßsystems und die Asymmetrie von Schilddrüse in allen untersuchten Dsh-homozygoten Embryonen nachweisbar (*siehe Kapitel 3.2*). Eine Untersuchung der Embryonen in älteren Stadien war aufgrund einer erhöhten intrauterinen Letalität nicht möglich.

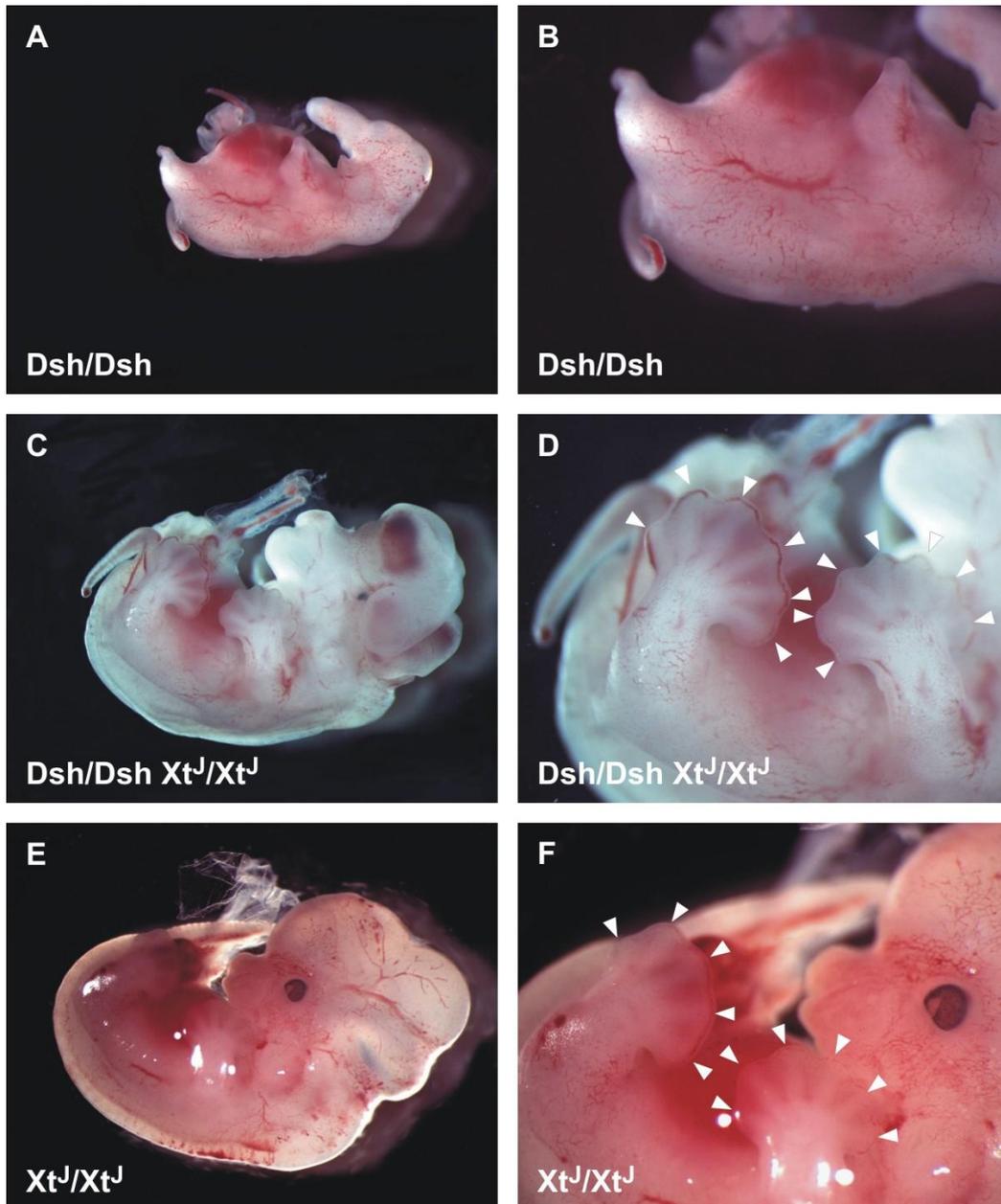
#### **3.3.1 Phänotyp der doppelt homozygoten Mausembryonen**

Bei der phänotypischen Betrachtung der Mausembryonen im Stadium E13.5 waren die Dsh/Dsh Xt<sup>J</sup>/Xt<sup>J</sup>-Embryonen deutlich größer als die Dsh/Dsh-Embryonen und entsprachen in ihrer Größe annähernd der Xt<sup>J</sup>/Xt<sup>J</sup>-Embryonen.

Im Bereich des Kopfes besteht ein Defekt der Schädeldecke. Der für die Dsh/Dsh-Mäuse charakteristische Rüssel (Proboscis) ist nicht vorhanden. Stattdessen sind Maul sowie Nase identifizierbar. Zwar sind die Augenanlagen deutlich kleiner als in Wildtyp- und Xt<sup>J</sup>/Xt<sup>J</sup>-Embryonen, aber im Gegensatz zur Zyklopie der Dsh/Dsh-Embryonen sind die Augenanlagen symmetrisch vorhanden und orthotop positioniert. Wie in der Literatur beschrieben, zeigen die Dsh/Dsh-Embryonen im Bereich der Extremitäten deutliche Fehlbildungen, vor allem der distalen Anteile (Unterarm bzw. -schenkel und Hand bzw.

Fuß) [45].  $Dsh/Dsh Xt^J/Xt^J$ -Embryonen hingegen haben komplette Extremitäten, die im Bereich von Hand und Fuß eine Polydaktylie ähnlich der der  $Xt^J/Xt^J$ -Embryonen aufweisen (siehe Abbildung 3.20).

Analog zu den oben beschriebenen Beispielen der  $Shh^{-/-} Gli3^{-/-}$ -Verkreuzungen scheint der ausgeprägte Phänotyp der  $Dsh/Dsh$  Embryonen durch das Einkreuzen der  $Gli3$ -Defizienz kompensiert zu werden.

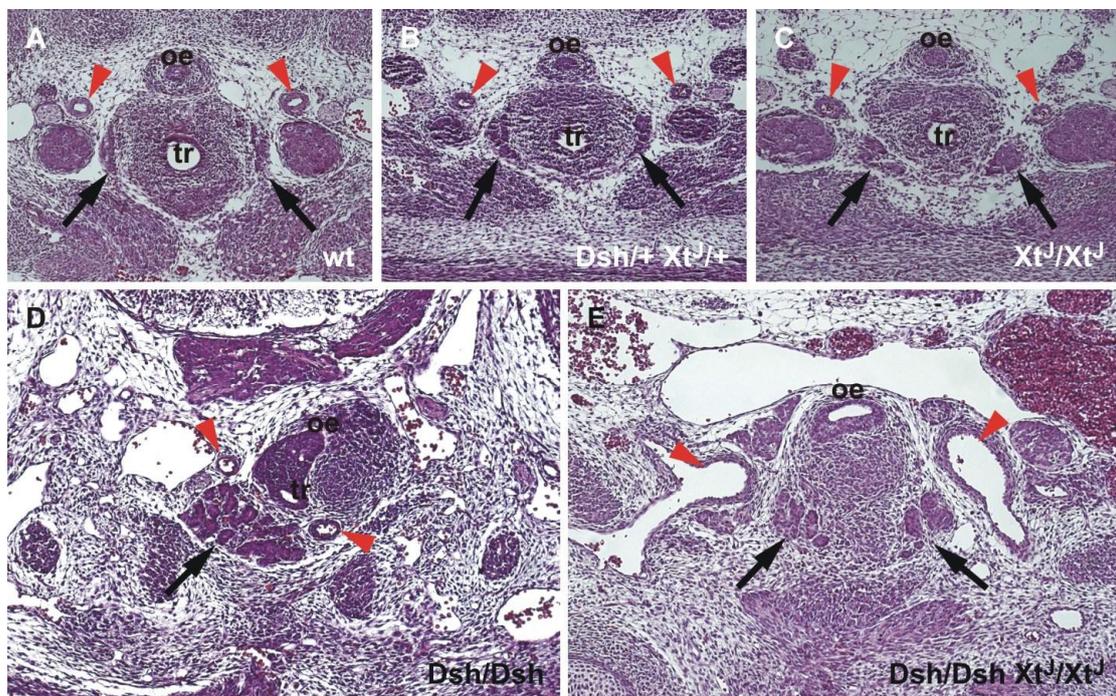


**Abbildung 3.20: Phänotyp der  $Dsh/Dsh$ ,  $Dsh/Dsh Xt^J/Xt^J$  und  $Xt^J/Xt^J$  –Embryonen im Stadium E13.5** (A,C und E): laterale Ansicht bei 1-facher Vergrößerung, (B,D und F): laterale Ansicht der Extremitäten bei 2-facher Vergrößerung. (C, D) Die  $Dsh/Dsh Xt^J/Xt^J$ -Embryonen zeigen einen Defekt der Schädeldecke, eine annähernd normale Gesichtsmorphologie sowie eine Polydaktylie der vorderen und hinteren Extremität. Die weißen Pfeilspitzen markieren die einzelnen Finger bzw. Zehen.

### 3.3.2 Histologie

Zur Beurteilung der Schilddrüsenmorphologie wurden transversale Gewebeschnitte in Paraffin eingebetteter Embryonen des Stadium E13.5 angefertigt, die im Anschluss mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt wurden.

Dsh/+ XtJ/+ sowie Xt<sup>J</sup>/Xt<sup>J</sup> -Embryonen zeigen histologisch eine dem Wildtyp entsprechende Schilddrüsenmorphologie. Die Schilddrüse ist orthotop im Bereich des Halses lokalisiert und besteht aus 2 symmetrisch angeordneten Lappen, die lateral der Trachea in Nachbarschaft zu den Karotiden lokalisiert sind. Kaudal sind die Schilddrüsenlappen über den Isthmus verbunden.



**Abbildung 3.21: Histologische Darstellung der Schilddrüse im Stadium E13.5 in Wildtyp-Embryonen sowie doppelten Verkreuzungen von Dsh mit Xt<sup>J</sup>.**

HE-gefärbte Transversalschnitte der Schilddrüsenregion. Die Schilddrüse der Dsh/Dsh Xt<sup>J</sup>/Xt<sup>J</sup>-Embryonen ist symmetrisch aufgebaut und in Nachbarschaft der Karotiden gelegen. (A) Wildtyp-, (B) Dsh/Xt<sup>J</sup>, (C) Xt<sup>J</sup>/Xt<sup>J</sup>, (D) Dsh/Dsh, (E) Dsh/Dsh Xt<sup>J</sup>/Xt<sup>J</sup>-Embryo. Oben ist im Embryo dorsal, links entspricht anatomisch rechts. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse, rote Pfeilspitzen: A. carotis, oe: Ösophagus, tr: Trachea.

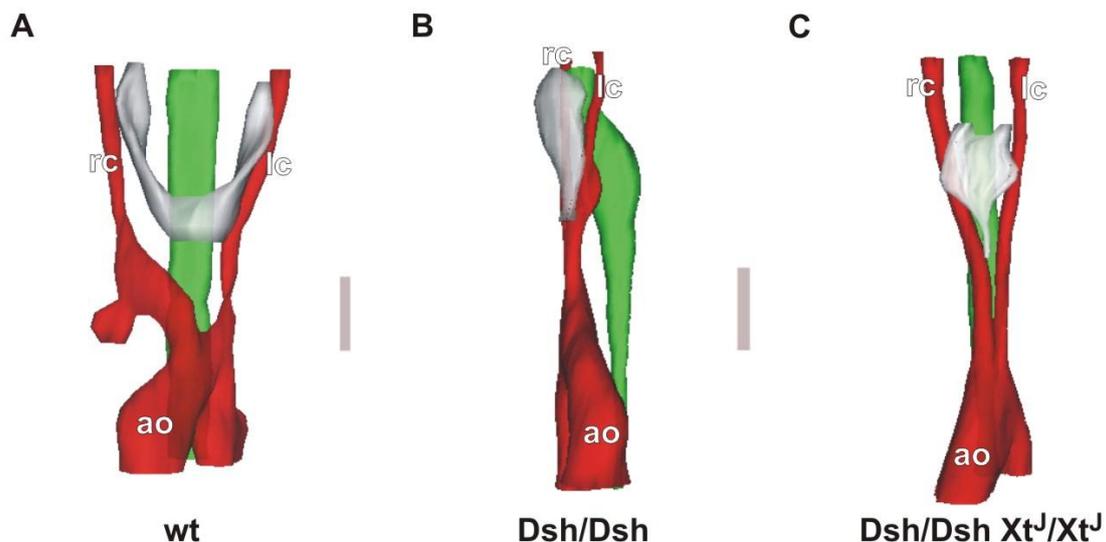
Wie bereits in Kapitel 3.2 dargestellt, besteht die Schilddrüse der Dsh/Dsh homozygoten Embryonen aus nur einem Lappen, welcher dystop lateral der Mittellinie positioniert ist, in engem Kontakt zu den ebenfalls fehllokalisierten Karotiden. Im Vergleich mit dem Dsh/Dsh-Phänotyp wird deutlich, dass die bei Shh-Defizienz gleichzeitig bestehende Defizienz für Gli3 zu einer Wiederherstellung der Symmetrie in der Schilddrüsenregion führt. Der Ösophagus ist in der Mittellinie lokalisiert und die

Schilddrüse symmetrisch angelegt. Sie besteht aus 2 Lappen, die kaudal über einen breiten Isthmus verbunden sind. Gegenüber Wildtyp-Embryonen sind die Schilddrüsenlappen verkleinert. Die Schilddrüse liegt in enger Nachbarschaft zu den symmetrisch lokalisierten Karotiden. Die doppelt homozygoten Embryonen weisen weiterhin Defekte im Bereich der Trachea auf.

Insgesamt wurden 4  $Dsh/Dsh Xt^J/Xt^J$  Embryonen untersucht, die alle eine identische Schilddrüsenmorphologie zeigten.

### 3.3.3 3-dimensionale Rekonstruktion

Zur besseren Veranschaulichung der Morphologie der Schilddrüse sowie des Aufbaus des arteriellen Gefäßsystems erfolgte die 3-dimensionale Rekonstruktion anhand transversaler Gewebedünnschnitte von  $Dsh/Dsh Xt^J/Xt^J$ -Embryonen.



**Abbildung 3.22: 3-dimensionale Darstellung der Schilddrüsenmorphologie sowie der Gefäße im Stadium E13.5 im  $Dsh/Dsh Xt^J/Xt^J$ -Embryonen.**

Die gleichzeitige Defizienz für *Shh* und *Gli3* führt zu einer Wiederherstellung einer symmetrisch ausgebildeten Schilddrüse in Nachbarschaft zu symmetrisch angeordneten Aa. carotidae. (A) Wildtyp-, (B)  $Dsh/Dsh$ -, (C)  $Dsh/Dsh Xt^J/Xt^J$ -Embryo. Grau: Schilddrüse, rot: Gefäße, grün: Ösophagus, der graue Balken entspricht 140µm.

Die 3-dimensionale Darstellung der großen arteriellen Gefäße, des Ösophagus und der Schilddrüse der  $Dsh/Dsh Xt^J/Xt^J$ -Embryonen bestätigt den auf Grund der histologischen Darstellung gewonnenen Eindruck einer erhaltenen Symmetrie im Bereich der Halsregion. Im Bereich der Gefäße ist ein Aortenbogen zu sehen, der die Mittellinie kreuzt und in eine linksseitig gelegene Aorta descendens übergeht. Dies entspricht der Situation im

Wildtyp-Embryo. Auch stellen sich 2 symmetrisch gelegene zervikale Gefäße, die Karotiden, dar, die im Vergleich zum Wildtyp-Embryo jedoch weiter medial gelegen sind. Die Schilddrüse ist symmetrisch aufgebaut, aber nicht normal wie in Wildtyp-Embryonen lateralisiert. Sie befindet sich dennoch in engem Kontakt zu den beiden Karotiden und spannt sich zwischen diesen auf (*siehe Abbildung 3.22*).

### **3.4 Die Expression schilddrüsenspezifischer Transkriptionsfaktoren in Dsh/Dsh-Embryonen**

Dsh/Dsh-Embryonen sind defizient für Shh. Die Asymmetrie und somit dystope Position der Schilddrüse zeigt sich erstmals im Stadium E12.5. Um zu überprüfen, ob Shh oder sein Rezeptor Ptch1 zu dem Zeitpunkt in der Schilddrüse exprimiert sind, wurde die Expression im Stadium E12.5 überprüft. Um außerdem zu klären, ob in Folge der Shh-Defizienz die zellautonome Regulation der Morphogenese durch eine veränderte Expression der Transkriptionsfaktoren Nkx2.1, Pax8 oder Foxe1 gestört ist, wurde deren Expression in den Stadien E10.5 -12.5 untersucht.

Ein Standardverfahren, um die Expression eines Gens in Geweben nachzuweisen, ist der Nachweis der mRNA im Embryo mittels in-situ-Hybridisierung. Im Stadium E10.5 und E11.5 erfolgte diese in ganzen Embryonen (whole-mount) mit DIG-markierten Sonden, ab dem Stadium E12.5 auf Gewebedünnschnitten von in Paraffin eingebetteten Embryonen mit radioaktiv markierten Sonden. In der whole-mount in-situ-Hybridisierung kommt es methodisch bedingt bei der Mehrheit der Sonden, auch sense-orientierten Proben, zu einer unspezifischen Anfärbung des IV. Ventrikels. Dies kann durch manuelles Eröffnen vor Beginn der Hybridisierung vermieden werden. Um die Morphologie der Dsh-homozygoten Embryonen zu bewahren, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur bei Wildtypembryonen der IV. Ventrikel eröffnet.

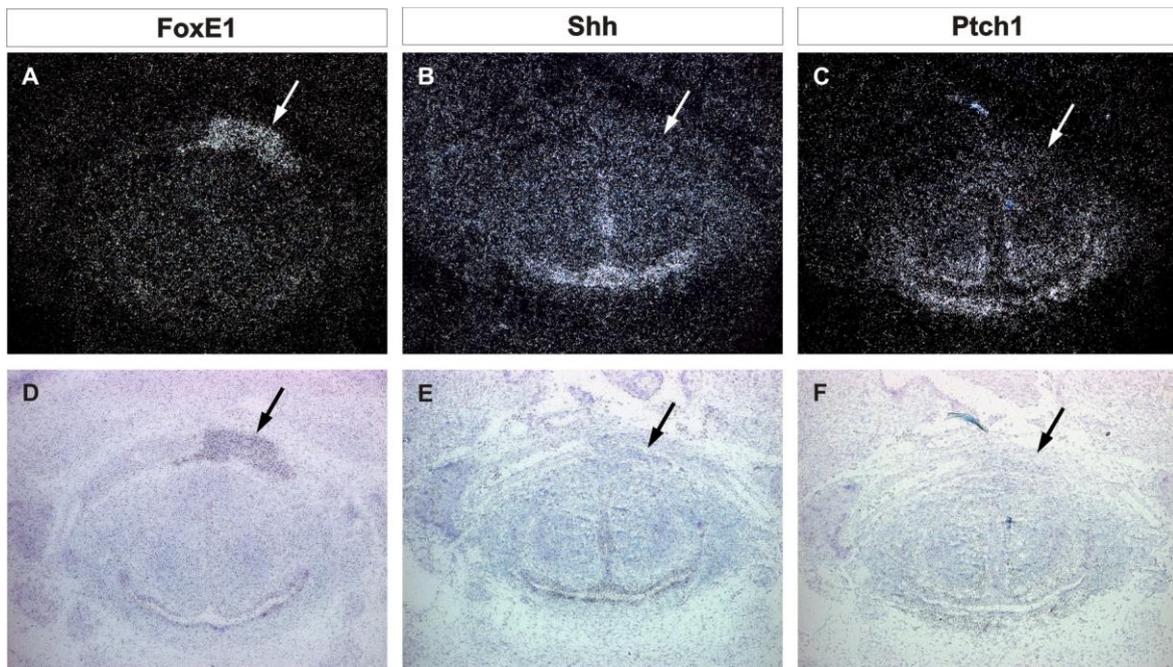
Die Auswertung der radioaktiven in-situ-Hybridisierung erfolgt mittels Hell- und Dunkelfeldmikroskopie. Die Gegenfärbung der Schnitte mit Toluidinblau ermöglicht im Hellfeld die Identifikation anatomischer Strukturen. Im Dunkelfeld stellt sich ein positives Signal als dichte, weiße Körnung dar.

#### **3.4.1 Shh und Ptch1**

Die Expression von Shh und Ptch wurde im Stadium E12.5, in dem erstmalig die gestörte Morphogenese der Schilddrüse nachweisbar ist, mittels radioaktiver in-situ-Hybridisierung überprüft.

Wie in Literatur und Datenbanken beschrieben, zeigen sich sowohl eine Shh-Expression im Epithel des Larynx als auch eine Ptch1-Expression im angrenzenden Mesenchym und dienen daher als Positivkontrolle für die Sonden [64].

In der Schilddrüse ist weder eine Expression von Shh noch von Ptch1 im Stadium E12.5 nachweisbar.



**Abbildung 3.23: Expression von Shh und Ptch1 in der Schilddrüsenregion im Stadium E12.5.**

Weder Shh noch Ptch1 sind in der Schilddrüse exprimiert. (A,D) Foxe1, (B,E) Shh, (C,F), Ptch1, (A) – (C) Dunkelfeldaufnahme, (D) – (F) Hellfeldaufnahme. Schwarzer Pfeil: Schilddrüse

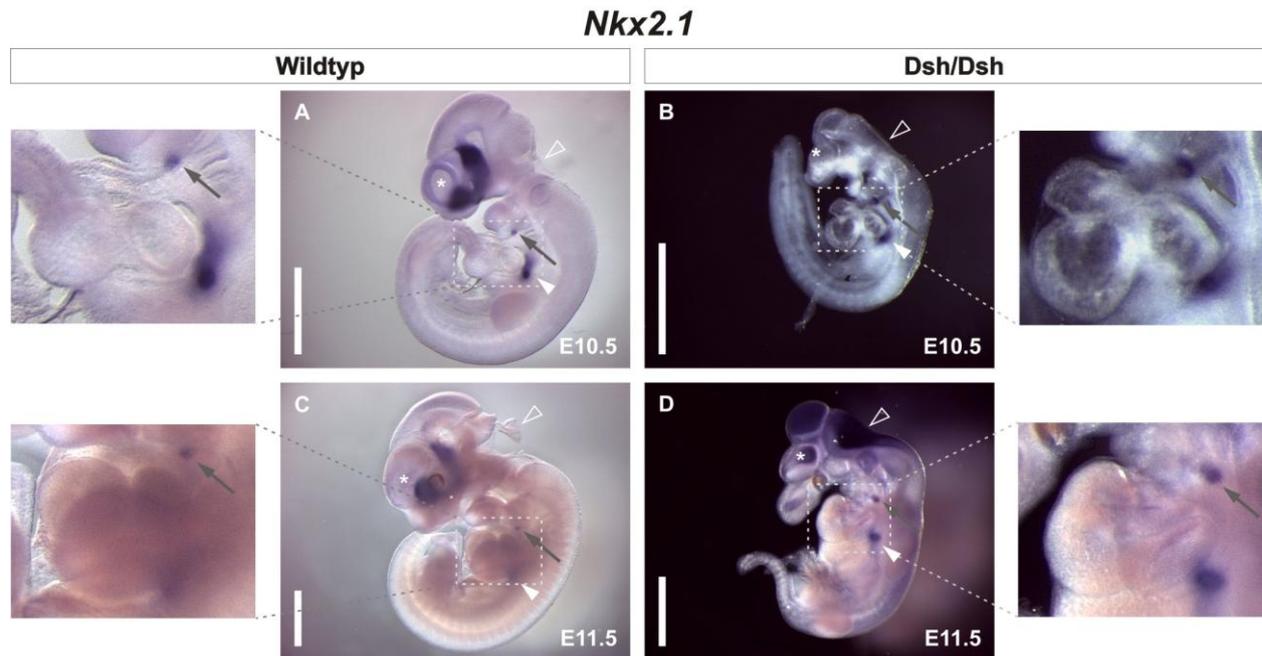
### 3.4.2 Nkx2.1

Nkx2.1 ist während der gesamten Entwicklung in der Schilddrüse exprimiert. Außerdem ist Nkx2.1 während der Embryonalentwicklung im Bereich der Lunge und des Vorderhirns exprimiert [65].

Die Sonde für Nkx2.1 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu generiert. Die whole-mount in-situ-Hybridisierung in Wildtypembryonen der Stadien E10.5 und E11.5 zeigt das erwartete Expressionsmuster von Nkx2.1 in der Schilddrüsenanlage, der Lungenanlage und im Bereich des Vorderhirns und dient damit einerseits dem Nachweis der Sensitivität und Spezifität der Sonde und andererseits dem Vergleich mit den Dsh-homozygoten Embryonen.

Die Dsh-homozygoten Embryonen unterscheiden sich in den Stadien E10.5 und E11.5 phänotypisch deutlich von den Wildtyp-Embryonen. Sie sind kleiner als die Wildtypen, haben keine bzw. stark reduzierte Extremitäten und im Kopfbereich ist der sich entwickelnde Proboscis und eine Zyklopie erkennbar. Das Gehirn ist in der Größe reduziert. Das Telencephalon besteht aus einem einzelnen, in der Mittellinie gelegenen

Großhirnbläschen, wohingegen in Wildtypembryonen in diesem Stadium bereits zwei lateral gelegene Großhirnbläschen angelegt sind [35].



**Abbildung 3.24: Nkx2.1-Expression in Dsh/Dsh–Embryonen in den Stadien E10.5 und E11.5**

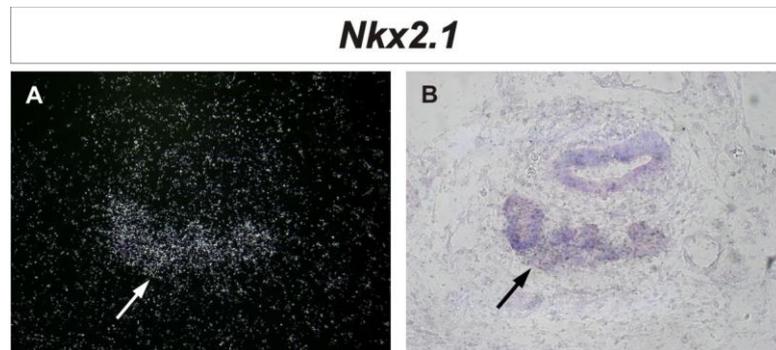
Nkx2.1 ist im Stadium E10.5 und E11.5 in der Lungenanlage, im Telencephalon und der Schilddrüse der Dsh/Dsh–Embryonen exprimiert. (A, C) Wildtypembryonen, (B, D) Dsh-homozygote Embryonen. Grauer Pfeil: Schilddrüse, weißer Pfeilkopf: Lunge, leerer Pfeilkopf: IV. Ventrikel, Stern: Telencephalon, weißer Balken: relativer Maßstab.

Mittels whole-mount in-situ-Hybridisierung ist eine Expression von Nkx2.1 in den homozygoten Dsh-Embryonen in diesen Stadien in mehreren Bereichen des Embryos nachweisbar:

- Im Bereich des Gehirns sind das Großhirnbläschen und der IV. Ventrikel positiv gefärbt. Im Stadium E10.5 ist die Färbung im Telencephalon nur schwach, im Stadium E11.5 hingegen stark. Die Färbung im Bereich des IV. Ventrikel ist unspezifisch (*siehe oben*).
- Die positiv gefärbte Struktur im Bereich des sich entwickelnden Vorderdarms, die kaudo-dorsal des Herzens gelegen ist, entspricht der Lungenanlage.
- Sowohl im Stadium E10.5 als auch E11.5 stellt sich eine Struktur im Bereich der Kiemenbögen, kranio-dorsal des Herzens gelegene Struktur deutlich positiv dar. Diese entspricht der Schilddrüse.

Im Stadium E13.5 wurde die Expression von Nkx2.1 in der Schilddrüse auf transversalen Gewebedünnschnitten überprüft. In der Hellfeldaufnahme ist die

Schilddrüse als einlappige, ventrolateral des Ösophagus gelegene Struktur mit sich entwickelndem follikulärem Aufbau zu erkennen. Im Dunkelfeld stellt sich eine deutliche Anreicherung des Signals im Bereich der Schilddrüse dar. Nkx2.1 ist also in der Schilddrüse im Stadium E13.5 exprimiert.



**Abbildung 3.25: Nkx2.1-Expression in der Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E13.5.** Die Pfeile markieren die Schilddrüse.

Zusätzlich zum Nachweis der Expression auf mRNA-Ebene erfolgte für Nkx2.1 außerdem ein Nachweis des Proteins mittels Immunhistochemie auf transversalen Gewebedünnschnitten der Schilddrüsenregion. Diese zeigt eine positive Färbung der Schilddrüse in den untersuchten Stadien E11.5 bis E14.5 (*siehe auch Kapitel 3.1.1 und 3.2.1*).

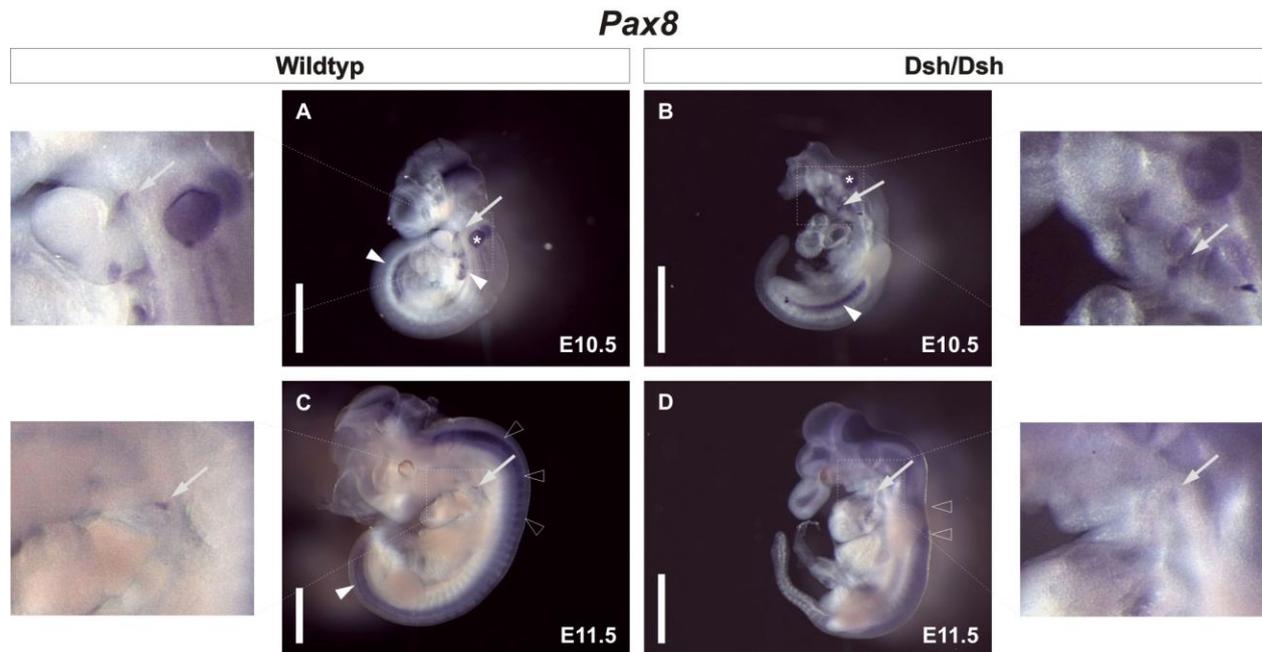
Die Nkx2.1-Expression in der Schilddrüse der Dsh/Dsh – Embryonen entspricht dem Wildtyp.

### 3.4.3 Pax8

Pax8 ist während der gesamten Embryonalentwicklung in der Schilddrüse exprimiert. Außerdem ist Pax8 im Stadium E10.5 im nephrogenen Mesenchym der Urniere (Mesonephros) exprimiert. Im Bereich des Nervensystems ist für das Stadium E11.5 eine Expression im Bereich des Myelencephalon und des Neuralrohrs beschrieben [10, 66].

Die Sonde für Pax8 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu generiert. Die whole-mount in-situ-Hybridisierung in Wildtypembryonen der Stadien E10.5 und E11.5 zeigt das erwartete Expressionsmuster von Pax8 in der Schilddrüsenanlage, im

nephrogenen Mesenchym und dem Neuralrohr. Des Weiteren zeigt sich insbesondere im Stadium E10.5 eine deutliche Expression im Bereich des otischen Vesikel.



○ **Abbildung 3.26: Pax8 Expression in Dsh/Dsh-Embryonen der Stadien E10.5 und E11.5.**

Pax8 ist im Stadium E10.5 und E11.5 in der Nierenanlage, dem zentralen Nervensystem und der Schilddrüse der Dsh-homozygoten Embryonen exprimiert. (A, C) Wildtypembryonen, (B, D) Dsh-homozygote Embryonen. Grauer Pfeil: Schilddrüse, weißer Pfeilkopf: Nierenanlage, leerer Pfeilkopf: ZNS, Stern: Ohrbläschen, weißer Balken: relativer Maßstab.

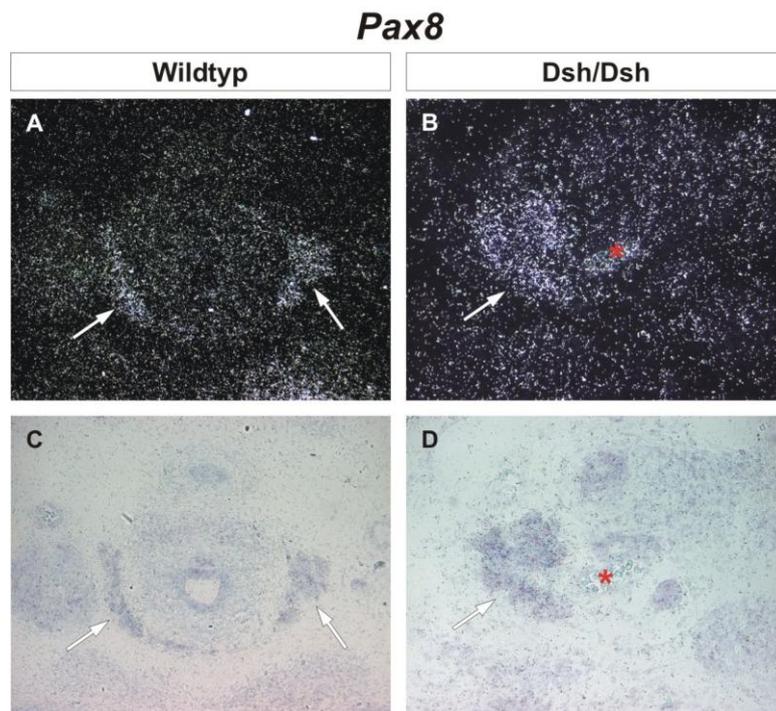
Die whole-mount in-situ-Hybridisierung zeigt in den Dsh-homozygoten Embryonen die Expression von Pax8 in mehreren Regionen des Embryos:

- Im kaudalen Anteil des Embryos färbt sich im Stadium E10.5 eine längliche Region positiv an, die ventral des Neuralrohres gelegen ist. Diese entspricht dem nephrogenen Mesenchym der Niere.
- Dorsal, auf Höhe der Kiemenbögen gelegen, ist im Stadium E10.5 eine runde Struktur positiv. Diese entspricht dem Ohrbläschen.
- Im Bereich des Nervensystems ist im Stadium E10.5 keine Expression nachweisbar. Jedoch kann aufgrund einer Schädigung des Embryos im kranialen Bereich des Kopfes keine Aussage über eine Expression in dieser Region gemacht werden. Im Stadium E11.5 ist im Neuralrohr eine leichte, gegenüber dem Wildtyp deutlich verminderte Expression nachweisbar. Die Anfärbung im Bereich des IV. Ventrikel ist unspezifisch.

- Im Bereich der Kiemenbögen stellt sich im Stadium E10.5 und E11.5 eine kleine, runde Struktur dar, die am Ausflusstrakt des Herzens lokalisiert ist. Diese entspricht der Schilddrüsenanlage.

Im Stadium E13.5 wurde die Expression von Pax8 in der Schilddrüse Dsh-homozygoter Embryonen auf transversalen Gewebedünnschnitten überprüft. In der Hellfeldaufnahme ist die Schilddrüse einlappig und deutlich lateral der Mittellinie positioniert. Im Dunkelfeld stellt sich eine deutliche Anreicherung des Signals im Bereich der Schilddrüse dar. Pax8 ist also im Stadium E13.5 in der Schilddrüse Dsh-homozygoter Embryonen exprimiert.

Eine weitere Signalanhebung ist über dem Lumen eines zur Schilddrüse benachbarten arteriellen Gefäßes zu beobachten. Dieses Signal wird durch dort gelegene Erythrozyten hervorgerufen und ist unspezifisch.



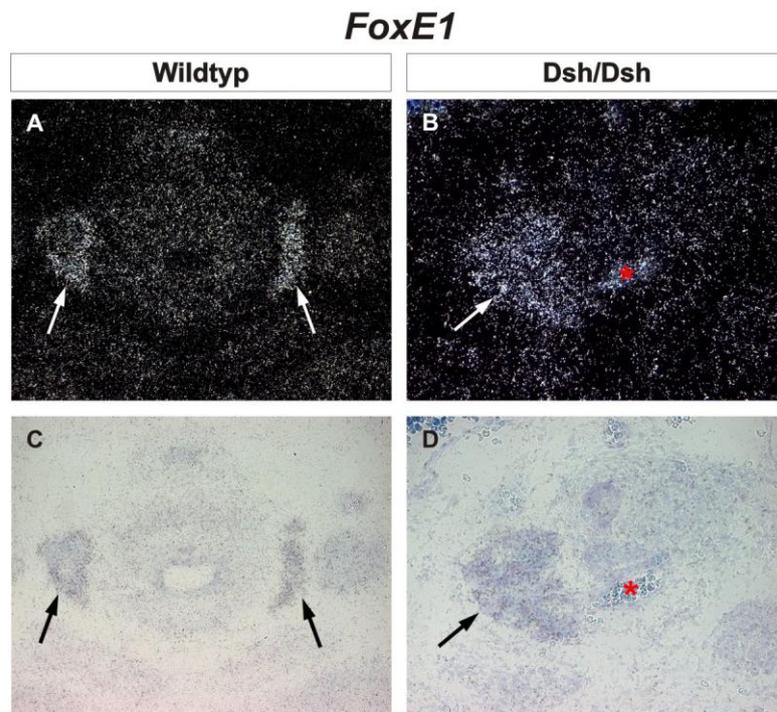
**Abbildung 3.27: Pax8 ist in der Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E13.5 exprimiert.** (A), (B) Dunkelfeldaufnahmen, (C), (D) dazugehörige Hellfeldaufnahmen. Die Pfeile markieren die Schilddrüse. Der Asterix markiert eine Arterie mit darin gelegenen Erythrozyten, die aufgrund ihrer Brechungseigenschaften ein falsch positives Signal verursachen.

Die Pax8-Expression in der Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen entspricht dem Wildtyp.

### 3.4.4 FoxE1

Die Expression von Foxe1 in der Schilddrüse Dsh-homozygoter Embryonen wurde im Stadium E13.5 auf transversalen Gewebedünnschnitten überprüft. In der Hellfeldaufnahme ist die Schilddrüse einlappig und deutlich lateral der Mittellinie positioniert. Im Dunkelfeld stellt sich eine deutliche Anreicherung des Signals im Bereich der Schilddrüse dar. Foxe1 ist also im Stadium E13.5 in der Schilddrüse Dsh-homozygoter Embryonen exprimiert.

Eine weitere Signalanhebung ist über dem Lumen eines zur Schilddrüse benachbarten arteriellen Gefäßes zu beobachten. Dieses Signal wird durch dort gelegene Erythrozyten hervorgerufen und ist unspezifisch.



**Abbildung 3.28: FoxE1 ist in der Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E13.5 exprimiert.**

(A), (B) Dunkelfeldaufnahmen, (C), (D) dazugehörige Hellfeldaufnahmen. Die Pfeile markieren die Schilddrüse. Der Asterix markiert eine Arterie mit darin gelegenen Erythrozyten, die aufgrund ihrer Brechungseigenschaften ein falsch positives Signal verursachen.

Die Foxe1-Expression in der Schilddrüse der Dsh/Dsh – Embryonen entspricht dem Wildtyp.

## 4 Diskussion

Die Schilddrüsendysgenese stellt eine häufige Fehlbildung dar, deren Ätiologie in den meisten Fällen unklar ist [15]. Um die Ursachen der Schilddrüsendysgenese weiter aufzuklären, ist ein besseres Verständnis der Schilddrüsenorganogenese notwendig. Aus der Entwicklung von Leber und Pankreas ist die Bedeutung der Gefäße für die Organogenese endodermaler Organe bekannt [33]. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Entwicklung der Schilddrüse folgende Hypothesen geprüft:

- Es besteht eine Ko-Entwicklung der arteriellen zervikalen Gefäße und der Schilddrüse.  
Dies wurde durch die 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse und benachbarter arterieller Gefäßstrukturen, insbesondere der Kiemenbogenarterien, in verschiedenen embryonalen Stadien überprüft (*siehe Kapitel 3.1*).
- Eine gestörte Entwicklung der Gefäße führt zu einer Schilddrüsendysgenese.  
Diese Hypothese wurde in der Shh-defizienten Dsh-Mausmutante, bei der sowohl eine Asymmetrie der Schilddrüse als auch der Halsgefäße besteht, überprüft, indem die Entwicklung der Schilddrüse und der Gefäße 3-dimensional rekonstruiert wurde (*siehe Kapitel 3.2 und 3.3*).
- Eine Shh-Defizienz führt zu einer Störung des Expressionsprofils der zellautonomen Transkriptionsfaktoren Nkx2.1, Pax8, Foxe1 der Schilddrüsenanlage.  
Dies wurde durch in-situ-Hybridisierungen in Wildtyp- und Dsh-homozygoten Embryonen überprüft (*siehe Kapitel 3.4*).

## 4.1 Die gemeinsame Entwicklung von Schilddrüsenanlage und arteriellen Gefäßen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die embryonale Entwicklung der Schilddrüse in der Maus in den Stadien E9.5 bis E14.5 untersucht und ihre Beziehung zur den arteriellen Gefäßen während der Entwicklung anhand 3-dimensionaler Rekonstruktionen dargestellt. Die Untersuchung der physiologischen Schilddrüsenentwicklung in Wildtyp-Embryonen hat hierbei gezeigt, dass der Beginn der morphologischen Schilddrüsenentwicklung im Stadium E9.5, gekennzeichnet durch die Bildung des Schilddrüsenprimordiums im Pharynxepithel, in enger Nachbarschaft zur ventralen Aorta stattfindet. Der enge Kontakt zwischen Schilddrüse und dem Ausflusstrakt des Herzens bleibt während der darauffolgenden Evagination des Primordiums und der Relokalisation entlang der anterior-posterioren Achse nach kaudal erhalten. Im weiteren Verlauf kommt es durch das laterale Auswachsen der Schilddrüsenanlage zur Ausbildung der beiden Schilddrüsenlappen. Diese morphologische Wandlung der Schilddrüse erfolgt in engem Kontakt zu den sich entwickelnden Aa. carotidae, der Kontakt zum Ausflusstrakt des Herzens hingegen geht verloren und die Schilddrüse erfährt eine Relokalisation nach kranial, so dass sie schließlich auf Höhe des Larynx lokalisiert ist (*siehe Kapitel 3.1*).

Mit Hilfe der 3-dimensionalen Rekonstruktion der Schilddrüsenentwicklung ist es gelungen, neue Erkenntnisse über die Morphogenese der Schilddrüse zu erlangen. Die Interpretation der 3-dimensionalen Darstellungen legt eine Gliederung der Entwicklungsprozesse in zwei Phasen nahe:

1. Phase: Diese setzt sich aus der Bildung des Schilddrüsenprimordiums sowie dessen Evagination und Relokalisation nach kaudal zusammen. Während dieser Phase besteht ein enger Kontakt zwischen dem Primordium und der ventralen Aorta bzw. dem Ausflusstrakt des Herzens (E9.5 – E12.5).
2. Phase: Diese umfasst die Ausbildung der Schilddrüsenlappen und die Relokalisation der Schilddrüse nach kranial. Hierbei geht der Kontakt der Schilddrüsenanlage zum Ausflusstrakt des Herzens bzw. dem Aortenbogen verloren, indes besteht ein enger Kontakt zu den beidseitig lokalisierten Aa. carotidae (ab E12.5).

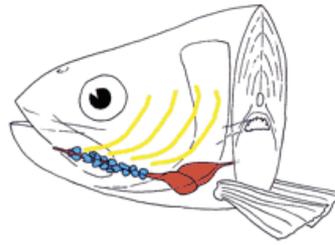
In Folge der 2-phasigen morphologischen Entwicklung der Schilddrüse kommt es zur charakteristischen Form und Position der Schilddrüse mit 2 Lappen, die kaudal über

einen schmalen Isthmus verbunden und ventral von Trachea und Larynx gelegen sind. In der bisherigen Darstellung der Schilddrüsenentwicklung wurde davon ausgegangen, dass die beiden Schilddrüsenlappen durch eine Bifurkation der Schilddrüsenanlage während ihres Deszensus entstehen [6, 35]. Dieser Darstellung widerspricht jedoch die Tatsache, dass der Isthmus nicht im kranialen, sondern im kaudalen Anteil der Schilddrüse positioniert ist. Durch die Erkenntnis, dass die Schilddrüsenlappen in der 2. Phase der morphologischen Schilddrüsenentwicklung durch ein Auswachsen der Schilddrüsenanlage nach kranial entstehen, ist es gelungen, diese Diskrepanz zu erklären.

Insbesondere durch die 3-dimensionalen Rekonstruktionen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die enge Nachbarschaft der Schilddrüse zu arteriellen Gefäßstrukturen während ihrer Entwicklung gezeigt werden. Eine ähnliche Darstellung der Ko-Entwicklung gelang kürzlich der Arbeitsgruppe um Fagman et al., die anhand von Immunfluoreszenzen für die 1. Phase der Entwicklung gezeigt haben, dass das Schilddrüsenprimordium und die Aorta zu Beginn der Schilddrüsenentwicklung in direktem Kontakt stehen [67]. Trotz des Auftretens einer dünnen, aus Mesenchymzellen aufgebauten Schicht zwischen dem Schilddrüsenprimordium und der Aorta während der anschließenden Relokalisation, bleiben diese weiterhin eng benachbart. In Bezug auf die 2. Phase der morphologischen Schilddrüsenentwicklung konnten sie im Stadium E12.5 einen engen Kontakt der Schilddrüsenanlage zu den 3. Kiemenbogenarterien, aus denen sich im Verlauf die Aa. carotideae entwickeln, nachweisen. Außerdem konnten sie zeigen, dass sich die mediale Schilddrüsenanlage entlang eines Pfades, der parallel zu den Gefäßen verläuft, nach lateral ausbreitet [67]. Die von Fagman et al. publizierten Ergebnisse bestätigen somit die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die enge Nachbarschaft der Schilddrüsenanlage zum Ausflusstrakt des Herzens in der 1. Phase und den Aa. carotideae in der 2. Phase der Morphogenese.

Weitere wichtige Erkenntnisse über die Schilddrüsenentwicklung konnten durch Untersuchungen im Zebrafisch (*Danio rerio*), der in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung als Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie gewonnen hat, erlangt werden. Ebenso wie die Maus besitzt der Zebrafisch hormonproduzierende Schilddrüsenfollikel, jedoch sind diese nicht zu einem kompakten Organ

zusammengelagert, sondern einzeln entlang der ventralen Aorta im Bereich der Kiemen verteilt (*siehe Abbildung 4.1*) [68].



**Abbildung 4.1: Die Distribution der Schilddrüsenfollikel im Zebrafisch**

Die Schilddrüsenfollikel (blau) sind im adulten Zebrafisch entlang der ventralen Aorta (rot) lokalisiert. Sie verteilen sich vom Bulbus arteriosus (rot) ausgehend im Bereich der Kiemen (gelb) [68].

Trotz der morphologischen Unterschiede der adulten Schilddrüse des Zebrafisches im Vergleich mit der Maus besteht auf molekularer Ebene eine starke Konservierung der an der Schilddrüsenentwicklung beteiligten Gene. Während der Entwicklung der Schilddrüsenanlage werden im Zebrafisch *nkx2.1a*, *pax8*, *pax2* und *hhex* exprimiert, die Homo- und Paraloga der entwicklungsrelevanten Gene *Nkx2.1*, *Pax8* und *Hhex* der Schilddrüse von Maus und Mensch darstellen. Eine Inaktivierung der Gene mittels Morpholino-Technik oder in Mutanten resultiert in Zebrafischembryonen in einem Defekt der Schilddrüsenorganogenese [23, 68]. Auch im Hinblick auf die Beziehung der Schilddrüsenanlage zum Herzens und arteriellen Gefäßstrukturen während der physiologischen Schilddrüsenentwicklung kann der Zebrafisch wichtige Erkenntnisse beitragen. Untersuchungen zum Zeitpunkt der Induktion haben gezeigt, dass auch im Zebrafisch die Schilddrüsenanlage zu Beginn der Entwicklung dem Ausflusstrakt des Herzens benachbart ist. Diese Nachbarschaft bleibt während der Evagination und Relokalisation des Schilddrüsenprimordiums erhalten. Während der folgenden Proliferation breiten sich die Schilddrüsenfollikel im Kontakt zur ventralen Aorta entlang der anterior-posterioren Achse aus und sind schließlich im Bereich der Kiemen lokalisiert [69].

Der Vergleich der beiden Spezies zeigt, dass die Morphogenese der Schilddrüse im Zebrafisch und der Maus grundsätzliche Ähnlichkeiten aufweist. Insbesondere die 1. Phase, charakterisiert durch die Nachbarschaft des Schilddrüsenprimordiums zum Ausflusstrakt des Herzens, scheint in beiden Spezies sehr ähnlich zu verlaufen. Zwar besteht auch im Zebrafisch ähnlich wie in der Maus in der 2. Phase der Kontakt zu

einem arteriellen, den Kopfbereich versorgenden Gefäß, jedoch ist die ventrale Aorta im Gegensatz zu den paarig angelegten Aa. carotideae nur ein singuläres Gefäß. Die Unterschiede in der 2. Phase der morphologischen Schilddrüsenentwicklung resultieren schließlich in der speziesspezifischen Morphologie der Schilddrüse.

Auch der Vergleich weiterer Spezies zeigt ausgeprägte Unterschiede der Schilddrüsenmorphologie. So bildet die Schilddrüse des Schnabeligels (Echidna) aus der Ordnung der Monotremen ein kompaktes, einlappiges Organ aus, das intrathorakal am Ausflusstrakt des Herzens lokalisiert ist [70]. Mit Hinblick auf die neuen Erkenntnisse über die Morphogenese der Schilddrüse ist dies durch eine morphologische Entwicklung zu erklären, bei der die 1. Phase ähnlich der Entwicklung in Maus und Zebrafisch in Nachbarschaft zum Ausflusstrakt des Herzens verläuft, bei der jedoch die 2. Phase im Sinne einer Relokalisation nach kranial und der Ausbildung zweier Lappen ausbleibt. Eine systematische Zusammenstellung der Schilddrüsenmorphologie und der Organisation der zervikalen Gefäße in verschiedenen Spezies könnte weitere interessante Einblicke in die morphologische Ko-Entwicklung von Schilddrüse und Halsgefäßen ermöglichen.

Anhand der 3-dimensionalen Rekonstruktion der Schilddrüsenanlage und der benachbarten arteriellen Gefäßstrukturen ist es gelungen, die Nachbarschaft der Schilddrüse zum Ausflusstrakt des Herzens und den Aa. carotideae während der Embryonalentwicklung in einer bisher nicht bekannten detaillierten räumlichen Auflösung darzustellen. Darauf basierend konnte die Morphogenese der Schilddrüse in 2 Phasen unterteilt werden, wobei sich insbesondere die 2. Phase zwischen den Spezies unterscheidet und zur speziesspezifischen Morphologie der Schilddrüse führt.

## **4.2 Eine gestörte Entwicklung der zervikalen Gefäße führt zu einer Störung der Schilddrüsenmorphogenese**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Schilddrüse in der Maus in enger Nachbarschaft zu arteriellen Gefäßstrukturen wie dem Ausflusstrakt des Herzens und der Aa. carotideae stattfindet. Wie aus der Entwicklung anderer endodermaler Organe bekannt ist, kann eine gestörte Entwicklung benachbarter Gefäßstrukturen sekundär zu einer Störung der Organogenese führen [33]. Um diesen Aspekt auch bezüglich der Schilddrüse näher zu betrachten, wurde die

Dsh-Maus untersucht, ein Shh-defizientes Mausmodell, bei dem sowohl eine gestörte Entwicklung des Herzens und des arteriellen Gefäßsystems als auch der Schilddrüse bekannt ist [41, 47].

Untersuchungen der Gefäß- und Schilddrüsenentwicklung haben gezeigt, dass die Entwicklung der ventralen Aorta, der Kiemenbogenarterien und der Aa. carotideae in der Dsh-Maus gestört ist. Hierbei stellt sich bis zum Stadium E11.5 ein symmetrisch organisiertes Gefäßsystem dar, wobei jedoch im Vergleich mit den Wildtypembryonen nur 1 anstatt 3 Kiemenbogenarterien vorhanden ist. Während der darauffolgenden Umgestaltung des Gefäßsystems zeigt sich in den Dsh-homozygoten Embryonen, dass es zu einer Regression der linken dorsalen Aorta und stattdessen zu einer Umwandlung der rechten dorsalen Aorta in die Aorta descendens kommt, eine Konstellation spiegelbildlich zu der im Wildtyp. Außerdem ist der Aortenbogen rechtsseitig lokalisiert und kreuzt somit nicht die Mittellinie. Dies führt zu einer asymmetrischen Lokalisation der Aa. carotideae auf einer Seite der Mittellinie, meist rechts.

Bezüglich der Störungen in der Entwicklung der Kiemenbogenarterien und ihrer Derivate entspricht der Dsh-Phänotyp grundsätzlich dem Shh<sup>-/-</sup>-Phänotyp, in dem die Ausbildung der 4. und 6. Kiemenbogenarterie nicht stattfindet und der Aortenbogen rechtsseitig lokalisiert ist. Bei den Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen im Stadium E16.5 bildet die A. carotidea jedoch zunächst ein singuläres Gefäß, das aus dem Aortenbogen entspringt und sich weiter kranial aufspaltet [41].

Bezüglich der Entwicklung der Schilddrüse haben die 3-dimensionalen Rekonstruktionen der Dsh-Embryonen gezeigt, dass die 1. Phase der Morphogenese ungestört zu verlaufen scheint. So entsprachen Morphologie und Position der Schilddrüsenanlage im Stadium E11.5 prinzipiell der Situation in Wildtypembryonen. In der 2. Phase hingegen sind insbesondere bezüglich der Lappenbildung und Lokalisation Auffälligkeiten zu beobachten. Im Stadium E12.5 wird deutlich, dass das Auswachsen der Schilddrüsenanlage nach lateral unterbleibt und die Schilddrüse stattdessen asymmetrisch auf eine Seite der Mittellinie verlagert ist. Auch in den darauffolgenden Stadien weist die Schilddrüse einen 1-lappigen statt des typischen 2-lappigen Aufbaus auf und ist asymmetrisch lokalisiert. Hierbei wurde deutlich, dass in allen untersuchten homozygoten Dsh-Embryonen die Schilddrüse immer auf derselben Seite wie die fehllokalisierten Aa. carotideae gelegen ist und sich zwischen ihnen ausbreitet. Die Relokalisation nach kranial erscheint unbeeinträchtigt, so dass die

Schilddrüse schließlich im Bereich der oberen Trachea und des Larynx lokalisiert ist (*siehe Kapitel 3.2*).

Bei der Untersuchung der Schilddrüsen- und Gefäßentwicklung der Dsh-homozygoten Embryonen war insbesondere auffällig, dass der Zeitpunkt, zu dem erstmalig eine Störung der morphologischen Schilddrüsenentwicklung auftritt, zeitlich mit der gestörten Umwandlung des arteriellen Gefäßsystems zusammenfällt. Außerdem sind zwar sowohl die Aa. carotidae als auch die Schilddrüse fehllokalisiert, jedoch besteht weiterhin die in der normalen Schilddrüsenentwicklung beobachtete enge Nachbarschaft.

Die gestörte Entwicklung der Schilddrüse in den Dsh-Embryonen, die in einer 1-lappigen Schilddrüse resultiert, ist mit dem von Fagman et al. beschriebenen Phänotyp der Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen vergleichbar. Fagman et al. haben gezeigt, dass in Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen das Primordium erst verzögert den Kontakt zum Pharynxepithel verliert, jedoch in Nachbarschaft zum Aortenbogen nach kaudal relokalisiert, so dass sich die 1. Phase der Morphogenese prinzipiell unbeeinträchtigt darstellt. In der 2. Phase haben Fagman et al. ebenfalls eine 1-lappige Schilddrüse beschrieben, die im Gegensatz zur Dsh-Maus jedoch bis zum Stadium E15.5 in der Mittellinie lokalisiert ist und erst später lateralisiert. Außerdem ist die Schilddrüse in der Mehrheit der Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen linksseitig, bei den Dsh-homozygoten Embryonen jedoch rechtsseitig lokalisiert [71]. Für den Aspekt der Ko-Entwicklung von Schilddrüsen und Aa. carotidea ist in diesem Zusammenhang insbesondere von Bedeutung, dass trotz der kontralateralen Lokalisationen der Schilddrüse in den Dsh- und Shh-Embryonen die Schilddrüse immer mit den jeweiligen Aa. carotidae ko-lokalisiert ist.

Die Unterschiede zwischen dem Phänotyp der Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen und den Dsh-homozygoten Embryonen könnte durch die unterschiedlichen Mutationen bedingt sein, die der Shh-Defizienz zu Grunde liegen. Während die Shh<sup>-/-</sup>-Embryonen auf einem gezielten Knockout des Shh-Gens beruhen, liegt bei der Dsh-Maus eine Inversion mit einer Trennung des Shh-Gens von Promoteranteilen vor [45, 46]. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Inversion auch die Funktion weiterer Gene verändert und dadurch der Phänotyp zusätzlich beeinflusst wird.

Trotz der Unterschiede bezüglich des zeitlichen Auftretens des Schilddrüsenphänotyps und der kontralateralen Position der Schilddrüse in den Shh<sup>-/-</sup> Embryonen, untermauern die Ergebnisse von Fagman et al. und Smoak et al. die in den Dsh-homozygoten Embryonen gewonnenen Erkenntnisse, dass eine Fehllokalisierung der Aa. carotidae

zusammen mit einer veränderten Morphologie und Position der Schilddrüse auftritt, wobei Aa. carotideae und Schilddrüse benachbart bleiben.

In-situ-Hybridisierungen haben gezeigt, dass in Wildtyp-Embryonen im Stadium E12.5, zu einem Zeitpunkt, zu dem sich die Störung der Morphogenese in den Dsh-homozygoten Embryonen entwickelt, weder Shh noch sein Rezeptor Ptch in der Schilddrüsenanlage exprimiert wird (*siehe Kapitel 3.4.1*). Fagman et al. konnten ebenfalls in verschiedenen Stadien der Schilddrüsenentwicklung keine Expression von Shh oder Ptch in der Schilddrüsenanlage nachweisen [71]. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Veränderung der Expression der Transkriptionsfaktoren Nkx2.1, Pax8 und Foxe1 in der Schilddrüsenanlage als Folge der Shh-Defizienz gezeigt werden (*siehe Kapitel 3.4*). Daraus kann geschlossen werden, dass der Schilddrüsenphänotyp der Dsh-homozygoten Embryonen weder auf zellautonome Störungen der Shh- oder Ptch-Expression in der Schilddrüsenanlage selbst noch auf eine beeinträchtigte Expression der zellautonomen Transkriptionsfaktoren zurückzuführen ist. Daher ist anzunehmen, dass der Defekt in der Schilddrüsenmorphogenese der Dsh-Embryonen sekundär aus einer gestörten Wirkung des umgebenden Gewebes resultiert.

Basierend auf dem Phänotyp der Dsh-homozygoten Embryonen kann eine reine Koinzidenz von Gefäß- und Schilddrüsenfehllokalisierung nicht ausgeschlossen werden. Dennoch kann aber vermutet werden, dass die 2. Phase der Morphogenese, die die Form und Position der Schilddrüse bestimmt, maßgeblich durch die benachbarten Aa. carotideae beeinflusst wird und die Fehllokalisierung der Schilddrüse in den Dsh-homozygoten Embryonen sekundär aus der Fehllokalisierung der Aa. carotideae resultiert.

Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Dsh-Maus mit Gli3-defizienten  $Xt^J$ -Mäusen verkreuzt. Für die Shh-knockout-Maus ist bekannt, dass sowohl der durch die Shh-Defizienz verursachte Extremitäten-Phänotyp als auch der ZNS-Phänotyp bei gleichzeitig bestehender Gli3-Defizienz aufgehoben bzw. abgemildert werden kann. Es wird postuliert, dass dies auf den Wegfall der repressiven Gli3-Wirkung, die infolge der Shh-Defizienz vermehrt auftritt, zurückzuführen ist [44, 63].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass im Stadium E13.5 die doppelt-homozygoten Embryonen (Dsh/Dsh  $Xt^J/Xt^J$ ) vollständige Extremitätenanlagen

mit einer Polydaktylie aufweisen. Diese Daten zeigen, dass durch die Verkreuzung der Dsh- mit der  $Xt^J$ -Maus die Ergebnisse der Shh/ $Xt^J$ -Verkreuzungen bezüglich des Extremitätenphänotyps in Teilaspekten reproduziert werden konnten [44].

Im Bereich der Schilddrüse wurde in den doppelt homozygoten Embryonen eine Wiederherstellung der Symmetrie erreicht. Die Schilddrüse ist in der Mittellinie lokalisiert und aus 2 symmetrisch angeordneten Lappen aufgebaut, die kaudal über einen breiten Isthmus verbunden sind. Auch die Aa. carotideae sind symmetrisch angeordnet, und befinden sich in enger Nachbarschaft zur Schilddrüse und den beiden „rudimentären“ Lappen. Auch wenn es nicht gelungen ist, den Schilddrüsen- und Gefäßphänotyp der Dsh-homozygoten Embryonen vollständig aufzuheben, konnte in Bezug auf die Morphologie und Position der Schilddrüse dennoch eine Symmetrie und eine Lokalisation der Schilddrüse in der Mittellinie erreicht werden. Parallel ist ebenfalls die Symmetrie der Aa. carotideae wiederhergestellt worden (*siehe Kapitel 3.3*). Aufgrund des gleichartigen Verhaltens der Schilddrüse und der Aa. carotideae bezüglich der Lokalisation und der Symmetrie und der auch in den doppelt-homozygoten Embryonen bestehenden engen Nachbarschaft wird die Hypothese, dass Morphologie und Position der Schilddrüse durch die benachbarten Aa. carotideae beeinflusst wird, weiter gestützt.

Allerdings kann auch auf Basis der Daten aus den Dsh/ $Xt^J$ -Verkreuzungen nicht ausgeschlossen werden, dass ein gemeinsamer externer Faktor auf die Entwicklung und Position sowohl der Schilddrüse als auch der Aa. carotideae einwirkt. Um diese Frage zu klären, erwies sich der Modellorganismus Zebrafisch in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von K. Rohr (Institut für Entwicklungsbiologie, Universität zu Köln) als informativ.

Im Zebrafisch breitet sich die Schilddrüsenanlage während der 2. Phase der Morphogenese in Nachbarschaft zur ventralen Aorta entlang der anterior-posterioren Achse aus. Alt et al. konnten zeigen, dass in mehreren Zebrafisch- Mutanten, bei denen eine veränderte Architektur der Kiemenbogenarterien besteht, zugleich eine veränderte Morphologie der Schilddrüse nachweisbar ist. In den verschiedenen verwendeten Mutanten wächst die ventrale Aorta nicht entlang der anterior-posterioren Achse aus, stattdessen bilden sich am Ausflusstrakt des Herzens irreguläre Gefäßäste. Die 1. Phase der Schilddrüsenmorphogenese stellt sich in den verwendeten Mutanten unauffällig dar, die Schilddrüsenanlage breitet sich anschließend jedoch nicht entlang der anterior-posterioren Achse aus, stattdessen ist sie weiterhin am Ausflusstrakt des

Herzens lokalisiert und breitet sich in Nachbarschaft zu den irregulären Gefäßstrukturen nach lateral aus [69]. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch im Zebrafisch, analog zu den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen im Dsh-Mausmodell, eine Ko-Entwicklung von Schilddrüsenanlage und Gefäßen nachweisbar ist.

Desweiteren bietet der Zebrafisch die Möglichkeit, gezielt die Gefäßentwicklung der Embryonen zu manipulieren und den daraus resultierenden Effekt auf die Entwicklung der Schilddrüse zu untersuchen. Durch die Injektion der mRNA der Transkriptionsfaktoren *scf* und *Imo2* werden Zellen dazu gezwungen, sich zu endothelialen Vorläuferzellen zu entwickeln [69]. Durch Transplantation derartiger endothelialer Vorläuferzellen in normale Zebrafischembryonen konnten Alt et al. ektope Gefäßstrukturen im Zebrafischembryo induzieren. In Embryonen, in denen transplantierte Zellen mittels Antikörperfärbung in direkter Nachbarschaft der medialen Schilddrüsenanlage nachweisbar waren, konnte gleichzeitig eine Ausbreitung des Schilddrüsengewebes in Richtung der transplantierten Endothelzellen gezeigt werden [69]. Diese Daten belegen erstmals, dass nicht nur eine Ko-Entwicklung von Schilddrüse und Gefäßen besteht, sondern sehr wahrscheinlich die Gefäße die Morphologie der Schilddrüsenanlage beeinflussen.

### 4.3 Neue Aspekte für die Ätiologie der Schilddrüsendysgenese

Die Schilddrüsendysgenese stellt eine relativ häufige Anomalie dar. Zum einen ist in 80-85 % der Fälle eine Schilddrüsendysgenese Ursache der CH [3], zusätzlich besteht bei 0.05-0.2% der Bevölkerung eine Hemiagenese der Schilddrüse [13, 72]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die morphologische Entwicklung der Schilddrüse in 2 Phasen unterteilt werden kann. Darauf basierend kann eine Zuordnung der verschiedenen Entitäten der Schilddrüsendysgenese (Athyreose, Ektopie, Hypoplasie und Hemiagenese) zu Störungen in einer der zwei Phasen der Morphogenese vorgenommen werden.

Abhängig von der zur Klassifizierung verwendeten Methode stellen Ektopie und Athyreose die häufigste Form der Schilddrüsendysgenese dar [10]. Bei der Ektopie kann Schilddrüsengewebe gewöhnlich in unterschiedlichen Lokalisationen im Bereich des Kopfes und Halses nachgewiesen werden, wohingegen bei der Athyreose kein funktionsfähiges Schilddrüsengewebe vorhanden ist. Der Schilddrüsenphänotyp der

Foxe1-knockout-Maus hat deutlich gemacht, dass diese beiden Entitäten keinesfalls klar voneinander zu trennen sind, da die Foxe1<sup>-/-</sup>-Embryonen beide Dysgenesieformen aufweisen können [27]. Darauf basierend sind wahrscheinlich sowohl Athyreose als auch Ektopie auf eine frühe Störung der Schilddrüsenentwicklung zurückzuführen, wobei insbesondere bei der Ektopie im Kopf-/Halsbereich von einer gestörten Relokalisation in der 1. Phase der Morphogenese auszugehen ist. Bei der Thyroidea lingualis betrifft die Störung die Evagination des Primordiums aus dem Pharynxepithel, wohingegen in den Fällen, bei denen das Schilddrüsengewebe kranial der normalen Position im Hals lokalisiert ist, von einer etwas späteren Störung auszugehen ist.

Neben der klassischen Ektopie im Kopf-/Halsbereich sind auch Fälle intrakardial lokalisierten, ektopen Schilddrüsengewebes beschrieben [73]. Diese Form der Ektopie ist pathogenetisch aus der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen engen Nachbarschaft des Schilddrüsenprimordiums zum Herzens während der 1. Phase der Morphogenese ableitbar und darauf basierend durch eine Störung der Relokalisation in der 2. Phase der Morphogenese zu erklären. Intrakardiale Ektopien unterscheiden sich demzufolge bezüglich ihrer Pathogenese von den Ektopien im Kopf-/Halsbereich

Eine Zuordnung der Hypoplasie zu einer der beiden Phasen ist schwierig, da davon auszugehen ist, dass die Hypoplasie auf eine Störung der Proliferation zurückzuführen ist, die zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung auftreten kann. Es kann postuliert werden, dass das Ausmaß der Hypoplasie vom Zeitpunkt und der Art der Störung abhängig ist und die Athyreose daher auch als maximale Form der Hypoplasie verstanden werden kann.

In Bezug auf die Hemiagenese konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die einseitig lokalisierte Schilddrüse bei der Dsh-Maus Folge einer gestörten 2. Phase der Morphogenese ist. Eine isolierte Betrachtung des Schilddrüsenphänotyps könnte zu dem Schluss führen, dass die Dsh-Maus ein Modell für die Pathogenese der Hemiagenese beim Menschen darstellt. Dazu steht im Widerspruch, dass die Dsh-Embryonen neben der Asymmetrie der Schilddrüse auch eine gestörte Entwicklung der Aa. carotidae zeigen, wohingegen eine Assoziation von Schilddrüsenhemiagenesen mit Anomalien der Aa. carotidae im Menschen nicht beschrieben ist. Daher ist es auf Basis der Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit nicht möglich, Aussagen über den zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismus zu treffen, der zur Entstehung einer Hemiagenese im Menschen führt.

Bisher konnte nur in wenigen Patienten die Ätiologie der Schilddrüsendysgenese durch einen Mutationsnachweis in den bisher bekannten Kandidatengen (NKX2.1, PAX8, FOXE1) geklärt werden. Bei den bisher bekannten Kandidatengen der Schilddrüsendysgenese handelt es sich um Gene, die während der Embryonalentwicklung in der Schilddrüsenanlage selbst exprimiert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben verdeutlicht, dass eine enge Ko-Entwicklung der Schilddrüse mit benachbarten Gefäßstrukturen besteht. Zusammen mit den von Alt et al. durchgeführten Arbeiten im Zebrafisch konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass die Gefäße die Position und Morphologie der Schilddrüse beeinflussen. Insbesondere die Tatsache, dass die mit der Schilddrüsendysgenese assoziierten Fehlbildungen am häufigsten das Herz und die großen Gefäße betreffen (3-12%), gewinnt in diesem Zusammenhang besondere Bedeutung [12, 14, 20]. Aus diesen Erkenntnissen resultiert, dass neben den in der Schilddrüsenanlage exprimierten Genen weitere Gene als mögliche Kandidaten für die Entstehung der Schilddrüsendysgenese in Betracht zu ziehen sind. Diese umfassen zum einen Gene, die zu einer gestörten Herz- oder Gefäßentwicklung führen und zum anderen Proteine, die von Herz und Gefäßen sezerniert werden und direkt oder indirekt auf die Schilddrüsenanlage einwirken.

Für Störungen in der 1. Phase der Morphogenese sind aufgrund der engen Nachbarschaft des Schilddrüsenprimordiums zum Herzen besonders Gene von Interesse, die zu Herzfehlbildungen führen und/oder vom Ausflusstrakt des Herzens sezerniert werden.

Ein mögliches Kandidatengen stellt hierbei Nkx2.5, ein Paralog von Nkx2.1, dar. Dieses ist insbesondere im Zusammenhang mit der Herzentwicklung bekannt. Neuere Arbeiten haben zeigen können, dass die Nkx2.5<sup>-/-</sup>-Embryonen neben Herzfehlern auch eine Schilddrüsendysgenese in Form einer Hypoplasie der Schilddrüsenanlage in frühen Stadien der Entwicklung aufweisen. Nkx2.5 war in der frühen Schilddrüsenanlage bis zum Stadium E11.5 nachweisbar. Es konnten NKX2.5-Mutationen in Patienten mit Schilddrüsendysgenese nachgewiesen werden, wobei diese Patienten im Unterschied zum Mausmodell eine Ektopie oder Athyreose hatten [74, 75]. Die Schilddrüse der Nkx2.5<sup>-/-</sup>-Embryonen kann aufgrund der embryonalen Letalität jedoch nur in frühen Stadien der Entwicklung untersucht werden, so dass nicht bekannt ist, ob eine Nkx2.5-Defizienz auch zu einer Störung der Evagination und Relokalisation in der 1. Phase der

Schilddrüsenmorphogenese führt. Nkx2.5 wird sowohl in der Schilddrüse als auch im Herzen exprimiert. Daher könnte eine gestörte 1. Phase der Morphogenese, die insbesondere einer Ektopie am wahrscheinlichsten zugrunde liegt, sowohl durch eine zellautonome Störung als auch sekundär aus einem gestörten Kontakt zwischen Schilddrüse und dem Herzen resultieren. Dies könnte anhand eines gewebespezifischen Knockout von Nkx2.5 in Herz und Schilddrüse weiter geklärt werden.

Potentielle Kandidaten für Proteine, die vom Herzen auf die Schilddrüse wirken können, stellen die Mitglieder der Familie der Fibroblast growth factors (Fgf) dar, die als sekretorische Proteine Zell-Zell-Interaktionen vermitteln und wichtige Wachstumsfaktoren der frühen Embryonalentwicklung darstellen. Als besonders interessant hat sich diesbezüglich Fgf10 erwiesen. Zum einen, weil Fgf10 während der Embryonalentwicklung im Ausflusstrakt des Herzens exprimiert wird und Fgf10<sup>-/-</sup>-Embryonen Defekte in diesem Bereich aufweisen [76, 77], zum anderen, da bei den Fgf10<sup>-/-</sup>-Embryonen gleichzeitig eine Athyreose besteht [78]. Da bisher keine Expression von Fgf10 in der Schilddrüsenanlage gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass der Schilddrüsenphänotyp sekundär durch die gestörte Entwicklung anderer Strukturen, wie z.B. des Herzens, resultiert [79]. Diese Hypothese wird weiter durch die Tatsache unterstützt, dass auch im Knockout-Mausmodell des Fgf-Rezeptors-2, Isoform IIIb (Fgfr2-IIIb), der in vielen endodermalen Organen als Rezeptor für Fgf10 exprimiert wird, eine Athyreose auftritt [80]. Desweiteren konnte auch im Zebrafisch gezeigt werden, dass Fgfs entscheidend an der frühen Schilddrüsenentwicklung beteiligt sind [81].

Als Kandidatengene für eine gestörte 2. Phase der Morphogenese bieten sich insbesondere Gene an, die an der Entwicklung der Kiemenbogenarterien und den Aa. carotidaeae beteiligt sind.

Hoxa3 stellt diesbezüglich einen guten Kandidaten dar. Hoxa3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in verschiedenen Geweben im Bereich der Kiemenbögen, nicht jedoch in der Schilddrüsenanlage, exprimiert wird und an der Umwandlung der Kiemenbogenarterien beteiligt ist. Der Knockout von Hoxa3 im Mausmodell führt zu Anomalien der Aa. carotidaeae [82, 83]. Außerdem tritt eine Dysgenese der Schilddrüse in Form einer Hemiagenese auf, wobei der Phänotyp variabel ist und eine unvollständige Penetranz vorliegt [84]. Bisher sind keine HOXA3-Mutationen

beschrieben worden, so dass nur spekuliert werden kann, wie HOXA3-Mutationen sich im Menschen manifestieren würden.

Aufgrund des Schilddrüsenphänotyps des Knockout-Mausmodells stellt Tbx1 ein weiteres Kandidatengenen für eine Störung der 2. Phase der Schilddrüsenmorphogenese dar. Auch Tbx1 ist ein Transkriptionsfaktor und beeinflusst die Entwicklung der Kiemenbögen und ihrer Derivate, einschließlich der Kiemenbogenarterien. Fagman et al. konnten keine Expression von Tbx1 in der Schilddrüsenanlage nachweisen, dennoch weist die Tbx1<sup>-/-</sup>-Maus eine Hemithyroidea auf, wobei die Aa. carotideae jedoch symmetrisch angeordnet sind. Nähere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Schilddrüsenphänotyp auf eine kombinierte Störung der 1. und 2. Phase der Morphogenese zurückzuführen ist. In der 1. Phase verliert die Schilddrüsenanlage in den Tbx1<sup>-/-</sup>-Embryonen während der Relokalisation den Kontakt zum Ausflusstrakt des Herzens und ist infolgedessen weiter kranial lokalisiert. In der 2. Phase entwickelt sich dann jedoch ein Kontakt mit einer der beiden Aa. carotideae und die Schilddrüse lateralisiert zu der Seite der jeweiligen A. carotideae [85]. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Schilddrüsenphänotyp der Tbx1<sup>-/-</sup>-Embryonen durch einen mangelnde Fgf8-Expression infolge der Tbx1-Defizienz in dem die Schilddrüse umgebenden Mesenchym verursacht wird [86]. Die Tatsache, dass es zur Ausbildung einer Asymmetrie der Schilddrüse trotz symmetrischer Reduktion der Fgf8-Expression im Mesenchym und erhaltender Symmetrie der Aa. carotideae kommt, legt nahe, dass noch weitere, eventuell asymmetrisch exprimierte Faktoren an der Entstehung des Phänotyps beteiligt sind.

Die Tbx1-knockout-Maus wird als Modell für das 22q11DS-Syndrom (velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge-Syndrom) angesehen, da die Tbx1<sup>-/-</sup>-Embryonen den menschlichen Phänotyp in vielen Aspekten widerspiegeln und das 22q11DS-Syndrom zudem häufig durch Mikrodeletionen verursacht wird, die u.a. den TBX1-Genlokus einschließen. Bei Patienten mit 22q11DS-Syndrom ist eine häufige Koinzidenz (ca. 20%) von Defekten der Schilddrüse und des kardiovaskulären Systems beobachtet worden [87]. Auch wenn der Einfluss weiterer im Rahmen des 22q11DS-Syndroms betroffener Gene auf die Schilddrüsenentwicklung nicht bekannt ist, kann aufgrund der Daten aus dem Tbx1<sup>-/-</sup>-Mausmodell davon ausgegangen werden, dass der Tbx1-Mangel eine Ursache des Schilddrüsenphänotyps der 22q11DS-Patienten darstellt.

Bei der Suche nach neuen Genen und Mechanismen, die zu einer Schilddrüsendysgenese führen können, ist zu bedenken, dass das Auftreten und die Ausprägung der Schilddrüsendysgenese auch durch den genetischen Hintergrund im Sinne einer polygenen Vererbung beeinflusst werden kann. Darauf deutet zum einen eine wesentlich niedrigere Inzidenz der kongenitalen Hypothyreose von 1:10 000 in der afro-amerikanischen Bevölkerung der USA hin [20]. Zum anderen kann bei derselben Mutation z.B. des Pax8-Gens eine starke Variabilität des Phänotyps beobachtet werden [88]. Desweiteren ergab eine Studie in Verwandten ersten Grades von Patienten mit Schilddrüsendysgenese in ca. 21% der Familien Auffälligkeiten im Bereich der Schilddrüse wie u.a. Ductus-thyroglossus-Zysten oder Hemiagenesen bei nicht manifest erkrankten Verwandten [89]. Im Mausmodell konnte in Nkx2.1/Pax8-doppelt-heterozygoten Mäusen eine Beeinträchtigung der Schilddrüsenentwicklung gezeigt werden, die bei den einfach heterozygoten Mäusen nicht bestand. Dieser Phänotyp konnte jedoch nur in einem bestimmten Mausstamm nachgewiesen werden [90]. In der Zusammenschau dieser Beobachtungen wird deutlich, dass eine Vielzahl verschiedener genetischer Einflüsse an der Schilddrüsenentwicklung beteiligt ist, über die derzeit nur wenig bekannt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, neue Einblicke in die Morphogenese der Schilddrüse zu erarbeiten. Die gewonnenen Erkenntnisse über die Phasen der Morphogenese und den Einfluss arterieller Gefäßstrukturen ermöglichen es, neue Hypothesen über die Entstehung der Schilddrüsendysgenese aufzustellen. Mausmutanten, bei denen sowohl Anomalien des Herzens oder der Gefäße als auch der Schilddrüse bestehen, können hierbei wichtige Anhaltspunkte für neue Kandidatengene liefern. Diesbezüglich konnten durch die Daten der vorliegenden Arbeit Mitglieder der Fgf-Familie inkl. ihrer Rezeptoren, aber auch Transkriptionsfaktoren wie Hoxa3 und Tbx1, die in die Schilddrüsenanlage umgebenden Gewebe exprimiert werden, als interessante neue Kandidatengene identifiziert werden. Hierbei ist zu bedenken, dass auch eine Kombination verschiedener, bei isoliertem Auftreten eventuell nicht pathogener Veränderungen, im Sinne einer polygenen Ätiologie zur Entstehung der Schilddrüsendysgenese führen könnte. Mutationssuchen in gut charakterisierten Patientenkollektiven mit Schilddrüsendysgenese werden die neu postulierten Kandidatengene schließlich als solche widerlegen oder bestätigen müssen.

## 5 Zusammenfassung

Die kongenitale Hypothyreose stellt mit einer Inzidenz von 1:3000 bis 4000 die häufigste angeborene endokrine Erkrankung dar [1]. In 80-85% der Fälle ist sie durch eine Störung der Organogenese mit daraus resultierender Schilddrüsendysgenese bedingt [3]. Die Ätiologie der Dysgenese konnte bisher nur in wenigen Patienten durch Mutationsnachweise in einem der bekannten, in der Schilddrüsenanlage exprimierten Kandidatengene NKX2.1, PAX8, FOXE1 geklärt werden [91].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Morphogenese der Schilddrüse im Zusammenhang mit der Entwicklung des kardiovaskulären Systems untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte die 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüsen- und Gefäßentwicklung sowohl in Wildtyp- als auch in Shh-defizienten Dsh-Mausembryonen. Die Untersuchung der Wildtyp-Embryonen hat gezeigt, dass die Morphogenese der Schilddrüse in 2 Phasen unterteilt werden kann. Die 1. Phase umfasst die Bildung und Evagination am ventralen Pharynx und die Verlagerung des Primordiums nach kaudal, die 2. Phase die Ausbildung der zwei symmetrischen Schilddrüsenlappen und die Relokalisation der Schilddrüsenanlage nach kranial. Dabei wurde eine enge Nachbarschaft der Schilddrüse zum kardiovaskulären System deutlich. In der 1. Phase besteht ein enger Kontakt zum Ausflusstrakt des Herzens, in der 2. Phase zu den Aa. carotidaeae.

In der Dsh-Maus als Modell für eine gestörte, asymmetrische Entwicklung des kardiovaskulären Systems war eine ebenfalls asymmetrisch verlaufende Entwicklung der Schilddrüse nachweisbar. Die parallele Veränderung der Entwicklung von Schilddrüse und Aa. carotidaeae bestätigte sich auch in Dsh/Dsh  $Xt^J/Xt^J$ -Embryonen, bei denen eine Wiederherstellung der Symmetrie von Schilddrüse als auch der Karotiden nachweisbar war.

Untersuchungen des Shh und Ptch sowie Nkx2.1, Pax8 und Foxe1 ergaben keinen Hinweis, dass die Schilddrüsendysgenese der Dsh-homozygoten Embryonen auf zellautonome Störungen der Genexpression der Schilddrüsenanlage selbst zurückzuführen ist, sondern wahrscheinlich aus einer gestörten Expression bisher nicht identifizierter Wachstumsfaktoren, die den Einfluss der Gefäße auf die Schilddrüsenanlage vermitteln, resultiert.

Anhand der 3-dimensionalen Rekonstruktionen von Wildtyp- und Shh-defizienten Embryonen ist es gelungen, die Ko-Entwicklung von Schilddrüse und kardiovaskulärem System aufzuzeigen. Auf Grundlage dieser Erkenntnis und analoger Ergebnisse aus dem Zebrafisch ist davon auszugehen, dass sowohl Morphologie als auch Position der Schilddrüse durch benachbarte Anteile des kardiovaskulären Systems beeinflusst werden [69]. Dieses neue Verständnis der Schilddrüsenembryogenese weist darauf hin, dass in der Pathogenese der angeborenen Hypothyreose neue Kandidatengene im Bereich der Ko-Entwicklung von Schilddrüse und Herz zu suchen sind. Langfristig können Mutationsnachweise in diesen neuen Kandidatengenen zur ätiologischen Aufklärung der angeborenen Hypothyreose mit beitragen.

## 6 Literatur

- [1] Klett, M., *Epidemiology of congenital hypothyroidism*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1997. **105 Suppl 4**: p. 19-23.
- [2] Gruters, A., A. Jenner, and H. Krude, *Long-term consequences of congenital hypothyroidism in the era of screening programmes*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2002. **16**(2): p. 369-82.
- [3] Gillam, M.P. and P. Kopp, *Genetic regulation of thyroid development*. Curr Opin Pediatr, 2001. **13**(4): p. 358-63.
- [4] Grütters, A., *Screening for congenital hypothyroidism: effectiveness and clinical outcome* Baillière's Clinical Paediatrics, 1996. **4**(2): p. 259-276.
- [5] de Vijlder, J.J., C. Ris-Stalpers, and T. Vulsma, *Inborn errors of thyroid hormone biosynthesis*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1997. **105 Suppl 4**: p. 32-7.
- [6] Kronenberg, H.M., S. Melmed, K.S. Polonsky, et al., *Williams textbook of endocrinology* 11 ed. 2008, Philadelphia: Saunders Elsevier.
- [7] Rodrigues, C., P. Jorge, J.P. Soares, et al., *Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism*. Eur J Endocrinol, 2005. **152**(2): p. 193-8.
- [8] Bakker, B., H. Bikker, T. Vulsma, et al., *Two decades of screening for congenital hypothyroidism in The Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update)*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(10): p. 3708-12.
- [9] De La Vieja, A., O. Dohan, O. Levy, et al., *Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology*. Physiol Rev, 2000. **80**(3): p. 1083-105.
- [10] De Felice, M. and R. Di Lauro, *Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms*. Endocr Rev, 2004. **25**(5): p. 722-46.
- [11] Gruters, A., K.P. Liesenkotter, M. Zapico, et al., *Results of the screening program for congenital hypothyroidism in Berlin (1978-1995)*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1997. **105 Suppl 4**: p. 28-31.

- [12] Olivieri, A., M.A. Stazi, P. Mastroiacovo, et al., *A population-based study on the frequency of additional congenital malformations in infants with congenital hypothyroidism: data from the Italian Registry for Congenital Hypothyroidism (1991-1998)*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(2): p. 557-62.
- [13] Maiorana, R., A. Carta, G. Floriddia, et al., *Thyroid hemiagenesis: prevalence in normal children and effect on thyroid function*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(4): p. 1534-6.
- [14] Devos, H., C. Rodd, N. Gagne, et al., *A search for the possible molecular mechanisms of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(7): p. 2502-6.
- [15] Gruters, A., H. Krude, and H. Biebermann, *Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism*. Eur J Endocrinol, 2004. **151 Suppl 3**: p. U39-44.
- [16] Clifton-Bligh, R.J., J.M. Wentworth, P. Heinz, et al., *Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 399-401.
- [17] Castanet, M., S.M. Park, A. Smith, et al., *A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(17): p. 2051-9.
- [18] Krude, H., B. Schutz, H. Biebermann, et al., *Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency*. J Clin Invest, 2002. **109**(4): p. 475-80.
- [19] Meeus, L., B. Gilbert, C. Rydlewski, et al., *Characterization of a novel loss of function mutation of PAX8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(9): p. 4285-91.
- [20] Roberts, H.E., C.A. Moore, P.M. Fernhoff, et al., *Population study of congenital hypothyroidism and associated birth defects, Atlanta, 1979-1992*. Am J Med Genet, 1997. **71**(1): p. 29-32.
- [21] Kaufman, M.H. and J.B.L. Bard, *The thyroid gland*, in *The anatomical basis of mouse development*. 1999, Academic press.
- [22] Kameda, Y., T. Nishimaki, M. Miura, et al., *Mash1 regulates the development of C cells in mouse thyroid glands*. Dev Dyn, 2007. **236**(1): p. 262-70.
- [23] Elsalini, O.A., J. von Gartzten, M. Cramer, et al., *Zebrafish hhex, nk2.1a, and pax2.1 regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors*. Dev Biol, 2003. **263**(1): p. 67-80.

- [24] Kimura, S., J.M. Ward, and P. Minoo, *Thyroid-specific enhancer-binding protein/thyroid transcription factor 1 is not required for the initial specification of the thyroid and lung primordia*. *Biochimie*, 1999. **81**(4): p. 321-7.
- [25] Mansouri, A., K. Chowdhury, and P. Gruss, *Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function*. *Nat Genet*, 1998. **19**(1): p. 87-90.
- [26] Pasca di Magliano, M., R. Di Lauro, and M. Zannini, *Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(24): p. 13144-9.
- [27] De Felice, M., C. Ovitt, E. Biffali, et al., *A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate*. *Nat Genet*, 1998. **19**(4): p. 395-8.
- [28] Martinez Barbera, J.P., M. Clements, P. Thomas, et al., *The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation*. *Development*, 2000. **127**(11): p. 2433-45.
- [29] Parlato, R., A. Rosica, A. Rodriguez-Mallon, et al., *An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis*. *Dev Biol*, 2004. **276**(2): p. 464-75.
- [30] Kaufman, M.H. and J.B.L. Bard, *The gut and its associated tissues*. 1999, Academic press: The anatomical basis of mouse development.
- [31] Matsumoto, K., H. Yoshitomi, J. Rossant, et al., *Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function*. *Science*, 2001. **294**(5542): p. 559-63.
- [32] Gualdi, R., P. Bossard, M. Zheng, et al., *Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control*. *Genes Dev*, 1996. **10**(13): p. 1670-82.
- [33] Lammert, E., O. Cleaver, and D. Melton, *Role of endothelial cells in early pancreas and liver development*. *Mech Dev*, 2003. **120**(1): p. 59-64.
- [34] Zaret, K.S., *Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(7): p. 499-512.
- [35] Kaufman, M.H. and J.B.L. Bard, *The anatomical basis of mouse development*. 1999: Academic press.
- [36] Lammert, E., O. Cleaver, and D. Melton, *Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels*. *Science*, 2001. **294**(5542): p. 564-7.
- [37] Nikolova, G. and E. Lammert, *Interdependent development of blood vessels and organs*. *Cell Tissue Res*, 2003. **314**(1): p. 33-42.

- [38] Hiruma, T., Y. Nakajima, and H. Nakamura, *Development of pharyngeal arch arteries in early mouse embryo*. J Anat, 2002. **201**(1): p. 15-29.
- [39] Kaufman, M.H. and J.B.L. Bard, *The branchial arch system*, in *The anatomical basis of mouse development*. 1999.
- [40] Litingtung, Y., L. Lei, H. Westphal, et al., *Sonic hedgehog is essential to foregut development*. Nat Genet, 1998. **20**(1): p. 58-61.
- [41] Washington Smoak, I., N.A. Byrd, R. Abu-Issa, et al., *Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development*. Dev Biol, 2005. **283**(2): p. 357-72.
- [42] Ingham, P.W. and A.P. McMahon, *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*. Genes Dev, 2001. **15**(23): p. 3059-87.
- [43] Riobo, N.A. and D.R. Manning, *Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs*. Biochem J, 2007. **403**(3): p. 369-79.
- [44] Litingtung, Y., R.D. Dahn, Y. Li, et al., *Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity*. Nature, 2002. **418**(6901): p. 979-83.
- [45] Niedermaier, M., G.C. Schwabe, S. Fees, et al., *An inversion involving the mouse Shh locus results in brachydactyly through dysregulation of Shh expression*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 900-9.
- [46] Chiang, C., Y. Litingtung, E. Lee, et al., *Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function*. Nature, 1996. **383**(6599): p. 407-13.
- [47] Mundlos, S., *personal communication*
- [48] Selby, P.B., S.N. Bolch, V.S. Mierzejewski, et al., *Synergistic interactions between two skeletal mutations in mice: individual and combined effects of the semidominants cleidocranial dysplasia (Ccd) and short digits (Dsh)*. J Hered, 1993. **84**(6): p. 466-74.
- [49] Maynard, T.M., M.D. Jain, C.W. Balmer, et al., *High-resolution mapping of the Gli3 mutation extra-toes reveals a 51.5-kb deletion*. Mamm Genome, 2002. **13**(1): p. 58-61.
- [50] Kaufman, M.H., *The Atlas of mouse development*. 1992: Academic press.
- [51] Niedermaier, M., *Molekulargenetische Analyse der Mausmutante Short Digits (DSH)*, in *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2005, Freie Universität Berlin: Berlin. p. 100.
- [52] Invitrogen, *Trizol<sup>®</sup> Reagent Manual*. 2007.

- [53] Qiagen, *Handbuch für den Omniscript™ RT Kit*. 2000.
- [54] Erlich, H.A., *Polymerase chain reaction*. J Clin Immunol, 1989. **9**(6): p. 437-47.
- [55] Qiagen, *Qiaquick® Spin Handbook*. 2002: p. 18.
- [56] Qiagen, *Qiaquick® Spin Handbook*. 2002: p. 23-24.
- [57] Invitrogen, *TOPO TA Cloning® User Manual*. 2006.
- [58] Qiagen, *QIAprep® Miniprep Handbook*. 2006: p. 22-23.
- [59] Qiagen, *QIAGEN® Plasmid Purification Handbook*. 2005: p. 19-23.
- [60] Roche, *DIG RNA labeling mix, product insert*. 2006.
- [61] Landes, C.A., F. Weichert, P. Geis, et al., *Evaluation of two 3D virtual computer reconstructions for comparison of cleft lip and palate to normal fetal microanatomy*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2006. **288**(3): p. 248-62.
- [62] (UK), M.R.C. and U.o. Edinburgh, *Edinburgh mouse atlas project*. <http://genex.hgu.mrc.ac.uk>.
- [63] Ruiz i Altaba, A., V. Nguyen, and V. Palma, *The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(5): p. 513-21.
- [64] Ioannides, A.S., D.J. Henderson, L. Spitz, et al., *Role of Sonic hedgehog in the development of the trachea and oesophagus*. J Pediatr Surg, 2003. **38**(1): p. 29-36; discussion 29-36.
- [65] Lazzaro, D., M. Price, M. de Felice, et al., *The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain*. Development, 1991. **113**(4): p. 1093-104.
- [66] Plachov, D., K. Chowdhury, C. Walther, et al., *Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland*. Development, 1990. **110**(2): p. 643-51.
- [67] Fagman, H., L. Andersson, and M. Nilsson, *The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation*. Dev Dyn, 2006. **235**(2): p. 444-55.
- [68] Wendl, T., K. Lun, M. Mione, et al., *Pax2.1 is required for the development of thyroid follicles in zebrafish*. Development, 2002. **129**(15): p. 3751-60.
- [69] Alt, B., O.A. Elsalini, P. Schruppf, et al., *Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental localisation*. Development, 2006. **133**(19): p. 3797-804.

- [70] Haynes, J.I., *Parathyroids and ultimobranchial bodies in monotremes*. Anat Rec, 1999. **254**(2): p. 269-80.
- [71] Fagman, H., M. Grande, A. Gritli-Linde, et al., *Genetic deletion of sonic hedgehog causes hemigenesis and ectopic development of the thyroid in mouse*. Am J Pathol, 2004. **164**(5): p. 1865-72.
- [72] Shabana, W., F. Delange, M. Freson, et al., *Prevalence of thyroid hemigenesis: ultrasound screening in normal children*. Eur J Pediatr, 2000. **159**(6): p. 456-8.
- [73] Casanova, J.B., R.C. Daly, B.S. Edwards, et al., *Intracardiac ectopic thyroid*. Ann Thorac Surg, 2000. **70**(5): p. 1694-6.
- [74] Dentice, M., V. Cordeddu, A. Rosica, et al., *Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(4): p. 1428-33.
- [75] Biben, C., R. Weber, S. Kesteven, et al., *Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2-5*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 888-95.
- [76] Kelly, R.G., N.A. Brown, and M.E. Buckingham, *The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm*. Dev Cell, 2001. **1**(3): p. 435-40.
- [77] Marguerie, A., F. Bajolle, S. Zaffran, et al., *Congenital heart defects in Fgfr2-IIIb and Fgf10 mutant mice*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(1): p. 50-60.
- [78] Ohuchi, H., Y. Hori, M. Yamasaki, et al., *FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(3): p. 643-9.
- [79] *Gene expression database (GXD)*, Mouse genome informatics (MGI)
- [80] Revest, J.M., B. Spencer-Dene, K. Kerr, et al., *Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb acts upstream of Shh and Fgf4 and is required for limb bud maintenance but not for the induction of Fgf8, Fgf10, Msx1, or Bmp4*. Dev Biol, 2001. **231**(1): p. 47-62.
- [81] Wendl, T., D. Adzic, J.J. Schoenebeck, et al., *Early developmental specification of the thyroid gland depends on han-expressing surrounding tissue and on FGF signals*. Development, 2007. **134**(15): p. 2871-9.
- [82] Kameda, Y., N. Watari-Goshima, T. Nishimaki, et al., *Disruption of the Hoxa3 homeobox gene results in anomalies of the carotid artery system and the arterial baroreceptors*. Cell Tissue Res, 2003. **311**(3): p. 343-52.

- [83] Manley, N.R. and M.R. Capecchi, *Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands*. Dev Biol, 1998. **195**(1): p. 1-15.
- [84] Manley, N.R. and M.R. Capecchi, *The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development*. Development, 1995. **121**(7): p. 1989-2003.
- [85] Fagman, H., J. Liao, J. Westerlund, et al., *The 22q11 deletion syndrome candidate gene Tbx1 determines thyroid size and positioning*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(3): p. 276-85.
- [86] Lania, G., Z. Zhang, T. Huynh, et al., *Early thyroid development requires a Tbx1-Fgf8 pathway*. Dev Biol, 2009. **328**(1): p. 109-17.
- [87] Bassett, A.S., E.W. Chow, J. Husted, et al., *Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome*. Am J Med Genet A, 2005. **138**(4): p. 307-13.
- [88] de Sanctis, L., A. Corrias, D. Romagnolo, et al., *Familial PAX8 small deletion (c.989\_992delACCC) associated with extreme phenotype variability*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(11): p. 5669-74.
- [89] Leger, J., D. Marinovic, C. Garel, et al., *Thyroid developmental anomalies in first degree relatives of children with congenital hypothyroidism*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(2): p. 575-80.
- [90] Amendola, E., P. De Luca, P.E. Macchia, et al., *A mouse model demonstrates a multigenic origin of congenital hypothyroidism*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5038-47.
- [91] Kopp, P., *Perspective: genetic defects in the etiology of congenital hypothyroidism*. Endocrinology, 2002. **143**(6): p. 2019-24.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Im Abkürzungsverzeichnis sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgelistet. Auf die Auflistung von allgemein üblichen Abkürzungen wurde verzichtet. Desweiteren wurde auch die Auflistung von chemischen Elementen und Summenformeln, Puffernamen (sofern im Methodenteil erläutert) sowie von offiziellen Symbole von Genen verzichtet.

®	amtlich registrierte Marke
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm (entspricht $10^{-6}$ g)
µl	Mikroliter (entspricht $10^{-6}$ l)
µm	Mikrometer (entspricht $10^{-6}$ m)
1st bzw. 2nd	1. bzw. 2. Kiemenbogen(arterie)
1x bzw. 10x	1-fach bzw. 10-fach konzentriert
3rd, 4th, 6th	3., 4., 6. Kiemenbogen(arterie)
A. bzw. Aa.	Arteria bzw. Arteriae
Ad	Aorta dorsalis
AG	Arbeitsgruppe
Ao	Aorta ascendens
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dem	Demineralisiertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
Br/br	Bronchus
cDNA	< engl. complementary DNA >, komplementäre DNA
CH	< engl. congenital hypothyroidism >, kongenitale Hypothyreose
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	< engl. Deoxyribonucleic acid >, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	Didesoxyribonukleosidtriphosphat(e)
Dsh	< engl. short digits >, Mutationssymbol eines verwendeten Mausstamms
E	Tag der Embryonalentwicklung (Maus)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

et al.	< lat. et alii >, und andere
F	< engl. forward >, Vorwärts-Primer
Fgf(s)	< engl. fibroblast growth factor >, Fibroblasten Wachstumsfaktor(en)
GCPS	Greig-Cephalo-Polysyndakylie-Syndrom
H <sub>2</sub> O	verwendet im Sinne von Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
He	Herz/Ausflusstrakt des Herzens
HPLC	< engl. high performance liquid chromatography >, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
kb	Kilobasen
Kb	Kiemenbogen
l	Liter
La/la	Larynx
LBamp	LB-Medium mit Ampicillin versetzt
lc	Linke Arteria carotis
m	Meter
M	molar
Mb	Processus mandibularis
min	Minute(n)
ml	Milliliter (entspricht 10 <sup>-3</sup> l)
mM	Millimolar (entspricht 10 <sup>-3</sup> molar)
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	< engl. messenger RNA >, Boten-RNA
Mx	Processus maxillaris
N./Nn.	Nervus (Singular)/Nervi (Plural)
Nc	Notochord
NTP(s)	Nukleosidtriphosphat(e)
Nv	Nervus vagus
Oe/oe	Ösophagus
p.a.	< lat. pro analysi >, zur Analyse
p.c.	< lat. post coitum >, nach dem Koitus
PAA	< engl. pharyngeal arch artery >, Kiemenbogenarterie
PBS	< engl. phosphate buffered saline >, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	< engl. polymerase chain reaction >, Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
Ph/ph	Pharynx
R	< engl. reverse >, Rückwärts-Primer
rc	Rechte Arteria carotis
RNA	< engl. Ribonucleic acid >, Ribonukleinsäure

---

RNase	Ribonuklease
rpm	< <i>engl.</i> rounds per minute >, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
rt	< <i>engl.</i> room temperature >, Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	< <i>engl.</i> sodium dodecylsulfate >, Natriumdodecylsulfat
SSC	< <i>engl.</i> standard saline citrate >, Standard Saline Citrat
Std.	Stunde
T <sub>3</sub>	Triiodthyronin
T <sub>4</sub>	Tetraiodthyronin, Thyroxin
Taq	Thermus aquaticus, Bakterienstamm
Tm	Thymus(primordium)
Tr/tr	Trachea
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
™	< <i>engl.</i> trademark >, Marke
U	< <i>engl.</i> unit >, Einheit
ü/N	über Nacht
USA	< <i>engl.</i> United States of America >, Vereinigte Staaten von Amerika
V./Vv.	Vena (Singular)/Venae (Plural)
va	Ventrale Aorta
Xt <sup>J</sup>	< <i>engl.</i> extra-toes >, Allelbezeichnung der verwendeten Gli3-knockout-Maus
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7.2 Herstellerverzeichnis

Hersteller	Ort
Agfa	Mortsel, Belgien
Amersham Biosciences	Little Chalfont, England
Applied Biosystems Inc.	Foster City, CA, USA
Becton Dickinson (BD)	Heidelberg
inkl. DIFCO	
Falcon™	
Bender & Hobein GmbH	Bruchsal
Biometra GmbH	Göttingen
Biozym Scientific GmbH	Hess. Oldendorf
Boehringer Ingelheim	Ingelheim am Rhein
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Carl Zeiss Microimaging GmbH	Göttingen
D. Moody/S. Lozanoff	University of Alberta, Canada / University of Hawaii, USA
Eppendorf AG	Hamburg
Fermentas GmbH	St.Leon-Rot
Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel
Gilson, Inc.	Middleton, WI, USA
Heraeus Holding GmbH	Hanau
Invitrogen	Invitrogen, Karlsruhe
inkl. Gibco®	
Kodak Company	Rochester, NY, USA
Leica Microsystems GmbH	Wetzlar
inkl. Reichert-Jung	
Memmert GmbH + Co. KG	Schwabach
Merck KG	Darmstadt
Mettler-Toledo GmbH	Giessen
MPI für molekulare Genetik	Berlin
MWG Biotech AG	Ebersberg
New England Biolabs	Schwalbach
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen
PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen
Qiagen	Hilden
Roche Diagnostics – Applied Science	Mannheim
Sartorius AG	Göttingen
Scotsman Ice Systems	Vernon Hills, IL, USA
Sigma-Aldrich	Taufkirchen
inkl. Fluka	

Hersteller	Ort
Techne Inc.	Burlington, NJ, USA
Thermo Scientific inkl. Richard-Allan Scientific	Karlsruhe
Haake GmbH	
Thermo Hybaid GmbH	Ulm

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Entitäten der Schilddrüsendysgenese.....	2
Abbildung 1.2: Schematische Übersicht über die Schilddrüsenentwicklung in der Maus.	5
Abbildung 1.3: Überblick über die frühe Leberentwicklung.....	7
Abbildung 1.4: Koinzidenz der Entwicklung von Pankreas und Gefäßen. ....	8
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Entwicklung der Kiemenbogenarterien..	10
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Shh-Signalwegs.....	11
Abbildung 2.1: 4% Agarosegel einer Dsh-Genotypisierungs-PCR .....	20
Abbildung 2.2: Schematischer Überblick über die Arbeitsschritte der in-situ- Hybridisierungen.....	28
Abbildung 2.3: Schematischer Überblick über die Lage der Sonden.....	29
Abbildung 2.4: SURFdriver 3.5 .....	34
Abbildung 3.1: Die Schilddrüse im Stadium E9.5. ....	36
Abbildung 3.2: Die Schilddrüse im Stadium E10.5. ....	37
Abbildung 3.3: Die Schilddrüse im Stadium E11.5. ....	37
Abbildung 3.4: Die Schilddrüse im Stadium E12.5. ....	38
Abbildung 3.5: Die Schilddrüse im Stadium E13.5. ....	39
Abbildung 3.6: Die Schilddrüse im Stadium E14.5. ....	39
Abbildung 3.7: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse im Stadium E9.5.....	40
Abbildung 3.8: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse im Stadium E11.5.....	41
Abbildung 3.9: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse im Stadium E12.5.....	42
Abbildung 3.10: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse im Stadium E13.5.....	42
Abbildung 3.11: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse im Stadium E14.5.....	43
Abbildung 3.12: Histologie der Schilddrüse in Dsh/Dsh-Embryonen des Stadium E11.5. .....	45
Abbildung 3.13: Histologie der Schilddrüse im Dsh/Dsh-Embryo des Stadium E12.5. ...	45
Abbildung 3.14: Histologie der Schilddrüse im Dsh/Dsh-Embryo des Stadium E13.5. ...	46
Abbildung 3.15: Histologie der Schilddrüse im Dsh/Dsh-Embryo des Stadium E14.5. ...	47
Abbildung 3.16: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse der Dsh/Dsh- Embryonen im Stadium E11.5. ....	47
Abbildung 3.17: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse der Dsh/Dsh- Embryonen im Stadium E12.5. ....	48

Abbildung 3.18: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse der Dsh/Dsh– Embryonen im Stadium E13.5. ....	49
Abbildung 3.19: 3-dimensionale Rekonstruktion der Schilddrüse der Dsh/Dsh– Embryonen im Stadium E14.5. ....	50
Abbildung 3.20: Phänotyp der Dsh/Dsh, Dsh/Dsh $Xt^J/Xt^J$ und $Xt^J/Xt^J$ –Embryonen im Stadium E13.5. ....	52
Abbildung 3.21: Histologische Darstellung der Schilddrüse im Stadium E13.5 in Wildtyp- Embryonen sowie doppelten Verkreuzungen von Dsh mit $Xt^J$ .....	53
Abbildung 3.22: 3-dimensionale Darstellung der Schilddrüsenmorphologie sowie der Gefäße im Stadium E13.5 im Dsh/Dsh $Xt^J/Xt^J$ -Embryonen. ....	54
Abbildung 3.23: Expression von Shh und Ptch1 in der Schilddrüsenregion im Stadium E12.5. ....	57
Abbildung 3.24: Nkx2.1-Expression in Dsh/Dsh–Embryonen in den Stadien E10.5 und E11.5. ....	58
Abbildung 3.25: Nkx2.1-Expression in der Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E13.5. ....	59
Abbildung 3.26: Pax8 Expression in Dsh/Dsh–Embryonen der Stadien E10.5 und E11.5. .....	60
Abbildung 3.27: Pax8 ist in der Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E13.5 exprimiert. ....	61
Abbildung 3.28: FoxE1 ist in der Schilddrüse der Dsh/Dsh-Embryonen im Stadium E13.5 exprimiert. ....	62
Abbildung 4.1: Die Distribution der Schilddrüsenfollikel im Zebrafisch .....	66

# **Curriculum vitae**

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**

# Publikationsleistungen

## Zeitschriftenartikel

### **Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation**

Alt\*, B., O. A. Elsalini\*, P. **Schrumpf\***, N. Haufs, N. D. Lawson, G. C. Schwabe, S. Mundlos, A. Gruters, H. Krude and K. B. Rohr (2006) *\*joint first authors*

Development 133(19): 3797-3804.

## Vorträge

- Dezember 2008 24. Arbeitstagung experimentelle Schilddrüsenforschung, Berlin  
**Danio rerio - Der Zebrafisch als Modellorganismus der Schilddrüsenentwicklung**  
**Expression of important embryonic pathways during thyroid development**
- Dezember 2004 20. Arbeitstagung experimentelle Schilddrüsenforschung, Berlin  
**Disturbed Co-development of Thyroid Gland and Cervical Arteries as a New Model for Thyroid Dysgenesis**
- Oktober 2004 15<sup>th</sup> European Students conference, Berlin  
*Session winner*  
**Disturbed Co-development of Thyroid Gland and Cervical Arteries as a New Model for Thyroid Dysgenesis**
- September 2004 43<sup>rd</sup> Annual Meeting European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Basel  
**Disturbed Co-development of Thyroid Gland and Cervical Arteries as a New Model for Thyroid Dysgenesis**
- Februar 2004 40. Arbeitstagung für pädiatrische Forschung, Göttingen  
**Koentwicklung von Schilddrüse und Carotiden in der Dsh/Dsh-Maus**
- Dezember 2003 19. Arbeitstagung experimentelle Schilddrüsenforschung, Halle  
**Koentwicklung von Schilddrüse und Gefäßen in der sonic hedgehog defizienten Maus**

## Poster

- Mai 2009 24. Deutscher Kongress für perinatale Medizin / 35. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin, Berlin  
**Ivanova, A; Schrumpf, P; Dame, C**  
**Expression Patterns of GATA Transcription Factors and their Co-factor FOG-2 During Development of the Nervous System in the Mouse**

# Danksagungen

Lieben Dank meinen Freunden und meiner Familie, die mir während dieser Zeit zur Seite gestanden haben, insbesondere meinen Eltern.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Prof. Dr. Stefan Mundlos und seiner Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin – Dahlem für die Bereitstellung der Mausmutanten. Ganz besonders möchte ich PD Dr. Georg Schwabe und Norbert Brieske für die Unterstützung bei den Versuchen danken.

Dr. Klaus Rohr danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Außerdem bedanken möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Instituts für experimentelle pädiatrische Endokrinologie für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die gute Atmosphäre, insbesondere auch bei Dr. Nele Haufs für die Einarbeitung zu Beginn der Arbeit und ihre weitere Unterstützung sowie PD Dr. Heike Biebermann, die immer ein offenes Ohr hatte. Vielen Dank auch an Dr. Anne Rediger für das schnelle und ergiebige Feedback beim Vollenden dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Heiko Krude für die Bereitstellung des Themas und die intensive Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und für seine unzähligen Ideen und Anregungen.

`Last but not least` gilt meine tiefste Verbundenheit Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich, ohne deren langjähriges und großes Engagement für Patienten mit kongenitaler Hypothyreose mir persönlich die Anfertigung dieser Arbeit nie möglich gewesen wäre.

# Erklärung

„Ich, Pamela Schrumpf, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Dreidimensionale Darstellung der Schilddrüse und benachbarter arterieller Gefäße während der Embryogenese: Vergleich von Wildtyp- und Sonic-hedgehog-defizienten Mausembryonen“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift