

Aus dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

DISSERTATION

Der Transkriptionsfaktor Osr1 in der Extremitätenentwicklung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Töpfer

aus Bremen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Mundlos

2. Prof. Dr. rer. nat. A. Winterpacht

3. Prof. Dr. rer. nat. A. Vortkamp

Datum der Promotion: 3.9.2010

Inhaltsverzeichnis

1. EINFÜHRUNG	7
1.1. Extremitätenentwicklung beim Modellorganismus Huhn	7
1.1.1. Muskeldifferenzierung	8
1.1.2. Sehnendifferenzierung	10
1.2. Der Transkriptionsfaktor Osr1	11
1.2.1. Phylogenetischer Kontext	11
1.2.2. Osr1 in höheren Organismen	12
1.3. Vorarbeiten	13
1.4. Zielsetzung der Arbeit	14
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Material	14
2.1.1. Geräte	14
2.1.2. Kits	15
2.1.3. Sonstige Materialien	15
2.1.4. Reagenzien	16
2.1.5. Enzyme mit dazugehörigen Puffern	17
2.1.6. Puffer und Lösungen	18
2.1.6.1. Lösungen für die Whole mount in-situ Hybridisierung	18
2.1.6.2. Lösungen für die Schnitt-in-situ-Hybridisierung	20
2.1.7. Bakterienstamm,-medien und Vektor	20
2.1.8. Computerprogramme	21
2.2. Methodik	21
2.2.1. Embryogewinnung und –verarbeitung	21
2.2.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	22
2.2.3. RNA-Sondenherstellung	23
2.2.3.1. Sondenherstellung Osr1	24
2.2.3.1.1. EST-Datenbank-Recherche	24
2.2.3.1.2. Transformation	24
2.2.3.1.3. Plasmidpräparation für die Sequenzierung	25
2.2.3.1.4. DNA-Sequenzierung	25
2.2.3.1.5. Plasmidpräparation für die Sondenherstellung	26
2.2.3.1.6. Plasmidlinearisierung	27
2.2.3.1.7. Gelelektrophorese	27
2.2.3.1.8. Sondentranskription	28
2.2.3.2. Sondenherstellung Collagen 12	28
2.2.3.3. Sondenherstellung der anderen Sonden	29
2.2.4. Whole-mount-in-situ-Hybridisierung	29
2.2.5. Schnitt-in-situ-Hybridisierung	31
2.2.6. Silansisierung von Objektträgern	33
2.2.7. 3D-Rekonstruktion	33

3. ERGEBNISSE	34
3.1. Expressionsmuster von Osr1 in Whole-mount-In-Situ-Hybridisierungen	34
3.2. Whole-mount-Expressionsmuster anderer Gene	39
3.2.1. Vergleich der Whole-mount-Expressionsmuster von Osr1 mit anderen Genen	39
3.2.2. Weitere Whole-mount-Expressionsmuster	41
3.3. Makroskopie nach Osr1-RCAS-Injektion	43
3.4. Whole-mount-Expressionsmuster nach Osr1-RCAS-Injektion	43
3.5. Expressionsmuster in Schnitt-in-situ-Hybridisierungen	44
3.6. Schnittmorphologie und 3D-Rekonstruktionen nach Osr1-RCAS-Injektion	48
4. DISKUSSION	54
4.1. Koexpression von BMP4 und Osr1 in der distalen Extremität	54
4.2. Veränderungen der Muskulatur durch ektope Osr1-Expression	56
4.3. OSR1 und humane Pathologie	57
5. ZUSAMMENFASSUNG	58
6. LITERATURVERZEICHNIS	59
7. DANKSAGUNG	65

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Lebenszyklus des Huhns
- Abb. 1.2: Muskeln der unteren Extremität des adulten Huhns
- Abb. 1.3: Schematische Darstellung eines Vertebratenembryos
- Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Somitenentwicklung
- Abb. 1.5: Auswirkung der Mutation von Odd in der Drosophila-Larve
- Abb. 2.1: Multiple-cloning-site des Vektors pBS SK +/- am Beispiel von Scx
- Abb. 3.1: Osr1-WMISH eines 3 ½ d alten Embryos
- Abb. 3.2: Osr1-WMISH eines 4 ½ d alten Embryos
- Abb. 3.3: Mesonephros des Embryos aus Abb. 3.2
- Abb. 3.4: Osr1-WMISH eines 5 ½ d alten Embryos
- Abb. 3.5: Osr1-WMISH einer unteren Extremität eines 5 ½ d alten Embryos
- Abb. 3.6: Osr1-WMISH von 6 ½ Tage alten Embryonen
- Abb. 3.7: Detailaufnahme einer Osr1-WMISH eines 6 ½ d alten Embryos
- Abb. 3.8: Osr1-WMISH einer unteren Extremität eines 6 ½ Tage alten Embryos
- Abb. 3.9: Osr1-WMISH eines 7 ½ d alten Embryos
- Abb. 3.10: Osr1-WMISH einer unteren Extremität von 7 ½ d alten Embryonen
- Abb. 3.11: Osr1-WMISH eines 8 ½ d alten Embryos
- Abb. 3.12: Osr1-WMISH eines 8 ½ d alten Embryos
- Abb. 3.13: Osr1-WMISH einer unteren Extremität eines 8 ½ d alten Embryos
- Abb. 3.14: WMISH von Osr1, BMP4, Scx und MyoD einer unteren Extremität (6 ½ Tage)
- Abb. 3.15: WMISH von Osr1, BMP4 und Fgf8 einer unteren Extremität (7 ½ Tage)
- Abb. 3.16: WMISH von Osr1 (links) und Scx (rechts) einer unteren Extremität (7 ½ Tage)
- Abb. 3.17: WMISH von Osr1 (links), Myf5 (Mitte) und Eya2 (rechts) (5 ½ Tage)
- Abb. 3.18: WMISH von EphA4, Follistatin, NR13 und Collagen12
- Abb. 3.19: Rechtes Bein (12 Tage) mit Injektion von Osr1-RCAS auf dieser Seite
- Abb. 3.20: Wie Abb. 3.19, nach Freipräparation
- Abb. 3.21: linkes Bein des selben 12 Tage alten Embryo ohne Injektion auf dieser Seite
- Abb. 3.22: WMISH für Scx eines 9 ½ Tage alten Embryo mit Injektion von Osr1-RCAS
- Abb. 3.23: WMISH für BMP4 eines 9 ½ Tage alten Embryo mit Injektion von Osr1-RCAS
- Abb. 3.24: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx und MyoD (Ausschnitt)
- Abb. 3.25: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx und MyoD, Pfeile: siehe Text
- Abb. 3.26: Überlagerung der Schnitt-in-situ-Hybridisierungen aus Abb. 3.25

Abb. 3.27: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx und MyoD
Abb. 3.28: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx und MyoD
Abb. 3.29: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx und MyoD
Abb. 3.30: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx, BMP4 und MyoD
Abb. 3.31: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx, BMP4 und MyoD
Abb. 3.32: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 1 (9,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.33: 3D-Rekonstruktion aus der Serie 1 (9,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.34: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 2 (13,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.35: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 2 (13,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.36: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 2 (13,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.37: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3a (13,5 Tage)
Abb. 3.38: 3D-Rekonstruktion aus der Serie 3a eines 13,5 Tage alten normalen linken Beines
Abb. 3.39: 3D-Rekonstruktion aus der Serie 3b (13,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.40: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3b (13,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.41: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3b (13,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.42: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3b (13,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.43: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3b (13,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.44: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3b (13,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.45: 3D-Rekonstruktion aus der Serie 3b (13,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 3.46: 3D-Rekonstruktion aus der Serie 3b (13,5 Tage) nach Osr1-RCAS-Injektion
Abb. 4.1: Schematische Darstellung eines quer gestreiften Skelettmuskels

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Plasmide zur RNA-Sondenherstellung

Tabelle 2.2: PCR-Programm für die Sequenzierung

Tabelle 2.3: PCR-Programm für die Sondenherstellung

Tabelle 2.4: Übersicht über das Ausgangsmaterial der 3D-Rekonstruktionen

1. Einführung

1.1. Extremitätenentwicklung beim Modellorganismus Huhn

Der Modellorganismus Huhn wurde gewählt, da er neben der leichten Zugänglichkeit der Embryonen auch Manipulationen während der Embryonalentwicklung gestattet, ohne dass diese abgebrochen werden muss. Nach Befruchtung dauert die Entwicklung bis zum Schlüpfen 21 Tage.

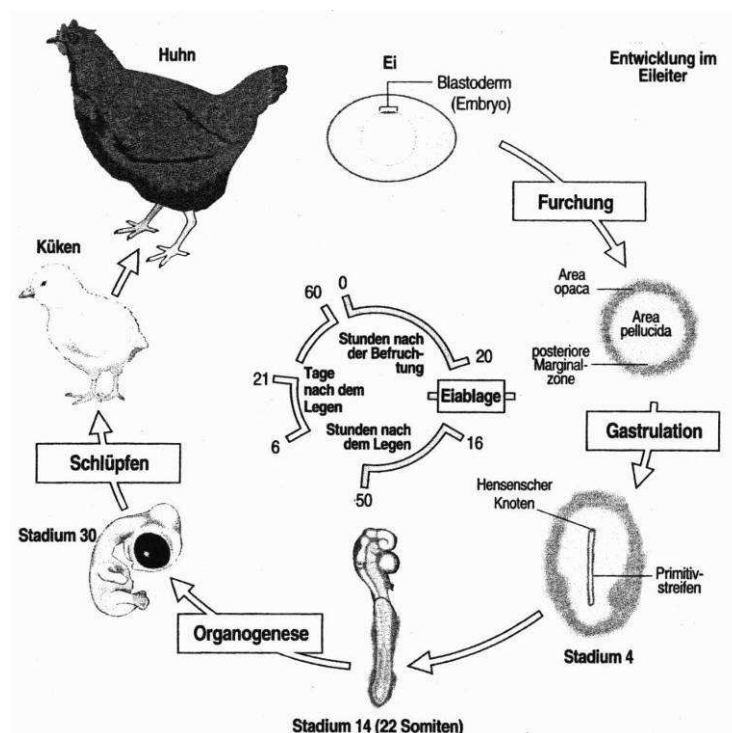


Abb. 1.1: Lebenszyklus des Huhns
(aus Wolpert)

Am dritten Tag der Embryonalentwicklung beginnen an der Flanke des Hühnerembryos die Extremitätenknospen zu wachsen. Sie bestehen anfangs im Inneren aus einem lockeren Verband mesenchymaler Mesodermzellen, die aus dem Lateralplattenmesoderm stammen und an der Oberfläche aus einer Schicht epithelialen Ektoderms. Am distalen Rand liegt die apikale Ektodermleiste (*apical ectodermal ridge*, AER) und darunter die Wachstumszone. Erst wenn die Zellen die Wachstumszone verlassen haben, beginnen sie sich zu den unterschiedlichen Funktionsgeweben zu differenzieren (Wolpert, p. 350-353). Sehnen und Knorpel entstehen aus dem Mesenchym, das dem Lateralplattenmesenchym entstammt, die Muskelzellen jedoch wandern aus den Somiten ein (Kardon, 1998).

Die untere Extremität ist der menschlichen ähnlicher als die obere Extremität, aus der der mehr spezialisierte Flügel hervorgeht, so dass die untere Extremität bei der Untersuchung im Vordergrund stand. Die Anatomie beim adulten Huhn zeigt Abb. 1.2.

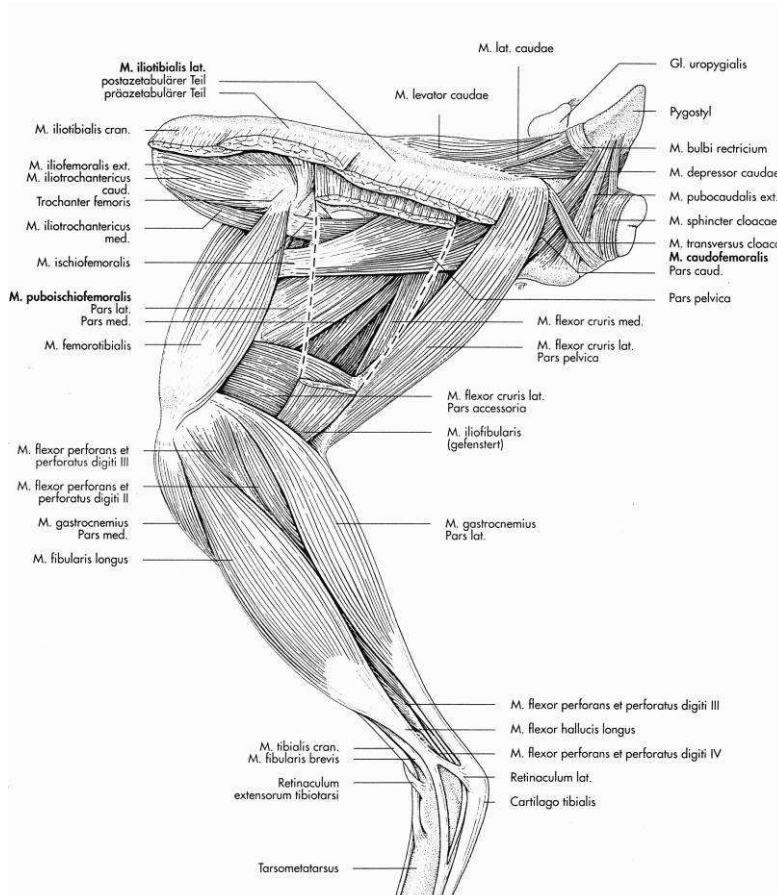


Abb. 1.2: Muskeln der unteren Extremität des adulten Huhns
(aus Koenig)

1.1.1. Muskeldifferenzierung

Die Zellen, die die Muskeln bilden, haben ihren Ursprung nicht im ursprünglichen Mesenchym der Extremität, sondern wandern aus den lateralen Dermatomyotomen in einem frühen Stadium in die sich entwickelnde Extremität ein.

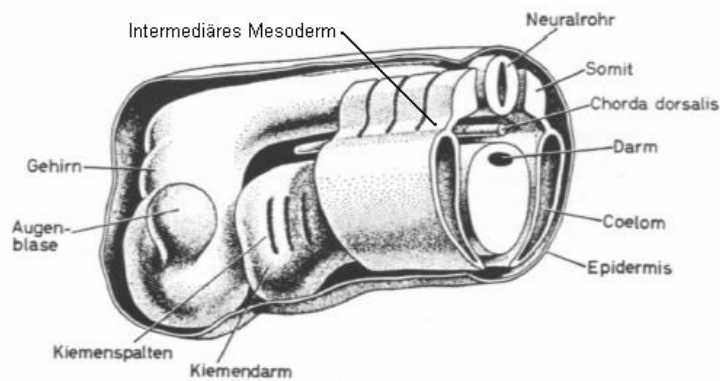


Abb. 1.3: Schematische Darstellung eines Vertebratenembryos im Stadium mit ausgebildeten Somiten
(modifiziert aus Romer und Parsons, 1991)

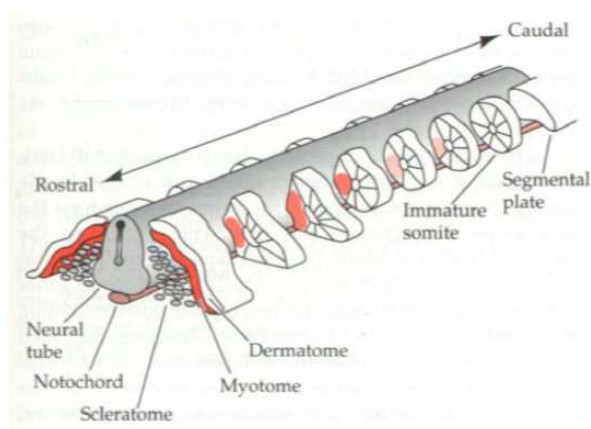


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Somitenentwicklung und Aufteilung in Dermatome, Myotome und Sklerotome
(aus Gilbert, 1997)

Die Somiten, die bei Wirbeltieren während der Embryonalentwicklung als Mesoderm-Blöcke beidseits axial neben dem Neuralrohr erscheinen, differenzieren sich durch äußere Signale einerseits zum Dermatomyotom und andererseits zum Sklerotom. So wird zum Beispiel das Sklerotom durch Shh aus der Chorda dorsalis induziert. Die Differenzierung zum Dermatomyotom wird durch Wnt1 und Wnt3a aus dem dorsalen Neuralrohr sowie Wnt4, Wnt6 und Wnt7a aus dem darüber liegenden Ektoderm ausgelöst (Brent und Tabin, 2002). Im Sklerotom wird Pax1 exprimiert, im Dermatomyotom Pax3 (dessen Mutation beim Mensch zum Waardenburg-Syndrom führt, Wolpert p.115). Aus dem Sklerotom entsteht das Achsenskelett. Vom ventrolateralen und dorsomedialen Rand des Dermatomyotoms wandern Zellen zwischen das Dermatomyotom und das Sklerotom und bilden dort das Myotom. Auf Höhe der Extremitätenknospen migrieren Zellen vom ventrolateralen Rand des Dermatomyotoms in das Lateralplattenmesoderm um dann zu Muskelzellen in den Extremitäten zu werden (Brent und Tabin, 2002).

Zuerst bilden sie dort eine dorsale und eine ventrale Muskelmasse, die sich dann jeweils am Tag 6,5 wieder in eine dorsale und eine ventrale Schicht aufteilen (Atlas of Chick Development, p. 66-67). Diese Zellansammlung teilt sich in 3 Teile auf, die im Bereich von Fuß, Ober- und Unterschenkel liegen. In den sich entwickelnden Lücken befinden sich jeweils Zellen, aus denen Sehnen hervorgehen. Die weitere Aufteilung in die einzelnen Muskelindividuen erfolgt von proximal nach distal, wobei sich die jeweils dorsal gelegenen Muskeln schneller als die ventral gelegenen Muskeln entwickeln (Kardon, 1998).

Myozyten exprimieren den Transkriptionsfaktor MyoD. Er ist ein Mitglied einer Proteinfamilie mit myogenem bHLH (basic helix-loop-helix)-Motiv, zu der unter anderen auch Myogenin, Myf5 und MRF4 gehören. Es hat die Potenz viele Zelllinien (wie z.B. Fibroblasten, Chondrozyten und Adipozyten) zu Myozyten umzudifferenzieren (Weintraub et al., 1991).

1.1.2. Sehnendifferenzierung

Als Sehnenmarker sind die Gene Scleraxis (Scx, Schweitzer et al., 2001), EphA4 (Patel et al., 1996), Tenascin (Kardon, 1998), Follistatin (D'Souza und Patel, 1999), Fgf8 (Edom-Vovard 2001a), Six1 und Six2 (Oliver et al., 1995) sowie Eya1 und Eya2 (Xu et al., 1997) bekannt. Scx wird von den Vorläuferzellen in den Somiten bis hin zur fertigen Sehne exprimiert, wohingegen die anderen Marker nur in bestimmten Regionen und zu bestimmten Zeiten der Entwicklung exprimiert werden (Schweitzer et al., 2001).

Im Huhn bildet sich in den distalen Extremitäten zwischen Knorpel und Epithel die Tenascinreiche *mesenchymal lamina*, die sich aus der von der Basalmembran abgelösten Lamina reticularis und um diese kondensierten mesenchymalen Zellen gebildet hat (Ros et al., 1995). Um diese Struktur formieren sich dann Zellen, die sich zur Sehne differenzieren. Diese Prozesse finden zwischen Tag 6 und 9 in den Phalangen statt. Die *mesenchymal lamina* löst sich proximal soweit ab bis sie auf Muskelzellen trifft. Die Verbindung zu den Knorpel-elementen des sich entwickelnden Skeletts wird durch dorsoventrale Fibrillen geschaffen (Hurle et al., 1990). Die distalen Extremitätensehnen entstehen in der Anlage auch in muskelfreien Extremitäten, gehen jedoch wieder unter wenn kein Muskel vorhanden ist (Kardon, 1998).

In den Somiten postulieren Brent et al. neben Sklerotom, Myotom und Dermatome als viertes Kompartiment das Syndetome, aus dem die Sehnenzellen hervorgehen. Es liegt zwischen Myotom, von dem es durch Fgf8 positiv reguliert wird und Sklerotom, von dem es durch Pax1 negativ reguliert wird (Brent et al., 2003).

Scx-Expression findet sich in der frühen Extremität subektodermal. Scx wird negativ durch BMPs reguliert, in der natürlichen Entwicklung überlappen sich die Expressionsdomänen von BMP2/4/7 nicht mit denen von Scx. Dies kann z.B. bei der Expression von BMP4/7 in den Interdigitalräumen einerseits und von Scx dazwischen über dem Knorpel andererseits beobachtet werden. Auf diese Weise können die BMP die räumliche Ausdehnung des Sehnenvorläuferpools begrenzen. Der BMP-Antagonist Noggin wird in den sich bildenden Knorpeln der Phalangen gebildet, so dass dort der BMP-Einfluss vermindert wird und sich dort Sehnenzellen differenzieren können (Schweitzer et al., 2001).

Zuerst treten 3 Zellansammlungen auf: jeweils dosal und ventral des späteren Knies, der Intertarsalgelenke und der distalen Extremität (Kardon, 1998).

1.2. Der Transkriptionsfaktor Osr1

1.2.1. Phylogenetischer Kontext

In *Drosophila* wurde Odd-skipped (Odd) 1980 als Pair-rule-Gen identifiziert (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Es ist ein DNA-bindender C2H2 Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der zusammen mit *Brother of Odd with entrails limited* (*Bowl*), *Sister of Odd and Bowl* (*Sob*) und *Drumstick* (*Drm*) zu einer Familie mit hoher Homologie in ihren Zinkfinger-Domänen gehört (Tena et al. 2006). C2H2 steht für je zwei Cystein- und Histidin-Aminosäuren, die entlang der Proteinsequenz etwas auseinanderliegen und ein Zinkatom komplexieren. Dadurch wird eine Schlaufe gebildet, die sich in die Freiräume der DNA-Doppelhelix einfügt.

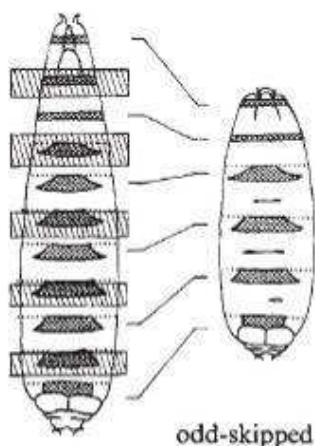


Abb. 1.5: Auswirkung der Mutation von Odd in der Drosophila-Larve

links Wildtyp (quergestreifte Kästen: bei der Mutante fehlender Bereich), rechts Mutante (aus Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980)

Eine Mutation von Odd resultiert im Fehlen von ungeraden Segmenten während der Embryonalentwicklung Drosophilas. Odd ist Teil eines Systems von aufeinander aufbauenden Segmentierungsmechanismen, die jeweils die vorherige einfacherere Stufe in weitere feinere Einheiten unterteilen. Am Anfang stehen die Gene der Gap-Gruppe, die den Embryo in einen anterioren und einen posterioren Teil und nachfolgend in große Bereiche einteilen. Die anterior-posterior-Polarität wird durch die maternale bicoid-mRNA vorgegeben (Wolpert et al.). Die Pair-rule-Gruppe, zu der neben Odd-skipped auch Even-skipped, Paired und Runt gehört, sind in jedem zweiten Segment in einem dem jeweiligen Gen typischen Bereich exprimiert. Die dritte Gruppe besteht aus den Segment-polarity-Genen, die die Segmente weiter unterteilen und dort jeweils anterior oder posterior exprimiert werden. Die so definierten Segmente erhalten durch die spezifische Expression der homöotischen Selektorgene (bei Wirbeltieren sind dies die homologen Hox-Gene) ihre spezifische Identität. Schon bei *C. elegans* wird die Zelldifferenzierung entlang der Längsachse von homologen Genen mit Homöobox reguliert (Wolpert).

Auch in späteren Stadien nach Abschluss der Segmentierung wird Odd exprimiert, u. a. in Bereichen des Verdauungstraktes, in bestimmten phagozytischen Nephrozyten, in einigen Bereichen des Zentralnervensystems, der sehnenähnlichen Apodemen (Ward und Coulter, 2000) und des Perikards (Ward und Skeath, 2000).

Odd wirkt hauptsächlich als Repressor auf die Zielgene Fushi-tarazu (Ftz), Paired (Prd), Engrailed (En) und Wingless (Wg), kann aber auch als Aktivator wirken (Saulier-LeDrean et al. 1998). Dies ist interessant, da zu Wingless homologe Gene die große Wnt-Familie mit vielfältigen Funktionen in höheren Organismen bilden (Cadigan 1997).

Odd wird durch Notch positiv reguliert (Rauskolb und Irvine, 1999). Bowl, ein Mitglied der gleichen Familie wie Odd, interagiert mit Lin, was evtl. auf eine Interaktion zwischen Osr1/2 und Lin-ähnlichen Genen bei höheren Genen schließen lässt (Johansen 2003).

1.2.2. Osr1 in höheren Organismen

Es wurden 2 in der Maus homologe Gene beschrieben: *Odd-skipped related 1* und 2 (*Osr1* und *Osr2*) (Lan et al., 2001; So and Danielian, 1999). *Osr1* und *Osr2* wurden im Huhn (Wilm et al., 2004) und im Vergleich zur Maus von Stricker (2006) untersucht. Auch im Menschen (Katoh, 2002; Debeer, 2002), *Caenorhabditis elegans* (Buckley et al., 2004), *Xenopus* und Zebrafisch (Tena et al, 2007) wurden zu Odd homologe Gene gefunden. Tena fand eine Funktion von *Osr1* als transkriptionellen Repressor in der Entwicklung von Pro- und Mesonephros von *Xenopus*

und Zebrafisch. Eine Inhibition führte zu Verlust von renalen Tubuli und Nephronen, eine ektope Aktivität von Osr1 führte in begrenzten Bereichen zu ektoper Bildung von Nierengewebe. In der Maus wurde Osr1-Expression im intermediären Mesoderm (siehe Abb. 1.3), Nieren, Extremitäten und Schlundbögen gesehen.

Huang (2004) identifizierte Osr1 als einen Faktor, der die Aktivität von p53 hochreguliert. Dies geschieht durch Unterdrückung des HDM2-gesteuerten proteosomalen Abbaus von p53. Der Transkriptionsfaktor p53 ist ein Tumor-Suppressor-Gen, das bei sehr vielen Tumoren entweder direkt mutiert ist (in 50 % aller menschlichen Neoplasien) oder dessen Netzwerk durch andere Mechanismen beeinträchtigt ist. p53 reguliert die Zellproliferation negativ und ist an Apoptose und Zellzyklus-Unterbrechung beteiligt. Eine Überexpression durch RCAS-Osr1 (injiziert in die Lateralplatte bei HH14) führte in 36 % der Fälle zu einer verkürzten Extremität, der Elemente des Autopodiums oder Zeugopodiums fehlten. In diesen Bereichen wurde auch eine erhöhte Apoptoserate gefunden.

Bei Osr1-Nullmutanten fand Wang (2005) Defekte in der Herzentwicklung und des Perikards. Nebennieren, Metanephros und Gonaden wurden nicht gebildet. Mesonephros-Elemente und der Wolff-Gang waren vermindert und deformiert. Es fand sich eine stark erhöhte Apoptoserate im nephrogenen Mesenchym. Im Herzen waren die Vorhöfe erweitert, wurde das atriale Septum nicht gebildet und die venösen Klappen waren hypoplastisch. Es kam zu venösem Rückstau und fast alle homozygoten Nullmutanten starben im Stadium E11.5 bis E12.5. Die Gene Nkx2.5, Pitx2 und Tbx5, die mit der Entwicklung des Vorhofseptums assoziiert sind, waren in der Expression nicht verändert, wobei Lhx1, Pax2 und Wt1 (Wilms Tumor Suppressorgen), die das frühe intermediäre Mesoderm steuern, herunterreguliert waren. Der Phänotyp von homozygoten Wt1-Nullmutanten ähnelt sehr stark dem von homozygoten Osr1-Nullmutanten, so dass auch Osr1 ein interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen im Zusammenhang mit Nierentumoren ist.

1.3. Vorarbeiten

In der Arbeitsgruppe wurden zuvor replikationskompetente Retroviren, die die infizierten Zellen Osr1 exprimieren lassen, erzeugt. Dieses Virus aus der Gruppe der ASLVs (avian sarcoma and leukaemia viruses) wurde mit Hilfe des RCAS-Systems erzeugt. Es gestattet ein zu exprimierendes Gen in ein Plasmid einzufügen, das dann Fibroblasten in einer Zellkultur dazu programmiert das Virus zu produzieren. Die Viren wurden dann aus zentrifugiertem Zellkulturmedium gewonnen (Morgan und Fekete, 1996).

Die Eier wurden am Tag 1,5 geöffnet und bei Embryonen im Stadium HH10 das Virus mit einer Kapillare in den Bereich des Embryonen injiziert, aus dem später die untere Extremität entsteht. Die Eier wurden mit Klebeband wieder verschlossen und weiter inkubiert.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Funktion des Transkriptionsfaktors Osr1 näher untersucht werden. Im Modellorganismus Huhn sollen die Expressionsmuster in einer Zeitreihe untersucht werden. Die räumliche Beziehung von Osr1-exprimierendem Gewebe zu Muskeln und Sehnen soll sowohl beim ganzen Embryo als auch in Schnitten dargestellt werden. Osr1 soll auch mit Genen verglichen werden, die häufig in Entwicklungs-Signalpfaden anzutreffen sind. Neben der normalen Aktivität von Osr1 in der Embryogenese soll auch untersucht werden, wie sich eine ektope Osr1-Expression auswirkt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Binokular-Mikroskop MZ 6 (Leica, Bensheim, D.)

BioPhotometer 6131 (Eppendorf, Hamburg, D.)

Brutschrank BSS300 (Ehret, Emmendingen, D.)

Durchlichtmikroskop BX 60 (Olympus, Hamburg, D.)

Durchlichtmikroskop MZ 12 (Leica)

Feinwaage AT20 / PM 200 (Mettler Toledo, Giessen, D.)

Geldokumentationsfotoanlage CP770 DW (Mitsubishi El. Corporation, Sunnyvale, USA)

GeneAmp PCR-System 9700/9600/2400 (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Heiz-Magnetrührer (Ikamag)

Heizblock Ori-Block OV 3 (Techne, Minneapolis, USA)

Heizplatte (Leica)

Hybridisierungssofen OV 2 (Biometra, Göttingen, D.)

Hybridisierungssofen (Heraeus, Osterode, D.)

Mikroskopkamera DC 200 (Leica)

Kaltlichtlampe KL 1500 LCD (Leica)

Kühlzentrifuge 5417 R (Eppendorf)
Laborwaage (Fischer)
Mikrotom 2050 Supercut, Reichert-Jung (Cambridge Instr. GmbH, Nussloch, D)
Netzgerät Consort E 132 (Peqlab, Erlangen, D.)
Netzgerät Power Supply (Peqlab)
Paraffinheizgerät EG 1120 (Leica)
pH-Meter MP 220 (Mettler Toledo)
Taumelwipptisch WT 17 (Whatman Biometra)
Tischzentrifuge 5416 (Eppendorf)
Tischzentrifuge Biofuge A (Heraeus)
Trockenschrank T 6060 (Heraeus)
UV-Transilluminator RH-5.1 (Herolab, Wiesloch, D.)
Vakuumbzentrifuge Speed Vac SVC 100 H (Savant Instruments, USA)
Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)
Wärmeschrank ULM 400 (Mettler, Schwabach, D.)
Wasserbad GFL 1052 (Leica)
Wasserbad L + Temperaturregler D1 (Haake, Karlsruhe, D.)

2.1.2. Kits

DIG RNA Labeling Kit 1 175 025 (Roche, Mannheim, D.)
NucleoBond AX 500 Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, D)
NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel)

2.1.3. Sonstige Materialien

Entellan Eindeckmedium (Merck)
Erlenmeyerkolben (Schott)
Kaisers Glyceringelatine Eindeckmedium (Merck)
Chroma Spin-100-Columns (BD Biosciences/Clontech)
Deckgläser für Objektträger (Leica)
Mikrotomklingen (Leica)
Einbettförmchen (Roth, Karlsruhe, D.)
Einbettkassetten (Roth)

Embryonenlöffel (Fine science tools, Heidelberg, D.)
Glasflaschen (Schott, Mainz, D.)
Küvetten UVette 220-1.60 nm (Eppendorf)
Küvetten mit Objektträgerhalter (Roth)
Mikrotiterplatten mit Siebeinsätzen, Kat.-Nr. CLS3478 (Sigma)
Objektträger (Leica/Roth/Mariefeld)
PCR Reaktionsgefäße und Deckel, 8er Streifen (Applied Biosystems, Foster City, USA)
Pinzetten (Fine science tools)
Pipetten (Eppendorf/Gilson, Middleton, USA)
Pipettenspitzen (Bio-Rad, München, D.; Biozym, Hessisch Oldendorf, D.; Gilson)
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2,0 ml (Eppendorf)
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml (Greiner, Frickenhausen, D.)
Rührspatel (Sarstedt, Nümbrecht, D.)
SPF-Eier (Lohmann Tierzucht, Cuxhaven)
Thermo-Fotopapier K 65 HM-CE (Mitsubishi Electric Corporation, USA)

2.1.4. Reagenzien

3-(Triethoxysilyl)propylamin (Merck, Darmstadt, D.)
Aceton (Merck)
Agarose (Gibco BRL, Crewe, U.K.)
Ampicillin 100 mg/ml (Bayer, Leverkusen, D.)
Antikörper Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente (Roche)
Big Dye Terminator Mix (Applied Biosystems)
Blocking Reagent (Roche)
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3 indolyl-phosphatase) (Roche)
BM Purple AP-Substrat (Roche)
Chloroform (Merck)
Deoxycholat (Merck)
DEPC (Diethyl-Pyrocabonate) (Sigma)
Desoxynukleotidtriphosphate (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D.)
DIG-RNA-Labeling-Mix, 10x konz. (Roche)
DNA-Größenmarker 1000 BP + (MBI Fermentas)

EDTA (Sigma)
Eosin-Lösung (Sigma)
Essigsäure (Merck)
Ethanol p.a. (Merck)
Ethidiumbromid 10 mg/ml (Roth, GmbH, Karlsruhe, D.)
Extran (Merck)
Formamid (Merck)
Gel-Ladepuffer (MBI Fermentas)
Glutaraldehyd 25 % (Merck)
Glycin (Sigma)
Glyzerin (Merck)
Hämatoxylin-Lösung (Sigma)
HCl (Salzsäure) 1 M (Merck)
Heparin (Sigma)
Isopropanol (Merck)
Levamisol (Sigma)
Maleic Acid (Sigma)
Methanol p.a. (Merck)
NBT (Nitroblue tetrazolium chloride) (Roche)
Nonidet P40 (Fluka)
Paraffin (Leica)
Paraformaldehyd (Merck)
Phenol (Roth)
Proteinase K, 20 µg/µl (DEPC) (Roche)
Transkriptionspuffer 10x konz. (Roche)
tRNA (Typ III aus Bäckerhefe) (Sigma)
Tween 20, 10 % (DEPC) (Sigma)
Wasserstoffperoxid 30 % (Merck)
Xylol (Roth)
Zitronensäure (Sigma)

2.1.5. Enzyme mit dazugehörigen Puffern

DNase I 10 U/µl (Roche)

Pfu/Taq-DNA-Polymerase 10 U/μl (hauseigen)
Proteinase K 20 mg/ml (Boehringer, Mannheim, D.)
Restriktionsenzyme (10 U/μl) und entsprechende Puffer 10x (MBI Fermentas)
RNase-Inhibitor 40 U/μl (Roche)
SP6-RNA-Polymerase 20 U/μl (Roche)
T3-RNA-Polymerase 20 U/μl (Roche)
T7-RNA-Polymerase 20 U/μl (Roche)

2.1.6. Puffer und Lösungen

10xPBS
(2 g KCl; 2,4 g KH₂PO₄; 14,4 g Na₂HPO₄; 80 g NaCl; auf 1 l auffüllen; autoklavieren)

10xPCR-Puffer
(750 mM Tris (pH 8,8); 200 mM NH₄SO₄; 0,1 % Tween 20; 15 mM MgCl₂)

10xTN
(1 M Tris (pH 7,5); 1,5 M NaCl)

1xSSC
(0,01 M Natriumcitrat; 0,15 M NaCl; pH 7,8 mit NaOH einstellen)

1xTAE
(0,04 M Tris; 0,005 M Natriumacetat; 0,001 M EDTA; pH 8 mit Eisessig einstellen)

20xSSC
(3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat, auf pH 7,8 mit NaOH einstellen)

5xNTE
(2,5 M NaCl; 50 mM Tris (pH 8,0); 25 mM EDTA (pH 8,0))

6xLadepuffer
(60 % Glycerol; 60 mM EDTA; 0,09 % Bromphenolblau; 0,09 % Xylencyanol)

LiCl, 4 M

MgCl₂, 1 M

NaAc, 3 M

NaCl, 5 M

NaOH, 5 M

PFA 4 % in PBS

2.1.6.1. Lösungen für die Whole mount in-situ Hybridisierung

Alle Lösungen vor und während der Hybridisierung müssen mit DEPC hergestellt (bis auf RIPA) und autoklaviert werden.

DEPC-H₂O

0,1 % DEPC, über Nacht bei 37°C inkubieren, autoklavieren

10 x PBS

2 g KCl; 2,4 g KH₂PO₄; 14,4 g Na₂HPO₄; 80 g NaCl; pH auf 7,4 einstellen , auf 1 l mit DEPC-H₂O auffüllen; autoklavieren

PBST

100 ml 10 x PBS, 10 ml 10 % TWEEN 20 in DEPC-H₂O, DEPC-H₂O ad 1000 ml

tRNA

RNA Typ III aus Bäckerhefe (Sigma R 7125), 10 mg / ml in DEPC-H₂O, bei -20 °C lagern

Proteinase K-Puffer

10 ml 1M Tris, pH 7,0, 1 ml 0,5M EDTA, DEPC-H₂O ad 500 ml

PBST/Glycin-Lösung

PBST, Glycin 2mg / ml

RIPA-Puffer

2,5 ml DSD (10%), 15 ml NaCl (5M), 5 ml NP40, 2,5 mg Deoxycholat, 1 ml EDTA (0,5M), 25 ml Tris (1M, pH 8,0), DEPC-H₂O ad 500 ml, nicht autoklavieren, bei 4 °C lagern

Heparin-Lösung

100 mg/ml in 4x DEPC-SSC

Hybridisierungspuffer

25 ml Formamid, 12,5 ml 20 x SSC, pH 4,5, 25 µl Heparin-Lösung, 500 µl 10% TWEEN 20, DEPC-H₂O ad 50 ml

SSC/FA/T

100 ml 20 x SSC, 500 ml Formamid, 10 ml 10 % TWEEN 20, Aqua bidest. ad 1000 ml

RNase-Lösung

5 ml NaCl-Lösung (5M), 500 µl Tris-Lösung (1M, pH 7,5), 500 µl 10% TWEEN 20, H₂O ad 50 ml

5 x MABT

11,6 g Maleinsäure, pH mit 5M NaOH auf 7,5 einstellen, 8,7 g NaCl, 10 ml 10% TWEEN 20, H₂O ad 200 ml

Alkalische Phosphatase-Puffer

4 ml NaCl-Lösung (5M), 10 ml MgCl₂-Lösung (1M), 2 ml 10 % TWEEN 20, 20 ml Tris-Lösung (1M, pH 9,5), 100 mg Levamisol, H₂O ad 200ml

2.1.6.2. Lösungen für die Schnitt-in-situ-Hybridisierung

Hyb-Puffer

50 % Formamid, 1 % SDS, 50 µg/ml Hefe-RNA, 50 µg/ml Heparin, in der Endlösung 5 x SSC (pH 4,5)

Wash1

50 % Formamid, in der Endlösung 5 x SSC (pH 4,5), 1% SDS

Wash2

50 % Formamid, in der Endlösung 5 x SSC (pH 4,5)

TBS 10x

80 g NaCl, 2 g KCl, 250ml 1 M Tris (pH 7,5), Aqua bidest ad 1 l

NTMT

20ml NaCl 5M, 100 ml Tris (pH 9,5) 1M, 50ml MgCl₂ 1M, 50 ml TWEEN20 20%, Aqua bidest. ad 1000ml

2.1.7. Bakterienstamm,-medien und Vektor

Bakterienstamm: *Escherichia coli* Stamm TOP 10 (Invitrogen)

LB Medium

(10 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Hefeextrakt; 10 g NaCl; auf 1 l mit H₂O auffüllen; pH 7,5; autoklavieren)

LB-Agar

(LB-Medium; 1,5 % Bacto-Agar (w/v); autoklavieren)

pBlueScript SK- (pBS SK-) (Stratagene)

pTA-gfp (hauseigen)

2.1.8. Computerprogramme

Bildbearbeitung: Adobe Photoshop 7, Corel Draw 11, Windows Paint

Digitale Fotografie: Axio Vision 4; Leica DC Viewer

Gelfotodokumentation: EASY Win32

Sequenzalignment und -auswertung: Seqman (DNA-Star)

3D-Rekonstruktion: SurfDriver

2.2. Methodik

2.2.1. Embryogewinnung und –verarbeitung

Die Eier der Art *Gallus gallus*, die dem Standard SPF (specified pathogen free) entsprechen, werden nach Lieferung bei +4 °C gelagert. Bei Bedarf werden sie in den 37 °C warmen Brutschrank gelegt um den Brutprozess zu beginnen. Im Brutschrank wird neben der Temperatur auch die Luftfeuchte geregelt, außerdem werden die Eier regelmäßig gedreht. Nach der gewünschten Inkubationszeit werden die Eier mit einer starken Lichtquelle durchleuchtet um die Lage des Embryonen festzustellen. Um diesen herum wird mit einer kleinen spitzen Schere die Eischale mit einem Durchmesser von ca. 1-2 cm entfernt. Die Eihäute werden eröffnet und der Embryo mit einer Pinzette oder einem Embryonenlöffel herausgehoben und in einer mit DEPC-PBS gefüllten Petrischale unter dem Binokularmikroskop zügig präpariert. Hierbei werden verbleibende Eihäute entfernt, und bei größeren Embryonen Kopf und Baueingeweide entfernt. Bei kleineren Embryonen werden die Hirnblasen mit einer Pinzette angestochen, da es sonst dort zu Farbstoffanreicherung während der Whole-mount-in-situ-Hybridisierung kommt. Die Embryonen werden in 4% PFA (pH 9,5, Basyuk et al., 2000) über Nacht fixiert und am

folgenden Tag 2 x 5 Min. in DEPC-PBST gewaschen. Die Altersstadien wurden entsprechend der gängigen Einteilung von Hamburger und Hamilton (HH) bestimmt (Hamburger, Hamilton, 1955 und Murray, Wilson, 1994). Die weiteren Schritte sind je nach späterer Verwendung unterschiedlich:

Für die Verwendung in Whole-mount-in-situ-Hybridisierungen werden sie 2 mal je 5 Min. in DEPC-PBST/Methanol (1:1) gewaschen und anschließend in Methanol überführt und darin für 5 Min. belassen. Alle Schritte werden auf einem langsam eingestellten Rütteltisch durchgeführt. Nachdem das Methanol erneuert wurde, können die Embryonen hierin bei – 20 °C gelagert werden.

für Paraffineinbettung und Mikrotomschnitte:

- 2 x 30 Min. in 70 % Ethanol (hierin lagern)
- 1,5 Stunden in 90 % Ethanol
- 1,5 Stunden in 95 % Ethanol
- 3 x 1,5 Stunden in 100 % Ethanol
- 2 x 15 Min. in Xylol
- 30 Min. in Xylol
- 3 Stunden in Xylol / Paraffin 1:1
- 3 Stunden in Paraffin

Die Embryonen werden in einer Metallform auf einer heißen Platte ausgerichtet, ein Plastik-Adapter aufgesetzt und nach dem Erkalten mit dem Mikrotom geschnitten. Die 7 µm dicken Schnitte werden mit einem Pinsel in das 37 °C warme Wasserbad überführt, von wo die Schnitte nach ca. 10 Min. mit einem silanisierten Objektträger aufgenommen werden. Anschließend werden sie über Nacht in einem Trockenschrank belassen.

2.2.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Objektträger mit den Schnitten werden durch folgende Küvetten geführt:

- 2 x 5 Min. in Xylol
- 2 Min. in 100 % Ethanol
- 2 Min. in 90 % Ethanol
- 2 Min. in 70 % Ethanol

- 5 Min. in Aqua dest.
- 3 Min. in Hämatoxylin-Lösung
- kurz mit Leitungswasser spülen
- 10 Min. in einer Küvette belassen, die leicht von fließendem Leitungswasser durchströmt wird
- kurz mit Aqua dest. spülen
- 3 Min. in frisch mit Essigsäure (0,5 ml auf 100 ml Eosin-Lösung) angesäuerter Eosin-Lösung
- kurz mit Aqua dest. spülen
- kurz in 70 % Ethanol
- 5 Min. in 90 % Ethanol
- 5 Min. in 100 % Ethanol
- 2 x 5 Min. in Xylol

Aus der Xylol-Küvette die Objektträger schräg auf ein Tuch tupfen um überschüssiges Xylol zu entfernen, Entellan am Rand mit einem Glasstab auftragen und mit einem Deckglas bedecken.

2.2.3. RNA-Sondenherstellung

Für die Sondenherstellung wurden unter anderen folgende Plasmide verwendet:

Tabelle 2.1: Plasmide zur RNA-Sondenherstellung

Gen	Quelle	Vektor	Antisense Promoter	Linearisierungsenzym
Osr1	ChEST	pBS II KS+	T3	NotI
MyoD	T. Braun	pBS KS+	T3	PsfI
Scx	Tabin	pBS SK	T3	HindIII
BMP4	Tabin	pBS SK	T3	BamHI
BMP2	Tabin	pBS SK	T3	HindIII
BMP7	Tabin	pBS SK+	T3	XhoI
Fgf8	Hartmann	pBS SK-	T7	EcoRI
Msx2	Hartmann	pBS SK	SP6	EcoRI
Myf5	T. Braun	pBS KS+	T7	HindIII
Follistatin	Patel	pBS SK	T7	HindIII
EphA3	Iemura	pBS SK-	T7	EcoRI
EphA4	Iemura	pBS SK-	T3	SalI
Eya2	Tomarev	pBS SK	T7	NotI
Collagen12	selbst	PCR-Produkt	T7	- (PCR-Produkt)
NR13	selbst	pGFP	T7	HindIII
Dkk1	Tabin	pBS SK	T3	SalI

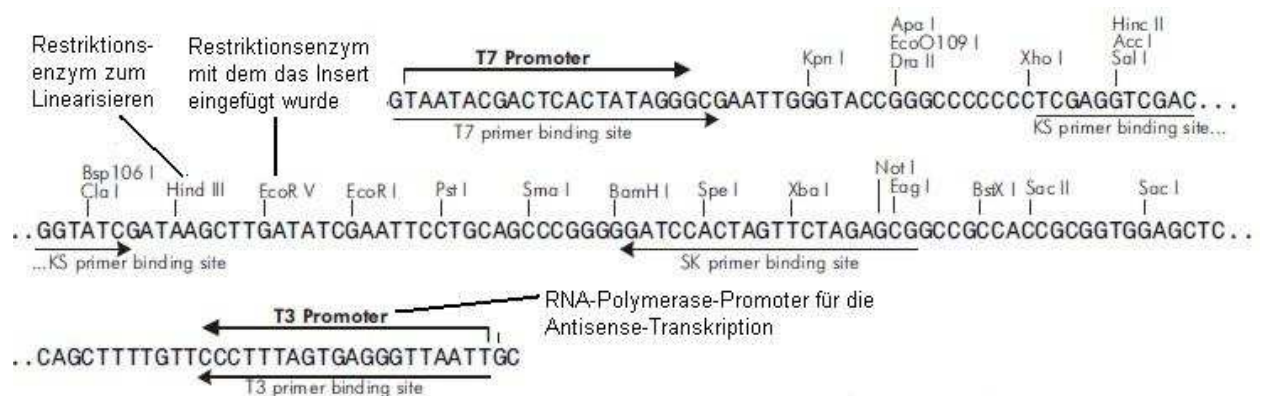


Abb. 2.1: Multiple-cloning-site des Vektors pBS SK +/- am Beispiel von Scx (modifiziert aus dem Datenblatt des Vektors, Stratagene)

2.2.3.1. Sondenherstellung Osr1

2.2.3.1.1 EST-Datenbank-Recherche

Es wurde die Osr1-Sequenz der Maus mit Hilfe des BlastN-Algorithmus mit einer Huhn-EST-Datenbank verglichen (<http://chick.umist.ac.uk>, Boardman et al., 2002). Die ESTs 3K9 und 257G13 wiesen eine hohe Übereinstimmung auf und wurden bestellt (dies wurde bereits als Vorarbeit durchgeführt).

2.2.3.1.2. Transformation

Die eingehenden auf Filterpapier aufgetropften Plasmide aus der ChEST-Bank oder aus anderen Arbeitsgruppen wurden ausgeschnitten und 5 Min. in 50 µl H₂O gelöst. Für die Transformation wurden 10 µl davon mit 100 µl kompetenten E.coli-Bakterien des Stamms TOP10 für 30 Min. auf Eis gestellt und dann für exakt 2 Min. bei 42 °C inkubiert. Dabei nahmen die Bakterien die Plasmide auf. Nach dem Hitzeschock wurde 500 µl LB-Medium mit Ampicillin (100 mg/ml) zugegeben und zur Vermehrung bei 37 °C für eine Stunde auf einem Rütteltisch inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 100 µl auf eine LB-Agar-Platte, die Ampicillin in einer Konzentration von 100 mg/ml enthält, mit einem sterilen Instrument ausgestrichen. Die restliche Flüssigkeit wurde auf einer zweiten Platte ausgestrichen und beide Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert

2.2.3.1.3. Plasmidpräparation für die Sequenzierung

Durch die Anwesenheit von Ampicillin wurden diejenigen Bakterien selektioniert, die das Plasmid aufgenommen und damit eine Ampicillin-Resistenz erworben haben. Diese bildeten eine Kolonie, die mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium mit 100 mg/ml Ampicillin überführt wurden. Die Bakterien wurden auf einem Rütteltisch über Nacht bei 37 °C vermehrt. Am nächsten Tag wurden die Plasmide mit dem Nucleospin Plasmid DNA Purification Kit nach Anleitung des Herstellers aus den Bakterien extrahiert und gereinigt. Dabei wurde ein Teil der Bakteriensuspension aufbewahrt um daraus einerseits einen großen Ansatz beimpfen zu können und andererseits diesen Stamm zu konservieren. Dazu wurden 500 µl Bakteriensuspension mit 500 µl Glycerin in einem Mikrozentrifugengefäß kräftig gemischt, dies Gefäß kurz in flüssigen Stickstoff gegeben und dann bei - 80 °C gelagert.

2.2.3.1.4. DNA-Sequenzierung

Es muss kontrolliert werden, ob die Plasmide die richtige DNA-Sequenz enthalten und in welcher Orientierung die Inserts in der Multiple-cloning-site liegen. Dies wurde nach der Didesoxymethode von Sanger durchgeführt. Hierzu wurde die Plasmidpräparation mit einer Konzentration von ca. 200 ng/µl (bzw. µg/ml) verwendet. Als Primer wurden je nach Ausrichtung des Inserts T7-Primer (Sequenz: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -'3) oder T3-Primer (Sequenz: 5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG -'3) verwendet. Diese Primer kodieren für die komplementäre Sequenz der T7/T3-RNA-Polymerase-Promotoren, die in den Plasmiden zur Transkription um die Multiple-cloning-site angeordnet sind.

Der PCR-Reaktionsansatz bestand aus:

- 2 µl Big Dye Terminator Mix
- 1 µl Plasmidpräparation
- 2 µl Primer (10 pmol / µl)
- 5 µl Aqua bidest.

Die Reaktion wurde als Hot-Start-PCR ausgeführt, d. h. die Proben wurden erst in den Cycler eingesetzt wenn dieser die programmierte Temperatur erreicht hatte. Die PCR-Cycle-Parameter lauteten:

Tabelle 2.2: PCR-Programm für die Sequenzierung

Schritt	Temperatur	Zeit
Pre-Denaturation	96 °C	1 Min.
Denaturation	96 °C	20 Sek.
Annealing	50 °C	10 Sek.
Extension	60 °C	4 Min.

} 35 Zyklen

Bei dieser PCR wurden die im Big Dye Terminator Mix neben den normalen Desoxynukleotiden auch Didesoxynukleotide, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, eingebaut. Nach solch einem Einbau bricht die weitere Amplifikation ab. Da dies an vielen unterschiedlichen Stellen geschieht, entstehen unterschiedlich lange Fragmente, die mit einem für die letzte Base spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.

Das PCR-Produkt wurde mit 25 µl 100 % Ethanol p.a. gemischt. Nach 10 Min. wurde mit 4000 Upm für 60 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Reaktionsgefäß kopf über auf ein Tuch gedrückt. Es wurden 100 µl 70 % Ethanol hinzugegeben und das Reaktionsgefäß vorsichtig geschwenkt. Nach Zentrifugation mit 4000 Upm für 30 Min. wurde der Überstand abgenommen. Nun wurden alle Schritte ab der Zugabe von 100 % Ethanol wiederholt. Die Flüssigkeit wurde durch Zentrifugation mit auf dem Kopf stehenden Reaktionsgefäßen für 20 Sek. bei 2500 Upm entfernt.

Dieses Pellet wurde in der hauseigenen Sequenzierabteilung weiterverarbeitet. Dort wurden die unterschiedlich langen DNA-Stränge per Gelelektrophorese-Kapillaren aufgetrennt und mittels Laser die jeweilige Base über den spezifischen Fluoreszenzfarbstoff bestimmt.

2.2.3.1.5. Plasmidpräparation für die Sondenherstellung

Wenn die DNA-Sequenz des Inserts in den Plasmiden korrekt war wurde mit der aufbewahrten Bakteriensuspension dieses Stammes ein Erlenmeyerkolben mit 250 ml LB-Medium (mit 100 mg/ml Ampicillin) beimpft und über Nacht inkubiert. Die Plasmide wurden am folgenden Tag mit einem Nucleobond AX 500-Kit laut den Herstellerangaben extrahiert und gereinigt. Am Ende betrug die DNA-Konzentration ca. 3500 µg/ml.

2.2.3.1.6. Plasmidlinearisierung

- 30 µg Ausgangsplasmid mit 5 µl spezifischem Restriktionsenzym in 10 µl enzymespezifischen Puffer in einem Endvolumen von 100 µl bei 37 °C für 3 Stunden inkubieren
- 5 µl Proteinase K (Endkonzentration 200 µg/ml) hinzufügen
- DEPC-H₂O ad 500 µl
- eine Stunde bei 37 °C inkubieren
- dazu 500 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) geben, schwenken
- 5 Min. bei 12.000 Upm zentrifugieren
- die obere Phase in ein anderes Eppendorfgefäß überführen
- dazu 500 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1) geben, schwenken
- 5 Min. bei 12.000 Upm zentrifugieren
- die obere Phase in ein anderes Eppendorfgefäß überführen
- 50 µl Natriumacetatlösung (3M, pH 5,2) hinzufügen und schütteln
- 1000 µl Ethanol 100 % hinzufügen
- 30 Min. bei – 20 °C belassen
- 30 Min. bei 14.000 Upm zentrifugieren, danach sofort die Flüssigkeit auskippen und leicht ausklopfen
- zum Pellet 1 ml Ethanol 70 % in DEPC-H₂O geben
- 20 Min. bei 14.000 Upm zentrifugieren, Flüssigkeit mit Pipette absaugen
- zum Pellet 1 ml Ethanol 70 % in DEPC-H₂O geben
- 20 Min. bei 14.000 Upm zentrifugieren, Flüssigkeit auskippen
- 3 Min. in einer Vakuumzentrifuge bei 12.000 Upm trocknen
- Pellet mit 25 µl DEPC-H₂O lösen (lagerbar bei – 20 °C)
- zur Kontrolle 5 µl hiervon mit 1 µl des ungeschnittenen Materials auf einem 1 %igem Agarosegel vergleichen (jeweils mit 2 µl Ladepuffer und 5 µl H₂O)

2.2.3.1.7. Gelelektrophorese

Diese Methode erlaubt es hochmolekulare Stoffe ihrer Größe nach aufzutrennen. Die negativ geladene DNA wandert in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell zur Anode. Die Nukleinsäuren werden durch Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht

sichtbar gemacht. Durch paralleles Auftragen eines Gemisches von Fragmenten bekannter Größe kann die Länge der Proben abgeschätzt werden.

Zur Herstellung der Gele wurde 1 % Agarose in 1 x TAE in einem Mikrowellenofen gelöst und mit Ethidiumbromidlösung (5 µl einer Lösung von 10 mg / ml Ethidiumbromid pro 100 ml Agaroselösung) versetzt. In die Taschen des erkalteten Gels wurde ein Gemisch aus 8 µl Probe und 2 µl Ladepuffer (der die Dichte erhöht) gegeben. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit TAE gefüllten Kammer bei 100 V für 20-60 Min. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

2.2.3.1.8. Sondentranskription

Von der Plasmid-DNA wurde durch die RNA Polymerase durch In-vitro-Transkription eine durch Digoxigenin markierte einzelsträngige RNA-Probe erzeugt. DIG-11-UTP wurde dabei in ca. jeder 20. Position des Transkripts eingebaut.

Auf Eis wurden 1 µg linearisierte Plasmid-DNA oder PCR-Produkt, 2 µl DIG RNA labeling mix 10x und 2 µl Transkriptionspuffer 10x in ein Mikrozentrifugengefäß gegeben und mit DEPC-H₂O auf insgesamt 18 µl aufgefüllt. Dann wurde je nach Sonde 2 µl T7-, SP6- oder T3-RNA Polymerase (20 U/µl) zugegeben, gemischt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Um die Template-DNA zu entfernen wurden 2 µl DNase I hinzugefügt, bei 37 °C für 15 Min. inkubiert und danach mit 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) die Reaktion gestoppt. Es wurde mit DEPC-H₂O auf 100 µl aufgefüllt. Die RNA-Sonden wurden nun mit BD Chroma Spin 100-Säulen entsprechend der Vorgaben des Herstellers isoliert und auf einem 1 % Agarosegel per Gelelektrophorese auf Transkriptionserfolg geprüft. Sie konnten danach bei – 80 °C gelagert werden.

2.2.3.2. Sondenherstellung Collagen 12

Es wurde die Coding Sequence (NCBI Genbank Nr. 345059.1) der α1-Kette von Collagen 12 mit der bereits gespleißten mRNA-Sequenz (NCBI Genbank Nr. X61024.1) verglichen. Die in der coding sequence nicht vorhandenen Basen sind diejenigen, die in der 5'-Untranslated Region (UTR) oder 3'-UTR liegen. Für einen Abschnitt der 3'-UTR wurden Primer erzeugt, die einen Bereich von 338 Basen der Positionen 9593 bis 9930 der mRNA umfassen. Der Forward-Primer (Sequenz 5'-CTGGAAAAGATCGCTGTCAA-3') entspricht der mRNA, der Reverse-Primer (Sequenz 5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGCCCTGGGATAACTGAATG-3') ist entgegengesetzt zu dieser und mit komplementären Basen kodiert. Zusätzlich enthält er an

seinem 5'-Ende die T7-Promotersequenz 5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAGGG-3', so dass direkt dort die RNA-Polymerase für die spätere Sondenherstellung ansetzen kann.

Aus cDNA wurde mit Hilfe dieser Primer die zwischen ihnen liegende Sequenz amplifiziert.

Dazu wurde der Ansatz aus 3 µl cDNA (20 pmol / µl), je 3 µl Primer (1:10 verdünnt, 10 µM), 10 µl dNTP (je 12,5 mM), 10µl PCR-Puffer 10 x, 2 µl Taq-Polymerase (10 U/µl) und H₂O ad 100µl mit folgendem PCR-Programm verarbeitet:

Tabelle 2.3: PCR-Programm für die Sondenherstellung

Schritt	Temperatur	Zeit	
Pre-Denaturation	94 °C	5 Min.	
Denaturation	94 °C	30 Sek.	} 5 Zyklen
Annealing	61 °C	30 Sek.	
Extension	72 °C	45 Sek.	
Denaturation	94 °C	30 Sek.	} 30 Zyklen
Annealing	58 °C	30 Sek.	
Extension	72 °C	45 Sek.	
Extension	72 °C	7 Min.	

Das PCR-Produkt wurde in einer Agarosegelelektrophorese überprüft, über BD Chroma Spin 100-Säulen aufgereinigt und per Photometrie quantifiziert. Hiervon wurden wie im Abschnitt Sondentranskription angegeben RNA-Sonden hergestellt.

2.2.3.3. Sondenherstellung der anderen Sonden

Alle weiteren Sonden wurden wie im Abschnitt „Sondenherstellung Osr1“ beschrieben produziert, wobei der Arbeitsschritt EST-Bestimmung wegfällt.

2.2.4. Whole-mount-in-situ-Hybridisierung

Tag 1: Hybridisierung

- Embryonen in einem 50ml-Falcon-Gefäß von Methanol nach PBST überführen: jeweils 10 Min. in 75%, 50%, 25% Methanol/PBST (DEPC), auf Eis, auf langsam eingestellten Rütteltisch; jeweils Flüssigkeit abdekantieren und mit neuer Lösung auffüllen
- 2 mal je 10 Min. mit PBST auf Eis waschen

- mit 6% Wasserstoffperoxyd in PBST für 1 Stunde auf Eis bleichen
- 3 mal je 10 Min. mit PBST auf Eis waschen
- Proteinase K-Behandlung: 20 µg / ml Proteinase K in Proteinase K-Puffer auf einem Rütteltisch
- 2 mal je 5 Min. mit frisch hergestellter PBST/Glycin-Lösung waschen
- 2 mal je 5 Min. mit PBST waschen
- 3 mal je 5 Min. mit RIPA-Puffer waschen
- 3 mal je 5 Min. mit PBST waschen
- exakt 20 Min. mit 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd in PBS fixieren
- 3 mal je 5 Min. mit PBST waschen
- in Hybridisierungs-Puffer/PBST (1:1) bei Raumtemperatur für 10 Min. waschen
- in Hybridisierungs-Puffer bei Raumtemperatur für 10 Min. waschen
- mit Hybridisierungs-Puffer bei 65°C für 1 Stunde inkubieren
- Sondenlösung bei 80°C für 5 Min. denaturieren
- Embryonen über Nacht bei 65°C inkubieren mit einer Mischung aus:
 - je nach Signalintensität der Sonde 10-30 µl Sonde
 - 1 ml Hybridisierungspuffer
 - 10 µl tRNA-Vorratslösung (10 mg/ml)

Tag 2: Nicht gebundene Sonden entfernen, Antikörper-Bindung

- Hybridisierungspuffer und SSC/FA/T auf 65°C erwärmen
- Embryonen auf 12er-Mikrotiterplatten aufteilen
- 2 mal je 30 Min. mit Hybridisierungspuffer bei 65 °C waschen
- Embryonen abkühlen lassen
- 5 Min. bei Raumtemperatur mit Hybridisierungspuffer/RNase-Lösung (1:1) waschen
- 2 mal je 30 Min. bei 37 °C mit RNase-Lösung + 100 µg/ml RNase A inkubieren
- für 5 Min. bei Raumtemperatur in RNase-Lösung / SSC/FA/T (1:1) inkubieren
- Embryonen in SSC/FA/T auf 65°C erwärmen
- 2 mal je 5 Min. bei 65 °C mit SSC/FA/T waschen
- 3 mal je 10 Min. bei 65 °C mit SSC/FA/T waschen
- 6 mal je 20 Min. bei 65 °C mit SSC/FA/T waschen
- Embryonen abkühlen lassen

- für 10 Min. bei Raumtemperatur in SSC/FA/T / 1x MABT (1:1) waschen
- 2 mal je 10 Min. mit 1x MABT waschen
- Embryonen bei Raumtemperatur für 1 Stunde in einer 10%igen Lösung aus BBR (Boehringer's Blocking Reagent) in 1x MABT auf einem Rütteltisch inkubieren
- während der BBR-Inkubation folgende Lösung bei 4 °C für 1 Stunde auf einem rotierenden Rad lassen:
 - DIG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 (1 µl auf 5 ml)
 - 1 % BBR in 1x MABT
- Embryonen in dieser vorbereiteten Lösung bei 4 °C über Nacht inkubieren

Tag 3: Ungebundenen Antikörper entfernen

- 3 mal je 5 Min. bei Raumtemperatur mit 0,05% Levamisol in PBST waschen
- 8 mal je 30 Min. bei Raumtemperatur mit 0,05% Levamisol in PBST waschen
- Embryonen bei 4 °C über Nacht auf einem Wipptisch in 0,05% Levamisol in PBST lassen

Tag 4: Färbung

- 3 mal je 20 Min. mit frisch angesetztem Alkalische-Phosphatase-Puffer waschen
- Embryonen in eine neue Mikrotiterplatte überführen
- in jeden Napf der Mikrotiterplatte 1,5 ml BM Purple AP Substrat geben
- bei Raumtemperatur auf einem langsam eingestellten Rütteltisch in Aluminiumfolie eingewickelt bis zur gewünschten Farbintensität belassen
- evtl. über Nacht bei 4°C belassen
- 2 mal je 10 Min. mit Alkalische-Phosphatase-Puffer waschen
- in einer Lösung aus 4% PFA in PBS und 0,2% Glutaraldehyd fixieren
- Embryonen in 60 % Glycerin überführen

2.2.5. Schnitt-in-situ-Hybridisierung

Die Objektträger wurden in Küvettenhaltern durch folgende Küvetten geführt:

Tag 1

- 2 mal je 5 Min. Xylol
- 2 mal je 2 Min. Ethanol 100 %
- 2 Min. Ethanol 70 %
- 2 Min. Ethanol 50 %
- 2 Min. Ethanol 30 %
- 5 Min. PBS
- 15 Min. PFA 4% (50ml von 20% PFA in 250ml PBS)
- 5 Min. PBS
- 5 Min. Proteinase K 1 µg/ml
- 5 Min. Glycin 2 mg/ml (0.5g in 250ml PBS)
- 5 Min. PBS
- 15 Min. PFA 4% in PBS
- 10 Min. Essigsäureanhydrid 0.25% (625 µl in 250ml 0.1M Triethanolamin)
- 5 Min. PBS
- 15 Min. bei 65 °C Hyb-Puffer
- Über Nacht bei 70°C Sonde 10µl/500µl Hyb-Puffer

Tag 2

- kurz bei 65 °C Wash 1
- 15 Min. bei 65 °C Wash 1-1
- 15 Min. bei 65°C Wash 1-2
- 15 Min. bei 65°C Wash 1-3
- 15 Min. bei 65°C Wash 2-1
- 15 Min. bei 65°C Wash 2-2
- 15 Min. bei 65°C Wash 2-3
- 3 mal je 10 Min. TBST Wash (TBS, 1% TWEEN 20)
- 30 Min. Block 3g BBR/200ml TBST
- 2 Stunden aDIG Ab (1 µl Anti-Dig-Antikörper in 2 ml TBST)
- 4 mal je 15 Min. TBST
- 3 mal je 5 Min. NTMT (Frisches NTM, 1% TWEEN)
- 1-4 Tage NBT/BCIP (250µg/ml NBT, 125µg/ml BCIP in NTMT)

- Anschließend kurz mit PBS spülen um die Reaktion zu beenden.
- Die Objektträger werden mit der Kante auf saugfähiges Papier geklopft, an der Seite wird Kaisers Glyceringelatine mit einem Glasstab aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt.

2.2.6. Silansisierung von Objektträgern

Dieser Schritt verbessert die Haftung der Schnitte auf dem Objektträger. Dazu wurden sie über Nacht mit einer 15%igen Extranlösung vorgereinigt, zweimal mit Leitungswasser und einmal mit Aqua dest. gespült und bei 175 °C 2 Stunden getrocknet. Die Silanisierung fand in einer Lösung aus 3 % 3-Trietoxypropylamin in Aceton für mindestens 5 Min. statt. Danach wurden sie zweimal 5 Min. mit Aceton und einmal mit Aqua bidest. gespült und bei 45 °C über Nacht getrocknet.

2.2.7. 3D-Rekonstruktion

Von den Mikrotomschnitten wurde jeder zweite HE-gefärbt. Entweder jeder oder jeder zweite gefärbte Schnitt wurden mit einem Mikroskop mit 1,25 x Objektiv digital fotografiert. Diese Bilder wurden in das Computerprogramm Surfdriver eingelesen und die verschiedenen zu rekonstruierenden Strukturen auf jedem Bild einzeln manuell umrandet. Nach einer Korrektur der Lage der Schnitte übereinander wurde die graphische 3D-Rekonstruktion durchgeführt. Dieses 3D-Modell lässt sich in allen Richtungen drehen und es wurden aus verschiedenen Richtungen Bilder erzeugt.

Tabelle 2.4: Übersicht über das Ausgangsmaterial der 3D-Rekonstruktionen

Nr.	Alter	Extremität	Schnitte	fotografiert	Fotos
1	9,5 d	Re (Osr1-RCAS)	142	jeder	71
2	13,5 d	Re (Osr1-RCAS)	300	jeder	111 proximal, 150 distal
3a	13,5 d	Li (Kontrolle)	144	jeder zweite	36
3b	13,5 d	Re (Osr1-RCAS)	104	jeder zweite	51

3. Ergebnisse

3.1. Expressionsmuster von Osr1 in Whole-mount-In-Situ-Hybridisierungen

Um die räumliche und zeitliche Verteilung von Osr1-mRNA zu bestimmen, wurden Whole-mount-in-situ-Hybridisierungen mit einer Osr1-RNA-Sonde für 3½, 4½, 5½, 6½, 7½, 8½ und 9½ Tage alte Embryonen durchgeführt.

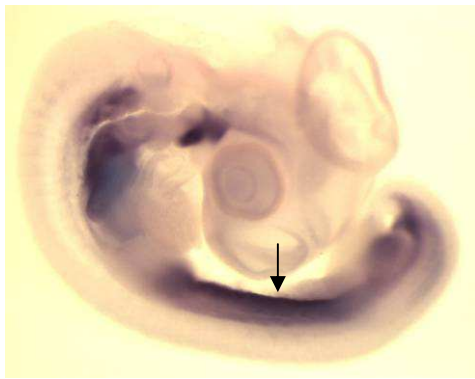


Abb. 3.1: Osr1-WMISH eines 3 ½ d alten Embryos
Stadium HH21, seitlich



Abb. 3.2: Osr1-WMISH eines 4 ½ d alten Embryos
Stadium HH25, seitlich

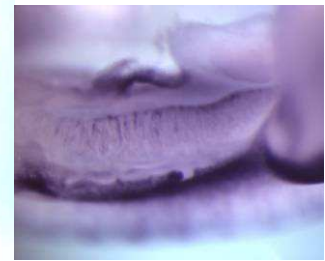


Abb. 3.3: Mesonephros des Embryos aus Abb. 3.2

Beim 3 ½ Tage alten Embryo (Abb. 3.1) fällt die Expression kaudal der oberen Extremität bis in die Schwanzspitze und ventral der Somiten auf (Pfeil). Dieser Bereich entspricht am ehesten dem Intermediär- und Lateralplattenmesoderm. Auch im Bereich der Somiten ist eine leichte Expression sichtbar. Weiterhin ist eine Expression im ersten Schlundbogen und in einem kegelförmigen Mesenchymbereich zwischen Auge und Schlundbögen nachweisbar. Auch im dorsalen Bereich des sich entwickelnden Herzens wird Osr1 exprimiert. In den gerade aussprossenden Extremitätenknospen stellt sich ein flaes kaudal betontes Signal dar. Einen Tag später (Abb. 3.2) sind die Extremitäten stark gewachsen und es findet sich ein detailreicheres Expressionsmuster. Am Ansatz der unteren Extremität ist sie sehr stark ausgeprägt, an der oberen Extremität weniger. An beiden findet sich im mittleren Teil radial und ulnar um eine ausgesparte Zone Expression. Auch an der Basis des späteren Autopodiums und am kaudalen Rand des Stylopodiums ist sie vorhanden.

Durch die gemeinsame Entfernung der Amnionhäute mit der Bauchhöhlendecke in die sie übergehen, ist der direkte Blick auf das Mesonephros freigegeben (Abb. 3.3). Hier zeigt sich eine um die Tubuli angeordnete Expression.

Weiterhin ist Osr1 kaudal des Auges und im Bereich der Schlundbögen exprimiert. Erstmals sind neben dem Intermediär- und Lateralplattenmesoderm auch die Somiten selbst angefärbt.

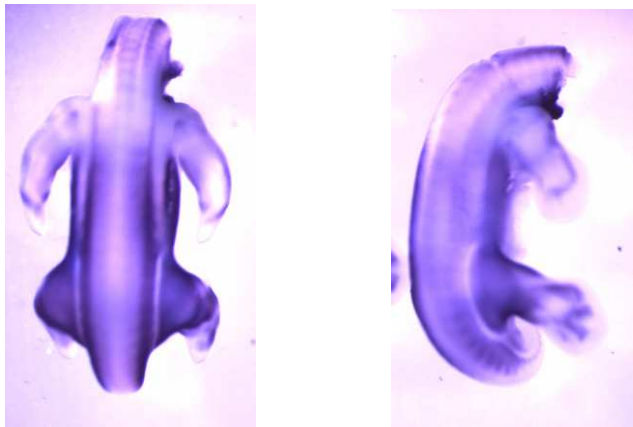


Abb. 3.4: Osr1-WMISH eines 5 ½ d alten Embryos
Stadium HH28, links: dorsal, rechts: seitlich

Bei 5 ½ d alten Embryonen (Abb. 3.4) findet sich bis auf Aussparungen an den Extremitäten und in einem schmalen Saum um den Ansatz der unteren Extremität am gesamten Körper eine Osr1-Expression. An der Basis der unteren Extremität und im Bereich zwischen der oberen und der unteren Extremität ist sie stärker ausgeprägt. Ab diesem Stadium wurden die Köpfe abgetrennt um die In-situ-Hybridisierung zu erleichtern. Es ist weiterhin eine segmentale Expression in den Somiten sichtbar.

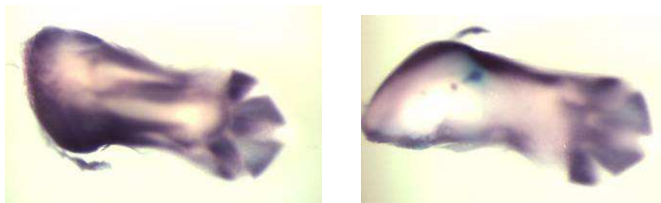


Abb. 3.5: Osr1-WMISH einer unteren Extremität eines 5 ½ d alten Embryos
Stadium HH28, links: dorsal, rechts: ventral

An abgetrennten unteren Extremitäten dieses Alters (Abb. 3.5) fallen scharf abgegrenzte Expressionsdomänen auf die den späteren Interdigitalräumen entsprechen und dreiecksförmig mit der Basis nach apikal liegen. Ventral und dorsal ist über den proximalen Phalangen liegende Expression zu sehen, die sich proximal mit den Expressionen der übrigen Phalangen vereinigt. Von dorsal gesehen sieht man Anfärbung um zwei längliche ausgesparte Strukturen.

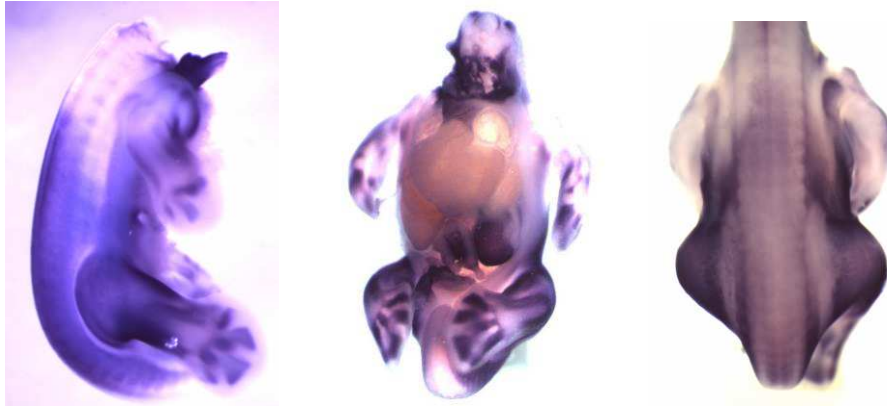


Abb. 3.6: Osr1-WMISH von 6 ½ Tage alten Embryonen

Stadium HH29, links: seitlich, Mitte: ventral mit eröffneter ventraler Leibeswand, rechts: dorsal

Bei 6 ½ Tage alten Embryonen (Abb. 3.6) hat sich die Aussparung um den Ansatz der unteren Extremität verbreitert und die flächige Expression ist auf die untere Körperhälfte konzentriert. Man erkennt weiterhin eine leichte segmentale Anfärbung am Rücken.

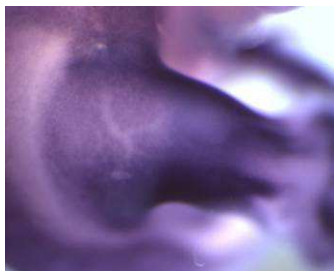


Abb. 3.7: Detailaufnahme einer Osr1-WMISH eines 6 ½ d alten Embryos

Stadium HH29, rechte unteren Extremität

An der Außenseite der proximalen unteren Extremität ist die flächige Expression durch ein gefäßartiges Muster ausgespart (Abb. 3.7), das so häufig gesehen wurde und mit den dicken Anteilen proximal lag und sich nach distal aufzweigte, so dass eher nicht von einem Artefakt durch Einrisse, sondern von einer Darstellung von Gefäßen auszugehen ist.

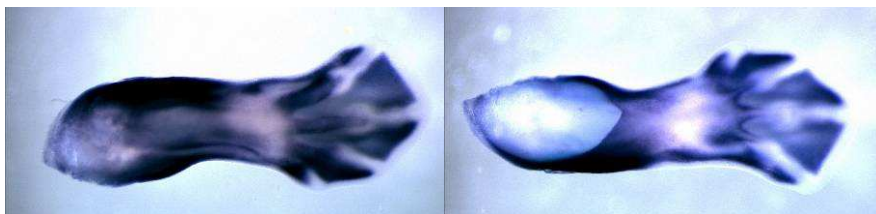


Abb. 3.8: Osr1-WMISH einer unteren Extremität eines 6 ½ Tage alten Embryos

Stadium HH29, links: dorsal, rechts: ventral

An der unteren Extremität bei 6 ½ Tagen zeigt sich das Muster von 5 ½ Tagen mit noch besserer Abgrenzung (Abb. 3.8). Die Aussparung an den Phalangen ist jeweils proximal kreisförmig erweitert. An dieser Stelle enden auf der dorsalen sowie auf der ventralen Seite die Ausläufer der

zweiten weiter proximal liegenden Osr1 exprimierenden Struktur. Auf der ventralen Seite geschieht dies eher spitz, dorsal eher plump. Am proximalen Ende der Extremität findet sich weiterhin flächige Osr1-Genaktivität.



Abb. 3.9: Osr1-WMISH eines 7 ½ d alten Embryos
Stadium HH32, links: dorsal, rechts: seitlich

Auch beim 7 ½ Tage alten Embryo (Abb. 3.9) ist sie in den proximalen Extremitäten zu sehen. Die dort vorher flächige Osr1-Expression erscheint nun jedoch in der Extremitätenlängsachse aufgefächert, so dass ein Zusammenhang mit der dort gleich angeordneten Muskulatur wahrscheinlich ist.

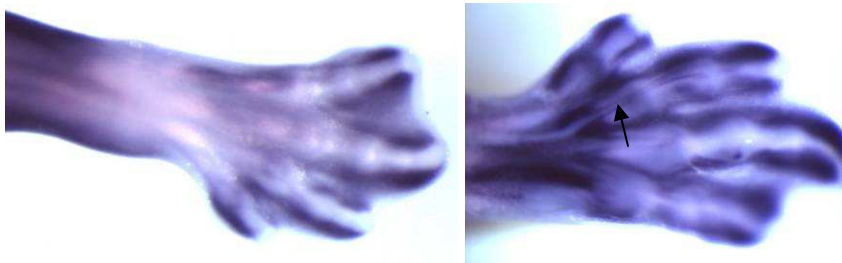


Abb. 3.10: Osr1-WMISH einer unteren Extremität von 7 ½ d alten Embryonen
Stadium HH32, links: dorsal, rechts: ventral, Pfeil: Osr1-Expression um die Sehnen

In der distalen unteren Extremität zeigt sich entlang den Phalangen, besonders von ventral gesehen, eine Aktivität aus zwei Streifen (Abb. 3.10, Pfeil), die offensichtlich mit den Sehnen assoziiert ist. Die interdigitale Expression ist entlang des Randes der einzelnen Phalangen verstärkt. Eine dreiecksförmige Struktur ist ventral ulnar am Übergang von Autopodium zu Zeugopodium zu sehen.

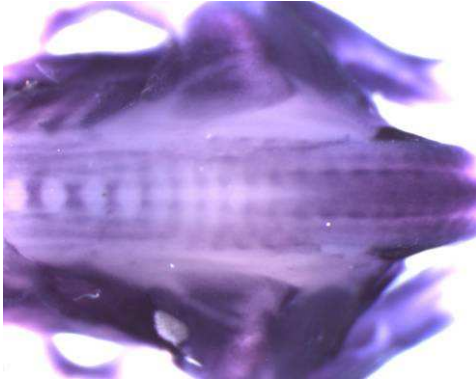


Abb. 3.11: Osr1-WMISH eines 8 ½ d alten Embryos
Stadium HH34, Ausschnitt dorsal

Das Muster entlang der Wirbelsäule bei 8 ½ Tagen (Abb. 3.11) ändert sich von kranial nach kaudal. Kranial der unteren Extremität gibt es in der Mitte quer liegende spindelförmige Strukturen, die sich mit Bereichen ohne Expression abwechseln. Daneben liegen beidseits zwei Längsstreifen. Auf Höhe der unteren Extremität ändert sich das Muster beim Individuum dieses Stadiums. Dort ist in der Mitte eine gleichmäßige Expression, die von einem perlschnurartigen Rand gesäumt ist, erkennbar.

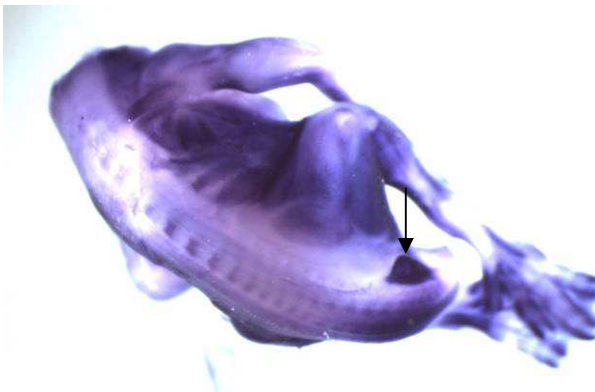


Abb. 3.12: Osr1-WMISH eines 8 ½ d alten Embryos
Stadium HH34, Pfeil: siehe Text, schräg dorsal

Die Auffiederung der Expression an den proximalen Extremitäten tritt bei 8 ½ Tagen (Abb. 3.12) deutlicher hervor und es ist eine deutliche Assoziation zu den Muskeln zu sehen. Der Rücken bleibt hingegen bis auf die Expression in der Mitte ausgespart. Lateral des Schwanzansatzes liegt beidseitig eine dreieckige Zone starker Osr1-Aktivität (Pfeil), die auch schon bei 7 ½ Tagen zu sehen war (Abb. 3.9).



Abb. 3.13: Osr1-WMISH einer unteren Extremität eines 8 ½ d alten Embryos
 Stadium HH34, oben: dorsal, unten: ventral

Im Bereich der Tarsalen und Phalangen nimmt die Expression bei 8 ½ Tagen ab (Abb. 3.13), es verbleiben streifenförmige Muster beidseits der distalen Phalangen, schwach entlang der distalen Sehnen und ausgeprägt vom Ansatz von Digitus IV bis zum proximalen Ende von Tarsale IV.

Bei älteren Embryonen wird die Anfärbung deutlich schwächer. Dies kann durch geringere Osr1-Expression oder durch kräftigere Haut und Bindegewebe verursachte abnehmende Sonden-Penetration verursacht sein.

3.2. Whole-mount-Expressionsmuster anderer Gene

3.2.1. Vergleich der Whole-mount-Expressionsmuster von Osr1 mit anderen Genen

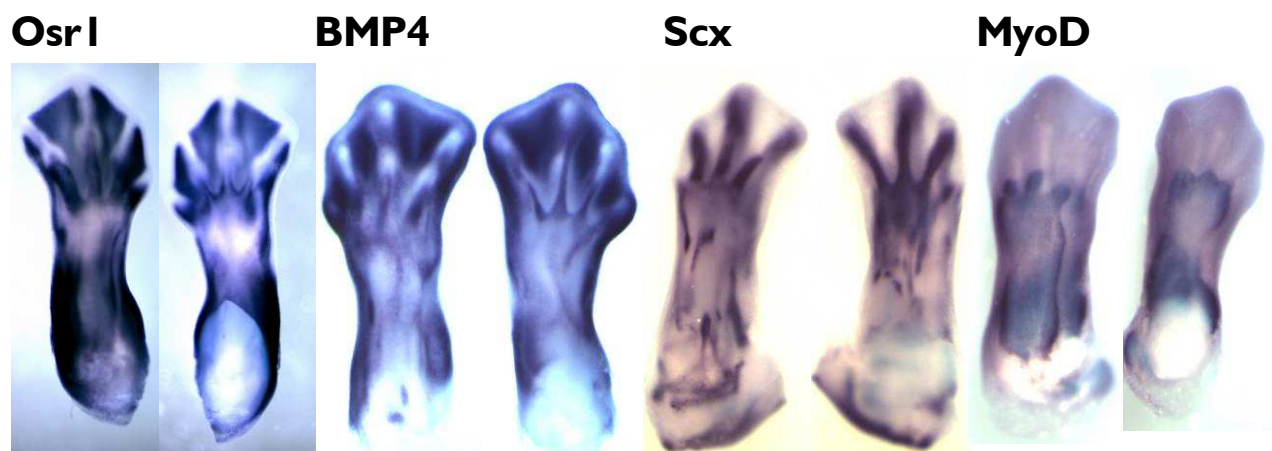


Abb. 3.14: WMISH von Osr1, BMP4, Scx und MyoD einer unteren Extremität von 6 ½ Tage alten Embryonen
 Stadium HH29, jeweils links: dorsal, rechts: ventral

Im Vergleich von WMISH der unteren Extremitäten von *Osr1* mit etablierten Markern für bestimmte Gewebe lassen sich die *Osr1*-exprimierenden Strukturen näher zuordnen (Abb. 3.14). Bei 6 ½ Tagen fällt die Ähnlichkeit der dorsal und auch ventral über den Phalangen liegende Struktur mit dem Muster der *Scx*-Expression, also dem Sehngewebe auf. Am proximalen Ende der über den Phalangen liegenden Strukturen nimmt die Expression ab, nachdem sie sich verbunden haben. Ab dieser Grenze beginnt die *MyoD*-Expression, die Muskelgewebe anzeigt. Der noch nicht aufgeteilte Muskelblock setzt sich weiter nach proximal hin fort. *BMP4* hat ein sehr ähnliches Expressionsmuster wie *Osr1*. Es finden sich ebenso die interdigitalen Bereiche starker Expression, wie auch die Strukturen die mit Sehnen assoziiert sind. Zusätzlich wird *BMP4* am distalen Rand, der ehemaligen *apical ectodermal ridge* exprimiert.

Osr1



BMP4



BMP7



Fgf8



Abb. 3.15: WMISH von *Osr1*, *BMP4* und *Fgf8* einer unteren Extremität von 7 ½ Tage alten Embryonen Stadium HH32, dorsal

Auch bei 7 ½ Tagen (Abb. 3.15) ist die Expression von *Osr1* und *BMP4* ähnlich. Die jeweils seitlich entlang der Phalangen liegende starke Expression findet sich bei beiden Genen, auch bei *BMP7* ist dies vorhanden. Die bei *BMP4* proximal vorhandenen V- und strichförmigen Muster sind bei *Osr1* ähnlich weiter distal zu sehen. Es ist jedoch nicht eindeutig ähnlich, so wie es im Vergleich zu *Fgf8* ist. Dort findet sich die V-förmige Struktur und der ulnarseitige Strich. *Fgf8* wird in Sehnen exprimiert (Edom-Vovard et al., 2001a), so dass das gleiche *BMP4*-Muster zumindestens mit Sehnen assoziiert ist. Auch *Fgf8* wird ebenso wie *BMP4* am distalen Rand exprimiert.

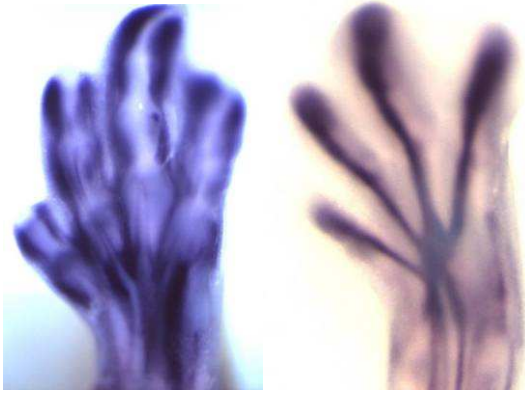


Abb. 3.16: WMISH von Osr1 (links) und Scx (rechts) einer unteren Extremität (7 ½ Tage)
Stadium HH32, ventral

An einer Ausschnittsvergrößerung einer WMISH von Osr1 und Scx bei 7 ½ Tagen (Abb. 3.16) lassen sich die über den Phalangen liegenden Osr1-exprimierenden Strukturen eindeutig Sehnen zuordnen. Osr1 wird jedoch nicht wie Scx, welches als Sehnenmarker verwendet wird, in den Sehnen exprimiert, sondern nur um sie herum, so dass nur die äußeren Ränder, die bei der Aufnahme tangential getroffen sind und somit eine höhere Anfärbdicke aufweisen, sichtbar sind.



Abb. 3.17: WMISH von Osr1 (links), Myf5 (Mitte) und Eya2 (rechts) von 5 ½ Tage alten Embryonen
Stadium HH28, dorsal

Bei 5 ½ Tagen Alter sind im Vergleich der Rückenstrukturen von Osr1, MyoD und Eya2 das perlschnurartige Muster von Osr1 auch bei den beiden anderen Genen zu sehen. Bei Myf5 liegt zusätzlich ein wellenförmiges, weiter medial liegendes Muster vor.

3.2.2. Weitere Whole-mount-Expressionsmuster

Für diverse andere Kandidatengene wurde das Expressionsmuster im Vergleich zu Osr1 bestimmt, die im Folgenden beispielhaft aufgeführt sind. Follistatin, EphA3, EphA4, Eya2, Collagen12 wurden in der Literatur als mit Sehnen assoziierte Gene beschrieben (siehe 1.1.2),

Scleraxis erwies sich jedoch als besserer Sehnenmarker. Für die restlichen Gene wurden keine Verbindungen zu Osr1 gefunden.

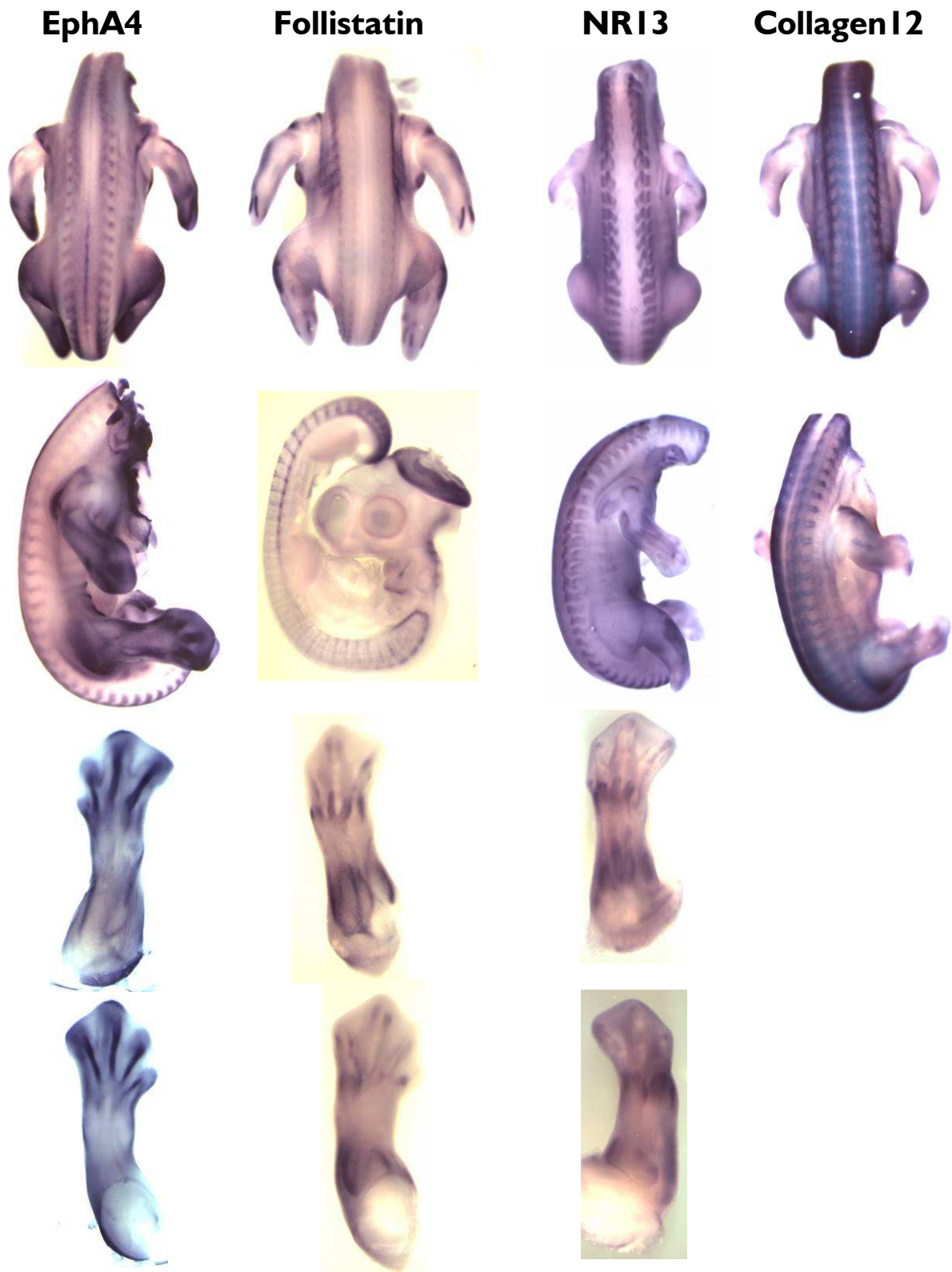


Abb. 3.18: WISH von EphA4, Follistatin, NR13 und Collagen12, von oben nach unten: von dorsal, seitlich, untere Extremität von dorsal, untere Extremität von ventral

3.3. Makroskopie nach Osr1-RCAS-Injektion



Abb. 3.19: Rechtes Bein eines 12 Tage alten Embryos mit Injektion von Osr1-RCAS auf dieser Seite Stadium HH38

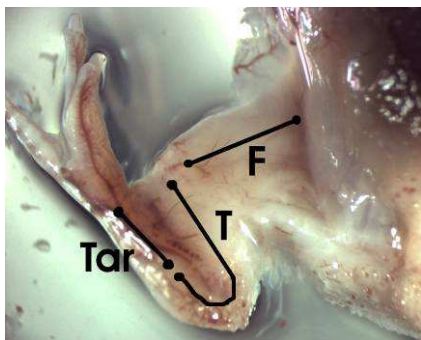


Abb. 3.20: Wie Abb. 3.19, zusätzlich nach Freipräparation bestimmte und eingezeichnete Lage des Femur (F), Tibia (T) und der Tarsale (Tar)

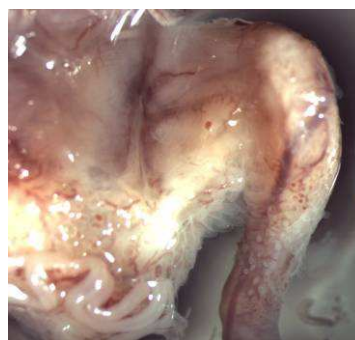


Abb. 3.21: linkes Bein des selben 12 Tage alten Embryo ohne Injektion auf dieser Seite

Nach ektopter Osr1-Expression während der Entwicklung des rechten Beines durch RCAS-Viren wurde der Embryo am Tag 12 getötet und untersucht. Das rechte Bein ist im Vergleich zur normalen linken Seite deformiert (Abb. 3.19 und 3.21). Die Blutgefäßversorgung ist nicht verändert. Nach Abpräparieren der Haut und Muskeln konnte die Lage von Femur, Tibia und der Tarsalen dem Bild zugeordnet werden (Abb. 3.20). Femur und Tarsale sind nicht beeinträchtigt, die Tibia hingegen weist in der distalen Hälfte einen Knick um 180° auf.

3.4. Whole-mount-Expressionsmuster nach Osr1-RCAS-Injektion

Um eine Beeinflussung der Lage und Muster der Sehnen bei ektopter Osr1-Expression zu untersuchen, wurde nach Osr1-RCAS-Viren-Injektion in den Bereich aus dem das rechte Bein hervorgeht der Embryo nach 9 ½ Tagen getötet und eine Whole-mount-in-situ-Hybridisierung mit einer Sonde für Scx durchgeführt (Abb.3.22). Bis auf die Verkürzung ist die Anordnung der Sehnen nicht verändert.



Abb. 3.22: WMISH für Scx eines 9 ½ Tage alten Embryo mit Injektion von Osr1-RCAS im Bereich der späteren rechten unteren Extremität Stadium HH36, von links (oben) und rechts (unten)

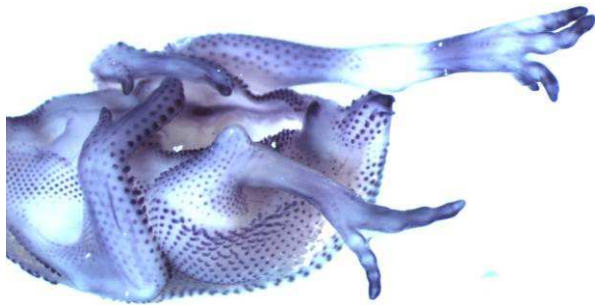


Abb. 3.23: WMISH für BMP4 eines 9 ½ Tage alten Embryo mit Injektion von Osr1-RCAS im Bereich der späteren rechten unteren Extremität Stadium HH36, von rechts

Es wurde auch eine WMISH für BMP4 mit gleichem Ausgangsmaterial wie oben beschrieben durchgeführt (Abb. 3.23). Auch hierbei findet sich keine Veränderung des Expressionsmusters von BMP4 an der deformierten rechten Extremität.

3.5. Expressionsmuster in Schnitt-in-situ-Hybridisierungen

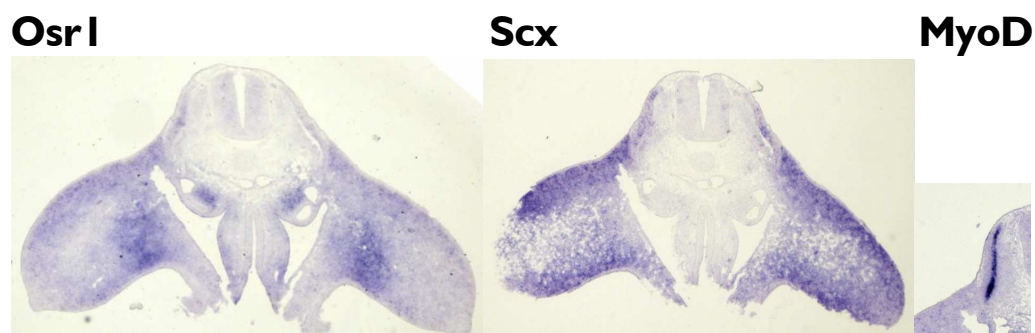


Abb. 3.24: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx und MyoD (Ausschnitt) Stadium HH22 (3,5 d), Vergrößerung 5x

Im Stadium HH22 (Abb. 3.24) lässt sich aufgrund der Lage von Myotom (durch MyoD markiert) zwischen Dermatome und Sklerotome die leichte Osr1-Aktivität im Bereich des Dermatome lokalisieren. Scx ist im Somit in einer ähnlichen Region wie Osr1 exprimiert.

Laterodorsal der Chorda dorsalis und der Aorta wird Osr1 stark im Bereich der Pro- und Mesonephros exprimiert.

In der kaudalen Extremitätenknospe ist in der oberflächlichen Schicht und proximal betont Aktivität zu sehen, die besonders am ventralen Übergang zum Torso stark ausgeprägt ist. Auch die Expression von Scx ist in den Extremitäten in den oberflächlicheren Schichten höher, es fehlt allerdings die Betonung am ventralen Übergang.

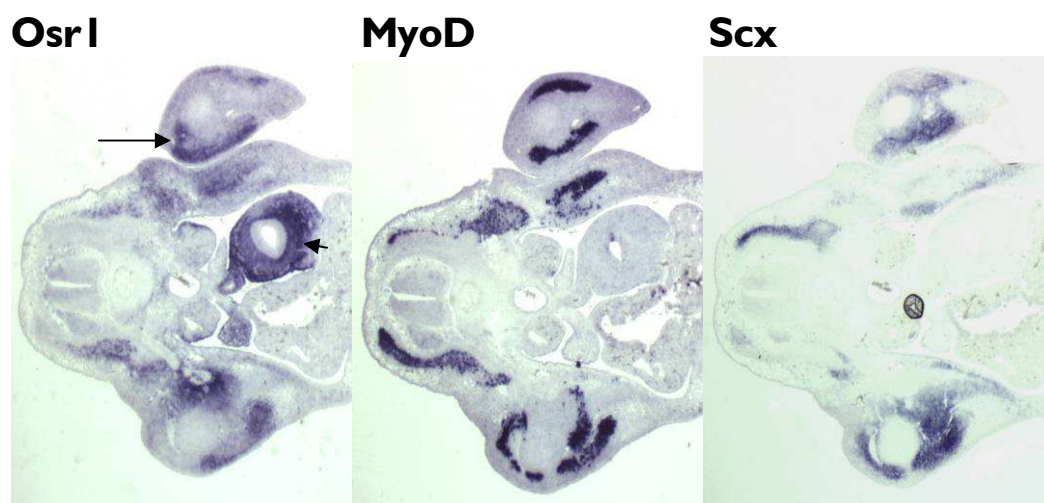


Abb. 3.25: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx und MyoD, Pfeile: siehe Text
 Stadium HH26 (4,5 d), Vergrößerung 2,5x



Abb. 3.26: Unterschiedliche nachträgliche Einfärbung der einzelnen Bilder und Überlagerung der Schnitt-in-situ-Hybridisierungen aus Abb. 3.25
 Stadium HH26 (4,5 d)

Auf diesen Schnitten des Stadiums HH26 (Abb. 3.25 und Abb. 3.26) wird Osr1 lateral des Myotoms exprimiert. Auffällig an der im Bild oberen Extremität ist der dem MyoD-exprimierenden Bereich anliegende Bereich von Osr1-Expression. Osr1 füllt den gesamten Bereich medial dieses Bereiches aus (Pfeil). Eine starke Osr1-Aktivität ist im Bindegewebe des Muskelmagens zu finden (Pfeilspitze), jedoch streng getrennt vom Epithel, wo es nicht zu finden ist. Auch im Stadium HH27 wird Osr1 lateral des Myotoms und nahe der Oberfläche exprimiert (Abb. 3.27).

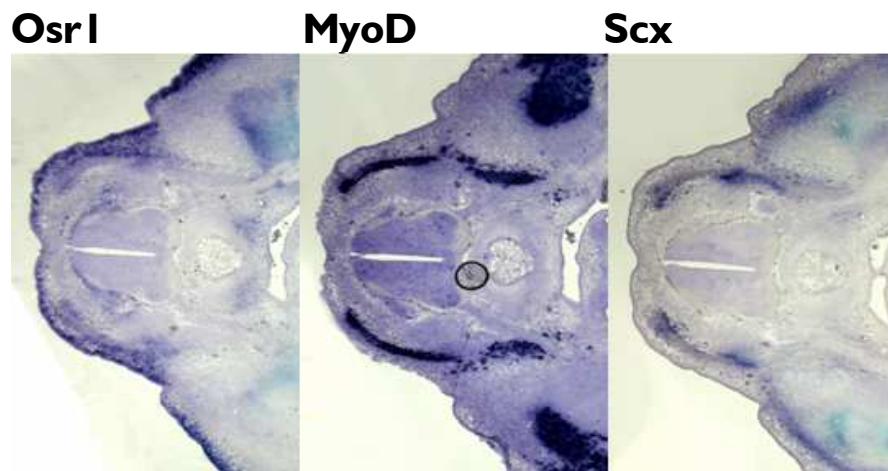


Abb. 3.27: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx und MyoD
Stadium HH27 (5 d), Vergrößerung 5x

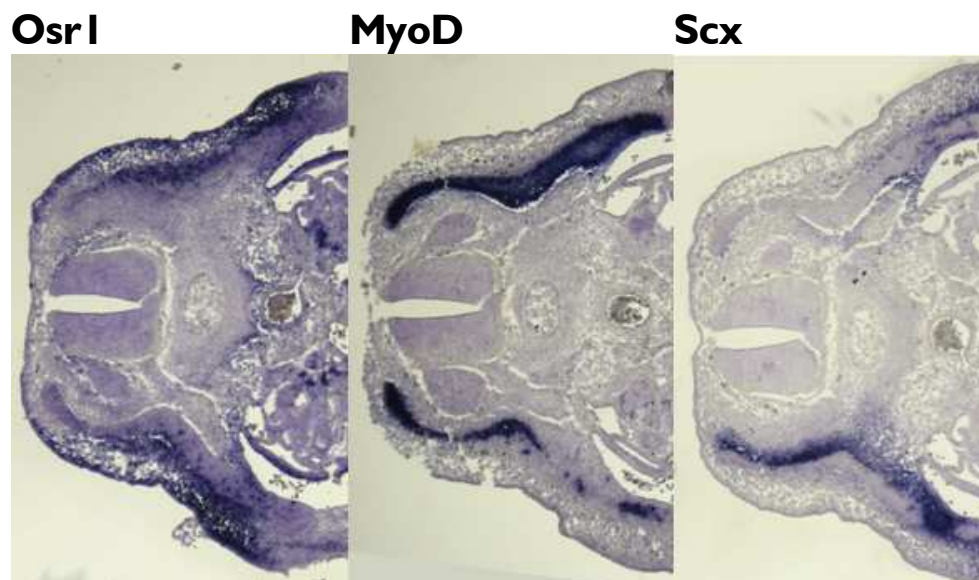


Abb. 3.28: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx und MyoD
Stadium HH28 (5,5 d), Vergrößerung 5x

Im späteren Stadium HH28 wird Osr1 stark dorsal an der Oberfläche und in den oberflächlichen Schichten bis zum Dermatome exprimiert (Abb. 3.28). Diese Expression reicht ventral bis über den Beginn der Leibeshöhle. Scleraxis wird medial des Myotoms exprimiert. Im oberen Teil ist wahrscheinlich kein Signal zu sehen, da der Schnitt schräg geführt wurde und in einem nicht Scx

exprimierenden Bereich liegt, was sich mit der starken Expression von MyoD in diesem Bereich und der alternierenden Expression der beiden Gene deckt. Osr1-Expression ist auch zu finden in der Membran, die die Mesonephros umhüllt, sowie im Ansatz der Mesonephros.

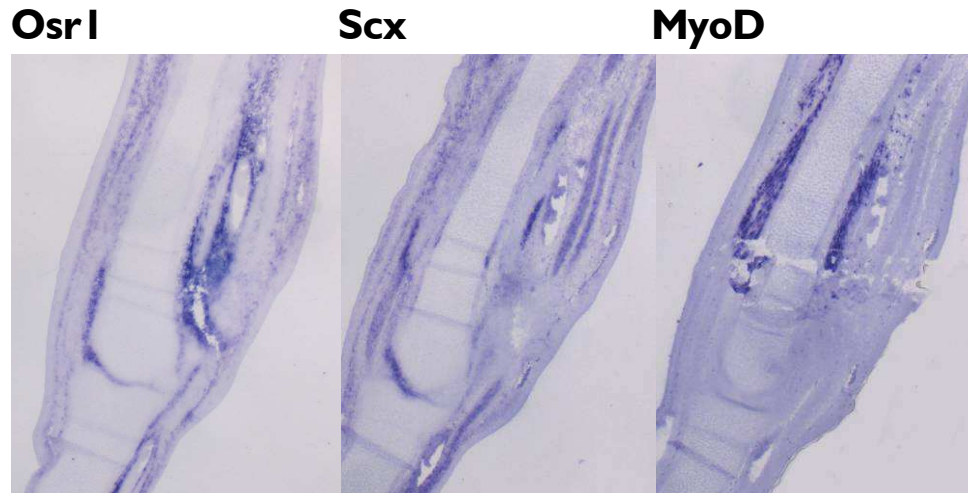


Abb. 3.29: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx und MyoD im Bereich des tibio-tarsalen Gelenks
Stadium HH36 (9 1/2 d), Vergrößerung 2,5x

In einem weiter fortgeschrittenen Stadium lassen sich die Expressionsmuster an ausdifferenzierten Geweben erkennen (Abb. 3.29). Hierbei wird wieder MyoD als Muskelmarker und Scx als Sehnenmarker verwendet. Osr1 ist nicht in Bereichen von Muskeln und Sehnen aktiv. Stattdessen ist es im, diese Strukturen umgebenden, Bindegewebe exprimiert. Keine Aktivität findet sich in Epidermis, Dermis und der oberflächliche Fettgewebsschicht.

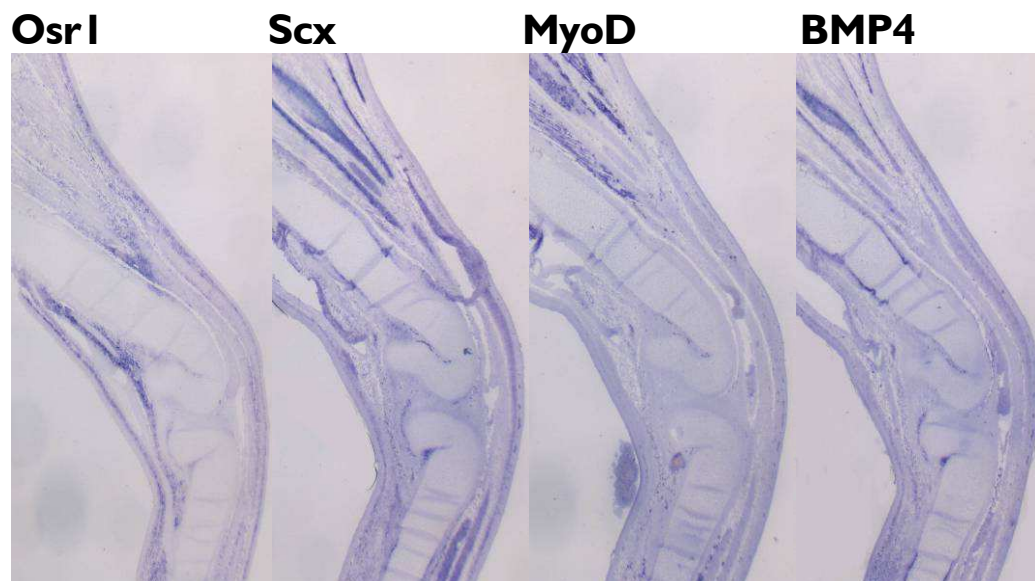


Abb. 3.30: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx, BMP4 und MyoD im Bereich des Kniegelenks
Stadium HH36 (9 1/2 d), Vergrößerung 2,5x

Auf diesen Schnitten (Abb. 3.30) ist die sich gegenseitig ausschließende Expression von Osr1, Scx und MyoD ebenfalls zu sehen. Osr1 wird in Bereichen exprimiert, deren Gewebe „locker“

erscheint und nicht so dicht ist wie Muskel- oder Sehngewebe. BMP4 zeigt in diesem Stadium eine Ähnlichkeit zu Scx.

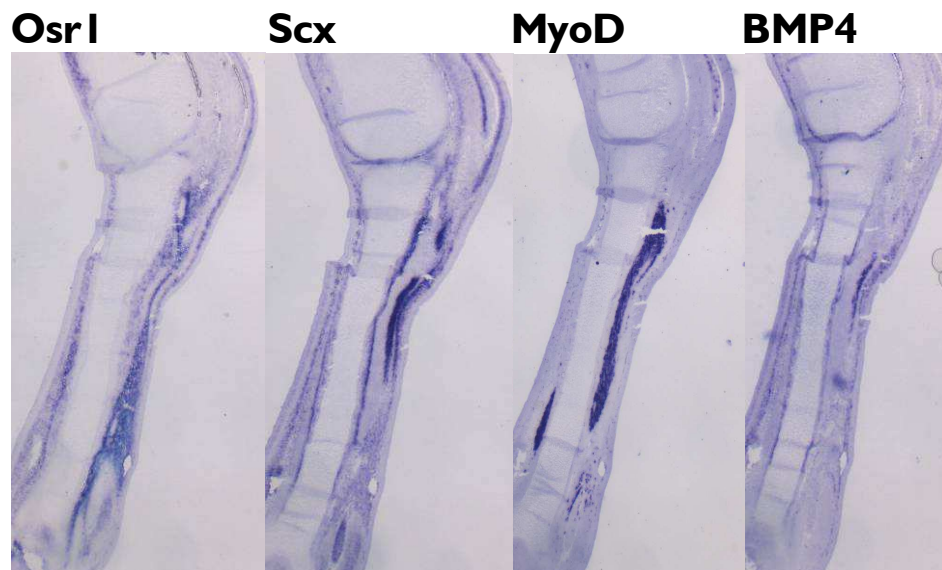


Abb. 3.31: Schnitt-in-situ-Hybridisierung von Osr1, Scx, BMP4 und MyoD im Bereich des tibio-tarsalen Gelenks
Stadium HH36 (9 ½ d), Vergrößerung 2,5x

In Abb. 3.31 lassen sich im Bereich des auf dem Bild rechten MyoD-Expressionstreifen im deckungsgleichen Bereich der Osr1-Expression einzelne punktförmige Bereiche von Osr1-Expression sehen. Andersherum sind auch in der MyoD-Expression kleine punktförmige Aussparungen zu sehen. Es ist somit möglich, dass auch innerhalb des Muskels sich gegenseitig ausschließende Bereiche der Expression von MyoD und Osr1 existieren.

3.6. Schnittmorphologie und 3D-Rekonstruktionen nach Osr1-RCAS-Injektion

Schnittserie Nr. 1: rechtes Bein, 9,5 Tage, Osr1-RCAS



Abb. 3.32: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 1 eines 9,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion
Vergrößerung 10x, Foto Nr. 23

Bei diesem 9,5 Tage alten Bein mit Osr1-RCAS (Abb. 3.32) ist makroskopisch und in der Rekonstruktion eine leichte Biegung in den Unterschenkelknochen zu sehen (Abb. 3.33). Muskelstruktur und –morphologie sind unauffällig.

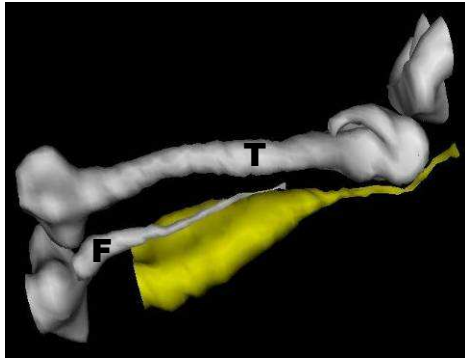


Abb. 3.33: 3D-Rekonstruktion aus der Serie 1 eines 9,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion
Tibia (T), Fibula (F), Muskel (gelb) teilweise dargestellt

Schnittserie Nr. 2: rechtes Bein, 13,5 Tage, Osr1-RCAS

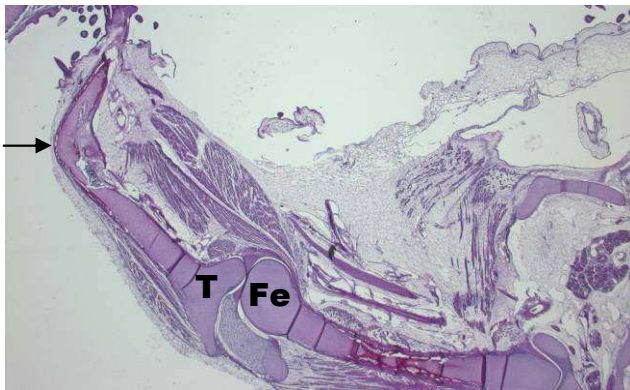


Abb. 3.34: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 2 eines 13,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion
Tibia (T), Femur (Fe), Vergrößerung 5x, Foto Nr. 63



Abb. 3.35: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 2 eines 13,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion
Vergrößerung 5x, Foto Nr. 21

In Abb. 3.34 ist ein starker Knick in der Tibia zu erkennen (Pfeil). Auf den Schnitten der Abb. 3.34 und 3.35 eines rechten Beines bei 13,5 Tagen mit ektopter Osr1-Expression sind die Muskeln verstärkt mit Bindegewebe (in der HE-Färbung hell) durchsetzt. Auch im Bereich des Knicks liegt viel Bindegewebe.



Abb. 3.36: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 2 eines 13,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion

Tibia (T), Fibula (F), Vergrößerung 5x, Foto Nr. 52

Der Knick in der Tibia liegt in am distalen Ende der Fibula (Abb. 3.36, Pfeil). Dort ist auch die Spina fibula, das distale Ende der Fibula, welche beim Huhn schon im Bereich der distalen Hälfte der Tibia liegt.

Schnittserie Nr. 3a: linkes Bein, 13,5 Tage, kein Osr1-RCAS

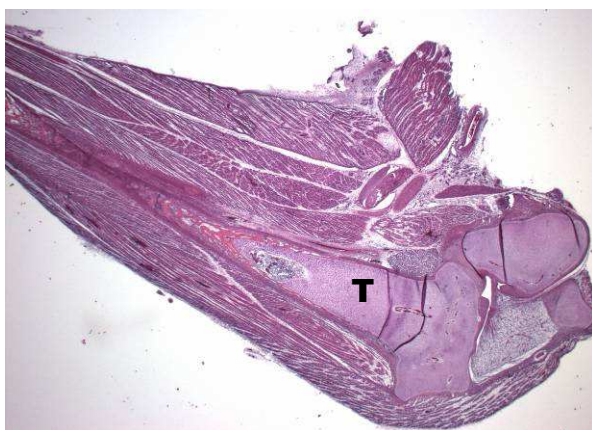


Abb. 3.37: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3a eines 13,5 Tage alten rechten Beines

Tibia (T), Vergrößerung 5x, Foto Nr. 26

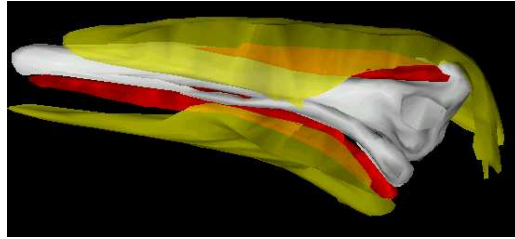


Abb. 3.38: 3D-Rekonstruktion aus der Serie 3a eines 13,5 Tage alten normalen linken Beines
Tibia und Fibula weiss, oberflächliche Muskeln gelb, tiefe Muskeln rot, links von medial, rechts von frontal

Dieses 13,5 Tage alte normale linke Bein zeigt auf dem HE-gefärbten Schnitt eine dicht gepackte Muskulatur, die nur mit sehr wenig Bindegewebe durchsetzt ist (Abb. 3.37 und 3.38).

Schnittserie Nr. 3b: rechtes Bein, 13,5 Tage, Osr1-RCAS

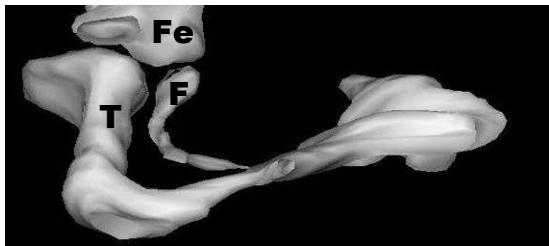


Abb. 3.39: 3D-Rekonstruktion aus der Serie 3b eines 13,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion
Tibia (T), Fibula (F), Femur (Fe)

In der Serie 3b liegt bei einem 13,5 Tage alten rechten Bein nach ektopter Osr1-Expression ein sehr starker Knick der Tibia vor (Abb. 3.39). Die Fibula endet wie beim Huhn üblich am Übergang vom mittleren zu distalen Drittel der Tibia.

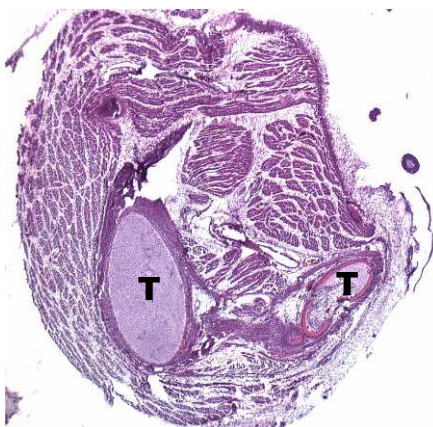


Abb. 3.40: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3b eines 13,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion
Tibia (T), Vergrößerung 5x, Foto Nr. 1-25, erstes von drei Bildern einer vom Scheitelpunkt des Knickes ausgehenden Reihe

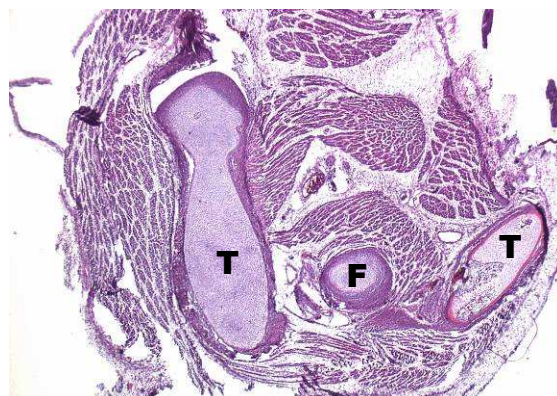


Abb. 3.41: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3b eines 13,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion
Tibia (T), Fibula (F), Vergrößerung 5x, Foto Nr. 1-22, zweites von drei Bildern einer vom Scheitelpunkt des Knickes ausgehenden Reihe

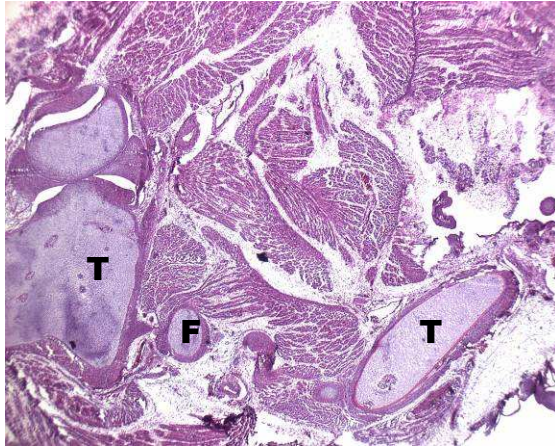


Abb. 3.42: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3b eines 13,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion
Tibia (T), Fibula (F), Vergrößerung 5x, Foto Nr. 1-17, drittes von drei Bildern einer vom Scheitelpunkt des Knickes ausgehenden Reihe

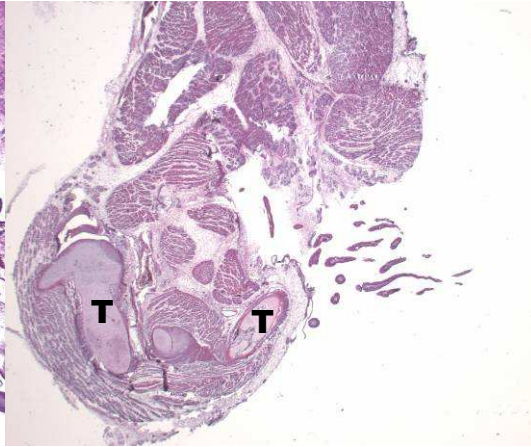


Abb. 3.43: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3b eines 13,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion
Tibia (T), Vergrößerung 2,5x, Foto Nr. 2-19

In den 3 ausgewählten Ebenen parallel zum Scheitelpunkt des Knickes in Richtung Tibia-Gelenke (Abb. 3.40 bis 3.42) sind die Muskeln im Vergleich zur Abb. 3.37 (Kontrolle) nicht längs parallel geordnet. Es findet sich mehr Bindegewebe zwischen den einzelnen Muskelindividuen.

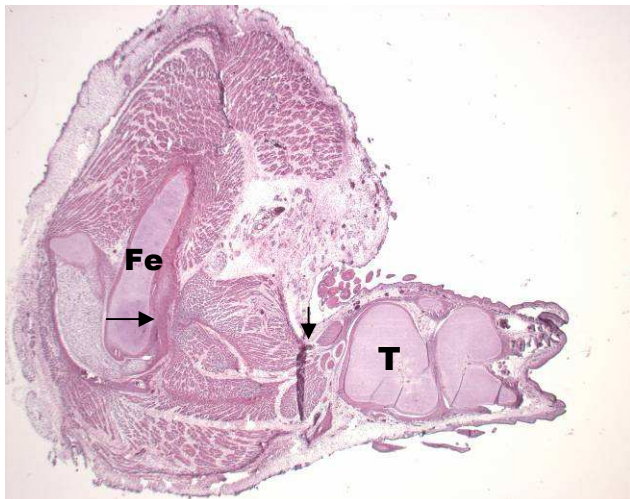


Abb. 3.44: HE-gefärbter Schnitt aus der Serie 3b eines 13,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion
Tibia (T), Femur (Fe), Ansatzstelle und Übergang in Sehne des M. gastrocnemius (Pfeile), Vergrößerung 2,5x, Foto Nr. 2-40

Der M. gastrocnemius hat seinen Ursprung am distalen Ende des Femurs und geht im distalen Teil der Tibia in seine Sehne über (Abb. 3.30). Der Muskelbauch liegt genau zwischen den beiden zusammengezogenen Teilen des Knicks.

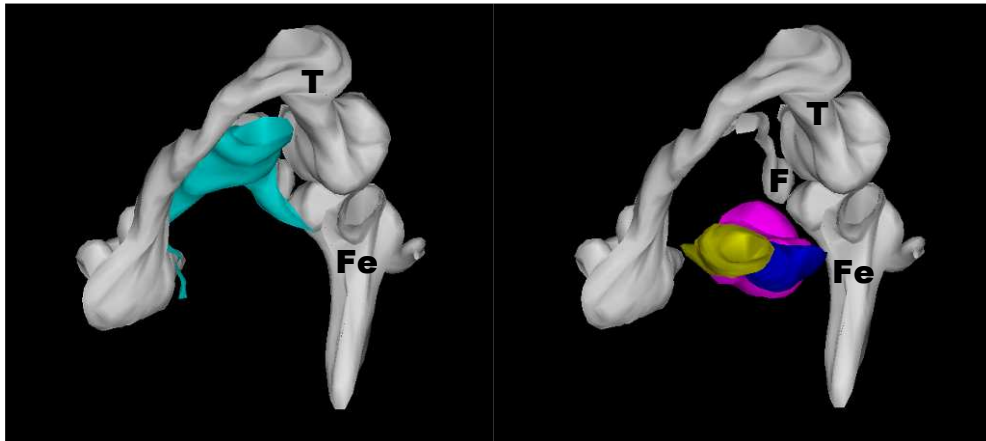


Abb. 3.45: 3D-Rekonstruktion aus der Serie 3b eines 13,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion

Tibia (T), Femur teilweise (Fe), Fibula (F), links: M. flexor perforans et perforatus digiti (cyan), rechts: M. gastrocnemius (farbig)

Dieser zwischen den Endstellen des Knicks liegende M. gastrocnemius lässt sich in der 3D-Rekonstruktion gut erkennen (Abb. 3.45 rechts). Im Vergleich dazu liegt der M. flexor perforans et perforatus digiti (Abb. 3.45 links) entlang der Tibia, so wie er auch im Wildtyp liegt. Es ist also anzunehmen, dass auf die Enden des M. gastrocnemius mechanische Zugkräfte wirken, die den Knick verursachen können.

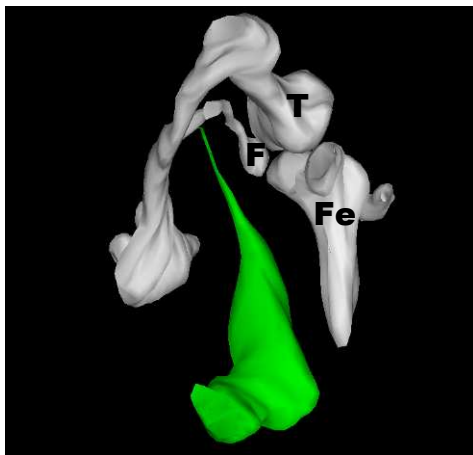


Abb. 3.46: 3D-Rekonstruktion aus der Serie 3b eines 13,5 Tage alten rechten Beines nach Osr1-RCAS-Injektion

Tibia (T), Femur teilweise (Fe), Fibula (F), M. iliofibularis (grün)

Zusätzlich zu diesem Mechanismus kann der M. iliofibularis beteiligt sein, indem er vom Körperstamm kommend an der Fibula ansetzt (Abb. 3.46). Dieser Ansatz ist genau hinter der Knickstelle lokalisiert und wäre mechanisch in der Lage, den Knick ebenfalls zu verstärken.

4. Diskussion

4.1. Koexpression von BMP4 und Osr1 in der distalen Extremität

Da die Expressionsmuster von Osr1 und BMP4 in der distalen Extremität sehr ähnlich sind (siehe Abschnitt 3.2.1), ist die Stellung des sehr gut untersuchten BMP4 in der entwicklungsbiologischen Signalkaskade interessant, auch um dort Verbindungen zu Odd bzw. Osr zu beschreiben.

BMP4 gehört zur TGF β (transforming growth factor)-Familie. Diese Familie besteht aus 2 Gruppen, der BMP/GDF/Anti-Müller-Hormon-Gruppe einerseits und der TGF β /Activin/Nodal-Gruppe andererseits. Gene dieser Familie nehmen zentrale Stellungen im Signalnetzwerk des sich entwickelnden Organismus ein. Sie wirken über Dimerisierung spezifischer Rezeptoren, die intrazellulär entweder Smad-Transkriptionsfaktoren aktivieren oder über die MAP-Kinase die Information weitergeben (Massague et al., 2000). BMP4 ist in vielen unterschiedlichen Geweben aktiv. Auch in der frühen Entwicklung spielt es eine Rolle, was der frühe Tod durch Gastrulationsdefekte und Veränderungen in der Mesodermbildung bei Mäusen mit deletiertem BMP4 zeigt (Winnier et al., 1995).

In der Extremität induzieren BMP2, 4 und 7 einerseits Wachstum und Differenzierung im prächondrogenen Mesenchym, andererseits verursachen sie Apoptose im undifferenzierten Mesenchym (Zuzarte-Luis 2002). Diese unterschiedliche Interpretation ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit von Kofaktoren zurückzuführen. So ist der BMP-Antagonist Gremlin in Bereichen exprimiert, in denen er das undifferenzierte Mesenchym vor der apoptotischen Wirkung der BMPs schützt (Zuzarte-Luis et al., 2002).

James et al. (2005) fanden in der frühen Huhn-Embryogenese (HH8-11) eine positive Regulierung von Osr1 durch kleine Konzentrationen von BMP2 im intermediären Mesoderm. Eine höhere Dosierung wirkte jedoch repressiv. Es wird ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem ein Konzentrationsgradient vom Lateralplattenmesoderm mit hoher Konzentration zu den Somiten mit keiner BMP-Aktivität eine mittlere BMP-Konzentration im intermediären Mesoderm erzeugt, der dort zur Osr1-Expression führt. Bei Unterdrückung von FoxC-Genen breitet sich die Expression von Osr1 vom normalen intermediären Mesoderm weiter nach medial aus (Wilm et al. 2004). Das Modell von James (2005) postuliert eine Hemmung der Osr1-

Expression durch FoxC, welche wiederum durch kleine BMP-Konzentrationen gehemmt wird. Wenn also geringe Konzentrationen von BMP vorhanden sind, wird die Hemmung der Osr1-Transkription durch FoxC unterdrückt. Osr1 ist das am frühesten exprimierte Gen, das spezifisch für das intermediäre Mesoderm ist (James et al., 2006). Bei -/- Osr1-Huhn-Mutanten lässt sich weder Metanephros-Mesenchym noch Aktivität der Metanephros-assoziierten Gene Six2, Eya1, Gdnf, Pax2 und Sall1 finden (Wang et al., 2005, James et al., 2006). Kurzfristig reguliert ektope Osr1-Expression die Gene Pax2 und Lim1 positiv (James et al., 2006).

Bei -/- Osr2-Huhn-Mutanten ist Osr1 im sich entwickelnden Gaumen hochreguliert. BMP4-Expression ist bei diesen Tieren jedoch unverändert (Lan et al., 2004).

Scleraxis, das die Sehnen markiert, wird negativ durch BMP4 reguliert (Schweitzer et al., 2001). Um die Sehnen herum wird BMP4 (wie auch Osr1) exprimiert und ektope Expression von BMP4 führt zu einem Aufsplitten der Sehnen (D'Souza et al., 1999).

Follistatin ist ein BMP2 und -4-Antagonist, der ebenfalls um die Sehnen herum exprimiert wird (D'Souza et al., 1999). Es formt trimere Komplexe mit BMPs und wirkt damit durch einen anderen Mechanismus als andere BMP-Antagonisten wie Noggin oder Chordin (Iemura et al., 1998).

Auf prämyogene Zellen wirkt BMP4 dosisabhängig. Bei geringer Konzentration werden die Zellen zwar in einem proliferativen Zustand gehalten, weitere Differenzierung wird jedoch unterdrückt. Hohe Konzentrationen von BMP4 verhindern die Muskelentwicklung, wahrscheinlich durch Induzierung von Apoptose (Amthor et al., 1998). Auch die hohen Konzentrationen von Osr1 durch ektope RCAS-induzierte Transkription führen in den eigenen Experimenten zu verminderter Muskelmasse.

Notch reguliert einerseits Odd positiv (Rauskolb und Irvine, 1999) und führt andererseits zur Verminderung von MyoD-Expression und Inhibierung von Muskeldifferenzierung (Brent, Tabin 2002). Da Osr1 im Experiment ebenfalls die Muskelbildung vermindert, wäre es möglich, dass Notch über den Zwischenschritt der Odd-Expression oder verbunden mit diesem Signalweg seine muskelinhibierende Wirkung ausübt.

Auch BMP4 hat eine inhibierende Wirkung auf die Muskelzell-Differenzierung. Diese Wirkung ist mit Notch verknüpft, da sie bei nichtfunktionalem Notch-Signalweg außer Kraft gesetzt ist (Dahlqvist et al., 2003).

Odd reguliert Wingless negativ (Saulier-LeDrean et al. 1998). Die homologen Wnt-Gene werden stark durch Dickkopf-1 (Dkk1) negativ reguliert, welches wiederum durch BMP4 aktiviert wird (Grotewold et al., 2002). Dadurch wirken sowohl Odd als auch BMP4 (über einen Zwischenschritt) unterdrückend auf die Wnt/Wg-Expression. Wnt-Gene, z.B. Wnt7a aktivieren die Myogenese im Lateralplattenmesoderm als Gegenspieler zum BMP4 (Cossu, Borello 1999). Wenn die negative Regulierung von Wingless durch Odd in höheren Organismen konserviert ist, kann Osr1 durch Unterdrückung der promyogenen Wnt-Expression die Muskeldifferenzierung hemmen.

4.2. Veränderungen der Muskulatur durch ektope Osr1-Expression

Ektope Überexpression von Osr1 durch RCAS-Viren in der sich entwickelnden Extremität resultiert oft in einem Knick im medialen Bereich der Tibia, der Winkel von ca. 20-150° aufweist. Der Grund dieser Entwicklungsstörung kann verminderte Stabilität des Tibia-Knochenvorläufer-Knorpels oder eine vermehrte mechanische Belastung von außen durch den sich entwickelnden Muskel-Sehnen-Apparat sein.

Auf HE-gefärbten Serienschnitten von Extremitäten, die diesen Knick zeigen, erschien die Knorpeldicke und -struktur unauffällig. Das Muskelgewebe war jedoch sowohl zwischen den Muskelindividuen als auch innerhalb des Muskels in den Bereichen des Endomysiums (Normalzustand in Abb. 4.1) verstärkt von Bindegewebe durchsetzt. Diese nicht so stark wie Muskulatur dehnbare bindegewebige Komponente in und um die Muskeln herum legt ein Ungleichgewicht im Kräfte-Wechselspiel während des Längenwachstums der Extremität zwischen Knorpel und Muskelapparat nahe. In Abb. 3.45 ist der M. gastrocnemius verkürzt, was im Vergleich zum M. flexor perforans et perforatus digiti deutlich wird. Letzterer folgt dem Verlauf der Tibia, wobei der M. gastrocnemius direkt zwischen den beiden Enden des Bogens (distale Tibia und distaler Femur), dessen Scheitelpunkt der Knick bildet, verläuft. Auch der M. iliofibularis kann einen mechanischen Anteil am Abknicken der Tibia haben.

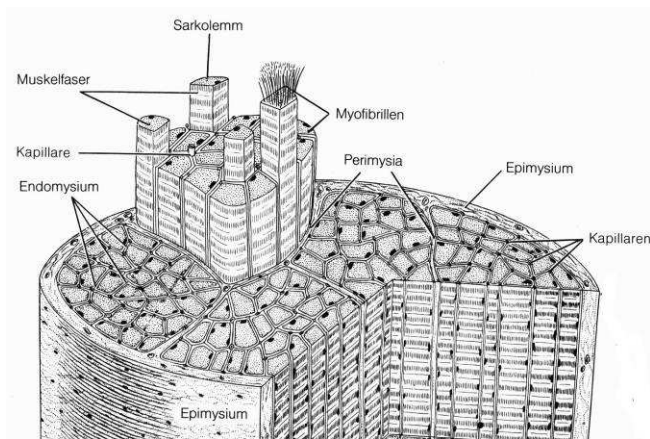


Abb. 4.1: Schematische Darstellung eines quer gestreiften Skelettmuskels
(modifiziert aus Junqueira, Carneiro)

Osr1 ist auf Schnitt-in-situ-Hybridisierungen hauptsächlich in Arealen exprimiert, welche aus Bindegewebe bestehen (Kap. 3.5.). Dies sind zum Beispiel in älteren Embryonen (HH36, Abb. 3.29 – 3.31) die Räume zwischen Sehnen, Muskeln und Epidermis. Es wäre möglich, dass Osr1 bei ektopter Expression Bereiche, die eigentlich Muskelgewebe werden sollten zu Bindegewebe werden lässt oder den relativen Anteil des Endomysiums vergrößert.

4.3. OSR1 und humane Pathologie

Das humane Homolog OSR1 wurde von Katoh (2002) im Genlocus 2p24 lokalisiert. Es wurde OSR1-Aktivität durch Northern Blot im adulten Kolon, Dünndarm, Prostata, Hoden und in der fetalen Lunge nachgewiesen. Es wurde eine signifikante Hochregulation von OSR1 in der Pankreaskarzinom-Zelllinie MIA PaCa-2 und schwächer in anderen Zelllinien von Ösophagus- und Magenkarzinomen gefunden.

Bei einer Recherche nach Syndromen mit zwar eingegrenzten Genloci aber noch nicht identifizierten Genen in der OMIM Gene Map wurden keine Syndrome gefunden, die durch das Expressionsmuster von Osr1 verdächtig wären, mit einer Mutation von OSR1 in Verbindung zu stehen.

Debeer et al. (2002) haben bei einem Syndrom mit distalen Extremitätenfehlbildungen, Mikrognathie und renaler Hypoplasie (OMIM 246560) keine Mutationen im OSR1-Gen gefunden.

Das wie OSR1 auch im Genloci 2p24 lokalisierte Feingold-Syndrom (OMIM 164280), welches mit distalen Extremitätenfehlbildungen, Mikrozephalus und Atresien des Verdauungstraktes

einhergeht, wurde mit Mutationen im MYCN-Gen in Verbindung gebracht (van Bokhoven et al., 2005) und ist somit wahrscheinlich nicht durch eine Mutation von OSR1 verursacht.

Da durch ektope Osr1-Expression in der embryonalen Extremitätenentwicklung der Muskel vermehrt von Bindegewebe durchsetzt wurde, ist die große Gruppe der kongenitalen Muskeldystrophien (CMD), die mit einem ähnlichen Phänotyp einhergehen, in diesem Zusammenhang interessant. Es liegen wie beim Osr1-Überexpressionsphänotyp oft Kontrakturen und Muskelschwäche vor. Bei vielen CMDs wurde der zu Grunde liegende Gendefekt aufgeklärt, so liegt z.B. bei der Bethlem-Myopathie ein Defekt des Kollagen VI vor (Gordon et al., 2006). Bei anderen CMDs wurde noch keine verursachende Mutation gefunden. Hier kommt bei der Untersuchung betroffener Familien in der Zukunft auch eine Mutation von Osr1 in Betracht.

5. Zusammenfassung

Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Odd-skipped-related 1 (Osr1) ist das Vertebratenhomolog zu Odd-skipped, das bei *Drosophila* als Pair-Rule-Gen an der Segmentierung der Larve beteiligt ist. Viele weitere Homologe anderer Segmentierungsgene übernahmen im Laufe der phylogenetischen Entwicklung wichtige Aufgaben, so dass auch die Rolle von Osr1 bei Vertebraten interessant ist.

Es wurden die Expressionsmuster von Osr1 in den Embryonalstadien 3 ½ - 9 ½ d im Modellorganismus Huhn mittels Whole-mount-in-situ-Hybridisierung (WMISH) und Schnitt-in-situ-Hybridisierung bestimmt. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Extremitäten gelegt. Auch von MyoD, Scx, BMP4, BMP2, BMP7, Fgf8, Msx2, Myf5, Follistatin, EphA3, EphA4, Eya2, Collagen12, NR13 und Dkk1 wurden zum Vergleich Expressionsmuster bestimmt.

Osr1 wurde ektop während der Embryonalentwicklung im Bereich der späteren unteren Extremität durch ein rekombinantes Virus (RCAS) exprimiert. Diese Phänotypen wurden seziiert, per WMISH untersucht oder es wurden HE-gefärbte Serienschritte angefertigt, die in eine 3D-Rekonstruktionssoftware eingelesen wurden und damit ein dreidimensionales Modell der Knorpel- und Muskelstrukturen erstellt wurde.

Osr1 wird in der Urniere, in Schlundbögen, den Somiten und im Bindegewebe exprimiert. In der unteren Extremität wird es scharf begrenzt interdigital, um die sich distal entwickelnde Sehnenplatte und im weiter proximal gelegenen Bindegewebe um die Muskelblöcke exprimiert.

Auch im weiteren Verlauf ist Aktivität um die Sehnen und im Bindegewebe der Phalangen sichtbar, zusätzlich zeichnet sich deutlich die Rumpfmuskulatur ab. Dabei wird *Osr1* in sich gegenseitig ausschließenden Bereichen im Vergleich zum Muskelmarker *MyoD* und zum Sehnenmarker *Scx* exprimiert.

BMP4 zeigt ein nahezu identisches Expressionsmuster in der distalen unteren Extremität wie *Osr1*.

Eine ektope Expression von *Osr1* in der sich entwickelnden unteren Extremität führt zu einer Knickbildung von Tibia und Fibula. Histologisch zeigt sich eine vermehrte Durchsetzung des Muskels mit Bindegewebe. In der 3D-Rekonstruktion sind Muskeln verkürzt, was durch das starrere Bindegewebe verursacht sein kann. Durch die erhöhte mechanische Belastung kann dann der Knick der noch nicht ossifizierten Tibia auftreten.

Die Wildtyp-Expression um Sehnen und Muskulatur herum und die vermehrte Bindegewebsbildung durch ektope *Osr1*-Expression legt einen Zusammenhang mit der Zelldeterminierung zu Bindegewebe nahe. Ebenfalls möglich ist, dass es eine Rolle bei der Trennung der einzelnen Funktionsgewebe wie z.B. Muskeln oder Sehnen spielt.

Neben den seit langem bekannten genetischen Grundlagen der Muskeldifferenzierung und dem seit kurzem aufgedeckten Weg der Sehnendifferenzierung ist *Osr1* ein interessanter Kandidat für die Steuerung der bislang wenig erforschten Bindegewebsdifferenzierung.

6. Literaturverzeichnis

Amthor H, Christ B, Weil M, Patel K. The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Curr Biol* 1998;8:642-652

Basyuk E, Bertrand E, Journot L. Alkaline fixation drastically improves the signal of in situ hybridization. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(10):E46

Bellairs R, Osmond M. *The Atlas of Chick Development*. 1. Aufl. 1998, USA: Academic Press, San Diego.

Boardman PE, Sanz-Ezquerro J, Overton IM, et al. A Comprehensive Collection of Chicken cDNAs. *Curr Biol* 2002;12:1965-1969.

Brent AE, Tabin CJ. Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:548-557

Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ. A Somitic Compartment of Tendon Progenitors. *Cell* 2003;113:235-248

Buckley MS, Chau J, Hoppe PE, Coulter DE. Odd-skipped homologs function during gut development in *C. elegans*. *Dev Genes Evol* 2004;214:10-18

Cadigan KM, Nusse R. Wnt signalling: a common theme in animal development. *Gene Dev* 1997;11:3286-3305

Cossu G, Borello U. Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J* 1999;18:6867-6872

D'Souza D, Patel K. Involvement of long- and short-range signalling during early tendon development. *Anat Emryol* 1999;200:367-375

Dahlqvist C, Blokzijl, A, Chapman G et al. Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development* 2003;130:6089-6099

Debeer P, Ravel TJL, Devriendt K et al. Human Homologues of *Osr1* and *Osr2* are not involved in a Syndrome with distal limb deficiencies, oral abnormalities, and renal defects. *Am J Med Genet* 2002;111:455-456

Edom-Vovard F, Bonnin MA, Duprez D. *Fgf8* transcripts are located in tendons during embryonic chick limb development. *Mech Dev* 2001;108:203-206

Gilbert S. F. *Developmental Biology*. Sinauer Association, 5. Auflage, 1997.

Gordon E, Hoffman EP, Pegoraro E. Congenital Muscular Dystrophy Overview, In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2007.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=gene.chapter.cmd-overview>

Zugriffsdatum 9.6.2007

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1955;88:49–82

Huang Q, Raya A, DeJesus P et al. Identification of p53 regulators by genome-wide functional analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3456-3461

Hurle JM, Ros MA, Ganan Y, Macias D, Critchlow M, Hinchliffe JR. Experimental analysis of the role of ECM in the patterning of the distal tendons of the developing limb bud. *Cell Diff Develop* 1990;30:97-108

Iemura SI, Yamamoto TS, Takagi C et al. Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9337-9342

James RG, Schultheiss TM. Bmp signaling promotes intermediate mesoderm gene expression in a dose-dependent, cell-autonomous and translation-dependent manner. *Dev Biol* 2005;288:113

James RG, Kamei CN, Wang Q, Jiang R, Schultheiss TM. Odd-skipped related 1 is required for development of the metanephric kidney and regulates formation and differentiation of kidney precursor cells. *Development* 2006;133:2995-3004

Johansen KA, Green RB, Iwaki DD, Hernandez JB, Lenyel JA. The Drm-Bowl-Lin relief-of-repression hierarchy controls fore- and hindgut patterning and morphogenesis. *Mech Dev* 2003;120:1139-1151

Kardon G. Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* 1998;125:4019-32.

Katoh M. Molecular cloning and characterization of OSR1 on human chromosome 2p24. *Int J Mol Med* 2002;10:221-225

Koenig, HE. Anatomie und Propädeutik des Geflügels. 1. Auflage 2001, Schattauer Verlag, Stuttgart

Lan Y, Kingsley PD, Cho ES, Jiang R. Osr2, a new mouse gene related to Drosophila odd-skipped, exhibits dynamic expression patterns during craniofacial, limb, and kidney development. *Mech Develop* 2001;107:175-179

Massague J, Blain SW, Lo RS. TGF β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell* 2000;103:295-309

Morgan BA, Fekete DM. Manipulating Gene Expression with Replication-Competent Retroviruses. In: *Methods in Cell Biology* 1996;51:185-217

Murray BM, Wilson DJ. A scanning electron microscopic study of the normal development of the chick wing from stages 19 to 36. *Anat Embryol* 1994;189:147-155

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature* 1980;287:795-801

Oliver G, Wehr R, Jenkins NA et al. Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development* 1995;121:693-705

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), Zugriffdatum 9.6.2007.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Patel K, Nittenberg R, D'Souza D et al. Expression and regulation of Cek-8, a cell to cell signalling receptor in developing chick limb buds. *Development* 1996;122:1147-1155

pBluescript SK- Vektor-Datenblatt, Stratagene, La Jolla, USA

Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch. 258. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1998

Rauskolb C, Irvine KD. Notch-mediated segmentation and growth control of the Drosophila leg. *Dev Biol* 1999;210(2):339-50

Romer A. S. und Parsons T. S. Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere. Verlag Paul Parey, 5. Auflage, 1991.

Ros MA, Rivero FB, Hinchcliffe JR, Hurle JM. Immunohistological and ultrastructural study of the developing tendons of the avian foot. *Anat Embryol* 1995;192:483-496

Salomon FV. Lehrbuch der Geflügelanatomie. 1. Auflage 1993, Fischer Verlag

Saulier-Le Drean B, Nasiadka A, Dong J, Krause HM. Dynamic changes in the functions of Odd-skipped during early *Drosophila* embryogenesis. *Development* 1998;125:4851-4861

Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC et al. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* 2001;128:3855-3866

So PL, Danielian PS. Cloning and expression analysis of a mouse gene related to *Drosophila* odd-skipped. *Mech Develop* 1999;84:157-160

Stricker S, Brieske N, Haupt J, Mundlos S. Comparative expression pattern of Odd-skipped related genes *Osr1* and *Osr2* in chick embryonic development. *Gene Expr Patterns* 2006;6:826-834

Tena JJ, Neto A, Calle-Mustienes E et al. Odd-skipped genes encode repressors that control kidney development. *Dev Biol* 2007;301(2):518-31

van Bokhoven, H, Celli, J, van Reeuwijk, J et al. MYCN haploinsufficiency is associated with reduced brain size and intestinal atresias in Feingold syndrome. *Nature Genet* 2005;37: 465-467

Wang Q, Lan Y, Cho ES, Maltby KM, Jiang R. Odd-skipped related (*Odd1*) is an essential regulator of heart and urogenital development. *Dev Biol* 2005;288:582-594

Ward EJ, Coulter DE. odd-skipped is expressed in multiple tissues during *Drosophila* embryogenesis. *Mech Develop* 2000;96:233-236

Ward EJ, Skeath JB. Characterization of a novel subset of cardiac cells and their progenitors in the *Drosophila* embryo. *Development* 2000;127:4959-4969

Weintraub H, Davis R, Tapscott S et al. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 1991;251:761-766

Wilm B, James RG, Schultheiss TM, Hogan BLM. The forkhead genes, *Foxc1* and *Foxc2*, regulate paraxial versus intermediate mesoderm cell fate. *Dev Biol* 2004;271:176-189

Winnier G, Blessing M, Labovsky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995;9:2105-2116

Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E.
Entwicklungsbiologie. 1. Aufl. 1999, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag,

Xu PX, Cheng J, Epstein JA, Maas RL. Mouse *Eya* genes are expressed during limb tendon development and encode a transcriptional activation function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11974-79

Zuzarte-Luis V, Hurle JM. Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol* 2002;46:871-876

7. Danksagung

Mein Dank gilt...

Professor Dr. Stefan Mundlos für die Überlassung des Themas, die inspirierenden Diskussionen und die Möglichkeit, die Arbeit frei zu gestalten.

Dr. Sigmar Stricker für die Einarbeitung in das Thema, viele hilfreiche Tipps, die Überlassung des RCAS-Systems und die sehr gute Betreuung.

Norbert Brieske für die Einführung in die Hybridisierungstechniken und viele hilfreiche Hinweise hierzu.

Asita Stiege und Britta Hofmann, für das Teilen ihrer reichhaltigen Laborerfahrung.

allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mundlos am MPI für molekulare Genetik für die gute Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft.

Ruby Wicahyono und meinen Freunden für viel Geduld und Motivation beim Schreiben dieser Arbeit.

meiner Mutter und meiner Großmutter Gertrud Vagt für ihre Unterstützung.

Erklärung

Ich, Michael Töpfer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Transkriptionsfaktor Osr1 in der Extremitätenentwicklung“ 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.

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