

**Untersuchungen zu Ursprung und Wachstum der
Schilddrüse im Zebrafisch *Danio rerio***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Burkhard Alt

aus Aachen

Köln 2006

Berichtersteller:

Priv.-Doz. Dr. Klaus B. Rohr
Prof. Dr. Wolfgang Werr

Tag der mündlichen Prüfung:

14.02.2007

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 3 |
| 1.1 Der Zebrafisch als Modellorganismus | 3 |
| 1.2 Die Embryonalentwicklung des Zebrafisches <i>Danio rerio</i> | 3 |
| 1.3 Die Entwicklung der Schilddrüse in Wirbeltieren | 5 |
| 1.4 Die Entwicklung des Endoderms im Zebrafisch | 8 |
| 1.5 Die Entwicklung des Blutgefäßsystems im Zebrafisch | 9 |
| 1.6 Die Zebrafisch <i>heart and soul (has)</i> Mutante | 10 |
| 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit | 12 |
| 2. Material und Methoden | 13 |
| 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 13 |
| 2.2 Puffer, Lösungen und Medien | 13 |
| 2.3 Zebrafische | 13 |
| 2.3.1 Verwendete Zebrafischstämme | 13 |
| 2.3.2 Haltung und Zucht des Zebrafisches | 14 |
| 2.3.3 Bestimmung der Entwicklungsstadien | 15 |
| 2.4 Histologische Methoden | 15 |
| 2.4.1 Fixierung und Aufbewahrung | 15 |
| 2.4.2 Einbetten in Durcupan und Anfertigung von Schnitten | 15 |
| 2.4.3 Einbetten in Glycerin | 16 |
| 2.4.4 Antikörperfärbungen (nach <i>in situ</i> Hybridisierung) | 17 |
| 2.4.5 Antikörper- und Phalloidin-färbungen an Vibratomschnitten und konfokale Mikroskopie | 18 |
| 2.5 <i>In situ</i> Hybridisierung | 19 |
| 2.6 Mikroinjektionen in Zebrafischembryonen | 22 |
| 2.7 Transplantationen und Detektion der transplantierten Zellen | 23 |
| 2.8 Molekularbiologische Methoden | 24 |
| 2.8.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe | 24 |
| 2.8.2 Herstellung von Einzelstrang-cDNA (first-strand cDNA) | 24 |
| 2.8.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit Einzelstrang-cDNA als Matrize | 24 |
| 2.8.4 Agarosegelelektrophorese | 25 |
| 2.8.5 Reinigung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen (Gelextraktion) | 25 |
| 2.8.6 Ligation von PCR-Produkten und Transformation in kompetente Bakterien | 26 |
| 2.8.7 Kulturverfahren für <i>Escherichia coli</i> | 26 |
| 2.8.8 Minipräparation von Plasmid DNA | 26 |
| 2.8.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA | 26 |
| 2.8.10 Spaltung (Schneiden) von DNA mittels Restriktionsendonukleasen | 27 |
| 2.8.11 Phenol-Chloroform Extraktion | 28 |
| 2.8.12 <i>in vitro</i> Transkription für die Herstellung von <i>in situ</i> Sonden | 28 |
| 2.8.13 <i>in vitro</i> Transkription zur Herstellung gecappter mRNA | 28 |
| 2.9 Datenerfassung und Auswertung | 29 |
| 2.9.1 Benutzte Computersysteme | 29 |
| 2.9.2 Benutzte Software | 29 |
| 3. Ergebnisse | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1 Der Differenzierungsmarker <i>slc5a5</i> wird ab ca. 40 hpf im Schilddrüsenprimordium exprimiert | 30 |
| 3.2 Im Zebrafisch stammen alle Zellen der Schilddrüsenfollikel vom endodermalen Mittellinienprimordium ab | 31 |
| 3.3 Transplantierte Tar* exprimierende Zellen enden häufig im Schilddrüsenprimordium | 33 |
| 3.4 Die <i>heart and soul (has)</i> Mutation löst verschiedene Defekte während der Schilddrüsenentwicklung aus | 36 |
| 3.4.1 Die Induktion der Schilddrüse in <i>has</i> Mutanten und Morphants verläuft wildtypisch, es zeigen sich jedoch Defekte während der Relokalisierung des Schilddrüsenprimordiums | 36 |
| 3.4.2 Der Relokalisierungsprozess der Schilddrüse benötigt die Kinase-Funktion von aPKC λ | 40 |
| 3.4.3 aPKC λ wirkt gewebeautonom im Pharynxepithel auf die Relokalisierung des Schilddrüsenprimordiums | 40 |
| 3.4.4 <i>has</i> Morphants weisen ein drastisch reduziertes Blutgefäßsystem im Kopf auf | 42 |
| 3.4.5 Ektopische Endothelzellen können die Schilddrüsenmorphologie nicht-zellautonom beeinflussen | 43 |
| 3.4.6 Die <i>has</i> Mutation beeinflusst die Schilddrüsendifferenzierung und Funktion | 47 |
| 3.5 Untersuchungen zur apiko-basalen Polarität während des Relokalisierungsprozesses der Schilddrüse im Zebrafisch | 49 |
| 3.5.1 Die Zellen des Schilddrüsenprimordiums im Wildtyp polarisieren während der Ablösung aus dem Pharynxepithel, in <i>has</i> Morphants polarisieren sie jedoch gestört | 49 |
| 3.5.2 E-Cadherin in relokalisierenden Schilddrüsenzellen des Wildtyps und in <i>has</i> Morphants | 56 |
| 4. Diskussion | 59 |
| 4.1 Die Schilddrüse des Zebrafisches - ein endodermales Organ | 59 |
| 4.2 Die vollständige Relokalisierung der Schilddrüse im Zebrafisch benötigt funktionale aPKCλ im Epithel des Pharynx | 62 |
| 4.3 aPKCλ wird bei der Etablierung des Schilddrüsenepithels während der Relokalisierung benötigt | 63 |
| 5. Zusammenfassung | 66 |
| 6. Abstract | 68 |
| 7. Literaturverzeichnis | 69 |
| 8. Abkürzungen, Symbole und Konventionen | 78 |
| 9. Erklärung | 81 |

1. Einleitung

1.1 Der Zebrafisch als Modellorganismus

Die in der vorgelegten Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden durch Experimente am Zebrafisch *Danio rerio* gewonnen. Der Zebrafisch gehört heute neben der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, dem Krallenfrosch *Xenopus laevis*, dem Nematoden *C. elegans*, dem Huhn *Gallus gallus* und der Maus *Mus musculus* zu einem der wichtigen Modellorganismen der Entwicklungsbiologie.

Die Vorteile des Zebrafisches sind vielfältig. So ist die Zahl der Nachkommen für eine kontinuierliche Forschung mit bis zu 200 Embryonen pro Weibchen und Woche ausreichend hoch. Die extrakorporale Befruchtung und Entwicklung und die am Anfang der Entwicklung völlig durchsichtigen Embryonen machen eine Beobachtung mit einfachen mikroskopischen Mitteln möglich. Der Zebrafisch zeichnet sich außerdem durch eine schnelle Embryonalentwicklung aus. So sind wichtige Organe, wie z.B. das Herz 24 Stunden nach der Befruchtung (*hours post fertilisation*, hpf) schon funktionsfähig. Die Generationszeit von etwa drei Monaten erleichtert die Herstellung vieler induzierter Mutanten (Driever et al., 1996) aber auch die Herstellung transgener Organismen (Bayer und Campos-Ortega, 1992). In den letzten Jahren wurde das Genom des Zebrafisches fast vollständig sequenziert. Dies ermöglicht eine schnelle Klonierung und Analyse von an Entwicklungsprozessen beteiligten Genen.

1.2 Die Embryonalentwicklung des Zebrafisches *Danio rerio*

Nach der Befruchtung teilt sich die Zygote (Abb. 1A) in kurzen Zeitabständen meroblastisch bis zum 8-Zell-Stadium (Abb. 1B). Durch weitere rasche Zellteilungen entsteht die aus mehreren tausend Zellen bestehende Blastula (Abb. 1D). Durch einen Epibolie genannten Prozess breiten sich die Zellen dann über den Dotter aus (Abb. 1E). Nach 50% Epibolie setzt die Gastrulation ein. Am sogenannten Organisator, im Zebrafisch auch Shield genannt (Abb. 1F), der die Dorsalseite des Embryos festlegt, involutieren Zellen. Sie unterwandern die äußere Zellschicht und die den Dotter abschließenden Zellen (*Yolk Syncytial Layer*, YSL) in Richtung des animalen Pols und beginnen damit die Keimblätter

auszubilden. Die primäre Achse des Embryos wird durch Konvergenz- und Extensionsbewegungen der Zellen festgelegt (Abb. 1G), am vegetalen Pol entsteht die Schwanzknospe (*Tailbud*, Abb. 1H) und anschließend bilden sich entlang der primären Achse von anterior nach posterior die Somiten (Abb. 1I). Parallel zur Somitogenese entstehen durch weitere morphogenetische Prozesse das Nervensystem und wichtige Sinnesorgane. Nach 24 hpf ist die für den Zebrafisch typische Embryonalform entwickelt und die meisten Organe wie z.B. das Herz sind angelegt (Abb. 1L).

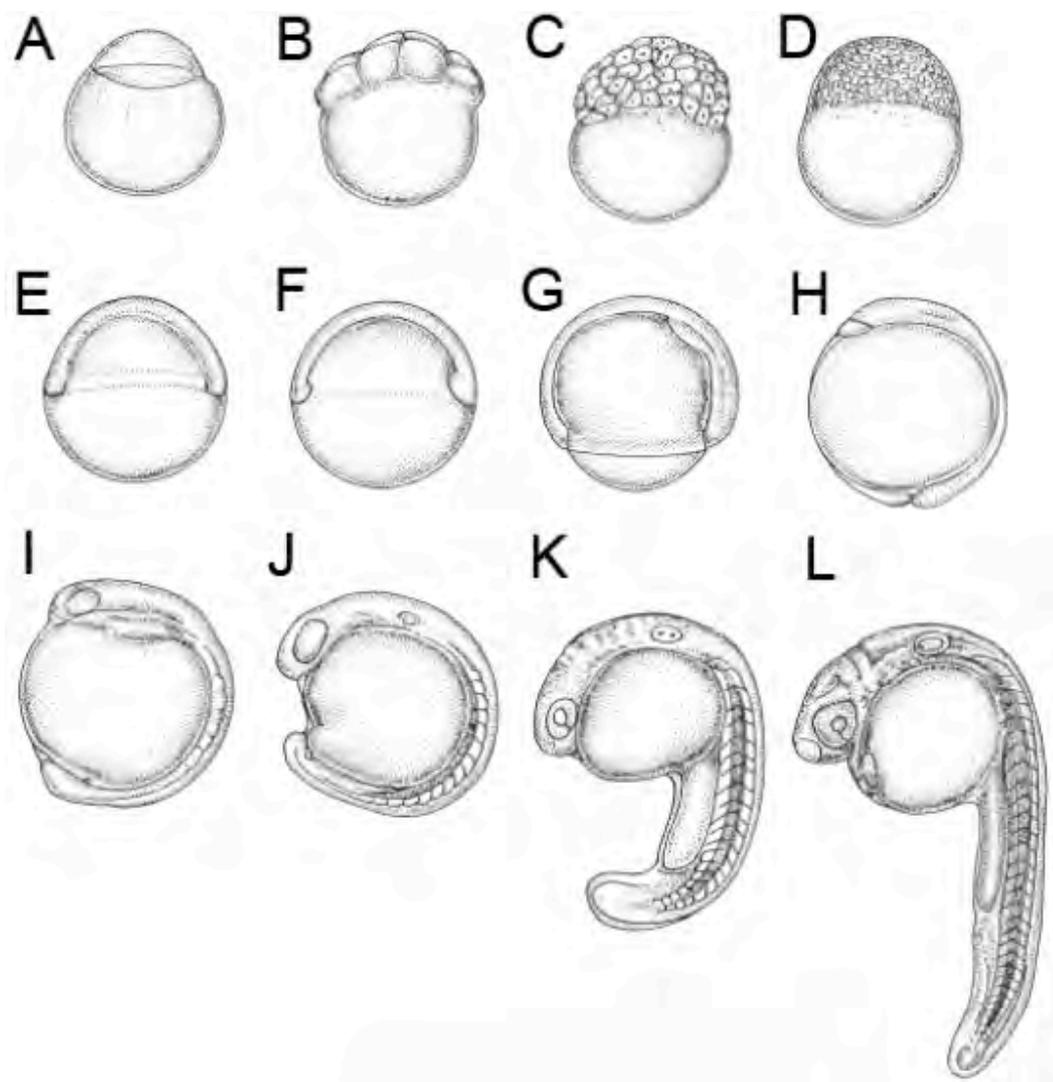


Abb. 1: Die ersten 24 hpf der Embryonalentwicklung des Zebrafisches (aus Kimmel et al., 1995). A: 1-Zellstadium (15 min), B: 8-Zellstadium (1,5 hpf), C: 128-Zellstadium (2,25 hpf), D: high-Stadium (3,3 hpf), E: Keimring-Stadium (5,7 hpf), F: Shield-Stadium (6 hpf), G: 75% Epibolie (8 hpf), H: Tailbud-Stadium (10 hpf), I: 6-Somitenstadium (12 hpf), J: 14-Somitenstadium (16 hpf), K: 21-Somitenstadium (19,5 hpf), L: Primordium-6-Stadium (25 hpf). Alle Altersangaben beziehen sich auf die Entwicklung bei einer Temperatur von 28,5°C.

1.3 Die Entwicklung der Schilddrüse in Wirbeltieren

Die Entwicklung der Schilddrüse in Wirbeltieren beginnt mit der Induktion eines Primordiums in Zellen des Pharynxendoderms. Diese Zellen lösen sich im weiteren Verlauf aus dem ventralen Pharynxepithel ab und relokalisieren bis tief ins hypopharyngiale Mesenchym. Die humane Schilddrüse und die von Mäusen beinhalten zwei Zelltypen mit endokriner Funktion: die Follikelzellen (Thyrozyten) und die C-Zellen (De Felice and Di Lauro, 2004). Die Thyrozyten produzieren das Schilddrüsenhormon T4 (Tetraiod-Thyronin, Thyroxin) und T3 (Triiod-Thyronin). Jod, welches der Natrium-Jod-Symporter in die Zelle schleust, wird dazu in diesen Zellen an Tyrosin-Reste des gemeinsamen Vorläuferproteins Thyroglobulin gebunden. Von diesem jodierten Protein werden T4 und T3 proteolytisch abgespalten und in die Blutzirkulation abgegeben. T4 und T3 werden für verschiedene Aspekte der Entwicklung und in der allgemeinen Regulation des Metabolismus benötigt. Die C-Zellen produzieren das Peptidhormon Calcitonin-verwandtes Polypeptid Alpha (Calca), das auch als Calcitonin bekannt ist. Calca greift regulierend in den Calcium Metabolismus ein, wobei jedoch die genaue Rolle im Menschen unklar ist (Inzerillo et al., 2002).

Bisher sind nur wenige Gene bekannt, die eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Schilddrüse spielen und auch in dieser exprimiert sind. Der Transkriptionsfaktor Nkx2.1 (auch Titf1 oder TTF-1 bezeichnet) ist früh in der Schilddrüse exprimiert. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass ohne funktionales Nkx2.1 die Schilddrüse zwar induziert wird, aber dann abstirbt (Kimura et al., 1999). Eine ähnliche Rolle spielt der Transkriptionsfaktor Pax8. Dieser wird früh im Primordium exprimiert und bei Ausfall werden keine Follikel und Thyrozyten gebildet (Mansouri et al., 1998). Nkx2.1 und Pax8 sind beide somit nicht für die Spezifizierung sondern für die Erhaltung des Schilddrüsengewebes nötig (De Felice and Di Lauro, 2004). Ein weiterer Transkriptionsfaktor, Hhex, ist ebenfalls früh im Primordium exprimiert. In *Hhex* knock-out Mäusen, also Mäuse, die kein *Hhex* Genprodukt produzieren, ist zu beobachten, dass anfänglich die Entwicklung der Schilddrüse völlig normal verläuft, jedoch nach der Abschnürung des Primordiums die Expressionen von *Nkx2.1*, *Pax8* und einem weiteren Transkriptionsfaktor *Foxe1* erlöschen und die Schilddrüse meist fehlt oder stark reduziert (hypoplastisch) ist (Martinez Barbera et al., 2000).

Wenig ist bekannt über Signale, die für die endgültige Lage und Form der endodermalen Organe wie der Schilddrüse nötig sind. Bei humanen Neugeborenen liegen häufig morphologische Abweichungen in der Form und Lage der Schilddrüse vor (eine von 4000 Geburten) (Rohr und Krude, 2006). Diese morphologischen Varianten

(Schilddrüsendysgenesien) sind auf Defekte während der Morphogenese zurückzuführen und können zu eingeschränkter Funktion der Schilddrüse (Hypothyreose) führen. Fehlbildungen können zu kleinen Schilddrüsen (Hypoplasie), halbseitigen Schilddrüsen (Hemithyroidea) oder fehlpositionierten Schilddrüsenengewebe (Ektopien) führen. Die relativen Häufigkeiten der verschiedenen Schilddrüsendysgenesien können sich je nach Untersuchungsmethode unterscheiden. So ist durch Radiojod-Szintigraphie festzustellen, dass die Ektopien mit 48-61% die häufigste Form der Schilddrüsendysgenesien darstellen (De Felice und Di Lauro, 2004). Ektope Schilddrüsen oder Schilddrüsenanteile können an den Stellen gefunden werden, die den Verlauf der embryonalen Schilddrüsenentwicklung und den Relokalisationsprozess des Primordiums widerspiegeln (De Felice und Di Lauro, 2004). In den meisten Fällen kann die Schilddrüse als eine Masse am Zungengrund oder unterhalb der Zunge gefunden werden. Weit seltener sind Schilddrüsen im Epithel der Luftröhre (Bowen-Wright und Jonklaas, 2005) und im Herzen beschrieben (Casanova et al., 2000).

Angeborene Hypothyreose mit Schilddrüsendysgenesien ist häufig eine spontane Erkrankung, es mehren sich aber Hinweise auf genetische Faktoren als Ursachen der angeborenen Hypothyreose. Es ist aber im Bereich der Ektopien bisher nur eine Mutation in Mäusen bekannt, die eine ektope Schilddrüse hervorruft (De Felice et al., 1998). In 50% der *Foxe1* knock-out Mäuse lässt sich kein Schilddrüsenengewebe feststellen. In den anderen 50% der Mausembryonen relokalisiert das Schilddrüsenprimordium nicht. Dieses Schilddrüsenengewebe ist im Pharynxepithel zu finden und kann dort sogar zu funktionalem, also Schilddrüsenhormon produzierendem Gewebe differenzieren (De Felice et al., 1998). Die Funktion von FOXE1 im Menschen ist bisher nicht bekannt.

Die Entwicklung der Schilddrüse im Zebrafisch ist in weiten Teilen mit der Entwicklung der Schilddrüse in Säugern und anderen Wirbeltieren vergleichbar und wurde von Rohr und Concha (2000) anhand der Expression von *nk2.1a*, dem Zebrafisch Ortholog zu *Nkx2.1*, beschrieben. Auch im Zebrafisch ist ein Primordium im ventralen Pharynxepithel auszumachen, welches sich in der weiteren Entwicklung von diesem abschnürt und ins hypopharyngiale Mesenchym relokalisiert (Abb. 2). Dabei bleibt es stets in der direkten Nähe zum sich entwickelnden Herzen und scheint dessen morphogenetischen Prozessen zu folgen. In der weiteren Entwicklung differenziert das Primordium zu einem epithelialen Follikel, der im inneren Lumen ab ca. 70 hpf Schilddrüsenhormon (T3 und T4) speichert (Wendl et al., 2002). Durch Proliferation entstehen weitere Follikel, die sich einzeln entlang der ventralen Aorta aufreihen. Sie stellen somit, anders als in Säugern, kein zusammenhängendes, durch eine Bindegewebshülle eingeschlossenes Organ dar. In *nk2.1a* und *hhex* Morphants, d.h. in

Embryonen, in denen durch Injektion von Morpholino-oligonukleotiden gegen das *hhex* oder das *nk2.1a* Transkript die Translation beider Proteine inhibiert wird, konnte gezeigt werden, dass diese Schilddrüsenwachstum und -differenzierung regulieren und unterhalb (*downstream*) vom Nodal Signaltransduktionsweg fungieren (Elsalini et al., 2003).

Gene, deren Produkte im Zebrafisch den Relokalisationsprozess regulieren, waren bisher nicht bekannt.

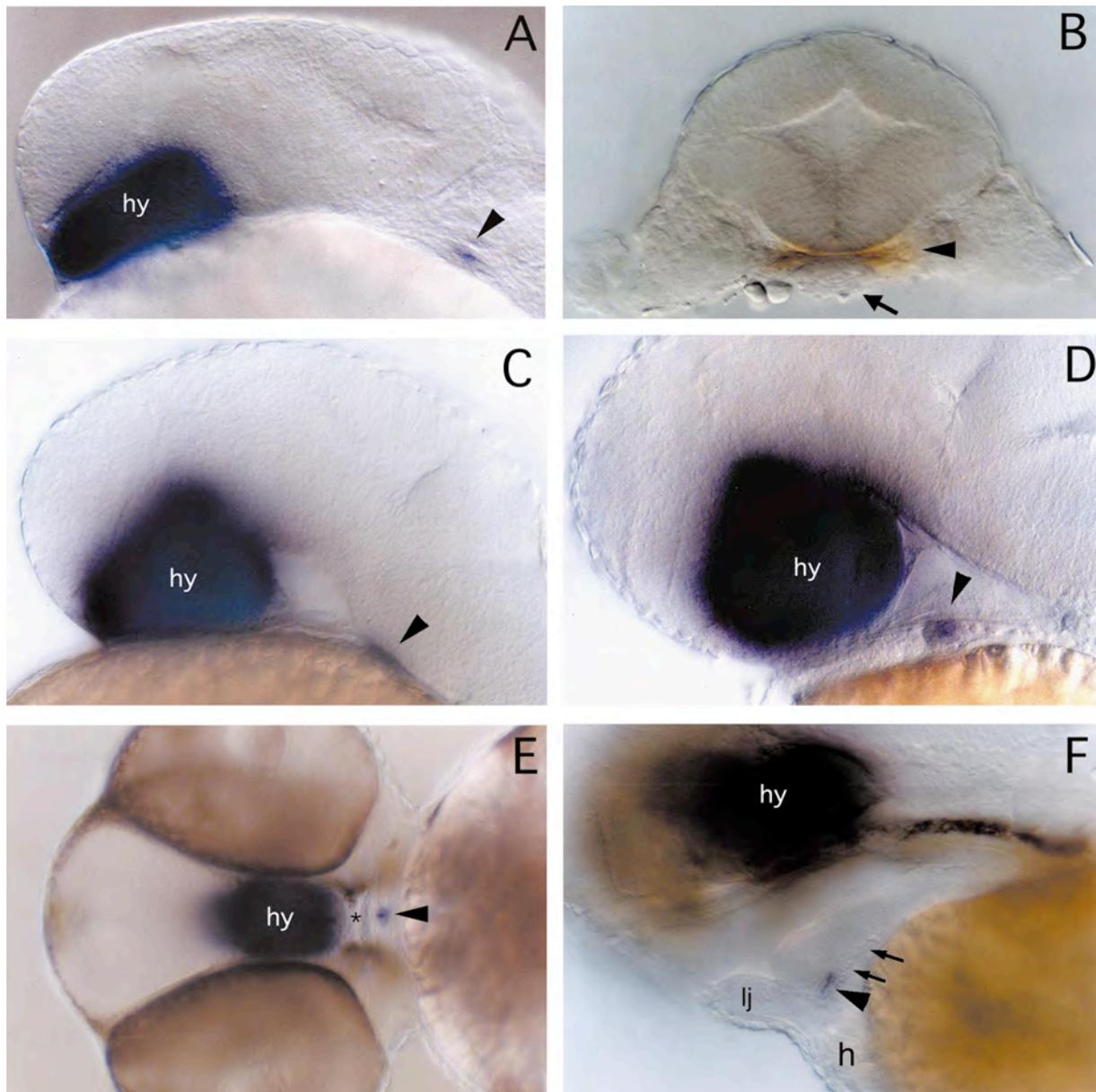


Abb. 2: Expression von *nk2.1a* in der Schilddrüsenanlage (aus Rohr und Concha, 2000). A, B: 24 hpf, C: 32 hpf, D: 40 hpf, E: 48 hpf, F: 55 hpf. A, C, D, F: laterale Ansicht, B: Querschnitt, E: ventrale Ansicht. Pfeilspitzen zeigen auf das Schilddrüsenprimordium. h: Herz, hy: Hypothalamus, lj: Unterkiefer (*lower jaw*), *: Pharynx. Pfeile weisen auf Blutgefäß.

1.4 Die Entwicklung des Endoderms im Zebrafisch

Die Erstellung von Anlagenkarten (*fate mapping*) haben für den Zebrafisch erbracht, dass Zellen des Endoderms und Mesoderms aus einem gemeinsamen Bereich am marginalen Rand der Blastula abstammen (Kimmel et al., 1990; Warga und Nüsslein-Volhard, 1999). Bei 50% Epibolie ist das Schicksal der Endodermzellen weitestgehend festgelegt (David und Rosa, 2001) und keine endodermale Zellen sind außerhalb der vier marginalen Zellreihen zu finden (Warga und Nüsslein-Volhard, 1999). Außerdem konnte festgestellt werden, dass sich die Verteilung dieser Vorläuferzellen von dorsal nach ventral zum Shield-Stadium später in der anterior-posterioren Verteilung der Zellen im Verdauungstrakt widerspiegelt (David und Rosa, 2001; Warga und Nüsslein-Volhard, 1999).

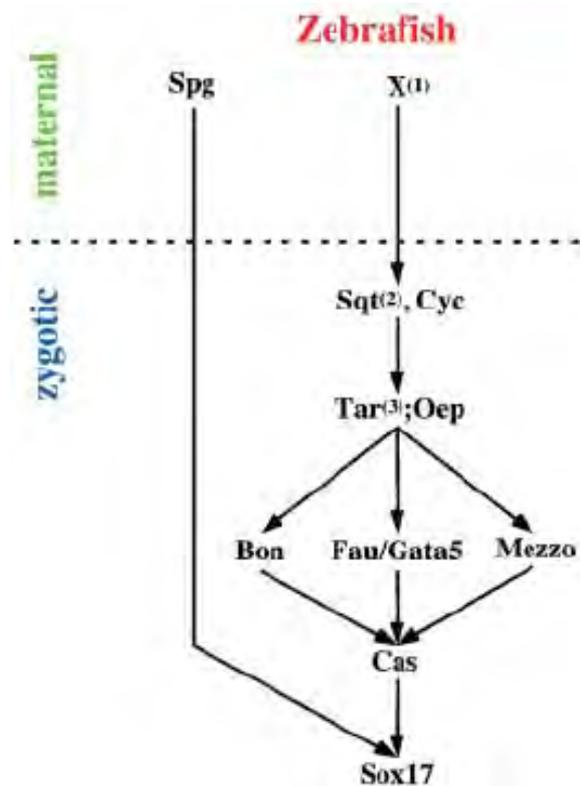


Abb. 3: Molekularer Signalweg der frühen Endodermentwicklung. 1: Maternaler Faktor X oberhalb von Nodal (Cyc, Sqt) ist nicht bekannt. Weitere Details im Text. Abbildung modifiziert nach Fukuda und Kikuchi, 2005.

Untersuchungen an den Zebrafisch Mutanten *one-eyed-pinhead* (*oep*), *cyclops* (*cyc*) und *squint* (*sqt*) haben Einblicke in die genetische und molekulare Regulation der Endodermentwicklung gebracht. Der Nodal-Signalweg (Abb. 3) konnte damit als wichtiger molekularer Regulator identifiziert werden. *oep* codiert für einen Kofaktor von Nodal (einem Protein der TGF- β Superfamilie). Mutanten, denen das maternale und zygotische Genprodukt von *oep* (MZ*oep*) fehlt und Embryonen von Doppelmутanten in den beiden Nodal Genen *cyc* und *sqt*, zeigen ein fast gänzlich fehlendes Endoderm und Mesoderm (Feldman et al., 1998;

Gritsman et al., 1999; Zhang et al., 1998). Die bestimmende Rolle des Nodal-Signalwegs an der Endodermentwicklung konnte dadurch bestätigt werden, dass die Injektion vom kompetitiven Nodal Inhibitor *lefty1* ebenso zum Verlust des Endoderms führt (Thisse und Thisse, 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Nodal-Signalwegs durch *Tar**, eine konstitutiv aktive Form des TGF- β Typ I (Nodal)-Rezeptors Taram-A (Renucci et al., 1996), Blastomeren in ein endodermales Schicksal leitet und in *oep* Mutanten zur Bildung von Endoderm führen kann (Peyrieras et al., 1998).

Bisher bekannte Zielgene des Nodal-Signalweges sind *bonnie and clyde (bon)*, *faust (fau)*, und *mezzo* (sie codieren für Transkriptionsfaktoren). Mutanten dieser Gene zeigen ebenfalls Defekte in der Endodermentwicklung (Übersichtsartikel: Fukuda und Kikuchi, 2005). Sie steuern, wahrscheinlich über den Transkriptionsfaktor Casanova (*cas*), einen weiteren endodermspezifischen Transkriptionsfaktor Sox17 (Alexander and Stainier, 1999). Auch maternale Komponenten sind an der Induktion des Endoderms im Zebrafisch beteiligt. *spiel-ohne-grenzen (spg)* codiert für den Transkriptionsfaktor Pou2 und wird maternal und zygotisch exprimiert. In maternal-zygotischen *spg* Mutanten (MZ*spg*) kann keine *sox17* Expression festgestellt werden, obwohl *cas* bis zu Beginn der Gastrulation exprimiert wird (Lunde et al., 2004; Reim et al., 2004). *spg* ist für die Induktion von *sox17* und außerdem für den Erhalt der *cas* Expression nötig.

1.5 Die Entwicklung des Blutgefäßsystems im Zebrafisch

Die Vorläufer der Blutgefäßzellen, die Angioblasten, liegen im Zebrafisch zunächst im Lateralplattenmesoderm. Von dort wandern sie zwischen dem 10- bis 15-Somitenstadium in die Körpermittellinie des Rumpfes, wo sie die ersten Blutgefäße bilden, die dorsale Aorta und die posteriore Kardinalvene (Fouquet et al., 1997). Dieser Prozess wird durch den Hedgehog Signalweg reguliert (Gering und Patient, 2005). Während der weiteren Entwicklung werden in der Angiogenese die intersegmentalen Blutgefäße angelegt, wodurch arterieller und venöser Kreislauf im ganzen Körper verbunden sind. Dieser Prozess ist in 72 hpf Embryonen nahezu abgeschlossen (Isogai et al., 2003). Im Zebrafisch entstehen die hämatopoetischen Zellen und die Angioblasten wahrscheinlich aus den gleichen Vorläuferzellen, den Hämangioblasten (Robb und Elefanty, 1998). Die Zebrafisch *cloche* Mutante unterstützt diese Auffassung, denn in *cloche* Mutanten fehlen nicht nur alle Blutvorläuferzellen sondern auch alle Blutgefäßvorläuferzellen (Stainier et al., 1995).

Die Transkriptionsfaktoren *Scl* und *Lmo2* tragen entscheidend zur Entwicklung des Blutkreislaufsystems des Zebrafisches bei. *scl* codiert für einen basischen Helix-Schleife-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktor und wird in Vorläuferzellen des Blutes und der Blutgefäße exprimiert (Gering et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass *scl* partiell die Expression von blutzellspezifischen und endothelspezifischen Genen in der *cloche* Mutante retten kann (Liao et al., 1998) und für die Entwicklung der dorsalen Aorta benötigt wird (Patterson et al., 2005). *Scl* kann mit anderen Proteinen Komplexe bilden, so auch mit dem LIM-Domäne Transkriptionsfaktor *Lmo2* (Wadman et al., 1997). *lmo2* ist in Hämangioblasten exprimiert (Warren et al., 1994) und reguliert während der Angiogenese die Verästelungen der Blutgefäße in Mäusen (Yamada et al., 2000). Koinjektion von *scl* und *lmo2* mRNA induziert die ektopische Expression des endothelspezifischen Transkriptionsfaktors *fli1* im gesamten Kopfmesenchym. Daraus konnte geschlossen werden, dass diese Faktoren hinreichend für die Induktion des Endothelschicksals in Zellen des Kopfmesenchyms sind (Gering et al., 2003). Der Vegf-Signalweg (Vegf: vascular endothelial growth factor) ist ebenfalls ausschlaggebend an der Entwicklung des Blutkreislaufsystems beteiligt (Ferrara, 2004). So zeigen verschiedene Mutanten im Vegf-Rezeptor *Kdr* Defekte in der Entwicklung der Blutgefäße (Covassin et al., 2006; Habeck et al., 2002). Die Fehlexpression von *vegf* kann zur Aktivierung des arteriellen Entwicklungsschicksals führen (Lawson et al., 2002). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass der Vegf-Signalweg in der Festlegung des arteriellen Schicksals zwischen zwei weiteren Signalwegen agiert: unterhalb des Hedgehog und oberhalb des Notch-Signalwegs (Lawson et al., 2002).

1.6 Die Zebrafisch *heart and soul (has)* Mutante

Bisher ist die Zebrafisch *heart and soul (has)* Mutante ausführlich in der Entwicklung des Herzens, des Auges, des Hirns und des Darmes beschrieben worden (Horne-Badovinac et al., 2001; Malicki et al., 1996; Peterson et al., 2001; Rohr et al., 2006; Schier et al., 1996; Stainier et al., 1996; Yelon et al., 1999). In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *has* Mutation starke Defekte in der Herzmorphogenese auslöst. So sind das „tilting“ des Herzschlauchs und die Herzschlauchelongation gestört. Dies führt dazu, dass beide Kammern des Herzens nicht wie im Wildtyp hintereinander liegen, sondern dass das Atrium den Ventrikel umschließt (Horne-Badovinac et al., 2001; Peterson et al., 2001; Yelon et al., 1999). In der *has* Mutante ist die Entwicklung verschiedener Epithelien gestört. So werden

z.B. im Darm von *has* Mutanten anstelle eines zentralen Lumens mehrere Lumina angelegt (Horne-Badovinac et al., 2001).

Klonierung der *has* Mutante zeigte, dass der Locus für die atypische Proteinkinase C λ (aPKC λ , auch Protein Kinase C iota (PRKCi) genannt) codiert (Horne-Badovinac et al., 2001; Peterson et al., 2001). aPKC liegt in Epithelien in einem Proteinkomplex zusammen mit Par3 und Par6 vor. Epitheliale Zellen zeichnen sich unter anderem durch zwei Eigenschaften aus. Sie sind polarisiert und besitzen hoch differenzierte Zellkontaktkomplexe (Knust und Bossinger, 2002). Diese Komplexe teilen die Plasmamembran in unterschiedliche Domänen auf. Den Abschluss zum Lumen und Diffusionsbarriere stellen in der apikalen Domäne die Tight Junctions her. Der aPKC-Par3-Par6 Proteinkomplex ist Teil dieser Tight Junctions, wobei innerhalb dieser die Claudine den Kontakt zu den Nachbarzellen aufbauen. An den Claudinen binden wiederum die Zonula Occludens Proteine ZO1, ZO2 und ZO3. ZO1 bindet nun über das Protein JAM an den aPKC-Par3-Par6 Komplex (Übersichtsartikel: Henrique und Schweisguth, 2003; Müller and Bossinger, 2003). Basal zu den Tight Junctions liegt die basolaterale Domäne (Zonula adherens) mit Adherens Junctions. Sie stellt den Kontakt zu den Nachbarzellen her. Eine Komponente der Adherens Junctions ist E-Cadherin, das hauptsächlich als Transmembranprotein den Kontakt zu den Nachbarzellen aufnimmt. An den cytoplasmatischen Teil von E-Cadherin binden α -Catenin und β -Catenin, die über Bindung von Formin den Kontakt zum apikalen Ring aus Actinsträngen herstellen (Übersichtsartikel: Lien et al., 2006).

Die beschriebenen Proteinkomplexe sind nicht nur bloßes „Rückgrat“ der Zellkontaktkomplexe, sondern auch aktiv an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt. In verschiedenen Untersuchungen und Organismen ist dies bestätigt worden (Henrique und Schweisguth, 2003). Ebenso zeigen *has* Mutanten Probleme während der Epithelbildung des Darmes (Horne-Badovinac et al., 2001) sowie in der Etablierung des Myocardepithels. Für die Myocardzellen ist gezeigt worden, dass ausschließlich die Kinasefunktion von aPKC λ gewebespezifisch in den Myocardzellen nötig ist, um die Epithelbildung zu ermöglichen (Rohr et al., 2006).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, verschiedene Aspekte des Relokalisierungsprozesses der Schilddrüse im Zebrafisch zu untersuchen. Es sollte geklärt werden, ob die Schilddrüse durch Evagination aus dem Pharynxepithel ein Derivat des Endoderms darstellt und ausschließlich aus Zellen endodermaler Herkunft besteht. Außerdem sollte die Relokalisierung, auch mittels hochauflösender konfokaler Mikroskopie, im Wildtyp und in Embryonen mit fehlender aPKC-Funktion unter dem Aspekt der Etablierung von apiko-basaler Polarität beschrieben werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Zur Verwendung kamen ausschließlich Chemikalien der Qualität pro analysis (p.a.) der folgenden Firmen: Biomol (Hamburg), Biozym (Hameln), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Merck-Eurolab (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen).

Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer: Invitrogen GmbH (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim).

Filtermaterial: Schleicher & Schüll (Dassel), Macherey & Nagel (Düren) und Amersham (Freiburg).

Verbrauchsmaterial: Roth (Karlsruhe) und Sarstedt (Rommelsdorf)

2.2 Puffer, Lösungen und Medien

Die verwendeten Lösungen, Puffer und Nährmedien zur Kultivierung von *E.coli* wurden nach Angaben von Sambrook und Russell (2001) mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O, Wasserreinigungssystem Milli-Q von Millipore, Eschborn) angesetzt. Die Lösungen und Nährmedien wurden vor Gebrauch autoklaviert bzw. sterilisiert (0,2 µm Filter, Roth).

2.3 Zebrafische

2.3.1 Verwendete Zebrafischstämme

Die Zebrafisch-Wildtyplinie wurde ursprünglich in einem Kölner Zoofachgeschäft bezogen. Die *heart and soul* (*has*) Mutante entstammt einem Mutanten Screen (Driever et al., 1996), das *has*^{m567} Allel trägt eine Basenaustauschmutation an der Position 1532, die zu einem verfrühten STOP und einem Verlust von 69 Aminosäuren führt (Horne-Badovinac et al., 2001).

Die transgene Zebrafischlinie CLGY576 entstammt einem Insertionsscreen (Ellingsen et al., 2005). In dieser Linie wird die Expression von yellow fluorescent protein (YFP) durch den *nk2.1a* Promoter gesteuert (pers. Mitteilung Tom Becker).

2.3.2 Haltung und Zucht des Zebrafisches

Die für die Experimente verwendeten Fische wurden in einem geschlossenen Aquariensystem der Firma Aquarienbau Schwarz (Göttingen), bei einem Lichtrhythmus von 14 Std. hell zu 10 Std. dunkel, gehalten. Die Wassertemperatur wurde auf ca. 28°C reguliert. Das zur Aquarienfällung verwendete Leitungswasser wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit VE Wasser verschnitten (Leitwert von ca. 500 - 600 µS/cm, Gesamthärte 17 - 20°dH). Nitrit- und Ammoniumkonzentration (nicht nachweisbar), Nitratkonzentration (< 50 mg / l) und pH-Wert (=7) wurden in regelmäßigen Zeitabständen kontrolliert und bei Abweichung nachreguliert.

Das Futter bestand aus einer Kombination aus herkömmlichem Fischtrockenfutter, frischgeschlüpften Larven des Salinenkrebse *Artemia salina* sowie *Bosmidien*, heimischen Süßwasserkrebsen, die tiefgefroren bezogen wurden.

Die Eiablage und Aufzucht der Fische geschah in Anlehnung an die Angaben in „*The Zebrafish Book*“ (Westerfield, M; 2000).

Embryonen wurden in Zebrafisch-Ringer (1/3 ZFR) gehalten.

Zebrafisch Ringer:

Stocklösungen:

#1 (25 x): 169,5 g / l NaCl; 5,4 g / l KCl; 29,75 g / l Hepes (Sigma)

#2 (100 x): 26,4 g / l; CaCl₂; 34,96 g / l; CaCl₂ x 2 H₂O

1/3 ZFR: 12 ml #1 + 9 ml #2 + 879 ml dd H₂O; auf pH 7,2 mit NaOH einstellen.

Um der ab ca. 20 hpf einsetzenden Pigmentierung entgegenzuwirken, wurde dem Zebrafisch-Ringer PTU (0,003% PTU; Phenylthiourea, Sigma) zugesetzt.

2.3.3 Bestimmung der Entwicklungsstadien

Die Bestimmung der Entwicklungsstadien erfolgte durch Beobachtung am Stereomikroskop und orientierte sich an den veröffentlichten Beschreibungen von Kimmel et al. (1995).

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Fixierung und Aufbewahrung

Vor dem Fixieren wurden die Embryonen entweder von Hand mit einer Uhrmacherpinzette oder mit Hilfe von Pronase (1-5 mg/ml in 1/3 ZFR, Sigma) dechorioniert. Die Embryonen wurden ü.N. bei 4°C mit einer 4%igen PFA-Lösung (4% Paraformaldehyd in 1xPBS) fixiert, bzw. 2 Std. bei Raumtemperatur (RT). Das PFA wurde anschließend mehrmals zunächst mit PBT, dann mit Methanol ausgewaschen. Die Embryonen wurden bei -20°C in Methanol gelagert.

4% PFA:

4g Paraformaldehyd in 100 ml 1xPBS einrühren und durch Erwärmen lösen. Abkühlen lassen und bei -20°C aufbewahren.

2.4.2 Einbetten in Durcupan und Anfertigung von Schnitten

Dieses Medium dient der dauerhaften Einbettung von fixierten Embryonen. Diese können dann an einem Mikrotom geschnitten werden.

Durcupan (mittelfest, *Fluka*) wurde wie folgt angesetzt:

32 ml Epoxydharz

+ 27 ml Härter

+ 1 ml Beschleuniger

+ 0,6 ml Weichmacher

Epoxydharz und Härter werden gründlich vermischt. Dann den Beschleuniger tropfenweise

zugeben und schließlich der Weichmacher sehr gründlich bis zur völligen Schlierenfreiheit einrühren. Das leicht zähflüssige Durcupan in Einmal-Spritzen abfüllen und bei -20°C aufbewahren.

Einbettung der Embryonen:

Die Embryonen jeweils 2 x 5 Min. in 50 %igem, 70 %igem, 90 %igem und 95 %igem Ethanol, sowie für jeweils 2 x 10 Min. in 100 %igem Ethanol und 100 %igem Azeton entwässern. Daraufhin wurden diese ü.N. in einem 1 : 1 Gemisch aus 100 %igem Azeton und Durcupan (mittelfest) inkubiert und offen stehen gelassen, damit das Azeton abdampft. Schließlich wurden sie in Einbettungsförmchen aus Silikon (*Plano*, Wetzlar) mit frischem Durcupan (mittelfest) überführt und ü.N. bei 65°C inkubiert.

Bevor die ausgehärteten Kunstharzblöcke in das Mikrotom eingespannt wurden, mussten sie zurecht geschnitten (getrimmt) werden, um die Schnittfläche zu minimieren. Der Bereich um den eingebetteten Embryo wurde hierzu pyramidenförmig zugeschnitten. Das Trimmen der Blöcke musste in regelmäßigen Abständen wiederholt werden, wenn die Schnittfläche nach Anfertigung einer bestimmten Anzahl von Schnitten zu groß geworden war. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (RM 2255, Leica) angefertigt, die Schnittdicke betrug zwischen 5 und 8 µm. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger überführt und ein Tropfen frisches Durcupan auf den Objektträger gegeben. Dieser wurde mit einem Deckgläschen bedeckt und die Präparate über Nacht bei 65°C ausgehärtet. Die Schnitte wurden auf einem Mikroskop (*Axioskop*, Zeiss) analysiert und mit einer Digitalkamera ProgRes C12 (*Jenoptik*, Jena) fotografiert.

2.4.3 Einbetten in Glycerin

Gefärbte Embryonen wurden vor der Betrachtung und den Aufnahmen an Mikroskopen (Stereomikroskop: Leica MZFLIII, Leica; Durchlichtmikroskop: Zeiss Axioskop, Zeiss; jeweils mit einer ProgRes C12 Kamera (Jenoptik) ausgestattet) in Glycerin überführt:

Aus nachfixierten Embryonen wurde das PFA mit PBT ausgewaschen. Dann wurden diese jeweils in 30 %igem, 50 %igem, 70 %igem und 90 %igem Glycerin so lange inkubiert, bis sie zu Boden sanken. Die Aufbewahrung erfolgte in 90- bis 100%igem Glycerin bei 4°C.

2.4.4 Antikörperfärbungen (nach *in situ* Hybridisierung)

Die gefärbten Embryonen wurden nach dem Nachfixierschritt der *in situ* Hybridisierung 30 Min. mit PBT gewaschen. Dabei wurde das PBT 5mal gewechselt. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidasen wurden die Embryonen in 10% H₂O₂ (10% H₂O₂ in PBT) 30 Min. inkubiert und danach innerhalb von einer Stunde 5mal mit PBT gewaschen. Dann wurden die Embryonen in 3% NGS/PBT (Normal Goat Serum (Ziegen Serum) in PBT) für 2 Std. geblockt und anschließend im 1. Antikörper in den angegebenen Verdünnungen (Tabelle) in 3% NGS/PBT für 2 Std. inkubiert. Nicht gebundener 1. Antikörper wurde 10mal während 3 Std. mit PBT ausgewaschen. Es folgte eine Lagerung über Nacht in PBT bei 4°C. Anschließend wurden die Embryonen 2 Std. im 2. Antikörper (1:200 verdünnt in 3 % NGS/PBT) inkubiert und danach 10mal mit PBT während 2 Stunden gewaschen. Das ABC-Reagenz (VectaStain Elite ABC-Kit, Linaris) wurde zur Detektion des biotinylierten 2. Antikörpers zu den Embryonen gegeben und für 2 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Embryonen mehrmals kurz mit PBT und dann über Nacht bei 4°C in PBT gewaschen. Danach 5mal je 10 Min. in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 30 Min. in DAB-Lösung inkubiert (DAB in 1xPBS; 0,2mg/ml). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,3%igem H₂O₂ gestartet (Verhältnis: DAB-Lösung zu 0,3% H₂O₂ = 500:1). Die Intensität der Färbung wurde durch Betrachtung mit dem Stereomikroskop kontrolliert und durch kurzes Waschen mit PBT gestoppt. Anschließend folgte die Nachfixierung über Nacht mit 4% PFA und die Überführung in Glycerol.

Folgende primäre Antikörper wurden verwendet:

| 1. AK | Beschreibung | Verdünnung | Hersteller |
|----------------|--|------------|---|
| α -TG | anti humanes Thyroglobulin, polyklonal, aus Kaninchen | 1:6000 | ICN Biomedicals |
| α -MF20 | anti Myosin schwere Kette, aus Maus | 1:100 | Developmental Studies Hybridoma Bank |

Folgende sekundäre Antikörper wurden verwendet:

| 2. AK | Beschreibung | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------|---|------------|----------------|
| G- α -M-HRP | biotinylierter Ziege-Anti-Maus Antikörper, Meerrettich-Peroxidase konjugiert | 1:200 | Vecta, Linaris |
| G- α -R-HRP | biotinylierter Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper, Meerrettich-Peroxidase konjugiert | 1:200 | Vecta, Linaris |

2.4.5 Antikörper- und Phalloidin-färbungen an Vibratomschnitten und konfokale Mikroskopie

Zur Anfertigung der Vibratomschnitte wurden frisch fixierte Embryonen der CLGY567 Linie nach der PFA-Fixierung 5mal für 5 Min. mit PBT gewaschen. Danach wurden sie in 4% Agarose (low melting point Agarose (Sigma) in 1xPBS) eingebettet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Agarose nicht über 40°C temperiert war. Die Embryonen wurden in der aushärtenden Agarose ausgerichtet. Nach Aushärtung wurden die Embryonen in kleinen Agaroseblöcken ausgeschnitten. Hieraus wurden an einem Vibratom (Vibratome1000, TPI) 150 μ M dicke Schnitte angefertigt. Danach wurden diese umgehend mit 1% BSA in PBDT (1% Bovine Serum Albumin (Rinderseumalbumin, Sigma) in PBDT: 1xPBS; 1% DMSO (Dimethylsulfoxid); 0,7% Triton X-100) für 2 Std. geblockt. Anschließend wurden die Schnitte für 2 Std. mit dem 1. Antikörper inkubiert. Die Antikörper wurden in den angegebenen Verhältnissen in 1% BSA/PBDT verdünnt. Die Schnitte wurden mindestens 8mal in 2 Std. mit 1% BSA/PBDT gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation entweder mit dem 2. Antikörper oder mit Rhodamin-Phalloidin für weitere 2 Std., jeweils verdünnt in 1% BSA/PBDT. Um Signalverluste der fluoreszenz-gekoppelten 2. Antikörper oder des Rhodamin-Phalloidin zu vermeiden, wurde dieser Inkubationsschritt bei Dunkelheit durchgeführt, ebenso die anschließenden Waschschrte. Es wurde nicht häufiger als 4mal in 45 Min. mit 1% BSA/PBDT gewaschen, ebenfalls um die Signalverluste so gering wie möglich zu halten. Die Schnitte wurden in 1xPBS überführt und auf Objektträgern vorsichtig mit einem feinen Pinsel ausgerichtet. Ein Deckglas, mit Wachsfüßchen versehen, bedeckte die Schnitte, die dann umgehend der Betrachtung am konfokalen Mikroskop Leica TCS SP2 (Leica, Bensheim) zugeführt wurden. Bei Multikanalmikroskopie wurden beide Kanäle sequenziell gescannt.

Folgende primäre Antikörper wurden verwendet:

| 1. AK | Beschreibung | Verdünnung | Hersteller |
|-----------------------------|--|-------------------|---------------------------------|
| α - β -Catenin | Antikörper gegen β -Catenin, aus Maus | 1:400 | Sigma |
| α -ZO1 | Antikörper gegen ZO1, aus Maus | 1:100 | Zymed Laboratories |
| α -E-Cadherin | Antikörper gegen E-Cadherin, aus Maus | 1:200 | BD Biosciences |
| α -Laminin | Antikörper gegen Laminin, aus Kaninchen | 1:100 | Sigma |
| α -GFP | Antikörper gegen GFP, erkennt aber auch YFP, aus dem Kaninchen | 1:600 | Torrey Pines Biolabs, Chemokine |

Folgende sekundäre Antikörper wurden verwendet:

| 2. AK | Beschreibung | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------|---|-------------------|--------------------|
| G- α -R-Cy2 | Cy2 gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper | 1:100 | Amersham Pharmacia |
| G- α -M-Cy3 | Cy3 gekoppelter Ziege-Anti-Maus Antikörper | 1:100 | Amersham Pharmacia |

Die f-Actin Detektion mittels Rhodamin-Phalloidin (Molecular Probes, jetzt: Invitrogen) wurde, wie oben erwähnt, mit der Antikörperfärbung verbunden. Das Rhodamin-Phalloidin wurde nach Herstellerangaben gelöst in Methanol und 1:100 verdünnt in 1%BSA/PBDT eingesetzt.

2.5 *In situ* Hybridisierung

In situ Hybridisierungen verliefen in Anlehnung an die Angaben in „*The Zebrafish Book*“ (Westerfield, 1994).

In Methanol gelagerte Embryonen wurden 3mal für je 5 Min. in PBT gewaschen und anschließend mit Proteinase K (verdünnt in PBT; Stock-Lsg: 2 mg/ml; Sigma) behandelt. Die

Proteinase K wurde kurz mit PBT ausgewaschen und die Embryonen mit 4% PFA für 15 Min. nachfixiert. Die Embryonen wurden danach etwa 5mal für je 10 Min. mit PBT ausgewaschen und anschließend mind. 2 Std. bei 60°C in Hyb⁺ prähybridisiert. Hybridisiert wurde über Nacht bei 60°C (Verdünnungen der Sonden lagen zwischen 1:50 und 1:500). Hierauf folgten je 15 minütige Waschschrte in Hyb⁺:2xSSC-Gemischen (75:25, 50:50, 25:75) bei 60°C. Dann wurde einmal mit 2xSSCT gespült und 2mal 30 Min. in 0,2xSSCT bei 60°C inkubiert.

Die folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zunächst wurde 5mal mit PBT gewaschen und danach 2-3 Std. mit 0,5%iger Blocking Reagenz Lösung (0,5% Boeringer Block in 1xPBS, Roche) geblockt. Der Anti-DIG-AP Antikörper (Roche, 1:6000 verdünnt in 0,5% Blocking Reagenz) wurde für 2 Std. inkubiert. Daraufhin wurde mehrere Male in kurzer Folge mit PBT gewaschen und übernacht bei 4°C gelagert. Vor dem Färben wurden die Embryonen weitere 2 Std. in PBT, anschließend 3mal für je 5 Min. in AP-Puffer inkubiert. Zum Färben wurden die Embryonen in Färbeschalen überführt, in Färbelösung BM Purple (Roche) inkubiert und im Dunkeln zum Entwickeln stehen gelassen. Nach der Färbung wurden die Embryonen mehrmals in PBT gewaschen, in 4%PFA nachfixiert, erneut mehrmals in PBT gewaschen, in Glycerol überführt und bei 4°C aufbewahrt.

Lösungen:

Hyb-:

50 % Formamid; 5 x SSC, 0,1 % Tween 20.

Hyb+:

976 µl Hyb- , 10 µl denaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg / ml),

10 µl Heparin (5 mg / ml), 4 µl Hefe-tRNA (25 mg / ml).

20 × PBS:

2,76 M NaCl

50 mM KCl

160 mM Na₂HPO₄

50 mM KH₂PO₄

1 × PBT:

1 × PBS

0,1 % Tween-20

20 × SSC:

3 M NaCl

0,3 M NaCitrat

pH 4,7

2 × SSCT:

2 × SSC

0,1 % Tween-20

0,2 × SSCT:

0,2 × SSC

0,1 % Tween-20

AP-Puffer:

100 mM Tris pH 9,5

50 mM MgCl₂

100 mM NaCl

0,1 % Tween-20

Folgende Inkubationszeiten und Verdünnungen in PBT wurden bei der Proteinase K Behandlung verwendet:

| Stadium | Verdünnung | Dauer |
|---------|------------------|------------------|
| <18 Som | keine Behandlung | keine Behandlung |
| 18 Som | 1:1000 | 5 min |
| 24 hpf | 1:1000 | 6 min |
| 26 hpf | 1:1000 | 8 |
| 28 hpf | 1:1000 | 10 |
| 30 hpf | 1:1000 | 30 |
| 32 hpf | 1:500 | 25 |
| 35 hpf | 1:250 | 10 |
| 48 hpf | 1:250 | 35 |
| 55 hpf | 1:250 | 45 |
| 72 hpf | 1:100 | 60 |

2.6 Mikroinjektionen in Zebrafischembryonen

Borsilikatkapillaren mit Filament (Hildenberg) wurden mit einem *Sutter P9 Micropipette Puller* (Sutter) gezogen und mit 4 μ l der Injektionslösungen befüllt. Diese enthielten unterschiedliche Mengen an Morpholino-oligonukleotiden oder mRNAs (siehe Tabelle) aber immer auch 0,2% Phenolrot (Sigma). Mittels eines Mikromanipulators (Narishige) und einer Injektionsanlage Pneumatic PicoPump (WPI) wurde mit fein abgebrochenen Kapillaren in die Embryonen injiziert. Bis auf die in Kapitel 3.2 vorgestellten Injektionen wurde immer im 1-Zell-Stadium injiziert. Dabei lagen die Embryonen, mit 1/3 ZFR bedeckt, in Vertiefungen agarosegelbeschichteter Petrischalen. Nach Injektion wurden die Embryonen in 1/3 ZFR gehalten und gegebenenfalls für Transplantationen weiterverwendet.

| Morpholino | Sequenz | Beschrieben von | Injektionskonzentration |
|---|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| <i>heart and soul</i> (<i>has</i>) | 5'-TGTCCCGCAGCG TGGGCATTATGG-3' | Horne-Badovinac et al., 2001 | 100µM |
| <i>Kontroll-MO</i> | 5'-CCTCTTACCTCA GTTACAATTTATA-3' | www.gene-tools.com | 100µM |

| mRNA | beschrieben von | absolute Menge pro Embryo |
|--------------------------|---|----------------------------------|
| <i>scl</i> | Gering et al., 2003 | 25 pg |
| <i>lmo2</i> | Gering et al., 2003 | 25 pg |
| <i>tar*</i> | Peyrieras et al., 1998; David und Rosa, 2001 | 0,6-1,2 pg |
| <i>aPKC^{2A}</i> | Rohr et al., 2006 | 120 pg |
| <i>gfp</i> | / | 120 pg |

2.7 Transplantationen und Detektion der transplantierten Zellen

Zuerst wurden die Embryonen im 1-Zell-Stadium mit den Injektionslösungen injiziert. Die Zusammensetzung dieser Lösung in bezug auf Konzentrationen von Morpholinos oder RNAs variierte je nach Experiment (siehe Tabellen in Abschnitt 2.6). Zusätzlich beinhalteten die Injektionslösungen, wenn Transplantationen durchgeführt werden sollten, noch Tetramethylrhodamin-Dextran (10000MW, 5mg/ml, Invitrogen) und biotiniliertes Dextranamin (10000 MW, 5mg/ml, Invitrogen). Vier Stunden nach Befruchtung wurden die injizierten Embryonen und Empfängerembryonen mit Pronase (1mg/ml in 1/3 ZFR) dechorioniert und in Vertiefungen von agarosegelbeschichteten Petrischalen überführt. Dabei war darauf zu achten, dass die Embryonen nicht mit Luft in Berührung kamen und stets mit 1/3 ZFR bedeckt waren. Zellen wurden mit einer abgebrochenen feinen Glaskapillare ohne Filament (Hilgenberg) mittels eines Öldrucksystems (WPI) und eines Mikromanipulators (Narishige) von einem zum anderen Embryo überführt. Die Embryonen wurden in 1/3 ZFR mit PTU gehalten, zu den jeweiligen Stadien fixiert und der *in situ* Hybridisierung zugeführt.

Nach der *in situ* Hybridisierung und Färbung schloss sich die Detektion und Färbung der transplantierten Zellen an. Wenn eine braune Färbung der transplantierten Zellen erreicht werden sollte, so entsprach die Detektion von biotinyliertem Dextranamin der Detektion des biotinylierten 2. Antikörpers des Antikörperfärbungsprotokolls mittels ABC-Kit und DAB (siehe 2.4.4.) Wenn die Zellen eine schwarze Färbung erhalten sollten, wurde lediglich die Färbelösung in der Zusammensetzung um Nickel erweitert (Färbelösung: 300µl DAB (1mg/ml), 64µl NiCl₂ (1%), 640µl 1xPBS).

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Köpfe adulter Zebrafische wurden in TRIZOL-Reagenz (Invitrogen) homogenisiert. Der weitere Verlauf entsprach dem TRIZOL Herstellerprotokoll.

2.8.2 Herstellung von Einzelstrang-cDNA (first-strand cDNA)

Unter Verwendung des *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) und der oligo dT-Primer dieses Kits wurde nach Herstellerangaben Einzelstrang-cDNA hergestellt.

2.8.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit Einzelstrang-cDNA als Matrize

Zur Durchführung der PCR (Erich, 1989) wurden die PCR Maschinen *Mastercycler Gradient* und *Mastercycler Personal* (Eppendorf) verwendet. Es wurde die *Platinum-Taq Pfx* (Invitrogen), MgSO₄-Konzentration, Reaktionspuffer, dNTPs, Primer- und Templatekonzentration nach Herstellerangaben, 1 × *Enhancersolution* und 0,5µl *Platinum-Taq Pfx* – Polymerase benutzt. Für einen Reaktionsansatz wurden 1-10ng DNA eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 50µl.

Reaktionsprofil:

Die DNA wurde zunächst 2 Minuten bei 94°C denaturiert. Zu Beginn eines Zyklus wurde die DNA 30 Sekunden bei 94°C denaturiert. Die Anlagerung der Primer für 30 Sekunden erfolgte für 3 Zyklen bei 60°C, für 6 Zyklen bei 58°C und für weitere 26 Zyklen bei 55°C. Die Extension wurde 1 Minute bei 72°C durchgeführt. Die finale Elongation erfolgte 5 Minuten bei 72°C. Das Programm endete auf 16°C, wartend.

Die verwendeten Primer für die *scl5a5*-Klonierung:

scl5a5-vorwärts:

5'-ATGGCTATGGACTCTGACAGACCAC-3'

scl5a5-rückwärts:

5'-CCTCCATAGTGACAGCAGCC-3'

2.8.4 Agarosegelelektrophorese

Bei der elektrophoretischen Trennung von Nukleinsäuren wurden Gele mit einem Agaroseanteil zwischen 0,8 % und 1,2 % in 1 × Tris-Acetat Elektrophorese (TAE)-Puffer verwendet. Der Agaroseanteil richtete sich nach der Größe der zu analysierenden Nukleinsäuren (Sambrook and Russel, 2001). Die Proben wurden mit 1×Ladepuffer (Ambion) versetzt und in 1 × TAE in einer Flachbettgelkammer aufgetrennt. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid versetzt (4µl Ethidiumbromidlösung (Sigma, 10µg/ml) auf 100 ml), so dass sie auf einem UV-Transiluminator sichtbar gemacht und fotografiert werden konnten.

Größenstandard: 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL)

Agarose: Ultra Pure Agarose (Invitrogen)

2.8.5 Reinigung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen (Gelextraktion)

Mittels einer Skalpellklinge wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel, das dabei auf dem UV-Transiluminator lag, ausgeschnitten und in ein 1,5ml Einmalreaktionsgefäß überführt. Die weitere Reinigung erfolgte über das GFX PCR and GelBand Purification Kit (Amersham Biosciences) nach den Angaben des Herstellers.

2.8.6 Ligation von PCR-Produkten und Transformation in kompetente Bakterien

Zur Ligation von PCR-Produkten und Transformation nach erfolgreicher Ligation wurde das TOPO-TA-Cloning Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Produkte wurden in den pCRII-Vector ligiert.

2.8.7 Kulturverfahren für *Escherichia coli*

Kulturverfahren für *E. coli* entsprachen vorhandenen Protokollen (Sambrook and Russel, 2001).

2.8.8 Minipräparation von Plasmid DNA

Die Plasmidextraktion (Volumen der Bakterienkultur: 3-5ml) wurde mittels Plasmid Mini Kit (QUIAGEN) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.8.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die Sequenzierungsreaktion wurde folgender 10 µl Ansatz verwendet:

1. 1,5 µl Big Dye Version 3.1
2. maximal 300 ng Plasmid-DNA
3. 1 µl 5µM Primer für eine Sequenzierungsrichtung
4. x µl Wasser, um die Reaktion auf 10 µl aufzufüllen

Die Reaktion wurde im Mastercycler gradient (Eppendorf) durchgeführt, wobei folgendes Reaktionsprofil verwendet wurde:

1. 96 °C, 1 min
2. 96 °C, 10 s
3. 52 °C, 15 s
4. 60 °C, 4 min
5. Wiederholung der Schritte 2-4 29x
6. Lagerung bei 4 °C

Zur Erstellung der Sequenz wurde ein ABI 3100-Sequencer (AppliedBiosystems) verwendet.

2.8.10 Spaltung (Schneiden) von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen (siehe 2.1) liegen gewöhnlich in 50% Glycerol vor. Zur Vermeidung von Sternaktivität betrug die Glycerolkonzentration eines Ansatzes nicht mehr als 5%. In einem 50µl Ansatz wurden 5-10µg Plasmid DNA und 20 U Enzym eingesetzt, die Restriktion erfolgte für ≥ 2 Std. bei 37°C. Es schloss sich eine Phenol-Chloroform Extraktion (siehe Abschnitt 2.8.11) zur Reinigung an.

Liste der verwendeten Plasmide; sowohl für die Herstellung der *in situ* Sonden (anti-sense Polymerase), als auch für die Herstellung von gecappter mRNA (sense Polymerase):

| Gen | Vector | Plasmid von | linearisiert mit | Polymerase |
|--------------------------|-----------|-----------------|------------------|------------------|
| <i>nk2.1a</i> | pCS2+ | Klaus Rohr | Bam H1 | T7 (anti-sense) |
| <i>tg (cb717)</i> | pBSII-SK+ | ZF stock center | Not 1 | T7 (anti-sense) |
| <i>scl5a5</i> | pCRII | Burkhard Alt | Not 1 | Sp6 (anti-sense) |
| <i>kdr</i> | pBSII-SK+ | Laborstock | EcoR1 | T7 (antisense) |
| <i>tiel</i> | pBSII-SK+ | Laborstock | Spe 1 | T7 (antisense) |
| <i>scl</i> | pβUT2-MT | M.Gering | EcoR1 | T3 (sense) |
| <i>lmo2</i> | pβUT2-MT | M.Gering | EcoR1 | T3 (sense) |
| <i>tar*</i> | pCS2+ | F. Rosa | Xba 1 | Sp6 (sense) |
| <i>aPKC^{2A}</i> | pCS2+ | Stefan Rohr | Not 1 | Sp6 (sense) |
| <i>gfp</i> | pCS2+ | A. Reugels | Xba 1 | Sp6 (sense) |

2.8.11 Phenol-Chloroform Extraktion

Ein dem Restriktionsansatz entsprechendes Volumen Phenol-Chloroform (Verhältnis Phenol: Chloroform = 1 : 1) wurde hinzugefügt, kräftig gemischt (Vortex) und anschließend bei 13000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Die wässrige (obere) Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5ml Einmalreaktionsgefäß überführt. Die Phenol-Chloroform Extraktion wurde 2mal wiederholt. Anschließend wurde 1 Volumen Chloroform hinzugefügt. Nach Mischen der Phasen (Vortex, 30 Sekunden) wurde 60 Sekunden bei 13000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Der Lösung wurde 1/20 Volumen 5M NaCl und das 2,5fache Volumen Ethanol (100%) hinzugefügt. Die DNA wurde für ≥ 10 Stunden bei -20°C , oder für 1 Stunde bei -80°C gefällt. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 x g für 20 Minuten. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und noch einmal 1 Minute bei 13000 x g zentrifugiert. Das Ethanol wurde verworfen und das Pellet dann in H_2O resuspendiert.

2.8.12 *in vitro* Transkription für die Herstellung von *in situ* Sonden

Die Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen erfolgte mittels RNA Polymerasen (Roche), entsprechend dem auf der DNA Matrize vorhandenen Promoter. Die Markierung der Sonden erfolgte mittels des *Digoxigenin RNA Labeling Mix* der Firma Roche nach Herstellerprotokoll. Auch die Aufreinigung wurde nach Angaben dieses Protokolls durchgeführt.

Die Angaben zur jeweils verwendeten antisense Polymerase (antisense) ist der Tabelle in Abschnitt 2.8.10 zu entnehmen.

2.8.13 *in vitro* Transkription zur Herstellung gecappter mRNA

Für die Herstellung gecappter mRNA wurde das MegaScript-Kit (Ambion) verwendet (sense Polymerase: siehe Tabelle in Abschnitt 2.8.10).

20 µl Ansatz, 3 Std. bei 37°C Inkubation:

1. x µl nukleasefreies H₂O, um den Ansatz auf 20µl aufzufüllen.
2. 2 µl ATP-Lösung
3. 2 µl CTP-Lösung
4. 2 µl UTP-Lösung
5. 1µl GTP-Lösung
6. 1,25µl m⁷G(5')ppp(5')G Cap-Analog
7. 2 µl 10x Reaktionspuffer
8. 1 µg Template-DNA
9. 2µl Enzym-Mix

Anschließend wurde die mRNA mit Filterröhrchen (Ultrafree-MC Centrifugal Filter Devices 100000 NMWL Filter Unit und 0,45 µM Filter Unit, Millipore) nach Herstellerangaben gereinigt, in H₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.9 Datenerfassung und Auswertung

2.9.1 Benutzte Computersysteme

Die Daten- und Bilderfassung wurden an PCs mit diversen Windows Betriebssystemen oder an Apple Rechnern mit dem Betriebssystem OSX durchgeführt.

2.9.2 Benutzte Software

Acrobat Reader, Photoshop CS2 (*Adobe*)

BioEdit (*Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University*)

VectorNTI (*Invitrogen*)

Außerdem wurden die Dienste von PubMed und Blast (*NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov*), sowie www.ensembl.org und die ZFIN (www.zfin.org) in Anspruch genommen.

3. Ergebnisse

3.1 Der Differenzierungsmarker *slc5a5* wird ab ca. 40 hpf im Schilddrüsenprimordium exprimiert

Bei Beginn der vorliegenden Doktorarbeit lagen keine Daten zur Expression von Schilddrüsendifferenzierungsmarkern im Zebrafisch vor. Um Zellen zu identifizieren, die über die Eigenschaft der Hormonproduktion verfügen, wurde die Expression des Natrium-Jod-Symporters (*solute carrier family 5 member 5, slc5a5*) in Schilddrüsenzellen untersucht. Der Natrium-Jod-Symporter, üblicherweise als Na(+)/I(-) Symporter (NIS) abgekürzt, wird an der basalen Membran der Schilddrüsenzellen benötigt. Dort transportiert er Jod aus dem Blut in die Schilddrüsenzelle, die in weiteren Reaktionen Jod an Thyroglobulin bindet (Nussey und Whitehead, 2001). Es wurde ein Teil der Aminosäuresequenz vom Natrium-Jod-Symporter im unvollständig sequenzierten Zebrafischgenom (www.ensembl.org) identifiziert und mittels genspezifischer Primer aus cDNA in einer PCR amplifiziert. Die Homologie des erhaltenen PCR-Fragments zum NIS aus dem Menschen (ProteinID: NP_000444) wurde mittels BLAST Analyse und einer Aminosäuridentität von 70% bestätigt. Die Zebrafisch cDNA Sequenz ist unter der Accession Nummer DQ402039 hinterlegt.

Zellen, die den Natrium-Jod-Symporter exprimieren, sind im Zebrafisch ab ca. 40 hpf im Schilddrüsenprimordium zu identifizieren (Abb. 4A). Während des weiteren Wachstums des Schilddrüsenprimordiums kann man die Expression des Natrium-Jod-Symporters in einer unregelmäßig geformten Domäne entlang der Mittellinie im ventralen Pharynxgewebe erkennen (Abb. 4C,D). Noch später kann man NIS Expression in den entlang der Mittellinie aufgereihten Follikeln ausmachen (Abb. 4E). Die gleichzeitige Detektion von *slc5a5* Transkript und Thyroglobulin zeigt, dass die Expression von *slc5a5* ausschließlich auf Schilddrüsenzellen beschränkt ist (Abb. 4F).

Die Expression des Differenzierungsmarkers NIS beginnt im Zebrafisch kurz nach der Evagination des Primordiums aus dem Pharynxepithel. Ausserdem kann die Thyroglobulinproteinexpression ebenfalls bei 55 hpf im Primordium beobachtet werden (Alt et al., 2006b). Dabei fällt auf, dass Thyroglobulin bereits zu dieser Zeit im noch vergleichsweise kleinen Lumen lokalisiert ist. Die Primordiumzellen sind also früh polarisiert und soweit differenziert, dass sie zur Expression von NIS und TG fähig sind.

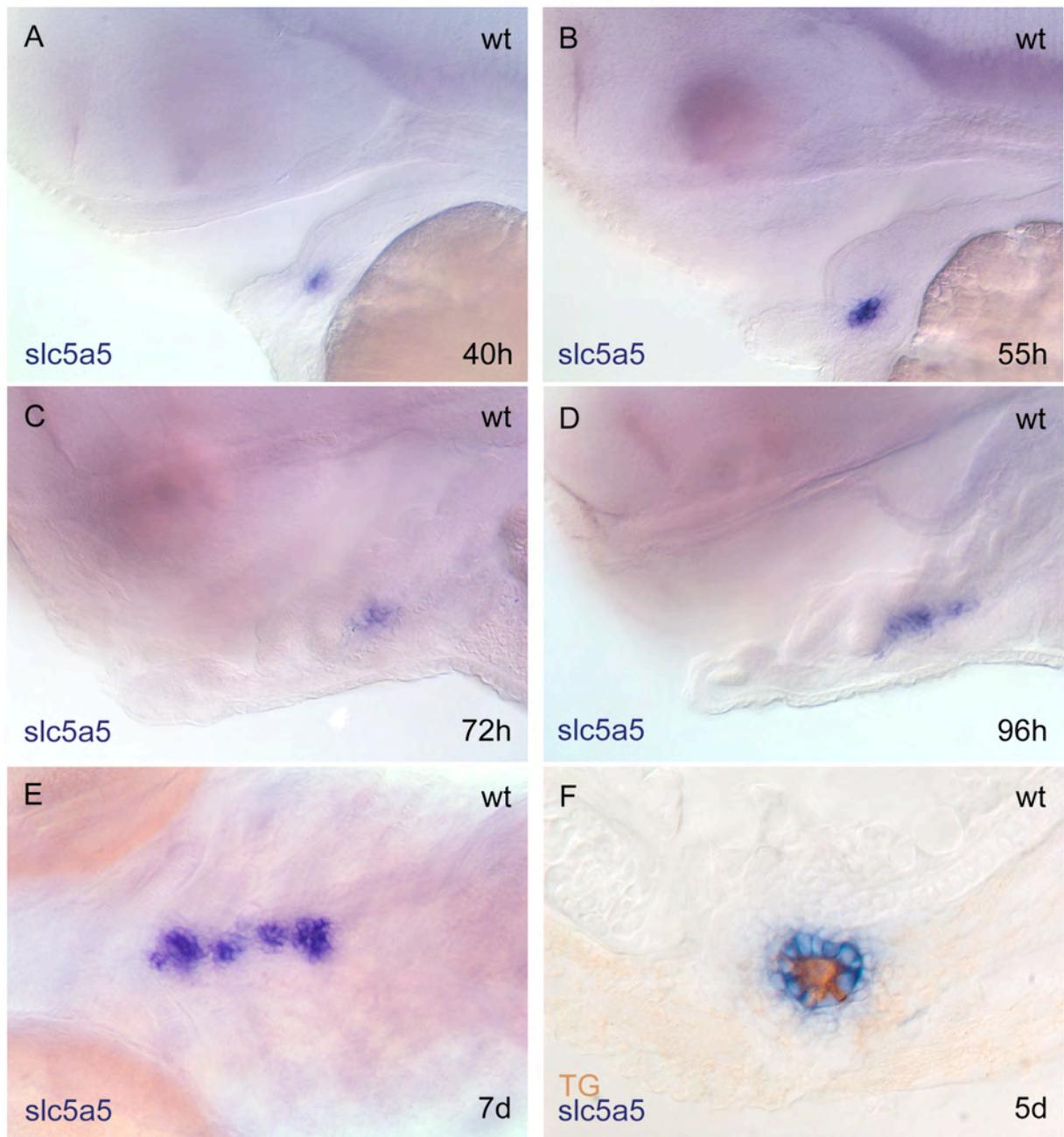


Abb. 4: Die Expression von *slc5a5* beginnt im Wildtyp bei ca. 40hpf. A-D: laterale Ansicht, E: ventrale Ansicht, A-E: anterior links; F: Querschnitt einer Doppelfärbung mit TG-Antikörper in braun. Das Stadium ist jeweils unten rechts und die Färbung unten links angezeigt.

3.2 Im Zebrafisch stammen alle Zellen der Schilddrüsenfollikel vom endodermalen Mittellinienprimordium ab

Die kontinuierliche Expression des Transkriptionsfaktors Nk2.1a im Schilddrüsenprimordium des Zebrafisches impliziert, dass alle Follikelzellen von diesem Primordium abstammen (Rohr und Concha, 2000). Es blieb in dieser Untersuchung jedoch offen, ob nicht zu einem späteren Zeitpunkt andere Zellen in das Primordium einwandern und

so z.B. zur Proliferation beitragen. In der vorliegenden Arbeit wurde dies untersucht, in dem Blastomeren in ihrem Entwicklungsschicksal beeinflusst wurden. Durch molekulare Manipulation wurden Blastomeren in ein endodermales Schicksal gezwungen und die Nachkommen dieser Blastomeren konnten durch Zellmarkierung verfolgt werden.

Die Entwicklung des Endoderms hängt vom Nodal Signaltransduktionsweg ab (Feldman et al., 1998). Um nun zu testen, ob die Schilddrüse aus dem vom Nodal-Signalweg abhängigen Endoderm entsteht, wurde *Tar** ektopisch exprimiert. *Tar** ist eine konstitutiv aktive Form des TGF β -Typ I Rezeptors Taram-A (Renucci et al., 1996). Taram-A wird im Wildtyp in einer Region exprimiert, die die Endodermzellen einschließt, so dass in diesen Zellen der Nodal-Signalweg eingeschaltet wird. Durch Injektion von *tar** mRNA werden Blastomeren zellautonom in ein endodermales Schicksal geleitet (David und Rosa, 2001; Peyrieras et al., 1998). Injektion in eine der äußeren Blastomeren im 8-Zell-Stadium führt dazu, dass diese Zelle eine zentrale Rolle in der Endodermentwicklung einnimmt und die Nachkommen dieser Zelle endodermale Derivate bilden. Durch Koinjektion von *tar** und Zellmarkern, wie z.B. *gfp* (green fluorescent protein) mRNA oder biotinyliertes Dextranamin oder Rhodamin-Dextranamin, kann man die Nachkommen der injizierten Blastomere verfolgen und die Entwicklung des Endoderms und seiner Derivate visualisieren (Peyrieras et al., 1998).

Embryonen, die in eine der äußeren Blastomeren mit *tar** und *gfp* mRNA injiziert wurden, visualisieren *in vivo* durch die Expression von green fluorescent protein (GFP) die Entwicklung des Pharynxendoderms. Nach 24 hpf ist das Pharynxepithel die einzige Struktur im Kopf, die ein GFP Signal zeigt. Ausserdem sind GFP Signale in der mesendodermalen Hatching Gland zu beobachten (Abb. 5A, B). Nach ca. 35 hpf evaginiert das Schilddrüsenprimordium aus dem Pharynxepithel (Abb. 5C). Später wird das GFP Signal zunehmend schwächer, aber die Detektion von Biotin-Dextran mittels DAB-Färbung zeigt bei 168 hpf eine starke Färbung im Pharynxepithel und in den Schilddrüsenfollikeln, die tief im hypopharyngialen Mesenchym liegen (Abb. 5D). Abbildung 5F zeigt die Expression vom Schilddrüsenentwicklungsmarker *nk2.1a* in den Follikelzellen. Nach Detektion der Endodermzellen im gleichen Embryo (Abb. 5G und E) ist zu entdecken, dass alle Zellen, die *nk2.1a* exprimieren ebenfalls den Zellmarker Biotin-Dextran beinhalten und damit vom Endoderm abstammen. Dies konnte in Querschnitten bestätigt werden (Abb. 5G). Hieraus kann geschlossen werden, dass im Zebrafisch aus dem Mittellinienprimordium, welches aus dem ventralen Pharynxepithel evaginiert, die Gesamtheit der larvalen Schilddrüsenfollikelzellen entsteht.

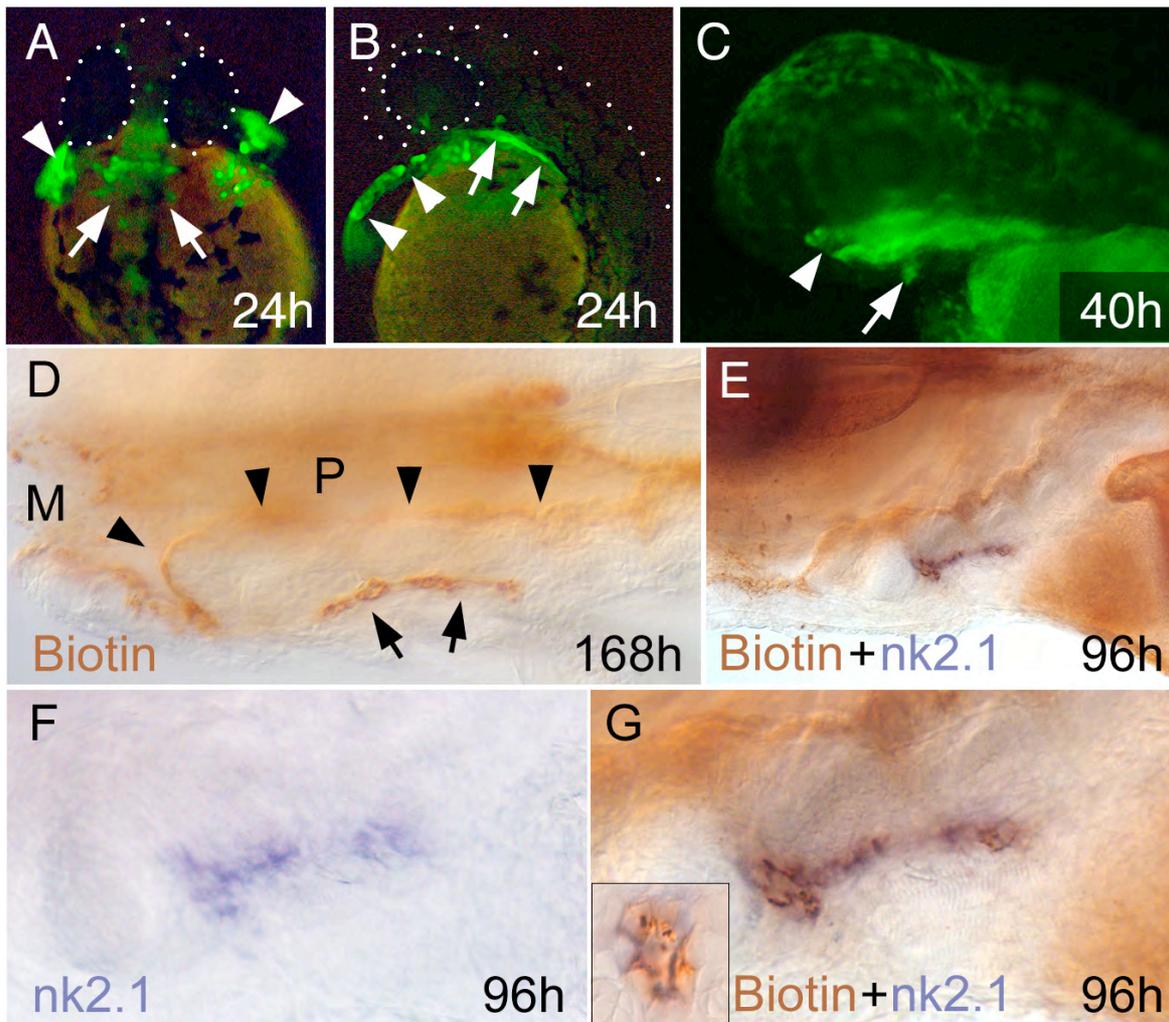


Abb. 5: *Tar exprimierende Zellen verdeutlichen den endodermalen Ursprung der Schilddrüse.** Stadium und Färbung entsprechend Abb.4. A-C: Green fluorescent protein (GFP) Expression in Embryonen, die in eine der acht Blastomeren im 8-Zellstadium mit *tar** und *gfp* mRNA injiziert wurden. A und B: Pfeilspitzen weisen auf GFP Expression in der hatching gland, die Pfeile auf die im Pharynxendoderm hin. C: Pfeil zeigt auf das Schilddrüsenprimordium, das gerade den Kontakt zum Pharynxendoderm verloren hat, Pfeilspitze zeigt auf den Mund. D: Biotin Detektion (DAB-Färbung (braun) von biotinyliertem Dextranamin) in einer 168 hpf Larve nach *tar**+Biotin-Dextran+*gfp* mRNA Injektion in eine äußere von acht Blastomeren. Die Färbung ist ausschließlich im Pharynxepithel (Pfeilspitzen) und in der Reihe der Schilddrüsenfollikel (Pfeile) zu beobachten. E: Doppelfärbung aus *nk2.1a* Expression (blau) und Biotin Detektion (braun) eines 96h Embryos, der wie die Embryonen in A-D injiziert wurde. F und G: Gleicher Embryo wie in E jedoch in höherer Vergrößerung vor (F) und nach (G) Biotin Detektion. Follikelquerschnitt (Box in G) zeigt eine vollständige Überlappung der braunen und blauen Färbung und somit die endodermale Abstammung des gesamten Schilddrüsenorgans. A: dorsale Ansicht, anterior oben; B - G: laterale Ansichten und anterior links. M: Mund; P: Pharynx

3.3 Transplantierte *Tar** exprimierende Zellen enden häufig im Schilddrüsenprimordium

Untersuchungen zum Anlagenplan (engl. Fate mapping) konnten im Zebrafisch zeigen, dass das Pharynxendoderm vom dorsalen Teil der Blastula, von marginalen Blastomeren nahe der Shield-Struktur abstammt (Warga and Nusslein-Volhard, 1999). Dieser Untersuchung folgend, entstammen weiter posterior gelegene endodermale Derivate von weiter ventral

gelegenen Zellen der Blastula. Um nun zu klären, ob die Schilddrüse aus dem Gebiet der Pharynxvorläuferzellen im Blastulastadium stammt, wurde in dieser Doktorarbeit eine schilddrüsenspezifische Anlagekarte mittels Zelltransplantation angestrebt. Nach Transplantation von mit Zellmarkern markierten wildtypischen Zellen in wildtypische Empfänger (beide im späten Blastulastadium), konnten transplantierte Zellen in 11 von 47 Embryonen im Pharynxepithel identifiziert werden. In keinem der Embryonen lagen jedoch transplantierte Zellen in der Schilddrüse. Dies kann daran liegen, dass nur eine sehr kleine Anzahl an Pharynxepithelzellen zum Schilddrüsenprimordium beitragen.

Um die Wahrscheinlichkeit von Schilddrüsen mit transplantierten Zellen zu erhöhen, wurden *tar** exprimierende wildtypische Zellen ca. 4 Std. alter Embryonen in wildtypische Empfänger gleichen Alters transplantiert. Dabei wurden die Zellen in die marginale Blastularegion der Empfängerembryonen positioniert. Solche Zellen enden im Endoderm (David und Rosa, 2001). Kurze Zeit nach diesen Transplantationen wurden die Empfängerembryonen im Shield-Stadium darauf untersucht, wo die transplantierten Zellen in Relation zur Shield-Struktur liegen (Abb. 6A). Dies war möglich, weil die transplantierten Zellen, in der marginalen Zone liegend, immer noch eine koherente Gruppe darstellten (n=63). Aus der Analyse ausgeschlossen wurden zwei Embryonen, bei denen die transplantierten Zellen keine zusammenhängende Gruppe mehr darstellten. Die transplantierten Empfängerembryonen wurden nach 55hpf auf transplantierte Schilddrüsenzellen untersucht. Dazu wurde nach einer *nk2.1a in situ* Hybridisierung eine Biotin Detektion angeschlossen, mit der man die biotinmarkierten transplantierten Zellen nachweisen kann. Im Gegensatz zum ersten Ansatz ohne *tar** mRNA, konnten jetzt in 16 von 63 Embryonen transplantierte Zellen in der Schilddrüse beobachtet werden (Abb. 6B, C). Durch Vergleich der „Schilddrüsentreffer“ mit der Position zum Shield im Shield-Stadium konnte folgendes geschlossen werden: Die Wahrscheinlichkeit, dass die transplantierten Zellen in der Schilddrüse enden ist am größten, wenn diese nahe der Shield-Struktur (Zone1) liegen. Andere Zellen der dorsalen Hemisphäre (Zonen 2 und 3) können ebenfalls zur Schilddrüse beitragen. Die Zellen der ventralen Blastularegion (Zonen 4, 5 und 6) können nicht in der Schilddrüse enden (Tabelle 1). Statistische Analysen zeigen, dass die Position der Zellen im Shield-Stadium in bezug auf deren Beitrag zur Schilddrüse nicht zufällig ist (χ^2 Test, 18.577; P = 0,001; Fisher's exact Test, 16.458; P = 0,002). Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass *Tar** einen Einfluss auf die Verteilung der Zellen entlang der dorsoventralen Achse im Shield-Stadium hat, so ist doch die gleiche Verteilung von

Schilddrüsen- und Pharynxvorläuferzellen ein Hinweis darauf, dass beide Vorläuferzelltypen gleicher Abstammung sind.

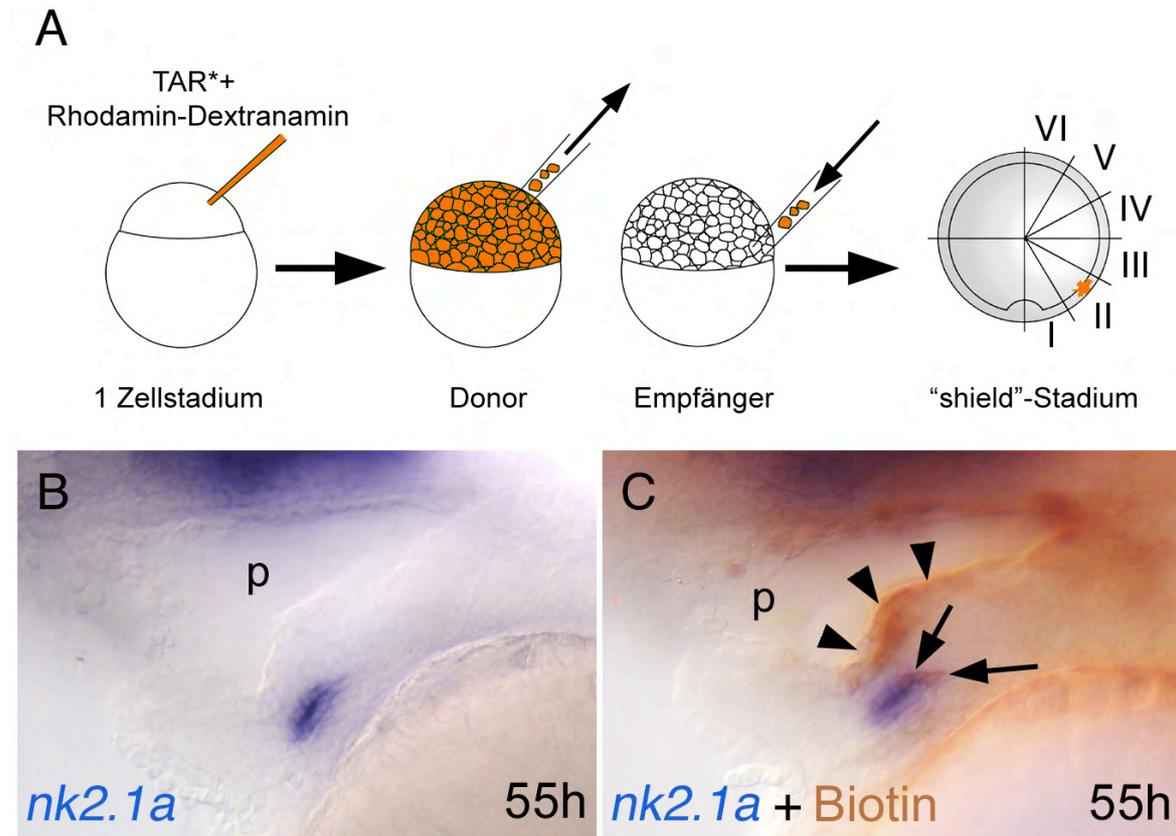


Abb. 6: Erstellung einer Anlagenkarte für die Schilddrüse im Shield-Stadium mittels Transplantation Tar* exprimierender Zellen. Stadium und Färbung entsprechend Abb.5. A: Schematische Zeichnung stellt den Verlauf des Experiments dar (siehe Text für Details). Im Shield-Stadium wurde der Embryo in sechs Zonen aufgeteilt (hier nur für eine Seite dargestellt). B und C: transplantierte Embryo nach 55hpf. *nk2.1a* Expression (B) und anschließende Biotin Detektion (C) im gleichen Embryo: Mindestens 2 transplantierte Zellen (Pfeile) liegen im Schilddrüsenprimordium. B und C: laterale Ansicht und anterior links. p: Pharynx; Pfeilspitzen zeigen transplantierte Tar* exprimierende Zellen im Pharynxepithel.

Tabelle 1: Schilddrüsenvorläuferzellen liegen im Blastulastadium nahe der Shield-Struktur

| Position der transplantierten Zellen im Shieldstadium (vergl. Abb. 6A) | Anzahl der Embryonen mit transplantierten Zellen in jeweiliger Zone | Jeweilige Anzahl an chimären Schilddrüsen (insges. 16 von 63 transplantierten Embryonen) |
|--|---|--|
| I | 20 | 10 |
| II | 12 | 1 |
| III | 10 | 5 |
| IV | 7 | 0 |
| V | 8 | 0 |
| VI | 6 | 0 |

3.4 Die *heart and soul (has)* Mutation löst verschiedene Defekte während der Schilddrüsenentwicklung aus

3.4.1 Die Induktion der Schilddrüse in *has* Mutanten und Morphants verläuft wildtypisch, es zeigen sich jedoch Defekte während der Relokalisierung des Schilddrüsenprimordiums

Klonierung der *has* Mutante zeigte, dass der Lokus für die atypische Proteinkinase C λ (*aPKC λ*) codiert (Horne-Badovinac et al., 2001; Peterson et al., 2001). Die bekannten Allele der *has* Mutante (*m129* und *m567*) weisen beide verfrühte STOP Codons auf. Dies führt zur Inaktivierung der Kinaseaktivität, obwohl in den Allelen die Kinase Domäne noch vorhanden ist. In beiden vorgenannten Veröffentlichungen sind Morpholino oligonukleotide gegen *aPKC λ* in Embryonen injiziert worden. Diese Embryonen werden im folgenden *has* Morphants genannt. Sie zeigen mit der *has* Mutante identische Defekte, da die verwendeten Morpholino oligonukleotide spezifisch die Translation von *aPKC λ* blockieren können (Horne-Badovinac et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass *aPKC λ* im Zebrafisch bei der Morphogenese des Herzens und des Darms eine wichtige Rolle spielt (Horne-Badovinac et al., 2001; Peterson et al., 2001; Rohr et al., 2006). Defekte in bezug auf die Entwicklung der Schilddrüse sind nicht beschrieben. Embryonen des *has^{m567}* Allels wurden in der vorgelegten Arbeit auf Defekte während der Schilddrüsenentwicklung untersucht. Es konnten in den Mutanten Phänotypen beobachtet werden, die mit den in dieser Arbeit vorgestellten Defekten nach *has* Morpholino Injektion (also in Morphants) identisch sind, aber in der Mutante seltener auftraten (Tabelle 2). Deshalb sind in dieser Arbeit weitestgehend an *has* Morphants Analysen durchgeführt worden.

Die ersten Vorläuferzellen der Schilddrüse lassen sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors *Nk2.1a* identifizieren (Rohr und Concha, 2000). Dieser ist ab 24 hpf in einer Gruppe von Zellen des Pharynxendoderms exprimiert, die sich in diesem schmal mediolateral erstreckt. Diese Domäne wandert während der weiteren Entwicklung in Richtung anterior und liegt nach ca. 30 hpf im ventralen Pharynxepithel. Zu diesem Zeitpunkt unterscheidet sich die Expression von *nk2.1a* in wildtypischen Embryonen, *has* Mutanten und mit *has* Morphants nicht (Abb. 7A, B,C).

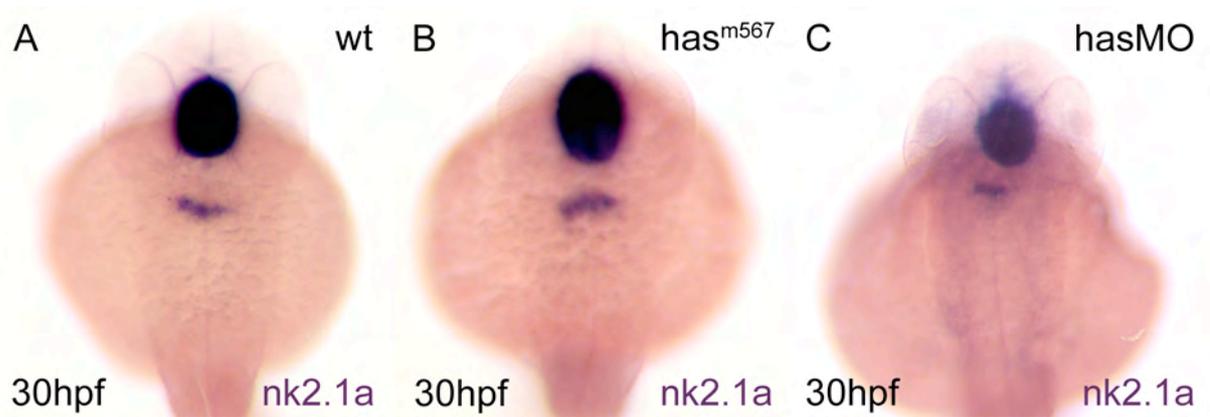


Abb. 7: Homozygote *has*^{m567} Mutanten und *has* Morphants weisen wildtypisch induzierte Schilddrüsenvorläuferzellen auf. A (wt), B (*has* Mutante), C (*has* Morphant): *nk2.1a* Expression (blau) bei 30 hpf, dorsale Ansicht, anterior ist oben.

In der weiteren Entwicklung löst sich das Schilddrüsenprimordium aus dem ventralen Pharynxepithel und liegt nach ca. 55 hpf tief im hypopharyngialen Mesenchym (Abb. 8A, A'). *has* Mutanten und Morphants zeigen bei diesem Prozess mehrere Defekte. Zum einen kann man in 53,2% (n=57) der Morphants beobachten, dass ein Teil des Primordiums im Pharynxepithel verbleibt (Abb. 8B, B', C, D), zum anderen liegen in 26,2% (n=28) die hier vollständig relokalierten Primordien nicht in der Mittellinie. Sie sind lateral verschoben (Abb. 8E; Tabelle 2). Beide Defekte können auch zusammen auftreten (Abb. 8C, C', D). Es ist also zu vermerken, dass *aPKCλ* während des Relokalisierungsprozesses des Schilddrüsenprimordiums benötigt wird.

Tabelle 2: Relokalisierungsphänotypen: Anzahl der Embryonen mit *nk2.1a* Expression in den angegebenen Regionen in *has^{m567}* -, *hasMO* -, *Kontroll-MO*-, *aPKC^{2A}* - und *gfp* - mRNA injizierten Embryonen sowie in nicht injizierten wiltypischen Embryonen (*wt*) nach 55 hpf.

| | Pharynx-epithel | relokalisierte Primordien (keine Expr. im Pharynxepithel) | | n= |
|-------------------------------|-----------------|--|-------------|-----|
| | | lat. verschob. Primordium | Mittellinie | |
| <i>has^{m567}</i> | 10 (19,2%) | 22 (42,3%) | 20 (38,5%) | 52 |
| <i>hasMO</i> | 57 (53,2%) | 28 (26,2%) | 32 (29,9%) | 107 |
| <i>aPKC^{2A}</i> mRNA | 14 (20,9%) | 25 (37,3%) | 28 (41,8%) | 67 |
| <i>Kontroll-MO</i> | 0 | 0 | 35 (100%) | 35 |
| <i>gfp</i> mRNA | 0 | 0 | 38 (100%) | 38 |
| <i>wt</i> | 0 | 0 | 52 (100%) | 52 |

Abb. 8: (folgende Seite): Fehlende aPKC λ Funktion löst verschiedene Defekte während der Relokalisierung des Schilddrüsenprimordiums aus. *nk2.1a* Expression (blau) bei 55 hpf. A und A': Wildtypembryo in lateraler (A) und frontaler (A') Ansicht zeigt vollständige Ablösung des Primordiums aus dem ventralen Pharynxepithel. B - E: Verschiedene Relokalisierungsphänotypen in *has* Morphants. B, B' und C, C': selbe Embryonen jeweils in lateraler (B,C) und frontaler (B', C') Ansicht. D und E frontale Ansicht. F und G: Relokalisierungsphänotypen in *aPKC^{2A}* mRNA injizierten Embryonen. Pfeile weisen auf nicht vollständig relokalierte Primordien hin. Pfeilspitzen zeigen auf lateral verschobene jedoch abgelöste Primordien. Doppelfärbung in braun: MF20 Antikörperfärbung zur Kontrolle des *has* Herzphänotyps in injizierten Embryonen. Nur erfolgreich injizierte Embryonen wurden quantifiziert. A, B, C, F: laterale Ansicht u. anterior rechts. A', B', C', D, E, G: frontale Ansicht.

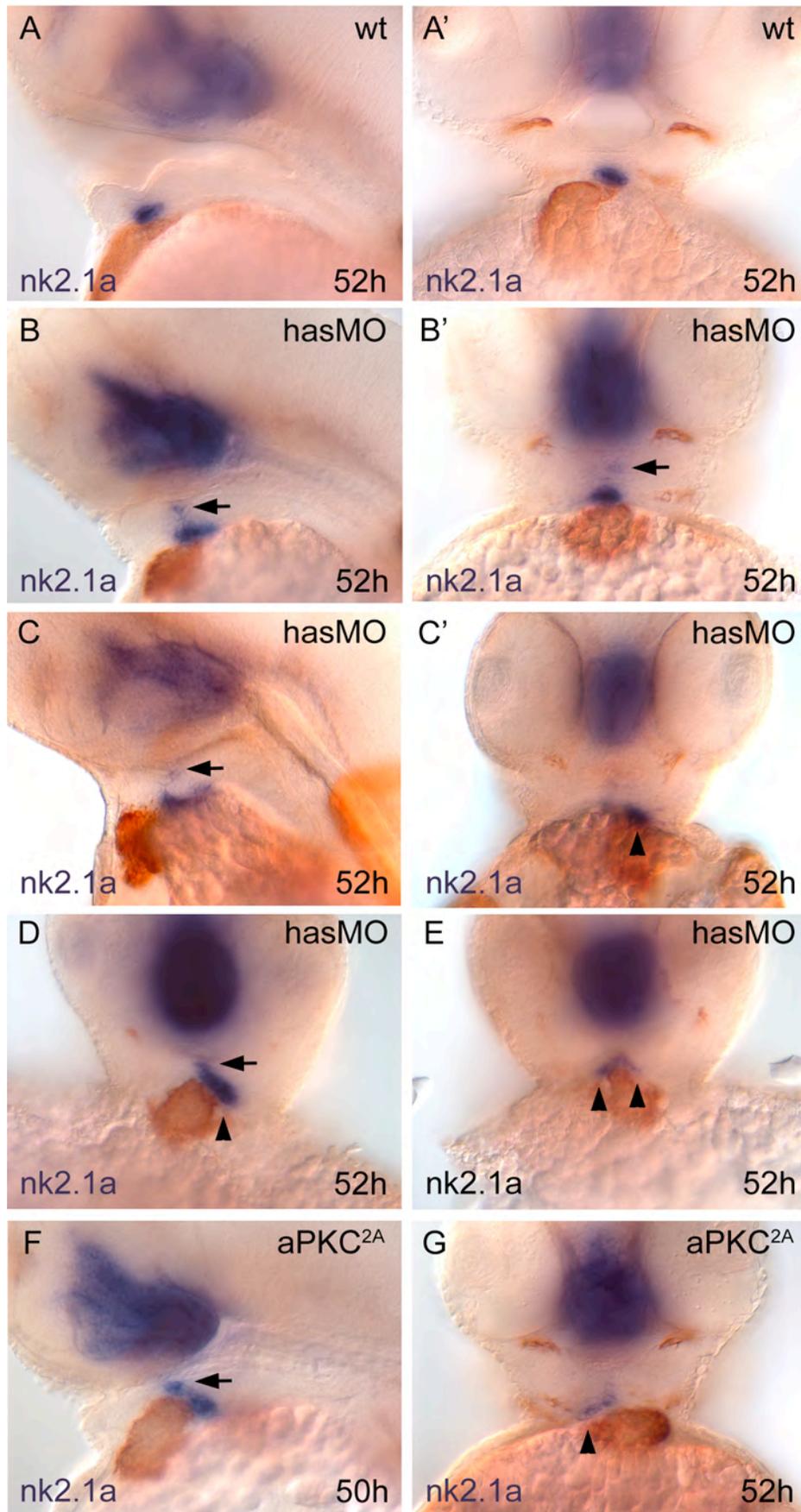


Abb. 8: (siehe vorherige Seite)

3.4.2 Der Relokalisierungsprozess der Schilddrüse benötigt die Kinase-Funktion von aPKC λ

Es konnte gezeigt werden, dass die Morphogenese des Herzens im Zebrafisch funktionale aPKC λ benötigt (Rohr et al., 2006). Mittels Injektion einer mutierten mRNA, die zu einer kinaseinaktivierten Version der aPKC λ (aPKC^{2A}) führt, konnte der *has* Herzphänotyp erzeugt werden. In einem großen Teil der injizierten Embryonen (54%) erhielt man einen sogar noch stärkeren Herzphänotyp (Rohr et al., 2006). Um herauszufinden, ob der Relokalisierungsprozess der Schilddrüse ebenfalls von der Kinaseaktivität der aPKC λ abhängig ist, wurde diese kinaseinaktivierte mRNA injiziert und die Embryonen mittels *nk2.1a in situ* Hybridisierung nach 55 hpf auf Relokalisierungsphänotypen untersucht. Es zeigten sich die Phänotypen, die auch schon in *has*^{m567} Mutanten und in den *has* Morphants beobachtet wurden. In einem Teil der injizierten Embryonen (20,9%) verblieb ein Rest des Primordiums im Pharynxepithel (Abb. 8F). Außerdem konnte festgestellt werden, dass abgelöste Primordien lateral die Mittellinie verlassen können (Abb. 8G, Tabelle 2).

Es kann also festgestellt werden, dass die in den *has* Mutanten und *has* Morphants beobachteten Phänotypen in solchen Embryonen, die mit der kinaseinaktivierten mRNA Variante von aPKC λ injiziert wurden, wieder zu finden sind. Daraus kann geschlossen werden, dass zum einen diese Kinasefunktion von aPKC λ im Relokalisierungsprozess benötigt wird. Zum anderen wird dadurch bestätigt, dass es die ebenfalls fehlende Kinaseaktivität der aPKC λ in den *has* Mutanten ist, die zu den beobachteten Schilddrüsendefekten führt.

3.4.3 aPKC λ wirkt gewebeautonom im Pharynxepithel auf die Relokalisierung des Schilddrüsenprimordiums

Die Abschnitte 3.4.1 und 3.4.2 haben gezeigt, dass die Funktion von aPKC λ für die Relokalisierung des Schilddrüsenprimordiums nötig ist. Die Funktion von aPKC λ war in den in diesen Abschnitten untersuchten Embryonen aber in allen Zellen, also auch in nicht-endodermalen Geweben, ausgeschaltet. In Kapitel 3.2 konnte gezeigt werden, dass sämtliche Schilddrüsenzellen im Zebrafisch aus endodermalen Vorläuferzellen entstehen. Um nun zu klären, ob die Funktion von aPKC λ gewebeautonom im Endoderm, also endodermgewebespezifisch, benötigt wird, wurden Transplantationsexperimente durchgeführt. Diese Transplantationen folgten dem Schema der Transplantationen aus Kapitel

3.3. Spenderembryonen wurden im Einzellstadium mit einer Mischung aus *tar** mRNA, *has* Morpholino und einem Zellmarker injiziert. Nach 4 Stunden wurden Zellen dieser Embryonen in wildtypische Empfänger gleichen Stadiums transplantiert. So konnte erreicht werden, dass in einem wildtypischen Empfängerembryo in Teilen des Endoderms die aPKC λ Funktion ausgeschaltet wurde. Nach *nk2.1a in situ* Hybridisierung wurden diese 55 hpf alten Embryonen auf Schilddrüsenphänotypen untersucht. Es zeigte sich, dass in 8 von 25 transplantierten Embryonen Reste des Schilddrüsenprimordium im Pharynxepithel verblieben (Abb. 9B-B'''). Dies ist ein Defekt, der auch in den *has* Mutanten und in den *has* Morphants beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten jedoch keine Embryonen gefunden werden, bei denen das relokalisierte Primordium die Mittellinienposition verlässt.

Daraus lassen sich zwei Schlussfolgerungen ziehen. Zum einen ist die Funktion von aPKC λ im Endoderm nötig, um sicher zustellen, dass das Primordium zusammenhängend aus dem Pharynxepithel auswandert. Zum anderen ist in der *has* Mutante oder in den *has* Morphants das umliegende Gewebe des Primordiums so verändert, dass es die Wanderungsrichtung des Primordiums stört und zu fehlplazierten Schilddrüsen führt.

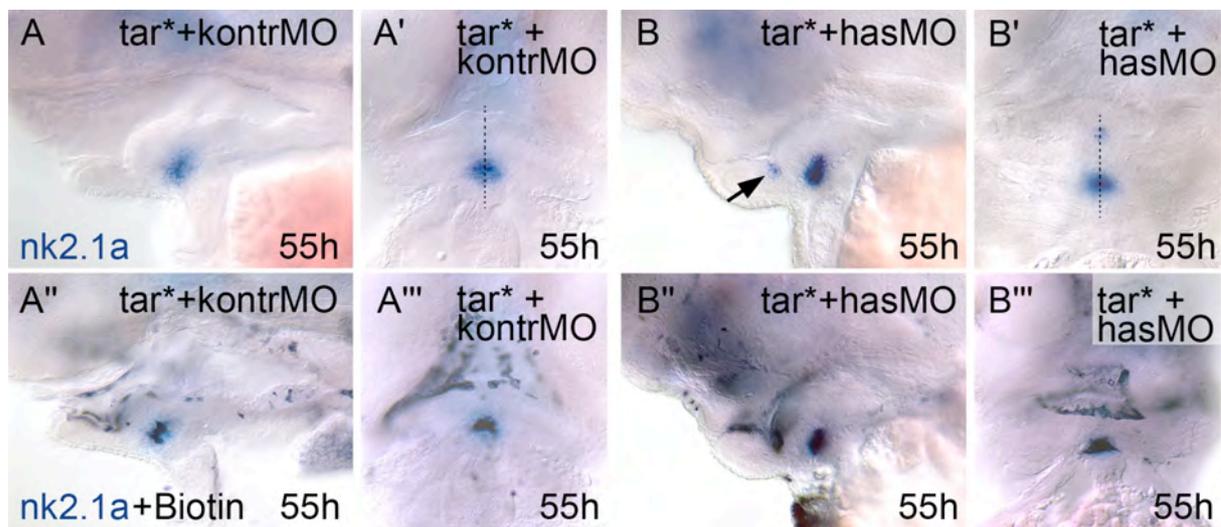


Abb. 9: Endodermspezifisches Ausschalten der aPKC λ Funktion führt zur unvollständigen Relokalisierung des Schilddrüsenprimordiums, das jedoch seine Mittellinienposition nicht verlässt. *nk2.1a* Expression (blau) vor (obere Reihe) und nach (untere Reihe) Biotin-Detektion (schwarz) in transplantierten Embryonen bei 55 hpf. Pfeil zeigt auf den Rest des Primordiums im ventralen Pharynxepithel. Gestrichelte Linie zeigt die Mittellinie. A-A''' und B-B''' jeweils selber Embryo. A, A'' und B, B'' laterale Ansicht. A', A''' und B', B''' frontale Ansicht.

Tabelle 3: Relokalisierungsphänotypen nach *tar**-Kombinationstransplantationen: Anzahl der Embryonen mit *nk2.1a* Expression in den angegebenen Regionen in Embryonen

| | Pharynx | relokalisierte Primordien | | n= |
|---------------------------------------|---------|---------------------------|-------------|----|
| | | lat. verschoben | Mittellinie | |
| <i>hasMO+tar*</i> mRNA in wt | 8 | 0 | 17 | 25 |
| <i>Kontroll-MO+tar*</i> mRNA in wt | 0 | 0 | 19 | 19 |

3.4.4 *has* Morphants weisen ein drastisch reduziertes Blutgefäßsystem im Kopf auf

Untersuchungen in Zebrafischmutanten, die Veränderungen der Pharynxblutgefäße aufweisen, konnten zeigen, dass in diesen Mutanten die Schilddrüsenprimordien morphologische Veränderungen aufweisen (Alt et al., 2006a). Es konnte beobachtet werden, dass die Primordien nach wildtypischer Induktion und vollständiger Ablösung aus dem Pharynxepithel häufig die Mittellinienposition verlassen. Diese Beobachtungen legten den Schluss nahe, dass die Morphogenese der Schilddrüse mit der Entwicklung der Kopfblutgefäße verknüpft ist (Alt et al., 2006a). Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit in Abschnitt 3.4.3 gezeigt werden, dass wahrscheinlich das Gewebe, welches das Primordium umgibt, für die Fehllokalisierung der relokalierten Primordien in *has* Morphants verantwortlich ist. Beide Beobachtungen führten dazu, *has* Morphants auf Defekte des Kopfblutgefäßsystems zu untersuchen.

Abbildung 10 zeigt die Expression des Blutgefäßmarkers *tiel*, eine Rezeptor Tyrosin Kinase, in 55 hpf Wildtypembryonen und *has* Morphants. Im Vergleich zum Wildtyp, bei dem die Schilddrüse in einem großen Bereich *tiel* exprimierender Endothelzellen eingebettet ist (Abb. 10A, A'), kann in *has* Morphants beobachtet werden, dass die Expression von *tiel* im Pharynxbereich drastisch reduziert ist (Abb. 10C, C'). Dies konnte in Schnitten bestätigt werden (Abb. 10B, D). In *has* Morphants ist somit das Blutgefäßsystem, das die relokalisierende Schilddrüse umgibt, nicht oder nur rudimentär ausgebildet.

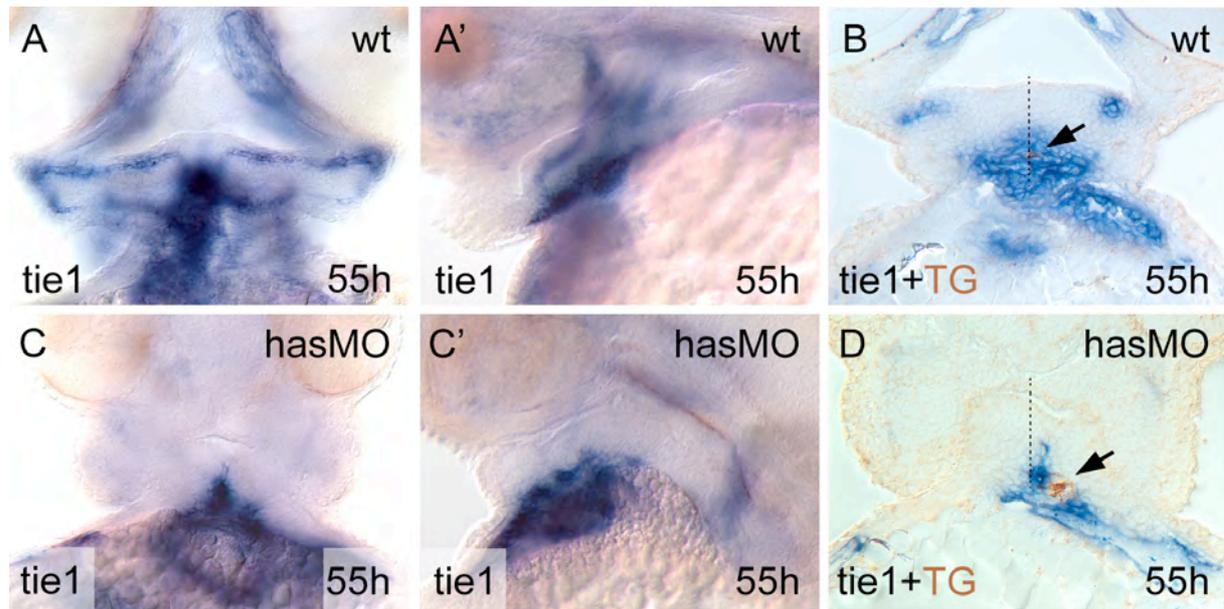


Abb. 10: *has* Morphants weisen ein stark reduziertes Blutgefäßsystem im Kopf auf. *tie1* Expression (blau) in wt Embryonen (A-B) und *has* Morphants (C-D) bei 55 hpf. Doppelfärbung mit TG Antikörper (braun) in B und D. Pfeil weist auf TG Färbung in der Schilddrüse hin. Gestrichelte Linie markiert die Mittellinie. A, A' und C, C' jeweils selber Embryo in frontaler bzw. lateraler (') Ansicht. B und D Querschnitte.

Es blieb aber zu klären, ob wirklich das veränderte Endothelgewebe in *has* Morphants für die Fehllokalisierung der Schilddrüse verantwortlich ist. Deshalb sollte in Transplantationsexperimenten untersucht werden, ob Endothelzellen nicht-zellautonom die Morphologie der Schilddrüse beeinflussen können (Abschnitt 3.4.5).

3.4.5 Ektopische Endothelzellen können die Schilddrüsenmorphologie nicht-zellautonom beeinflussen

Der Experimentansatz zur Schaffung und Transplantation ektopischer Blutgefäßzellen beinhaltete die Verwendung der Transkriptionsfaktoren *Scl* und *Lmo2*, die beide spezifisch in der Hämatopoese und Angiogenese wirken (Gering et al., 1998; Jin et al., 2006; Liao et al., 1998; Patterson et al., 2005; Yamada et al., 2000; Yamada et al., 1998). Koinjektion von *scl* und *lmo2* mRNA induziert die ektopische Expression des endothelspezifischen Transkriptionsfaktors *Fli1* im gesamten Kopfmesenchym. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Faktoren hinreichend für die Induktion des Endothelschicksals in Zellen des Kopfmesenchyms sind (Gering et al., 2003). Die Expression des Endothelmarkers *Kdr*, einem

endothelspezifischen Vegf Rezeptor, ist ebenfalls nach Koinjektion von *scl* und *lmo2* mRNA im gesamten Kopfmesenchym zu beobachten (Abb. 11B, D). Diese Embryonen entwickeln sehr starke Kopfdefekte und sterben nach 24 hpf. Dies verhindert in diesen Embryonen eine Analyse der Schilddrüse. Analysen konnten jedoch in Embryonen erfolgen, die bei Transplantationen Empfängerembryonen für *scl* und *lmo2* überexprimierende Zellen waren. In diesem Transplantationsansatz (Abb. 11E) wurden zum späten Blastulazeitpunkt (Dome-Stadium; ca. 4 - 4,5 hpf) aus *scl* und *lmo2* mRNA injizierten Donorembryonen Zellen entnommen und in wildtypische Empfänger transplantiert (Abb. 11E). Einige Embryonen wurden im 12-Somiten-Stadium, also einem Zeitpunkt zu dem die Zellen der späteren Blutgefäße des Kopfes angelegt werden (Gering et al., 2003), auf ektopische Endothelzellen untersucht. Mittels *kdr in situ* Hybridisierung und anschließender Detektion der transplantierten Zellen konnten diese Zellen eindeutig von den wildtypischen *kdr* exprimierenden Endothelzellen unterschieden und als ektopische Endothelzellen identifiziert werden. In allen Embryonen, die untersucht wurden, zeigten die transplantierten Zellen im Kopfmesenchym die Expression von *kdr* und dadurch ihr Endothelschicksal (12 von 12 Embryonen; Abb. 11F, G).

Die Analyse der Schilddrüsenentwicklung wurde an 55 hpf Empfängerembryonen durchgeführt. In den meisten Fällen war die Morphologie und Position der Schilddrüse wildtypisch, auch wenn transplantierte Zellen in der umgebenden Pharynxregion gefunden wurden (n=14). Aber in vier Embryonen, bei denen die transplantierten Zellen direkt neben dem Schilddrüsenprimordium lagen, zeigten diese Primordien in Richtung der transplantierten Zellen laterale Projektionen (Abb. 11H). Bei diesen vier Embryonen ist der Schilddrüsenmarker *nk2.1a* nicht in den transplantierten Zellen exprimiert. Zur Kontrolle wurden *gfp* mRNA überexprimierende Zellen in wildtypische Embryonen transplantiert. Von 28 transplantierten Embryonen zeigten sieben Embryonen transplantierte Zellen sehr nahe am Schilddrüsenprimordium. Diese und auch all die anderen Embryonen, bei denen transplantierte Zellen weiter von der Schilddrüse entfernt lagen, hatten eine normal geformte Schilddrüse, die keine lateralen Projektionen aufwies (Abb. 11I). Beide Transplantationsassays wurden auch weitergehend quantitativ untersucht. Die Breite und Länge der Schilddrüse wurde auf mittlerer Höhe ausgemessen. Die sieben Empfängerembryonen mit GFP-Zellen nahe der Schilddrüse, wiesen eine normale, leicht eiförmige Schilddrüse auf, sodass sich für diese Embryonen ein Quotient von je ungefähr 0,8 ermitteln lässt (Tabelle 5). Bei den vier Empfängerembryonen mit *scl* und *lmo2* exprimierenden, ektopischen Endothelzellen nahe der Schilddrüse lag der Quotient bei

ungefähr 0,4 (Tabelle 5). Statistische Analysen dieser Werte ergaben, dass sich die Schilddrüsen mit benachbarten *scl* und *lmo2* exprimierenden Zellen signifikant von den Schilddrüsen der Kontrollembryonen unterschieden ($P=0,02$; U-Test nach Mann, Wilcoxon and Whitney).

Tabelle 5: Benachbarte *scl* und *lmo2* exprimierende Zellen beeinflussen die Form der Schilddrüse

| Transplantierter Embryo (Labor code) | Breite | Länge | Breite/Länge |
|--|---------------|--------------|---------------------|
| gfp-25 | 12,4 | 15,6 | 0,79 |
| gfp-14 | 11,7 | 15,5 | 0,75 |
| gfp-4 | 12,2 | 16,7 | 0,73 |
| gfp-2 | 10,8 | 15,7 | 0,69 |
| gfp-18 | 13,8 | 14,5 | 0,95 |
| gfp-3 | 13,3 | 16,1 | 0,83 |
| gfp-5 | 13,7 | 15,4 | 0,89 |
| Mittelwert | 12,6 | 15,6 | 0,83 |
| | | | |
| scl-lmo2-4 | 10,7 | 29,6 | 0,36 |
| scl-lmo2-6 | 15,4 | 36,1 | 0,43 |
| scl-lmo2-3 | 10,2 | 31,9 | 0,32 |
| scl-lmo2-8 | 13,5 | 24,4 | 0,55 |
| Mittelwert | 12,5 | 30,5 | 0,42 |
| Breite und Länge (in μm) der Schilddrüse bei 55 hpf, gemessen auf mittlerer Höhe. Daten der vier Embryonen, bei denen die <i>scl+lmo2</i> überexprimierenden Zellen nahe der Schilddrüse lagen (<i>scl+lmo2</i> -#), und der sieben Embryonen, bei denen die <i>gfp</i> -exprimierenden Kontrollzellen entsprechend nahe an der Schilddrüse lagen (<i>gfp</i> -#). | | | |

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich zum einen transplantierte *scl* und *lmo2* überexprimierenden Zellen im Kopfmesenchym wie ektopische Endothelzellen verhalten, zum anderen, dass genau diese Zellen die Morphologie der Schilddrüse in nicht-zellautonomer Art beeinflussen.

Diese Daten und die Analyse der Blutgefäße in *has* Morphants legen den Schluss nahe, dass in der *has* Mutante und in *has* Morphants die Veränderungen der Blutgefäße für das seitliche Wegrutschen der Schilddrüse verantwortlich sein könnten.

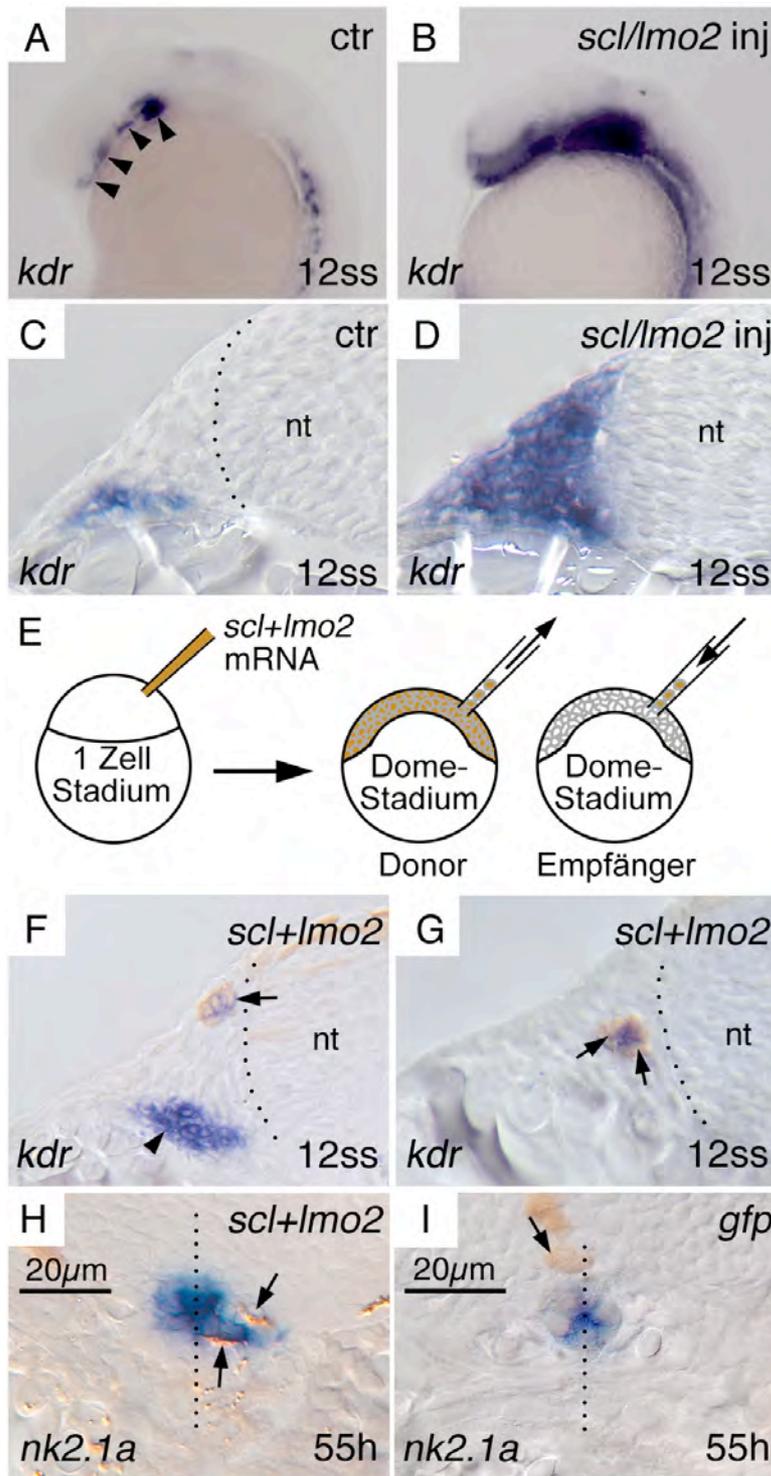


Abb. 11:
Ektopische Endothelzellen können die Schilddrüsenmorphologie nicht-zellautonom beeinflussen. Laterale Ansicht (A und B) und Querschnitte durch die Kopfregion (C, D, F-I). (A,C) In Wildtyp-Embryonen markieren bilaterale *kdr* Expressionsdomänen (blau) Teile des anterioren Lateralplattenmesoderms, die sich zu Blutgefäßstrukturen entwickeln. (B,D) Koinjektion von *scl* und *lmo2* mRNA führt zur starken Erweiterung der *kdr* Expression im Kopfmesenchym. (E) Experimentansatz: Donorzellen aus *scl* und *lmo2* injizierten Embryonen werden in wildtypische Empfänger transplantiert. (F,G) Donorzellen entwickelten sich alle in Endothelzellen im Bereich des Kopfmesenchyms. *kdr* Expression (blau) überlappt mit den braunen transplantierten Zellen (Pfeile). Endogene *kdr* Expression wird durch die Pfeilspitze angezeigt. Diese Expression ist nicht in G zu sehen, da sie von der Schnittebene entlang der anterior-posterioren Achse abhängt (Vergleich mit A). (H) Bei 55 hpf haben die transplantierten *scl+lmo2* Zellen (braun, Pfeile) die laterale Ausstülpung des Primordiums (*nk2.1a* Expression, blau) bewirkt. (I) *gfp* Donorzellen (braun), die nahe am Primordium liegen, beeinflussen nicht die Morphologie des Primordiums. Gestrichelte Linien zeigen die Grenze des Neuralrohrs (neural tube, nt) in C, F und G und die Mittellinie in H und I. 12ss, 12-Somiten-Stadium.

3.4.6 Die *has* Mutation beeinflusst die Schilddrüsendifferenzierung und Funktion

Nachdem in den vorigen Kapiteln beschrieben wurde, dass $aPKC\lambda$ für die korrekte Relokalisierung des Schilddrüsenprimordiums nötig ist, sollte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, ob $aPKC\lambda$ auch Einfluss auf die Differenzierung und die Funktion der Schilddrüse hat.

Wie in Kapitel 3.1 gezeigt, wird der Natrium-Jod-Symporter (*slc5a5*) im Zebrafisch ab etwa 40 hpf in den relokalierten Zellen des Schilddrüsenprimordiums exprimiert. *slc5a5* Expression kann nicht in allen *has* Morphants beobachtet werden. 42,9% (n=21) der injizierten Embryonen zeigen keine *slc5a5* Expression (Abb. 12C). Ähnliches, jedoch in weit geringerem Umfang, ist für die *tg* Expression festzustellen. Auch hier zeigen ca. 8,8% (n=3) keine Expression (Abb. 12F). Fehlende oder nicht wildtypisch lokalisierte *slc5a5* oder *tg* Expression war nicht in Embryonen zu erkennen, die mit Kontroll-Morpholino injiziert wurden (*slc5a5*: n=33; *tg*: n=51). Es ist also festzustellen, dass die Differenzierung der Schilddrüsenzellen durch fehlende $aPKC\lambda$ negativ beeinflusst werden kann. Des Weiteren ist in 16,3% (n=8; *slc5a5*) bzw. 35,3% (n=12; *tg*) der *has* Morphants zu erkennen, dass die Reste des Primordiums, die im Pharynx verbleiben, durchaus in der Lage sind, die schilddrüsenspezifischen Marker *slc5a5* und *tg* zu exprimieren (Abb. 12B und E, Pfeile). Die Reste der Primordien im Pharynxepithel beginnen folglich mit der Differenzierung zu funktionalen Schilddrüsenzellen. Diese Differenzierung wird aber nicht bis zur Proteinexpression von TG geführt. In TG Antikörperfärbungen an 72 hpf *has^{m567}* Mutanten konnte keine Färbung im Pharynxepithel beobachtet werden (15 von 15 geschnittenen Embryonen). Die weiterführende Analyse dieser Färbungen an mutanten *has* Embryonen konnte den negativen Einfluss fehlender $aPKC\lambda$ Funktion auf die Differenzierung zur funktionalen Schilddrüse (s.o.) bestätigen: In 26,6% der Embryonen (n=4 von 15 geschnittenen Embryonen) war zu beobachten, dass die Follikel kein oder nahezu kein TG Protein produzieren oder anreichern (Abb. 12L). Die restlichen Embryonen zeigten positive Signale in der TG Antikörperfärbung. Diese war jedoch nicht in einem klar begrenzten, inneren Lumen, wie im Wildtyp (Abb. 12G), lokalisiert, sondern ist entweder in mehreren Lumina verteilt bei relativ wildtypischer Menge (Abb. 12H) oder am Rand der Follikel und in geringer Menge zu beobachten (Abb. 12I, J, K).

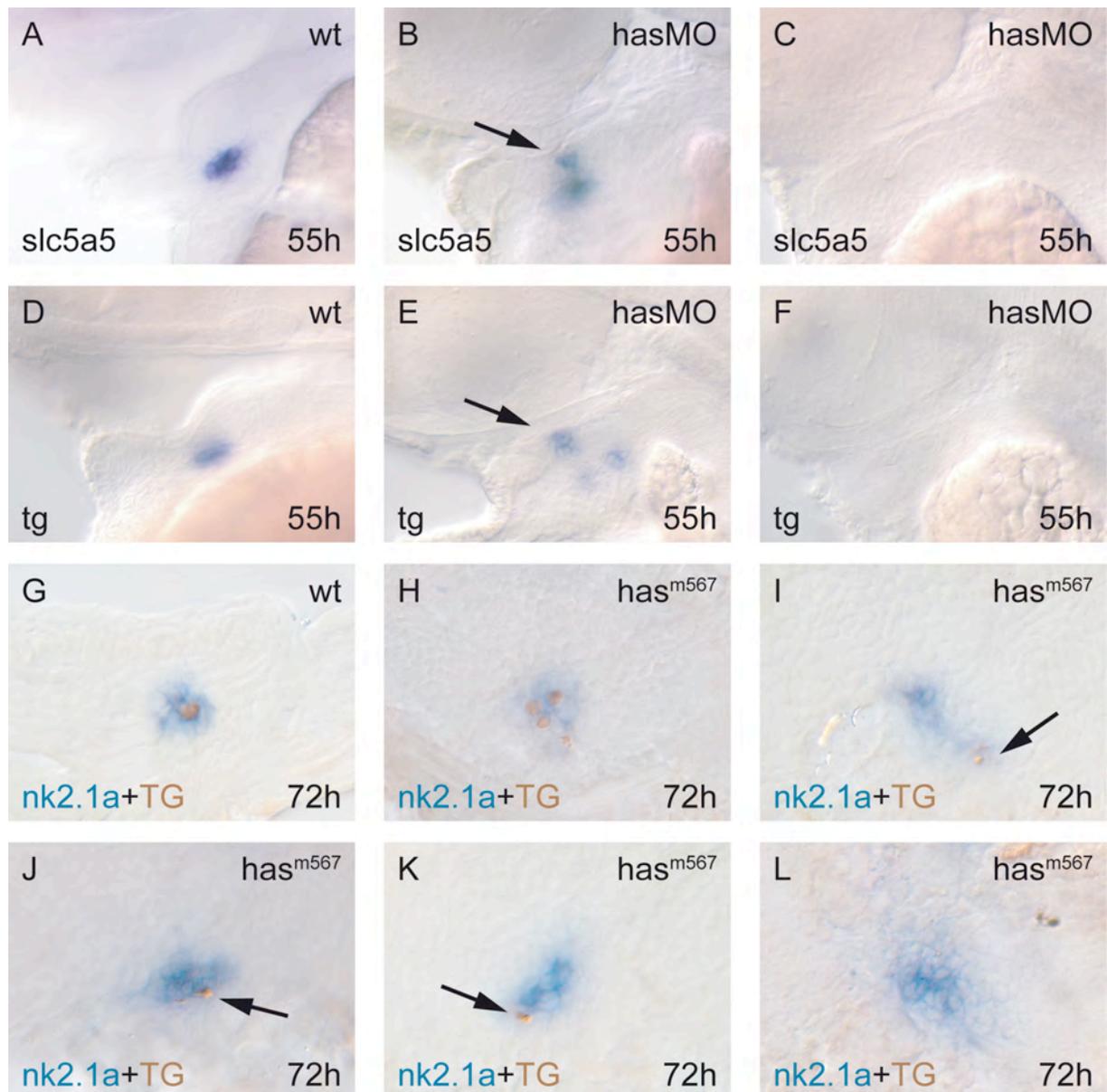


Abb. 12: Fehlende aPKC λ Funktion hat Einfluss auf Schilddrüsendifferenzierung und Funktion. A-C: *slc5a5* Expression (blau) bei 55 hpf im wt (A) und *has* Morphants (B, C). D-F: *tg* Expression (blau) bei 55 hpf im wt (D) und *has* Morphants (E,F). A-F: laterale Ansicht, anterior links. G-L: Doppelfärbung aus *nk2.1a* Expression (blau) und TG Antikörperfärbung (braun) an 72 hpf Embryonen. Querschnitte von (G) wt und (H-L) *has*^{m567} Mutanten. Pfeile in B und E weisen auf nicht relokalierte Teile des Primordiums, die Schilddrüsendifferenzierung starten. Pfeile in I, J und K weisen auf fehllokalisierte TG Antikörperfärbung in Mutanten.

3.5 Untersuchungen zur apiko-basalen Polarität während des Relokalisierungsprozesses der Schilddrüse im Zebrafisch

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *has* Mutation starke Defekte in der Herzmorphogenese auslöst. So sind das „tilting“ des Herzschlauchs und die Herzschlauchelongation blockiert (Horne-Badovinac et al., 2001; Peterson et al., 2001; Yelon et al., 1999). Wie erwähnt, codiert *has* für aPKC λ . aPKC λ ist an der Etablierung der apiko-basalen Polarität von Epithelzellen beteiligt. *has* Mutanten zeigen im Einklang mit dieser Funktion Defekte während der Entwicklung von verschiedenen embryonalen Epithelien, wie z.B. dem Auge (Horne-Badovinac et al., 2001) und dem Myocardium (Rohr et al., 2006).

Die Abschnitte 3.4.1 und 3.4.2 haben gezeigt, dass aPKC λ ebenfalls für die vollständige Relokalisierung des Schilddrüsenprimordiums nötig ist. In der vorliegenden Arbeit wurde nun mittels hoch auflösender konfokaler Mikroskopie die Relokalisierung der Schilddrüse unter dem Aspekt der Etablierung von apiko-basaler Polarität im Wildtyp und in *has* Morphants untersucht. Zur Visualisierung der Schilddrüse kam in diesen Untersuchungen eine stabile transgene Zebrafischlinie zum Einsatz (Ellingsen et al., 2005). Bei Embryonen der CLGY576 Linie wird die Expression von yellow-fluorescent-protein (YFP) durch den *nk2.1a* Promoter gesteuert (pers. Mitteilung Tom Becker). Es wurden Vibratomschnitte von ca. 150 μ m Dicke von wildtypischen und *has* Morpholino injizierten CLGY576 Embryonen angefertigt und die Lokalisation von Polaritätsmarkern mittels verschiedener Antikörper- und Phalloidin-färbungen untersucht.

3.5.1 Die Zellen des Schilddrüsenprimordiums im Wildtyp polarisieren während der Ablösung aus dem Pharynxepithel, in *has* Morphants polarisieren sie jedoch gestört

Filamentöses (f) Actin, ein Bestandteil des Cytoskeletts, ist in jeder Zelle exprimiert. In apiko-basal polarisierten Zellen kann jedoch beobachtet werden, dass f-Actin als ringartiges Bündel an den apiko-lateralen Adherens junctions angereichert ist (Nelson, 2003). Durch die spezifische Bindung von Phalloidin, das aus dem Pilz *Amanita phalloides* gewonnen wird, kann f-Actin sichtbar gemacht werden. In Untersuchungen dieser Arbeit wurde Rhodamin konjugiertes (gekoppeltes) Phalloidin verwendet, dessen Lokalisation in den Zellen der vibratomgeschnittenen Embryonen mittels Laseranregung und einem konfokalen Mikroskop sichtbar gemacht werden konnte.

Abbildung 13 zeigt die Lokalisierung von filamentösem Actin in wildtypischen Embryonen. Es ist zu erkennen, dass die Zellen des Schilddrüsenprimordiums f-Actin kurz vor der Abschnürung aus dem Pharynxepithel stärker exprimieren (Pfeilspitzen in Abb. 13A). Bereits in diesem Stadium beginnen die Zellen mit der apikalen Lokalisierung von f-Actin in verschiedenen Foci am apikalen Rand der Zellen. Im weiteren Verlauf der Ablösung aus dem Epithelverband verändert sich die Morphologie eines Teils der primordialen Zellen. Die äußeren Zellen bilden apikal spitz zulaufende Zellenden, die meist auch f-Actin stark exprimieren (Abb. 13B). Damit unterscheiden sich diese Zellen von den umliegenden Pharynxepithelzellen. Kurz darauf, nachdem das Primordium vollkommen aus dem Epithelverband ausgelöst ist, ist deutlich zu erkennen, dass das Primordium bereits zu diesem Zeitpunkt eine polarisierte follikelartige Struktur aufweist. Die Zellen sind, durch die starke apikale Konzentration an f-Actin sichtbar, polarisiert und beginnen mit der Bildung eines Lumens (Abb. 13C-D). Außerdem nehmen die Zellen während dieses Prozesses eine cuboidale Form an. Spitz zulaufende Zellen sind nicht mehr zu entdecken (Abb. 13D). Während der weiteren Verlagerung des Primordiums tief ins Mesenchym der Pharynxregion bleiben die Zellen durchgehend polarisiert und in cuboidaler Form (Abb. 13E).

Neben der Lokalisation von f-Actin wurde auch die Verteilung von β -Catenin, ein weiterer Marker für die apikale Region, untersucht. β -Catenin bildet mit α -Catenin die Brücke zwischen dem Transmembrananker E-Cadherin und den Actinsträngen (Übersichtsartikel: Lien et al., 2006). Abbildung 14 gibt einen Überblick über die Verteilung von β -Catenin im Wildtyp. Bei 30 hpf ist β -Catenin in den Zellen des Schilddrüsenprimordiums nicht stärker exprimiert als in den anderen Zellen des Pharynxepithels (Abb. 14A). Mit dem Beginn der Ablösung des Primordiums wird β -Catenin in den Zellen des Primordiums stärker und apikal lokalisiert exprimiert (Abb. 14B). Wie auch schon durch die Phalloidin färbung gezeigt, fahren die Zellen des Primordiums mit der Reifung der Polarität in der weiteren Entwicklung fort. Nach vollständiger Lösung aus dem Pharynxepithel ist β -Catenin vollkommen polarisiert im Primordium exprimiert (Abb. 14C-D). Diese Polarisierung bleibt für β -Catenin auch während der weiteren Verlagerung des Primordiums erhalten (Abb. 14E).

Abb. 13 (folgende Seite): Lokalisation von f-Actin zeigt zunehmende Polarisierung der Schilddrüsenzellen. A-E: Querschnitte wildtypischer Embryonen zwischen 32 hpf und 55 hpf. f-Actin (rot) wird zunehmend apikal in den Schilddrüsenzellen exprimiert (Pfeilspitzen). Laterale Zellen des Primordiums laufen apikal spitz zu und zeigen ausserdem starke apikale Lokalisation von f-Actin (Pfeile). A'-E' jeweils selber Embryo und Schnitt wie in A-E jedoch mit YFP/Cy2-Signal (grün) zur Ortung der *nk2.1a* exprimierenden Schilddrüsenzellen.

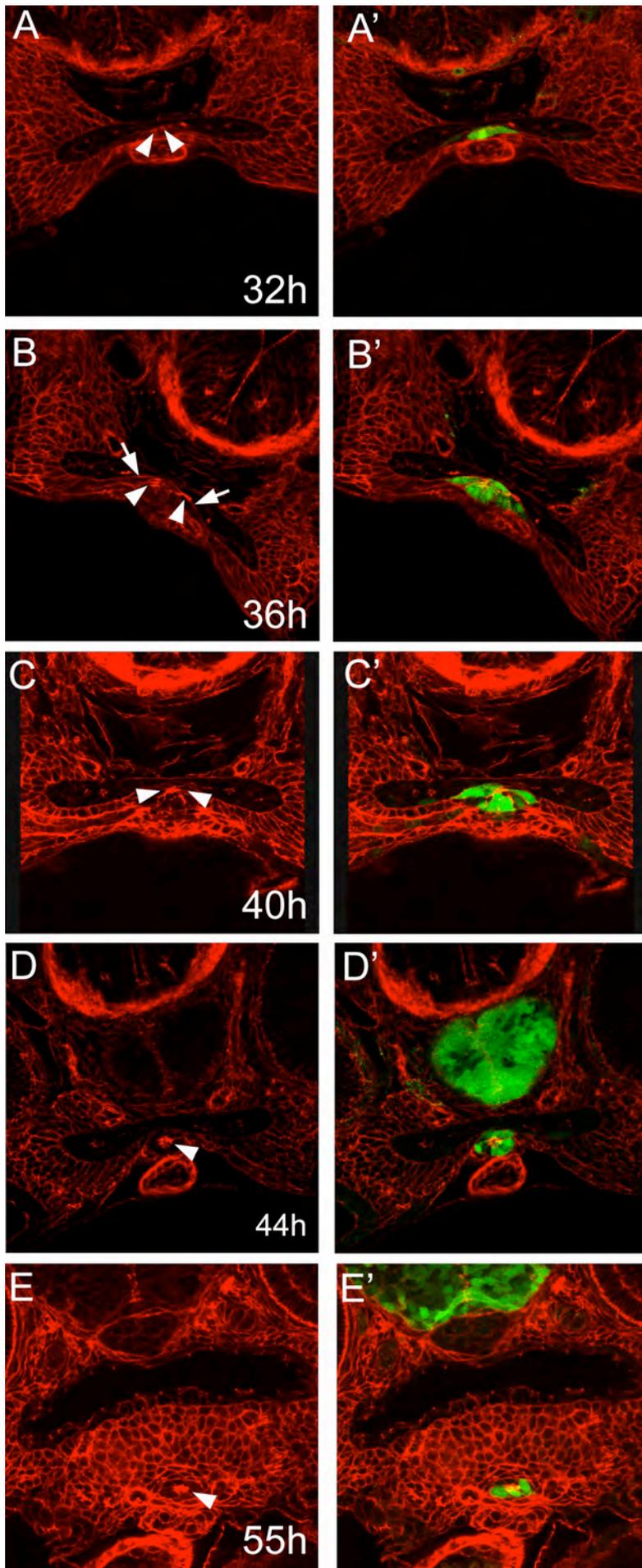


Abb. 13: (siehe vorige Seite)

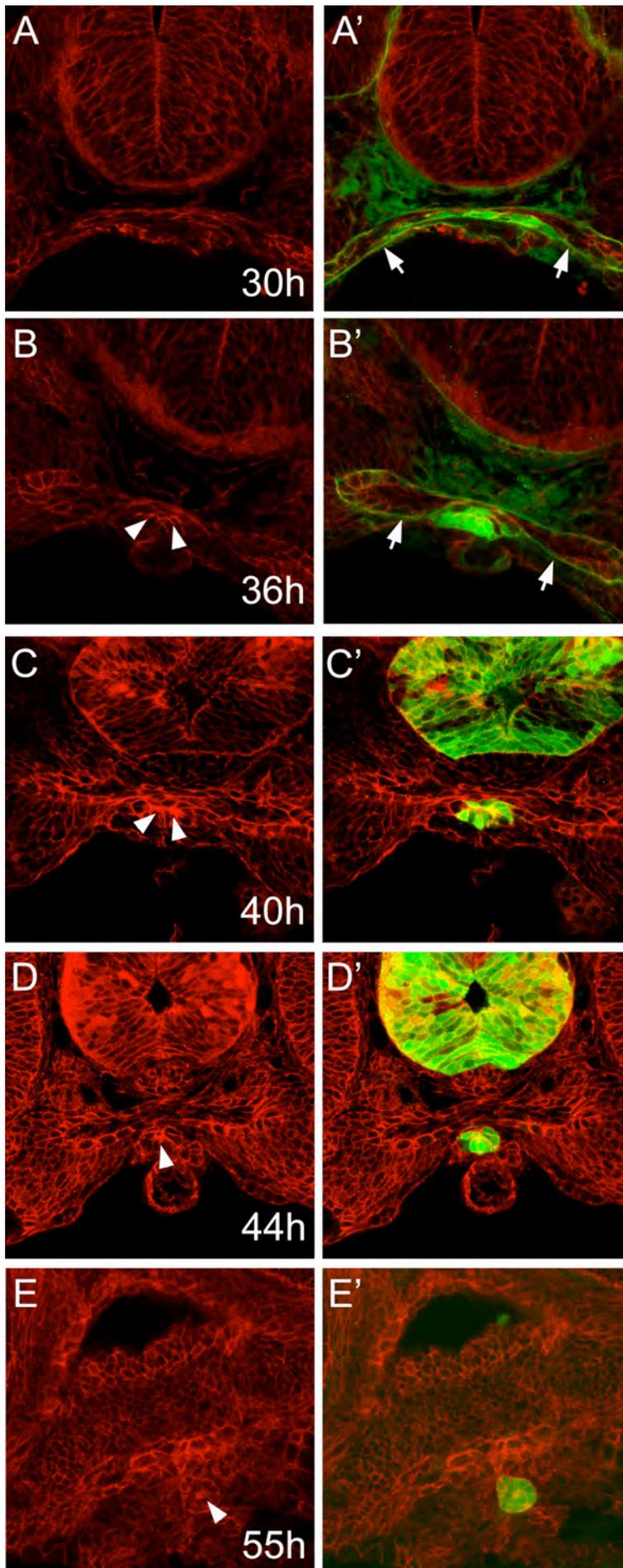


Abb. 14: (siehe nächste Seite)

Abb. 14 (vorherige Seite): Lokalisation von β -Catenin zeigt ebenfalls zunehmende Polarisierung der Schilddrüsenzellen. A-E: Querschnitte wildtypischer Embryonen zwischen 30 hpf und 55 hpf. β -Catenin (rot) wird zunehmend apikal in den Schilddrüsenzellen exprimiert (Pfeilspitzen). A'-E' jeweils selber Embryo und Schnitt wie in A-E jedoch mit YFP/Cy2-Signal (grün) zur Ortung der *nk2.1a* exprimierenden Schilddrüsenzellen. Pfeile in A' und B' weisen auf zusätzliche Anti-Lamininantikörperfärbung (grün) hin.

Neben der Betrachtung der Zonula Adherens Marker f-Actin und β -Catenin wurde die zunehmende Polarisierung der Schilddrüsenzellen durch Untersuchung des Tight Junction Markers ZO-1 visualisiert. Abbildung 15 zeigt, dass die Zellen des Schilddrüsenprimordiums im Verlaufe der Ablösung des Primordiums aus dem Pharynxepithel auch zunehmend ZO-1 Protein apikal lokalisieren und diese apikale Lokalisierung von ZO-1 auch während der weiteren Verlagerung von den Zellen aufrecht erhalten wird (Pfeilspitzen in Abb. 15).

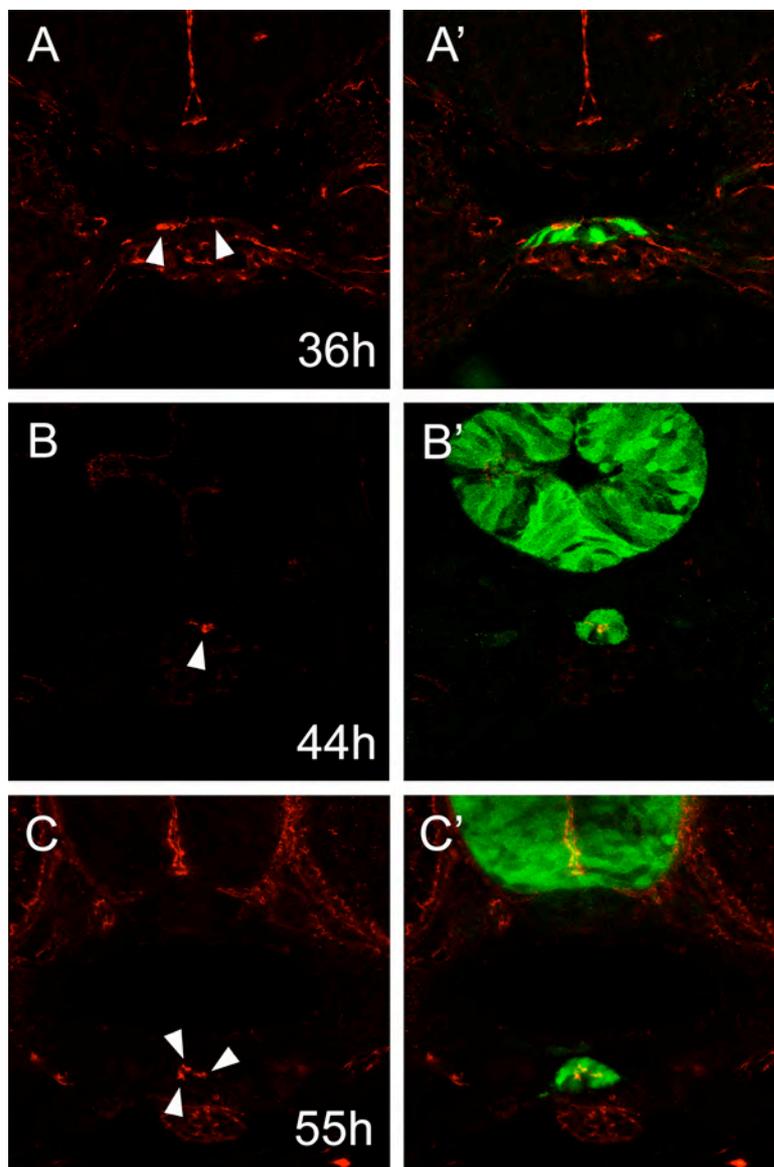


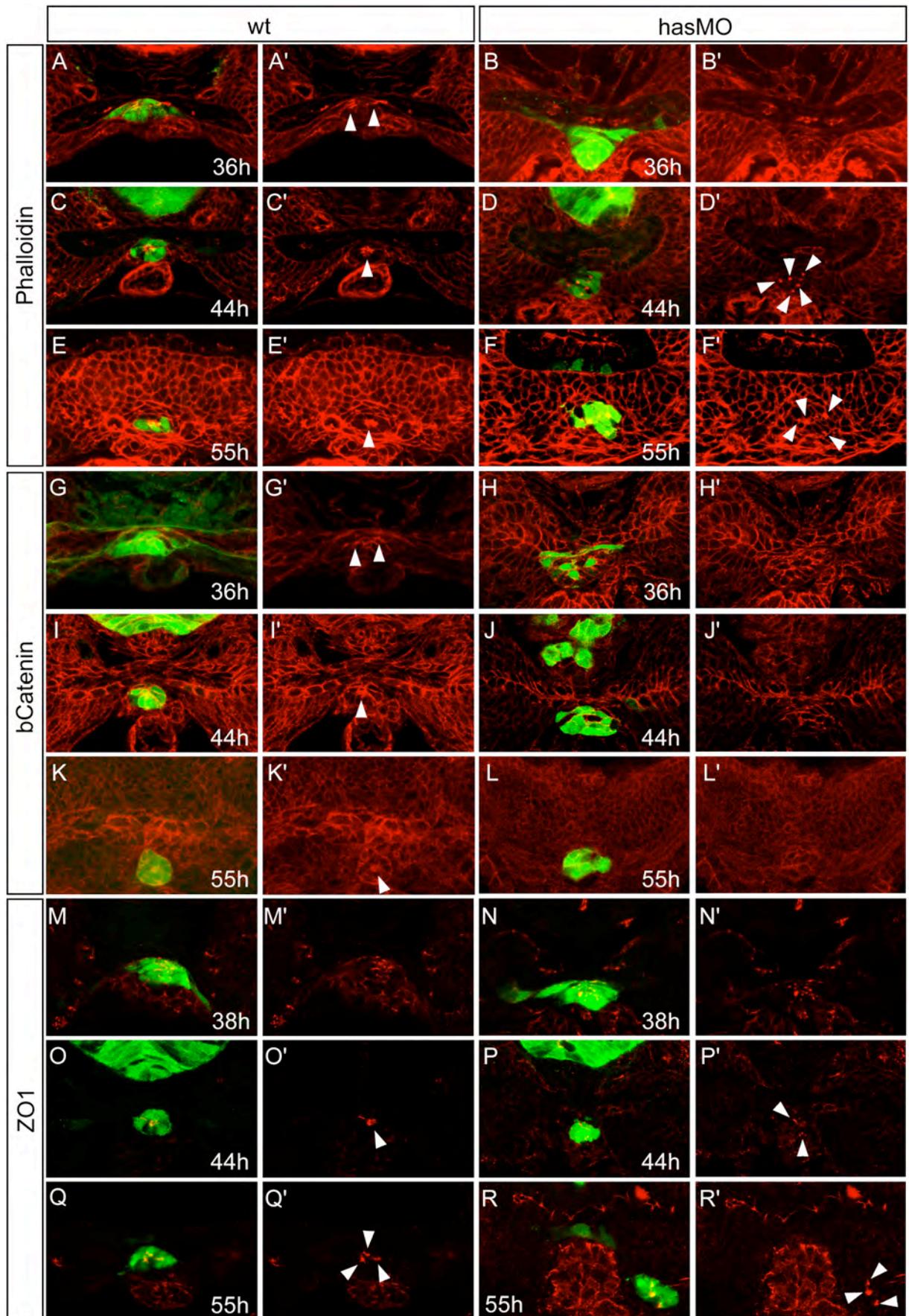
Abb. 15: Lokalisation von ZO-1 bestätigt zunehmende Polarisierung der Schilddrüsenzellen. A-C: Querschnitte wildtypischer Embryonen zwischen 36 hpf und 55 hpf. ZO-1 (rot) wird apikal in den Schilddrüsenzellen exprimiert (Pfeilspitzen). A'-C' jeweils selber Embryo und Schnitt wie in A-C jedoch mit YFP/Cy2-Signal (grün) zur Ortung der *nk2.1a* exprimierenden Schilddrüsenzellen.

Mit den gleichen Markern wurden nun auch *has* Morphants untersucht. Es stellte sich heraus, dass mit keinem der verwendeten Marker eine wildtypisch geordnete Polarisation der Schilddrüsenzellen beobachtet werden konnte (Abb. 16). Für f-Actin und ZO-1 kann in den Schilddrüsenfollikeln der *has* Morphants keine wildtypisch zentrale Lokalisierung um das sich bildende Follikellumen beobachtet werden. ZO-1 und f-Actin werden in den *has* Morphants in mehreren Foci im Primordium verteilt exprimiert. Diese Orte der verstärkten Lokalisierung müssen nicht zentral im Primordium liegen. Sie sind auch am Rand der Primordien zu finden (Abb. 16F, F'; P, P' und R, R'), was darauf schließen lässt, dass die Zellen keine wildtypische apiko-basale Polarität aufbauen. β -Catenin wird in den Schilddrüsenzellen der *has* Morphants nicht lokal höher konzentriert (Abb. 16H, H'; J, J'; L, L').

Die Morphologie des Primordiums in *has* Morphants kann sich erheblich von der kompakten, leicht eiförmigen Struktur des wildtypischen Primordiums unterscheiden. In *has* Morphants sind unregelmäßig geformte Primordien zu beobachten (Abb. 16E, F). Außerdem treten die für den Wildtyp typisch spitz zulaufenden Zellen während des Ablöseprozesses in *has* Morphants nicht oder vermindert auf (Abb. 16A, B und G, H).

Es kann also festgestellt werden, dass funktionales aPKC λ für die korrekte Lokalisation von f-Actin, β -Catenin und ZO1 in den Schilddrüsenzellen und damit für die korrekte Etablierung der Polarität benötigt wird. Ein einschichtiges Schilddrüsenepithel wird in den *has* Morphants nicht gebildet.

Abb. 16 (folgende Seite): Gestörte Polarität in Schilddrüsenprimordien der *has* Morphants. Konfokale Aufnahmen wildtypischer Embryonen und *has* Morphants zwischen 36 hpf und 55 hpf. Markersignale von f-Actin, β -Catenin und ZO1 (rot). A'-R' jeweils selber Embryo und Schnitt wie in A-R jedoch ohne YFP/Cy2-Signal (grün) der *nk2.1a* exprimierenden Schilddrüsenzellen zur besseren Visualisierung der lokal erhöhten Expression der Polaritätsmarker. In G zusätzliche Anti-Lamininantikörperfärbung (grün). Pfeilspitzen weisen auf die lokal erhöhten Expressionen hin.



3.5.2 E-Cadherin in relokalisierenden Schilddrüsenzellen des Wildtyps und in *has* Morphants

Untersuchungen an der Maus konnten zeigen, dass das Zelladhäsionsprotein E-cadherin durchgehend in der gesamten Entwicklung der Schilddrüse und damit auch während der Relokalisierung des Schilddrüsenprimordiums exprimiert wird (Fagman et al., 2003). Es wurde gefolgert, dass somit kein Epithel-Mesenchym-Übergang während der Relokalisierung stattfindet, sondern der epitheliale Charakter des Primordiums erhalten bliebe. Dies würde dafür sprechen, dass das Primordium passiv durch Veränderungen des umliegenden Gewebes seine Positionsveränderungen durchführt (Fagman et al., 2003). In Zebrafisch wurden diesbezüglich bisher keine Untersuchungen durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden E-Cadherin Antikörperfärbungen an verschiedenen Stadien der Schilddrüsenentwicklung im Wildtyp und in *has* Morphants durchgeführt.

In Abbildung 17A ist zu erkennen, dass die Zellen des Schilddrüsenprimordiums vor Ablösung aus dem Pharynxepithel E-Cadherin auf dem gleichen Niveau exprimieren, wie die umliegenden Pharynxepithelzellen. Mit Einsetzen der Ablösung ist allerdings in den Zellen des Primordiums kaum noch E-Cadherin Expression festzustellen (Abb. 17B). Auch zu späteren Zeitpunkten ist eine E-Cadherin Expression in der Schilddrüse nicht mehr zu beobachten (Abb. 17C, D).

Es kann also festgestellt werden, dass im Zebrafisch im Gegensatz zur Situation in der Maus, das Adhäsionsmolekül E-Cadherin während der Relokalisierung der Schilddrüsenzellen nicht mehr exprimiert wird.

Die gleichen Untersuchungen wurden auch in Embryonen durchgeführt, die mit *has* Morpholino injiziert wurden. Es konnte beobachtet werden, dass diese Embryonen E-Cadherin in den sich gerade vom Epithel abschnürenden primordialen Zellen exprimieren (Abb. 18B). Erst nach vollendeter Ablösung des Primordiums weisen die Schilddrüsenzellen ein vermindertes E-Cadherin Signal auf (Abb. 18C).

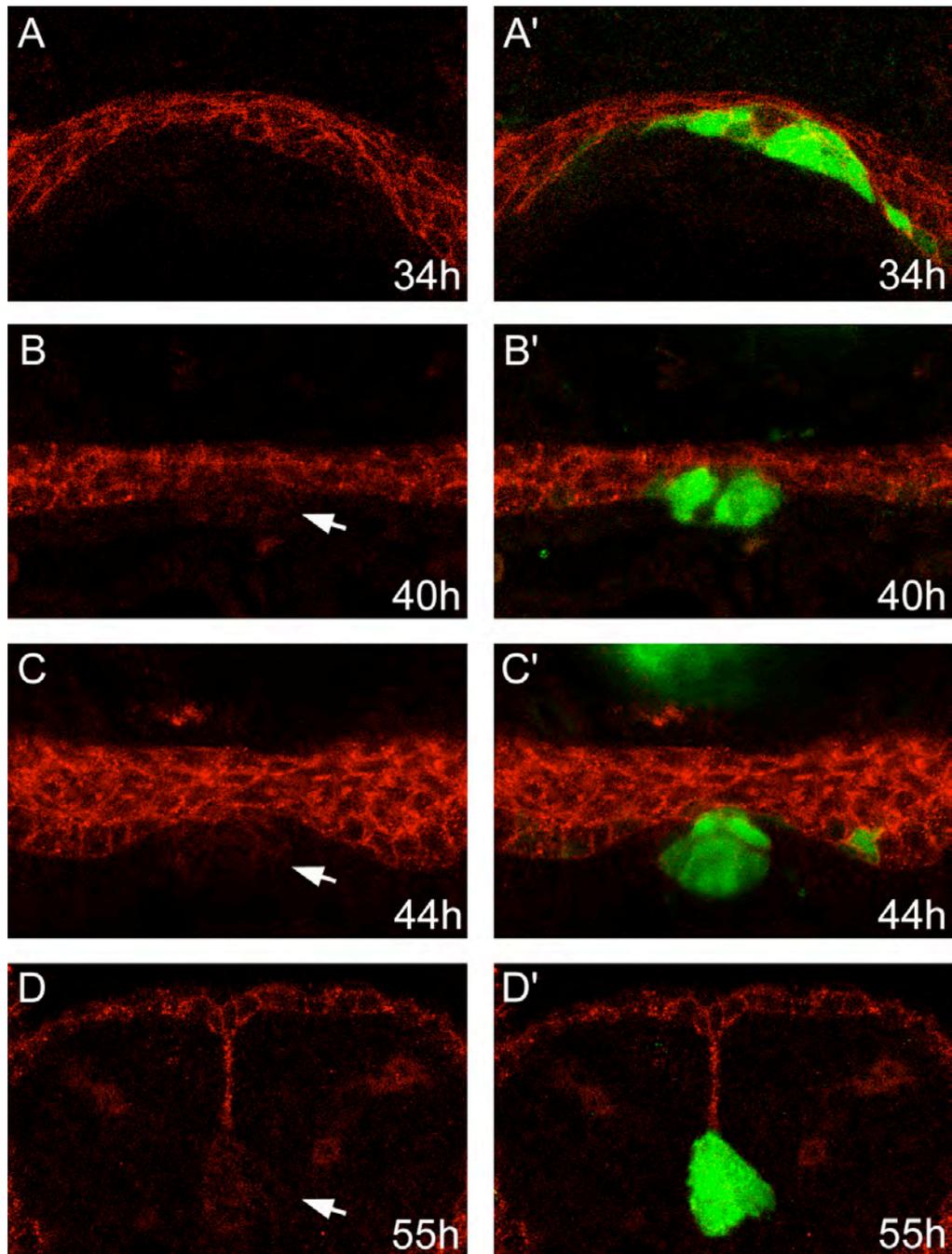


Abb. 17: E-Cadherin wird in relokalisierenden Schilddrüsenzellen des Wildtyps nicht exprimiert. A-D: Querschnitte wildtypischer Embryonen zwischen 34 hpf und 55 hpf. E-cadherin (rot). A'-D' jeweils selber Embryo und Schnitt wie in A-D jedoch mit YFP/Cy2-Signal (grün) zur Ortung der *nk2.la* exprimierenden Schilddrüsenzellen. Pfeil weist auf das Primordium.

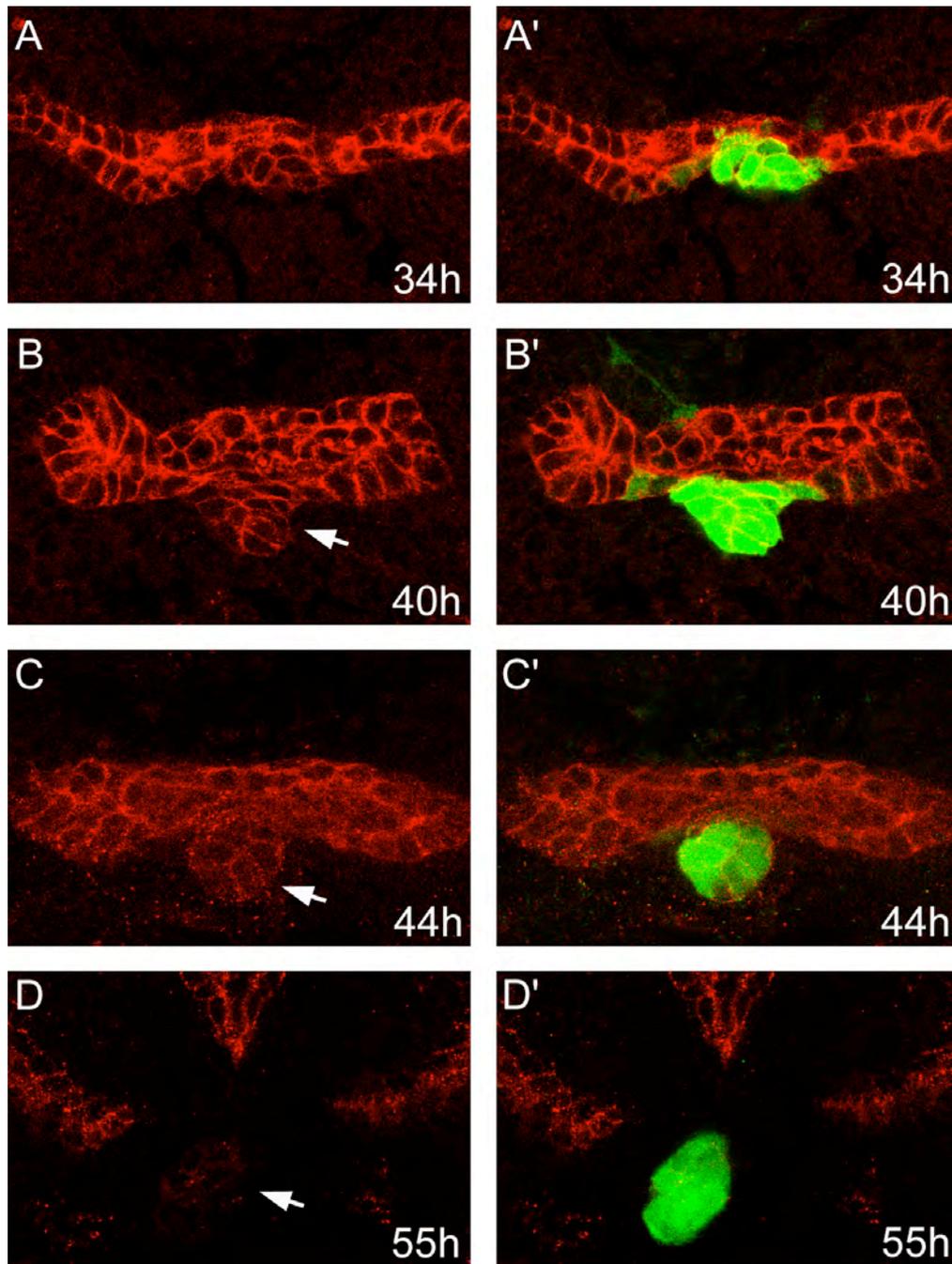


Abb. 18: E-Cadherin wird in relokalisierenden Schilddrüsenzellen der *has* Morphants exprimiert. A-D: Querschnitte durch *has* Morphants zwischen 34 hpf und 55 hpf. E-Cadherin (rot). A'-D' jeweils selber Embryo und Schnitt wie in A-D jedoch mit YFP/Cy2-Signal (grün) zur Ortung der *nk2.1a* exprimierenden Schilddrüsenzellen. Pfeil weist auf das Primordium.

4. Diskussion

4.1 Die Schilddrüse des Zebrafisches - ein endodermales Organ

Aus dem Endoderm der Wirbeltiere entstehen im Laufe der Entwicklung der Magen und Darm und seine Anhänge Leber, Pankreas und die Schilddrüse. In der endgültigen Form beinhalten diese „endodermalen“ Organe jedoch Zellen oder Gewebe aus anderen Keimblättern. So können Zellen des peripheren Nervensystems oder Blutgefäße, die aus dem Ektoderm bzw. dem Mesoderm abstammen, in diesen Organen vorliegen. Speziell am Beispiel des Wirbeltierkopfes wird deutlich, dass es nicht immer möglich ist, Strukturen anhand ihrer Abstammung von einem einzelnen Keimblatt zu unterscheiden. So sind Knochen des Neurocraniums gemischte Derivate der Neuralleiste (Ektoderm) und des Mesoderms (Creuzet et al., 2005; Kuratani, 2005).

Die humane Schilddrüse und die der Mäuse beinhalten zwei Zelltypen mit endokriner Funktion: die Follikelzellen und die C-Zellen (De Felice und Di Lauro, 2004). Die Follikelzellen produzieren das Schilddrüsenhormon T4 (Thyroxin) und T3. T4 und T3 werden für verschiedene Aspekte der Entwicklung und des Metabolismus benötigt. Die C-Zellen produzieren das Peptidhormon Calcitonin-verwandtes Polypeptid Alpha (Calca), das auch als Calcitonin bekannt ist. Calca greift regulierend in den Calcium Metabolismus ein, wobei jedoch die genaue Rolle dabei im Menschen unklar ist (Inzerillo et al., 2002).

In vielen Säugetieren, wie z.B. dem Menschen und in der Maus, entwickelt sich die Schilddrüse aus zwei Primordien (De Felice und Di Lauro, 2004). Das eine Primordium, das Schilddrüsen Diverticulum, schnürt sich aus der Mittellinie des ventralen Pharynxepithels ab. Dieses Diverticulum relokalisiert weiter, bis es tief im zervikalen Mesenchym zu liegen kommt. Während dieser Relokalisierung fusioniert dieses Diverticulum mit einem anderen Primordium, den Ultimobranchialkörpern. Dieses bilaterale Primordium kann vorher auf Höhe der letzten Kiementaschen im Bereich des Pharynxepithels identifiziert werden (Pearse und Carvalheira, 1967). Nach der Fusion beider Primordien differenzieren die Zellen in Follikelzellen und C-Zellen (Fagman et al., 2006; Kusakabe et al., 2006). Es wird angenommen, dass dabei die C-Zellen aus den Ultimobranchialkörpern und die Follikelzellen aus dem Diverticulum entstehen. Es ist jedoch fraglich, ob diese strikte Trennung der Linien wirklich existiert, weil Abstammungsuntersuchungen fehlen und die Differenzierung der Zellen spät nach der Fusion beider Primordien erfolgt (Kusakabe et al., 2006; Manley und Capecchi, 1998).

In anderen Vertebraten wie den Fischen, Amphibien und Vögeln sind Follikelzellen und C-Zellen in getrennten Organen zu finden. Follikelzellen bilden die Schilddrüse und fusionieren nicht mit den Calcitonin produzierenden Ultimobranchialkörpern, die an anderer Stelle im Körper als separates Organ gefunden werden können (Le Douarin et al., 1974; Le Lievre und Le Douarin, 1975). Basierend auf morphologischen Betrachtungen wurde auch in diesen Wirbeltieren das Diverticulum den Schilddrüsenfollikeln zugeordnet und somit als endodermales Organ wahrgenommen. Abstammungsuntersuchungen in Hühnchen-Wachtel-Chimären konnten zeigen, dass die Ultimobranchialkörper aus Neuralleistenzellen bestehen und somit als ektodermales Organ bezeichnet werden können (Le Douarin et al., 1974; Le Lievre und Le Douarin, 1975).

In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, inwieweit diese Betrachtungen auch für den Zebrafisch zutreffen. Die kontinuierliche Expression des Transkriptionsfaktors Nk2.1a im Schilddrüsenprimordium des Zebrafisches implizierte, dass alle Follikelzellen von diesem Primordium abstammen (Rohr und Concha, 2000). Es blieb in dieser Untersuchung jedoch offen, ob nicht zu einem späteren Zeitpunkt andere Zellen in das Primordium einwandern und so z.B. zur Proliferation beitragen. Auch die Untersuchung von Nodal Mutanten mit Beeinträchtigungen in der Endodermentwicklung brachte diesbezüglich keine endgültige Klärung. So sind in *cyc^{m294}* mutanten Embryonen des Nodal Signalwegs zu Beginn der Schilddrüsenentwicklung kleine Schilddrüsenprimordien zu beobachten. In der späteren Entwicklung sind diese Embryonen jedoch in der Lage, eine normale Anzahl an Follikeln zu bilden (Elsalini et al., 2003). Dieser Ausgleich könnte durch erhöhte Proliferation der Follikelzellen oder durch vermehrtes Einwandern umliegender Gewebe entstehen. Außerdem weisen diese Mutanten nicht nur ein fehlendes oder stark reduziertes Endoderm auf, sondern auch erhebliche Veränderungen ektodermalen und mesodermalen Gewebes. Diese könnten ebenfalls für die Defekte in der Schilddrüsenentwicklung verantwortlich sein (Elsalini et al., 2003). Deshalb konnte zu Beginn dieser Doktorarbeit nicht geschlossen werden, dass die Schilddrüse im Zebrafisch komplett vom Endoderm abstammt, und dass ausschließlich im Endoderm der Nodal Signaltransduktionsweg für die Entwicklung der Schilddrüse benötigt wird.

Wie in Kapitel 3.2 gezeigt, konnte in Injektionsversuchen das Endoderm von Zebrafischembryonen markiert und das weitere Entwicklungsschicksal verfolgt werden. Die Daten zeigen, dass die Schilddrüse im Zebrafisch komplett aus Zellen endodermaler Abstammung gebildet wird. In den Transplantationsversuchen (Kapitel 3.3) konnte festgestellt werden, dass die Schilddrüsenvorläuferzellen in der Region der

Pharynxvorläuferzellen liegen. Beide Beobachtungen stehen im Einklang mit der Theorie, dass sich das Schilddrüsenprimordium als Divertikel vom ventralen Pharynxepithel in der Mittellinie abschnürt. Somit ist diese Abschnürung nicht nur in der Expression verschiedener Markergene, sondern auch durch Zellmarkierung in *tar** mRNA Injektionen zu beobachten. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Ultimobranchialkörper und somit die C-Zellen im Zebrafisch nicht im Bereich der Schilddrüsenfollikel zu finden sind (Alt et al., 2006b). Daraus folgt, dass die Schilddrüse im Zebrafisch tatsächlich als Organ endodermaler Abstammung betrachtet werden kann. Es kann somit auch geschlossen werden, dass die zuerst kleinen Primordien in *cyc^{m294}* mutanten Embryonen später durch vermehrtes Wachstum die normale Anzahl an Schilddrüsenfollikel bilden. Die Transplantationsexperimente im Shield-Stadium zur Erstellung einer Anlagenkarte konnten zeigen, dass ausschließlich Zellen der dorsalen Hemisphäre zur Schilddrüse beitragen. In diesem Experiment kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass durch *Tar** Einfluss auf die Position der Vorläuferzellen genommen wird. Die Schilddrüsen dieser transplantierten Embryonen erscheinen jedoch morphologisch wildtypisch. Außerdem entspricht die Verteilung der Zellen, die nicht in der Schilddrüse endeten (Daten nicht gezeigt), der, die im veröffentlichten Endoderm-Anlagenplan ermittelt wurde (Warga und Nüsslein-Volhard, 1999). Es kann also geschlossen werden, dass die Transplantation *Tar** exprimierender Zellen nicht mit der Schilddrüsenentwicklung interferiert und somit eine Beeinflussung auf die Vorläuferzellposition unwahrscheinlich ist. Die variable Position der Schilddrüsenvorläuferzellen innerhalb der dorsalen Hemisphäre gibt an, dass die exakte Position der Schilddrüse zu diesem Zeitpunkt nicht endgültig festgelegt ist. Inwieweit Signale aus dem Shield das Entwicklungsschicksal der Vorläuferzellen beeinflussen, ist nicht bekannt und könnte eine interessante Fragestellung weiterer Untersuchungen darstellen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die oben diskutierte Technik der *tar** mRNA Injektion mit anschließender Transplantation eine ausgezeichnete Methode ist, um manipulierte Zellen gewebespezifisch ins Endoderm zu schleusen. Diese Technik fand in weiteren Experimenten dieser Arbeit Verwendung.

4.2 Die vollständige Relokalisierung der Schilddrüse im Zebrafisch benötigt funktionale aPKC λ im Epithel des Pharynx

Bisher war über Faktoren, die den Relokalisierungsprozess der Schilddrüse in Wirbeltieren steuern, nur wenig bekannt. Lediglich für den Transkriptionsfaktor Foxe1 konnte in Mäusen gezeigt werden, dass dieser für die Relokalisierung der Schilddrüse benötigt wird (De Felice et al., 1998). In den Kapiteln 3.4 und 3.5 konnte gezeigt werden, dass der Relokalisierungsprozess des Schilddrüsenprimordiums im Zebrafisch funktionale aPKC λ im Pharynxepithel benötigt. *has* mutante Zebrafischembryonen, die über keine funktionale aPKC λ verfügen, zeigen bisher im Zebrafisch nicht beschriebene Defekte der Relokalisierung, die zu ektoischem Schilddrüsengewebe führen. Zum einen ist häufig im Pharynx von *has* Mutanten und *has* Morphants bei 55 hpf eine *nk2.1a* Expression zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass Teile des Primordiums nicht relokalisieren und im Pharynxepithel verweilen; ein Defekt, der den *foxe1* knock-out Mäusen ähnelt, aber auf Mutationen in vollkommen unterschiedlichen Proteinen beruht: Fox1 ist ein Transkriptionsfaktor und aPKC λ eine Komponente der Tight Junctions. Zum anderen ist in Embryonen mit fehlender aPKC λ Funktion zu beobachten, dass die Primordien, die sich vom Pharynxepithel abschnüren konnten, häufig lateral von der Mittellinie verschoben sind. In Kapitel 3.4.1 konnte in 30 hpf Embryonen gezeigt werden, dass sich die Lage der Primordien der *has* Mutanten und *has* Morphants zu diesem frühen Zeitpunkt nicht von der wildtypischer Embryonen unterscheidet. Dies legt den Schluss nahe, dass die später lateral verschobenen Primordien nicht durch weiter lateral induzierte Primordien entstehen.

Es konnte in Transplantationsexperimenten (Kapitel 3.4.3) gezeigt werden, dass der Defekt der lateral verschobenen, relokalierten Primordien und der Defekt der Primordienreste im Pharynxepithel auf Einflüsse unterschiedlicher Gewebe zurückgeführt werden kann. Die fehlende Funktion von aPKC λ im Pharynxendoderm kann dazu führen, dass Teile des Primordiums im Pharynxepithel verweilen, auch wenn das umliegende Gewebe wildtypisch ist. Ist jedoch das die Schilddrüse umschließende Gewebe verändert, so können die ablösenden Schilddrüsenprimordien die Mittellinienposition verlassen und lateral von der Mittellinie liegen. Daraus folgt, dass im Zebrafisch aPKC λ ausschließlich im Endoderm benötigt wird, um die vollständige Abschnürung des Primordiums aus dem Endoderm zu gewährleisten.

Auf der Suche nach Veränderungen im die Schilddrüse umschließenden Gewebe in *has* Morphants wurde das Blutgefäßsystem dieser Embryonen untersucht. Es ist zu erkennen, dass

dieses stark reduziert ist (Kapitel 3.4.4). Um festzustellen, ob Veränderungen im Blutgefäßsystem für das seitliche Verschieben der Primordien in *has* Mutanten und Morphants verantwortlich sein könnten, wurde wie in Kapitel 3.4.5 vorgestellt, ein bisher nicht beschriebener Experimentansatz entwickelt. Es konnten ektopische Blutgefäßzellen in Zebrafischembryonen transplantiert werden. Wenn diese transplantierten Zellen in direkter Nähe zum Schilddrüsenprimordium auftreten, können sie dazu führen, dass die Schilddrüsen in Richtung dieser Zellen Ausstülpungen bilden. Blutgefäßzellen können somit die Morphologie der Schilddrüse nicht-zellautonom beeinflussen.

Das seitliche Abgleiten der relokalisierenden Primordien bei fehlender *has* Funktion könnte somit durch Veränderungen des Blutgefäßsystems in *has* Morphants erklärt werden.

4.3 aPKC λ wird bei der Etablierung des Schilddrüsenepithels während der Relokalisierung benötigt

Das Schilddrüsenprimordium legt in der Embryonalentwicklung die Distanz vom Ort der Spezifikation im Pharynxendoderm bis zum finalen Ort im hypopharyngialen Mesenchym zurück (Kapitel 3.2 und 3.3). In Untersuchungen an Mausembryonen konnte gezeigt werden, dass das Primodium kontinuierlich während dieses Relokalisierungsprozesses das Zelladhäsionsprotein E-Cadherin exprimiert. Der Epithel-Mesenchym-Übergang (epithelial-mesenchymal transition, EMT) ist ein für aktiv wandernde Zellen typischer Schritt. Der EMT ist neben Änderungen der Zellmorphologie auch durch Veränderungen im Expressionsniveau der Cadherine und vor allem durch ein Erlöschen der E-Cadherin Expression gekennzeichnet (Locascio und Nieto, 2001; Savagner, 2001). Aus der kontinuierlichen E-Cadherin Expression in Mäusen wurde nun geschlossen, dass das Primodium den Epithel-Mesenchym-Übergang nicht durchführt und passiv als Epithel relokalisiert wird (Fagman et al., 2003). Aus diesem Grund wird der Begriff „Migration“, der ein aktives Wandern der Schilddrüsenzellen implizieren würde, in der vorgelegten Arbeit vermieden.

Antikörperfärbungen mit Zellpolaritätsmarkern und Phalloidin-färbungen konnten in Kapitel 3.5.1 zeigen, dass die Zellen des Schilddrüsenprimordiums mit dem Start der Abschnürung aus dem Pharynxepithel mit der Etablierung der apiko-basalen Polarität beginnen. Es ist ebenfalls ersichtlich, dass die Zellen vollkommen polarisiert sind, sobald sie das Pharynxepithel verlassen haben. Sie bilden ab diesem Zeitpunkt ein polarisiertes, einschichtiges Follikelepithel. Zeitgleich beginnen die Zellen mit der Expression des

Natrium-Jod-Symporters (*slc5a5*) (Kapitel 3.1). In einer aktuellen humanen Studie ist dem Natrium-Jod-Symporter eine entscheidende Rolle in der terminalen Differenzierung zu hormonproduzierenden Zellen zugeschrieben worden (Szinnai et al., 2006). Außerdem konnte in Thyrozyten aus dem Schwein *in vitro* festgestellt werden, dass diese NIS nur dann exprimieren, wenn sie in einer epithelartigen Follikelstruktur vorliegen (Bernier-Valentin et al., 2006). Die hier präsentierten Beobachtungen im Zebrafisch bezüglich der Expression des Natrium-Jod-Symporters und der Etablierung eines Epithels weisen darauf hin, dass die Follikelzellen schon zu diesem Zeitpunkt mit der terminalen und funktionalen Differenzierung begonnen haben. In dieser Form „wandert“ das Primordium weiter bis zu seiner finalen Position tief ins hypopharyngiale Mesenchym. Somit scheint das Primordium im Zebrafisch ebenso wie in der Maus während der Relokalisation keinen Epithel-Mesenchym-Wechsel vorzunehmen. Folglich gelangt es wahrscheinlich passiv durch Umstrukturierungen umliegendes Gewebes an seinen finalen Ort.

Während der frühen Phase der Abschnürung fallen am Rand des Primordiums spitz zulaufende Zellen auf. Diese könnten einen Hinweis auf eine zumindest aktiv verlaufende Abschnürung der Zellen aus dem Pharynxepithel sein. Dies wird durch die Beobachtungen unterstützt, die in Kapitel 3.5.2 dargestellt sind. Es konnte in wildtypischen Zebrafischembryonen beobachtet werden, dass in Zellen des Primordiums genau zum Eintritt der Ablösung aus dem Pharynxepithel das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin kaum noch exprimiert ist. In bezug auf die Expression von E-Cadherin folgen die Zellen des Primordiums somit also einem Kriterium des Epithel-Mesenchym-Übergangs und könnten damit zumindest zum Abschnürungsprozess aktiv beitragen. Dass die Reduzierung im Expressionsniveau von E-Cadherin von wichtiger Bedeutung für eine vollkommene Abschnürung des Primordiums aus dem Epithel sein könnte, wird dadurch bekräftigt, dass in *has* Morphants die Reduktion der E-Cadherin Expression in den abschnürenden Zellen der *has* Morphants erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt. Es wird in *has* Morphants somit in bezug auf die E-Cadherin Expression keine Grenze zwischen exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen aufgebaut. Dies könnte dazu führen, dass die Zellen des Primordiums zum Zeitpunkt der Ablösung nicht oder schlechter den Kontakt zu den nicht abschnürenden Zellen verlieren. Dies könnte somit einen Grund dafür darstellen, dass in Embryonen mit fehlender aPKC λ Funktion Teile der Primordien im Pharynx verbleiben. Um zu testen, ob eine zeitlich verlängerte E-Cadherin Expression in relokalisierenden Schilddrüsenzellen zu Defekten in der Relokalisierung führt, müssten weitere Versuche durchgeführt werden. So könnten z.B.

Embryonen untersucht werden, die E-cadherin überexprimieren oder in denen der Abbau von E-Cadherin verhindert wird.

Der Prozess der Polarisierung und Epithelbildung der Schilddrüse ist in *has* Morphants gestört. Es wird kein einschichtiges Follikel epithel gebildet. Mehrere zentrale Lumina können sich bilden (Abb. 16D, F). Außerdem können apikale Marker am äußeren Rand des Primordiums festgestellt werden (Abb. 16F, P, R). Dies hat auch funktionale Konsequenzen. Wie in Kapitel 3.4.6 gezeigt, kann in Thyroglobulin-Antikörperfärbungen festgestellt werden, dass die Follikelzellen TG nicht wildtypisch in einem inneren Lumen sammeln. Es kann in mehreren Lumina, am äußeren Rand der Follikel oder gar nicht nachweisbar auftreten. Letzteres lässt darauf schließen, dass in Embryonen mit fehlender *has* Funktion ebenfalls die Differenzierung zu hormonproduzierenden Zellen gestört ist. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in Teilen der *has* Morphants die Expression der Schilddrüsen spezifischen Differenzierungsmarker *slc5a5* und *tg* mittels *in situ* Hybridisierung nicht nachweisbar ist (Abb. 12C, F).

Meist ist ektopes humanes Schilddrüsengewebe in der Lage Schilddrüsenhormon zu produzieren. Ebenso zeigen die ektopischen Schilddrüsen in *foxe1* knock-out Mäusen TG Expression (De Felice and Di Lauro, 2004). Im Zebrafisch *has* Morphants kann in den Zellen des Primordiums, die im Pharynx verbleiben, *slc5a5* und *tg* Expression nachgewiesen werden (Abb. 12B, E). Allerdings sind in der Analyse der Schnitte von *has*^{m567} Mutanten keine TG exprimierenden Zellen im Pharynx zu erkennen gewesen. Dies kann entweder daran liegen, dass im Zebrafisch diese Zellen kein TG produzieren, oder daran, dass die Proteinexpression in den wenigen Zellen, die im Pharynx verbleiben auf einem mit dieser Methode nicht nachzuweisenden Niveau lag.

Es kann also zusammenfassend festgestellt werden, dass die Analyse der Embryonen mit fehlender aPKC λ Funktion neue Aspekte der Etablierung von apiko-basaler Polarität der Schilddrüsenzellen aufzeigen und die *has* Mutation als einen neuen Auslöser für angeborene Hypothyreose identifizieren konnte.

5. Zusammenfassung

Die vermutlich endodermale Herkunft der Thyroxin-produzierenden Schilddrüsenzellen war bisher nicht eindeutig für Wirbeltiere gezeigt worden. In dieser Arbeit konnte das Endoderm von Zebrafischembryonen durch Injektionsversuche markiert und sein weiteres Entwicklungsschicksal verfolgt werden. Es wurde so festgestellt, dass neben dem Pharynxepithel auch die Schilddrüse vollständig aus markierten Zellen gebildet wird. Transplantationsversuche ergaben, dass die Schilddrüsenvorläuferzellen im Shield-Stadium im Bereich der Pharynxvorläuferzellen zu finden sind. Beide Beobachtungen stehen im Einklang mit der Hypothese, dass sich das Schilddrüsenprimordium als Divertikel vom ventralen Pharynxepithel in der Mittellinie ablöst und somit als Organ endodermaler Abstammung betrachtet werden kann.

has mutante Zebrafischembryonen, die über keine funktionale aPKC λ verfügen, zeigen bisher im Zebrafisch nicht beschriebene Defekte der Relokalisierung. In Transplantationsexperimenten mit *tar** exprimierenden und *has* Morpholino-Oligonukleotiden beinhaltenden Zellen konnte gezeigt werden, dass funktionales aPKC λ gewebespezifisch im Endoderm benötigt wird, um die vollständige Ablösung des Primordiums aus dem Pharynxepithel zu gewährleisten. Die Beobachtung, dass in Embryonen ohne funktionale aPKC λ die seitlich verschobenen Primordien von einem stark reduzierten Blutgefäßsystem umgeben sind, ergab die Frage, ob Blutgefäßzellen die Morphologie der Schilddrüse beeinflussen können. Durch Transplantation ektopischer Blutgefäßzellen konnte dies bestätigt werden.

Untersuchungen zur apiko-basalen Polarität der Schilddrüse zeigen, dass die Zellen des Schilddrüsenprimordiums im Wildtyp zum Zeitpunkt der Ablösung aus dem Pharynxepithel mit der Etablierung der apiko-basalen Polarität beginnen. Sie bilden ein vollkommen polarisiertes Follikelepithel, sobald sie das Pharynxepithel verlassen haben. In dieser Form relokalisiert das Primordium weiter bis zu seiner finalen Position tief ins hypopharyngiale Mesenchym. Der Prozess der Polarisierung und Epithelbildung ist in *has* Morphants gestört. Es wird kein wildtypisches, einschichtiges Follikelepithel gebildet. Die Lokalisierung von Zellpolaritätsmarkern aber auch die des Schilddrüsenhormonvorläuferproteins Thyroglobulin (TG) ist verändert. Außerdem zeigen *has* Mutanten und Morphants Defekte während des Differenzierungsprozesses in hormonproduzierende Zellen. Die Analyse der Embryonen mit fehlender aPKC λ Funktion konnte neue Aspekte der Etablierung von apiko-basaler Polarität

der Schilddrüsenzellen aufzeigen und die *has* Mutation als einen neuen Auslöser für angeborene Hypothyreose identifizieren.

6. Abstract

The endodermal origin of thyroid hormone producing cells in the thyroid was not proven in vertebrates. In order to address this question, zebrafish endoderm was marked and the development of these cells was traced. The lineage analysis reveals that thyroid follicle cells are exclusively recruited from the pharyngeal endoderm. Mosaic analysis in *tar** grafted host embryos further suggests that the thyroid progenitors are part of the pharyngeal progenitors. Such an origin is later reflected by the evagination of the midline diverticulum from the pharyngeal epithelium. These results show that the thyroid in zebrafish is an endoderm-derived organ.

The zebrafish *heart and soul (has)* mutant lacking aPKC λ shows defects in this evagination process. Transplantation experiments involving *tar** mRNA and *has* morpholino show that aPKC λ is tissue-specifically needed within the endoderm for complete evagination of the whole thyroid primordium. Blood vessels surrounding thyroid primordium are dramatically reduced and the thyroid primordium frequently loses its midline orientation in *has* morphants. This raised the question, if blood vessel cells can influence the morphology of the thyroid. Transplantation of ectopic blood vessel cells confirmed this.

Analysis of apico-basal polarity of the relocating thyroid primordium reveals that wildtype cells are starting to polarize at the onset of evagination. Concomitant with the completion of the evagination process thyroid cells are completely polarized and start to form a proper single layered epithelium. They further relocate as epithelium deep into the hypopharyngeal mesenchyme. *has* morphants show severe defects during epithelia formation. The thyroid in these embryos is not single layered and forms multiple lumina. This is also reflected in altered TG localisation. In addition aPKC λ deficient embryos frequently show defects in the differentiation process of thyroid hormone producing cells. Analysis of these embryos reveals new aspects of establishing apico-basal polarity and serves as a new model for defects leading to thyroid hypothyroidism.

7. Literaturverzeichnis

Alexander, J. und Stainier, D. Y. (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Curr Biol* **9**, 1147-57.

Alt, B., Elsalini, O. A., Schrupf, P., Haufs, N., Lawson, N. D., Schwabe, G. C., Mundlos, S., Gruters, A., Krude, H. und Rohr, K. B. (2006a). Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation. *Development* **133**, 3797-804.

Alt, B., Reibe, S., Feitosa, N. M., Elsalini, O. A., Wendl, T. und Rohr, K. B. (2006b). Analysis of origin and growth of the thyroid gland in zebrafish. *Dev Dyn* **235**, 1872-83.

Bayer, T. A. und Campos-Ortega, J. A. (1992). A transgene containing lacZ is expressed in primary sensory neurons in zebrafish. *Development* **115**, 421-6.

Bernier-Valentin, F., Trouttet-Masson, S., Rabilloud, R., Selmi-Ruby, S. und Rousset, B. (2006). Three-dimensional organization of thyroid cells into follicle structures is a pivotal factor in the control of sodium/iodide symporter expression. *Endocrinology* **147**, 2035-42.

Bowen-Wright, H. E. und Jonklaas, J. (2005). Ectopic intratracheal thyroid: an illustrative case report and literature review. *Thyroid* **15**, 478-84.

Casanova, J. B., Daly, R. C., Edwards, B. S., Tazelaar, H. D. und Thompson, G. B. (2000). Intracardiac ectopic thyroid. *Ann Thorac Surg* **70**, 1694-6.

Covassin, L. D., Villefranc, J. A., Kacergis, M. C., Weinstein, B. M. und Lawson, N. D. (2006). Distinct genetic interactions between multiple Vegf receptors are required for development of different blood vessel types in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6554-9.

Creuzet, S., Couly, G. und Le Douarin, N. M. (2005). Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. *J Anat* **207**, 447-59.

- David, N. B. und Rosa, F. M.** (2001). Cell autonomous commitment to an endodermal fate and behaviour by activation of Nodal signalling. *Development* **128**, 3937-47.
- De Felice, M. und Di Lauro, R.** (2004). Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* **25**, 722-46.
- De Felice, M., Ovitt, C., Biffali, E., Rodriguez-Mallon, A., Arra, C., Anastassiadis, K., Macchia, P. E., Mattei, M. G., Mariano, A., Scholer, H. et al.** (1998). A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* **19**, 395-8.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z. et al.** (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123**, 37-46.
- Ellingsen, S., Laplante, M. A., Konig, M., Kikuta, H., Furmanek, T., Hoivik, E. A. und Becker, T. S.** (2005). Large-scale enhancer detection in the zebrafish genome. *Development* **132**, 3799-811.
- Elsalini, O. A., von Gartzen, J., Cramer, M. und Rohr, K. B.** (2003). Zebrafish *hhex*, *nk2.1a*, and *pax2.1* regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors. *Dev Biol* **263**, 67-80.
- Erlich, H. A.** (1989). Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol* **9**, 437-47.
- Fagman, H., Andersson, L. und Nilsson, M.** (2006). The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Dev Dyn* **235**, 444-55.
- Fagman, H., Grande, M., Edsbagge, J., Semb, H. und Nilsson, M.** (2003). Expression of classical cadherins in thyroid development: maintenance of an epithelial phenotype throughout organogenesis. *Endocrinology* **144**, 3618-24.

Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. I., Schier, A. F. und Talbot, W. S. (1998). Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* **395**, 181-5.

Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* **25**, 581-611.

Fouquet, B., Weinstein, B. M., Serluca, F. C. und Fishman, M. C. (1997). Vessel patterning in the embryo of the zebrafish: guidance by notochord. *Dev Biol* **183**, 37-48.

Fukuda, K. und Kikuchi, Y. (2005). Endoderm development in vertebrates: fate mapping, induction and regional specification. *Dev Growth Differ* **47**, 343-55.

Gering, M. und Patient, R. (2005). Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos. *Dev Cell* **8**, 389-400.

Gering, M., Rodaway, A. R., Gottgens, B., Patient, R. K. und Green, A. R. (1998). The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *Embo J* **17**, 4029-45.

Gering, M., Yamada, Y., Rabbitts, T. H. und Patient, R. K. (2003). Lmo2 and Scf/Tal1 convert non-axial mesoderm into haemangioblasts which differentiate into endothelial cells in the absence of Gata1. *Development* **130**, 6187-99.

Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W. S. und Schier, A. F. (1999). The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* **97**, 121-32.

Habeck, H., Odenthal, J., Walderich, B., Maischein, H. und Schulte-Merker, S. (2002). Analysis of a zebrafish VEGF receptor mutant reveals specific disruption of angiogenesis. *Curr Biol* **12**, 1405-12.

Henrique, D. und Schweisguth, F. (2003). Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 341-50.

Horne-Badovinac, S., Lin, D., Waldron, S., Schwarz, M., Mbamalu, G., Pawson, T., Jan, Y., Stainier, D. Y. und Abdelilah-Seyfried, S. (2001). Positional cloning of heart and soul reveals multiple roles for PKC lambda in zebrafish organogenesis. *Curr Biol* **11**, 1492-502.

Inzerillo, A. M., Zaidi, M. und Huang, C. L. (2002). Calcitonin: the other thyroid hormone. *Thyroid* **12**, 791-8.

Isogai, S., Lawson, N. D., Torrealday, S., Horiguchi, M. und Weinstein, B. M. (2003). Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development* **130**, 5281-90.

Jin, H., Xu, J., Qian, F., Du, L., Tan, C. Y., Lin, Z., Peng, J. und Wen, Z. (2006). The 5' zebrafish scl promoter targets transcription to the brain, spinal cord, and hematopoietic and endothelial progenitors. *Dev Dyn* **235**, 60-7.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. und Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310.

Kimmel, C. B., Warga, R. M. und Schilling, T. F. (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development* **108**, 581-94.

Kimura, S., Ward, J. M. und Minoo, P. (1999). Thyroid-specific enhancer-binding protein/thyroid transcription factor 1 is not required for the initial specification of the thyroid and lung primordia. *Biochimie* **81**, 321-7.

Knust, E. und Bossinger, O. (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* **298**, 1955-9.

Kuratani, S. (2005). Craniofacial development and the evolution of the vertebrates: the old problems on a new background. *Zoolog Sci* **22**, 1-19.

Kusakabe, T., Hoshi, N. und Kimura, S. (2006). Origin of the ultimobranchial body cyst: T/ebp/Nkx2.1 expression is required for development and fusion of the ultimobranchial body to the thyroid. *Developmental Dynamics* **235**, 1300-1309.

Lawson, N. D., Vogel, A. M. und Weinstein, B. M. (2002). sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell* **3**, 127-36.

Le Douarin, N., Fontaine, J. und Le Lievre, C. (1974). New studies on the neural crest origin of the avian ultimobranchial glandular cells--interspecific combinations and cytochemical characterization of C cells based on the uptake of biogenic amine precursors. *Histochemistry* **38**, 297-305.

Le Lievre, C. S. und Le Douarin, N. M. (1975). Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* **34**, 125-54.

Liao, E. C., Paw, B. H., Oates, A. C., Pratt, S. J., Postlethwait, J. H. und Zon, L. I. (1998). SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev* **12**, 621-6.

Lien, W. H., Klezovitch, O. und Vasioukhin, V. (2006). Cadherin-catenin proteins in vertebrate development. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 499-506.

Locascio, A. und Nieto, M. A. (2001). Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 464-9.

Lunde, K., Belting, H. G. und Driever, W. (2004). Zebrafish pou5f1/pou2, homolog of mammalian Oct4, functions in the endoderm specification cascade. *Curr Biol* **14**, 48-55.

Malicki, J., Neuhauss, S. C., Schier, A. F., Solnica-Krezel, L., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Abdelilah, S., Zwartkuis, F., Rangini, Z. und Driever, W. (1996). Mutations affecting development of the zebrafish retina. *Development* **123**, 263-73.

Manley, N. R. und Capecchi, M. R. (1998). Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev Biol* **195**, 1-15.

Mansouri, A., Chowdhury, K. und Gruss, P. (1998). Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* **19**, 87-90.

- Martinez Barbera, J. P., Clements, M., Thomas, P., Rodriguez, T., Meloy, D., Kioussis, D. und Beddington, R. S.** (2000). The homeobox gene *Hex* is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* **127**, 2433-45.
- Müller, H. A. und Bossinger, O.** (2003). Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development. *Mech Dev* **120**, 1231-56.
- Nelson, W. J.** (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766-74.
- Nussey, S. und Whitehead, S. A.** (2001). Endocrinology: an integrated approach. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Patterson, L. J., Gering, M. und Patient, R.** (2005). *Scl* is required for dorsal aorta as well as blood formation in zebrafish embryos. *Blood* **105**, 3502-11.
- Pearse, A. G. und Carvalheira, A. F.** (1967). Cytochemical evidence for an ultimobranchial origin of rodent thyroid C cells. *Nature* **214**, 929-30.
- Peterson, R. T., Mably, J. D., Chen, J. N. und Fishman, M. C.** (2001). Convergence of distinct pathways to heart patterning revealed by the small molecule concentramide and the mutation heart-and-soul. *Curr Biol* **11**, 1481-91.
- Peyrieras, N., Strahle, U. und Rosa, F.** (1998). Conversion of zebrafish blastomeres to an endodermal fate by TGF-beta-related signaling. *Curr Biol* **8**, 783-6.
- Reim, G., Mizoguchi, T., Stainier, D. Y., Kikuchi, Y. und Brand, M.** (2004). The POU domain protein *spg* (*pou2/Oct4*) is essential for endoderm formation in cooperation with the HMG domain protein *casanova*. *Dev Cell* **6**, 91-101.
- Renucci, A., Lemarchandel, V. und Rosa, F.** (1996). An activated form of type I serine/threonine kinase receptor TARAM-A reveals a specific signalling pathway involved in fish head organiser formation. *Development* **122**, 3735-43.

- Robb, L. und Elefanty, A. G.** (1998). The hemangioblast--an elusive cell captured in culture. *Bioessays* **20**, 611-4.
- Rohr, K. B. und Concha, M. L.** (2000). Expression of nk2.1a during early development of the thyroid gland in zebrafish. *Mech Dev* **95**, 267-70.
- Rohr, K. B. und Krude, H.** (2006). Transkriptionelle und parakrine Regulation der Entwicklung der Schilddrüse. *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*, 59-76.
- Rohr, S., Bit-Avragim, N. und Abdelilah-Seyfried, S.** (2006). Heart and soul/PRKCi and nagie oko/Mpp5 regulate myocardial coherence and remodeling during cardiac morphogenesis. *Development* **133**, 107-15.
- Sambrook, J. und Russel, D.** (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Savagner, P.** (2001). Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* **23**, 912-23.
- Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Harvey, M., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Stemple, D. L., Rangini, Z. et al.** (1996). Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development* **123**, 165-78.
- Stainier, D. Y., Fouquet, B., Chen, J. N., Warren, K. S., Weinstein, B. M., Meiler, S. E., Mohideen, M. A., Neuhauss, S. C., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F. et al.** (1996). Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* **123**, 285-92.
- Stainier, D. Y., Weinstein, B. M., Detrich, H. W., 3rd, Zon, L. I. und Fishman, M. C.** (1995). Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Development* **121**, 3141-50.

Szinnai, G., Lacroix, L., Carre, A., Guimiot, F., Talbot, M., Martinovic, J., Delezoide, A. L., Vekemans, M., Michiels, S., Caillou, B. et al. (2006). Sodium/iodide symporter (NIS) gene expression is the limiting step for the onset of thyroid function in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab.*

Thisse, C. und Thisse, B. (1999). Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* **126**, 229-40.

Wadman, I. A., Osada, H., Grutz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A. und Rabbitts, T. H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *Embo J* **16**, 3145-57.

Warga, R. M. und Nüsslein-Volhard, C. (1999). Origin and development of the zebrafish endoderm. *Development* **126**, 827-38.

Warren, A. J., Colledge, W. H., Carlton, M. B., Evans, M. J., Smith, A. J. und Rabbitts, T. H. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* **78**, 45-57.

Wendl, T., Lun, K., Mione, M., Favor, J., Brand, M., Wilson, S. W. und Rohr, K. B. (2002). Pax2.1 is required for the development of thyroid follicles in zebrafish. *Development* **129**, 3751-60.

Westerfield, M. (2000). The Zebrafish Book. *www.zfin.org*.

Yamada, Y., Pannell, R., Forster, A. und Rabbitts, T. H. (2000). The oncogenic LIM-only transcription factor Lmo2 regulates angiogenesis but not vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 320-4.

Yamada, Y., Warren, A. J., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R. und Rabbitts, T. H. (1998). The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3890-5.

Yelon, D., Horne, S. A. und Stainier, D. Y. (1999). Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish. *Dev Biol* **214**, 23-37.

Zhang, J., Talbot, W. S. und Schier, A. F. (1998). Positional cloning identifies zebrafish one-eyed pinhead as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation. *Cell* **92**, 241-51.

8. Abkürzungen, Symbole und Konventionen

| | | |
|--------------------|---|---|
| Abb. | - | Abbildung |
| AK | - | Antikörper |
| AP | - | alkalische Phosphatase |
| BDA | - | Biotin Dextran Amin |
| BSA | - | (bovine serum albumine) Rinderserumalbumin |
| bzw. | - | beziehungsweise |
| ca. | - | circa |
| d | - | (day) Tag |
| DAB | - | Diaminobenzidin |
| ddH ₂ O | - | doppelt destilliertes H ₂ O |
| Dig | - | Digoxigenin |
| DMSO | - | Dimethylsulfoxid |
| DNA | - | (deoxyribonucleic acid) Desoxyribonukleinsäure |
| dpf | - | (days post fertilisation) Tage nach der Befruchtung |
| EDTA | - | (ethylen diamin tetraacid) Ethylendiamintetraessigsäure |
| h | - | (hours) Stunden |
| HEPES | - | N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethan)-Sulfonsäure |
| hpf | - | (hours post fertilisation) Stunden nach der Befruchtung |
| HRP | - | (horseradish peroxidase) Meerrettich Peroxidase |
| Min. | - | Minute |
| MO | - | Morpholinooligonukleotid |
| mRNA | - | (messenger RNA) Boten-RNA |
| MW | - | (molecular weight) Molekülgewicht |

| | | |
|------|---|--|
| NGS | - | (normal goat serum) Ziegenserum |
| nt. | - | (neural tube) Neuralrohr |
| PBS | - | (phosphate buffered saline) Phosphat-gepufferte Salzlsg. |
| PBT | - | PBS mit 0,1% Tween 20 |
| PCR | - | Polymerasekettenreaktion |
| PFA | - | Paraformaldehyd |
| PTU | - | Phenylthiourea |
| RDA | - | Rhodamin Dextran Amin |
| RNA | - | (ribonucleic acid) Ribonukleinsäure |
| SSC | - | standard saline citrat |
| Std. | - | Stunde |
| TAE | - | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TG | - | Thyroglobulin |
| TGF | - | transforming growth factor |
| Tris | - | Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan |
| U | - | (unit) Reaktionseinheit |
| ü.N. | - | über Nacht |
| UV | - | ultraviolette Strahlung |
| VE | - | voll entsalztes Wasser |
| YFP | - | (yellow fluorescent protein) gelb fluoreszierendes Protein |
| YSL | - | (yolk syncytial layer) syncytiale Zellschicht auf dem Dotter |
| z.B. | - | zum Beispiel |
| ZF | - | Zebrafisch |
| ZFR | - | Zebrafisch Ringer |

Die Genetische Nomenklatur in dieser Arbeit hält sich an die üblichen Konventionen:

Gene, mRNAs und Phänotypen werden klein und *kursiv* geschrieben, außer in der Maus groß und *kursiv*.

Proteine werden nicht kursiv und deren Anfangsbuchstaben jeweils groß geschrieben.

9. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Diethard Tautz und Priv.-Doz. Dr. Klaus B. Rohr betreut worden.

Köln, den _____

Teilpublikationen:

Alt, B., Elsalini, O. A., Schrumpf, P., Haufs, N., Lawson, N. D., Schwabe, G. C., Mundlos, S., Gruters, A., Krude, H. und Rohr, K. B. (2006a). Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation. *Development* **133**, 3797-804

Alt, B., Reibe, S., Feitosa, N. M., Elsalini, O. A., Wendl, T. und Rohr, K. B. (2006b). Analysis of origin and growth of the thyroid gland in zebrafish. *Dev Dyn* **235**, 1872-83