Die Rolle von Fgfs und Bmps in der frühen Schilddrüsenentwicklung des Zebrafisches

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Dejan Adzic
aus Karlsruhe

Köln 2008

Berichterstatter:	Prof. Dr. Siegfried Roth
	Prof. Dr. Matthias Hammerschmidt
Tag der mündlichen Prüfung:	25.04.2008

Danksagung

Allen voran möchte ich Dr. Klaus Rohr für die sehr gute Betreuung, für seine Diskussionsbereitschaft, die hilfreichen Anregungen und Tipps, sowie für die Anleitung in Laborarbeiten und die kritische Durchsicht meiner Dissertation danken.

Ferner danke ich Prof. Dr. Siegfried für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Übernahme des Erstgutachtens. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Matthias Hammerschmidt für seine große Unterstützung meiner Doktorarbeit, darunter insbesondere für die Bereitstellung der transgenen Linien und Klone, ohne die ein großer Teil dieser Arbeit nicht zustande gekommen wäre, sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Thomas Wendl, Burkhard Alt, Osama Elsalini, und Julia von Gartzen danke ich für die vielen Hilfestellungen und Ratschläge in der Laborarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Julia von Gartzen, die mich in der experimentellen Arbeit tatkräftig unterstützt hat.

Christel Schenkel und Thomas Wagner danke ich für ihre wertvolle Unterstützung in experimentellen Arbeiten, die mir mit ihrer kollegialen Hilfe die Arbeit erleichtert haben.

Einen großen Dank richte ich an Bastian Ackermann und Ramona Esposito, mit denen ich meine beste Zeit im Institut hatte. Sie war leider nur zu kurz.

Mein besonderer Dank gilt Jens Hofmann, der mir immer eine Stütze war und, wenn nötig, mir Antrieb für meine Arbeit gegeben hat.

Zum Schluss richte einen ganz großen Dank an meine Eltern, Milojko und Natasa Adzic, die mir erst das Studium ermöglicht haben und mir ihre größtmögliche Unterstützung zukommen ließen.

1 Einleitung 3

1.1 Der Zebrafisch als Modellorganismus für die Wirbeltierentwicklung 3

1.2 Die Embryonalentwicklung des Zebrafisches 4

1.3 Die Schilddrüse 6

1.4 Die Schilddrüsenentwicklung im Zebrafisch 9

1.5 Die Endodermentwicklung im Zebrafisch 12

1.7 Der Bmp-Signalweg 19

1.8 In *hands off/hand2*-Mutanten ist die Schilddrüsenentwicklung gestört 22

1.9 Zielsetzung der Arbeit 26

2 Material und Methoden 27

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 27

2.2 Puffer, Lösungen und Medien 27

2.3 Verwendete Zebrafischstämme 28

2.4 Haltung und Zucht der Zebrafische 28

2.5 Histologische Methoden 29

2.5.1 Fixierung und Aufbewahrung 29

2.5.2 Einbetten in Durcupan und Herstellung von Mikrotomschnitten 29

2.5.3 Whole-Mount-In-Situ-Hybridisierung 31

2.5.4 Wholemount-Antikörperfärbung 35

2.6 Mikroinjektionen von Morpholinos und mRNAs 37

2.7 Transplantationen 37

2.8 Implantationen 38

2.9 Auswertung der Zellproliferations- und Zelltodmarker 39

2.10 Molekulare Methoden 40

2.10.1Sequenzierung von Plasmid-DNA 40

2.10.2 Herstellung von Dig-konjugierten DNA-Sonden 41

2.10.3 In-Vitro-Transkription 43

3 Ergebnisse 44

3.1 Die Schilddrüse entwickelt sich unabhängig von der *hand2*-Expression in den Kiemenbögen und den Kiemenbögen-assoziierten Zellen 44

3.2 Fgfs sind für die Schilddrüsenentwicklung notwendig 47

3.3 Die ektopische Exposition von Fgf-Proteinen rettet die Schilddrüsenentwicklung in der *han*^{S6} -Mutante 51

3.4 Bmps sind für die Schilddrüsenentwicklung notwendig 54

3.5 Die Manipulation der Bmp-Konzentrationen bei 18ss beeinflusst die endodermale *nk2.1a*-Expression 59

3.6 Der Bmp-Signalweg ist für die Entwicklung und Differenzierung der Schilddrüsenanlage notwendig 65

3.7 Das anteriore Endoderm und die Zellproliferationsrate werden durch veränderte Bmp-Konzentrationen nicht beeinflusst. 71

3.8 Die Manipulation der Bmp-Konzentrationen bei 18ss hat keine Auswirkung auf die Größe des Herzfeldes 76

3.9 Die Expressionsmuster von *bmp2b*, *bmp4*, *alk8* und *alk3b* machen diese Gene zu möglichen Kandidaten für eine Beteiligung an der Schilddrüsenentwicklung 78

***4 Diskussion* 86**

4.1 Der Fgf-Signalweg wird für den Erhalt der Schilddrüsenentwicklung benötigt. 86

4.2 Bmps sind potenzielle induktive Faktoren in der Schilddrüsenentwicklung 88

4.3 Das Herz ist ein potenzielles Signalzentrum für die Schilddrüsenentwicklung 91

4.4 Schlussfolgerung 94

***5 Zusammenfassung* 95**

***6 Abstract* 97**

***7 Literatur* 99**

***8 Abkürzungen, Symbole und Konventionen* 105**

***9 Erkärung* 107**

***10 Lebenslauf* 108**

1 Einleitung

1.1 Der Zebrafisch als Modellorganismus für die Wirbeltierentwicklung

Die molekulare und genetische Komplexität der Entwicklung erfordert es, dass sich die Forschung auf wenige Modellorganismen konzentriert. Der Zebrafisch gehört zu den fest etablierten Modellorganismen der Wirbeltierforschung und weist viele Vorteile auf, die den Zebrafisch zu einem experimentell leicht zugänglichen Organismus machen. Der Zebrafisch hat eine hohe Nachkommenzahl, die eine statistische Auswertung von genetischen Experimenten ermöglicht. Zebrafische lassen sich das ganze Jahr über paaren, wobei ein Pärchen ein Mal in der Woche bis zu 100 befruchtete Eier produzieren kann. Die Befruchtung und Embryonalentwicklung findet außerhalb des Mutterleibes (extra-uteral) statt und ermöglicht zusammen mit der Transparenz der Embryonen die Beobachtung der Embryonalentwicklung mit einem einfachen Stereomikroskop, ohne die Entwicklung zu stören oder zu unterbrechen. Weiterhin ermöglicht die extra-uterale Entwicklung die Transplantation von Zellen bzw. Zellverbänden, sowie die Untersuchung von Chemikalien auf eine teratogene (entwicklungsstörende) Wirkung durch die einfache Zugabe der Chemikalie in das Wasser. Die Embryonalentwicklung ist im Vergleich zu anderen Wirbeltieren äußerst schnell. Bereits 24 Stunden nach der Befruchtung (hours post fertilisation, hpf) haben sich die meisten Gewebe und Organanlagen gebildet. Insbesondere das Herz beginnt bei 24hpf bereits zu schlagen und seine Funktion auszuüben. Die hohe Nachkommenzahl und die kurze Generationszeit machen den Zebrafisch zu einem geeigneten Organismus für die Suche nach Kandidatengenen für eine bestimmte biologische Fragestellung in einem Mutagenesescreen. Der erste Mutagenesescreen im Zebrafisch im Labor von Christiane Nüsslein-Volhard hat bereits viele Mutanten geschaffen, die als Tiermodelle für die Wirbeltierentwicklung und sogar für Krankheiten des Menschen herangezogen werden (Mullins et al., 1994). Ein besonderer Vorteil des Zebrafisches bietet der Einsatz von Morpholinos, durch die eine gewünschte Genfunktion durch die Herunterregulierung der Translation der entsprechenden mRNA ausgeschaltet werden kann. Schließlich eignet sich der Zebrafisch zur Herstellung transgener

Linien, die es ermöglichen, ein gewünschtes transgen unter gewünschten Bedingungen ein- bzw. auszuschalten und so bestimmte Aspekte der Entwicklung zu untersuchen.

1.2 Die Embryonalentwicklung des Zebrafisches

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse wurden aus Experimenten in verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien des Zebrafisches gewonnen. Für ein näheres Verständnis der Ergebnisse folgt eine kurze Beschreibung der Embryonalentwicklung des Zebrafisches, die den Zeitraum von der Befruchtung bis zum Schlüpfen der Larve aus dem Chorion umfasst. Kurz nach der Befruchtung hebt sich die erste Blastomere vom großen Dotter des Eies ab (Abb. 1.1 A). Es folgt eine Reihe von Zellteilungen, die zur Bildung des Blastoderms führen (Abb.1.1 B-D). Nach ungefähr vier Stunden nach der Befruchtung beginnen die Zellen in Richtung des vegetalen Pols zu wandern und umwandern so den großen Dotter (Kane und Kimmel, 1993; Kimmel et al., 1995; Schier und Talbot, 2005). Diese ersten Zellbewegungen werden als Epibolie bezeichnet. Sobald die Zellen ca. 50% des Dotters bedeckt haben (50% Epibolie, Abb.1.1 E), beginnt die Gastrulation. Zu diesem Zeitpunkt bildet sich am äußeren Rand der wandernden Zellen eine Verdickung, die als „germ ring“ bezeichnet wird. Der „germ ring“ besteht aus wenigen Zellschichten, wobei die äußeren Zellschichten den Epiblasten und die inneren Zellschichten den Hypoblasten bilden. Entlang dieser Randzone hebt sich an einer Stelle eine lokalisierte Struktur hervor, die als „shield“ bezeichnet wird (Abb 1.1 F). Das „shield“ markiert die zukünftige, dorsale Seite des Embryos und ist dem Organisator in Amphibien homolog (Shih und Fraser, 1996; Saude et al., 2000). Am „shield“ setzt die Involution der ersten Zellen ein und breitet sich entlang der Randzone aus. Die involutierenden Zellen wandern wieder in Richtung des animalen Poles, während die außen verbleibenden Zellen weiter in Richtung des vegetalen Poles wandern und so die Epibolie fortführen (Abb 1.1 G). Durch Konvergenz- und Extensionsbewegungen konzentrieren sich die wandernden Zellen entlang einer durch den „shield“ gehenden Achse und lassen eine anterior-posteriore Polarität erkennen (Solnica-Krezel, 2006). Am ehemals animalen Pol ist der Kopf zu

erkennen, während am vegetalen Pol die Schwanzknospe zu sehen ist (Abb 1.1 H). Im Anschluss folgt die Somitogenese, die durch die sequenzielle Bildung von Somiten gekennzeichnet ist (Abb.1.1 I-K). In dieser Periode ist besonders die rasche Entwicklung des Nervensystems zu beobachten. Bei ca. 24hpf ist bereits die Grundform des Embryos zu erkennen (Abb. 1.1 L). Bis zum Schlüpfen der Larve bei ca. 3 Tagen nach der Befruchtung (day post fertilisation, dpf) haben sich die meisten Organe gebildet und die Larve ist in der Lage sich fortzubewegen.

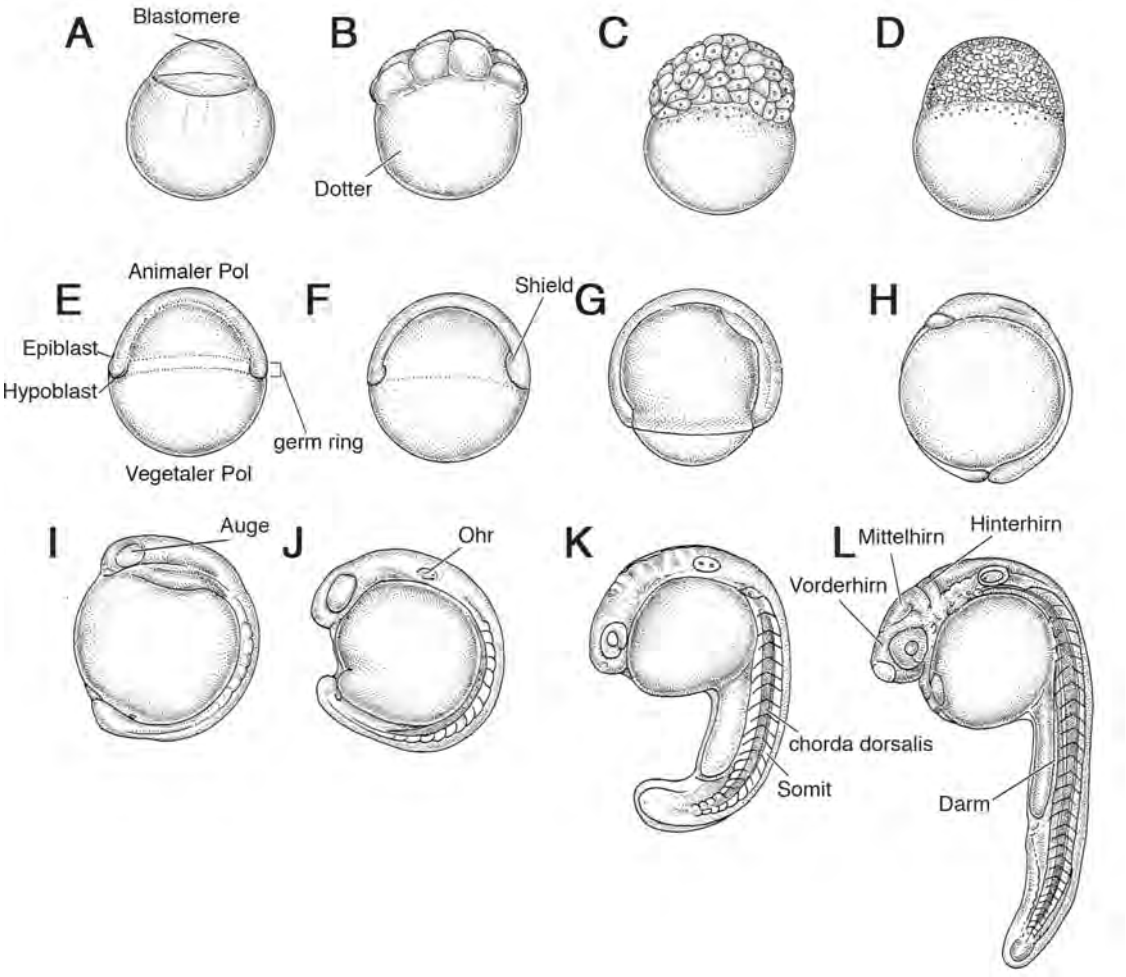

Abb. 1.1 Die Embryonalentwicklung des Zebrafisches

Die Abbildung illustriert die Embryonalentwicklung des Zebrafisches. Erläuterung siehe Text (modifiziert aus Langeland und Kimmel, 1997).

1.3 Die Schilddrüse

Die Schilddrüse ist ein endokrines Organ, das in allen Wirbeltieren vorhanden ist. Im Menschen bildet die Schilddrüse ein kompaktes, schmetterlingsförmiges Organ, das sich im unteren Bereich des Halses vor der Luftröhre befindet (Abb. 1.2 A). Der Aufbau der Schilddrüse ist im Vergleich zu anderen Organen relativ simpel und besteht aus nur wenigen Zelltypen (Abb. 1.2 B). In der menschlichen Schilddrüse befinden sich zwei Hormon produzierende Zellpopulationen: Die Schilddrüsenzellen und die C-Zellen. Die Schilddrüsenzellen (Thyrozyten) sind in Follikel organisiert, die ein einschichtiges, sphärisches Epithel mit einem Lumen bilden (Abb. 1.2 B). Die Thyrozyten weisen eine apikobasale Struktur auf, wobei die apikale Seite in Richtung des Lumens weist (Abb. 1.2 C). Im Lumen wird das Schilddrüsenhormon gelagert. Die C-Zellen sind zwischen den Schilddrüsenfollikeln lose angeordnet und sind für die Produktion des Hormons Kalzitonin verantwortlich (Abb. 1.2 B). Weitere in der Schilddrüse befindlichen Zelltypen werden durch Zellen des Blutgefäßsystems und durch mesenchymale Zellen gebildet. Die Blutgefäße dienen der Versorgung der Schilddrüsenzellen und ermöglichen die Abgabe des Schilddrüsenhormons in den Blutkreisklauf. Die mesenchymalen Zellen bilden das Bindegewebe und umgeben die Schilddrüse mit einer Bindegewebshülle.

Die Funktion der Schilddrüsenfollikel liegt in der Produktion des Schilddrüsenhormons Tetraiodthyronin (T_4, Thyroxin) bzw. dessen biologisch aktives Derivat Triiodthyronin (T_3). Das Schilddrüsenhormon dient zur Regulierung der physiologischen Aktivität (Stoffwechsel) der Zielzellen, wobei fast jede Zelle im menschlichen Körper Schilddrüsenhormon-Rezeptoren exprimiert. Die zentrale Bedeutung der Schilddrüse für den menschlichen Körper zeigt sich in den Auswirkungen einer unbehandelten angeborenen Hypothyreose. Unter einer Hypothyreose versteht man das Ausbleiben der Schilddrüsenfunktion, wobei es dafür unterschiedliche Ursachen geben kann. Beispielsweise ist in Patienten mit angeborener Hypothyreose kein (Athyreose) oder fehlpositioniertes Schilddrüsengewebe (Ektopien) vorhanden. Unbehandelt führt diese Krankheit zum Kretinismus, der durch Kleinwuchs und mentaler Retardierung charakterisiert ist.

Die Funktion der Kalzitonin produzierenden C-Zellen ist im Menschen nicht geklärt. Obwohl Kalzitonin ein Hormon des Kalziumstoffwechsels ist, weisen Patienten mit sehr hohen oder nicht nachweisbaren Kalzitoninspiegeln normale Kalziumwerte auf (Inzerillo et al., 2002).

Der Aufbau der Schilddrüse im Zebrafisch unterscheidet sich von der Schilddrüsenstruktur im Menschen. Die Schilddrüse im Zebrafisch bildet kein kompaktes Organ, sondern besteht aus einzelnen Schilddrüsenfollikeln, die entlang der ventralen Aorta im unteren Pharynxbereich lose verteilt sind (Abb. 1.2 D). Die C-Zellen sind im Zebrafisch separat in den Ultimobranchialkörpern organisiert, die nicht mit den Schilddrüsenfollikeln fusioniert sind und eine andere Position im Körper einnehmen (Alt et al., 2006 b; Abb. 1.2 D). Diese Trennung der beiden Zellpopulationen ist nicht nur in Fischen, sondern auch in weiteren Wirbeltierklassen wie den Amphibien und den Vögeln zu finden (Le Douarin et al., 1974; Le Lievre und Le Douarin, 1975). Die Fusion der C-Zellen und Thyrozyten, wie sie in der Maus und im Menschen vorkommt, übt vermutlich keine besondere Funktion aus und ist möglicherweise auf gemeinsame Aspekte der beiden Zellpopulationen in der Relokalisation der jeweiligen primordialen Zellen zurückzuführen. Zelllinienanalysen in der Wachtel haben ergeben, dass die C-Zellen sich aus Neuralleistenzellen entwickeln (Le Douarin et al., 1974; Le Lievre und Le Douarin, 1975). Die C-Zellen werden daher als Derivate des Ektoderms angesehen und stellen wahrscheinlich keinen weiteren Zelltyp der eigentlichen Schilddrüse dar. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit nur die Entwicklung der Thyrozyten untersucht.

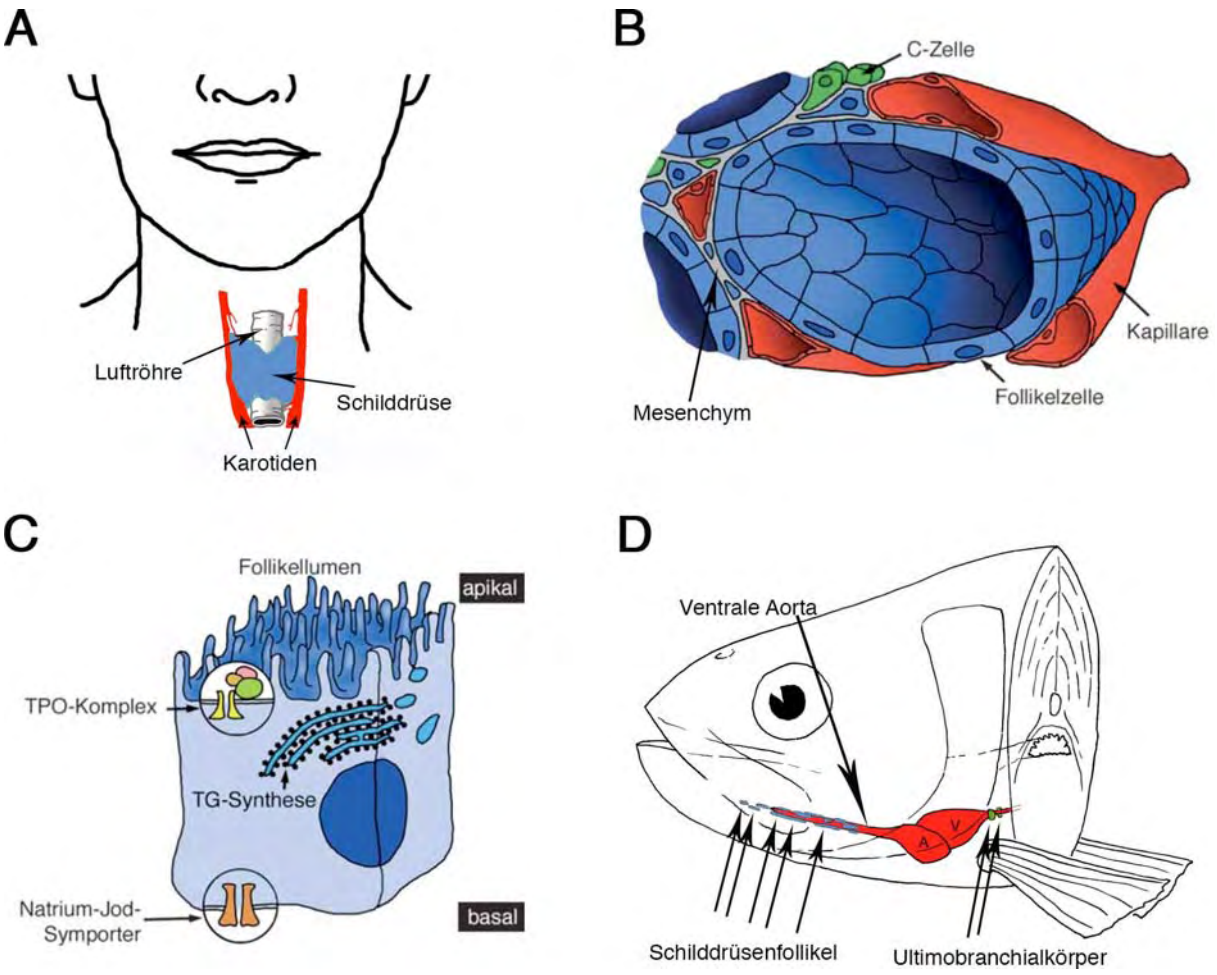

Abb. 1.2 Die Schilddrüse im Menschen und im Zebrafisch

(**A**) Die Abbildung zeigt die Position der menschlichen Schilddrüse (in blau). (**B**) In der menschlichen Schilddrüse kommen 4 Zelltypen vor: Die Thyrozyten (in blau), die in Follikel organisiert sind, Blutgefäßzellen (in rot), C-Zellen (in grün) und mesenchymale Zellen (in grau). Nur die Thyrozyten produzieren das Schilddrüsenhormon. (**C**) Die Thyrozyten weisen eine apikobasale Polarität auf. Der Natrium-Jod-Symporter, Thyroglobuline (TG) und der TPO-Komplex (Thyreoperoxidase-Komplex) sind Proteine, die spezifisch in den Thyrozyten exprimiert werden. (**D**) Die Schildrüsenfollikel (in blau) bilden im Zebrafisch kein kompaktes Organ, sondern sind entlang der ventralen Aorta lose verteilt. Die C-Zellen sind separat in den Ultimobranchialkörpern (in grün) organisiert.

A= Atrium; V= Ventrikel

1.4 Die Schilddrüsenentwicklung im Zebrafisch

Die Entwicklung der Schilddrüse lässt sich in bestimmte Phasen der Organogenese unterteilen. Dazu gehören die Induktion der Schilddrüse aus kompetentem Gewebe, die Relokalisation des Primordiums zu seiner spezies-spezifischen Position im Körper, die Proliferation, die Differenzierung und die Morphogenese des Organs. Diese Unterteilung der Schilddrüsenentwicklung ist thematisch und entspricht nicht unbedingt der chronologischen Reihenfolge, wie sie in den verschiedenen Wirbeltieren auftritt. Weiterhin können diese Prozesse zum Teil parallel ablaufen. Im Folgenden sei die Entwicklung der Schilddrüse am Beispiel des Zebrafisches beschrieben:

Die Schilddrüsenentwicklung im Zebrafisch beginnt mit der Induktion der Schilddrüsenanlage im anterioren Bereich des zunächst flach vorliegenden Endoderms (Abb. 1.3 A, graue Fläche in (I)). Ab ca. 36hpf beginnt sich das Schilddrüsenprimordium vom Pharynxepithel abzulösen (Abb. 1.3 A, graue Fläche in (II)). Zu diesem Zeitpunkt hat sich bereits der Pharynx gebildet und es ist klar zu erkennen, dass die Schilddrüsenanlage im Zebrafisch im ventralen Pharynxepithel lokalisiert ist. Sobald sich die Schilddrüsenanlage vollständig abgelöst hat, ist bereits die follikuläre Struktur zu erkennen, in der die Schilddrüsenzellen ein einschichtiges, rundes Epithel mit einem Lumen bilden. Ab ca. 40hpf findet eine Relokalisierung der abgelösten Schilddrüse tief in das Mesenchym ventral vom Pharynx statt, an deren Ende die Schilddrüse an ihrer endgültigen Position an der ventralen Aorta in unmittelbarer Nähe des Herzens lokalisiert ist (Abb. 1.3 A, graue Fläche in (III) und (IV)). Eine deutliche Zunahme der Schilddrüsengröße ist im Zebrafisch erst ab ca. 70hpf zu beobachten. Während sich bis dahin das Primordium zu einem einzelnen Follikel entwickelt hat, entstehen nun durch Proliferation weitere Follikel. Die neu hinzukommenden Schilddrüsenfollikel ordnen sich entlang der anterior-posterioren Achse der wachsenden ventralen Aorta an. Vermutlich liegen dabei die ältesten Follikel an der am weitesten anterioren Position vor und die jüngeren Follikel schließen sich posterior an (Alt et al., 2006 b; Abb. 1.3 A, graue Flächen in (V) und (VI)). Die Produktion des Schilddrüsenhormons ist ab ca. 80hpf histologisch nachweisbar, so dass spätestens ab diesem Zeitpunkt bereits differenzierte Schilddrüsenfollikel vorhanden sind.

Über den Mechanismus der Induktion der Schilddrüse und der daran beteiligten Gene ist bisher nichts bekannt. Bei ca. 24hpf beginnt die Expression von drei Transkriptionsfaktoren, die im Bereich der Schilddrüsenanlage im Endoderm exprimiert werden: *nk2.1a, pax2.1* und *hhex* (Elsalini et al., 2003; Abb.1.3 B-D). Funktionsanalysen haben ergeben, dass diese Transkriptionsfaktoren weder in der Maus noch im Zebrafisch für die Bildung der Schilddrüsenanlage benötigt werden (Wendl et al., 2002; Elsalini et al., 2003). Experimente im Zebrafisch haben gezeigt, dass der Funktionsverlust eines der Transkriptionsfaktoren zunächst keinen Einfluss auf die Expression der anderen Transkriptionsfaktoren in der Schilddrüsenanlage hat. Erst ab ca. 30hpf führt der Funktionsverlust zum Verschwinden der Expression der jeweils anderen Transkriptionsfaktoren in der Schilddrüsenanlage. Da es durch den Funktionsverlust *nk2.1a, pax2.1* oder *hhex* nicht zur Bildung einer funktionalen Schilddrüse kommt, wird vermutlich in diesen Embryonen das schilddrüsenspezifische Entwicklungsprogramm eingestellt. Ab ca. 28hpf wird ein weiteres Gen im Bereich der Schilddrüsenanlage exprimiert, bei dem es sich ebenfalls um einen Transkriptionsfaktor handelt: *pax8* (Abb. 1.3 E). Wie *nk2.1a, pax2.1* und *hhex* gehört *pax8* zu den schilddrüsenspezifischen, frühen Entwicklungsgenen. Die Differenzierung der Schilddrüse beginnt mit der Expression der *thyroglobulin*-mRNA bei ca. 30 hpf (Abb. 1.3 F). Thyroglobulin ist das Vorläuferprotein des Schilddrüsenhormons und wird in das Follikellumen sekretiert und gelagert. Für die Herstellung des Schilddrüsenhormons benötigt die Schilddrüse Jod, das zur Jodierung der Tyrosinreste des Thyroglobulins dient. Die Aufnahme des Jods aus dem Blutkreislauf erfolgt durch den Natrium-Jod-Symporter („sodium-iodide-symporter“, *nis/slc5a5*). Die Expression der *slc5a5*-mRNA beginnt im Zebrafisch bei ca. 55hpf (Abb.1.3 G) und zeigt das Fortschreiten der Schilddrüsendifferenzierung an. Ungefähr zum gleichen Zeitpunkt ist die Expression des Thyroglobulin-Proteins histologisch nachweisbar (Abb. 1.3 H). Das Schilddrüsenhormon T_4 kann ab ca. 80 hpf detektiert werden, so dass die Schilddrüse ab diesem Zeitpunkt ihre Funktion aufnimmt.

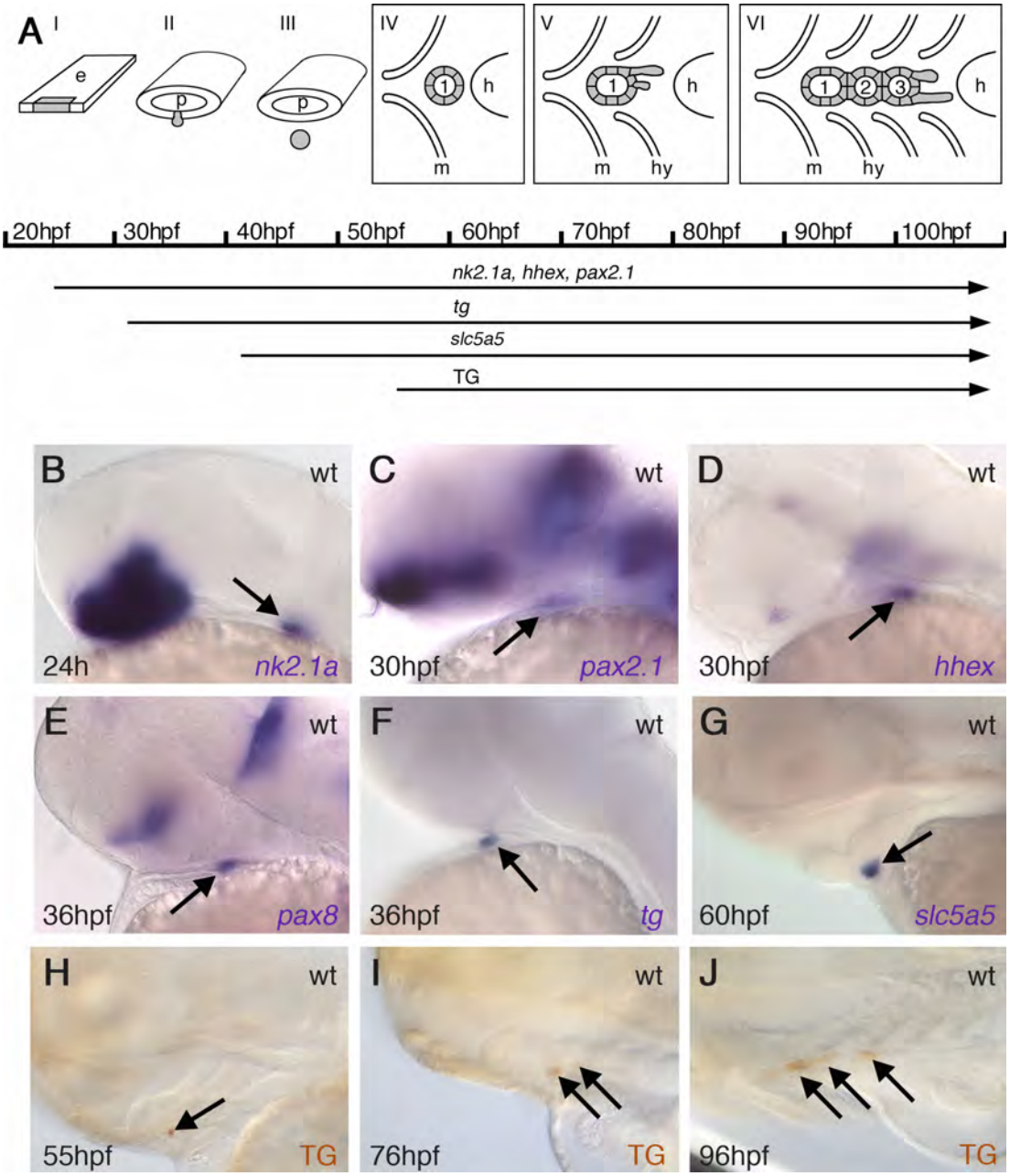

Abb. 1.3 Die Schilddrüsenentwicklung im Zebrafisch

(**A**) Die Bilder (I)-(VI) illustrieren schematisch die Schilddrüsenentwicklung im Zebrafisch. Die aufsteigenden Zahlen markieren die Entstehung der Schilddrüsenfollikel in chronologischer Reihenfolge. Für eine Beschreibung der Entwicklung siehe Text. Die Pfeile unter der Zeitlinie von 20-110hpf zeigen den Expressionsbeginn (Pfeilende) der unterschiedlichen Schilddrüsenmarker (über dem Pfeil), die konstitutiv im Schilddrüsenprimordium und später in der Schilddrüse exprimiert werden. (Abbildung modifiziert aus Alt et al., 2006 b). (**B-J**) Die Bilder zeigen die Expressionmuster der verschiedenen Schilddrüsenmarker.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeile markieren die Schilddrüse. B-J sind laterale Ansichten.

e= Endoderm; h=Herz; hy= Hyoidbogen; m= Mandibularbogen; p= Pharynx

1.5 Die Endodermentwicklung im Zebrafisch

Die morphologische Beobachtung der Schilddrüsenentwicklung in der Maus, dass sich die Schilddrüse aus dem transienten Kiemendarm entsteht, hat dazu geführt, dass die Schilddrüse als Derivat des Endoderms betrachtet wird (Noden, 1991; Walker und Liem, 1994). Diese Annahme wurde durch Experimente im Zebrafisch bestätigt, die gezeigt haben, dass die Schilddrüsenfollikel aus rein endodermalen Zellen gebildet werden (Alt et al., 2006 b). Aufgrund der endodermalen Herkunft der Schilddrüsenzellen ist anzunehmen, dass die Schilddrüsenanlage aus kompetentem Gewebe des Endoderms induziert wird. Es folgt eine kurze Beschreibung der Endodermentwicklung bis zur Induktion der Schilddrüsenanlage im Zebrafisch:

Fate-Mapping-Experimente haben gezeigt, dass endodermale Vorläuferzellen kurz vor dem Beginn der Gastrulation in den ersten vier Zellreihen der Randzone des Blastoderms lokalisiert und mit mesodermalen Vorläuferzellen vermischt sind (Abb 1.4 A; Warga und Nüsslein-Volhard, 1999). Die endodermalen Vorläuferzellen sind asymmetrisch verteilt, wobei mehr endodermale Vorläuferzellen in den ersten beiden Zellreihen und um den Bereich der zukünftigen dorsalen Seite des Embryos zu finden sind (Warga und Nüsslein-Volhard, 1999). Die Verteilung der endodermalen Vorläuferzellen entlang der dorsoventralen Achse im „shield stage“ spiegelt die spätere anteriorposteriore Achse des Endoderms wieder, wobei mehr dorsal (am „shield“) lokalisierte Vorläuferzellen anteriore Strukturen im Endoderm bilden (Warga und Nüsslein-Volhard, 1999; David und Rosa 2001). Zelltransplantationsexperimente haben gezeigt, dass die Spezifizierung der endodermalen Vorläuferzellen kurz vor der Gastrulation bei 50% Epibolie stattfindet (David und Rosa, 2001, Abb. 1.4 A). Vor diesem Zeitpunkt können die marginalen Zellen des Blastoderms sowohl mesodermale als auch endodermale Zellschicksale einnehmen und werden daher als endomesodermale Vorläuferzellen bezeichnet (David und Rosa, 2001).

Die Untersuchung des molekularen Mechanismus der Induktion endodermaler Vorläuferzellen basiert auf die Analyse von Mutanten und auf Überexpressionstudien, die gezeigt haben, dass der Nodal-Signalweg für die Induktion endodermaler Vorläuferzellen essenziell ist (Ober et al., 2002). Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen folgendes Modell der Induktion endodermaler Vorläuferzellen: Die Nodal-Liganden Squint (Sqt) und Cyclops (Cyc) sind kurz vor Beginn der Gastrulation in der

Randzone des Blastoderms exprimiert und aktivieren den Nodal-Rezeptor Taram-A (Tar) (Feldman et al., 1998; Ober et al., 2002; Fukuda und Kikuchi, 2005; Abb 1.4 B). Obwohl die genaue Rolle der beiden Nodal-Liganden in der Induktion endodermaler Vorläuferzellen nicht genau geklärt ist, ist gezeigt worden, dass eine hohe Nodal-Signalaktivität, sowie die Expression des Co-Rezeptors One-eyed-pinhead (Oep) für die Spezifierung der endodermalen Vorläuferzellen notwendig sind (Schier et al., 1997; Thisse und Thisse, 1999). Die Aktivierung des Nodal-Signalweges führt zur Expression der Transkriptionsfaktoren Bonnie and Clyde (Bon), Faust/Gata5 (Fau) und Mezzo (Mez), die gemeinsam für die Expression des Transkriptionsfaktors Casanova (Cas) benötigt werden (Alexander und Stainier, 1999; Rodaway et al., 1999; Dickmeis et al., 2001; Kikuchi et al., 2001; Reiter et al., 2001; Sakaguchi et al., 2001, Abb 1.4 B). Die *casanova(cas)*-Mutante entwickelt keine endodermalen Zellen und die Überexpression des Transkriptionsfaktors führt zur Änderung des Zellschicksales mesodermaler Zellen in endodermale Zellen (Kikuchi et al., 2001). Diese Ergebnisse zeigen, dass *cas*-exprimierende Zellen endodermale Vorläuferzellen darstellen. Casanova aktiviert die Expression des Transkriptionsfaktors Sox17, der ebenfalls endodermale Vorläuferzellen markiert (Alexander et al., 1999, Abb. 1.4 B).

Nach der Induktion der endodermalen Vorläuferzellen wird im Laufe der Gastrulation das Endoderm gebildet. Über die Endodermentwicklung zwischen der Gastrulation und der Bildung der ersten Organanlagen des Endoderms ist wenig bekannt. Im Zebrafisch beginnen die endodermalen Zellen bereits während der Gastrulation drei Transkriptionsfaktoren der Fox/Forkhead-Familie (FoxA1-3) zu exprimieren (Strähle et al., 1993; Odenthal und Nüsslein-Volhard, 1998). Zusätzlich zu nicht-endodermalen Expressionsdomänen sind FoxA1, FoxA2, und FoxA3 in drei großen Bereichen entlang der anterior-posterioren Achse des Endoderms dynamisch exprimiert, wobei sich die Expressionsdomänen der drei Fox/Forkhead-Faktoren zum Teil überlappen. Über die Funktion der Fox/Forkhead-Faktoren ist im Zebrafisch wenig bekannt, jedoch zeigen Experimente in der Maus, dass FOXA2 zellautonom für die Bildung des anterioren Endoderms benötigt wird (Dufort et al., 1998).

Untersuchungen im Zebrafisch haben gezeigt, dass Bmps eine Rolle in der anterior-posterioren Musterbildung des Endoderms spielen (Tiso et al., 2002). Die Expression

des anterioren Endodermmarkers *her5* ist in der *bmp2b/swirl*-Mutante expandiert. Demnach wird bei der Herrunteregulierung des Bmp-Signalweges durch den Funktionsverlust von Bmp2b die Entwicklung des anterioren Endoderms gefördert. Umgekehrt ist in *chordino/chordin*-Mutanten, in denen der Bmp-Signalweg durch den Funktionsverlust des Bmp-Antagonisten Chordin hochreguliert ist, die Expression von *her5* reduziert. Folglich wird durch die Hochregulierung des Bmp-Signalweges die Entwicklung des anterioren Endoderms inhibiert. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass der Bmp-Signalweg an der anterior-posterioren Musterbildung des Endoderm beteiligt ist.

Die endodermalen Expressionsmuster verschiedener Transkriptionsfaktoren im Huhn haben gezeigt, dass eine graduelle Regionalisierung des Endoderms in anterior-posteriore und dorso-laterale Regionen in den Somitogenesestadien stattfindet (Grapin-Botton und Melton, 2000; Abb 1.4 C). Dabei werden zunächst in frühen Somitogenesestadien Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sox2 und CdxA in großen unterschiedlichen Domänen des Endoderms entlang der anterior-posterioren Achse exprimiert (Abb. 1.4 C). Im Fortlauf der Somitogenese werden weitere Transkriptionsfaktoren exprimiert, die das Endoderm in immer kleinere Bereiche unterteilt, bis es schließlich zur Expression von Genen kommt, die spezifisch für die Entwicklung der unterschiedlichen Organanlagen des Endoderms benötigt werden. Obwohl eine so ausgedehnte Untersuchung von endodermal exprimierten Transkriptionsfaktoren während der Somitogenesestadien im Zebrafisch nicht durchgeführt worden ist, lassen die sequenziellen Expressionsmuster von FoxA1, FoxA2 und FoxA3 einen ähnlichen Mechanismus vermuten.

Zum Zeitpunkt der ersten Schilddrüsenmarkerexpression der Entwicklungsgene *nk2.1a, pax2.1, hhex* und *pax8* ist die Schilddrüsenanlage bereits induziert. Welche Gene für die Kompetenz des Endoderms benötigt werden, um auf ein induktives Signal für die Schilddrüsenspezifizierung reagieren zu können, sind bisher nicht bekannt. Weiterhin stehen Untersuchungen über die Art und die Herkunft des Signals noch aus.

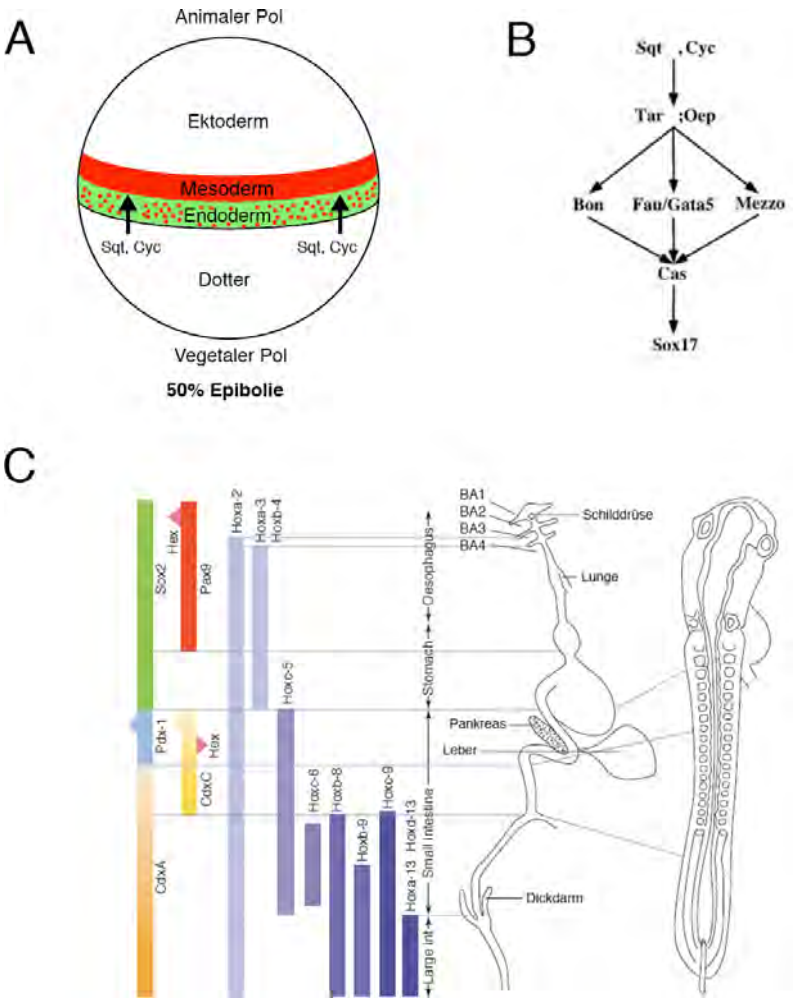

Abb 1.4 Die Endodermentwicklung in Wirbeltieren

(**A**) Das Schema illustriert die Spezifizierung der endodermalen Vorläuferzellen bei 50% Epibolie im Zebrafisch. Der grüne Bereich markiert die ersten vier Zellschichten mit den endodermalen Vorläuferzellen. Dazwischen befinden sich die mesodermalen Vorläuferzellen (rote Punkte). Der rote Bereich markiert weitere mesodermale Vorläuferzellen. Die asymmetrische Verteilung der endodermalen Vorläuferzellen ist nicht in dem Schema widergegeben. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der mutmaßlichen Proteingradienten von Squint (Sqt) und Cyclops (Cyc) (Abbildung modifiziert aus Kimelman und Griffin, 2000). (**B**) Das Schema zeigt die genetische Abfolge der Induktion der endodermalen Vorläuferzellen durch den Nodal-Signalweg im Zebrafisch. Erklärung siehe Text (Abbildung modifiziert aus Fukuda und Kikuchi, 2005). (**C**) Die Abbildung illustriert die fortschreitende, graduelle Regionalisierung des Endoderms am Beispiel des Huhns. Die Balken in der linken Hälfte zeigen schematisch die Ausdehnung der Expressionsdomänen der unterschiedlichen, im Endoderm exprimierten Transkriptionsfaktoren, wobei die waagerechten Linien die entsprechenden Expressionsgrenzen in der schematischen Abbildung des Endoderm im rechten Teil des Bildes markieren (Abbildung modifiziert aus Grapin-Botton und Melton, 2000).

BA= Kiemenbögen (branchial arches); large intestine= posteriorer Teil des Verdauungskanals mit dem Dickdarm; oesophagus= Speiseröhre; small intestine= anteriore Teil des Verdauungstraktes mit dem Zwölffingerdarm und Dünndarm; stomach= Magen

1.6 Der Fgf-Signalweg

Der erste Teil der vorgelegten Arbeit befasst sich mit der Rolle von Fgfs (Fibroblasten-Wachstumskaktoren, fibroblast growth factors) in der Schilddrüsenentwicklung. Die Fgfs bilden eine große Familie sekretierter Proteine mit 19 bekannten Fgf-Liganden im Zebrafisch (Sprague et al., 2006; http://www.zfin.org). Es handelt sich um Signalmoleküle die durch die spezifische Bindung an Rezeptortyrosinkinasen (Fgf-Rezeptoren) die Genexpression der Zielzellen verändern. Im Zebrafisch sind 5 Fgf-Rezeptoren bekannt (Thisse und Thisse, 2005; Trueb et al., 2005): Fgfr1, Fgfr2, Fgfr3, Fgfr4 und Fgfrl1 (Fgf receptor like 1). Die Fgf-Rezeptoren 1-3 liegen in jeweils zwei Rezeptorisoformen vor (Powers et al., 2000), so dass im Zebrafisch insgesamt acht Rezeptoren mindestens 19 Fgf-Liganden gegenüberstehen. Die intrazelluläre Weitervermittlung des Fgf-Signal erfolgt über zwei Wege: den Mapk-Kinase-Weg und den PhopholipaseC-γ-Weg (Thisse und Thisse, 2005). Die“klassische“ Weiterleitung erfolgt über den Mapk-Kinase-Weg und ist in den meisten Fgf-Signaltransduktionen involviert. Aufgrund dessen wird hier die Signaltransduktion über den Mapk-Kinase-Weg beschrieben (Thisse und Thisse, 2005; Abb. 1.5):

Fgfs binden als Homodimere an zwei Untereinheiten eines Fgf-Rezeptors. Die Bindungsspezifität der Fgfs hängt von der Art und Isoform des Fgf-Rezeptors und von den in der extrazellulären Matrix befindlichen Heparansulfatproteoglykanen (HSPGs) ab. Durch die Bindung erfolgt eine Dimerisierung der beiden Untereinheiten des Fgf-Rezeptors, wodurch die intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität der beiden Untereinheiten aktiviert wird und sich die Untereinheiten gegenseitig an bestimmten Tyrosinresten phosphorylieren. Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Andockstelle für intrazelluläre Signalproteine, wie z.B. Frs2α (Fgfr substrate 2α), die zum Teil ebenfalls durch die Rezeptoruntereinheiten phosphoryliert werden. Durch das Andocken dieser Proteine kommt es zur Bindung und Aktivierung eines Proteinkomplexes, das aus dem Protein Grb2 gekoppelt an einen Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (guanine nucleotide exchange factor, GEF; z.B. sister of sevenless, sos) besteht. Der Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor aktiviert die monomere GTPase Ras, indem es den Austausch eines GDPs durch ein GTP

katalysiert. Die aktivierte Form von Ras aktiviert die Serin/Threonin-Kinase Raf, wodurch eine Phosphorylierungskaskade ausgelöst wird, in der Raf die Kinase MEK und anschließend MEK die Map-Kinase phosphoryliert. Im Anschluss kommt es zur Translokation der Map-Kinase in den Nukleus, wo die Map-Kinase Genregulatorproteine phosphoryliert und aktiviert. Die bekanntesten Genregulatorproteine des Map-Kinase-Weges sind die Transkriptionsfaktoren Erm und Pea3, die je nach Genexpressionsprofil der Zelle Proteinkomplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren bilden. Am Ende des Map-Kinase-Weges kommt es zu einer Veränderung der Genexpression der Zielgene als Antwort auf die Signalübertragung.

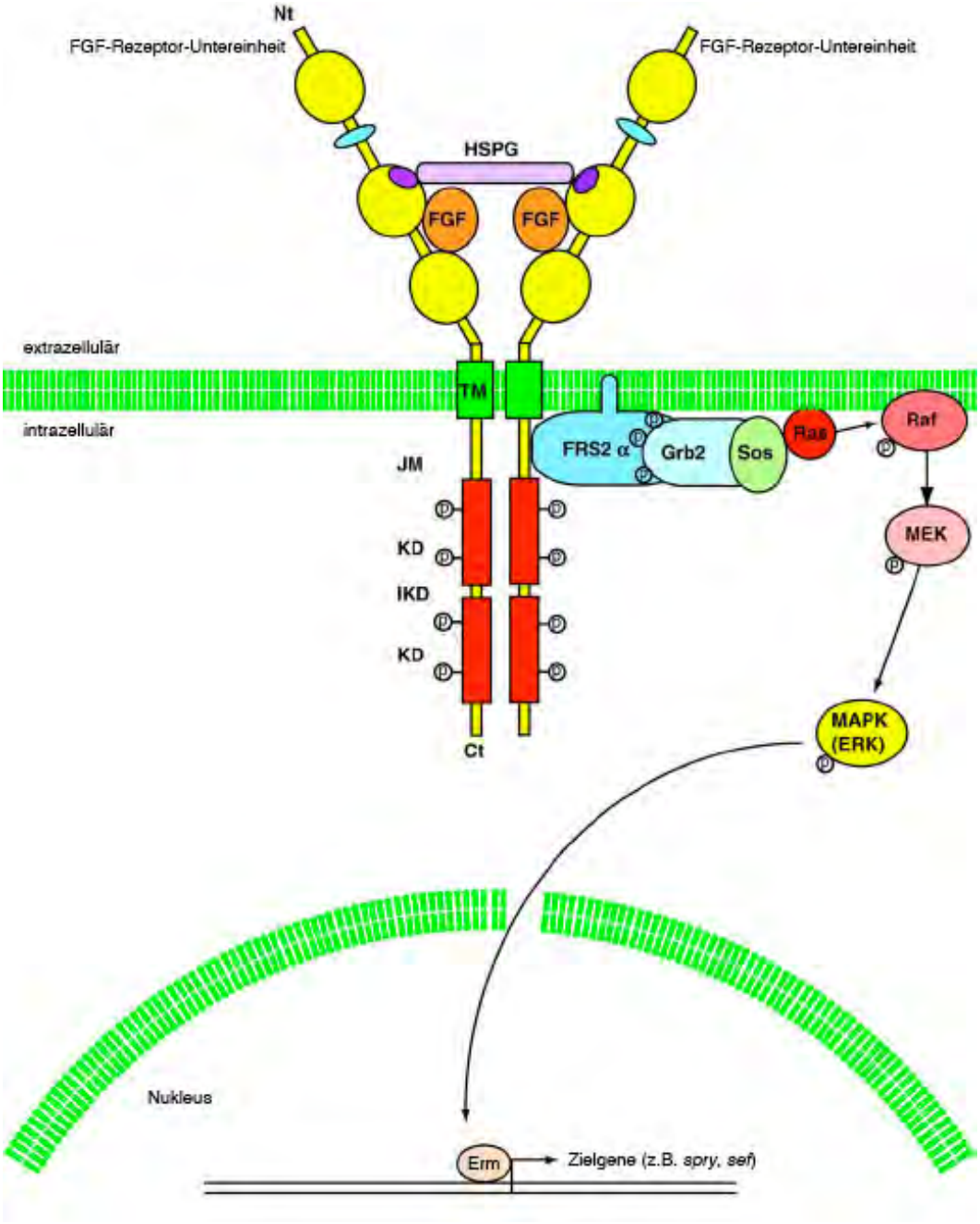

Abb. 1.5 Der Fgf-Signalweg

Die Abbildung illustriert den Map-Kinase-Weg der Fgf-Signaltransduktion. Erklärung siehe Text. (Abbildung modifiziert aus Thisse und Thisse, 2005)

Ct= C-Terminus; FRS2α= Fgf receptor substrate α; Erm= Ets related protein; Grb2= Growth factor receptor-bound protein 2 ; HSPG= Heparansulfatproteoglykan; IKD= Interkinase-Domäne; JM= Juxtamembran-Domäne; KD= Kinase-Domäne; MAPK= Mitogen-activated protein kinase ; MEK= Mitogen-activated kinase; Nt= N-Terminus; Raf= Rapidly growing fibrosarcoma; Ras= Rat sarcoma; Sef= Similar expression to Fgf genes; Sos= Sister of sevenless ; Spry= Sprouty; TM= Transmembran-Domäne

1.7 Der Bmp-Signalweg

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Rolle des Bmp-Signalweges in der Schilddrüsenentwicklung. Bmps (bone morphogenetic proteins) sind sekretierte Signalmoleküle, die zur TGFβ-Superfamilie (transforming growth factor β) gehören. Im Zebrafisch sind 10 Bmp-Liganden bekannt (Sprague et al., 2006; http://www.zfin.org), die ihre Wirkung über die Bindung an zwei Klassen von Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren (Typ I und Typ II) entfalten (Abb. 1.6). Durch die Bindung des als Homodimer vorliegenden Bmp-Liganden an die Bmp-Rezeptoruntereinheiten erfolgt die Bildung eines heteromeren Rezeptorkomplexes, der aus einem Typ I- und einem Typ II-Rezeptor besteht (von Bubnoff und Cho, 2001). Der Typ II-Rezeptor besitzt eine intrazelluläre Domäne mit einer konstitutiven Kinase-Aktivität, die durch die Ligandenbindung zur Phosphorylierung und Aktivierung des Typ I-Rezeptors führt. Im Zebrafisch sind drei Typ I-Rezeptoren (BmpRIA/alk3, BmprIAb/alk3b, BmpRIB, Alk8; Sprague et al., 2006; http://www.zfin.org) und zwei Typ II-Rezeptoren (BmpRIIA, BmpRIIB; Sprague et al., 2006; http://www.zfin.org) bekannt, die eine Weiterleitung von Bmp-Signalen ermöglichen. Die Spezifität eines Bmp-Liganden hängt von der Kombination der Typ I- und Typ II-Rezeptoren ab, so dass ein Bmp-Ligand für eine bestimmte Kombination der Rezeptoren eine hohe Affinität aufweist. So ist z.B. gezeigt worden, dass Bmp2b und Bmp7 den Bmp-Typ I-Rezeptor Alk8 aktivieren (Bauer et al., 2001).Der aktivierte Typ I-Rezeptor phosphoryliert bestimmte Mitglieder der Smad-Familie, die für die intrazelluläre Weitervermittlung des Bmp-Signals verantwortlich sind und als Rezeptor-regulierte Smads bezeichnet werden (R-Smads). Die Signaltransduktion erfolgt vorzugsweise über Smad1, Smad5 und/oder Smad8, wobei die Spezifität des Typ I-Rezeptors für ein R-Smad von der Art des Bmp-Liganden abhängt. Die phosphorylierten R-Smads binden daraufhin einen Proteinkomplex mit Smad4, der im TGFβ-Signalweg mit allen phosphorylierten R-Smads interagieren kann und daher als Co-Smad bezeichnet wird. Der R-Smad/Co-Smad-Proteinkomplex wird im Anschluss in den Nukleus transloziert und bildet dort mit je nach Genexpressionprofil vorhandenen Transkriptionsfaktoren einen Genregulationskomplex, der an die Promotoren der Zielgene bindet und deren Transkription reguliert.

Der Bmp-Signalweg unterliegt einer strengen Regulation auf allen Ebenen der Signalweiterleitung. Die intrazelluläre Regulation des Bmp-Signalweges verläuft hauptsächlich über die Inhibition des Bmp-Signalweges (von Bubnoff und Cho, 2001). Da die intrazelluläre Regulation für das Verständnis der vorliegenden Arbeit nicht benötigt wird, wird hier nicht näher darauf eingegangen. Die extrazelluläre Regulation erfolgt über sekretierte Proteine, die die Signalweiterleitung positiv oder negativ regulieren können. Chordin und Noggin inhibieren den Bmp-Signalweg durch die Bindung an Bmp-Liganden, so dass diese nicht mehr an ihre für sie spezifischen Rezeptoren binden und die Signaltransduktion auslösen können (Abb. 1.6). Bisher konnte die spezifische Inhibition von Bmp2, Bmp4 und Bmp7 durch Chordin und Noggin im Krallenfrosch nachgewiesen werden (Piccolo et al., 1996; Zimmerman et al., 1996), jedoch besteht aufgrund fehlender Untersuchungen die Möglichkeit, dass diese Inhibitoren auch weitere Bmps inhibieren können. Bmp1 ist ein extrazellulärer, positiver Regulator des Bmp-Signalweges. Bei Bmp1 handelt es sich um eine Metallopeptidase, die die Proteolyse von extrazellulären Bmp-Inhibitoren katalysiert und somit inaktiviert.

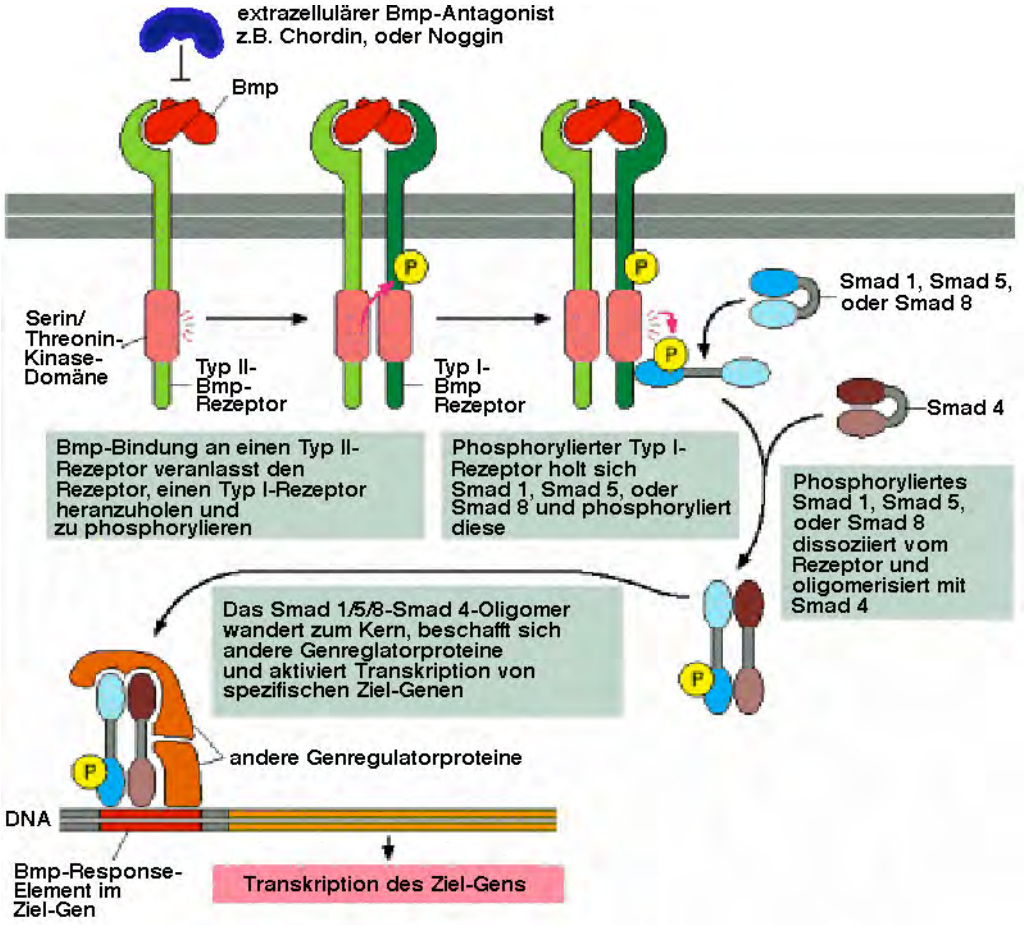

Abb. 1.6 Der Bmp-Signalweg

Die Abbildung illustriert Bmp-Signaltransduktion. Erklärung siehe Text (Abbildung modifiziert aus Alberts et al., 2004).

1.8 In *hands off/hand2*-Mutanten ist die Schilddrüsenentwicklung gestört

Die Untersuchung der Schilddrüsenentwicklung in der *hands off/hand2*-Mutante hat gezeigt, dass in *hands off/hand2*-Embryonen die Schilddrüsenentwicklung gestört ist (Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005,). Der *hands off*-Genlokus kodiert für den Transkriptionsfaktor Hand2 (Yelon et al., 2000). Bisher sind zwei mutante Allele identifiziert worden, zu denen das han^{c99}- und das han^{S6}-Allel gehören. Während im han^{c99}-Allel eine Insertion in einem Intron vorliegt, ist im han^{S6}-Allel der *hand2*-Lokus vollständig deletiert. Die in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit *hands off/hand2*-Mutanten durchgeführt, die das han^{S6}-Allel tragen und werden im weiteren Verlauf der Arbeit als han^{S6}-Mutanten bezeichnet.

Die han^{S6}-Mutante wurde im Rahmen eines Mutagenesescreens identifiziert, um Mutanten der Myokardentwicklung zu generieren (Alexander et al., 1998). Die Untersuchung der Herzentwicklung anhand myokardspezifischer Marker hat gezeigt, dass die han^{S6}-Mutante nur wenige Herzmuskelzellen besitzt (Yelon et al., 2000; Abb. 1.7 A, B). Zusätzlich sind in der han^{S6}-Mutante die Brustflossen nicht vorhanden und der Pharynx stark missgebildet. Die Missbildungen der han^{S6}-Mutante spiegeln sich in der *hand2*-Expression wider. Die *hand2*-Expression beginnt in frühen Somitogenese-Stadien im Lateralplattenmesoderm (Abb. 1.7 C). Bei ca. 6ss wird *hand2* in einer anterioren und einer posterioren Domäne exprimiert und dementsprechend dem anterioren Lateralplattenmesoderm (aLPM) und dem posterioren Lateralplattenmesoderm (pLPM) zugeordnet (Abb. 1.7 D). Bei 24hpf sind zusätzliche Expressionsdomänen vorhanden und *hand2* wird in den Kiemenbögen, den Kiemenbögen assoziierten Zellen (arch associated cells, AACs), im Herzen, im Endoderm und in den Brustflossenknospen exprimiert (Abb. 1.7 E).

Untersuchungen in der Schilddrüsenentwicklung der han^{S6}-Mutante haben gezeigt, dass diese Mutanten Defekte in der Schilddrüsenentwicklung aufweisen (Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005; Abb.1.8 A, B), während die Entwicklung des anterioren Endoderms auf der Ebene der *foxA2/axial*-Expression normal verläuft (Abb. 1.8 C, D). Weiterführende Untersuchungen haben ergeben, dass bereits bei 24hpf die frühe Schilddrüsenentwicklung in han^{S6}-Mutanten gestört ist, wobei die *pax2.1*- und *hhex*-

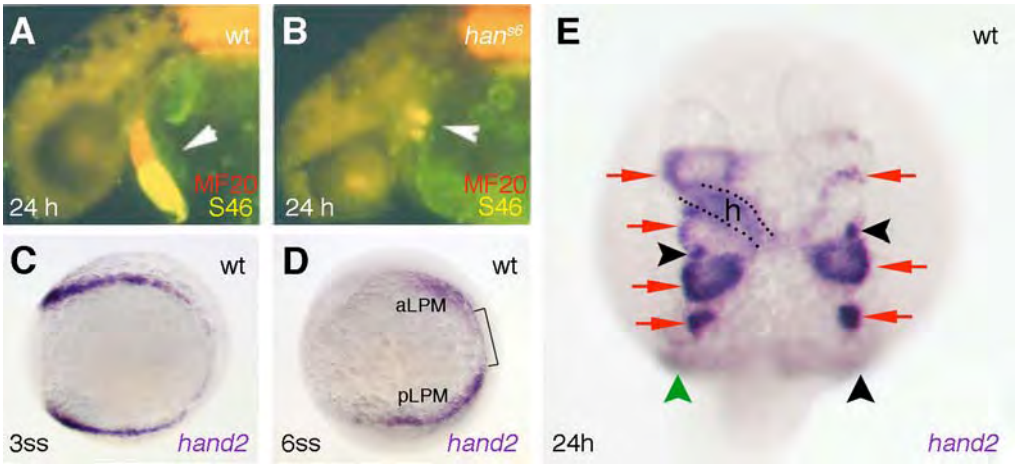

Abb. 1.7 Das *hand2*-Expressionsmuster korreliert mit den Entwicklungsdefekten in der *han*^{S6}-Mutante

(**A, B**) Die Abbildungen zeigen eine Doppelfärbung der Herzmuskelzellen mit den fluoreszierenden Antikörpern MF20 (Ventrikel in rot) und S46 (Atrium in gelb). Die *han*^{S6}-Mutante hat nur wenige Herzmuskelzellen, die Eigenschaften von Zellen des Atriums aufweisen (weiße Pfeilspitze in B) (A, B modifiziert aus Yelon et al., 2000) (**C-D**). Die *hand2*-Expression im Wildtyp. Erklärung siehe Text. Die Klammer in (D) markiert die entstehende Lücke der hand2-Expression im Lateralplattenmesoderm. Rote Pfeile in (E) zeigen auf die *hand2*-Expression in den Kiemenbögen, schwarze Pfeilspitzen auf die *hand2*-Expression in den Kiemenbögen assoziierten Zellen und grüne Pfeilspitzen auf die *hand2*-Expression in den Brustflossenknospen.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt.

aLPM= anteriores Laterlplattenmesoderm; pLPM= posteriores Lateralplattenmesoderm

Expression im Bereich der Schilddrüsenanlage nicht detektierbar ist (Abb. 1.8 E-H) und die *nk2.1a*-Expression in 90% der *han*^{S6}-Embryonen fehlt. (Abb.1.8 I-K).Die Betrachtung des Differenzierungsmarkers *slc5a5* in *han*^{S6}-Mutanten hat gezeigt, dass nur in 10% der Embryonen *slc5a5* exprimiert wird (Abb. 1.8 L-N). Demnach wird in 10% der Embryonen das Differenzierungprogramm gestartet und exprimieren daher vermutlich auch die anderen schilddrüsenspezifischen Entwicklungsgene *pax2.1* und *hhex* auf nicht detektierbarem Expressionsniveau. In den restlichen 90% der *han*^{S6}-Embryonen sind in keinem Entwicklungsstadium bekannte Schilddrüsenmarker exprimiert und es ist anzunehmen, dass diese Embryonen kein Schilddrüsenprimordium haben.

Thomas Wendl ist in seiner Doktorarbeit (2005) der Frage nachgegangen, welches *hand2*-exprimierende Gewebe für die Schilddrüsenentwicklung benötigt wird.

Zelltransplantationsexperimente haben gezeigt, dass *hand2* nicht im Endoderm, sondern im umgebenden Gewebe für die Schilddrüsenentwicklung notwendig ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *hand2* nicht in den Kiemenbögen für die schilddrüsenspezifische *nk2.1a*-Expression gebraucht wird. Es bleibt jedoch noch zu klären, ob die *hand2*-Expression in den Kiemenbögen nicht für die anderen schilddrüsenspezifischen Entwicklungsgene (*pax2.1, hhex, pax8*) bzw. für die Schilddrüsendifferenzierung benötigt wird. Weiterhin besteht die Frage, ob die Kiemenbögen assoziierten Zellen bzw. das Herz als *hand2*-exprimierende Gewebe für die Schilddrüsenentwicklung gebraucht werden. Eine Rolle der Brustflossenknospen in der Schilddrüsenentwicklung kann aufgrund der großen Distanz zum Schilddrüsenprimordium vermutlich ausgeschlossen werden.

Als Transkriptionsfaktor übt Hand2 seine Funktion zellautonom in den *hand2*-exprimierenden Geweben aus. Da Hand2 nicht im Endoderm für die Schildrüsenentwicklung benötigt wird, müssen andere Faktoren die Schilddrüsenentwicklung beeinflussen, die von der *hand2*-expression in den nicht-endodermalen Geweben abhängen. Es konnte gezeigt werden, dass die *nk2.1a*-Expression in *han*^{S6}-Mutanten durch die Implantation von Fgf-ummantelten Kügelchen wiederhergestellt werden kann (Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005). Es besteht jedoch die Frage, ob die ektopische Exposition von Fgfs die Schilddrüsendifferenzierung retten kann oder sich nur auf die Wiederherstellung der *nk2.1a*-Expression beschränkt. Entsprechende Experimente standen bei Beginn der Arbeit noch aus.

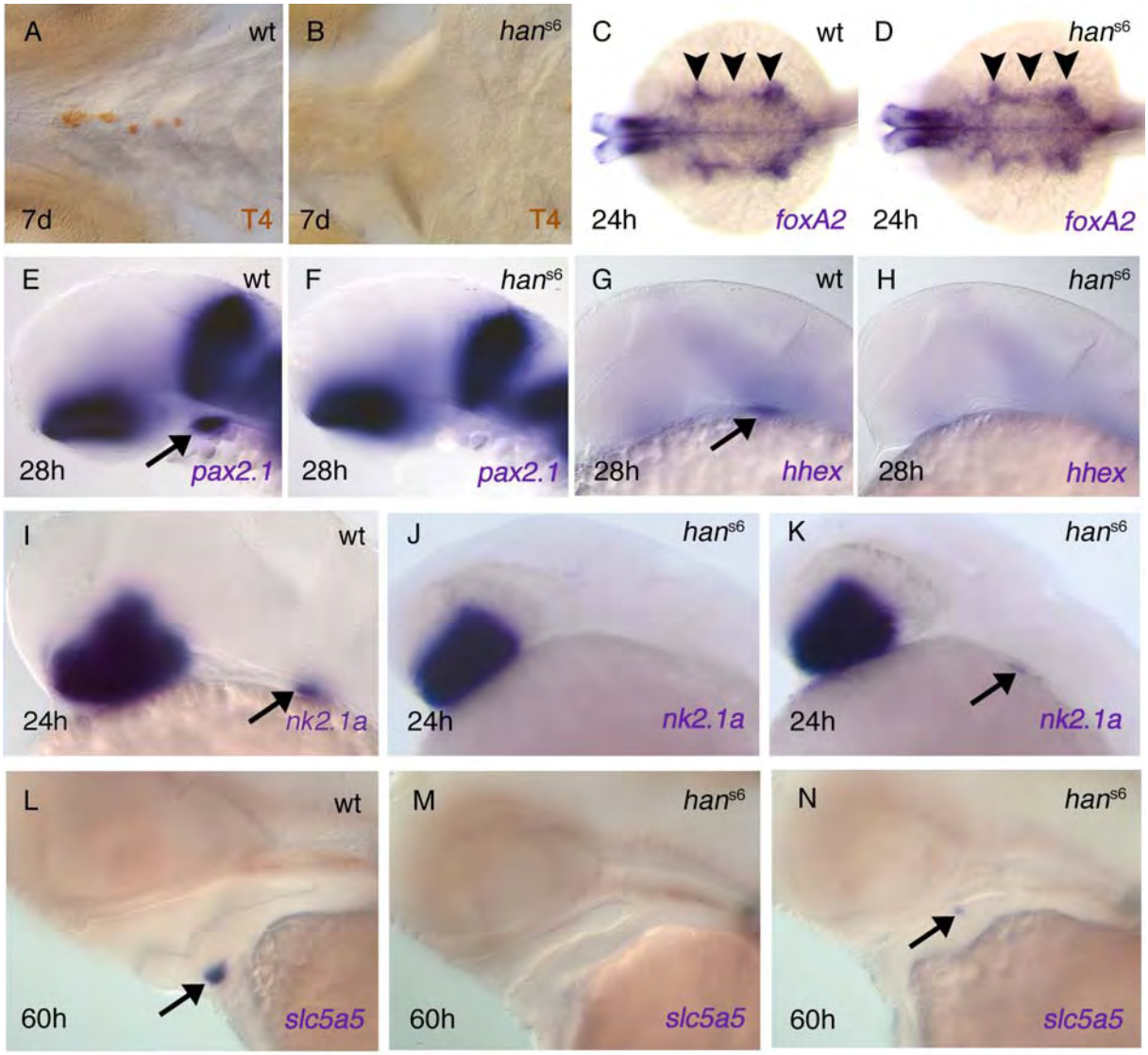

Abb. 1.8 Die Schilddrüsenentwicklung ist in *han*^{s6}-Mutanten gestört

Erklärung siehe Text.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeile markieren die Schilddrüse, schwarze Pfeilspitzen markieren das anteriore Endoderm.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Der bisherige Kenntnisstand über die molekularen Vorgänge in der frühen Schilddrüsenentwicklung konzentriert sich hauptsächlich auf zellautonomwirkende Transkriptionsfaktoren wie *nk2.1a, pax2.1, hhex* und *pax8*, die erst nach der Induktion der Schilddrüse eine Funktion in der Schilddrüsenentwicklung ausüben. Faktoren, die in der Schilddrüseninduktion oder in der Kompetenz des Endoderms, entsprechende induktive Signale empfangen zu können, eine Rolle spielen, sind nicht bekannt. Die Zielsetzung der Arbeit war es den Vorgang der Induktion der Schilddrüse zu untersuchen. Induktionsvorgänge basieren hauptsächlich auf nicht zellautonom wirkende Signalmoleküle, die aus benachbarten Geweben sezerniert werden und im Zielgewebe das Entwicklungsprogramm für ein entsprechendes Primordium induzieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des Fgf- und des Bmp-Signalweges in der frühen Schilddrüsenentwicklung untersucht. Dabei wurde geprüft, welche Funktionen diese Signalwege in der Schilddrüsenentwicklung übernehmen, wobei besonders eine mögliche Rolle in der Induktion der Schilddrüsenanlage betrachtet werden sollte. Aufgrund der räumlich Nähe des Herzens zur Schilddrüse während der gesamten Entwicklung des Zebrafisches sollte weiterhin der Frage nachgegangen werden, ob und welche Rolle das Herz in der Schilddrüsenentwicklung einnimmt und ob das Herz als eventuelle Quelle für Signalmoleküle dient, die die Schilddrüsenentwicklung beeinflussen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Es wurden Chemikalien der Qualität pro analysis (p.a.) verwendet und von folgenden Firmen bezogen: Biomol (Hamburg), Biozym (Hameln), Fluka (Neu-Ulm), Life Technologies (Karlsruhe), Merck-Eurolab (Darmstadt), Pharmacia (Freinburg), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth (Karksruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen).

Die Restriktionsendonukleasen und die dazugehörigen Puffer wurden von folgenden Firmen bezogen: Invitrogen GmbH (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Fermentas (St. Leon-Rot), Roche Diagnostics (Mannheim).

Das Verbrauchsmaterial wurde von folgenden Formen bezogen: Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Rommelsdorf).

Das Filtermaterial wurde von folgenden Firmen bezogen: Schleicher & Schüll (Dassel), Macherey und Nagel (Düren), Amersham (Freiburg).

2.2 Puffer, Lösungen und Medien

Die Standardlösungen und –puffer, sowie Nährmedien zur Kultivierung von E.coli wurden unter Verwendung von doppelt deionisiertem Wasser (ddH_2O, Wasserreinigungssytem MilliQ von Millipore, Eschborn) nach den Protokollen von Sambrook und Russel (2001) hergestellt. Die Lösungen für molekulare Arbeiten und Nährmedien wurden vor der Anwendung autoklaviert bzw. sterilisiert (0,2 μm Filter, Roth).

2.3 Verwendete Zebrafischstämme

Die verwendete Wildtyp-Linie wurde aus einem Kölner Zoofachgeschäft bezogen.

Die *hands off/hand2*-Mutante, die das *han*^{S6}-Allel trägt, stammt aus einem ENU-basierten Mutagenesescreen für Herzmutanten (Alexander et al., 1998). Die *han*^{S6}-Mutante ist durch eine ungefähr 100kb (Kilobasen) große Deletion charakerisiert, wodurch der *hands off*-Genlokus vollständig fehlt. Die Identifizierung der Mutanten erfolgte nach morphologischen Kriterien.

Die folgenden Linien wurden aus dem Labor von Matthias Hammerschmidt bezogen: *chordino/chordin, snailhouse/bmp7, tg(hsp70:bmp2b)* und *tg(hsp70:noggin3)*. Die Identifizierung der *chordino/chordin*-Mutanten (Hammerschmidt et al., 1996) und *snailhouse/bmp7*-Mutanten (Haffter et al., 1996) erfolgte nach morphologischen Kriterien. Die transgenen Linien tragen in irem Transgen ein FLAG-Tag und wurden durch die Genotypisierung mit Hilfe folgender Primer identifiziert (Chocron et al., 2007): forward primer 5′-cgcaggaaagaacatgtgagc-3′, reverse primer 5′-cgggttggactcaagacgatag-3′. Folgende PCR-Bedingungen wurden angewandt: 25 Zyklen, 55°C Annealing-Temperatur, 30s Elongationszeit. Bei Individuen, die das Transgen tragen, wird ein 500bp-Fragment amplifiziert.

2.4 Haltung und Zucht der Zebrafische

Die Haltung der Zebrafische erfolgte in einem geschlossenen Aquariumsystem der Firma Schwarz (Aquarienbau, Göttingen). Die Zebrafische wurden in einem Lichtrythmus von 14 Stunden hell zu 10 Stunden dunkel gehalten. Die Wassertemperatur wurde um 29,5°C gehalten. Das Aquarienwasser bestand aus mit Aktivkohle gereinigtem Leitungswasser und VE-Wasser in einem Verhältnis von 1:1. Der Leitwert des Wassers betrug ca. 550-600 μS/cm mit einer Gesamthärte von 17-20°dH. In regelmäßigen Abständen wurden die Konzentrationen von Nitrit und Ammonium (Sollwert: nicht nachweisbares Konzentratiosniveau), sowie von Nitrat (Sollwert: <50mg/l) überprüft und bei Bedarf den Sollwerten angepasst.

Die Zebrafische wurden mit herkömmlichem Fischtrockenfutter, sowie mit zerkleinerten Bosmidien (heimische Süßwasserkrebse) gefüttert. Aufzuchten wurden eine Woche nach der Eiablage mit frisch geschlüpften Artemienlarven gefüttert. Die Eiablage und Aufzucht erfolgte nach Westerfield (1994).

Zebrafischembryonen wurden in Zebrafischringer (1/3 ZFR) bei 29,5°C gehalten. Um eine Pigmentierung der Embryonen zu verhindern wurde für Experimente Phenylthioharnstoff (Phenylthiourea, PTU) in den Zebrafischringer in einer Endkonzentration von 0,003% hinzugegeben.

Zebrafischringer (ZFR): 115 mM NaCl
2,8 mM KCl
4,5 mM HEPES
2,4 mM $CaCl_2$ entwässert
2,4 mM $CaCl_2$ * 2x H_2O

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Fixierung und Aufbewahrung

Die Embryonen wurden mit 4%igem PFA (Paraformaldehyd) für mindestens 8h, oder Ü/N (über Nacht) bei 4°C fixiert. Vor dem Fixieren wurden die Embryonen mit Pronase (5mg/ml in Zebrafischringer, Sigma #5147) behandelt, um das Chorion enzymatisch zu entfernen. In Ausnahmefällen wurde das Chorion erst nach dem Fixieren mit Dumont-Pinzetten manuell entfernt. Bereits aus dem Chorion geschlüpfte Embryonen wurden nicht mit Pronase behandelt.

Nach dem Fixieren wurden die Embryonen 3x5min in PBT und anschließend 3x5min in 100%igem Methanol gewaschen. Die Embryonen wurden in 100%igem Methanol bei –20°C gelagert.

2.5.2 Einbetten in Durcupan und Herstellung von Mikrotomschnitten

Für die Herstellung von Mikrotomschnitten wurden in-Situ-gefärbte Embryonen in das Kunstharz Durcupan (Durcupan-ACU-Fluka, #44610) eingebettet. Die

Zusammensetzung und Herstellung von Durcupan lautet, wie folgt:

Eine Komplettpackung besteht aus den Komponenten A, B, C, D (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1 Zusammensetzungen der verschiedenen Härtegrade von Durcupan.

Härtegrad	*Komponente A Epoxydharz (ml)*	*Komponente B Härter (ml)*	*Komponente C Beschleuniger (ml)*	*Komponente D Weichmacher (ml)*
Weich	***32***	***18***	***0,8***	***0,5***
Mittel	***32***	***27***	***1***	***0,6***
Hart	***100***	***100***	***2***	***3,5***

Komponenten A und B wurden zusammengefügt und luftblasenfrei vermischt. Anschließend wurden zuerst Komponente C und danach Komponente D tropfenweise hinzugefügt und gründlich bis zur völligen Schlierenfreiheit verrührt. Das fertige Durcupan wurde in Einmal-Spritzen bei –20°C gelagert. Zum Einbetten wurde nur Durcupan mittlerer Härte verwendet.

Die Embryonen wurden zunächst mindestens 3 Stunden in 10 minütigen Waschritten in PBT gewaschen. Im Anschluss wurden die Embryonen mittels einer Alkoholreihe langsam entwässert:

o 1x 10 min in 50% Ethanol

o 1x 10 min in 70% Ethanol

o 1x 10 min in 90% Ethanol

o 2x 10 min in 100% Ethanol

Anschließend wurden die Embryonen 2x 15 min in Aceton gewaschen. Das Aceton wurde abgenommen und die Embryonen wurden Ü/N in einem Aceton/Durcupan-Gemisch (50:50) inkubiert. Die Embryonen wurden danach in frisches Durcupan

überführt, ausgerichtet und Ü/N bei 65°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen wieder auf Raumtemperatur gestellt. Die Embryonen wurden zum Schluss mit Hilfe eines Mikrotoms in 8 µm große Schnitte geschnitten und auf Objekträger verteilt. Die Schnitte wurden mit Durcupan eingebettet und Ü/N bei 65°C ausgehärtet. Am nächsten Tag wurden die Objekträger wieder auf Raumtemperatur gestellt und mit dem Mikroskop ausgewertet.

2.5.3 Whole-Mount-In-Situ-Hybridisierung

Wenn nicht anders angegeben, erfolgten die beschriebenen Schritte bei Raumtemperatur und die hinzugegebene Menge der Reagenzien betrug 1,5 ml. Unter Spülen ist das Hinzugeben einer Reagenz und das sofortige abnehmen dieser Reagenz zu verstehen.

In Methanol befindliche, fixierte Embryonen wurden 4x5min mit PBT gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen mit Proteinase K (PnK) in PBT verdünnt behandelt. Die Konzentration der PnK-Lösung und die Dauer der Behandlung hängen vom Alter der Embryonen ab (Tabelle 2.2). Der Verdau wurde durch zweimaliges Spülen in PBT gestoppt. Die Embryonen wurden dann für 20min in 4%igem PFA nachfixiert. Das PFA wurde durch 5x5min Waschen mit PBT entfernt. Die Embryonen wurden dann mit 300 µl HYB+ gespült. Schließlich erfolgte eine zweistündige Prähybridisierung in HYB+ bei 60°C. Zum Schluss wurden 50µl einer Sonde in einer Sonden-spezifischen HYB+-Verdünnung hinzugegeben (Tabelle 2.3). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (Ü/N).

Die Sonde wurde nach der Hybridisierung abpipettiert und die Embryonen 1x in HYB+ gespült. Es folgten 4 jeweils 15 minütige Waschritte bei 60°C, bei denen die Konzentration der HYB+-Lösung kontinuierlich abnimmt:

o HYB+

o HYB+/2x SSC Verhältnis 75:25

o HYB+/2x SSC Verhältnis 50:50

o HYB+/2x SSC Verhältnis 25:75

Die Embryonen wurden 1x in 2x SSC gespült. Anschließend wurden die Embryonen 2x 30 min in 0,2x SSC (+0,1% Triton) bei 60°C gewaschen. Dann wurden die Embryonen 1x in PBT gespült. Es folgten 3x10 min Waschen in PBT. Das PBT wurde abgenommen und 500 µl einer 1%igen Blocking Reagenz (Roche) hinzugegeben und für 2 Stunden inkubiert. Die Embryonen wurden nach dem Blocking für 2 Stunden in 500 µl einer Anti-Dig-Alkalische-Phosphatase-Antikörperverdünnung (Anti-Dig-AP) von 1:6000 in 1%iger Blocking-Reagenz inkubiert. Nach der Inkubation mit Anti-Dig-AP wurden die Embryonen 5x in einem Zeitraum von 30 min mit PBT gewaschen. Im Anschluss wurden die Embryonen Ü/N bei 4°C in PBT gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Embryonen 7x in 1 Stunde in PBT gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen 1x in frisch angesetztem Xpho-Puffer gespült. Es folgten 3x10min Waschen mit Xpho- Puffer. Schließlich wurden die Embryonen in 500 µl der BM-Purple-Farbreaktionslösung in Dunkelheit inkubiert. Gelegentlich wurde unter einem Binokular die Farbreaktion geprüft. Die Farbreaktion wurde durch 3x5min Waschen mit PBT gestoppt. Die Embryonen wurden dann Ü/N in 4%igem PFA nachfixiert. Nach dem Nachfixieren wurde das PFA durch 3x5min Waschen mit PBT entfernt. Schließlich wurden die Embryonen schrittweise durch 30 minütige Waschritte in Glycerol überführt:

- 50% Glycerol in PBS
- 70% Glycerol in PBS
- 90% Glycerol in PBS

Zum Schluss folgte die mikroskopische Analyse der Embryonen.

HYB+-Lösung: 50% Formamid
5X SSC
0,1% Tween20
pH-Wert mit 92µl/10ml 1M Zitronensäure auf ca. 6 einstellen.
5mg/ml Torula Yeast RNA
50µg/ml Heparin

20xSSC: 3M NaCl
0,3M NaCitrat

pH=7

Xpho-Puffer: 0,1M Tris pH9,5
50mM MgCl2
0,1% Tween20
0,1M NaCl

Proteinkinase K (PnK): 2mg/ml in PBS (Sigma, #P2308)

Tabelle 2.2 Dauer der PnK-Behandlung in Abhängigkeit des Alters der Embryonen

Stadium	Pnk-Konzentration	Dauer der Inkubation (min)
5ss	1:1000	1
13ss	1:1000	3
20ss	1:1000	4
24hpf	1:1000	6
26hpf	1:1000	8
28hpf	1:1000	10
30hpf	1:1000	30
32/33hpf	1:500	25
35hpf	1:250	10
40hpf	1:250	15
45hpf	1:250	30
48hpf	1:250	35
55hpf	1:250	45
60hpf	1:100	30
72-75hpf	1:100	60
80-120hpf	1:50	60

Tabelle 2.3 Verwendete Sonden

Sonde	Vektor	Plasmid von	Linearisiert mit	Polymerase
foxA2/axial	pBSII	Strähle et al.	DraI	T3
hand2	unbekannt	D. Yelon	BamHI	T7
hhex	pGEM-T	E. Ober	NcoI	SP6
nk2.1a	pCS2+	K. Rohr	BamHI	T7
pax2.1	pGEM-3Zf(+)	I. Mikkola	BamHI	T7
pax8	pT7 blue	Pfeffer/Bussl.	BamHI	T7
tg	pBSII-SK+	ZF stock center	NotI	T7
scl5a5	pCRII	B. Alt	NotI	SP6
cmlc2	p-GEM-T	D. Yelon	NcoI	SP6

2.5.4 Wholemount-Antikörperfärbung

Das folgende Protokoll beschreibt die Wholemount-Antikörperfärbung mit dem Antikörper MF20:

MF20 ist ein monoklonaler anti-Myosin-Antikörper, der aus der Maus gewonnen wurde (Developmental Studies Hybrodoma Bank), und bindet an die Herzmuskelzellen des Atriums und des Ventrikels. In Glycerol befindliche, In-Situ-gefärbte Embryonen wurden 10x10min mit PBT gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen in einer 10%igen H_2O_2-Lösung verdünnt in PBT inkubiert. Es folgten drei 5minütige Waschritte in PBT. Danach wurden die Embryonen in 300µl 3%igem NGS („Normal Goat Serum“, Ziegenserum, VectaStain, Linaris) für 2 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation mit NGS wurden die Embryonen in 200µl einer 1:100

verdünnten Lösung des 1. Antikörpers (MF20, verdünnt in 3%igem NGS) für 2 Stunden inkubiert. Der 1. Antikörper bindet spezifisch an MF20-Proteine und wurde aus Mäusen isoliert. Nicht gebundener 1. Antikörper wurde 10x in 3 Stunden mit PBT herausgewaschen. Anschließend wurden die Embryonen Ü/N in PBT bei 4°C gelagert.

Am Tag 2 wurden die Embryonen in 100 µl einer 1:200 verdünnten Lösung des 2. Antikörpers (biotinylierter Ziege-α-Mouse-Antikörper, Merretichperoxidase konjugiert, verdünnt in 3%igem NGS, VectaStain, Linaris). Der 2. Antikörper bindet spezifisch an die konstante Region des 1. Antikörpers. Danach wurde nicht gebundener 2. Antikörper durch 10x Waschen mit PBT in 2 Stunden herausgewaschen. Während der letzten halben Stunde des Waschens wurde das ABC-Kit nach dem Protokoll des VectaStain Elite ABC Kit (Linaris) zusammenpipettiert und für eine halbe Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Auswaschen ungebundener 2. Antikörper wurden 200 µl von der ABC-Reagenz zu den Larven gegeben und für 2 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Embryonen mehrmals mit PBT gespült und Ü/N bei 4°C gewaschen.

Am Tag 3 wurden die Embryonen in eine Multiwell-Gewebekulturschale überführt und 3x10min in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 30 min in 500µl einer 1:5 in PBS verdünnter DAB-Lösung inkubiert. Nach der Inkubation mit DAB wurden zur DAB-Lösung 1 µl 0,3%ige H_2O_2-Lösung hinzugegeben und die Färbung beobachtet. Sobald die Färbung vollständig zu sehen war, wurde die Farbreaktion durch zweimaliges Spülen in PBT gestoppt und die Embryonen wurden Ü/N in 4% PFA nachfixiert. Das PFA wurde durch 7x5min Waschen mit PBT entfernt. Schließlich wurden die Embryonen schrittweise durch 30 minütige Waschritte in Glycerol überführt:

- o 50% Glycerol in PBS
- o 70% Glycerol in PBS
- o 90% Glycerol in PBS

Es folgte die mikroskopische Analyse der Embryonen.

2.6 Mikroinjektionen von Morpholinos und mRNAs

Die Injektionen wurden ausschließlich im 1-Zellstadium vorgenommen. Die Morpholinos und die mRNAs (Tabelle 2.4) wurden mit Hilfe des Pneumatic PicoPump von WPI direkt in den Dotter der Embryonen injiziert. Die Lösungen wurden vorher in eine Borosilikatglaskapillare mit innenliegendem Filament pipettiert (Hilgenberg, #1403501). Die Kapillare hatte folgende Eigenschaften:

Filamentdurchmesser: 0,133 mm
Außendurchmesser: 1,6 mm
Wanddicke: 0,21 mm
Länge: 100 mm

Als Trägergas für die Injektionspumpe diente molekularer Stickstoff.

Tabelle 2.4 Konzentrationen der injizierten Morpholinos und mRNAs

Morpholino/mRNA	**Sequenz**	**Konzentration (ng)**
foxi1/no soul-Morpholino	5´-TAATCCGCTCTCCCTCCAGAAA-3´	2,8
casanova-Morpholino	5´-GCATCCGGTCGAGATACATGCTGTT-3´	7,6
alk8-Morpholino	5´-GATTCATGTTTGTGTTCAATTTCCG-3´	22,4
smad5-Morpholino	5´-AACAGACTAGACATGGAGGTCATAG-3´	22,8
apelin-mRNA	Nicht angegeben	0,06/0,01
*taramA**-mRNA	Nicht angegeben	0,08

2.7 Transplantationen

Für die Transplantationen wurden in die Donoren ein 1:1-Gemisch aus Tetramethylrhodamindextran (10000MW, 5mg/ml, Invitrogen) und biotinyliertes

Dextranamin (10000MW, 5mg/ml, Invitrogen) zusammen mit der *taramA**-mRNA und dem *alk8*- bzw. *smad5*-Morpholino im 1 Zellstadium injiziert. Als Kontrolle dienten Embryonen, die nur mit dem Tetramethylrhodamindextran/biotinyliertes Dextranamin-Gemisch und *taramA**-injiziert wurden. In die Akzeptoren wurde der *casanova*-Morpholino zusammen mit Phenolrot als Farbmarker injiziert. Zellen wurden im „sphere"-Stadium (1000 Zellen) isochron von den Donoren in den animalen Pol der Blastula der Akzeptoren transplantiert (David und Rosa, 2001). Für die Transplantation wurde ein Öldrucksystem (WPI) mit Borosilikatkapillaren ohne Filament verwendet (Hilberg, #). Die Steuerung der Halterung der Glaskapillare erfolgte über einen Mikromanipulator (Narishige).

Die Detektion der transplantierten Zellen erfolgte frühestens bei 24hpf visuell über ein Fluoreszensmikroskop mit angeschlossener UV-Lampe (Leica), durch das die Fluoreszenz des Tetramethylrhodamindextran angeregt wurde. Die histologische Detektion der transplantierten Zellen erfolgte über ein Biotin-Detektions-Kit von VectaStain (Linaris) nach der Fixierung und In-Situ-Färbung.

2.8 Implantationen

Die Implantationen erfolgten im Wesentlichen nach Reifers et al. (2000). Für die Implantation wurden Polystyrene Beads (Polysciences, #07314) mit einem Durchmesser von 45 *µ*m verwendet. Die Ummantelung der Polystyrene Beads erfolgte durch die Inkubation dieser Kügelchen mit in PBS gelösten Fgf1-(250*µ*g/ml; Sigma, #F5542), Fgf2-(100*µ*g/ml; Roche, #11123149001) bzw. Fgf8-Proteinen (250*µ*g/ml; R&D System, #423-F8/CF) Ü/N bei 4°C. Die Fgf-ummantelten Proteine wurden bei 4°C bis zu ihrer Verwendung, aber maximal 4 Wochen nach der Inkubation aufbewahrt.

2.9 Auswertung der Zellproliferations- und Zelltodmarker

Die Antikörperfärbung mit dem Zellproliferationsmarker α-pH3 (phosphoryliertes Histon 3; Yamauchi et al., 2006; Upstate, #06-570) erfolgte nach dem gleichen Protokoll, wie für die MF20-Antikörperfärbung. α-pH3 ist ein polyklonaler anti-Phospho-Histon-H3(Ser10)-Antikörper, der aus dem Kaninchen gewonnen wurde. Zelltod wurde mit Hilfe des TUNEL-Assays detektiert (ApopTag detection kit, alkaline phosphatase detection, Qbiogene, Eschwege/Germany).

Bisher sind keine endodermalen Marker bekannt, welche die Vorläuferzellen der Schilddrüsenanlage markieren. Fate-mapping-Experimente haben jedoch gezeigt, dass die Schilddrüsenvorläuferzellen bei 8ss auf der Ebene der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (Midbrain-hindbrain boundary, MHB) zu finden sind (Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005; Abb. 2.1). Die Auswertung der Zellproliferations- (α-pH3) und Zelltodmarker (TUNEL) erfolgte bei 22ss, zu einem Zeitpunkt, an dem die Konzentrationen der Hitzeschock-induzierten Proteine (Bmp2b bzw. Noggin3) am höchsten ist (Chocron et al., 2007). Zwischen 8ss und 22ss finden umfassende morphogenetische Prozesse statt, wodurch sich die Position der Schilddrüsenvorläuferzellen verändern kann. Um alle Schilddrüsenvorläuferzellen in die Auswertung einfließen zu lassen, wurden unter einem Stereomikroskop alle Marker-exprimierenden Zellen zwischen den Augenblasen als anteriore Grenze und dem ersten Somit als posteriore Grenze ausgezählt.

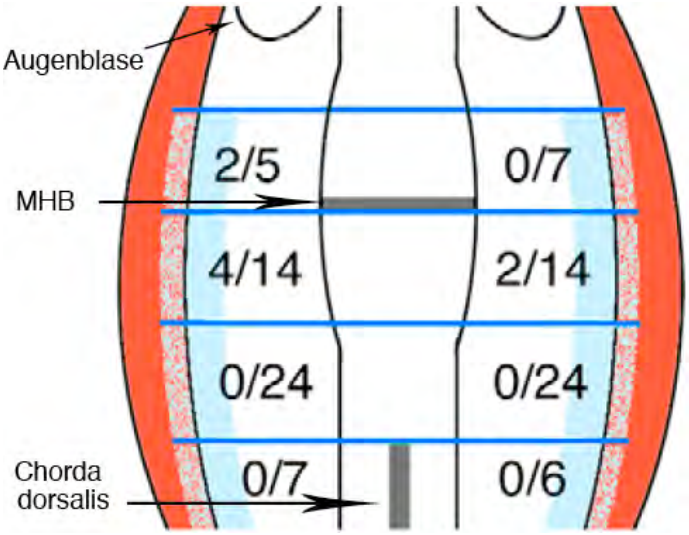

Abb. 2.1 „Fate map“ der Vorläuferzellen der Schilddrüsenanlage im Zebrafisch bei 8ss

Für das „fate mapping“ der Vorläuferzellen des Schilddrüsenprimordiums wurde der Embryo in vier Bereiche unterteilt (blaue Linien; Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005). Das „fate mapping“ erfolgte durch das Markieren endodermaler Zellen und die anschließende Auswertung, ob die markierten Zellen zu Schilddrüsenanlagenzellen werden. Die Zahlen links geben an wie viele markierte Zellen in dem jeweiligen Bereich zu Schilddrüsenanlagenzellen spezifiziert wurden im Vergleich zu den Zahlen rechts, wie viele Zellen insgesamt markiert wurden. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass sich bei 8ss die meisten Vorläuferzellen der Schilddrüsenanlage posterior zu der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze („Midbrain-hinbrain boundary“, MHB) befinden (modifiziert aus Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005).

2.10 Molekulare Methoden

2.10.1Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde ein ABI 3100-Sequencer (Applied Biosystems) mit 16 Kapillaren und einer automatischem Ladekapazität von bis zu 96 Well-Platten verwendet.

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 Programm verwendet wurde:

1. 96°C, 1min

2. 96°C, 10s

3. 52°C, 15s

4. 60°C, 4min

5. Wiederholung der Schritte 2-4 29x

6. Lagerung bei 4 °C

Plasmide wurden immer in zwei Reaktionen in gegensätzlichen Leserichtungen sequenziert. Als Primer wurden die Sequenzen von den SP6-, T3- oder T7-Promotoren benutzt.

2.10.2 Herstellung von Dig-konjugierten DNA-Sonden

1. Verdau (Linearisieren der Plasmid-DNA)

Pipettierreihenfolge für einen 50µl-Ansatz:

1. x µl nukleasefreies H_2O, um einen 50µl-Ansatz zu erreichen.

2. 5-10µg Plasmid-DNA als Template (Tabelle 2.3).

3. 5 µl enzymspezifischer 10x-Puffer.

4. 2 µl Enzym-Lösung (Restriktionsendonuklease).

Die Inkubation erfolgte zwischen 3-4 Stunden bei einer für das eingesetzte Enzym optimalen Temperatur.

2. Phenol-Chloroform-Aufreinigung der geschnittenen Plasmid-DNA.

Zum Verdau wurden 150 µl nukleasefreies H_2O hinzugegeben. Anschließend wurde eine äquivalente Menge (200 µl) Phenol zur wässrigen DNA-Lösung gegeben. Die Lösung wurde kurz geschüttelt. Das Gemisch wurde 1min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Zur wässrigen Phase wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt. Das Gemisch wurde kurz geschüttelt. Im Anschluss wurde das Gemisch 1min bei 14000rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur wässrigen Phase wurden 0,7 Vol Isopropanol und 0,1 Vol 3M Natriumacetat (pH 6,0) hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch 30s geschuütelt und 3min ruhen gelassen. Es folgte ein 30minütiger Zentrifugationsschritt bei 14000rpm. Die Isopropanol-Mischung wurde vorsichtig abgenommen, ohne das Pellet mitzunehmen. Es wurden 500 µl 70%iges Ethanol hinzugegeben. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 20min bei 14000rpm. Das Ethanol wurde vorsichtig abgezogen. Das Pellet wurde für 10min unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 5 µl nukleasefreiem H_2O gelöst.

3. In-Vitro-Transkription

Für die In-Vitro-Transkription wurde folgender 20 µl Ansatz zusammenpipettiert (generalisiert):

1. x µl nukleasefreies H_2O, um auf einen 20 µl Ansatz zu aufzufüllen

2. 2 µl 10x Puffer (Boehringer Puffer)

3. 2µl Dig-Labeling-Mix

4. 0,5-1 µg linearisierte Plasmid-DNA

5. 0,5µl RNAsin (Rnase-Inhibitor)

6. 1 µl für das Enzym und für die Transkriptionrichtung spezifische DNAabhängige RNA-Polymerase

Die In-Vitro-Transkription erfolgte für 3-4 Stunden.

4. Aufreinigung der Sonden in Filter-Säulen

Zur fertigen In-Vitro-Transkription wurden 150 µl nukleasefreies H_2O hinzugegeben. Das wässrige Sondengemisch wurde in Millipore ultrafree Säulen überführt und mit einer Tischzentrifuge die wässrige Lösung von den Sonden abzentrifugiert, bis 1-2 mm Wasserstand in der Säule erreicht worden ist. Anschließend wurden 200 µl nukleasefreies H_2O in das Säulchen gegeben und wieder bis zu einem Wasserstand von 1-2 mm zentrifugiert. Diese Prozedur wurde 3x wiederholt. Zum Schluss wurde die in der Säule verbliebene Lösung mit der Sonde nach mehrmaligem auf- und abpipettieren der Lösung in ein neues Eppendorfgefäß überführt und in 5 µl Aliquots aufgeteilt und bei –80°C gelagert.

2.10.3 In-Vitro-Transkription

Für die Herstellung gecappter mRNA wurde das MegaScrip-Kit von Ambion mit dem Zusatz von Cap-Analog von Ambion verwendet. Für die In-Vitro-Transkription wurde folgender 20 µl Ansatz zusammenpipettiert:

1. x µl nukleasefreies H_2O, 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

Die In-Vitro-Transkription wurde für 3-4 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die mRNA mit Hilfe der Miilipore ultrafree Säulen aufgereinigt und in 5µl Aliquots bei –80°C gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 Die Schilddrüse entwickelt sich unabhängig von der *hand2*-Expression in den Kiemenbögen und den Kiemenbögen-assoziierten Zellen

Untersuchungen in der *han*^{S6} -Mutante haben gezeigt, dass in dieser Mutante das Gen für den Transkriptionsfaktor Hand2 deletiert ist (Yelon et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in *han*^{S6} -Mutanten keine Schilddrüsenanlage und keine Schilddrüsenfollikel detektierbar sind (Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005). Die Betrachtung des Expressionsmusters von Hand2 hat ergeben, dass Hand2 im Endoderm, in den Kiemenbögen, in den Kiemenbögen-assoziierten Zellen (arch assoiciated cells, ACCs) und im Herzen exprimiert ist. Da es sich bei Hand2 um einen Transkriptionsfaktor handelt, wird das Protein zellautonom in einem der *hand2*-exprimierenden Gewebe für die Schilddrüsenentwicklung benötigt. Zelltransplantationsexperimente haben gezeigt, dass die Schilddrüsenentwicklung nicht von der *hand2*-Expression im Endoderm abhängt (Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005). Um herauszufinden, in welchem anderen Gewebe Hand2 für die Schilddrüsenentwicklung benötigt wird, wurde die *hand2*-Expression nacheinander in einem der *hand2*-exprimierenden Gewebe eliminiert (Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005). Die Expression der Gene *endothelin1 (edn1)* und *tfap2a* wird für die Entwicklung der Kiemenbögen benötigt und der Knockdown dieser Gene führt zur Eliminierung der *hand2*-Expression in diesem Gewebe. Die Untersuchung der frühen Schilddrüsenentwicklung in *edn1/tfap2a*-Doppel-Morphants hat gezeigt, dass die *nk2.1a*-Expression im Bereich der Schilddrüsenanlage vorhanden ist, während die *han*^{S6}-Mutante keine endodermale *nk2.1a*-Expression aufweist. Demnach wird die *hand2*-Expression in den Kiemenbögen nicht für die endodemale *nk2.1a*-Expression benötigt. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich der Knockdown dieser Gene auf die Expression anderer schilddrüsenspezifischer Entwicklungsgene auswirkt, so dass es nicht mehr zur Entstehung einer funktionalen Schilddrüse kommt. Um dies auszuschließen, wurde in dieser Arbeit das Experiment wiederholt und die Expression des Natrium-Jod-Symporters (*slc5a5*) als Marker für die differenzierte Schilddrüse untersucht (Abb. 3.1 A, B). Die Expression dieses Markers ist in den

edn1/tfap2a-Morphants vorhanden und entspricht der Wildtyp-Expression. Demnach wird *hand2* in den Kiemenbögen für die Entwicklung einer funktionalen Schilddrüse nicht benötigt.

Aufgrund dieser Kenntnisse bleiben noch zwei *hand2*-exprimierende Zellpopulationen übrig, die für die Entwicklung der Schilddrüse nötig sein könnten: Das anteriore Lateralplattenmesoderm bzw. das Herz und die Kiemenbögen-assoziierten Zellen (arch assoiciated cells, ACCs). Guo et al. (1999) haben gezeigt, dass das *foxi1/no soul*-Gen für die Spezifizierung der Kiemenbögen-assozierten Neuronen (arch associated neurons, AANs) notwendig ist. Da vermutet wird, dass die Kiemenbögen-assozierten Neuronen und die Kiemenbögen-assoziierten Zellen Vorläufer des Glomus caroticums darstellen (Wendl et al., 2007), besteht die Möglichkeit, dass die Entwicklung beider Zellpopulationen z.T. von den gleichen Genen abhängt. Um zu testen, ob die Entwicklung der Kiemenbögen-assoziierten Zellen ebenfalls von der *foxi1*-Expression abhängt, wurde in dieser Arbeit die Foxi1-Proteinexpression mit Hilfe von Morpholinos herrunterreguliert. Der Knockdown von *foxi1* führt zu einer fehlenden *hand2*-Expression in den Kiemenbögen-assoziierten Zellen (Abb. 3.1 D). Da die *foxi1*-Morphants Schilddrüsenprimordien besitzen (Abb. 3.1 F), lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Schilddrüsenentwicklung von der *hand2*-Expression in den Kiemenbögen-assoziierten Zellen unabhängig ist. Demnach ist wahrscheinlich das anteriore Lateralplattenmesoderm bzw. das daraus entstehende Herz das *hand2*-exprimierendes Gewebe, das die Schilddrüsenentwicklung beeinflusst.

Da Hand2 nicht im Endoderm bzw. in der Schilddrüse für ihre Entwicklung benötigt wird und Hand2 als Transkriptionsfaktor zellautonom in einem benachbarten Gewebe seine Funktion ausübt, ist es wahrscheinlich, dass andere Faktoren an der Schilddrüsenentwicklung beteiligt sind, die von der Hand2-Expression in den benachbarten Geweben abhängen. Abe et al. (2002) haben anhand ihrer Arbeit an der Zahnentwicklung in Mäusen gezeigt, dass die Expression von Fgfs durch Hand2 angeschaltet wird. Es besteht daher die Möglichkeit, dass Hand2 auch in anderen Geweben die Fgf-Expression hochreguliert und so möglicherweise die Schilddrüsenentwicklung beeinflusst. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde in dieser

Arbeit als nächstes die Rolle des Fgf-Signalweges in der Schilddrüsenentwicklung untersucht.

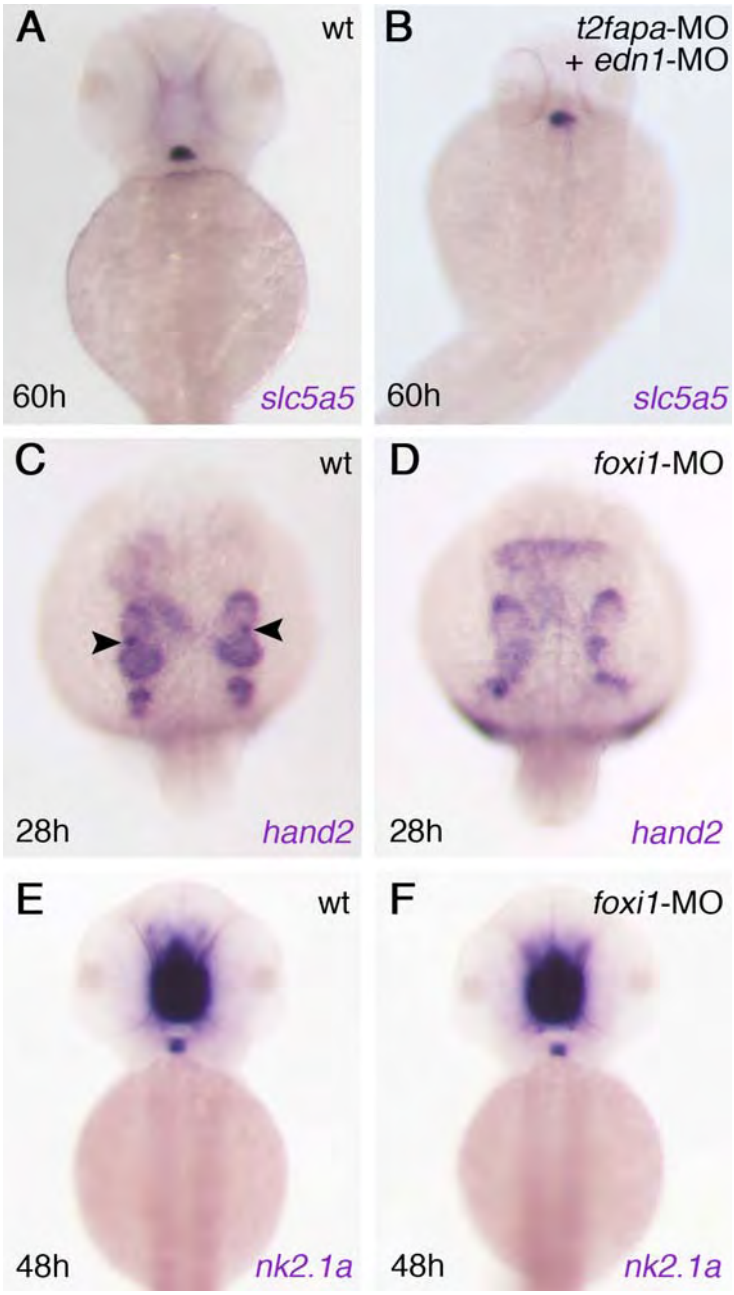

Abb. 3.1. Die Eliminierung der *hand2*-Expression in den Kiemenbögen und in den Kiemenbögen-assoziierten Zellen hat keinen Einfluss auf die Schilddrüsenentwicklung

(**A, B**) Der *edn1/tfap2a*-Doppel-Morphant zeigt eine wildtypische Expression des Differenzierungsmarkers *slc5a5*. (**C, D**) *hand2* ist im Wildtyp u.a. in den Kiemenbögen-assoziierten Zellen exprimiert (C, schwarze Pfeilspitzen). In *foxi1*-Morphants fehlt diese Expression (D). (**E, F**) *foxi1*-Morphants zeigen eine wildtypische *slc5a5*-Expression.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt.

3.2 Fgfs sind für die Schilddrüsenentwicklung notwendig

Der Transkriptionsfaktor Hand2 wird zellautonom in einem benachbarten Gewebe für die Schilddrüsenentwicklung benötigt, wobei der Einfluss auf die Schilddrüsenentwicklung möglicherweise über Fgfs erfolgt. Es ist bereits gezeigt worden, dass in der *fgf8/ace-Mutante* eine reduzierte Anzahl von Schilddrüsenfollikeln vorliegt (Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005), so dass ein Einfluss des Fgf-Signalweges auf die Schilddrüsenentwicklung vermutet werden kann.

Fgfs bilden eine große Familie von Signalmolekülen (Ornitz und Itoh, 2001; Thisse und Thisse, 2005) mit 19 bekannten Fgf-Liganden im Zebrafisch (Sprague et al., 2006; http://www.zfin.org). Die Verwendung des Fgf-Rezeptor-Blockers SU5402 (Mohammadi et al., 1997) bietet die Möglichkeit, die Signaltransduktion spezifisch für den Fgf-Signalweg über einen selbst gewählten Zeitraum zu inhibieren. Da alle Fgf-Rezeptoren blockiert werden, müssen nicht die einzelnen Fgfs untersucht werden. Ferner wird damit eine mögliche Redundanz mehrerer Fgfs umgangen.

Zur Untersuchung der Bedeutung von Fgfs während der Schilddrüsenentwicklung wurden Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien in einem Zeitfenster von zwei Stunden mit 10μM SU5402 gelöst in DMSO behandelt. Anschließend wurde die Expression des Entwicklungsmarkers *nk2.1a* bei 36 hpf und des Differenzierungsmarkers *slc5a5* bei 60 hpf untersucht, um jeweils den Einfluss von Fgfs auf die Schilddrüsenanlage bzw. die differenzierte Schilddrüse testen. Um auszuschließen, dass DMSO einen Einfluss auf die Schilddrüsenentwicklung hat, wurden zusätzlich in allen Stadien Embryonen mit einer äquivalenten Menge DMSO behandelt, wie sie in der SU5402-Lösung enthalten ist (Abb. 3.2, Tabelle 3.1). In allen Fällen hat DMSO keinen Einfluss auf die Schilddüsenentwicklung. Die Inhibition des Fgf-Signalweges vor Beginn der Expression schilddrüsenspezifischer Entwicklungsgene in den Somitogenesestadien (10-26ss) führt zu einer fehlenden Expression von *nk2.1a* und *slc5a5* in durchschnittlich 70% der Embryonen (Abb. 3.2 C, F; Tabelle 3.1). Es findet eine Inhibition der Schilddrüsenmarkerexpression in allen Zeitfenstern zwischen 10 und 26ss statt. Es ist möglich, dass die SU5402-Chemikalie nicht effizient ausgewaschen werden kann, wodurch dieses uniforme Ergebnis

entsteht. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass der Fgf-Signalweg innerhalb dieses Zeitraums für die Schilddrüsenentwicklung durchgängig benötigt wird.

Die Behandlung von Embryonen mit SU5402 zu einem späteren Zeitpunkt, z.B. bei 30hpf, wenn bereits Entwicklungsgene wie *nk2.1a* exprimiert werden, führt in durchschnittlich 20% der Embryonen zur Eliminierung der schilddrüsenspezifischen Genexpression, während 80% der Embryonen eine unveränderte Schilddrüsenentwicklung aufweisen (Abb.3.2 B, E; Tabelle 3.1). Eine Ursache hierfür kann in diesem Stadium ein geringerer Einfluss von Fgfs auf die Schilddrüsenentwicklung sein. Jedoch ist möglicherweise aufgrund einer dickeren Haut die Durchlässigkeit des Embryos für die SU5402-Chemikalie und damit die Effizienz des Fgf-Rezeptor-Blockers in den älteren Embryonen niedriger.

Es wäre vorstellbar, dass durch die Blockade des Fgf-Signalweges die frühe Endodermentwicklung so grundlegend gestört wird, dass durch das Fehlen von endodermalen Zellen kein Schilddrüsenpromordium gebildet werden kann. Frühere Experimente haben jedoch bereits gezeigt, dass das anteriore Endoderm durch die Behandlung mit SU5402 nicht beeinträchtigt wird (Diplomarbeit Dejan Adzic, 2005). Demnach ist das Fehlen der Schilddrüsenmarkerexpression nicht auf das Fehlen endodermalen Vorläuferzellen zurückzuführen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Fgf-Signalweg für die Spezifizierung (*nk2.1a*) und für die Differenzierung (*slc5a5*) der Schilddrüse notwendig ist. Ein genaues Zeitfenster für die Wirkung der Fgfs konnte jedoch nicht bestimmt werden.

Tabelle 1. Die Inhibition des Fgf-Signalweges führt zum Verlust schilddrüsenspezifischer Expressionsmarker.

nk2.1a					
Zeitfenster der SU5402-Behandlung	**Getestetes Alter**	**Gesamtzahl der Embryonen**	**Embryonen mit Schilddrüse**	**Embryonen ohne Schilddrüse**	**Embryonen mit Schilddrüse in %**
DMSO	30hpf, 48hpf	127	127	0	100
10-14ss	30hpf	20	10	10	50
12-16ss	30hpf	34	7	27	18
14-18ss	30hpf	28	12	16	44
16-20ss	30hpf	45	20	25	40
18-22ss	30hpf	39	8	31	20
20-24ss	30hpf	18	4	14	20
22-26ss	30hpf	20	2	18	10
30-34hpf	48hpf	20	17	3	85
slc5a5					
Zeitfenster der SU5402-Behandlung	**Getestetes Alter**	**Gesamtzahl der Embryonen**	**Embryonen mit Schilddrüse**	**Embryonen ohne Schilddrüse**	**Embryonen mit Schilddrüse in %**
DMSO	60hpf	118	118	0	100
10-14ss	60hpf	19	6	13	30
12-16ss	60hpf	25	9	16	30
14-18ss	60hpf	20	0	20	0
16-20ss	60hpf	40	5	35	13
18-22ss	60hpf	29	3	26	10
20-24ss	60hpf	20	9	11	45
22-26ss	60hpf	24	4	20	13
30-34hpf	60hpf	20	14	6	70

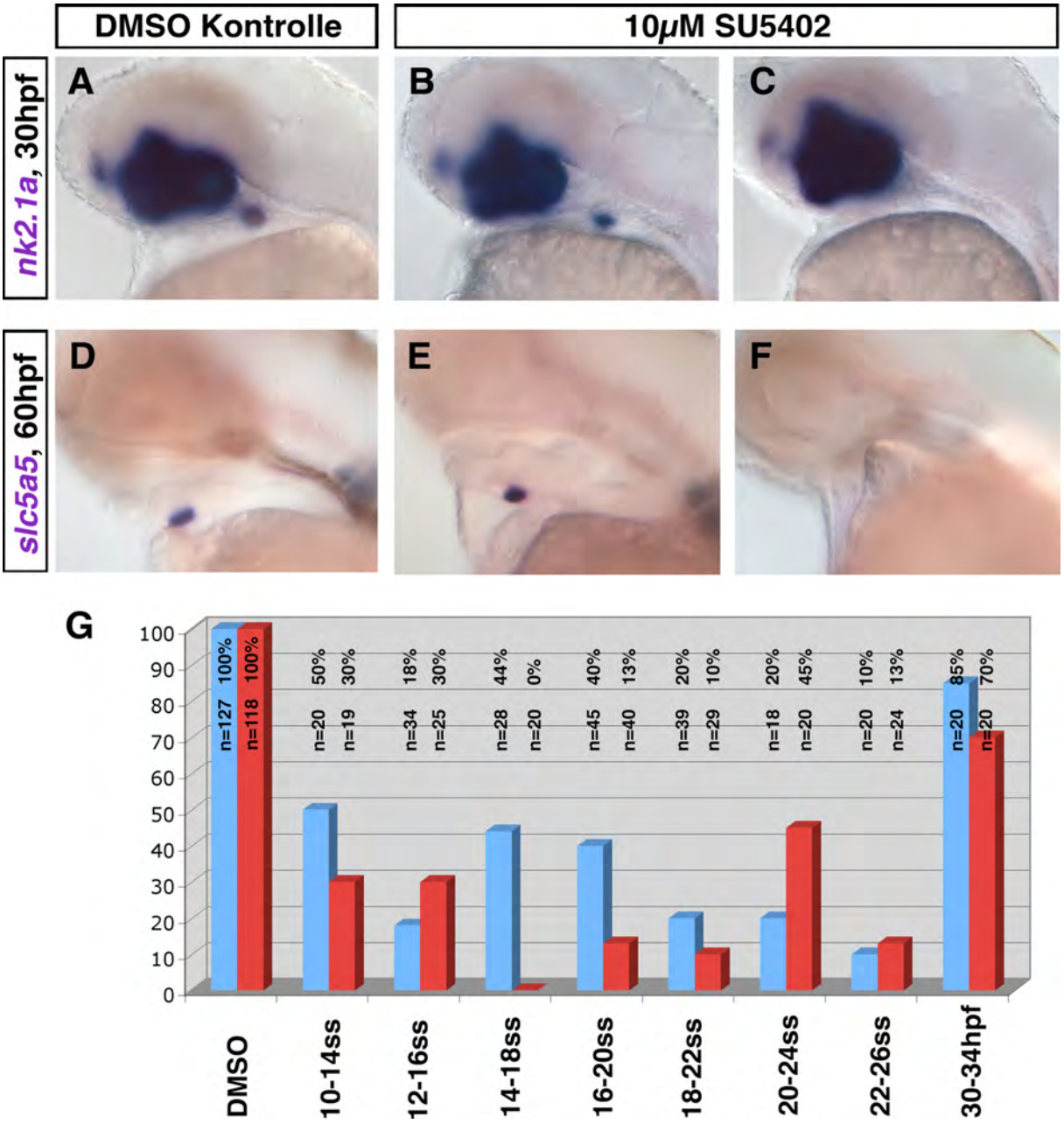

Abb. 3.2. Die Inhibition des Fgf-Signalweges verhindert die Expression schilddrüsenspezifischer Gene

(**A-F**) Die Behandlung von Embryonen mit SU5402 führt spezifisch zur Inhibition der *nk2.1a*- (C) und der *slc5a5*- Expression (F). Im Vergleich hat die DMSO-Kontrolle eine normale Schilddrüse (A, D). Bei einem Behandlungszeitraum von 30-34hpf haben SU5402-behandelte Embryonen überwiegend eine Schilddrüse (B, E).

(**G**) Das Bild zeigt die graphische Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 1. Die Prozentzahlen geben die Menge der Embryonen mit einer Schilddrüse an. Blaue Balken repräsentieren die Ergebnisse für *nk2.1a*-getestete Embryonen und rote Balken die Ergebnisse für *slc5a5*-getestete Embryonen. "n“ steht für die Zahl der für das jeweilige Entwicklungsstadium getesteten Embryonen.

3.3 Die ektopische Exposition von Fgf-Proteinen rettet die Schilddrüsenentwicklung in der *han*^{S6} -Mutante

Zusätzlich zu den SU5402-Experimenten in dieser Arbeit deuten weitere Experimente darauf hin, dass Fgfs an der Schilddrüsenentwicklung beteiligt sind und geben einen Hinweis, welche Fgfs beeinflussen könnten. FGF1 und FGF2 können im gleichen Maße wie kardiäres Mesoderm Lebermarkerexpression in endodermalen Maus-Zellkulturen induzieren (Serls et al., 2005). Zebrafisch-*ace/fgf8*-Mutanten haben eine verkleinerte Schilddrüse (Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Injektion von *fgf1*- und *fgf2*-mRNA die Schilddrüsenentwicklung in *han*^{S6} -Mutanten rettet (Diplomarbeit Dejan Adzic, 2005). Basierend auf diesen Kenntnissen wurden in weiterführenden Experimenten Kügelchen aus Polystyrol, die mit Fgf-Proteinen ummantelt waren, in unmittelbarer Nähe des Endoderms von *han*^{S6} -Embryonen implantiert, wodurch die Anzahl der Embryonen, die *nk2.1a* exprimieren, in diesen Mutanten erhöht wurde (Doktorarbeit Thomas Wendl, 2005). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Wiederherstellung der *nk2.1a*-Expression transient ist und die Schilddrüsenentwicklung nicht bis zu der Entstehung einer differenzierten Schilddrüse bestehen bleibt. Weiterhin ist es möglich, dass die Implantation der Fgf-ummantelten Kügelchen nur die *nk2.1a*-Expression und nicht die Expression anderer schilddrüsenspezifischer Entwicklungsgene wiederherstellt. In beiden Fällen würde keine differenzierte Schilddrüse entstehen. Um zu testen, ob durch die Implantation von Fgf-Beads auch die Differenzierung der Schilddrüse in *han*^{S6} -Mutanten wiederhergestellt wird, wurde in dieser Arbeit das Experiment wiederholt und die implantierten *han*^{S6} -Embryonen auf den Differenzierungsmarker *slc5a5* hin untersucht.

Die Kügelchen wurden in der Nähe des Endoderms implantiert. Als Orientierungspunkt diente die Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (Midbrain-Hindbrain-Boundary, MHB). Die Implantation der Kügelchen wurde zwischen dem 14 und dem 18 Somitenstadium vorgenommen, um eine Exposition des Endoderms mit den Fgfs kurz vor der Induktion der schilddrüsenspezifischen Entwicklungsgene sicherzustellen.

Die Implantation von BSA-ummantelten Kügelchen (Kontrolle) führt im Vergleich zu den nicht implantierten *hands off*-Embryonen zu keiner erhöhten Anzahl *scl5a5*-exprimierender *han*^{S6}-Embryonen (Abb. 3.3 B-D, F, Tabelle 3.2). Die Implantation Fgf-ummantelter Kügelchen dagegen erhöht die Anzahl *slc5a5*-exprimierender *han*^{S6}-Embryonen um 23-35% (Abb. 3.3 E-F). Dabei ist der prozentuale Anteil der *han*^{S6}-Embryonen mit einer wiederhergestellten Schilddrüsenentwicklung unabhängig von der Art des verwendeten Fgfs ungefähr gleich hoch. Demnach können sich die unterschiedlichen Fgfs auf Proteinebene funktional gegenseitig ersetzen. Um die Aussagefähigkeit der Erhöhung der *slc5a5*-Expressionsrate zu überprüfen, wurde ein Signifikanztest durchgeführt (Tabelle 3.3). Dabei zeigt sich, dass die Anzahl der *slc5a5*-exprimierenden Embryonen gegenüber der nicht implantierten Kontrolle bzw. der BSA-implantierten Kontrolle signifikant höher ist. Dieses Ergebnis zeigt, dass die ektopische Exposition des Endoderms mit Fgfs die Schilddrüsenentwicklung in *han*^{S6}-Embryonen wiederherstellen kann.

Tabelle 2. Die Implantation Fgf-ummantelter Kügelchen in *han*^{S6}-Embryonen.

slc5a5				
Beads ummantelt mit	**Gesamtzahl der Embryonen**	**Embryonen mit Schilddrüse**	**Embryonen ohne Schilddrüse**	**Embryonen mit Schilddrüse in %**
han^{S6} ohne Bead	65	8	58	12
BSA	28	3	25	11
Fgf8	17	6	11	35
Fgf1	16	6	10	38
Fgf2	12	5	7	42
Fgf1+Fgf2	19	9	10	47

Tabelle 3. Signifikanztest (Chi-Quadrat-Test) bezüglich der Fgf-implantierten *han*^{S6}-Embryonen.

Kügelchen	***FGF8***	***FGF1***	***FGF2***	***FGF1+FGF2***
X^2 (Prüfgröße)	***3,99***	***4,49***	***5,03***	***8,00***
P (Signifikanzwert)	***0,046***	***0,034***	***0,024***	***0,004***

Die ermittelten Prüfgrößen und Signifikanzwerte beziehen sich auf die Normalverteilung der BSA-implantierten *han*^{S6}-Embryonen .

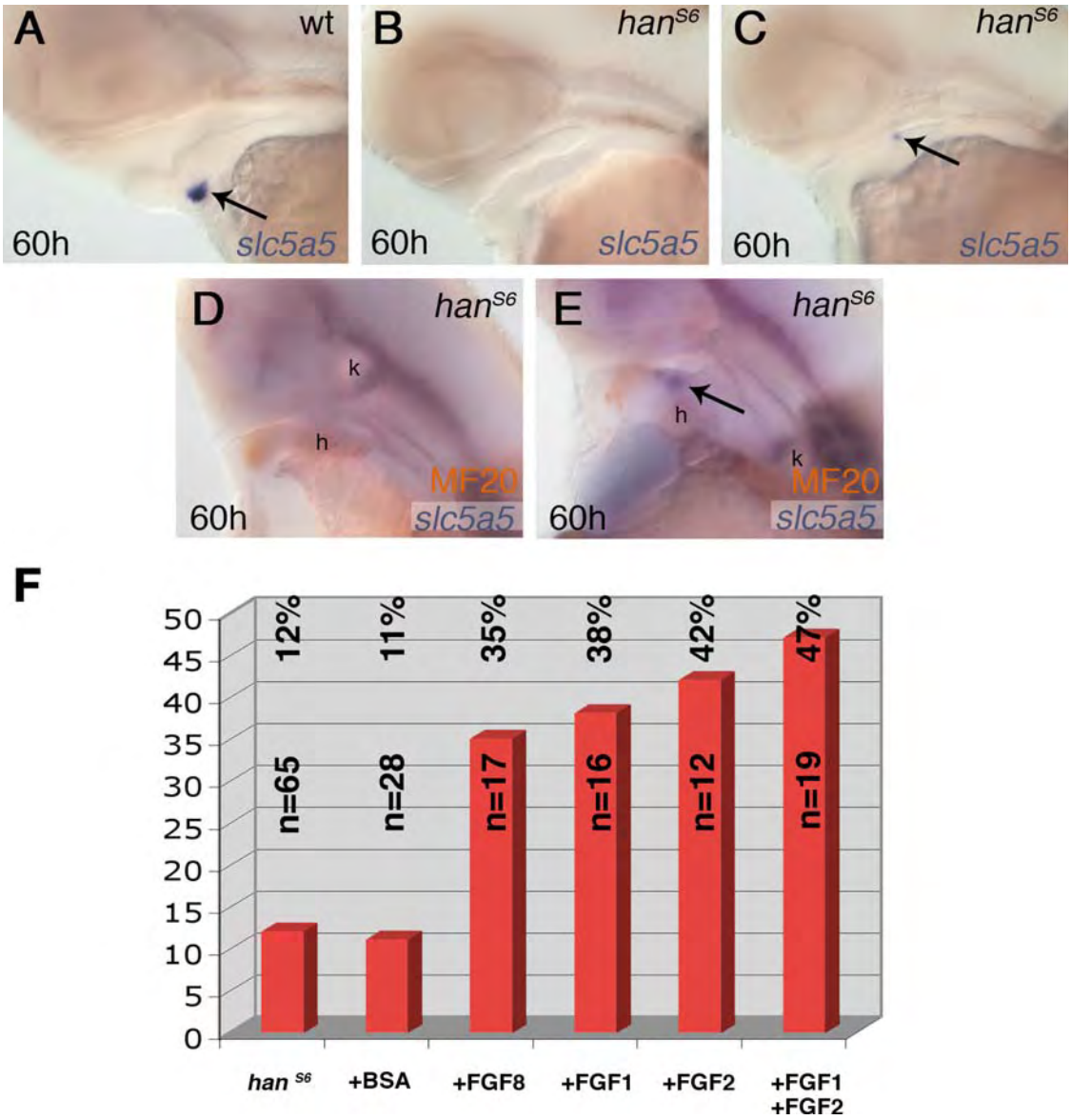

Abb. 3.3 Die Implantation von Fgf-Kügelchen stellt die Schilddrüsenentwicklung in *hands off*-Mtanten wieder her.

(**A-C**) Der Differenzierungsmarker *slc5a5* wird in der *hands off*-Mutante (B) im Vergleich zum Wildtyp (A) nicht exprimiert. Nur in wenigen Fällen ist eine kleine Expressionsdomäne in den *han*^{S6}-Mutanten vorhanden (C). (**D, E**) Die Implantation von BSA-ummantelten Kügelchen hat keinerlei Auswirkungen auf die Schilddrüsenentwicklung in *han*^{S6}-Mutanten (D). Im Gegensatz dazu wird die Anzahl der *slc5a5*-exprimierenden *han*^{S6}-Mutanten bei der Implantation Fgf-ummantelter Kügelchen erhöht (E). Für die Identifizierung der *han*^{S6}-Mutanten wurden die Embryonen zusätzlich einer MF20-Antikörperfärbung unterzogen. (**F**) Das Diagramm zeigt eine Zusammenfassung der in Tabelle 3.2 aufgeführten Ergebnisse. Die Prozentzahlen geben die Menge der Embryonen mit einer Schilddrüse an. "n“ steht für die Zahl der für die jeweiligen ummantelten Kügelchen getesteten Embryonen.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. k=Kügelchen; h= Herz. Der Pfeil markiert die Schilddrüse.

3.4 Bmps sind für die Schilddrüsenentwicklung notwendig

Der Bmp-Signalweg ist an der Entwicklung des Endoderms und seiner Derivate beteiligt (Tiso et al., 2002). Einige Daten geben Hinweise darauf, dass Bmps auch die Schilddrüsenentwicklung beeinflussen könnten. Untersuchungen an der Leberentwicklung in Hühnern haben gezeigt, dass Bmp2 eine ektopische *hhex*-Expression anterior und lateral zu der endogenen leberspezifischen *hhex*-Expression induzieren kann, während die Transplantation von Noggin3-exprimierenden Zellen die *hhex*-Expression inhibiert (Zhang et al., 2004). Im Einklang mit diesen Ergebnissen haben Experimente im Zebrafisch gezeigt, dass die Überexpression eines dominant negativen Bmp-Rezeptors die *hhex*-Expression in der Leber eliminiert (Shin et al., 2007). Weiterhin konnte in diesen Embryonen das Fehlen der *hhex*-Expression im Schilddrüsenprimordium beobachtet werden (X. Shin, mündliche Mitteilung). Ferner spielen Bmps eine Rolle in der anterior-posterioren Musterbildung des Endoderms (Tiso et al., 2002). Auf Basis der *her5*-Expression wurde gezeigt, dass *swirl/bmp2b*-Mutanten, in denen der Bmp-Signalweg herrunterreguliert ist, ein expandiertes anteriores Endoderm haben. Im Gegensatz dazu ist bei *chordino/chordin*-Mutanten, in denen der Bmp-Signalweg hochreguliert ist, das anteriore Endoderm reduziert. Folglich fördern Bmps die Entwicklung des posterioren Endoderms und inhibieren die Entwicklung des anterioren Endoderms, aus dem sich die Schilddrüse entwickelt.

Um eine Beteiligung von Bmps an der Schildrüsenentwicklung zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Expression von Schilddrüsenmarkern in der *snailhouse/bmp7*- bzw. in der *chordino/chordin*-Mutante geprüft, in denen der Bmp-Signalweg jeweils herunter- bzw. hochreguliert ist. Betrachtet man die frühe Schilddrüsenentwicklung anhand des Markers *nk2.1a*, so ist in der *snailhouse*-Mutante die Expression im Schilddrüsenprimordium vollständig eliminiert (55 von 55 Embryonen; Abb. 3.4 D-F). In der *chordino*-Mutante ist die Expressionsdomäne dagegen wildtypisch (17 von 25 Embryonen; nicht gezeigt) bzw. stark vergrößert (8 von 25 Embryonen; Abb. 3.4 G-I, schwarze Pfeile). Die Untersuchung des Differenzierungsmarkers *thyroglobulin* zeigt, dass die Herrunterregulierung des Bmp-Signalweges in der *snailhouse*-Mutante zur Eliminierung der diferenzierten Schilddrüse führt (18 von 18 Embryonen; Abb. 3.5 D-F). Im Gegensatz dazu ist bei

der Hochregulierung in den chordino-Mutanten die *thyroglobulin*-Expression wildtypisch (11 von 13 Embryonen; nicht gezeigt), oder in wenigen Fällen vergrößert (2 von 13 Embryonen; Abb. 3.5 G-I, schwarzer Pfeil).

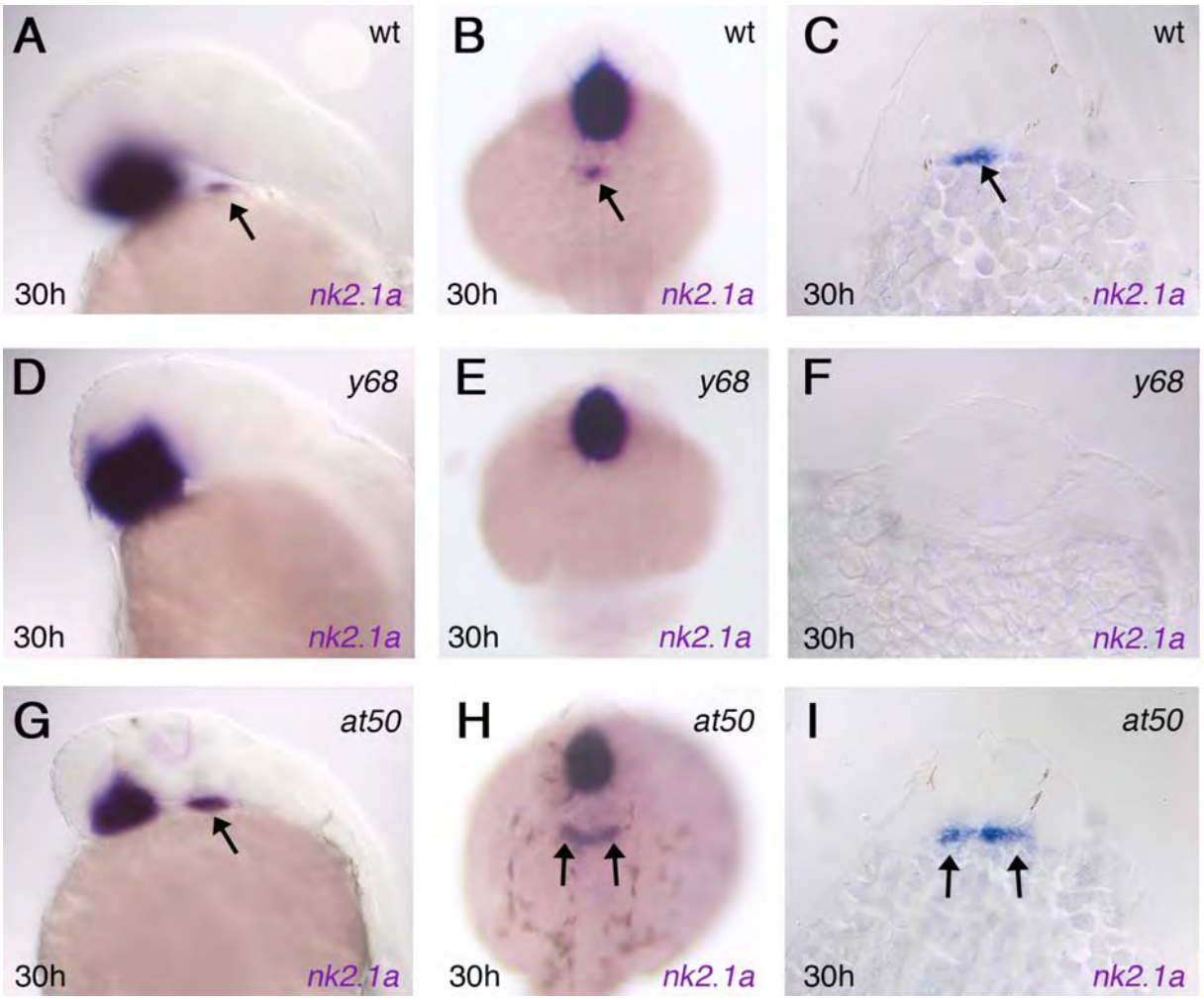

Abb. 3.4 Die schilddrüsenspezifische *nk2.1a*-Expression ist in Mutanten des Bmp-Signalweges verändert.

(**A-C**) Die *nk2.1a*-Expression im Wildtyp. Der schwarze Pfeil markiert die *nk2.1a*-Expression im Schilddrüsenprimordium. (**D-F**) Die schilddrüsenspezifische *nk2.1a*-Expression fehlt in *snailhouse/bmp7*-Mutanten. (**G-I**) Die endodermale *nk2.1a*-Expressionsdomäne ist in einigen *chordino/chordin*-Mutanten vergrößert (schwarze Pfeile).

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeile markieren die Schilddrüse.

A, D, G zeigen laterale und B, E, H dorsale Ansichten. C, F, I sind Transversalschnitte in der Ebene der Schilddrüsenanlage.

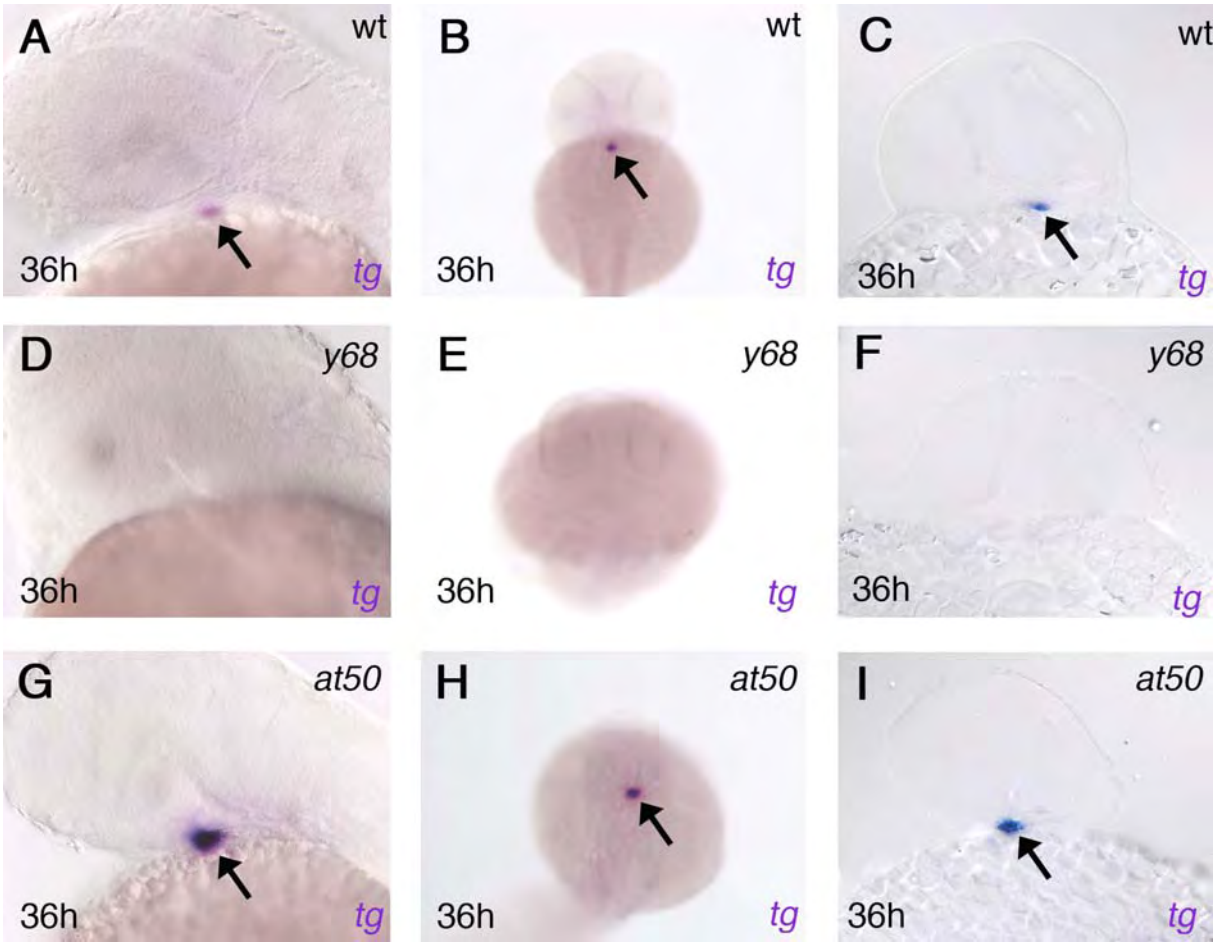

Abb.3.5 Veränderte Bmp-Konzentrationen beeinflussen die Differenzierung der Schilddrüse.

(**A-C**) Die *thyroglobulin*-Expression (*tg*) im Wildtyp. Der schwarze Pfeil zeigt die Expression in den Thyrozyten. (**D-F**) In *snailhouse/bmp7*-Mutanten fehlt die Expression des Differenzierungsmarkers *thyroglobulin*. (**G-I**) In *chordino/chordin*-Mutanten differenzieren sich mehr Zellen zu Thyrozyten.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeile markieren die Schilddrüse.

A, D, G zeigen laterale und B, E, H dorsale Ansichten. C, F, I sind Transversalschnitte in der Ebene der Schilddrüsenanlage.

Um die Entwicklung des anterioren Endoderms in diesen Mutanten weiter zu untersuchen, wurde die Expression des anterioren Endodermmarkers *foxA2/axial* untersucht. Die endodermale *foxA2*-Expression fehlt in der *snailhouse*-Mutante vollständig (16 von 16 Embryonen; Abb. 3.6 C+D), während sie in der *chordino*-Mutante kleiner erscheint, aber vorhanden ist (12 von 12 Embryonen; Abb. 3.6 E+F, schwarze Pfeilspitzen). Dieses Ergebnis steht im genauen Gegensatz zu den Daten von Tiso et al. (2002), die zeigen, dass das anteriore Endoderm in *chordino*-Mutanten reduziert ist. Dieser Widerspruch zu den publizierten Daten lässt sich dadurch erklären, dass die Herunterregulierung des Bmp-Signalweges nicht zur Expansion (auf der Ebene des Markers *her5*) bzw. Reduktion (auf der Ebene des Markers *foxA2*) des anterioren Endoderms führt, sondern vielmehr die Identität des anterioren Endoderms zu Gunsten der *her5*-Epression und auf Kosten der *foxA2*-Expression verschoben wird.

Zusammengefasst fehlt bei reduzierten Bmp-Konzentrationen das Schilddrüsenprimordium bzw. die differenzierte Schilddrüse. Dabei ist möglicherweise die fehlende Schilddrüse in den *snailhouse*-Mutanten eine Folge der fehlenden *foxA2*-Expression, die zeigt, dass Zellen des anterioren Endoderms nicht vorhanden sind. Bei erhöhten Bmp-Konzentrationen ist das Primordium vorhanden und die Differenzierung zur Schilddrüse setzt ein, wobei sowohl das Primordium als auch die Schilddrüse in einigen Fällen vergrößert sind.

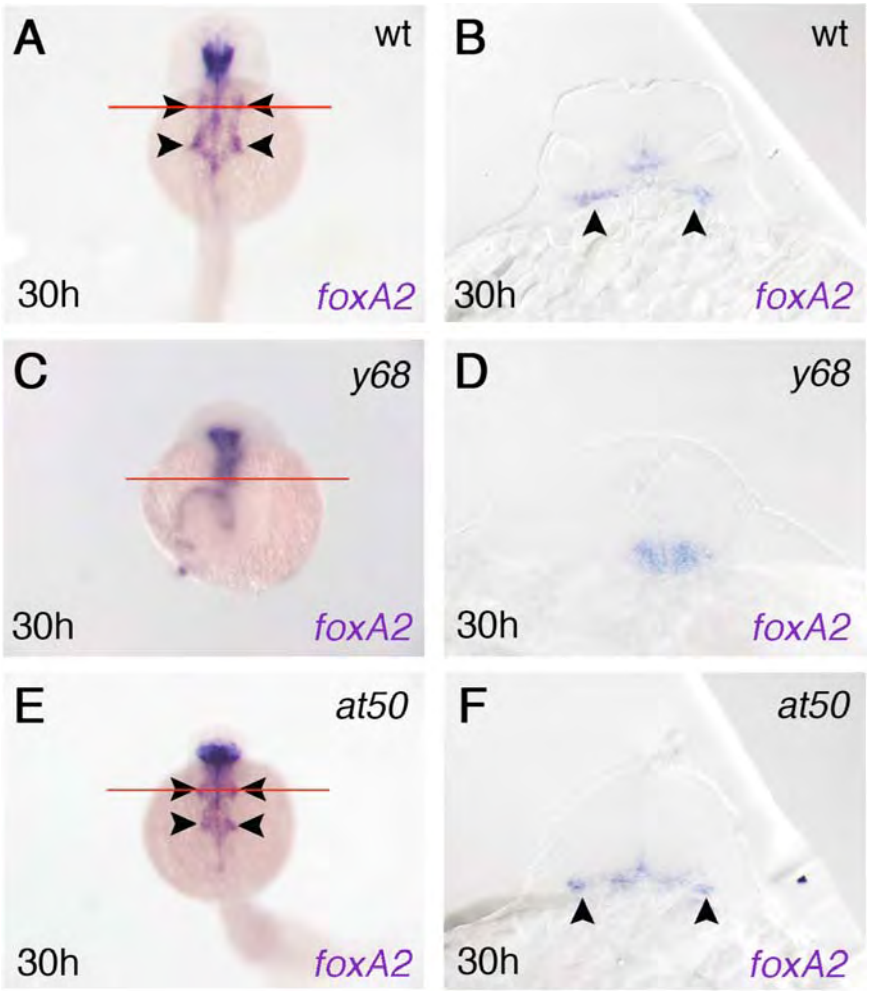

Abb. 3.6 Bmps sind an der Entwicklung des anterioren Endoderms beteiligt.

(**A, B**) Die Expression des Endodermmarkers *foxA2/axial* im Wildtyp. Das anteriore Endoderm wird durch schwarze Pfeilspitzen markiert. (**C, D**) Das anteriore Endoderm ist in *snailhouse/bmp7*-Mutanten nicht vorhanden. (**E, F**) Die endodermale Expression von *foxA2/axial* ist in *chordino/chordin*-Mutanten aufgrund morphologischer Veränderungen gedrängt, aber vorhanden (schwarze Pfeilspitzen).

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeilspitzen markieren das anteriore Endoderm.

A, C, E zeigen dorsale Ansichten. Die rote Linien zeigen die Ebene der Transversalschnitte in B, D, F.

3.5 Die Manipulation der Bmp-Konzentrationen bei 18ss beeinflusst die endodermale *nk2.1a*-Expression

Die Ergebnisse in der *snailhouse*- und in der *chordino*-Mutante haben gezeigt, dass Bmps für die Schilddrüsenentwicklung benötigt werden. Jedoch sind die jeweiligen Genfunktionen in diesen Mutanten bereits von der Befruchtung an ausgeschaltet und beeinflussen die Entwicklung des anterioren Endoderms. Möglicherweise gibt es unabhängig von den frühen Funktionen eine spätere, zweite Rolle des Bmp-Signalweges, die einen Einfluss auf die Schilddrüsenentwicklung haben könnte. Um dies zu untersuchen, wurden zwei hitzeschock-induzierbare transgene Linien verwendet, so dass der Bmp-Signalweg kurz vor dem Auftreten der ersten Schilddrüsenmarkerexpression manipulieren werden konnte. Die Linie *tg(hsp70:bmp2b)* ermöglicht durch einen induzierten Hitzeschock die ektopische Hochregulation von Bmp2b in allen Zellen, während die Linie *tg(hsp70:noggin3)* unter den gleichen Bedingungen den Bmp-Antagonisten Noggin3 hochreguliert. Es kann angenommen werden, dass die Expression des Transgens 10 Minuten nach Beginn des Hitzeschocks startet, wobei die höchsten Transkriptmengen zwischen 30 Minuten und 3 Stunden nach Hitzeschockbeginn gebildet werden (Matthias Hammerschmidt, mündliche Mitteilung). Der Hitzeschock wurde bei 18ss vorgenommen und die Auswirkung auf die frühe Schilddrüsenentwicklung anhand der *nk2.1a*-Expression bei 30 hpf untersucht. Die Hochregulation von Bmp2b führt im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.7 A-C, schwarze Pfeile) zu einer stark vergrößerten Expressionsdomäne im Endoderm (Abb. 3.7 D-F, schwarze Pfeile). Zusätzlich ist die Expressionsdomäne im Hypothalamus und in Nerven des Vorderhirns stark vergrößert (Abb. 3.7 D+E, schwarze Pfeilspitzen). Interessanterweise sind noch zusätzliche Expressionsdomänen zu sehen, die im Wildtyp bisher nicht beobachtet worden sind (Abb. 3.7 D+E, rote Pfeilspitzen). Es besteht die Möglichkeit, dass diese ektopische Expression von *nk2.1a* durch Bmp2b induziert worden ist, oder dass diese Expressionsdomänen im Wildtyp nicht detektierbar sind, jedoch bei Überexpression von Bmp2b stark vergrößert werden.

Die Überexpression von Noggin3 bei 18ss führt zur Eliminierung der *nk2.1a*-Expression im Schilddrüsenprimordium (Abb. 3.7 G-I). Die Expressionsdomäne im Hypothalamus ist dagegen wildtypisch.

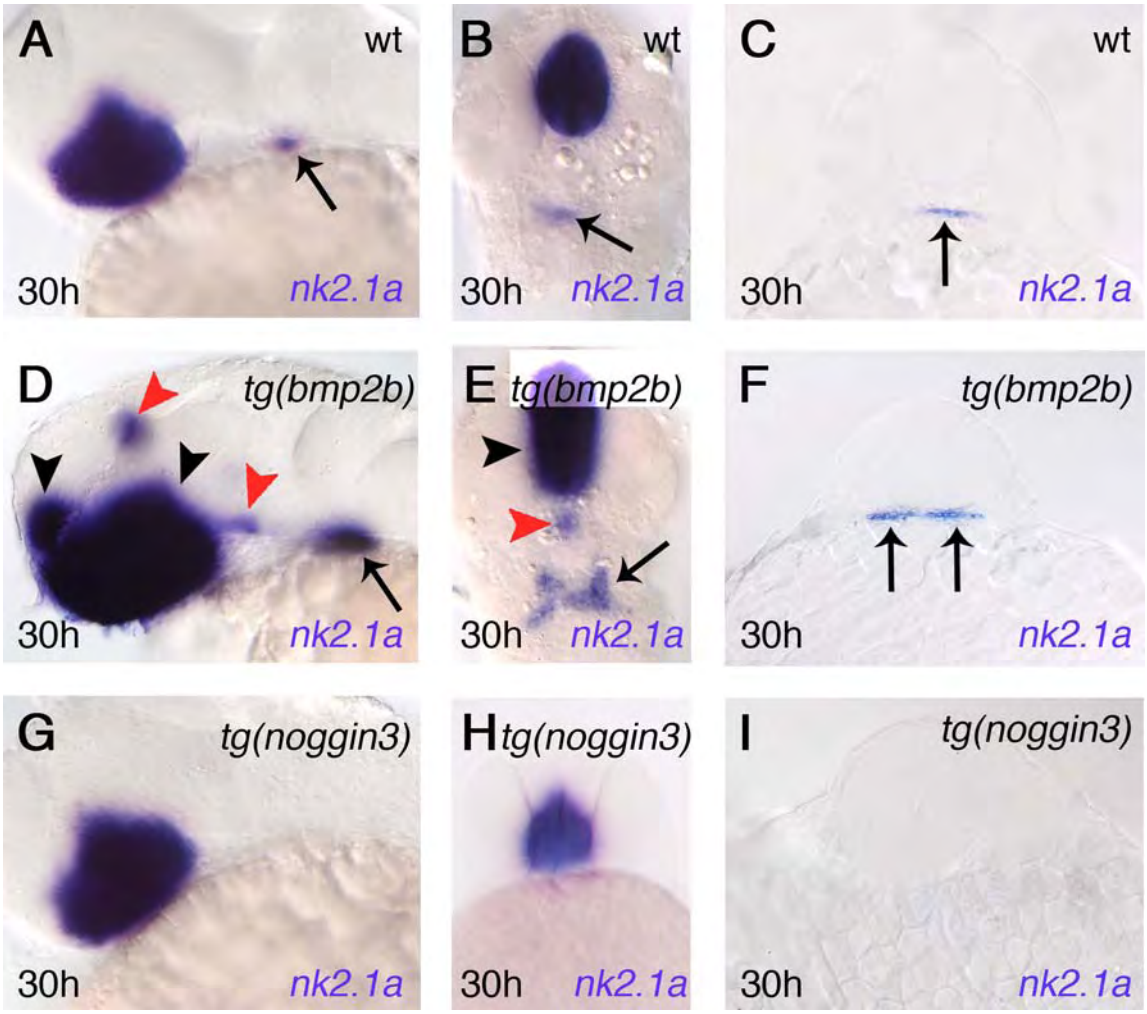

Abb. 3.7 Die Stärke der Bmp-Konzentration beeinflusst die endodermale *nk2.1a*-Expression bei 18ss.

(**A-C**) Die *nk2.1a*-Expression im Wildtyp. In wenigen Fällen ist eine Expression in Neuronen des Vorderhirns zu sehen (hier nicht zu sehen). Der schwarze Pfeil zeigt die Expression in der Schilddrüsenanlage. (**D-F**) Die Hochregulierung der Bmp-Konzentration führt zu einer Expansion der *nk2.1a*-Expression im Endoderm (schwarze Pfeile). Zusätzlich ist die Expression im Hypothalamus und in Neuronen des Vorderhirns verstärkt (schwarze Pfeilspitzen). Es tauchen weitere Expressionsdomänen auf, die im Wildtyp bisher nicht beobachtet worden sind (rote Pfeilspitzen). (**G-I**) Die Herunterregulierung der Bmp-Mengen führt zur Eliminierung der endodermalen *nk2.1a*-Expression.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeile markieren die Schilddrüse.

A, D, G zeigen laterale und B, E, H dorsale Ansichten. C, F, I sind Transversalschnitte in der Ebene der Schilddrüsenanlage.

Zwischen der Überexpression von Bmp2b bzw. Noggin3 und der Überprüfung der *nk2.1a*-Expression bei 30 hpf liegt eine relativ lange Zeitspanne von 12 Stunden. Um den Zeitpunkt der Expansion bzw. der Eliminierung der *nk2.1a*-Expression weiter einzugrenzen, wurde zusätzlich die Expression von *nk2.1a* bei 24 hpf betrachtet. Es zeigt sich, dass bereits zu diesem Stadium die *nk2.1a*-Expressionsdomäne vergrößert bzw. eliminiert ist (Abb. 3.8 A-I).

Um herauszufinden, ob die Überexpression von Bmp2b und Noggin3 die Schilddrüsenentwicklung auch in anderen Entwicklungsstadien beeinflussen, wurden danach noch weitere Hitzeschocks zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Im Allgemeinen führt die Überexpression von Bmp2b in den Somitogenesestadien (14-20ss) zu einer Expansion der *nk2.1a*-Expression in der Schilddrüsenanlage (Abb. 3.8 D-F, rote Balken und Tabelle 4). Bei der Überexpression von Bmp2b bei 25 hpf haben 50% der Embryonen ein wildtypisches Schilddrüsenprimordium, jedoch fehlt den anderen Embryonen die Schilddrüsenanlage ganz (Abb. 3.8 F, Tabelle 4). Demnach hat die Hochregulierung des Bmp-Signalweges unmittelbar nach der Induktion der Schilddrüse eine inhibierende Auswirkung auf die Expression von *nk2.1a*. Die Überexpression von Bmp2b bei 32 hpf hat keinen Effekt auf die *nk2.1a*-Expression und ist wildtypisch.

Die Herunterregulierung des Bmp-Signalweges durch die Überexpression von Noggin3 hat keinen Effekt bei 14ss (Abb. 3.8 I, Tabelle 4). Die Noggin3-Überexpression bei 16ss hat eine inhibierende Wirkung auf die *nk2.1a*-Expression bei 74% der Embryonen. Bei 18ss und 20ss fehlt die *nk2.1a*-Expression in allen Embryonen. Sogar die Überexpression nach 25 hpf blockiert die *nk2.1a*-Expression bei 100% der Embryonen. Dies zeigt, dass der Bmp-Signalweg auch nach der Induktion der Schilddrüsenanlage für ihre Entwicklung benötigt wird. Die Inhibition von Bmps bei 32 hpf führt nur noch in 33% der Fälle zu einer fehlenden *nk2.1a*-Expression in der Schilddrüse.

Die Ergebnisse zeigen folgendes Bild. Hohe Bmp-Konzentrationen vor Beginn der frühesten Schilddrüsenmarkerexpression führen zur Expansion der *nk2.1a*-Expressionsdomäne in der Schilddrüsenanlage, während die Herunterregulierung der Bmp-Konzentration in diesem Zeitraum die *nk2.1a*-Expression eliminiert. Dabei scheint der Zeitpunkt der Expansion bzw. der Eliminierung vor Beginn der *nk2.1a*-

Expression zu liegen. Nach Beginn der Schilddrüsenmarkerexpression ist der Bmp-Signalweg für den Erhalt der *nk2.1a*-Expression notwendig, jedoch inhibiert eine erhöhte Bmp-Konzentration die Entwicklung des Schilddrüsenprimordiums vor Beginn der Differenzierung. Da vermutlich Noggin3 alle Bmps antagoniert (Fürthauer et al., 1999), scheinen andere Bmps als Bmp2b für den Erhalt der Schilddrüse nötig zu sein. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, dass Bmp2b nur in sehr hohen Konzentrationen die Schilddrüsenentwicklung stört.

Tabelle 4. Vergleich der Anzahl der Embryonen mit *nk2.1a*-Expression im Bereich der Schilddrüsenanlage bei unterschiedlichen Bmp-Konzentrationen.

wt			
Zeitpunkt des Hitzeschocks	**Anzahl der Embryonen Gesamt**	**Anzahl der Embryonen mit wildtypischer *nk2.1a*-Expression**	**Anzahl der Embryonen ohne *nk2.1a*-Expression**
14ss	68	68	0
16ss	7	7	0
18ss	31	31	0
20ss	56	56	0
25hpf	71	71	0
32hpf	79	79	0
tg(hsp70:bmp2b)			
Zeitpunkt des Hitzeschocks	**Anzahl der Embryonen Gesamt**	**Anzahl der Embryonen mit wildtypischer *nk2.1a*-Expression**	**Anzahl der Embryonen ohne *nk2.1a*-Expression**
14ss	20	20 (alle mit vergrößerter Expressionsdomäne)	0
16ss	7	7 (alle mit vergrößerter Expressionsdomäne)	0
18ss	15	15 (alle mit vergrößerter Expressionsdomäne)	0
20ss	18	18 (alle mit vergrößerter Expressionsdomäne)	0
25hpf	30	15	15
32hpf	36	36	0

Fortsetzung Tabelle 4. Vergleich der Anzahl der Embryonen mit *nk2.1a*-Expression im Bereich der Schilddrüsenanlage bei unterschiedlichen Bmp-Konzentrationen.

tg(hsp70:noggin3)			
Zeitpunkt des Hitzeschocks	**Anzahl der Embryonen Gesamt**	**Anzahl der Embryonen mit wildtypischer *nk2.1a*-Expression**	**Anzahl der Embryonen ohne *nk2.1a*-Expression**
14ss	11	11	0
16ss	19	5	14
18ss	37	0	37
20ss	22	1	21
25hpf	32	0	32
32hpf	46	34	12

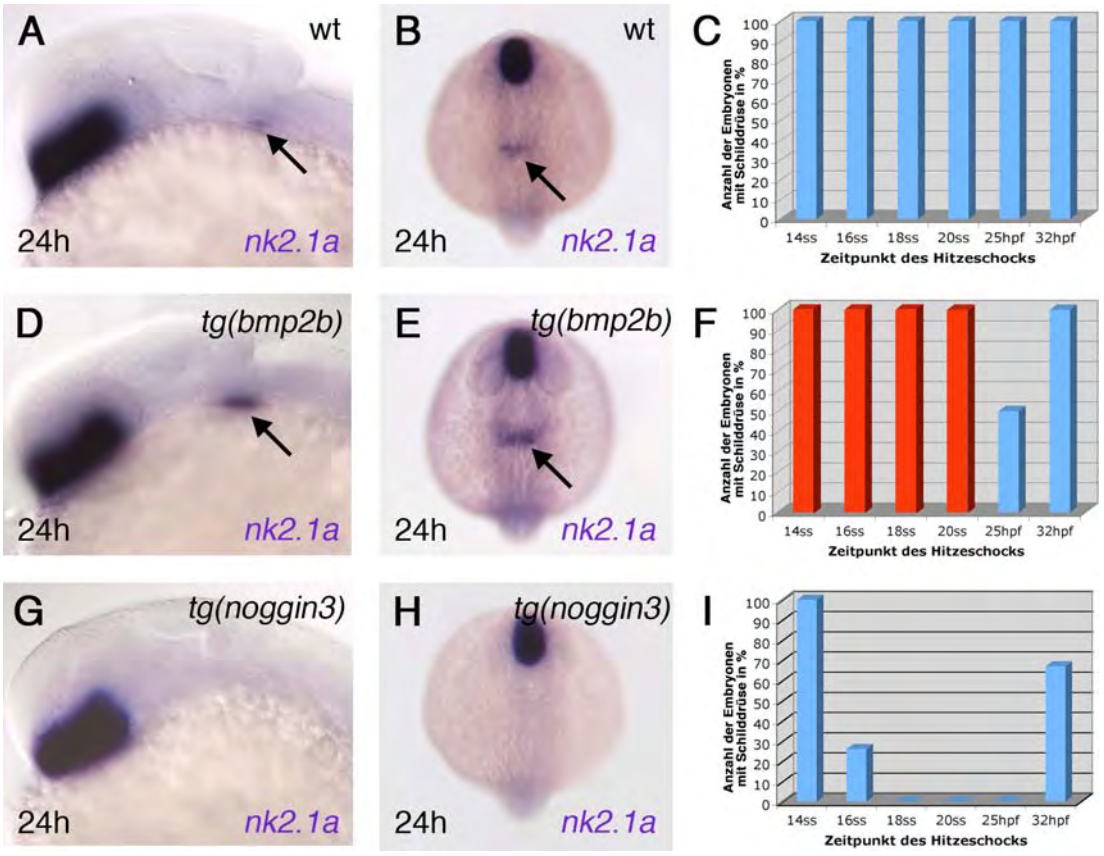

Abb. 3.8 Der Einfluss des Bmp-Signalweges auf die Schilddrüsenentwicklung in diversen Entwicklungsstadien.

(**A-C**) Bei 24hpf beginnt die endodermale *nk2.1a*-Expression (A, B; schwarzer Pfeil). Der Hitzeschock hat keinen Einfluss auf die *nk2.1a*-Expression im Wildtyp (C). (**D-F**) Die Überexpression von Bmp2b bei 18ss führt zur Vergrößerung der endodermalen *nk2.1a*-Expression bereits bei 24hpf (D, E, schwarzer Pfeil). Generell resultiert die Überexpression von Bmp2b in Somitogenesestadien in einer expandierten *nk2.1a*-Expressionsdomäne (F, rote Balken). Bei 25 hpf zeigen nur die Hälfte der Embryonen eine endodermale *nk2.1a*-Expression. Bei 32 hpf hat die Bmp2b-Überexpression keine Wirkung auf die *nk2.1a*-Expression. (**G-I**) Die Überexpression von Noggin3 bei 18ss führt zu Embryonen ohne *nk2.1a*-Expression bereits bei 24hpf (G, H).Dieser Effekt beginnt bei der Überexpression ab 16ss und verschwindet bei 32hpf (I).

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeile markieren die Schilddrüse.

A, D, G zeigen laterale und B, E, H dorsale Ansichten.

Die Balken in C, F, I zeigen den prozentualen Anteil der einem Hitzeschock unterzogenen Embryonen mit einer endodermalen *nk2.1a*-Expression. Blaue Balken repräsentieren Embryonen mit einer wildtypischen *nk2.1a*-Expression und rote Balken repräsentieren Embryonen mit einer vergrößerten *nk2.1a*-Expressionsdomäne (siehe Tabelle 4).

3.6 Der Bmp-Signalweg ist für die Entwicklung und Differenzierung der Schilddrüsenanlage notwendig

hhex, *pax2.1* und *pax8* sind wie *nk2.1a* für die frühe Schilddrüsenentwicklung notwendig (Wendl et al., 2002; Elsalini et al., 2003). Es ist anzunehmen, dass für die Spezifizierung der Schilddrüsenvorläuferzellen alle vier Transkriptionsfaktoren exprimiert sein müssen, obwohl entsprechende experimentelle Beweise noch ausstehen. Um zu testen, ob die Manipulation des Bmp-Signalweges das vollständige, bekannte Entwicklungsprogramm des Schilddrüsenprimordiums mit allen beteiligten Genfunktionen und nicht nur die *nk2.1a*-Expression beeinflusst, wurde in dieser Arbeit die Expression von *hhex*, *pax2.1* und *pax8* in Embryonen untersucht, die Bmp2b bzw. Noggin3 ab 18ss überexprimieren.

Hohe Bmp-Konzentrationen führen zu einer stark vergrößerten Expressionsdomäne von *hhex* (70 von 70 Embryonen; Abb. 3.9 D-F, schwarze Pfeile), *pax2.1* (19 von 19 Embryonen; Abb. 3.10 C+D, schwarze Pfeile) und *pax8* (34 von 34 Embryonen; Abb. 3.11 D-F, schwarze Pfeile) im Bereich des Schilddrüsenprimordiums. Umgekehrt führt die Abschwächung der Bmp-Konzentrationen zu einer verkleinerten endodermalen Expressionsdomäne von *hhex* (14 von 38 Embryonen; Abb. 3.9 G-I) bzw. zu keiner sichtbaren Expression von *hhex* (24 von 38 Embryonen; Abb. 3.9 J-L). Die *pax2.1*-Expression in Noggin3-überexprimierenden Embryonen ist im Bereich der Schilddrüsenanlage nicht vorhanden (26 von 26 Embryonen; Abb. 3.10 E+F). Die Herunterregulation der Bmp-Konzentrationen führt zu einer reduzierten enodermalen Expressionsdomäne von *pax8* (18 von 49 Embryonen; Abb. 3.11 G-I) bzw. zu keiner sichtbaren Expression in diesem Bereich (31 von 49 Embryonen; Abb. 3.11 J-L). Obwohl die Expression von *hhex* und *pax8* im Bereich des Schilddrüsenprimordiums nicht in allen Embryonen fehlt, ist der negative Einfluss der Herrunterregulierung des Bmp-Signalweges auf die Schilddrüsenentwicklung in allen Embryonen zu sehen, da zumindest die entsprechenden Expressionsdomänen stark reduziert sind.

Bisher wurde im Zebrafisch kein gesättigter Mutagenese-Screen bezüglich der Schilddrüsenentwicklung durchgeführt. Daher besteht die Möglichkeit, dass weitere Gene als die bekannten in der frühen Entwicklung der Schilddrüse beteiligt sein können, deren Expression unabhängig vom Bmp-Signalweg reguliert wird. In diesem

Fall würde die Expansion der hier untersuchten Entwicklungsgene durch die Erhöhung der Bmp-Konzentration keine Auswirkung auf die Größe des Schilddrüsenprimordiums haben, da die Expressionsdomänen anderer Entwicklungsgene als *nk2.1a, hhex*, *pax2.1* und *pax8* nicht vergrößert würden. Um diese Hypothese zu testen, habe ich die Expression des Differenzierungsmarkers *thyroglobulin* in Bmp2b-überexprimierenden Embryonen untersucht, da für die Differenzierung die Expression aller Entwicklungsgene benötigt wird. Es zeigt sich, dass die differenzierte Schilddrüse im Vergleich zum Wildtyp vergrößert ist (22 von 22 Embryonen; Abb 3.12 D-F, schwarze Pfeile). Folglich verursacht die Überexpression von Bmp2b spezifisch die Ausdehnung des Schilddrüsenprimordiums als solches und ist nicht nur auf die Expression von *nk2.1a*, *hhex*, *pax2.1* und *pax8* beschränkt. Erwartungsgemäß hat die Inhibition des Bmp-Signalweges die Eliminierung der *thyroglobulin*-Expression zur Folge (23 von 23 Embryonen; Abb. 3.12 G-I).

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Überexpression von Bmp2b zu einer vergrößerten Schilddrüsenanlage führt. Daraus resultierend differenzieren sich im Vergleich zum Wildtyp mehr Zellen zu Schilddrüsenzellen. Die Inhibition des Bmp-Signalweges durch die Überexpression von Noggin3 reduziert bzw. verhindert die Expression von schilddrüsenspezifischen Entwicklungs- bzw. Differenzierungsgenen.

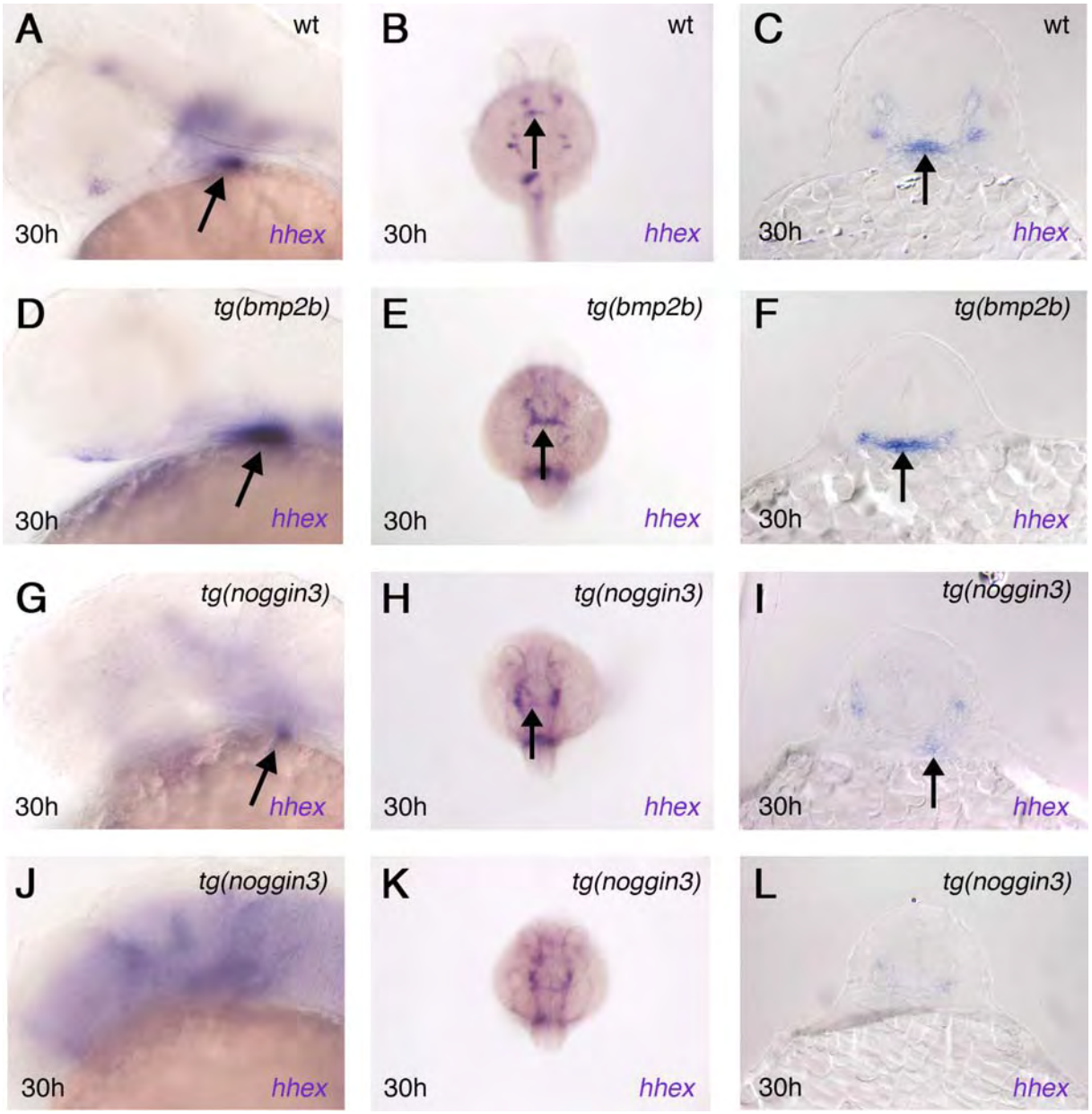

Abb.3.9 Der Einfluss von Bmps auf die schilddrüsenspezifische Expression von *hhex.*

(**A-C**) Die Pfeile zeigen auf die wildtypische *hhex*-Expression im Bereich des Schilddrüsenprimordiums. (**D-F**) Die *hhex*-Expression ist im Bereich der Schilddrüsenanlage bei der Überexpression von Bmp2b stark vergrößert (schwarze Pfeile). (**G-L**) Die Herunterregulierung des Bmp-Signalweges führt zur Reduzierung (G-I) bzw. Eliminierung (J-L) der schilddrüsenspezifischen *hhex*-Expression.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeile markieren die Schilddrüse.

A, D, G, J zeigen laterale und B, E, H, K dorsale Ansichten. C, F, I, L sind Transversalschnitte in der Ebene der Schilddrüsenanlage.

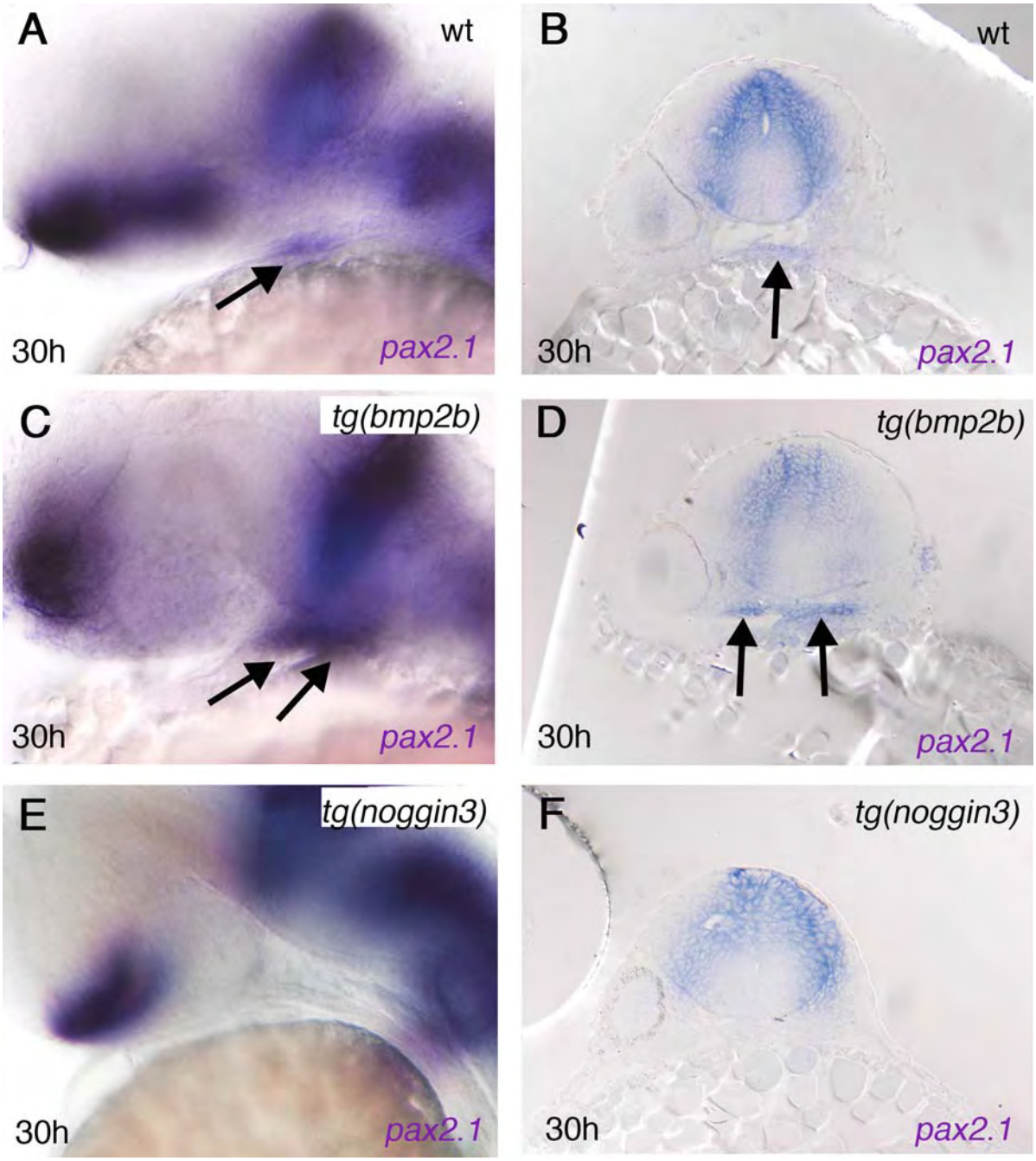

Abb.3.10 Der Einfluss von Bmps auf die schilddrüsenspezifische Expression von *pax2.1.*

(**A+B**) Die Pfeile zeigen auf die wildtypische *pax2.1*-Expression im Bereich des Schilddrüsenprimordiums. (**C+D**) Die *pax2.1*-Expression ist im Bereich der Schilddrüsenanlage bei der Überexpression von Bmp2b stark vergrößert (schwarze Pfeile). (**E+F**) Die Herunterregulierung des Bmp-Signalweges führt zur Eliminierung der schilddrüsenspezifischen *pax2.1*-Expression.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeile markieren die Schilddrüse.

A, C, E zeigen laterale Ansichten. B, D, F sind Transversalschnitte in der Ebene der Schilddrüsenanlage.

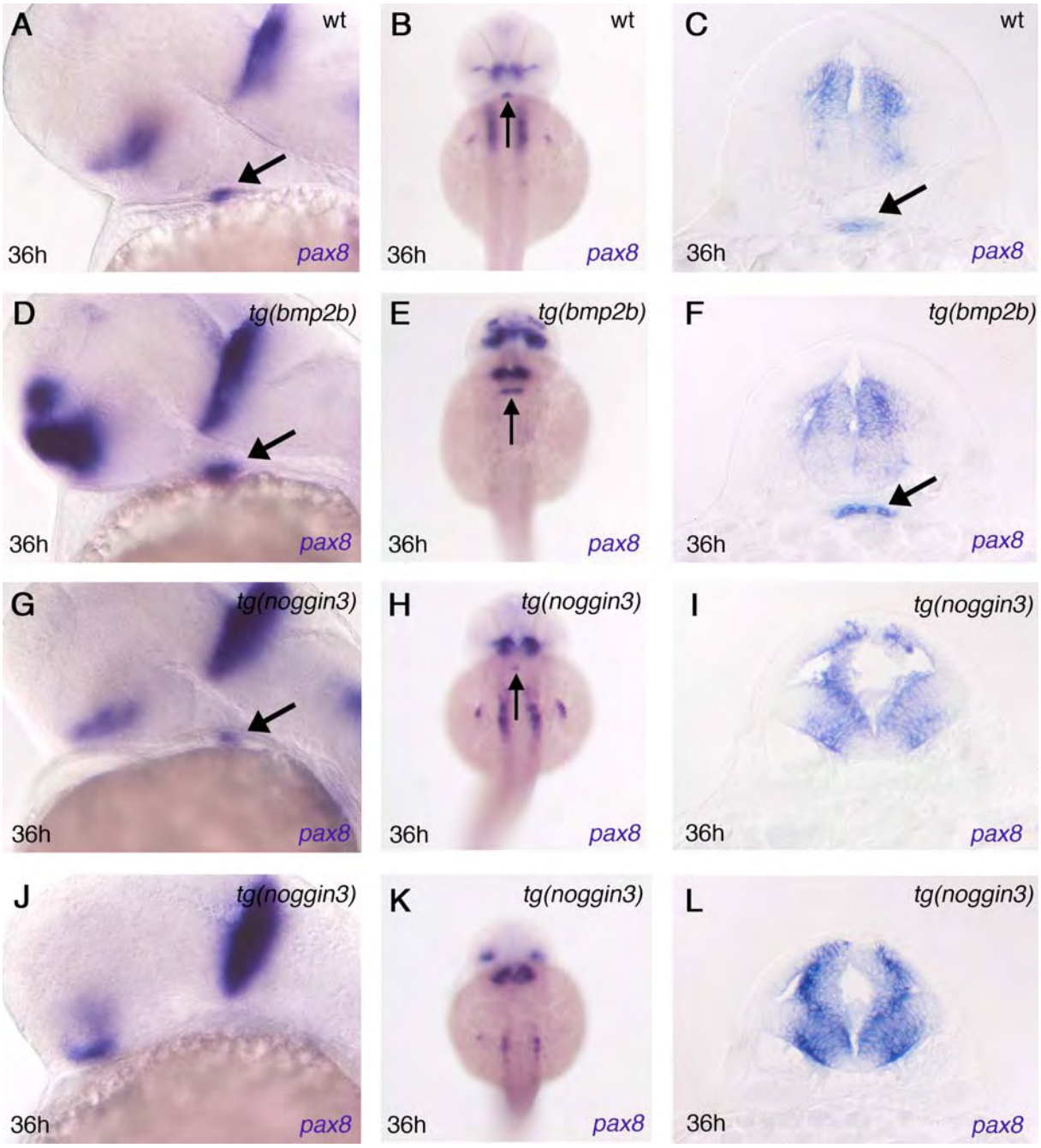

Abb.3.11 Der Einfluss von Bmps auf die schilddrüsenspezifische Expression von *pax8.*

(**A-C**) Die Pfeile zeigen auf die wildtypische *pax8*-Expression im Bereich des Schilddrüsenprimordiums. (**D-F**) Die *pax8*-Expression ist im Bereich der Schilddrüsenanlage bei der Überexpression von Bmp2b stark vergrößert (schwarze Pfeile). (**G-L**) Die Herunterregulierung des Bmp-Signalweges führt zur Reduzierung (G-I) bzw. Eliminierung (J-K) der schilddrüsenspezifischen *pax8*-Expression. Die reduzierte *pax8*-Expression ist im Transversalschnitt nicht sichtbar (I).

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeile markieren die Schilddrüse.

A, D, G, J zeigen laterale und B, E, H, K dorsale Ansichten. C, F, I, L sind Transversalschnitte in der Ebene der Schilddrüsenanlage.

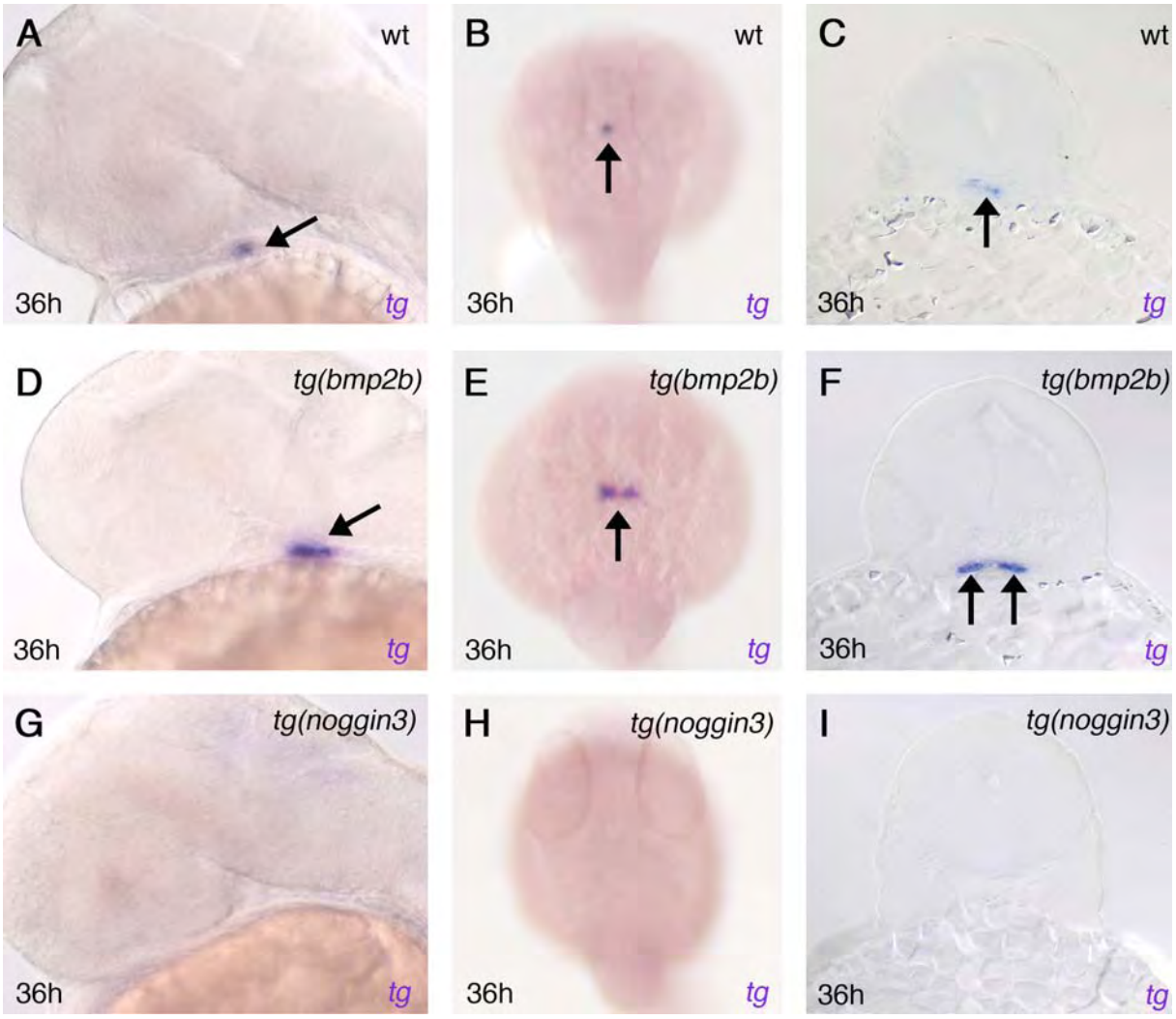

Abb.3.12 Der Einfluss von Bmps auf die schilddrüsenspezifische Expression von *thyroglobulin (tg).*

(**A-C**) Die Pfeile zeigen auf die wildtypische *tg*-Expression im Bereich des Schilddrüsenprimordiums. (**D-F**) Die *tg*-Expression ist im Bereich der Schilddrüsenanlage bei der Überexpression von Bmp2b stark vergrößert (schwarze Pfeile). (**G-I**) Die Herunterregulierung des Bmp-Signalweges führt zur

Eliminierung der *tg*-Expression.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeile markieren die Schilddrüse.

A, D, G zeigen laterale und B, E, H dorsale Ansichten. C, F, I sind Transversalschnitte in der Ebene der Schilddrüsenanlage.

3.7 Das anteriore Endoderm und die Zellproliferationsrate werden durch veränderte Bmp-Konzentrationen nicht beeinflusst.

Obwohl die Manipulation des Bmp-Signalweges die Schilddrüsenentwicklung beeinflusst, ist eine Aussage über die Funktion des Bmp-Signalweges in der Schilddrüsenentwicklung nicht möglich. Es besteht die Möglichkeit, dass die Herunteregulierung des Bmp-Signalweges die Eliminierung des anterioren Endoderms zur Folge hat, aus dem die Schilddrüsenanlage entsteht. Umgekehrt kann die Hochregulierung der Bmp-Konzentrationen zu einer Vergrößerung des anterioren Endoderms führen, aufgrund dessen das Schilddrüsenprimordium größer wird. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass Bmps eine wachstumsfördernde Wirkung haben, wodurch bei hohen Bmp-Mengen die Proliferation der Schilddrüsenvorläuferzellen erhöht wird und bei Inhibition des Bmp-Signalweges keine Proliferation stattfindet, oder sogar der Zelltod eintritt.

Zunächst wurde der Einfluss des Bmp-Signalingweges auf das anteriore Endoderm anhand der Expression von *foxA2/axial* untersucht. Die Überexpression von Bmp2b bei 18ss resultiert in eine schwache Reduktion des anterioren Endoderms (20 von 20 Embryonen; Abb. 3.13 C+D, schwarze Pfeilspitzen). Dennoch ist das anteriore Endoderm vorhanden. Die Herunterregulierung des Bmp-Signalweges führt zu einer wildtypischen Expression von *foxA2/axial* im anterioren Endoderm (26 von 26 Embryonen; Abb. 3.13 E+F, schwarze Pfeilspitzen). Hohe Bmp-Konzentrationen haben demnach einen leicht negativen Einfluss auf die Entwicklung des anterioren Endoderms, während die Herunteregulierung der Bmp-Konzentration die Entwicklung des anterioren Endoderms nicht beeinflusst.

Es bleibt die Frage, ob die Vergrößerung der Schilddrüsenanlage aufgrund einer durch Bmps erhöhten Zellproliferation zustande kommt. Proliferierende Zellen verdoppeln im Laufe des Zellzyklus ihre genetische Information, um sie auf ihre Tochterzellen gleichmäßig zu verteilen. Eine Vorraussetzung für die DNA-Synthese ist u.a. die Phosphorylierung der Histone, um die Verpackung der DNA aufzulockern und damit den Zugang der DNA-Polymerase zu gewährleisten. Daher sind phosphorylierte Histone geeignete Marker für sich teilende Zellen. Betrachtet man den Zellproliferationsmarker α-pH3 (Antikörper gegen phoshoryliertes Histon 3) in

Bmp2b überexprimierenden Embryonen, zeigt sich, dass im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhte Zellproliferation vorliegt (Abb. 3.14 A+B, Tabelle 5). Beim Wildtyp liegt die Zahl der proliferierenden Zellen bei durchschnittlich 98 (Abb. 3.14 A, Bereich innerhalb der gestrichelten Linie, Tabelle 5), während bei Bmp2b-überexprimierenden Embryonen die Zahl der proliferierenden Zellen bei durchschnittlich 95 liegt (Abb. 3.14 B, Tabelle 5). Noggin3-überexprimierende Embryonen zeigen mit durchschnittlich 95 proliferierenden Zellen ebenfalls keine veränderte Zellproliferationsrate (Abb. 3.14 C, Tabelle 5).

Unterbleibt die Wirkung von Wachstumsfaktoren, besteht die Möglichkeit, dass Zellen die Apoptose einleiten und sterben. Die TUNEL-Methode bietet die Möglichkeit, solche apoptotischen Zellen zu färben. Dabei werden freie 3´-Hydroxylgruppen, die bei der Zersetzung der DNA durch Endonukleasen entstehen, mit markierten Nukleotiden versehen und mit einer Färbereaktion nachgewiesen. Um zu testen, ob die Überexpression von Noggin3 zum Zelltod führt, wurden die entsprechenden Embryonen mit Hilfe der TUNEL-Methode untersucht. Interessanterweise zeigen Noggin3-überexprimierende Embryonen im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen (Abb. 3.14 D+F; 220 Zellen im Wildtyp, 207 Zellen in *tg(hsp70:noggin3)*, Tabelle 6). Ebenso ist bei erhöhten Bmp-Konzentrationen keine Veränderung bezüglich der Anzahl apoptotischer Zellen zu beobachten (Abb. 3.14 E; 221 Zellen in *tg(hsp70:bmp2b)*, Tabelle 6).

Zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen: Die Vergrößerung des Schilddrüsenprimordiums in Bmp2b-überexprimierenden Embryonen ist nicht auf ein vergrößertes anteriores Endoderm zurückzuführen. Weiterhin ist die Zellproliferationsrate sowie die Anzahl der apoptotischen Zellen im Vergleich zum Wildtyp ungefähr gleich. Die Eliminierung der Schilddrüsenmarkerexpression in Noggin3-überexprimierenden Embryonen geht nicht auf fehlende Vorläufer im anterioren Endoderm zurück. Wie in Bmp2b-überexprimierenden Embryonen ist keine Veränderung in der Anzahl proliferierender bzw. apoptotischer Zellen festzstellen, wodurch das fehlende Primordium erklärt werden kann.

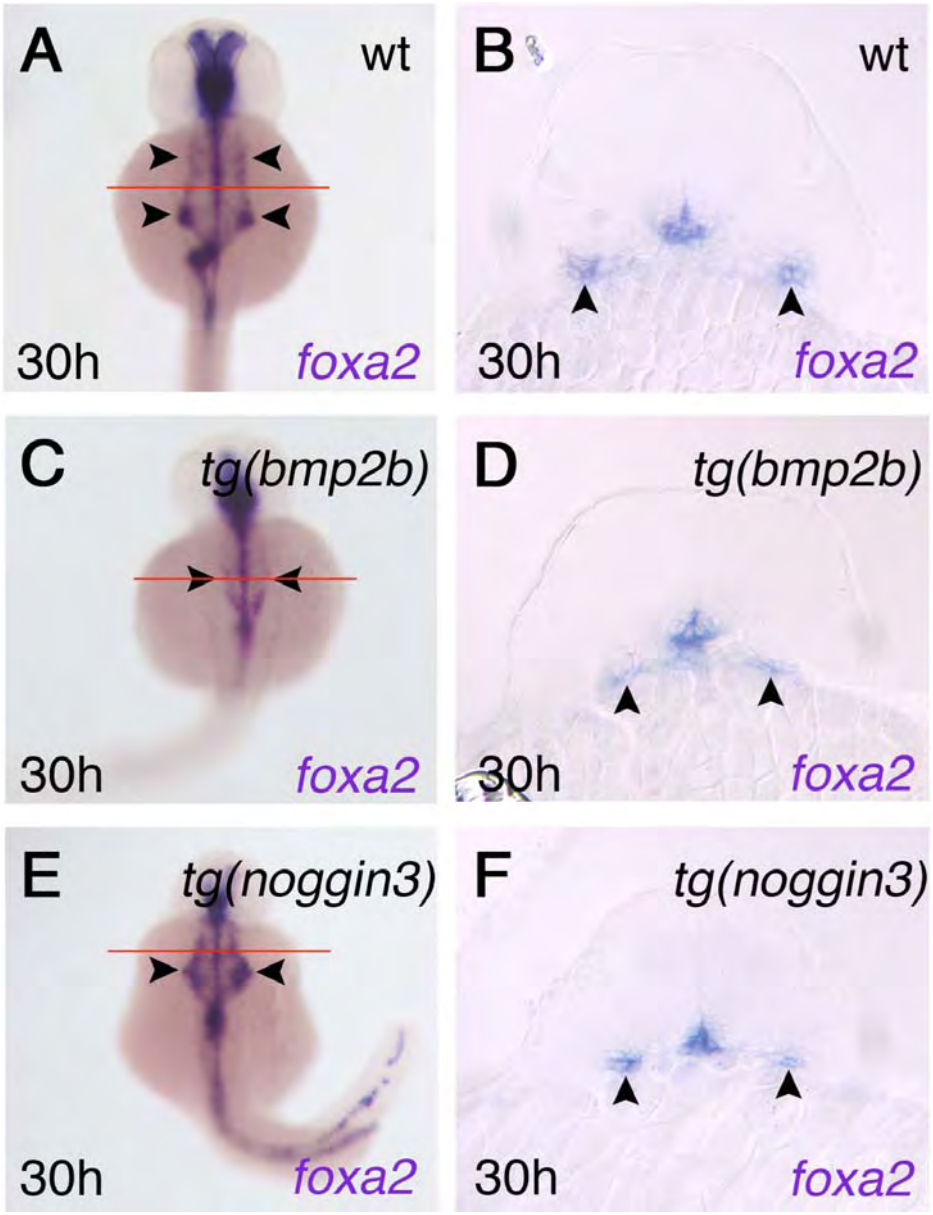

Abb. 3.13 Der Einfluss des Bmp-Signalweges auf die Schilddrüsenentwicklung ist nicht auf frühe Defekte in der Endodermentwicklung zurückzuführen.

(**A+B**) Die *axial/foxA2*-Expression im Wildtyp. (**C+D**) Das anteriore Endoderm ist in Bmp2b-überexprimierenden Embryonen leicht reduziert (schwarze Pfeilspitzen). (**E+F**) Das anteriore Endoderm ist in Noggin3-Überexprimierenden Embryonen aufgrund der veränderten Morphologie gestaucht, aber vorhanden (schwarze Pfeilspitzen).

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeilspitzen markieren das anteriore Endoderm. A, C, E zeigen laterale Ansichten. Die rote Linien zeigen die Ebene der Transversalschnitte in B, D, F.

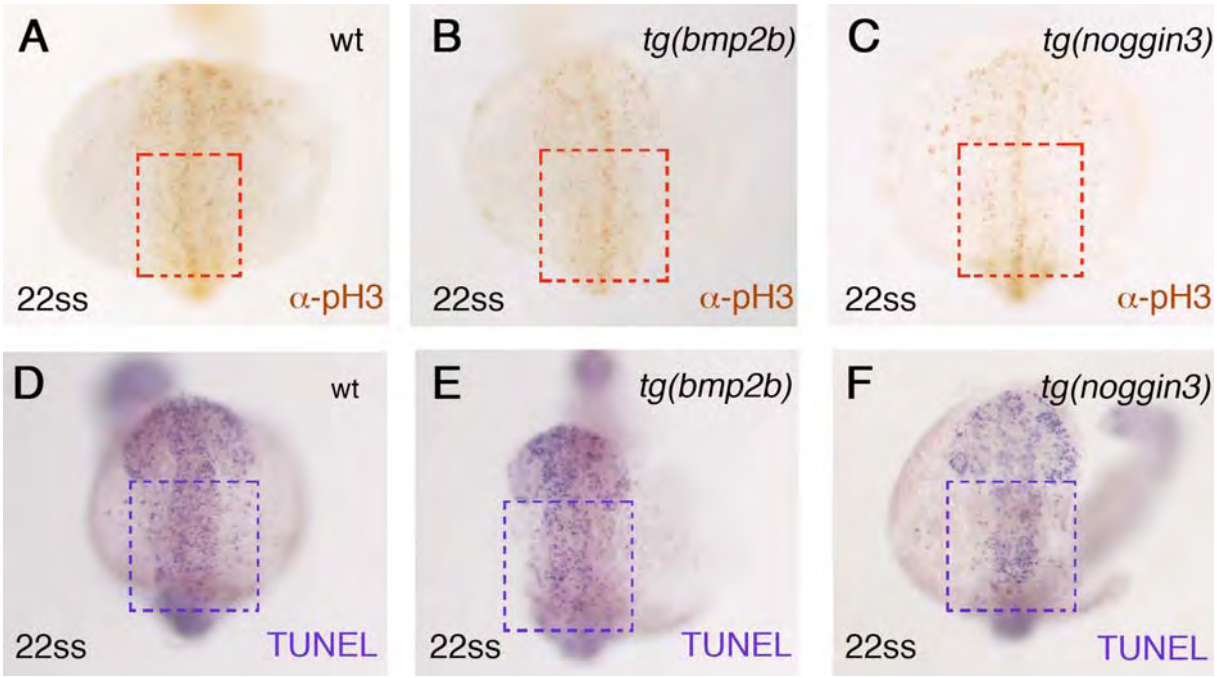

Abb. 3.14 Bmps haben keinen Einluss auf die Zellproliferationsrate und die Apoptoserate bei 18ss.

(**A-C**) Die Zellproliferation ist weder in Bmp2b-(B), noch in Noggin3-überexprimierenden (C) Embryonen im Vergleich zum Wildtyp (A) erhöht. (**D-F**) Bmp2b-(E), sowie Noggin3-überexprimierende (F) Embryonen haben gegenüber dem Wildtyp (D) keine veränderte Apoptoserate.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Zellproliferations- bzw. Apoptosemarker aufgeführt. Der Bereich innerhalb der gestrichelten Linie markiert die in die Auswertung einbezogenen Zellen. A-F zeigen dorsale Ansichten.

Tabelle 5. Anzahl der proliferierender Zellen bei unterschiedlichen Bmp-Konzentrationen

Für jeden Genotyp wurden die proliferierenden Zellen von drei Embryonen in einem definierten Bereich (Abb. 3. 14 A-C, Bereich innerhalb der gestrichelten Linie) ausgezählt.

Genotyp	Anzahl proliferierender Zellen Embryo 1	Anzahl proliferierender Zellen Embryo 2	Anzahl proliferierender Zellen Embryo 3	Durchschnitt proliferierender Zellen
wt	103	102	89	98
tg(hsp70:bmp2b)	105	93	88	95
tg(hsp70:noggin3)	101	98	85	95

Tabelle 6. Anzahl der apoptotischen Zellen bei unterschiedlichen Bmp-Konzentrationen

Für jeden Genotyp wurden die apoptotischen Zellen von drei Embryonen in einem definierten Bereich (Abb. 3. 14 D-F, Bereich innerhalb der gestrichelten Linie) ausgezählt.

Genotyp	Anzahl apoptotischer Zellen Embryo 1	Anzahl apoptotischer Zellen Embryo 2	Anzahl apoptotischer Zellen Embryo 3	Durchschnitt apoptotischer Zellen
wt	238	216	207	220
tg(hsp70:bmp2b)	241	213	210	221
tg(hsp70:noggin3)	215	208	198	207

3.8 Die Manipulation der Bmp-Konzentrationen bei 18ss hat keine Auswirkung auf die Größe des Herzfeldes

Die Herzentwicklung ist eng mit der Schilddrüsenentwicklung verknüpft (Wendl et al., 2007) und Defekte in der Herzentwicklung treten im Menschen relativ häufig in Kombination mit Schilddrüsendefekten auf (De Felice und Di Lauro, 2004). Es liegt die Vermutung nahe, dass das Herz als Quelle für Signale dient, die die Schilddrüsenentwicklung beeinflussen. Daher ist es möglich, dass die fehlende Schilddrüse in Noggin3-überexprimierenden Embryonen eine Folge fehlender Herzzellen sein kann. Umgekehrt besteht die Möglichkeit, dass die vergrößerte Schilddrüse in Bmp2b-überexprimierenden Embryonen durch ein vergrößertes Herzfeld verursacht wird. Um diese Möglichkeiten zu überprüfen wurde die Expression des Herzmuskelzellmarkers *cmlc2* (Myokard) in den entsprechenden Embryonen untersucht.

Die Überexpression von Bmp2b bei 18ss hat unmittelbar vor der Expression der ersten Schilddrüsenmarker keinen Einfluss auf die Größe des Herzens (Abb.3.15 E, F). Erst später in der Entwicklung ist zu sehen, dass das Herz etwas kleiner im Vergleich zum Wildtyp ist (Abb. 3.15 G, H). Interessanterweise ist in einigen Embryonen die Position des Herzens rechts statt wie im Wildtyp links (Abb. 3.15 G, H). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Daten von Chen et al. (1997), die gezeigt haben, dass Bmp4 im Zebrafisch die bilaterale Symmetrie des Herzens beeinflusst.

Die Überexpression von Noggin3 bei 18ss führt anfänglich zu keiner Veränderung bezüglich der Größe des Herzens (Abb. 3.15 I, J). Bei 30hpf ist das Herz gegenüber dem Wildtyp etwas verkleinert und die Morphogenese gestört (Abb. 3.15 K, L). Dies kann auf die geringere Größe und die allgemein gestörte Morphologie dieser Embryonen zurückgeführt werden.

Zusammengefasst hat die Manipulation der Bmp-Konzentrationen bei 18ss keinen Einfluss auf die Größe des Herzens im Zebrafisch. Daher kann die Vergrößerung bzw. das Fehlen der Schilddrüse nicht durch die Veränderung der Anzahl der Herzzellen erklärt werden.

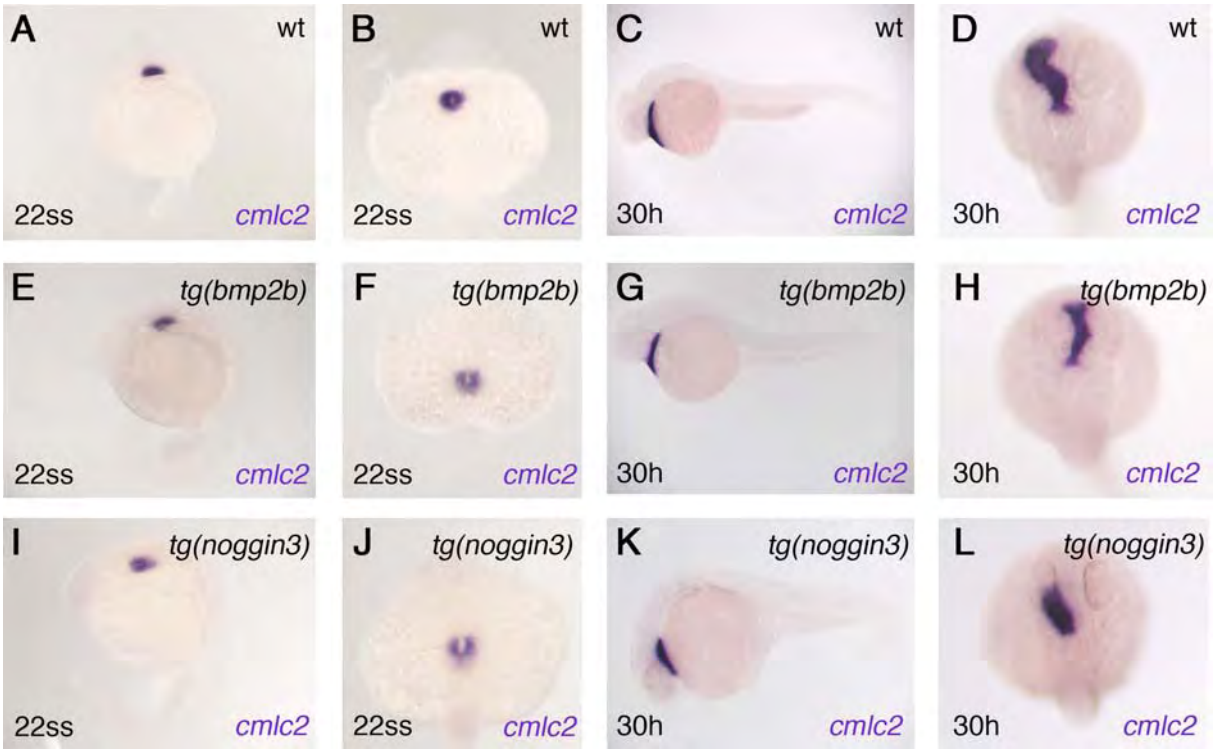

Abb. 3.15 Die Manipulation des Bmp-Signalweges hat keinen Einfluss auf die Anzahl der sich entwickelnden Herzmuskelzellen.

(**A-D**) *cmlc2*-Expression im Wildtyp, ein Marker für Herzmuskelzellen. Bei 30h hat sich das Herz auf die linke Seite verlagert (D). (**E-H**) Die Überexpression von Bmp2b hat großen keinen Einfluss auf die Anzahl der Herzellen. In einigen Fällen befindet sich das Herz auf der rechten statt auf der linken Seite (H). (**I-L**) Die Morphogenese des Herzens ist zwar in Noggin3-überexprimierenden Embryonen gestört, jedoch ist das Herz vorhanden.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. A, C, E, G, I, K zeigen laterale und B, D, F, H, J, L zeigen dorsale Ansichten.

3.9 Die Expressionsmuster von *bmp2b*, *bmp4*, *alk8* und *alk3b* machen diese Gene zu möglichen Kandidaten für eine Beteiligung an der Schilddrüsenentwicklung

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Bmps eine Rolle in der Schilddrüsenentwicklung kurz vor der Induktion des Primordiums spielen. Es stellt sich die Frage, welche Bmps in vivo diese Rolle übernehmen könnten. Nimmt man an, dass Bmps direkt an entsprechende Rezeptoren im Endoderm binden, so müssen Bmp-Rezeptoren im Endoderm in vivo exprimiert sein. Weiterhin müssen Bmp-Liganden in der Nähe des Endoderms exprimiert sein die an die entsprechenden Rezeptoren binden können. In dieser Arbeit wurden die Expressionsmuster von drei verschiedenen Bmps (*bmp2b, bmp7* und *bmp4*) und zwei verschiedenen Bmp-Rezeptoren (*alk3b* und *alk8*) in einer Reihe von Enwicklungsstadien vor, um und nach Beginn der ersten Schilddrüsenmarkerexpression untersucht.

Die Überexpression von Bmp2b bei 18ss führt zu einer Vergrößerung des Schilddrüsenprimordiums. Demnach besteht die Möglichkeit, dass Bmp2b auch im Wildtyp die Schilddrüsenentwicklung beeinflusst. Betrachtet man das Expressionsmuster von Bmp2b, so ist festzustellen, dass die mRNA in den Somitogenesestadien (nicht gezeigt) und insbesondere bei 18ss (Abb. 3.16 A, B) relativ ubiquitär in der Kopfregion exprimiert ist. Demnach ist eine Rolle von Bmp2b in der Schilddrüsenentwicklung nicht auszuschließen.

In der *snailhouse/bmp7*-Mutante fehlt zwar das anteriore Endoderm, jedoch besteht die Möglichkeit, dass *bmp7* zusätzlich zu einem späteren Zeitpunkt an der Schilddrüsenentwicklung beteiligt ist. Bei 18ss ist *bmp7* in wenigen Zellen dorsal im Kopf (Epiphyse) exprimiert (Abb.3.16 C, D; schwarze Pfeilspitze). Diese Expressionsdomäne ist sehr klein und weit von den mutmaßlichen Schilddrüsenvorläuferzellen im Endoderm entfernt. Die Wahrscheinlichkeit, dass Bmp7-Signalmoleküle zu diesem Zeitpunkt direkt an Rezeptoren der Schilddrüsenvorläuferzellen binden, ist demnach vermutlich sehr gering.

Wie bereits beschrieben deuten viele Hinweise darauf, dass das Herz oder dessen Vorläufer im anterioren Lateralplattenmesoderm die Schilddrüsenentwicklung

beeinflussen. Weiterhin ist in *han*^{S6}-Mutanten das anteriore laterale Plattenmesoderm das wahrscheinlichste Gewebe, das für die Schilddrüsenentwicklung notwendig ist. Somit ist das anteriore Lateralplattenmesoderm bzw. das Herz ein guter Kandidat für eine Quelle von Signalmolekülen, die an der Schilddrüsenentwicklung beteiligt sein könnten. Von *bmp4* ist bekannt, dass es im anterioren Lateralplattenmesoderm bzw. später im Herzen exprimiert ist (Hwang et al., 1997). Betrachtet man das Expressionsmuster von *bmp4*, so zeigt sich, dass die Position der *bmp4*-Expression und die Position der späteren Schilddrüsenmarkerexpression nahe beieinander liegen (Abb.3.16 E, F; schwarze Pfeile). Dies macht *bmp4* zu einem vielversprechenden Kandidaten für einen Faktor in der Schilddrüsenentwicklung.

Bisher sind im Zebrafisch sechs Bmp-Rezeptoren bekannt (Bmpr1a/Alk3, Bmpr1ab, Bmpr1b/alk6, Bmpr2a, Bmpr2b, Alk8; Sprague et al., 2006; http://www.zfin.org).Von Bmp2b ist bekannt, dass es zusammen mit Bmp7 den Bmp-Rezeptor Alk8 aktiviert (Bauer et al., 2001). Da möglicherweise Bmp2b ein Kandidat für ein Signalmolekül ist, dass die Schilddrüsenentwicklung beeinflusst, wurde weiterhin das Expressionsmuster von *alk8* untersucht. *alk8* ist in den Somitogenesestadien ubiquitär im gesamten Embryo exprimiert (Abb.3.16 G, H). Erst bei 24 hpf reduziert sich die Expressionsdomäne und bleibt auf den gesamten Kopf- und Rumpfbereich beschränkt (nicht gezeigt). In allen untersuchten Stadien ist *alk8* im anterioren Endoderm exprimiert. Demnach ist eine Weiterleitung von Bmp-Signalen über *alk8* in Zellen des anterioren Endoderms möglich.

Die Untersuchung des Expressionsmusters eines weiteren Bmp-Rezeptors, *alk3b*, zeigt, dass *alk3b* wie *alk8* in den Somitogenese-Stadien, sowie nach Beginn der ersten Schilddrüsenmarkerexpression durchgängig im anterioren Endoderm exprimiert ist (Abb. 3.16 I, J). Folglich ist auch hier eine durch Bmps vermittelte Signaltransduktion in Zellen des anterioren Endoderms über die Aktivierung von Alk3b möglich. Jedoch ist bisher nicht bekannt, welche Bmps Alk3b binden und aktivieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vergrößerung der Schilddrüse durch die Überexpression von Bmp2b eine Folge der Aktivierung von Bmp-Rezeptoren ,vermittelt durch Alk8 und Alk3b, im anterioren Endoderm sein kann. Weiterhin sind Bmp2b und Bmp4 mögliche Kandidaten, die eine Rolle in der

Schilddrüsenentwicklung spielen könnten. Um jedoch die Beteiligung dieser Gene an der Schilddrüsenentwicklung nachzuweisen, ist eine Herunterregulierung ihrer jeweiligen Genfunktionen nötig. Insbesondere ist dabei zu klären, ob die Genfunktion der Bmp-Rezeptoren zellautonom im Endoderm der in anderen Geweben für die Schilddrüsenentwicklung benötigt wird.

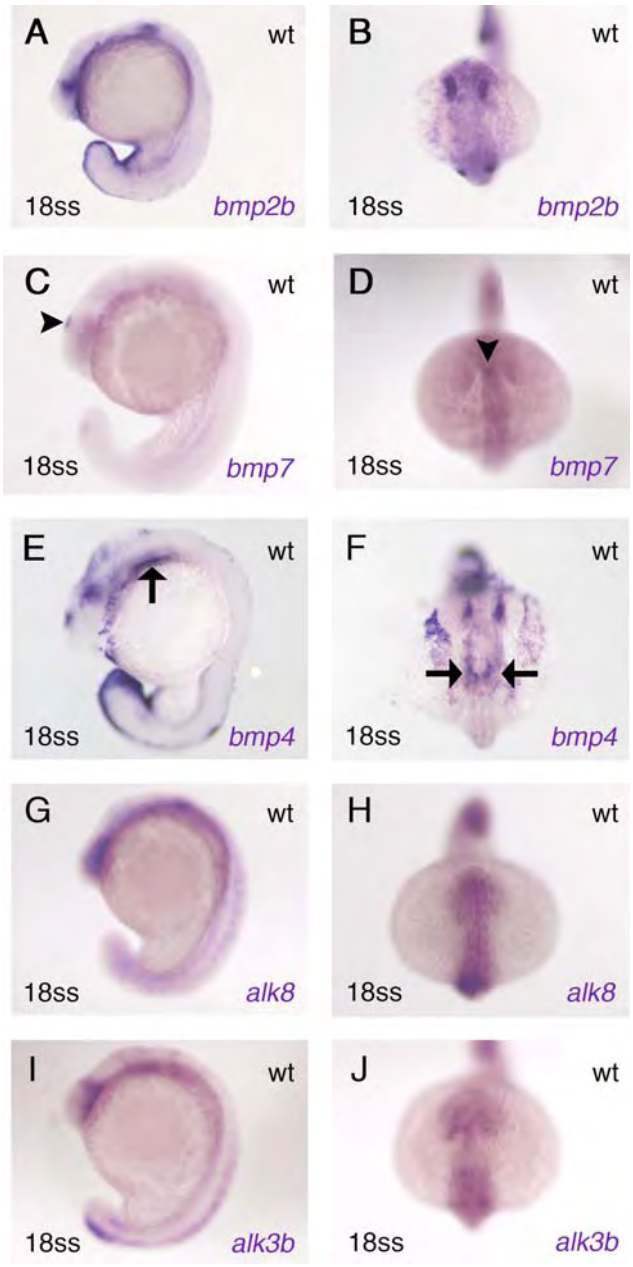

Abb. 3.16 Die Expressionsmuster von *bmp2b*, *bmp7*, *bmp4*, *alk8* und *alk3b* vor Beginn der ersten Schilddrüsenmarkerexpression.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. A, C, E, G, I zeigen laterale und B, D, F, H, J zeigen dorsale Ansichten.

Die Pfeilspitzen markieren die Epiphyse und die Pfeile das anteriore Lateralplattenmesoderm bzw. das Herz.

3.10 Der Knock-Down von Alk8 führt zum Wegfall der schilddrüsenspezifischen *nk2.1a*-Expression

Die Überexpression von Noggin3 hat gezeigt, dass der Bmp-Signalweg für die frühe Entwicklung der Schilddrüse benötigt wird. Aufgrund der ubiquitären Expression von Noggin3 ist jedoch keine Aussage darüber möglich, ob das anteriore Endoderm der Empfänger der entsprechend benötigten Bmp-Signale ist, oder ob die Eliminierung der Bmp-Signale einen indirekten Einfluss über andere, nicht-endodermale Gewebe auf die Schilddrüsenentwicklung hat. Die Generierung von genetischen Mosaiken ermöglicht die Untersuchung von zellautonomen Genfunktionen in einem gewünschten Gewebe. Es ist bereits ein System etabliert worden, in dem spezifisch im Endoderm Gene hoch- bzw. herunterreguliert werden können (David und Rosa, 2001; Stafford et al., 2004). Die Injektion von *casanova*(*cas*)-Morpholinos führt zu Embryonen, in denen jegliche endodermale Zellen fehlen und die folglich keine Schilddrüse entwickeln können (17 von 17 Embryonen, Abb. 3.17 C). Die Injektion von *taramA**-mRNA, einem konstitutiv aktiven Activin-Rezeptor, im 1-Zellstadium führt zur Entstehung von rein endodermalen Zellen. Kombiniert man *taramA** mit anderen mRNAs oder Morpholinos erhält man endodermale Zellen, in denen das Zielgen hochreguliert bzw. ausgeschaltet ist (Abb. 3.17 A). Die Transplantation solcher Zellen in *cas*-Morphants führt zu Embryonen, in denen das Endoderm ausschließlich aus transplantierten Zellen gebildet wird. Dadurch kann die Funktion eines Gens spezifisch im Endoderm untersucht werden.

Die Transplantation von nur mit *taramA**-mRNA-injizierten Zellen in *cas*-Morphants führt zu einer normalen Schilddrüsenentwicklung in 100% aller Embryonen (15 von 15 Embryonen, Abb. 3.17 D). Demnach wird in *cas*-Morphants durch die Transplantation endodermaler Zellen die Schilddrüsenentwicklung wiederhergestellt. Um herauszufinden, ob für die Schilddrüsenentwicklung die direkte Aktivierung des Bmp-Signalweges im Endoderm erforderlich ist, wurde der *alk8*-Morpholino zusammen mit *taramA**-mRNA in Embryonen im 1-Zellstadium injiziert und die sich daraus entwickelnden endodermalen Zellen in *cas*-Morphants transplantiert. Anschließend wurde die Schilddrüsenentwicklung anhand der *nk2.1a*-Expression untersucht. Es zeigt sich, dass die Herunterregulierung des Alk8-Rezeptors im Endoderm zur Eliminierung der *nk2.1a*-Expression in der Schilddrüsenanlage in 78%

der transplantierten Embryonen führt (29 von 37 Embryonen, Abb. 3.17 E). Das zeigt, dass für die Schilddrüsenentwicklung Alk8 zellautonom im Endoderm benötigt wird. Warum nicht alle Embryonen eine fehlende *nk2.1a*-Expression haben, könnte an zwei Dingen liegen: Einerseits kann die Konzentration des Morpholinos nicht hoch genug sein, so dass in einigen Fällen das Schilddrüsenprimorium immer noch da ist. Andererseits könnte es sein, dass ein anderer Bmp-Rezeptor die Rolle von Alk8 kompensieren kann.

Es wurde bereits gezeigt, dass Smad5 die Weiterleitung von Bmp-Signalen über die Aktivierung von Alk8 vermittelt. Um zu überprüfen, ob Smad5 zellautonom im Endoderm für die Schilddrüsenentwicklung benötigt wird, habe ich *smad5*-Morpholino+*taramA**-injizierte Zellen in *cas*-Morphants transplantiert. Es zeigt sich, dass die Expression von *nk2.1a* in 50% der Embryonen fehlt (8 von 16 Embryonen, nicht gezeigt). Die Penetranz des Alk8-Knockdowns wird damit nicht erreicht. Möglicherweise wird das Bmp-Signal über Smad1 und/oder Smad8 weitergeleitet und so der Knockdown von Smad5 teilweise kompensiert.

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Alk8 und Smad5 zellautonom im Endoderm für die Schilddrüsenentwicklung benötigt werden.

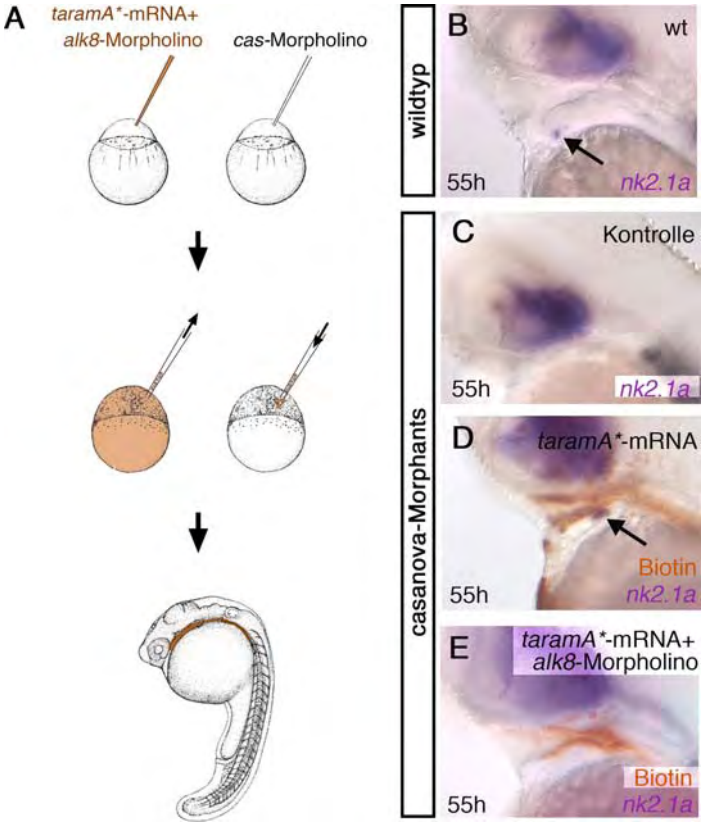

Abb. 3.17 Smad5 und Alk8 werden zellautonom im Endoderm für die *nk2.1a*-Expression im Bereich des Schilddrüsenprimordiums benötigt.

(**A**) Die Abbildung zeigt das Transplantationschema, wie die genetischen Mosaike hergestellt worden sind. Zunächst wurde *taramA**-mRNA zusammen mit dem *smad5*- bzw. dem *alk8*-Morpholino gleich nach der Befruchtung in Wildtyp-Embryonen injiziert. Aus diesen Embryonen enstehen rein endodermale Zellen, in denen Smad5 bzw. Alk8 herunterreguliert sind (Genotyp A). Gleichzeitig wurde der *casanova*-Morpholino in Wildtyp-Embryonen im 1-Zell-Stadium injiziert, die daraufhin kein Endoderm entwickeln können (Genotyp B). Vier Stunden nach der Befruchtung wurden wenige Zellen von Embryonen mit dem Genotyp A in Embryonen mit dem Genotyp B transplantiert. Es entstehen Embryonen, in deren endodermalen Zellen Smad5 bzw. Alk8 herunterreguliert sind. Alle anderen Zellen sind wildtypisch. (**B**) Die *nk2.1a* –Expression im Wildtyp. Der schwarze Pfeil markiert die Expression im Bereich des Schilddrüsenprimordiums. (**C**) *cas*-Morphants (Kontrolle) haben kein Endoderm und entwickeln daher keine Schilddrüsenanlage. In diesen Embryonen ist die *nk2.1a*-Expression im Bereich des Schilddrüsenprimordiums eliminiert. (**D**) Werden nur mit *taramA**-mRNA-injizierte Zellen in *cas*-Morphants transplantiert, wird die *nk2.1a*-Expression im Bereich der Schilddrüsenanlage gerettet (schwarzer Pfeil). (**E**) Die Transplantation von *taramA**-mRNA- und *alk8*-Morpholino-injizierten Zellen in *cas*-Morphants führt zu Embryonen ohne *nk2.1a*-Expression im Bereich des Schilddrüsenprimordiums.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Transplantierte Zellen wurden mittels der Biotindetektion markiert (braune Zellen in D und E). Die schwarzen Pfeile markieren das Schilddrüsenprimordium. B-E zeigen laterale Ansichten.

3.11 Die Überexpression von Apelin führt zu Defekten in der Endodermentwicklung

Wie bereits beschrieben gibt es viele Hinweise, die darauf schließen lassen, dass die Schilddrüsenentwicklung von der Herzentwicklung abhängt. In Zusammenhang mit dem Einfluss des Bmp-Signalweges auf die Schilddrüsenentwicklung besteht die Möglichkeit, dass das Herz eine Signalquelle für Bmps darstellt. Viele Herzmutanten, in denen die Schilddrüsenentwicklung betroffen ist, zeigen jedoch pleiotrope Defekte, was eine alleinige Zuordnung der Schilddrüsendefekte auf die Herzdefekte schwierig gestaltet. Weiterhin ist bisher keine Herzmutante bekannt, in der alle Herzzellen fehlen, so dass ein geringer Einfluss der Herzzellen auf die Schilddrüsenentwicklung nicht ausgeschlossen werden kann. Jüngste Experimente im Zebrafisch zeigen, dass die Spezifizierung der Herzmuskelvorläuferzellen von deren Expression des Angiotensinrezeptorartigen-TypIb-Rezeptors (Angiotensin receptor-like 1b, Agtrl1b) und von der Expression des entsprechenden Liganden Apelin (Apln) abhängt (Scott et al., 2007). Die Überexpression von Apelin durch die Injektion der *apln*-mRNA verhindert die Spezifizierung wahrscheinlich aufgrund der Fehlleitung der Herzmuskelvorläuferzellen zu einer anderen, nicht für sie vorgesehenen Position im Embryo. Daraus resultierend entstehen Embryonen ohne jegliche Herzmuskelzellen, die sich für die Untersuchung der Rolle des Herzens als Signalquelle für Bmps in der Schilddrüsenentwicklung eignen.

Die Injektion einer sehr hohen Konzentration von *apln*-mRNA (15 ng/µl) führt erwartungsgemäß zu fehlenden Herzmuskelzellen (31 von 31 Embryonen; Abb. 3.18 K, L). Die Überprüfung der Schilddrüsenentwicklung anhand der *nk2.1a*-Expression in diesen Embryonen zeigt, dass die Schilddrüse ebenfalls nicht vorhanden ist (52 von 52 Embryonen; Abb. 3.18 M, N), jedoch ist gleichzeitig das anteriore Endoderm vollständig eliminiert (15 von 15 Embryonen; Abb. 3.18 O). Die Injektion einer geringeren Konzentration von *apln*-mRNA (3 ng/µl) erhöht zwar die Anzahl der Embryonen, deren anteriores Endoderm normal entwickelt ist (42 von 65 Embryonen (65%); Abb 3.18 J). Jedoch exprimiert in entsprechenden Versuchen ungefähr die gleiche Prozentzahl an Embryonen *nk2.1a* (77 von 101 Embryonen (76%); Abb. 3.18 H, I) und besitzt Herzmuskelzellen (84 von 115 Embryonen (73%); Abb. 3.18 F, G).

Die Ergebnisse zeigen, dass Apelin die Entwicklung des Endoderms beeinflusst. Die fehlende *nk2.1a*-Expression in Apelin-überexprimierenden Embryonen ist wahrscheinlich auf fehlende endodermale Vorläuferzellen zurückzuführen. Daher kann die Eliminierung der Herzmuskelzellen durch die Überexpression von Apelin nicht dazu verwendet werden, kurz vor der Induktion den Einfluss des Herzens als mögliche Signalquelle für die Schilddrüsenentwicklung zu untersuchen.

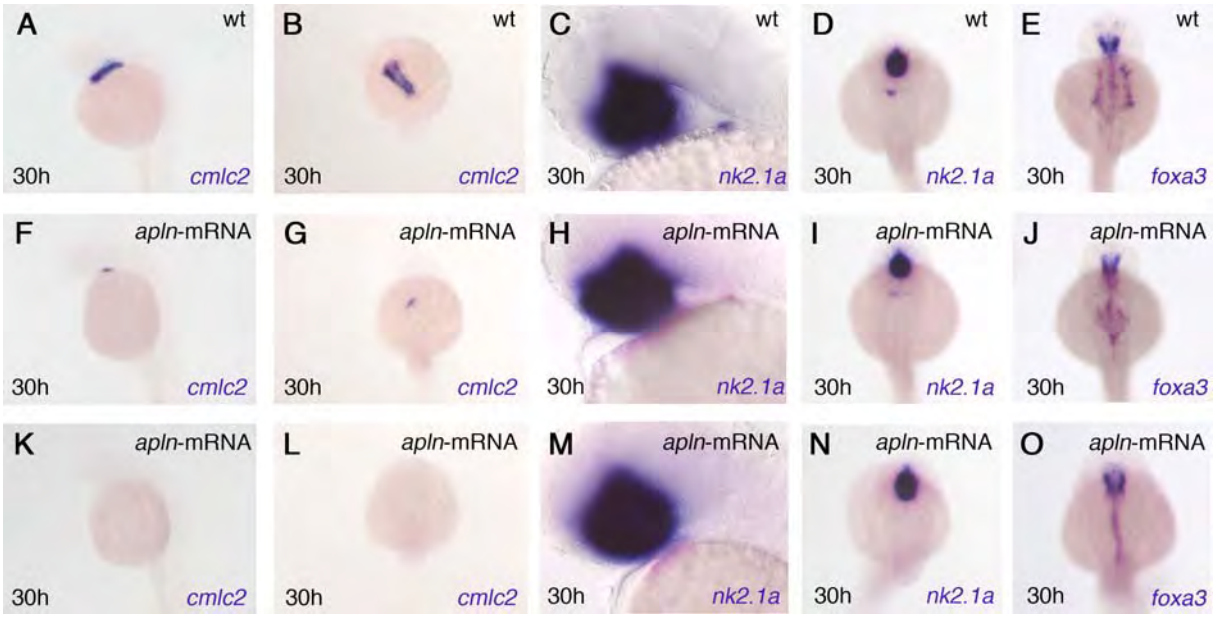

Abb. 3.18 Der Apelin-vermittelte Signalweg wird für die Entwicklung des Endoderms benötigt.

(**A-E**) Die Bilder zeigen die Expressionsmuster von *cmlc2*, *nk2.1a* und *foxA2/axial* im Wildtyp. (**F-J**) Die Überexpression von Apelin führt zu einer reduzierten Anzahl von Herzmuskelzellen (F+G). Gleichzeitig ist die Anzahl endodermaler (J) und der Schilddrüsenvorläuferzellen (H+I) reduziert. (**K-O**) Sehr hohe Apelin-Konzentrationen führen zur Eliminierung der Herzmuskelzellen, endodermaler Zellen und damit verbunden der Schilddrüsenanlage.

Oben rechts ist der Genotyp, unten links das Alter und unten rechts der Expressionsmarker aufgeführt. Schwarze Pfeile markieren die Schilddrüse.

A, C, F, H, K, M zeigen laterale und B, D, E, G, I, J, L, N, O dorsale Ansichten.

4 Diskussion

Über die frühe Schilddrüsenentwicklung ist bisher sehr wenig bekannt. Bei 24hpf beginnt die Expression von vier Transkriptionsfaktoren (*nk2.1a*, *pax2.1*, *hhex* und *pax8*), die im Bereich der Schilddrüsenanlage exprimiert und für die Differenzierung der Schilddrüse benötigt werden. Zum Zeitpunkt der Expression dieser Transkriptionsfaktoren ist das Schilddrüsenprimordium jedoch bereits vorhanden. Die Mechanismen, durch die kompetente endodermale Zellen zu Schilddrüsenanlagenzellen spezifiziert werden, sind bisher unbekannt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde in dieser Arbeit die mögliche Induktionsrolle von zwei Signaltransduktionswegen untersucht. Dazu gehören der Fgf- und der Bmp-Signalweg.

4.1 Der Fgf-Signalweg wird für den Erhalt der Schilddrüsenentwicklung benötigt.

Die Blockierung des Fgf-Signalweges durch den Fgf-Rezeptor-Blocker SU5402 hat gezeigt, dass Fgfs für die Expression von schilddrüsenspezifischen Entwicklungs- und Differenzierungsgenen notwendig sind. Da es nicht möglich war, die Inhibition des Fgf-Signalweges auf ein definiertes Zeitfenster zu begrenzen, kann der Zeitpunkt der Fgf-Wirkung nicht genau unterteilt werden. Die späte Behandlung mit der SU5402-Chemikalie zeigt jedoch, dass Fgfs auch nach der Induktion eine Rolle in der Schilddrüsenentwicklung spielen. Dieses Ergebnis impliziert, dass Fgfs eine erhaltende Funktion in der Schilddrüsenentwicklung ausüben könnten. Die Ergebnisse der Implantationsexperimente stützen diese Möglichkeit. Zwar wurde die Schilddrüsenentwicklung in den *han*^{S6}-Mutanten wiederhergestellt, jedoch entsteht kein ektopisches Schilddrüsengewebe, wie man es bei der Überexpression eines induzierenden Faktors erwarten würde. Voraussetzung hierfür ist, dass im Wildtyp mehr endodermale Zellen kompetent sind, auf ein induzierendes Signal zu reagieren, als in vivo zu Schilddrüsenanlagenzellen spezifiziert werden. Ein weiteres Indiz für die erhaltende Funktion von Fgfs geben Knockout-Mäuse, in denen kein FGF10 bzw.

kein FGF-Rezeptor 2 IIIb exprimiert wird. Diese Mäuse entwickeln eine Schilddrüsenanlage, die nach der Induktion eingeht (De Felice und Di Lauro, 2004).

Die Implantationsexperimente haben gezeigt, dass die Spezifität für die Art des Fgf-Liganden für die Rettung der Schilddrüsenentwicklung keine Rolle spielt. Die ektopische Expression von Fgf1, Fgf2, Fgf8 und Fgf1+2 zeigen keine Unterschiede in ihrer Wirkung auf die Schilddrüsenentwicklung in *hands off*-Mutanten. Weiterhin hat die Herrunteregulierung der Translation der endogenen *fgf1*-, *fgf2*-, *fgf3*- und *fgf8*-mRNA mittels der Injektion der entsprechenden Morpholinos keinen Effekt auf die Schilddrüsenentwicklung (Diplomarbeit Dejan Adzic, 2005; Thomas Wendl unveröffentlichte Beobachtungen). Sogar bei Kombination dieser Morpholinos ist die Schilddrüsenentwicklung wildtypisch. Demnach spielen entweder diese Fgfs in vivo keine Rolle in der Schilddrüsenentwicklung, oder andere Fgfs kompensieren ihren Funktionsverlust. Um die Fgfs identifizieren zu können, die in vivo an der Schilddrüsenentwicklung beteiligt sind, muss man weitere Fgf-Mutanten bzw. Fgf-Morphants im Hinblick auf die Schilddrüsenentwicklung untersuchen. Gegebenenfalls müssen Mehrfachmutanten bzw. Mehrfachmorphants herangezogen werden, um eine eventuelle Redundanz einzubeziehen.

Um eine Rettung der Schilddrüsenentwicklung in *hands off*-Mutanten zu erzielen, erfolgte die Implantation der Fgf-ummantelten Kügelchen zwischen dem 14 und 18 Somitenstadium. Demnach ist der Fgf-Signalweg erst ab späten Somitenstadien für die Schilddrüsenentwicklung notwendig. Es ist anzunehmen, dass die Wirkung der Fgfs nach der Implantation im Laufe der Zeit durch Proteinabbau nachlässt, so dass die Exposition der Fgfs zeitlich begrenzt ist. Eine genaue Wirkungsdauer der implantierten Fgf-Kügelchen wurde jedoch nicht ermittelt. Die Ermittlung der Wirkungsdauer würde klären, bis zu welchem Zeitpunkt die ektopische Exposition der Fgfs für die Wiederherstellung der Schilddrüsenentwicklung in han^{S6}-Mutanten notwendig ist.

Die Verwendung der Fgf-ummantelten Kügelchen bringt eine örtlich begrenzte Exposition der Fgf-Proteine mit sich. Da die Kügelchen in der Nähe der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze in direktem Kontakt zum Endoderm implantiert wurden, ist anzunehmen, dass sich die Wirkung auf die Fgfs auf die umgebenden Gewebe beschränkt. Ob die Fgfs direkt an Rezeptoren endodermaler Zellen binden, ist

fraglich. Es besteht die Möglichkeit, dass die Rettung der Schilddrüsenentwicklung in *han*^{S6}-Mutanten durch die Aktivierung von Fgf-Rezeptoren in nicht endodermalen Zellen zustande kommt. Um diese Frage zu klären, müsste der Fgf-Signalweg zellatonom im Endoderm inhibiert werden. Da die Fgf-Kügelchen in späten Somitenstadien implantiert werden, ist die Exposition der Fgfs in der Nähe des Endoderm zeitlich begrenzt. Aufgrund morphologischer Entwicklungs- und Wachstumsprozesse wandert das implantierte Kügelchen in unterschiedliche Regionen des Embryos und entfernt sich so vom Endoderm. Unabhängig vom Wanderungsweg der Kügelchen ist eine Rettung der Schilddrüsentwicklung in *han*^{S6} -Mutanten zu beobachten. Daher kann man vermuten, dass der Einfluss der Fgfs auf die Schilddrüsenentwicklung mit fortschreitendem Alter der *han*^{S6}-Embryonen durch die immer größer werdende Distanz nachlässt. Daraus kann man vermuten, dass die Wirkungsdauer der implantierten Fgf-Kügelchen zeitlich beschränkt ist. In Zusammenhang mit dem Proteinabbau der Fgfs ist die ektopische Exposition der Fgfs für die Wiederherstellung der Schilddrüsenentwicklung in *han*^{S6} –Mutanten auf die frühe Schilddrüsenentwicklung begrenzt.

4.2 Bmps sind potenzielle induktive Faktoren in der Schilddrüsenentwicklung

Die Untersuchung des Bmp-Signalweges auf eine Involvierung in der Schilddrüsenentwicklung hat viele Hinweise auf eine induktive Rolle ergeben. Die Effekte der Hoch- bzw. Herunterregulierung der Signaltransduktion zeigen, dass bereits zu Beginn der ersten Schilddrüsenmarkerexpression bei 24hpf die Schilddrüsenanlage vergrößert bzw. nicht vorhanden ist. Folglich beeinflusst der Bmp-Signalweg die Schilddrüsenentwicklung bereits vor dem Auftauchen der ersten Schilddrüsenmarkerexpression. Nimmt man an, dass Bmps die Schilddrüse induzieren, so ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich, da durch die Bmp2b-Überexpression mehr kompetente Zellen zu Schilddrüsenanlagenzellen spezifiziert werden. Umgekehrt findet bei Inhibition des Bmp-Signalweges keine Induktion statt. Nach Beginn der ersten Schilddrüsenmarkerexpression hat die Bmp2b-Überexpression keinen vergrößernden Effekt auf die Schilddrüsenanlage. Dieses

Ergebnis impliziert, dass die Vergrößerung des Schilddrüsenprimordiums nicht auf eine erhöhte Zellproliferation zurückzuführen ist. Geht man von einer induzierenden Wirkung des Bmp-Sigalweges aus, verlieren die endodermalen Schilddrüsenvorläuferzellen ihre Kompetenz sich auf das induzierende Signal zu Schilddrüsenanlagenzellen zu spezifizieren.

Die Induktive Rolle wird weiterhin durch den Umstand gestützt, dass bei der Manipulation des Bmp-Signalweges alle vier bekannten frühen Entwicklungsgene ein untereinander vergleichbares Ergebnis zeigen. Die Bmp2b-Überexpression führt in allen vier Entwicklungsgenen zu einer Expansion im Bereich der Schilddrüsenprimordiums, während die Inhibition des Bmp-Signalweges durch Noggin3 die Expression dieser Gene spezifisch im Bereich der Schilddrüsenanlage eliminiert. Vermutlich werden durch die Bmp2b-Überexpression mehr Zellen zu Schilddrüsenanlagenzellen spezifiziert und es durchlaufen mehr Zellen das gleiche Entwicklungsprogramm. Insbesondere die Vergrößerung der Expressionsdomäne des Differenzierungsmarkers *thyroglobulin* zeigt, dass die Wirkung des Bmp-Signalweges alle, auch noch nicht identifizierte Entwicklungsgene betrifft. Demnach ist die Expansion der schilddrüsenspezifischen Expressionsdomänen der Entwicklungsgene auf eine vergrößerte Schilddrüsenanlage zurückzuführen und nicht nur auf die erweiterte Expression der vier bekannten Entwicklungsgene beschränkt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer möglichen Induktionsrolle, da das vollständige Entwicklungsprogramm der Schilddrüse aktiviert wird. Dennoch ist es möglich, dass zunächst wenige Zellen zu Schilddrüsenanlagenzellen spezifiziert werden und durch anschließende Proliferation vermehrt werden.

Die Induktion setzt voraus, dass die induzierenden Signale direkt an Rezeptoren kompetenter Vorläuferzellen binden können. Die Zelltransplantationsexperimente demonstrieren, dass für die Schilddrüsenentwicklung der Bmp-Rezeptor Alk8 zellautonom im Endoderm benötigt wird. Das Expressionsmuster von Alk8 zeigt, dass der Rezeptor um den Zeitpunkt der ersten Schilddrüsenmarkerexpression im anterioren Endoderm exprimiert wird. Demnach sind alle Voraussetzungen für eine Weiterleitung eines induzierenden Signals gegeben. Obwohl Alk8 von der Befruchtung an im Endoderm herunterreguliert ist, zeigen die Biotin-detektierten Zellen, dass das anteriore Endoderm vorhanden ist und sich sogar ein Pharynx

ausbildet. Es ist daher anzunehmen, dass Alk8 für die Entwicklung des anterioren Endoderms nicht benötigt wird. Die intrazelluläre Weiterleitung des Bmp-Signals scheint nur z.T. über Smad5 statt zu finden, da die Schilddrüsenentwicklung in einem geringeren Prozentsatz der Embryonen gestört ist, als in Alk8-defizienten Embryonen.

Die Untersuchung der Entwicklung des anterioren Endoderms mittels *foxA2/axial* hat gezeigt, dass der Einfluss des Bmp-Signalweges auf die Schilddrüsenentwicklung nicht durch eine indirekte Wirkung über den Einfluss auf das anteriore Endoderm erklärt werden kann. Obwohl das anteriore Endoderm bei der Bmp2b-Überexpression leicht reduziert ist, ist die Schilddrüsenanlage dennoch vergrößert. Umgekehrt ist bei fehlendem Schilddrüsenprimordium das anteriore Endoderm vorhanden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss des Bmp-Signalweges ab 18ss spezifisch die Schilddrüsenentwicklung betrifft.

Die Manipulation der Bmp-Konzentrationen scheint keinen Einfluss auf die Zellproliferationsrate zu haben. Demnach ist die vergrößerte Schilddrüsenanlage in Bmp2b-überexprimierenden Embryonen nicht auf eine erhöhte Proliferationsrate der Schilddrüsenanlagenzellen zurückzuführen. Die Expressionsdomänen der Entwicklungsgene bei 24hpf zeigen jedoch, dass im Wildtyp zu Beginn sehr wenig Schilddrüsenanlagenzellen vorhanden sind. Demnach ist es möglich, dass eine veränderte Zellproliferationsrate schwer zu detektieren ist. Ähnlich verhält es sich mit der Zelltodrate. Die Hoch- bzw. Herunterregulierung des Bmp-Signalweges führt im Vergleich zum Wildtyp zu keiner veränderten Zelltodrate. Dennoch ist es möglich, dass aufgrund der geringen Anzahl der Schilddrüsenanlagenzellen zusätzliche apoptotische Zellen nicht detektiert worden sind.

Die Überexpression von Bmp2b führt nicht nur zu einer vergrößerten *nk2.1a*-Expression im Bereich der Schilddrüsenanlage. Zusätzlich sind die Expressionsdomänen im Hypothalamus und in Neuronen des Vorderhirns expandiert, sowie weitere, im Wildtyp bisher nicht beobachtete Expressionsdomänen zu sehen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der *nk2.1a*-Promotor direkt auf die Bmp-Signale anspricht und somit direkt durch den Bmp-Signalweg reguliert wird. Zangh et al. (2002) haben bereits ein Bmp-responsives Element (BRE) im *hhex*-Promotor im Huhn identifiziert und gezeigt, dass die *hhex*-Expression direkt durch

den downstream-Regulator Smad1 des Bmp-Signalweges positiv reguliert wird. Ein Nachweis, dass die Expression aller vier bekannten Entwicklungsgene durch die Aktivierung des Bmp-Signalweges im Endoderm gesteuert werden, würde zeigen, dass der Bmp-Signalweg für die Induktion und nicht für die Proliferation der Schilddrüsenanlage verantwortlich ist.

Die Bmp-Expressionsmuster von *bmp2b* und *bmp4* haben gezeigt, dass beide Liganden für eine Rolle als mögliche induktive Faktoren in Frage kommen. Um eine entsprechende Rolle zu beweisen, ist es nötig die jeweiligen Genfunktionen zum Zeitpunkt der mutmaßlichen Induktion herunterzuregulieren. Da bisher kein entsprechendes System etabliert worden ist, stehen diese Experimente noch aus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse darauf hindeuten, dass der Bmp-Signalweg für die Induktion des Schilddrüsenprimordiums benötigt wird. Die Weiterleitung des hierfür benötigten Bmp-Signals könnte über den Bmp-Rezeptor Alk8 und z.T. über den intrazellulären Mediator Smad5 stattfinden.

4.3 Das Herz ist ein potenzielles Signalzentrum für die Schilddrüsenentwicklung

Die Herrunterregulierung der *foxi1*-Proteinaktivität hat ergeben, dass die Schilddrüsenentwicklung nicht von der *hand2*-Expression in den Kiemenbögen-assoziierten Zellen abhängt. In Zusammenhang mit den Arbeiten von Thomas Wendl, der gezeigt hat, dass die Schilddrüsenentwicklung von der *hand2*-Expression im Endoderm und in den Kiemenbögen unabhängig ist, bleibt als einziges *hand2*-exprimierende Gewebe das anteriore Lateralplattenmesoderm (aLPM) bzw. das sich daraus entwickelnde Herz, das die Schilddrüsenentwicklung beeinflusst. Da Fgfs den Verlust der *hand2*-Expression im aLPM/Herzen kompensieren und so die Schilddrüsenentwicklung in han^{S6}-Mutanten herstellen können, ist es durchaus möglich, dass das aLPM/Herz in vivo eine Quelle für Fgf-Signale ist, die für den Erhalt der Schilddrüsenentwicklung notwendig sind. Die Überprüfung der Expressionsmuster von *fgf1*, *fgf2*, *fgf8* und deren downstream-Faktoren *sef*, *sprouty2* und *sprouty4* (Wendl et al. 2007) hat gezeigt, dass diese Genexpression in han^{S6}-

Mutanten unverändert ist. Falls das aLPM/Herz tatsächlich eine Quelle für Fgf-Signal ist, müssen andere Fgfs, als die genannten, involviert sein.

Obwohl die Herzentwicklung in *han*^{S6}–Mutanten gestört ist, sind immer noch wenige Herzzellen in diesen Embryonen vorhanden (Yelon et al., 2000), die eine Quelle für Signalmoleküle darstellen können. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den wenigen *han*^{S6}-Embryonen, die eine Schilddrüsenanlage entwickeln, die Herzzellen die Schilddrüsenentwicklung positiv beeinflussen. Um die Rolle des Herzens in der Schilddrüsenentwicklung besser untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit durch die Apelin-Überexpression Embryonen geschaffen, die keine Herzmuskelzellen entwickeln. Dabei hat sich gezeigt, dass in den gleichen Embryonen kein Endoderm vorhanden ist und die Schilddrüsenentwicklung daraufhin nicht stattfinden kann. Die Herzentwicklung und die Entwicklung des anterioren Endoderms weisen demnach gemeinsame Aspekte auf. Dies wird durch Ergebnisse in der Untersuchung des Transkriptionsfaktors Gata5 bestätigt. Gata5 ist sowohl in endodermalen Zellen, als auch in Herzvorläuferzellen exprimiert und wird für die Entwicklung beider Zellpopulationen benötigt (Reiter et al., 1999). Die Betrachtung der *miles apart*-Mutante zeigt, dass weiterhin die Herzentwicklung und die Schilddrüsenentwicklung eng verknüpft sind. In der *miles apart*-Mutante findet die Fusion der beiden Zellpopulationen des aLPMs nicht statt und die Embryonen entwickeln eine cardia bifida, die durch zwei laterale Herzen charakterisiert wird (Yelon, 2001). Die Untersuchung der Schilddrüsenentwicklung in dieser Mutante hat gezeigt, dass zwei laterale Schilddrüsenprimordien in der Nähe der Herzen vorhanden sind (nicht veröffentlichte Beobachtung von Thomas Wendl).Vermutlich findet in diesen Embryonen die Fusion der bilateral vorliegenden Zellpopulationen des anterioren Endoderms nicht statt. Obwohl die Entwicklung des anterioren Endoderms und die Herzentwicklung eng verknüpft zu sein scheinen, macht dieser Umstand eine Untersuchung der Rolle des Herzens in der Schilddrüsenentwicklung schwierig. Eventuell ist es notwendig nur bestimmte Aspekte der Herzfunktion zu unterbinden, um die Rolle einzelner Faktoren spezifisch im Herzen und zu bestimmten Zeiten der Entwicklung zu untersuchen. Eine Möglichkeit würde die Schaffung einer transgenen Linie bieten, die es ermöglicht, die Sekretion von Bmp-Signalen spezifisch im Herzen und in bestimmten Zeitfenstern zu unterbinden. Ein

solches Experiment würde klären, ob das Herz die Quelle für Bmp-Signale bereitstellt, die für die Schilddrüsenentwicklung benötigt wird.

Im Menschen bildet die Schilddrüse ein schmetterlingförmiges, kompaktes Organ, das sich unterhalb des Halses vor der Luftröhre befindet. Das Ogan besteht aus zwei Lappen, die über einen Isthmus miteinander verbunden sind. Interessanterweise ist die Form des Organs meist asymmetrisch, wobei in den meisten Fällen der rechte Lappen größer als der linke ist (Netter, 1965). Diese Asymmetrie impliziert, dass ein asymmetrisch platziertes Organ die Schilddrüsenentwicklung beeinflusst. Bei Patienten, die eine Dextrakardia aufweisen, ist das Größenverhältnis der Schilddrüsenlappen umgekehrt, so dass der linke Lappen größer als der rechte ist (Netter, 1965). Aufgrund dieser Beobachtung kann man vermuten, dass die Herz- und Schilddrüsenentwicklung zusammenhängen und dass das Herz für den asymmetrischen Aufbau der Schilddrüse verantwortlich ist. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass es sich um einen zufälligen Befund handelt, da in diesen Patienten möglicherweise ein generelles Problem in der bilateralen Symmetrie ihrer Organe vorliegt, das nicht vollständig penetrant ist und daher nur das Herz und die Schilddrüse betrifft. Insbesondere haben Untersuchungen in der Maus und im Zebrafisch gezeigt, dass große Gefäße im Kopfbereich für die Morphogenese und für die endgültige Spezies-spezifische Position der Schilddrüse verantwortlich sind (Alt et al., 2006a). In der *Short digits/Dsh*-Mausmutante, in denen der Sonic Hedgehog-Signalweg fast vollständig herunterreguliert ist (Niedermaier et al., 2005), liegen die Karotiden unilateral entweder auf der linken Seite bzw. auf der rechten Seite vor. Diese Mäuse haben eine Schilddrüse mit nur einem Lappen, der auf der Seite der Karotiden liegt. Möglicherweise haben Patienten mit einer Dextrakardia ebenfalls bilateral vertauschte Karotiden, worauf die umgekehrt vorliegenden Schilddrüsenlappen zurückzuführen sind. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass einer der beiden Karotiden die Schilddrüsenmorphogenese stärker beeinflusst als der andere.

Unveröffentlichte Beobachtungen von Klaus Rohr haben ergeben, dass es im Zebrafisch eine Tendenz gibt, dass die Position der Schilddrüsenanlage auf die Seite des meist links liegenden Herzens verschoben ist. Die Betrachtung des vergrößerten Schilddrüsenprimordiums in Bmp2b-überexprimierenden Embryonen zeigt, dass die

Expansion der Schilddrüsenanlage relativ gleichförmig auf beide Seiten des Embryos ausstrahlt. Geht man vom Herzen als potenzielle Signalquelle für induzierende Faktoren aus, so überlagern die hohen Bmp-Konzentration dieses Signal, so dass die vergrößerte Schilddrüsenanlage bilateral symmetrisch ist. In wenigen Fällen ist das vergrößerte Schilddrüsenprimordium auf der linken Seite größer. Vermutlich ist in diesen Embryonen die Bmp-Konzentration etwas niedriger, so dass auf der Seite des Herzens die mutmaßlichen zusätzlichen Bmp-Signale die Expansion auf einer Seite verstärken. Dieser mutmaßliche Mechanismus, bei dem die Schilddrüsenanlage bereits bei der Induktion unilateral verschoben ist, ist unabhängig von dem Mechanismus des auf einer Seite größeren Schilddrüsenlappens im Menschen, der wahrscheinlich erst während der Morphogenese entsteht.

4.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Fgf- und der Bmp-Signalweg für die Schilddrüsenentwicklung benötigt werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann man sich folgendes hypothetische Modell für die Einordnung der beiden Signalwege in die Schilddrüsenentwicklung vorstellen. Die Schilddrüsenanlage wird durch Bmps induziert. Anschließend werden Fgfs für den Erhalt der Schilddrüsenanlage benötigt. Bei beiden Prozessen ist möglicherweise das Herz die Signalquelle für beide Signalmoleküle.

5 Zusammenfassung

Die Schilddrüse ist ein endokrines Organ, das in allen Wirbeltieren vorkommt und das sich aus dem ventralen Bereich des Pharynx entwickelt. Über die Induktionsvorgänge, in dessen Verlauf ein Teil des anterioren Urdarms zur Schilddrüsenanlage spezifiziert wird, ist wenig bekannt. Der klassische Induktionsvorgang beinhaltet die Sekretion eines induzierenden Faktors aus umliegendem Gewebe, das ein kompetentes Gewebe zu einer bestimmten Organanlage spezifiziert. In dieser Arbeit wurde die Rolle des Fgf- und des Bmp-Signalweges in der frühen Schilddrüsenentwicklung des Zebrafisches und eine mögliche Involvierung der beiden Signalwege in der Induktion der Schilddrüsenanlage untersucht.

In der embryonal-letalen Zebrafisch-Mutante *hands off*, die homozygot für das *han*^{S6}-Allel ist, ist der Genlokus für den Transkriptionsfaktor Hand2 vollständig deletiert. In früheren Versuchen wurde gezeigt, dass in der *han*^{S6}-Mutante die Expression schilddrüsenspezifischer Gene nicht vorhanden ist und daher die Schilddrüse fehlt. Da bereits gezeigt worden ist, dass Hand2 die Expression von Fgfs hochregulieren kann, wurden in dieser Arbeit Fgfs zum Zeitpunkt der Induktion der Schilddrüsenanlage im Bereich des anterioren Endoderms von *han*^{S6}-Mutanten ektopisch exprimiert. Die ektopische Exposition der Fgf-Signalmoleküle führt zur Wiederherstellung der Schilddrüsenentwicklung in *han*^{S6}-Mutanten. Die ubiquitäre Herrunterregulierung des Fgf-Signalweges durch den Fgf-Blocker SU5402 in Wildtyp-Embryonen führt zum Wegfall der schilddrüsenspezifischen Genexpression und damit zum Eingehen der Schilddrüse. Da die ektopische Exposition der Fgfs in *han*^{S6}-Mutanten kein ektopisches Schilddrüsengewebe induziert und die Herrunterregulierung des Fgf-Signalweges auch lange Zeit nach der Induktion der Schilddrüsenanlage zum Wegfall der Schilddrüse führt, ist vermutlich der Fgf-Signalweg für den Erhalt der Schilddrüse und nicht für deren Induktion notwendig.

Experimente im Huhn und in der Maus haben gezeigt, dass Bmps die Expression schilddrüsenspezifischer Transkriptionsfaktoren beeinflussen können. Um eine Rolle des Bmp-Signalweges in der Schilddrüsenentwicklung des Zebrafisches zu untersuchen wurde der Ligand Bmp2b, sowie der Bmp-Inhibitor Noggin3 in

hitzeschock-indzierbaren transgenen Linien zum Zeitpunkt der Schilddrüseninduktion hochreguliert. Die Überexpression von Bmp2b führt zu einer vergrößerten Schilddrüsenanlage, während die Überexpression von Noggin3 die Schilddrüsenentwicklung inhibiert. Da nach der Schilddrüseninduktion die Bmp2b-Überexpression keinen vergrößernden Effekt auf die Schilddrüse hat, sind vermutlich Bmps an der Induktion der Schilddrüsenanlage beteiligt.

6 Abstract

The thyroid is an endocrine gland existing in all vertebrates. It develops from the ventral floor of the pharynx and is therefore considered as an endodermal derivative. Little is known about the induction of the thyroid primordium. One possible way of organ induction is based on the proximate interaction of cells or tissues, in which one tissue is secreting an inductive signal to a competente tissue specifying it as a certain organ primordium. This study deals with the role of the Fgf and Bmp signal transduction pathways in early thyroid development and their possible involvement in thyroid induction.

The embryonic lethal zebrafish mutant *hands off*, homozygous for the *han*^{S6} allele, lacks the locus for the transcription factor Hand2. Previous experiments have shown, that in *han*^{S6} mutants thyroid specific gene expression is absent and that the thyroid is missing. Further Data in mouse development shows, that Hand2 can activate Fgf expression suggesting the possibility, that the missing thyroid in *han*^{S6} mutants may be caused by missing Fgfs. To test this hypothesis Fgf protein soaked beads have been implanted into the anterior endoderm of *han*^{S6} mutants in the time window of thyroid induction. The ectopic exposition of Fgfs restores thyroid development in *han*^{S6} mutants. Consistently, the ubiqitous downregulation of the Fgf signal pathway by the Fgf blocker SU5402 in wildtype embryos leads to missing thyroid specific gene expression and fading of the thyroid itself. Due to the finding, that Fgfs don´t induce ectopic thyroid tissue and that the downregulation blocks thyroid development even at later time points after thyroid induction, Fgfs have presumably a role in the maintanance rather than in the induction of the thyroid.

Experiments in chick and mouse have shown, that Bmps have an influence on the expression of thyroid specific transcription factors. To test a possible role of the Bmp signal pathway in thyroid development of the zebrafish, overexpression studies with the ligand Bmp2b and the Bmp inhibitor Noggin3 have been made. The overexpression of Bmp2b at the time point of thyroid induction leads to an expanded thyroid primordium. In contrast Noggin3 overexpressing embryos have no detectable thyroid primordium. Overexpressing Bmp2b after thyroid induction has no increasing

effect on the thyroid. Therefore it is possible that Bmps are putative inducing factors in thyroid development

7 Literatur

Abe, M., Y. Tamamura, H. Yamagishi, T. Maeda, J. Kato, M. J. Tabata, D. Srivastava, S. Wakisaka and K. Kurisu (2002). "Tooth-type specific expression of dHAND/Hand2: possible involvement in murine lower incisor morphogenesis." Cell Tissue Res **310**(2): 201-12.

Adzic, D. (2005). Diplomarbeit: Die Rolle von FGFs in der Entwicklung der Schilddrüse des Zebrafisches. Institut für Entwicklungsbiologie. Köln, Universität zu Köln.

Alberts, B. J., Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter (2002). Molecular Biology of the Cell, Blackwell Publishing.

Alexander, J., M. Rothenberg, G. L. Henry and D. Y. Stainier (1999). "casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish." Dev Biol **215**(2): 343-57.

Alexander, J., D. Y. Stainier and D. Yelon (1998). "Screening mosaic F1 females for mutations affecting zebrafish heart induction and patterning." Dev Genet **22**(3): 288-99.

Alt, B., O. A. Elsalini, P. Schrumpf, N. Haufs, N. D. Lawson, G. C. Schwabe, S. Mundlos, A. Gruters, H. Krude and K. B. Rohr (2006). "Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation." Development **133**(19): 3797-804.

Alt, B., S. Reibe, N. M. Feitosa, O. A. Elsalini, T. Wendl and K. B. Rohr (2006). "Analysis of origin and growth of the thyroid gland in zebrafish." Dev Dyn **235**(7): 1872-83.

Bauer, H., Z. Lele, G. J. Rauch, R. Geisler and M. Hammerschmidt (2001). "The type I serine/threonine kinase receptor Alk8/Lost-a-fin is required for Bmp2b/7 signal transduction during dorsoventral patterning of the zebrafish embryo." Development **128**(6): 849-58.

Chocron, S., M. C. Verhoeven, F. Rentzsch, M. Hammerschmidt and J. Bakkers (2007). "Zebrafish Bmp4 regulates left-right asymmetry at two distinct developmental time points." Dev Biol **305**(2): 577-88.

David, N. B. and F. M. Rosa (2001). "Cell autonomous commitment to an endodermal fate and behaviour by activation of Nodal signalling." Development **128**(20): 3937-47.

De Felice, M. and R. Di Lauro (2004). "Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms." Endocr Rev **25**(5): 722-46.

Dickmeis, T., P. Mourrain, L. Saint-Etienne, N. Fischer, P. Aanstad, M. Clark, U. Strahle and F. Rosa (2001). "A crucial component of the endoderm formation pathway, CASANOVA, is encoded by a novel sox-related gene." Genes Dev **15**(12): 1487-92.

Dufort, D., L. Schwartz, K. Harpal and J. Rossant (1998). "The transcription factor HNF3beta is required in visceral endoderm for normal primitive streak morphogenesis." Development **125**(16): 3015-25.

Elsalini, O. A., J. von Gartzen, M. Cramer and K. B. Rohr (2003). "Zebrafish hhex, nk2.1a, and pax2.1 regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors." Dev Biol **263**(1): 67-80.

Feldman, B., M. A. Gates, E. S. Egan, S. T. Dougan, G. Rennebeck, H. I. Sirotkin, A. F. Schier and W. S. Talbot (1998). "Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals." Nature **395**(6698): 181-5.

Fukuda, K. and Y. Kikuchi (2005). "Endoderm development in vertebrates: fate mapping, induction and regional specification." Dev Growth Differ **47**(6): 343-55.

Furthauer, M., B. Thisse and C. Thisse (1999). "Three different noggin genes antagonize the activity of bone morphogenetic proteins in the zebrafish embryo." Dev Biol **214**(1): 181-96.

Gilbert, S. (2003). Developmental Biology, Sinauer.

Grapin-Botton, A. and D. A. Melton (2000). "Endoderm development: from patterning to organogenesis." Trends Genet **16**(3): 124-30.

Guo, S., J. Brush, H. Teraoka, A. Goddard, S. W. Wilson, M. C. Mullins and A. Rosenthal (1999). "Development of noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain requires BMP, FGF8, and the homeodomain protein soulless/Phox2a." Neuron **24**(3): 555-66.

Guo, S., S. W. Wilson, S. Cooke, A. B. Chitnis, W. Driever and A. Rosenthal (1999). "Mutations in the zebrafish unmask shared regulatory pathways controlling the development of catecholaminergic neurons." Dev Biol **208**(2): 473-87.

Haffter, P., M. Granato, M. Brand, M. C. Mullins, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, J. Odenthal, F. J. van Eeden, Y. J. Jiang, C. P. Heisenberg, R. N. Kelsh, M. Furutani-Seiki, E. Vogelsang, D. Beuchle, U. Schach, C. Fabian and C. Nusslein-Volhard (1996). "The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio." Development **123**: 1-36.

Hammerschmidt, M., F. Pelegri, M. C. Mullins, D. A. Kane, F. J. van Eeden, M. Granato, M. Brand, M. Furutani-Seiki, P. Haffter, C. P. Heisenberg, Y. J. Jiang, R. N. Kelsh, J. Odenthal, R. M. Warga and C. Nusslein-Volhard (1996). "dino and mercedes, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo." Development **123**: 95-102.

Hwang, S. P., M. F. Tsou, Y. C. Lin and C. H. Liu (1997). "The zebrafish BMP4 gene: sequence analysis and expression pattern during embryonic development." DNA Cell Biol **16**(8): 1003-11.

Inzerillo, A. M., M. Zaidi and C. L. Huang (2002). "Calcitonin: the other thyroid hormone." Thyroid **12**(9): 791-8.

J.A. Langeland, C. B. K. (1997). Fishes.

Kane, D. A. and C. B. Kimmel (1993). "The zebrafish midblastula transition." Development **119**(2): 447-56.

Kikuchi, Y., A. Agathon, J. Alexander, C. Thisse, S. Waldron, D. Yelon, B. Thisse and D. Y. Stainier (2001). "casanova encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish." Genes Dev **15**(12): 1493-505.

Kimelman, D. and K. J. Griffin (2000). "Vertebrate mesendoderm induction and patterning." Curr Opin Genet Dev **10**(4): 350-6.

Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." Dev Dyn **203**(3): 253-310.

Langeland, J. A. and C. B. Kimmel (1997). Fishes, Sinauer; Sanderland.

Le Douarin, N., J. Fontaine and C. Le Lievre (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**(4): 297-305.

Le Lievre, C. S. and N. M. Le Douarin (1975). "Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos." J Embryol Exp Morphol **34**(1): 125-54.

Mohammadi, M., G. McMahon, L. Sun, C. Tang, P. Hirth, B. K. Yeh, S. R. Hubbard and J. Schlessinger (1997). "Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors." Science **276**(5314): 955-60.

Mullins, M. C., M. Hammerschmidt, P. Haffter and C. Nusslein-Volhard (1994). "Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate." Curr Biol **4**(3): 189-202.

Netter, F. (1965). Anatomy of the thyroid and parathyroid glands.

Niedermaier, M., G. C. Schwabe, S. Fees, A. Helmrich, N. Brieske, P. Seemann, J. Hecht, V. Seitz, S. Stricker, G. Leschik, E. Schrock, P. B. Selby and S. Mundlos (2005). "An inversion involving the mouse Shh locus results in brachydactyly through dysregulation of Shh expression." J Clin Invest **115**(4): 900-9.

Noden, D. M. (1991). "Vertebrate craniofacial development: the relation between ontogenetic process and morphological outcome." Brain Behav Evol **38**(4-5): 190-225.

Ober, E. A., H. A. Field and D. Y. Stainier (2003). "From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish." Mech Dev **120**(1): 5-18.

Odenthal, J. and C. Nusslein-Volhard (1998). "fork head domain genes in zebrafish." Dev Genes Evol **208**(5): 245-58.

Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." Genome Biol **2**(3): REVIEWS3005.

Pasca di Magliano, M., R. Di Lauro and M. Zannini (2000). "Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13144-9.

Piccolo, S., Y. Sasai, B. Lu and E. M. De Robertis (1996). "Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4." Cell **86**(4): 589-98.

Powers, C. J., S. W. McLeskey and A. Wellstein (2000). "Fibroblast growth factors, their receptors and signaling." Endocr Relat Cancer **7**(3): 165-97.

Reifers, F., E. C. Walsh, S. Leger, D. Y. Stainier and M. Brand (2000). "Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar)." Development **127**(2): 225-35.

Reiter, J. F., Y. Kikuchi and D. Y. Stainier (2001). "Multiple roles for Gata5 in zebrafish endoderm formation." Development **128**(1): 125-35.

Rodaway, A., H. Takeda, S. Koshida, J. Broadbent, B. Price, J. C. Smith, R. Patient and N. Holder (1999). "Induction of the mesendoderm in the zebrafish germ ring by yolk cell-derived TGF-beta family signals and discrimination of mesoderm and endoderm by FGF." Development **126**(14): 3067-78.

Sakaguchi, T., A. Kuroiwa and H. Takeda (2001). "A novel sox gene, 226D7, acts downstream of Nodal signaling to specify endoderm precursors in zebrafish." Mech Dev **107**(1-2): 25-38.

Sambrook, J. R., DW (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. New york, Cold Spring Harbor.

Saude, L., K. Woolley, P. Martin, W. Driever and D. L. Stemple (2000). "Axis-inducing activities and cell fates of the zebrafish organizer." Development **127**(16): 3407-17.

Schier, A. F., S. C. Neuhauss, K. A. Helde, W. S. Talbot and W. Driever (1997). "The one-eyed pinhead gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with no tail." Development **124**(2): 327-42.

Schier, A. F. and W. S. Talbot (2005). "Molecular genetics of axis formation in zebrafish." Annu Rev Genet **39**: 561-613.

Scott, I. C., B. Masri, L. A. D'Amico, S. W. Jin, B. Jungblut, A. M. Wehman, H. Baier, Y. Audigier and D. Y. Stainier (2007). "The g protein-coupled receptor agtrl1b regulates early development of myocardial progenitors." Dev Cell **12**(3): 403-13.

Serls, A. E., S. Doherty, P. Parvatiyar, J. M. Wells and G. H. Deutsch (2005). "Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung." Development **132**(1): 35-47.

Shih, J. and S. E. Fraser (1996). "Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage." Development **122**(4): 1313-22.

Shin, D., C. H. Shin, J. Tucker, E. A. Ober, F. Rentzsch, K. D. Poss, M. Hammerschmidt, M. C. Mullins and D. Y. Stainier (2007). "Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish." Development **134**(11): 2041-50.

Solnica-Krezel, L. (2006). "Gastrulation in zebrafish -- all just about adhesion?" Curr Opin Genet Dev **16**(4): 433-41.

Sprague, J., L. Bayraktaroglu, D. Clements, T. Conlin, D. Fashena, K. Frazer, M. Haendel, D. G. Howe, P. Mani, S. Ramachandran, K. Schaper, E. Segerdell, P. Song, B. Sprunger, S. Taylor, C. E. Van Slyke and M. Westerfield (2006). "The Zebrafish Information Network: the zebrafish model organism database." Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D581-5.

Stafford, D., A. Hornbruch, P. R. Mueller and V. E. Prince (2004). "A conserved role for retinoid signaling in vertebrate pancreas development." Dev Genes Evol **214**(9): 432-41.

Strahle, U., P. Blader, D. Henrique and P. W. Ingham (1993). "Axial, a zebrafish gene expressed along the developing body axis, shows altered expression in cyclops mutant embryos." Genes Dev **7**(7B): 1436-46.

Thisse, B. and C. Thisse (2005). "Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development." Dev Biol **287**(2): 390-402.

Thisse, C. and B. Thisse (1999). "Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction." Development **126**(2): 229-40.

Tiso, N., A. Filippi, S. Pauls, M. Bortolussi and F. Argenton (2002). "BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish." Mech Dev **118**(1-2): 29-37.

Trueb, B., S. C. Neuhauss, S. Baertschi, T. Rieckmann, C. Schild and S. Taeschler (2005). "Fish possess multiple copies of fgfrl1, the gene for a novel FGF receptor." Biochim Biophys Acta **1727**(1): 65-74.

von Bubnoff, A. and K. W. Cho (2001). "Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network?" Dev Biol **239**(1): 1-14.

Walker, W. F. and K. F. Liem (1994). Functional Anatomy of Vertebrates. An Evolutionary Perspective., Saunders.

Warga, R. M. and C. Nusslein-Volhard (1999). "Origin and development of the zebrafish endoderm." Development **126**(4): 827-38.

Wendl, T. (2005). Dissertation: Untersuchungen zur Rolle von hand2 in der Schilddrüsenentwicklung des Zebrafischs. Institut für Entwicklungsbiologie. Köln, Universität zu Köln.

Wendl, T., D. Adzic, J. J. Schoenebeck, S. Scholpp, M. Brand, D. Yelon and K. B. Rohr (2007). "Early developmental specification of the thyroid gland depends on han-expressing surrounding tissue and on FGF signals." Development **134**(15): 2871-9.

Wendl, T., K. Lun, M. Mione, J. Favor, M. Brand, S. W. Wilson and K. B. Rohr (2002). "Pax2.1 is required for the development of thyroid follicles in zebrafish." Development **129**(15): 3751-60.

Westerfield, M. (1994). The Zebrafish Book: a Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio), University of Oregon Press.

Yamauchi, H., Y. Hotta, M. Konishi, A. Miyake, A. Kawahara and N. Itoh (2006). "Fgf21 is essential for haematopoiesis in zebrafish." EMBO Rep **7**(6): 649-54.

Yelon, D. (2001). "Cardiac patterning and morphogenesis in zebrafish." Dev Dyn **222**(4): 552-63.

Yelon, D., B. Ticho, M. E. Halpern, I. Ruvinsky, R. K. Ho, L. M. Silver and D. Y. Stainier (2000). "The bHLH transcription factor hand2 plays parallel roles in zebrafish heart and pectoral fin development." Development **127**(12): 2573-82.

Zhang, W., T. A. Yatskievych, X. Cao and P. B. Antin (2002). "Regulation of Hex gene expression by a Smads-dependent signaling pathway." J Biol Chem **277**(47): 45435-41.

Zimmerman, C. M. and L. S. Mathews (1996). "Activin receptors: cellular signalling by receptor serine kinases." Biochem Soc Symp **62**: 25-38.

8 Abkürzungen, Symbole und Konventionen

– Katalog-Nummer

AK – Antikörper

AP – Alkalische Phosphatase

BDA – Biotin Dextran Amin

BSA – (bovine serum albumine) Rinderserumalbumin

DAB – Diaminobenzidin

dd H2O – doppelt destilliertes H2O

Dig – Digoxygenin

dpf – days post fertilisation, Tage nach der Befruchtung

EDTA – Ethylen-Diamin-Tetraacid

h – Stunde

HEPES – N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N`-(2-Ethan)-Sulfonsäure

hpf – hours post fertilisation, Stunde(n) nach der Befruchtung

LPM – lateral plate mesoderm , Lateralplattenmesoderm

MHB – midbrain hindbrain boundary , Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze

min – Minute

MO – Morpholino-Oligonukleotide

mRNA – (messenger RNA) Boten-RNA

μl – microliter

ng – nanogramm

PBS – (phosphate buffered saline) Phosphat-gepufferte Salzlsg.

PBT – PBS mit 1%igem Tween 20

PFA – Paraformaldehyd

pH – (von lat. pondus hydrogenii; Wasserstoff-Gewicht) negativer dekadischer Logarithmus der aktuellen Hydroniumionenaktivität

RDA – Rhodamin Dextran Amin

RT – Raumtemperatur

s – Sekunden

SSC – standard saline citrat

TAE – Tris/Acetat/EDTA-Puffer

Tris – Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan

U – (unit) Reaktionseinheit

Ü/N – über Nacht

VE – voll entsalztes Wasser

ZF – Zebrafisch

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 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. Siegfried Roth und Priv.-Doz. Dr. Klaus Rohr betreut worden.

Köln, den _____

Teilpublikationen:

Wendl, T., D. Adzic, J. J. Schoenebeck, S. Scholpp, M. Brand, D. Yelon and K. B. Rohr (2007). "Early developmental specification of the thyroid gland depends on han-expressing surrounding tissue and on FGF signals." Development **134**(15): 2871-9.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Dejan Deni Adzic
Geburtsdatum	13.10.1978
Geburtsort	Karlsruhe-Durlach
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1985-1989	Besuch der Nebenius-Grundschule Karlsruhe
1989-1998	Besuch des Helmholtz-Gymnasiums Karlsruhe
1998	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

09.1998-09-1999	Zivildienst im Förderungs- und Betreuungsbereich der Hagsfelder Werkstätten, Zweigstelle Neureut

Akademische Ausbildung

10.1999-04.2005	Diplomstudium Biologie, Universität zu Köln
02.2004-11.2004	Diplomarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie, Universität zu Köln, bei Prof. Dr. Siegfried Roth mit dem Thema: Die Rolle von Fgfs in der Schilddrüsenentwicklung des Zebrafisches
04.2005-02.2005	Doktorarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie, Universität zu Köln, bei Priv.-Doz. Dr. Klaus B. Rohr und Prof. Dr. Siegfried Roth mit dem Thema: Die Rolle von Fgfs und Bmps in der frühen Schilddrüsenentwicklung des Zebrafisches