

Universität Ulm
Abteilung Humangenetik
Leiter: Prof. Dr. W. Vogel

**Darstellung von Zellproliferationsmustern
während der Gehirnentwicklung im Huhn**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von:

Anne-Kristin Possek

aus Neuruppin

2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Horst Hameister

2. Berichterstatter: PD Dr. Eva Küppers

Tag der Promotion: 12.07.2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	9
1.1 Das Huhn als Modellorganismus	10
1.2 Das Genom des Huhns	11
1.3 Vergleich der Gehirne von Huhn und Mensch	12
1.3.1 Entwicklungsmuster des Telencephalons	18
1.3.2 Der Lobus opticus	19
1.3.3 Das Cerebellum	20
1.4 Untersuchungen zur Zellproliferation	20
1.4.1 Markierung mit BrdU	21
1.4.2 RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung / Histon H4	22
1.5 Fragestellung der Arbeit	23
2 Materialien und Methoden	24
2.1 Materialien und Geräte	24
2.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien	24
2.1.2 Spezielle Materialien und Geräte	26
2.1.3 Lösungen	27
2.2 Verwendete DNA-Sequenzierungsprimer	30
2.3 Methoden	31
2.3.1 Versuche mit Zellkulturen	31
2.3.2 Untersuchungen an Embryonen	34
2.3.3 BrdU-Antikörpernachweis	36
2.3.4 DNA-Techniken	37
2.3.5 RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	41
3 Ergebnisse	46
3.1 Untersuchungen zum Zellzyklus der embryonalen Hühnerfibroblasten	46
3.2 Nachweis der Zellproliferation während der Fetalentwicklung des Huhns	48
3.2.1 Nachweis der Zellproliferation mit dem BrdU-Antikörpernachweis	48
3.2.2 Nachweis der Zellproliferation mit der RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	48
3.3 Untersuchung der Gehirnentwicklung des Huhns	49
3.3.1 Untersuchungen am 5-Tage alten Hühnerembryo	49
3.3.2 Untersuchungen am 8-Tage alten Hühnerembryo	51

3.3.3	Untersuchungen am 10-Tage alten Hühnerembryo.....	54
3.3.4	Untersuchungen am 13-Tage alten Hühnerembryo.....	59
3.3.5	Untersuchungen am Gehirn eines 16-Tage alten Hühnerembryos.....	61
3.3.6	Untersuchungen am Gehirn eines 19-Tage alten Hühnerembryos.....	65
3.3.7	Untersuchungen am Gehirn eines adulten, 50-Tage alten Huhns	68
3.4	Zusammenfassende Darstellung der Entwicklung des Lobus opticus	70
3.5	Korrelation der Gehirnregionen von Huhn und Mensch.....	74
4	Diskussion.....	75
4.1	Die Zellzyklusdauer im Hühnerembryo	75
4.2	Nachweis der Zellproliferation mit dem BrdU-Antikörpernachweis.....	76
4.3	Die Gehirnentwicklung des Huhns.....	77
4.3.1	Die Entwicklung des Telencephalons.....	77
4.3.2	Die Entwicklung des Lobus opticus	79
4.3.3	Die Entwicklung des Cerebellum	80
4.4	Schlussfolgerung	81
5	Zusammenfassung	82
6	Literaturverzeichnis	83

Abkürzungsverzeichnis

A	je nach Kontext: Arcopallium; bzw. Adenosin	Ab3	3. Aortenbogen
Abb.	Abbildung	A. bidest	Aqua bidest
Acc	Ncl. accumbens	Ad	Aorta dorsalis
AK	Antikörper	Amp	Ampicillin
Ap	Arcopallium posterius	AP	Alkalische Phosphatase
APH	Area parahippocampalis	AQ	Aquaeductus mesencephali
ATP	Adenosintriphosphat	BasK	Basales Keimepithel
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat	BO	Bulbus olfactorius
bp	Basenpaare	BrdU	5-Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine serum albumine	BSTm	Bed nucleus of the stria terminalis, medial part
bzw.	beziehungsweise	C	je nach Kontext: Cor; bzw. Cytidin
°C	Grad Celsius	ca.	circa
CAM	Chorion-Allantois-Membran	Cav	Cavitas oris
Cb	Cerebellum	C''Ep''	Compartment Ependym
C''h-i-j''	Compartment "h-i-j"	CO ₂	Kohlendioxid
Coc	Cochlea	CPi	Cortex piriformis
CPM	counts per million	C''SGC''	Compartment Stratum griseum centrale
C''SGP''	Compartment Stratum griseum periventriculare	CT	Commissura tectalis
CTP	Cytosintriphosphat	DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
(d)dNTPs	(Di)desoxynukleotide	DEPC	Diethylpyrocarbonat
Di	Diencephalon	DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	DNase	DNA abbauendes Enzym
DTT	Dithiothitol	E	Ncl. entopallialis

Abkürzungsverzeichnis

E. coli	Escherichia coli	ED	Embryo-Day
EDTA	Ethylendiamintetraessig- säure	EGL	External granule layer
EST	expressed sequence tags	et al.	et alii (und andere)
FCS	fetal calf serum	FM	Foramen Monroi
FRM	Formatio reticularis mesencephali	G	Guanosin
g	Gramm	GC	Guanosin und Cytidin
GCT	Substantia grisea centralis	Gls	Glandulae salivariae
GP	Globus pallidus	G ₁ -Phase	1. G(gap)-Phase des Zellzyklus
G ₂ -Phase	2. G(gap)-Phase des Zellzyklus	GTP	Guanintriphosphat
GZ	Zona generativa	H	Hyperpallium
h	Stunde	H4	Histonprotein Typ 4
HA	Hyperpallium apicale	HBO-Lampe	Quecksilberdampfampe
HCl	Chlorwasserstoff	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hp	Hippocampus	HPLC	High pressure liquid chromatographic
Hy	Hypothalamus	Ig	Immunglobulin
IGL	Internal granule layer	Ipc	Ncl. isthmi, pars parvocellularis
K	kilo (x 10 ³)	KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht	KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogen- phosphat
L	Field L	l	Liter
LaM	Lamina mesopallialis	LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Le	Lens	LFS	Lamina frontalis superior
LO	Lobus opticus	LSt	Striatum laterale
M	je nach Kontext: Meso- pallium; bzw. Molare Masse	m	milli (x 10 ⁻³); bzw. Meter
μ	mikro (x 10 ⁻⁶)	mA	Milliampere
MAC	Makrochromosom	Mand	Arcus mandibularis

Abkürzungsverzeichnis

Max	Arcus maxillaris	M/E	Methanol/Eisessig
Med	Medulla oblongata	Mes	Mesencephalon
Met	Metencephalon	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIC	Mikrochromosom	min	Minute
Mma	Musculi masticatorii	Mo	Musculi oculorum
MOPS	Morpholinorthopropion- säure	M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
Mph	Musculi pharyngis	Ms	Medulla spinalis
Myo	Myotome	MZ	Zona marginalis
N	Nidopallium	n	nano (x 10 ⁻⁹)
N 4	Ncl. nervi trochlearis	Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid	Na ₂ HCO ₃	Natriumhydrogen- carbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat	NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ PO ₄	Natriumphosphat	NBT	Nitroblautetrazoliumsalz
Ncl.	Nucleus	nSt	Ncl. striae terminalis
OD	Optische Dichte	OD _{xxx}	Optische Dichte bei xxx nm
Ös	Ösophagus	P	Corpus pineale
p.A.	pro Analyti	PBS	phosphate buffered saline
PC	Plexus choroideus	PCL	Purkinje cell layer
PCR	Polymerasekettenreaktion	PCVL	Plexus choroideus ventriculi lateralis
PFA	Paraformaldehyd	Ph	Pharynx
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasser- stoffionenkonzentration	PHN	Ncl. periventricularis hypothalami
QBT	Äquilibrierungspuffer	QC	Waschpuffer
QF	Elutionspuffer	R	Retina
RISH	RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	RMS	rostral migrating stream
RNA	Ribonukleinsäure	RNAse	RNA abbauendes Enzym
ROT	Ncl. Rotundus	rpm	Umdrehungen pro min
rS	reife Spermien	RT	Rathke'sche -Tasche
SAC	Stratum album centrale	SDS	Natriumdodecylsulfat

Abkürzungsverzeichnis

sec	Sekunde	SFP	Stratum fibrosum periventriculare
SGC	Stratum griseum centrale	SGFS	Stratum griseum et fibrosum superficiale
Sio	Septum interorbitale	SL	Ncl. septalis lateralis
SO	Stratum opticum	S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
S-UTP	Uridintriphosphat mit einem gebundenen Schwefelatom	T	Thymidin
Tab.	Tabelle	TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TCC	Transient cell compartment	TE	Tris/EDTA
Tel	Telencephalon	Th	Thalamus
TIO	Tractus isthmo-opticus	Tr	Trachea
Tris	Tris(hydroxymethyl)amino- methan	Tsem	Tubulus seminiferus
U	Unit (Enzymaktivität)	u.s.w.	und so weiter
UTP	Uridintriphosphat	UV	Ultraviolett
V	Volt	V3	Ventriculus tertius
V4	Ventriculus quartus	VL	Ventriculus lateralis
VT	Ventriculus tecti mesencephali	VZ	Zona ventricularis
W	Wulst	X-Phosphat	5-Bromo-4-Chloro-3- Indolylphosphat Toluidinsalz in Dimethylformamid
z.B.	zum Beispiel	ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVS	Zona subventricularis		

1 Einleitung

Schon seit Aristoteles ist das Huhn ein beliebtes Modell zum Studium der Embryologie. Durch die Erkenntnis, dass das Huhn (*Gallus gallus domesticus*) dem Menschen in der Organisation des Genoms ähnlicher ist als die Maus (siehe 1.2), obwohl sich die Vögel bereits seit über 300 Millionen Jahren getrennt von den Säugern entwickelten, rückt es nun auch in der Entwicklungsgenetik in den Vordergrund. Das Genom des Huhns erweist sich aufgrund des hohen Grads an Konservierung als außerordentlich informativ (Bourque et al., 2005). Da die Vögel in der Evolution eine Mittelstellung zwischen den Säugetieren und Fischen einnehmen, gelingt es, vergleichende phylogenetische Betrachtungen für die Gesamtheit der Vertebraten anzustellen. Für vergleichende entwicklungs-genetische Untersuchungen hat sich die Darstellung von Genexpressionsmustern als besonders informativ erwiesen. Um diese Genexpressionsmuster zu interpretieren, ist es hilfreich, sie mit den Mustern der Gewebeproliferation in Beziehung zu setzen.

Aufgrund der hohen Spezialisierung der menschlichen kognitiven Fähigkeiten einerseits, und der visuellen Leistungen, verbunden mit einer unübertroffenen räumlichen Orientierung, der Vögel andererseits, ist ein Vergleich der Entwicklung des menschlichen Gehirns mit dem des Vogels besonders interessant. Entgegen früherer Meinungen, dass das Verhalten von Vögeln auf Instinkte begrenzt sei, wurde inzwischen mithilfe vieler Experimente nachgewiesen, dass die Vögel über komplexe kognitive Leistungen verfügen, wie z.B. Erinnerung und Flexibilität des Denkens (Emery und Clayton, 2004).

Ein ausgezeichnete Atlas der Entwicklungsstadien des Huhns wurde bereits 1951 von Hamburger und Hamilton vorgelegt, der 1992 als Wiederauflage erschienen ist. Die allgemeine Embryonalentwicklung des Huhns bis zum 13. Tag wurde 1998 in einem Atlas von Bellairs und Osmond dargestellt. Ein Atlas der Gehirnmorphologie des adulten Huhns wurde 1988 von Kuenzel und Masson veröffentlicht. Da in den bisher veröffentlichten Arbeiten eine Übersicht über die Proliferationsareale im Gehirn des sich entwickelnden Huhns fehlt, wird dies mit dieser Arbeit ergänzt.

1.1 Das Huhn als Modellorganismus

Das Huhn verfügt über alle Vorteile, die ein Modellorganismus aufweisen sollte. Die Handhabung der Embryonen ist einfach und preiswert, da auf aufwendige Stallungen verzichtet werden kann. Darüber hinaus muss das Muttertier nicht getötet werden, um an die Embryonen zu gelangen, was ethisch und tierschutzrechtlich gesehen Vorteile bietet. Der Embryo ist im Gegensatz zum Modellorganismus Maus während der gesamten Embryogenese zugänglich. Am offenen Ei lassen sich Beobachtungen, Untersuchungen und Eingriffe einfach durchführen. Außerdem ist es möglich, die Embryonen außerhalb des Eies zu kultivieren. Aus diesen Gründen wurde das Huhn schon immer für entwicklungsbiologische Studien herangezogen. Nachdem vor kurzer Zeit das Genom vom Huhn beschrieben wurde (www.ensembl.org), und damit alle molekularen Werkzeuge frei verfügbar sind, ist in den nächsten Jahren eine stürmische Entwicklung auf dem Gebiet der allgemeinen Genetik und Entwicklungsgenetik beim Huhn zu erwarten.

Die vergleichende Untersuchung des gesamten Genoms ist für evolutionsbiologische Fragen sehr aussagekräftig (Murphy et al., 2004; International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004). Vergleichende Untersuchungen von Funktionsänderungen der Gene werden am besten an Organismen vorgenommen, die weit entfernte Evolutionsstufen repräsentieren. Deshalb ist das Huhn in diesem Punkt ein optimaler Modellorganismus. In diesem Zusammenhang ist es besonders beeindruckend, dass die Organisation des Genoms des Huhns dem des Menschen ähnlicher ist als das der Maus, wie vergleichende Genkartierungsanalysen gezeigt haben (Brown et al., 2003; Burt et al., 1999) (siehe 1.2).

Die Entwicklungszeit im Ei ist mit 20-21 Tagen mit der Mausentwicklung vergleichbar. Das geschlüpfte Küken kann, im Gegensatz zur geborenen Maus, sofort sehen und laufen. Das Gehirn und die sensorischen Funktionen sind im Vergleich zur Maus bei Geburt viel weiter entwickelt. Das Huhn hat im Verlauf der Evolution sehr selektiv hohe sensorische Leistungen erreicht. Dies belegt die Ausbildung des Lobus opticus (siehe 1.3.2). Das Cerebellum der Vögel hat aufgrund der enormen Gleichgewichtsleistungen beim Fliegen große Ausmaße und ausgeprägte Faltungen entwickelt (siehe 1.3.3). Dies spiegelt einen hohen Grad an Spezialisierung wider.

Wenn ursprünglich angenommen wurde, dass die Vögel im Verhalten auf Instinkte begrenzt sind, wurde nun in vielen Experimenten gezeigt, dass Vögel durchaus komplexe Verhaltensmuster, soziale Fähigkeiten und aktive Lernprozesse aufweisen. Auch die Herstellung und der Gebrauch von Werkzeugen wird von Vögeln praktiziert, wobei sie durch-

aus imstande sind, dies ohne soziale Kontakte und Vorbilder zu erlernen, was die Beteiligung der Vererbung an derartigen Fähigkeiten vermuten lässt (Kenward et al., 2005). Das Vogelgehirn vollbringt erstaunliche Leistungen, wie z.B. ausgezeichnete räumliche Orientierung, Erinnerung und Flexibilität des Denkens (Emery und Clayton, 2004). Wegen der komplexen kognitiven Leistungen von Vögeln ist die neurowissenschaftliche Forschung sehr am Aufbau und Funktion des Gehirns der Vögel interessiert.

1.2 Das Genom des Huhns

Der Karyotyp des Huhns enthält 39 Chromosomenpaare, von denen 9 als Makrochromosomen (MACs), einschließlich der Geschlechtschromosomen Z und W, und 30 als Mikrochromosomen (MICs) klassifiziert wurden (Bloom et al., 1993). Zytologisch sind die MICs 10-39 nicht unterscheidbar, da sie eine Länge von nur 0,5-2,5 μm aufweisen (Rodionov, 1996). Zwei Drittel des Genoms befindet sich auf den MACs 1-9, jedoch ist die Gendichte der MICs weitaus höher (Burt, 2002; Smith et al., 2000). Man geht davon aus, dass sich auf den MACs ca. 1/3 der Gene und auf den MICs ca. 2/3 der Gene befinden (McQueen et al., 1998). Wie bei anderen Vertebraten besitzen die meisten Gene im Huhn CpG-Islands (Cooper et al., 1983; McQueen et al., 1996), welche mit den Promotoren von Genen in Verbindung gebracht werden. Die Gene können von dem größten Teil der nicht-kodierenden DNA durch ihren hohen GC-Gehalt und den Mangel an Cytosin-Methylierung (Cross und Bird, 1995) unterschieden werden. *In-situ*-Hybridisierung zeigen die CpG-Islands konzentriert auf den Mikrochromosomen, was auf die hohe Gendichte dieser Chromosomen hinweist. Makrochromosomen hingegen sind relativ arm an CpG-Islands (McQueen et al., 1996).

GC-reiche und genreiche Regionen sind mit einer hohen Rekombinationsrate verbunden (Eyre-Walker, 1993; Hurst et al., 1999). Das wird ebenfalls bei den MICs beobachtet. Die Rekombinationsrate übertrifft die der Säuger um das 10-fache.

Generell ist das Genom der Vögel im Vergleich zum menschlichen Genom kleiner. Die Größe des Hühnergenoms beträgt $1,1 \times 10^9$ bp, die des menschlichen Genoms 3×10^9 bp. Vergleichende Genkartierungsanalysen haben gezeigt, dass die Organisation des Genoms des Huhns dem des Menschen ähnlicher ist als die Genomorganisation der Maus (Brown et al., 2003; Burt et al., 1999). Im Maus-Mensch-Vergleich wurden 195 autosomal konservierte Segmente gefunden, im Huhn-Mensch-Vergleich hingegen nur ca. 96. Das heißt, dass beim Vergleich des Genoms von Huhn und Mensch 96 große, autosomal konservierte Segmente gefunden wurden. Ein Vergleich des Genoms zwischen Maus und Mensch ergab

hingegen eine Verteilung der autosomal konservierten Bereiche auf 195 kleinere Segmente. Dies lässt erkennen, dass sich die Organisation des Genoms der Maus während der Evolution stärker veränderte als die des Huhns. Inzwischen belegen die vergleichenden Genkartierungsdaten, dass die Maus einen besonders starken Umbau des Genoms in der Evolution durchgemacht hat.

Diese Erkenntnisse unterstreichen die wichtige Position des Huhns in der Wirbeltiergenetik. Zum einen kann aufgrund der relativen Stabilität des Genoms die genetische Ausstattung unserer gemeinsamen Vorfahren untersucht werden, zum anderen ist es sehr interessant zu untersuchen, wie sich trotz ähnlicher Genomorganisation derartig unterschiedliche Organismen entwickeln konnten.

1.3 Vergleich der Gehirne von Huhn und Mensch

Die Gehirne von Vögeln und Säugern sind sich in frühen Entwicklungsstadien sehr ähnlich. Für die basale Segmentierung des Gehirns sind bei Vögeln und Säugern dieselben Gene verantwortlich (Puelles et al., 2000; Medina und Reiner, 2000). Die Gehirne unterscheiden sich aber deutlich in der Entwicklung des Telencephalons der adulten Tiere.

Die Ähnlichkeit der embryonalen Gehirne ist in den Abbildungen 1 und 2 zu erkennen. Hier sieht man, dass zu Beginn der Embryonalentwicklung das Gehirn des Huhns kaum von dem des Menschen zu unterscheiden ist. Vergleichende Untersuchungen der Embryonalentwicklung haben gezeigt, dass das Telencephalon des Huhns dem des Menschen in frühen Entwicklungsstadien sehr ähnlich ist (Striedter, 1997).

Das Telencephalon des adulten Huhns unterscheidet sich stark von dem des adulten Menschen, siehe Abbildung 3 und 4. So fehlen beispielsweise die Sulci und Gyri im Aufbau des Vogel-Telencephalons. Das Telencephalon des Vogels zeigt nicht den typisch geschichteten Aufbau, wie er im Neocortex der Säugetiere zu finden ist, sondern eine nukleäre Struktur (Kuenzel und Masson, 1988). Deshalb nahm man an, dass sich das Telencephalon des Huhns aus Derivaten der Basalganglien entwickelt, siehe Abbildung 5, und somit den Basalganglien des Menschen entspricht (Edinger et al., 1903). Beim Menschen sind diese relativ klein, befinden sich im Marklager und sind unter anderem für die Koordination der Motorik verantwortlich. Die Abbildung 6 zeigt einen Querschnitt durch das Endhirn einer Taube. Durch die Annahme des telencephalen Ursprungs in Basalganglienderivaten war man der Meinung, dass große Areale des Telencephalons der Vögel den menschlichen Basalganglien vergleichbare Funktionen besitzen, und bezeichnete sie dementsprechend, z.B. als Hyperstriatum, Neostriatum u.s.w. (Edinger et al., 1903). Durch Untersu-

chungen der Funktionen dieser Bereiche (Fernandez et al., 1998; Puelles et al., 2000; Reiner et al., 1998; Durstewitz et al., 1999; Shimizu, 2001; Medina und Reiner, 2000) wurde deutlich, dass die Funktionen der meisten als Striatum bezeichneten Strukturen denen des menschlichen Neocortex ähneln. Aufgrund dieser Erkenntnisse erfolgte eine Nomenklaturreform (Reiner et al., 2004; The Avian Brain Nomenclature Consortium, 2005), welche nicht mehr den Ursprung, sondern die Funktion der Areale berücksichtigt, siehe Tabelle 1. Die neue Nomenklatur wird in dieser Arbeit bereits verwendet. Auf spezifische Entwicklungsmuster des Telencephalons in Vögeln und Säugetieren wird im Abschnitt 1.3.1 näher eingegangen. Eine die 6-fach-Schichtung des Neocortex der Säuger weit übertreffende Struktur ist der Lobus opticus der Vögel. Dieser ist in der Abbildung 4 bereits makroskopisch deutlich zu erkennen. Im Abschnitt 1.3.2 wird auf diese Gehirnstruktur näher eingegangen. Die Abbildung 4 zeigt auch, dass das Cerebellum des Vogels relativ groß ist und ausgeprägte Faltungen aufweist. Dies korreliert mit der Leistungsfähigkeit des Bewegungsapparates und des Gleichgewichtssinnes, welche z.B. für das Flugvermögen unabdingbar sind. Der Abschnitt 1.3.3 beschreibt das Cerebellum näher.

Der Hippocampus, als wichtige Struktur für Lern- und Gedächtnisprozesse beim Menschen, weist bei den Vögeln eine andere Lokalisation als der humane auf. So besitzt der Hippocampus des Vogels eine dorsale, eher oberflächliche Position, und der des Menschen liegt in der Tiefe des Gehirns der medialen Fläche des Temporallappens an. Dennoch ist der Hippocampus des Vogels dem des Menschen funktionell homolog. Untersuchungen zeigten beispielsweise, dass bei Läsionen im Hippocampus sowohl beim Vogel als auch beim Säugetier das Erstellen einer neuen räumlichen Karte gestört ist, nicht jedoch die Erinnerung an die vor der Läsion bereits vorhandene räumliche Kartierung (Colombo und Broadbent, 2000). Dies lässt erkennen, dass der Hippocampus bei beiden Wirbeltierklassen neben anderen Funktionen für die Merkfähigkeit neuer Informationen und auch für die Verarbeitung räumlicher Informationen notwendig ist. Des Weiteren entwickelt sich der Hippocampus sowohl beim Menschen als auch beim Vogel aus dem Archipallium.

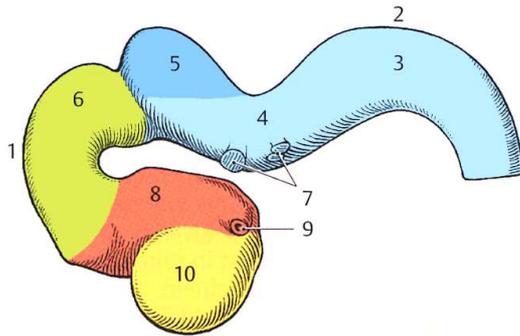


Abb. 1

Gehirn eines menschlichen Embryos von 10 mm Scheitel-Steiß-Länge (Kahle, 2001).

Legende:

1. Scheitelbeuge;
2. Nackenbeuge;
3. Medulla oblongata;
4. Pons;
5. Cerebellum;
6. Mesencephalon;
7. Hirnnervenaustrittspunkte;
8. Diencephalon;
9. Augenbecher;
10. Telencephalon.

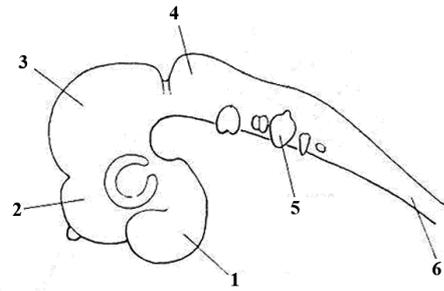


Abb. 2

Gehirn eines 4-Tage alten Hühnerembryos (Bellairs und Osmond, 1998).

Legende:

1. Telencephalon;
2. Diencephalon;
3. Mesencephalon;
4. Metencephalon;
5. Ohrbläschen;
6. Medulla spinalis.

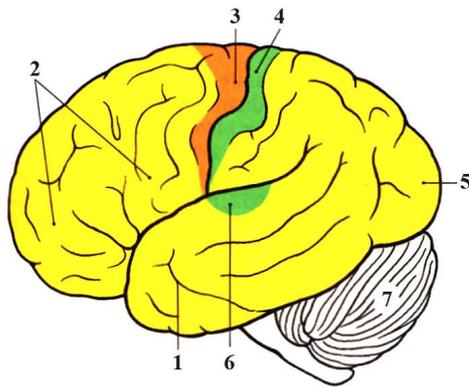


Abb. 3

Gehirn eines adulten Menschen
(Kahle, 2001).

Legende:

1. Temporallappen;
2. Frontallappen;
3. Motorischer Cortex;
4. Sensibler Cortex;
5. Optischer Cortex;
6. Akustischer Cortex;
7. Cerebellum.

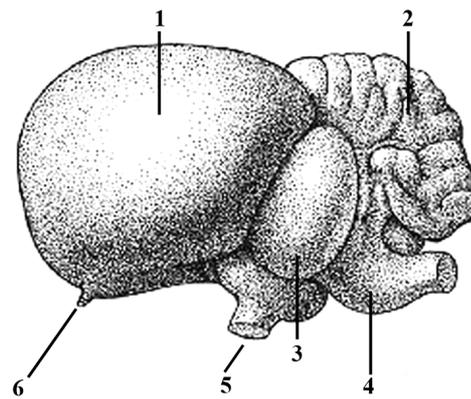


Abb. 4

Gehirn eines adulten Vogels
(Starck, 1982).

Legende:

1. Telencephalon;
2. Cerebellum;
3. Lobus opticus;
4. Rhombencephalon;
5. Nervus opticus;
6. Nervus olfactorius.

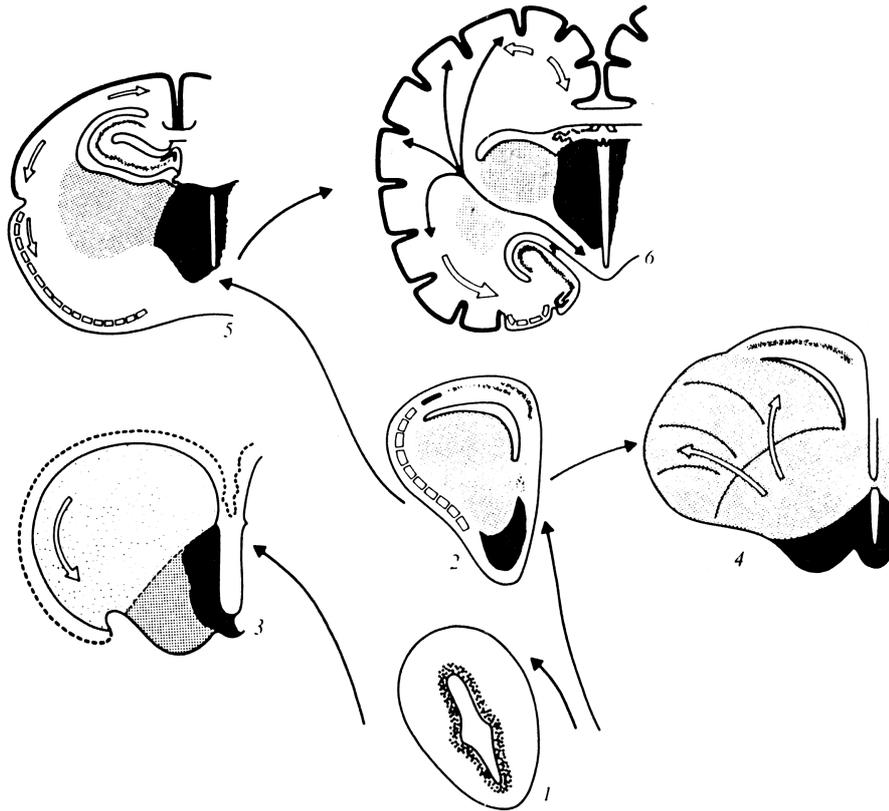


Abb. 5

Ursprüngliche Vorstellung der Differenzierungslinien des Endhirns bei Wirbeltieren, erläutert am Querschnitt durch das Vorderhirn (Starck, 1982).

Schwarz: Diencephalon;

dicht punktiert: Basalganglien und deren Abkömmlinge;

locker punktiert: Pallium bei Knochenfischen;

weiße Pfeile: Wachstumsrichtungen;

schwarze Pfeile in 6: Neencephale Bahnen.

1: Amphibien;

2: Lacertilier;

3: Teleostier;

4: Vogel;

5: niederer Säuger;

6: evolvierter Säuger.

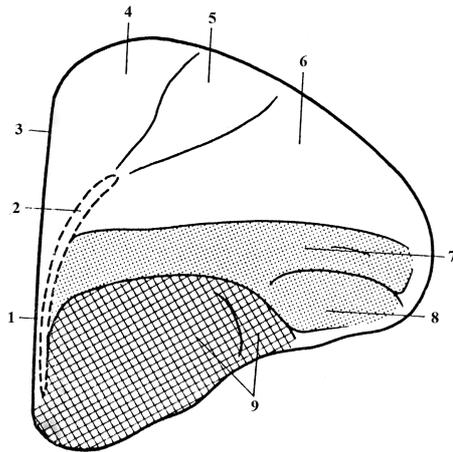


Abb. 6

Beispiel für die ursprüngliche Bezeichnung der telencephalen Strukturen des Vogels.
Querschnitt durch das Endhirn einer Taube (Starck, 1982).

- 1 – Septum;
- 2 – Ventrikel;
- 3 – Archipallium;
- 4 – Hyperstriatum accessorium;
- 5 – Hyperstriatum dorsale;
- 6 – Hyperstriatum ventrale;
- 7 – Neostriatum;
- 8 – Ectostriatum (laterales Neostriatum);
- 9 – Palaeostriatum.

Tabelle 1: Alte und neue Bezeichnungen der Gehirnstrukturen des Huhns (Nomenklaturreform 2002)

Alte Bezeichnung	Neue Bezeichnung
A = Archistriatum	A = Arcopallium
Acc = Ncl. Accumbens	BSTm = Bed nucleus of the stria terminalis, medial part
E = Ectostriatum	E = Ncl. Entopallialis
HA = Hyperstriatum accessorium	HA = Hyperpallium apicale
HD = Hyperstriatum dorsale	HD = Hyperpallium densocellularum
HV = Hyperstriatum ventrale	M = Mesopallium
LH = Lamina hyperstriatica	LaM = Lamina mesopallialis
LPO = Lobus parolfactorius	MSt = Striatum mediale
Neo = Neostriatum	N = Nidopallium
PA = Paleostriatum augmentatum	LSt = Striatum laterale
PP = Paleostriatum primitivum	GP = Globus pallidus
W = Wulst	H = Hyperpallium

1.3.1 Entwicklungsmuster des Telencephalons

Die Zellen des Telencephalons werden sowohl bei den Säugetieren als auch bei den Vögeln vorwiegend durch Stammzellen der Zona subventricularis gebildet (Boulder-Committee, 1970; Sidman und Rakic, 1982; Striedter und Keefer, 2000). Bis vor einigen Jahren war man der Meinung, dass die embryonale Entwicklung des Telencephalons des Huhns nach dem sogenannten Outside-in-Muster abläuft. Das bedeutet, dass die Zellen, die sehr früh gebildet werden, durch die nach ihnen gebildeten Zellen nach außen gedrängt werden, so dass im adulten Huhn die älteren Zellen an der Oberfläche und die jüngeren in der Tiefe des Gehirns zu finden sind. Es bedeutet auch, dass keine Migration der jungen Zellen entlang der alten Zellen stattfindet (Tsai et al., 1981). Im Gegensatz dazu ist seit langem bekannt, dass sich das Telencephalon der Säugetiere nach dem Inside-out-Muster entwickelt, wobei die jungen Zellen in der Lage sind, über die zuvor gebildeten Zellen nach außen zu wandern (Angevine und Sidman, 1961; Berry und Rogers, 1965). Dies wurde als ein Schlüsselereignis in der Evolution des Gehirns der Säugetiere betrachtet. Inzwischen wird dieser Sachverhalt kontrovers diskutiert. So wiesen Striedter und Keefer

nach, dass auch in der Entwicklung des Telencephalons des Huhns junge Zellen die Fähigkeit besitzen, über ältere Zellen hinweg zu wandern. Auch waren viele spät gebildeten Zellen an der Oberfläche des Gehirns nachzuweisen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gebildeten Zellen durchmischen und nicht nur eine bloße Verdrängung stattfindet. Aufgrund dieser Beobachtungen gehen die Forscher auch bei den Vögeln von einem Inside-out-Entwicklungsmuster aus. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen früherer Studien wird auf inzwischen verfeinerte Methoden und Techniken zurückgeführt (Striedter und Keefer, 2000).

1.3.2 Der Lobus opticus

Der Lobus opticus ist Ausdruck der hohen Spezialisierung der Vögel auf visuelle Leistungen. So können Seeadler ihre Beute aus 2000 m Höhe erkennen. Stare und viele andere Vögel können UV-Licht sehen, was ihnen z.B. bei der Geschlechtsdifferenzierung ihrer Artgenossen hilft, da diese teilweise nur unter UV-Licht unterscheidbar sind. Auch einige Schimmelpilzarten leuchten unter UV-Licht in bestimmten Farben, was bei der Reifebeurteilung von Früchten hilfreich ist.

Der Lobus opticus erfüllt eine zentrale Rolle bei der Verarbeitung visueller Informationen und wird aufgrund seines komplexen Aufbaus in der Neurowissenschaft als experimentelles Modell für die Entwicklung komplexer neuronaler Strukturen betrachtet (Scicolone et al., 1995).

Diese Struktur des Gehirns entwickelt sich aus dem dorsalen Anteil des Mesencephalons. Der Lobus opticus korreliert mit dem humanen Colliculus superior, dem oberen Anteil des Tectum mesencephali, einer Schaltstätte für akustische und optische Bahnen. Der Colliculus superior des Menschen empfängt Afferenzen hauptsächlich von peripheren Retinaanteilen und besteht aus 7 Schichten. Er steuert unbewusste reflektorische Begleitprozesse der visuellen Wahrnehmung, wie z.B. die sakkadische Blickmotorik. Des Weiteren ist der Colliculus superior bei der Steuerung der fixierenden Ausrichtung auf Objekte des peripheren Gesichtsfeldes beteiligt.

Der Lobus opticus der Vögel setzt sich aus 15 Schichten zusammen. Eine derartige Vielschichtigkeit tritt im humanen Gehirn nicht auf. Die Funktion des Lobus opticus beschränkt sich nicht allein auf die Weiterleitung der retinalen Informationen und auf reflektorische Begleitprozesse bei der visuellen Wahrnehmung. Diese Hirnstruktur ist ebenso für die Verarbeitung der visuellen Information und für die optische Orientierung verantwortlich (Matsushima et al., 2003). Dies wird an folgendem Experiment besonders deutlich: Eine komplette Telencephalektomie bei Vögeln führte zu keiner Beeinträchtigung der vi-

suell evozierten senso-motorischen Koordination (Kovach und Kabai, 1993). Diese Art der Reizverarbeitung könnte das menschliche Gehirn nach vergleichbarem Eingriff nicht leisten.

1.3.3 Das Cerebellum

Das Cerebellum, als Integrationsorgan für die Koordination und Feinabstimmung der Körperbewegungen und für die Regulierung des Muskeltonus, ist im Aufbau in der Entwicklung des ZNS der Wirbeltiere hoch konserviert. Die Abbildung 4 zeigt, dass das Cerebellum des Vogels relativ groß ist und ausgeprägte Faltungen aufweist. Dies korreliert mit der Leistungsfähigkeit des Bewegungsapparates und des Gleichgewichtssinnes, welche z.B. für das Flugvermögen unabdingbar sind. Es ist sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch dem Cerebellum der Säugetiere sehr ähnlich.

1.4 Untersuchungen zur Zellproliferation

Als eine Voraussetzung für die Beurteilung von Genexpressionsmustern wird die Kenntnis der Muster des Gewebewachstums bzw. der Zellproliferation benötigt, da ein Vergleich von Proliferations- mit Genexpressionmustern funktionell unbekannter Gene Rückschlüsse auf die Beteiligung der untersuchten Gene an Proliferationsprozessen geben kann.

Zur Zellzyklusdauer der Hühnerembryonen ist folgendes bekannt: Das Hühnerei wird ca. 24 h nach der Befruchtung gelegt. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Keimscheibe bereits aus ca. 60000 Zellen (Eyal-Giladi und Kovach, 1976), d.h. es haben 15-16 Zellteilungen in 24 h stattgefunden, was einer Zellzyklusdauer von 1,5 h entspricht. Dieser rasanten Zellteilung steht eine Zellzyklusdauer der Säugerzellen von ca. 12 h gegenüber.

Insgesamt wachsen die Hühnerembryonen im Vergleich zu den Embryonen der Maus schneller, siehe Tabelle 2. Es ist jedoch unklar, ob die Hühnerembryonen während der gesamten Embryonalentwicklung eine Zellzyklusdauer von 1,5 h aufweisen.

Tabelle 2: Gewichtszunahme des Mausembryos und des Hühnerembryos

Mausembryo: Tage post conceptionem	Mausembryo : Durchschnittliches Gewicht in mg	Hühnerembryo: Tage post conceptionem	Hühnerembryo : Durchschnittliches Gewicht in mg
11	25,5	5	130
13,5	130	7	570
16	580	9	1530
18,5	1480	19	255620

1.4.1 Markierung mit BrdU

Um die Zellproliferation und die Dauer des Zellzyklus zu untersuchen, ist die Bromdesoxyuridin(=BrdU)-Markierung eine geeignete Methode. BrdU ist ein Thymidinanalogon (Abbildung 7 und 8) und wird mit gleicher Einbaurrate wie das Thymidin während der S-Phase in die DNA eingebaut (Schutter et al., 1987; Lanier et al., 1989). Es ist ein nicht radioaktives Nukleotidderivat und wird deshalb dem früher verwendeten ³H-Thymidin vorgezogen. Die Applikation von BrdU ist relativ einfach: Es kann direkt dem Zellkulturmedium zugefügt, bzw. in die Venen des Embryos injiziert werden. Nach Vorbehandlung der Zellen kann das inkorporierte BrdU mit spezifischen Antikörpern im Zellkern nachgewiesen werden.

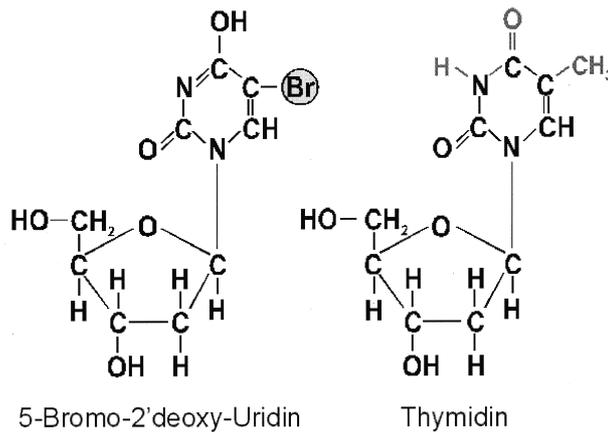


Abb. 7
Gegenüberstellung der chemischen Struktur von 5-Bromo-2'deoxy-Uridin und Thymidin.

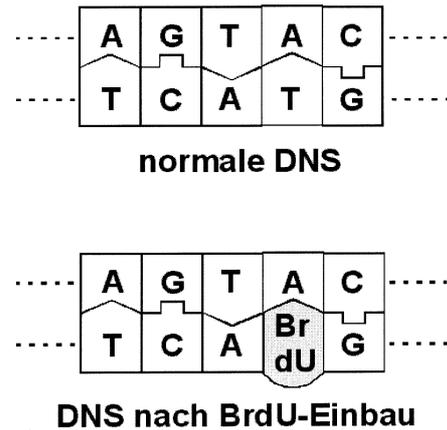


Abb. 8
Schematische Darstellung von Desoxyribonukleinsäure (DNS) ohne und mit Einbau von BrdU. BrdU nimmt kompetitiv den Platz von Thymidin in der DNS ein.

1.4.2 RNA-*in-situ*-Hybridisierung / Histon H4

Histone sind Proteine, welche durch Bindung an die DNA eine Verpackung und Komprimierung der DNA in Form von Chromatin ermöglichen. Es sind 5 verschiedene Typen von Histonen bekannt: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Da bei Zellteilungen neue DNA synthetisiert wird, müssen für diese ebenfalls Histon-Proteine gebildet werden. Somit korreliert die Expression der Histon-Proteine mit der Zellproliferation. Daher stellt die RNA-*in-situ*-Hybridisierung mit einer Sonde, die die RNA des Histon-H4-Proteins kodiert, eine weitere Methode zur Untersuchung der Proliferation dar. Die Sonde wird radioaktiv markiert, wodurch eine höhere Sensitivität erreicht wird als mit nicht-radioaktiven Verfahren. Für diese Methode wird jedoch relativ viel Zeit benötigt (ca. 3-4 Wochen).

Da die BrdU-Markierung ohne die Verwendung von Radioaktivität möglich ist, was die Strahlenbelastung im Labor reduziert und weniger Zeit in Anspruch nimmt (1-2 Tage), bietet diese Methode viele Vorteile. Außerdem ist die Bestimmung der Lokalisation der markierten Zellen bei der RNA-*in-situ*-Hybridisierung weniger exakt. Man beobachtet nach Autoradiographie das Präparat im Dunkelfeld, wobei das resultierende Signal dem von den Silberkörnern reflektierten Streulicht entspricht. Dieser Nachteil beeinflusst die

Untersuchungen zur Gehirnproliferation jedoch kaum, da keine einzelnen Zellen, sondern proliferierendes Gewebe dargestellt werden soll.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Durch die Erkenntnis, dass das Huhn dem Menschen in der Organisation des Genoms ähnlicher ist als die Maus, ist das Huhn als Modell für entwicklungs-genetische Untersuchungen wieder sehr populär geworden. Zu Beginn des Jahres 2004 wurde eine vorläufige DNA-Sequenz vom Genom des Huhnes der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt (www.ensembl.org). Um herauszufinden, wann Gene, die beim Menschen für die Ausbildung von Strukturen, die mit dem Denken und Lernen assoziiert sind, diese Funktion aufgenommen haben, werden in unserem Labor Genexpressionsuntersuchungen an Maus- und Hühnerembryonen durchgeführt. Um die Expressionsmuster richtig deuten zu können, benötigt man nicht nur einen genauen anatomischen Atlas der Hirnentwicklung, sondern auch Kenntnis über das Hirnwachstum. Da die bisher veröffentlichten Atlanten diesen Bezug zur Hirnentwicklung nicht enthalten, werden in dieser Arbeit die Proliferationsareale im Gehirn von Hühnerembryonen vom Tag 5 bis zum Tag 19, was den Stadien 27 – 45 nach Hamburger/Hamilton entspricht, und im Gehirn eines adulten, 50-Tage alten Huhns untersucht. Mithilfe der daraus gewonnenen Darstellung der Proliferationsmuster können in darauf folgenden Studien Vergleiche mit Genexpressionsmustern durchgeführt werden und Rückschlüsse auf die Beteiligung der untersuchten Gene an der Proliferation gezogen werden.

Des Weiteren wird die Dauer des Zellzyklus mithilfe von Fibroblasten-Zellkulturen von Hühnerembryonen mit der Durchflusszytometrie bestimmt. Da die Hühnerembryonen schneller als die Mausembryonen wachsen, und die Zellen einen geringeren DNA-Gehalt aufweisen, wird erwartet, dass die Hühnerfibroblasten eine geringere Zellzyklusdauer aufweisen. Fraglich ist jedoch, ob die zu Beginn der Embryonalentwicklung des Huhns sehr schnell ablaufenden Zellteilungen mit einer Zellzyklusdauer von nur 1,5 h diese Geschwindigkeit beibehalten.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien

Ammoniumacetat	Fa. Merck, Darmstadt
Antikörper:	
BrdU-Antikörper aus Maus	Fa. Roche, Mannheim
Anti-Maus-Antikörper aus Schaf (an alkalische Phosphatase gekoppelt)	Fa. Roche, Mannheim
Basic Fuchsin Färbung:	
Basic Fuchsin Hydrochloride	Fa. ICN Biomedicals, Frankfurt
Bromdesoxyuridin:	
BrdU-Markierungsreagenz (BrdU-labeling-and-detection-kit 2)	Fa. Roche, Mannheim
BSA, bovine serum albumine	Fa. Serva, Heidelberg
CyStain DNA 1step, Färbelösung	Fa. Partec, Münster
DEPC, Diethylpyrocarbonat	Fa. Sigma, München
Dextransulfat	Fa. Pharmacia, Freiburg
DNA-Standards:	
100 bp-Längenstandard	Fa. Pharmacia, Freiburg
1 kb-Längenstandard	Fa. GIBCO BRL, Eggenstein
DTT, Dithiothreitol	Fa. Sigma, München
EDTA	Fa. Serva, Heidelberg
Ethanol-Fixierung:	
100% Ethanol	Fa. Merck, Darmstadt
50 mM Glycinpuffer , pH 2,0	Fa. Fluka, Neu-Ulm
Ethidiumbromid (EtBr)	Fa. Sigma, München
Eukitt Eindeckmedium	Fa. O. Kindler, Freiburg
Extran	Fa. Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Fa. Sigma, München
Formamid	Fa. Fluka, Neu-Ulm
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Fa. Amersham, Braunschweig

Giemsa-Färbelösung:

0,3 M KH_2PO_4	Fa. Merck, Darmstadt
0,3 M Na_2HPO_4	Fa. Merck, Darmstadt
Giemsa-Lösung	Fa. Merck, Darmstadt
HCl, 1 M	Fa. Merck, Darmstadt
H_2O_2 , 30%	Fa. J. T. Baker, B.V.-Deventer, Holland

Inkubationspuffer:

66 mM Tris-Puffer	Fa. Roche, Mannheim
0,66 mM MgCl_2	
1 mM 2-Mercapto-Ethanol	

Isopropanol Fa. Merck, Darmstadt

Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator Fa. Merck, Darmstadt

Kodak D 19 Entwickler Fa. Sigma, München

Kodak NBT-2 Fotoemulsion Fa. Sigma, München

Magnesiumchlorid Fa. Roche, Mannheim

M/E-Fixierlösung:

Methanol p.A.	Fa. Merck, Darmstadt
Eisessig p.A.	Fa. Merck, Darmstadt
Mini quick spin RNA columns	Fa. Roche, Mannheim
Natriumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt
NBT-/X-Phosphat-Färbelösung	Fa. Roche, Mannheim
O.C.T. Compound –Tissue TEK	Fa. Sakura Finetek, Zoeterwoude / Holland

Paraformaldehyd, 16% Fa. Merck, Darmstadt

PBS, 9,55 g/l Fa. Biochrom, Berlin

Phenol Fa. Roth, Karlsruhe

Polyvinylpyrolidone (PVP) Fa. Sigma, München

Proteinase K:

aus Dneasy® Tissue Kit 50 Fa. Qiagen, Hilden

Qiagen Plasmid Midi Kit Fa. Qiagen, Hilden

Restriktionsendonukleasen: Fa. Pharmacia, Freiburg

EcoR1

Not1

RNA aus E.coli	Fa. Calbiochem, La Jolla / USA
RNase A	Fa. Sigma, München
RNase Inhibitor	Fa. Roche, Mannheim
RNA-Polymerasen:	Fa. Roche, Mannheim
T3-Polymerase	
T7-Polymerase	
³⁵ S- α -UTP	Fa. Amersham, Braunschweig
SDS, Natriumdodecylsulfat	Fa. Serva, München
Silicon-Lösung	Fa. Serva, Heidelberg
SSC (2x), pH 7,0:	
3 M NaCl	Fa. Merck, Darmstadt
0,3 M NaCitrat	Fa. Merck, Darmstadt
Sucrose-Lösung	Fa. Sigma, München
Taq PCR Core Kits	Fa. Qiagen, Hilden
Thymidin	Fa. Fluka, Neu-Ulm
Tris-HCl	Fa. Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA-Lösung:	
0,15% Trypsin	Fa. Biochrom, Berlin
0,08% EDTA	Fa. Biochrom, Berlin
Waschlösung:	
Hank`s Lösung	Fa. Biochrom, Berlin
Zellkulturmedium:	
DMEM (Dulbecco`s MEM 10x)	Fa. Biochrom, Berlin
Gentamycin	Fa. Biochrom, Berlin
Glutamin	Fa. Biochrom, Berlin
FCS	Fa. Biochrom, Berlin
Na ₂ HCO ₃ (7,5%)	Fa. Merck, Darmstadt

2.1.2 Spezielle Materialien und Geräte

Cell Counter Analyser	Fa. Partec, Münster
Deckgläser	Fa. Menzel, Darmstadt
Fixogum	Fa. Marabu, Tamm
Filme	Fa. Agfa, Leverkusen
	Fa. Fuji, Tokio (Japan)
Röntgenfilme DX 10	Fa. Fuji, Tokio (Japan)

ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Fa. Pharmacia, Freiburg
AxioCam	Fa. Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge 5402	Fa. Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Fa. DuPont, Bad Homburg
Kunststoffkulturflaschen T25	Fa. NUNC TM Brand Products, Wiesbaden
Lichtmikroskop	Fa. Zeiss, Oberkochen
Objektträger, reinweiß	Fa. Menzel, Darmstadt
Stereomakroskop SV 8	Fa. Zeiss, Oberkochen
Szintillationszähler 1209	Fa. LKB, Heidelberg
Tumbling Table WT 12	Fa. Biometra, Göttingen

2.1.3 Lösungen

Ampicillinhaltiger Nährboden:

Stammlösung: 25 mg/ml in H₂O,
50 mg Ampicillin in 1 l LB-Medium

BSA:

1% BSA in PBS

DEPC-H₂O:

0,1% Diethylpyrocarbonat in A. bidest über Nacht bei 50°C inkubieren, dann autoklavieren

DTT-Lösung:

2,2 M Dithiothieitol
100 mM Na-Acetat (pH 7,5)

EDTA-Stammlösung:

0,5 M in H₂O (pH 8)

Ethanol-Fixierung:

70 ml 100% Ethanol
30 ml Glycinpuffer (50 mM, pH 2,0)

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg/ml in H₂O

Gel-Ladepuffer:

0,1% Xylencyanol
0,2% Orange G
20% Ficoll in TE-Puffer

Materialien und Methoden

Giemsa-Färbelösung (7%):

5 ml KH_2PO_4 (0,3 M)
5 ml Na_2HPO_4 (0,3 M)
7 ml Giemsa-Lösung
A. bidest ad 100 ml

Hank`s Waschlösung:

50 ml 10x Hank`s
2,35 ml 7,5% NaHCO_3
A. bidest ad 500 ml

Hybridisierungspuffer (10x):

3 M NaCl
0,1 M Tris-HCl
0,1 M Na_3PO_4 (pH 6,8)
50 mM EDTA
0,2% Ficoll 400

LB-Medium:

1% NaOH
1% Bacto-Tryptone
0,5% Hefe-Extrakt
NaOH ad pH 7,2

M/E-Fixierlösung:

Methanol p.A.
Eisessig p.A.
Mischungsverhältnis 3:1

PBS (10x):

95 g PBS ad 1 l DEPC- H_2O

Puffer P1 (Resuspensionspuffer):

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A

Puffer P2 (Lysepuffer):

200 mM NaOH
1% SDS

Puffer P3 (Neutralisationspuffer):

3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5

Puffer QBT (Äquilibrierungspuffer):

750 mM NaCl

50 mM MOPS, pH 7

15% Isopropanol

0,15% Triton[®]X-100

Puffer QC (Waschpuffer):

1,0 M NaCl

50 mM MOPS, pH 7

15% Isopropanol

Puffer QF (Elutionspuffer):

1,25 M NaCl

50 mM MOPS, pH 8,5

15% Isopropanol

Substratpuffer (pH 9,5):

100 mM Tris-HCL-Puffer

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

TBE-Puffer (1x):

89 mM Tris-HCl

89 mM Borsäure

2 mM EDTA (pH 8,0)

TBS (10x):

8 g NaCl

0,2 g KCl

2,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,4)

A. bidest ad 100 ml

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

Thymidin, 200 mM:

242 mg Thymidin (M=242)

5 ml DMSO-Lösung

Zellkulturmedium:

50 ml DMEM (Dulbecco`s MEM 10x)
2,5 ml Gentamycin
5 ml Glutamin
50 ml FCS
14,6 ml Na₂HCO₃ (7,5 %)
A. bidest ad 500 ml

2.2 Verwendete DNA-Sequenzierungsprimer

Sequenz:

T3 ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
T7 TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

2.3 Methoden

2.3.1 Versuche mit Zellkulturen

2.3.1.1 Herstellung und Behandlung der Hühner-Fibroblasten-Zelllinie

Zur Herstellung einer Hühner-Embryo-Fibroblasten-Zellkultur wurden Hühnerembryonen am 6. Entwicklungstag (Stadium 29 nach Hamburger / Hamilton) aus dem Ei präpariert (siehe 2.3.2.3), in sterilem 1 x PBS (9,55 g/l) gewaschen und zerkleinert. Die entstandenen Gewebestücke wurden auf 2-3 T25-Gewebekulturflaschen verteilt. Jeder Flasche wurden 5,0 ml Zellkulturmedium und CO₂ zugefügt. Die Fibroblasten setzten sich bei der Inkubation im Brutschrank bei 37°C am Boden der Zellkulturflaschen innerhalb von 24 h ab. Die übrigen Zellen wurden mit der Hank`s-Waschlösung entfernt.

Anstelle der sofortigen Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen auch bei -190°C in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Bedarf aufgetaut werden.

Die Ampulle mit den im flüssigen Stickstoff tiefgefrorenen Zellen wurde zunächst im Wasserbad (37°C) vorsichtig aufgetaut. Die Zellen wurden in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Unter ständigem Schütteln wurde insgesamt 9,0 ml kaltes Zellkulturmedium innerhalb von 10 min langsam dazu getropft. Die Zellen wurden bei 1000 rpm 8 min zentrifugiert, der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 8,0 ml Zellkulturmedium gelöst. Das gelöste Zellpellet wurde bei 1000 rpm erneut 8 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 4,0 ml Zellkulturmedium gelöst und auf zwei T25-Gewebekulturflaschen aufgeteilt. Zuletzt wurden 3,0 ml Zellkulturmedium unter Zugabe von CO₂ in jede Kulturflasche gegeben. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ passagiert.

Die Kulturen wurden in T25-Gewebekulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und einem pH von 7,2 gehalten. Nach Bildung eines dichten Zellrasens wurde ca. alle 2 Tage eine neue Subkultur angelegt. Dazu wurden die Kulturen mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,15% Trypsin/0,08% EDTA) vom Flaschenboden gelöst, Zellkulturmedium dazugegeben und die Zellen 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit Zellkulturmedium gelöst und auf 2-3 neue Gewebekulturflaschen verteilt.

2.3.1.2 Synchronisierung und Abbruch der Zellkultur

Da es für die Untersuchung der Zellzyklusdauer von Vorteil ist, eine synchronisierte Zellkultur zu verwenden, wurden die Fibroblastenzellkulturen für 6-10 h mit einem Thymidinüberschuss (2 mM) behandelt.

Thymidin wirkt in dieser Konzentration als Inhibitor der DNA-Synthese und führte zum Arrest der Zellen am G₁-/S-Phase-Übergang (Schempp et al., 1978). Zur Lösung des Blocks wurde ein Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt.

Eine Stunde vor dem Abbruch der Zellkultur wurde dem Zellkulturmedium Colcemid (10,0 µl/ml) zugefügt. Zum Abbruch wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Kulturflaschenboden gelöst.

2.3.1.3 Durchflusszytometrie

Prinzip:

Das Durchflusszytometer ist ein Instrument zum Zählen und Analysieren von Partikeln und Zellen, z.B. zur Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen.

Zunächst werden die Zellen gefärbt. Während der Färbung lagert sich ein fluoreszierender Farbstoff an die zu messenden Zellinhaltsstoffe, beispielsweise DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) an die DNA im Zellkern. Die eingelagerte Farbstoffmenge ist dem DNA-Gehalt der jeweiligen Zelle proportional. Im Durchflusszytometer werden die Zellen einzeln mit UV-Licht beleuchtet, um die fluoreszierenden Farbstoffmoleküle anzuregen (siehe Abbildung 9). Dadurch leuchten diese in einer für sie charakteristischen Farbe. Dieses Fluoreszenzlicht wird herausgefiltert und für jede Zelle einzeln die Lichtintensität bestimmt. Je heller die Zelle leuchtet, umso mehr des interessierenden Zellinhaltsstoffes enthält sie. Die Lichtintensität, und damit die Menge an DNA, wird einer von 4096 Größenklassen zugeordnet. Es entsteht ein Histogramm, in welchem die Verteilung der gemessenen Zellinhaltsstoffe in einer Probe dargestellt ist. Alle zu einem Peak gehörenden Zellen haben dieselbe Menge an DNA. Die Peaks repräsentieren die G₁- und G₂-/M-Phase des Zellzyklus.

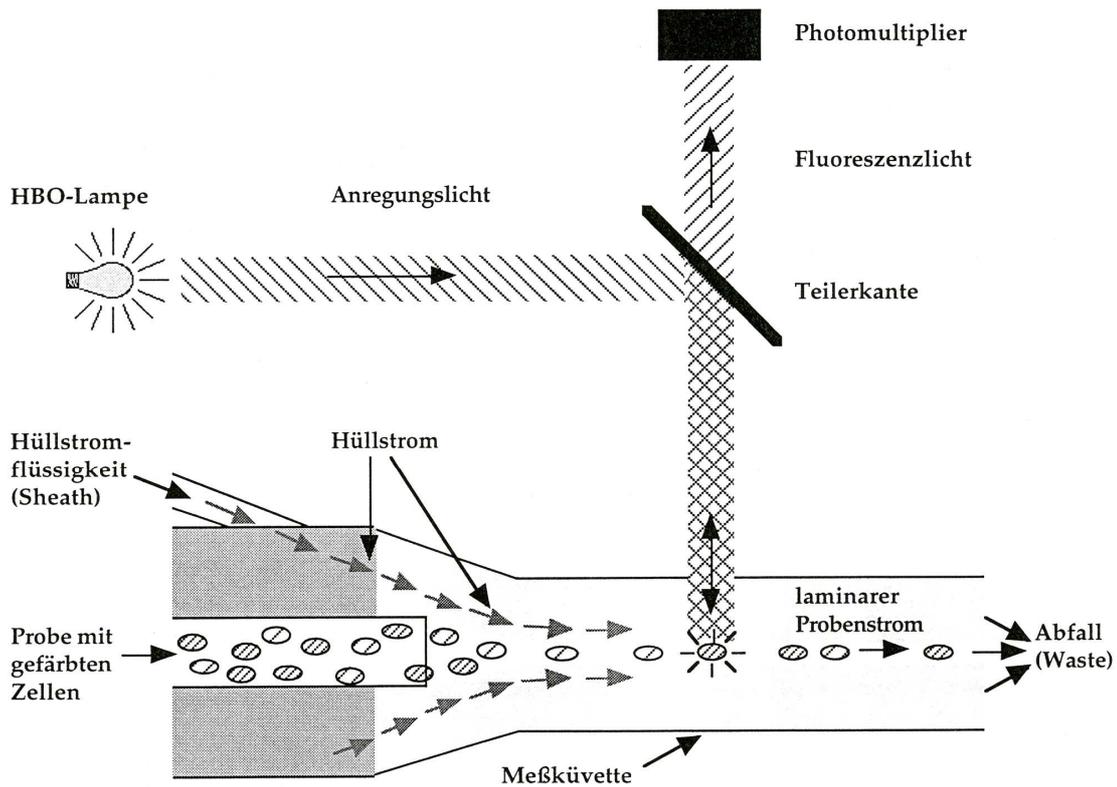


Abb. 9

Messprinzip der Durchflusszytometrie.

Durchführung:

Die Hühnerembryo-Fibroblasten-Zellkultur wurde mit einem Thymidinüberschuss behandelt, siehe 2.3.1.2. Nach 6, 8 und 10 h der Inkubation mit Thymidin, wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit 1 ml Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, 2 ml neues Zellkulturmedium hinzugefügt und 8 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 500 µl Zellkulturmedium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 40 µl mit 2 ml DAPI-Färbelösung (CyStain DNA 1step) gemischt. Die Messung des DNA-Gehalts der Zellen in dieser Probe erfolgte anschließend im Durchflusszytometer.

Des Weiteren wurde nach einem 10 stündigen Block das Zellkulturmedium gewechselt, womit der Block gelöst wurde. 5,5 h später erfolgte die Messung mit dem Durchflusszytometer, siehe oben.

2.3.2 Untersuchungen an Embryonen

2.3.2.1 Behandlung der Eier

Die befruchteten Eier wurden zunächst mit 70%igem Ethanol desinfiziert, um mögliche spätere Infektionen der Embryonen in den ab dem 3. Tag geöffneten Eiern zu vermeiden. Anschließend wurden die Eier mit der spitzen Seite des Eies nach unten gerichtet drei Tage bei 38°C und 50% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank bebrütet. Am dritten Tag der Inkubation wurden die Eier gewendet, dabei bewegt sich der Embryo mit der steigenden Luftblase von unten (stumpfe Seite) nach oben (spitze Seite). Das Wenden des Eies führte zur Verlagerung der Schalenhäute, die der Kalkschale des Eies anliegen, und Embryo, Eiklar und Dotter innerhalb des Eies schützen. Die Schalenhaut an der Spitze verbindet sich mit der Kalkschale in den ersten drei Tagen durch das Gewicht des Eiklars und Dotters. Nach dem Wenden des Eies konnte nun beim Öffnen des Eies an der spitzen Seite die Schalenhaut mit entfernt werden. Danach ist der direkte Zugang zum Embryo möglich. Der Embryo kann nun beim Wachsen beobachtet und das Entwicklungsstadium nach Hamburger und Hamilton genau bestimmt werden. Das Loch wurde mit Leukosilk-Heftpflaster zugeklebt, um Infektionen während der Brutzeit zu vermeiden. Die Hühnerembryonen wurden so lange bei 38°C und 50% Luftfeuchtigkeit bebrütet bis sie das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht hatten, maximal bis zum 19. Entwicklungstag.

2.3.2.2 BrdU-Markierung der Embryonen

Für den Nachweis der Proliferationsareale mithilfe des BrdU(= 5-Bromdesoxyuridin)-Antikörpernachweises ist es erforderlich, zunächst die proliferierenden Zellen zu markieren. BrdU ist ein Thymidinanalogon und wird von proliferierenden Zellen während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Diese Zellen können anschließend immunhistochemisch nachgewiesen werden, siehe 2.3.3.

Das BrdU-Markierungsreagenz, dessen Konzentration 10 µmol/l beträgt, wurde 1:10 mit 1x PBS verdünnt und je nach Alter des Embryos mit verschiedenen Techniken appliziert: Bis zum 5. Entwicklungstag wurde das Reagenz direkt auf den Embryo, welcher sich noch im Ei befand, getropft. Die von der herstellenden Firma Roche empfohlene Dosis beträgt 10-20 µl/g KG (bzw. 100-200 µl/g KG der 1:10 Verdünnung). Da bei der Auftropftechnik nicht die gesamte Dosis vom Embryo aufgenommen wird, wurde bei dieser Methode die 3 fache Dosis verwendet.

Ab dem 6. Entwicklungstag bildet sich über dem Embryo die CAM (=Chorion-Allantois-Membran), eine Schutzschicht, durch welche die Reagenzaufnahme erschwert wird. Da es

erst ab dem 9. Entwicklungstag gelang, die Markierungslösung direkt in eine oberflächliche Vene des Embryos zu injizieren, wurde bei den 6-8 Tage alten Hühnerembryonen auf die RNA-*in-situ*-Hybridisierung ausgewichen, siehe 2.3.5.

Den 9-19 Tage alten Embryonen wurde das BrdU-Markierungsreagenz direkt in eine oberflächliche Vene injiziert, wobei die empfohlene Dosis von 10-20 $\mu\text{l/g}$ KG verwendet wurde.

Nach dem Auftropfen, bzw. der Injektion erfolgte eine 2-stündige Inkubation bei 38°C.

2.3.2.3 Präparation der Embryonen

Die Embryonen wurden durch das Durchtrennen der außerhalb des Embryos liegenden großen Blutgefäße und anschließendem Ausbluten und/oder Dekapitation getötet. Mit Hilfe eines löffelartigen Präparationsbestecks wurden sie aus dem Ei geholt, kurz in sterilem 1x PBS gewaschen und noch vorhandene Häute entfernt, bzw. ab dem 16. Tag der Embryonalentwicklung das Gehirn präpariert. Dann wurden sie unfixiert bei -70°C eingefroren, oder nach 2.3.2.4 fixiert und anschließend bei -70°C eingefroren.

2.3.2.4 Fixierungstechniken

Die präparierten Embryonen, bzw. Gewebestücke wurden nach der Präparation mit einem Lineal vermessen. Die Embryonen wurden mit Paraformaldehyd fixiert, das mit einer Geschwindigkeit von ca. 1,0 mm/h durch das Gewebe diffundiert. Als Alternative wurde das Ethanol-Fixans angewandt, welches mit einer Geschwindigkeit von ca. 1,5 mm/h das Gewebe durchdringt. Nach dem Vermessen der Embryonen, wurden sie, bzw. die Gewebestücke in ein mit 4%-Paraformaldehyd (in 1x PBS), bzw. mit Ethanol-Fixans gefülltes Röhrchen gegeben und bei 4°C auf dem Tumbling Table WT12 entsprechend der vorher berechneten Diffusionszeit inkubiert. Nach erfolgter Fixierung wurden die Embryonen in ein mit 50% Sucroselösung (in 1x PBS) gefülltes Röhrchen für ca. 24 h, bzw. bis sie auf den Boden abgesunken waren, gegeben und auf dem Tumbling Table geschüttelt. Dadurch wurde die im Embryo vorhandene Fixierlösung durch Sucrose ersetzt, das Gewebe weicher und das Schneiden der Embryonen/Gewebestücke erleichtert.

2.3.2.5 Herstellung der Gefrierschnitte

Die gefrorenen Embryonen bzw. Gehirne wurden in dem Einbettmedium O.C.T. Tissue TEK eingebettet und auf einem Metallständer aufgeblockt. Mithilfe eines Kryostatmikrotoms wurden 10,0 μm dicke Schnitte angefertigt. Die zum Schneiden benötigte Temperatur betrug bei den unfixierten und den mit 4%-Paraformaldehyd fixierten Embryo-

nen/Gehirnen -22°C . Um das mit Ethanol fixierte Gewebe zu schneiden, war eine Temperatur von -30°C erforderlich, da diesem durch das Ethanol Wasser entzogen wurde, wodurch das Gewebe härter wurde. Die Schnitte wurden auf sterile Objektträger gezogen, 2 min auf einer 34°C warmen Heizplatte getrocknet, anschließend wieder auf -70°C abgekühlt und bis zum Gebrauch aufbewahrt.

2.3.3 BrdU-Antikörpernachweis

Prinzip:

Ein monoklonaler, spezifischer anti-BrdU-Antikörper (aus Maus) bindet an das eingebaute BrdU. An den 1. Antikörper bindet ein anti-Maus-AK, welcher mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Dieses Enzym wird mit NBT (Nitroblautetrazoliumsalz) und X-Phosphat (5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat Toluidinsalz in Dimethylformamid (BCIP)) nachgewiesen.

Durchführung:

Die aufgetauten, luftgetrockneten Schnitte der Embryonen wurden, wenn sie unfixiert oder mit Ethanol fixiert waren, zunächst nochmalig mit Methanol/Eisessig fixiert (3x 15 min). Dem folgte eine 20-minütige Denaturierung mit 1 M HCl. Anschließend wurden die Objektträger für einige Sekunden in einen Substratpuffer (pH 7,3) gehalten, um den sauren pH-Wert der HCl-Lösung zu neutralisieren, und 3x in 1x PBS gewaschen.

Bei den mit Paraformaldehyd fixierten Embryonen entfielen diese Schritte, da die Fixierung ausreichend war. Auf die mit Paraformaldehyd fixierten Präparate wurde Proteinase K (2%ige Proteinase K, 60,0 μl pro Objektträger) getropft. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und ein 3 maliges Waschen in 1x PBS.

Unabhängig von der Fixierung erfolgte eine Inkubation von 30 min in 1%igem BSA. Nach einem weiteren Waschschrift (3x in 1x PBS) wurden die Objekte in einer 2%igen H_2O_2 -Lösung inkubiert. Erneut wurden die Schnitte 3x in 1x PBS gewaschen und luftgetrocknet. 40,0 μl der anti-BrdU-Lösung (anti-BrdU-AK 1:10 mit Inkubationspuffer verdünnt) wurden auf die Objektträger getropft. Dies inkubierte 30 min bei 37°C in einer Feuchtkammer. Nach einem weiteren Waschschrift (3x in 1x PBS) wurden 40,0 μl der anti-Maus-Ig-AP-Lösung (IgG-anti-maus-AK 1:10 mit 1x PBS verdünnt) auf die Objekte gegeben und 30 min bei 37°C in der Feuchtkammer inkubiert. Dem folgte ein Waschschrift (3x in 1x PBS). Dann wurden 40,0 μl der NBT-X-Phosphat-Farblösung auf die Objektträger gegeben und 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte 1x mit 1x PBS und 3x mit A. bidest gespült, damit sich während des Trocknens keine Salzkristalle auf dem

Objekt bilden können. Eine geeignete Gegenfärbung stellte die Basic-Fuchsin-Färbung (siehe 2.3.3.1) dar.

2.3.3.1 Basic-Fuchsin-Färbung

Basisches Fuchsin färbt die Zellkerne rot und ist daher eine geeignete Gegenfärbung nach einem BrdU-Antikörper-Nachweis mit NBT/X-Phosphat, welcher für eine Blaufärbung der Kerne der proliferierenden Zellen verantwortlich ist. Die mit NBT/X-Phosphat behandelten Präparate wurden kurz in 70% Ethanol gespült und für 10 min in 2 M HCl bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit A. bidest gewaschen, 3 min in 5% Essigsäure bei Raumtemperatur inkubiert und für 20 min in der Basic-Fuchsin-Färbelösung gefärbt. Nach 3 minütiger Inkubation in 5% Essigsäure wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 100% Ethanol) entwässert, luftgetrocknet und mit Eukitt eingedeckt.

2.3.4 DNA-Techniken

2.3.4.1 Präparation von Plasmid-DNA

Als Vektor für das untersuchte Gen H4 des Huhns (Laborbezeichnung ggH4) wurde pBluescriptII verwendet. Das Transkript besaß eine Insertgröße von 0,55 kb und die EST-Zugriffsnummer BV243434.

Ampicillinhaltige Nährbodenplatten wurden mit der Bakterienkultur (*E. coli*) beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie von der Platte in 25,0 ml flüssiges LB-Amp-Nährmedium überimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAGEN® HiSpeed™ Plasmid Midi Kits. Die im Folgenden erwähnten Puffer und Lösungen sind Bestandteile des Kits. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet mit 4,0 ml des Resuspensionspuffers (Puffer 1) homogenisiert. Mit 4,0 ml des Lysepuffers (Puffer 2) erfolgte die 5-minütige alkalische Lyse der Bakterien. Zur Fällung der Proteine und Bakterien-DNA wurden 4,0 ml des Neutralisationspuffers (Puffer 3) hinzugefügt. Nach einer 10 minütigen Inkubation wurde dies auf die zuvor mit 4,0 ml des Puffers QBT äquilibrierte Säule gegeben. Mit 20,0 ml des Puffers QC wurden die in der Säule verbliebenen Salze ausgewaschen und mit 5,0 ml des Puffers QF die DNA aus der Säule eluiert. Die eluierte DNA wurde mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und in einem speziell entwickelten QIA® precipitator-Modul

gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol wurde die DNA mit 500,0 µl Tris-Puffers von der Modulschicht eluiert.

2.3.4.2 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der DNA-Qualität wurde eine Gelelektrophorese mit 1%-Agarose-Gel durchgeführt. Dem Gel wurde Ethidiumbromid zugesetzt. Der fluoreszierende Farbstoff lagert sich in den DNA-Doppelstrang ein, wodurch die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar werden. Durch die Zugabe von Ladepuffer wurden die Proben beschwert, so dass sie auf den Boden der Geltasche sanken und nicht in den Elektrophorese-Puffer diffundierten. Das Fortschreiten der Gelelektrophorese kann durch den Farbstoff im Ladepuffer beobachtet und das Auslaufen der Probe aus dem Gel damit vermieden werden. Neben den zu analysierenden Proben wurde ein geeigneter DNA-Längenstandard aufgetragen. Die Laufzeit des Gels betrug ca. 35 min bei einer Spannung von 230 Volt und einer Stromstärke von 200 mA.

2.3.4.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Nach der DNA-Präparation war es notwendig, die Konzentration der Nukleinsäure-Lösung zu bestimmen, um für nachfolgende Versuche die richtige DNA-Menge einsetzen zu können.

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde bestimmt, indem ihre Extinktion im Spektralphotometer nach geeigneter Verdünnung (1:20, mit autoklaviertem Wasser) bei 260 nm (DNA, RNA, Oligonukleotide) und 280 nm (Protein) (OD_{260} , OD_{280}) gemessen wurde.

Die DNA-Konzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$$OD_{260} \text{ (gemessene Absorption)} \times 50 \text{ (optische Dichte)} \times 50 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \\ = \text{DNA-Konzentration in ng/}\mu\text{l}$$

Die Messung der OD_{280} erfasste Verunreinigungen und diente der Überprüfung des Reinheitsgrades. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} (Ratio) gilt als Maß für die Reinheit der isolierten DNA und sollte im Idealfall Werte zwischen 1,8 und 2,0 annehmen.

2.3.4.4 Überprüfung der Probe durch Sequenzierung

Mit Hilfe der Sequenzierung kann die Abfolge einer Nukleotidsequenz von Plasmiden oder PCR-Produkten ermittelt werden. Das Prinzip folgt der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) durch Didesoxynukleotide (ddNTPs) auf einem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer. Die Überprüfung der Probe erfolgte mithilfe der für das Gen ggH4 spezifischen Primer T3 und T7.

Der für die Sequenzierung benötigte 10,0 µl-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

2,0 µl	1x Puffer (5x)
2,0 µl	PreMix (DNA Sequencing Kit, Big Dye v. 3.0)
2,0 µl	Primer (10 µM)
1,0-5,0 µl	DNA (200 ng)
ad 10,0 µl	HPLC-H ₂ O

Nachdem dieser Ansatz auf Eis erstellt wurde, folgte eine Abzentrifugation bei 13000 rpm.

Danach wurde eine PCR-Reaktion angeschlossen:

Bei der Methode der PCR wird ein DNA-Abschnitt enzymatisch amplifiziert. Dabei binden zwei 15–30-Nukleotid-lange Oligonukleotide (Primer) spezifisch in sense- und antisense-Orientierung an die Template-DNA. Für die Reaktion wird die DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) verwendet. Das Enzym ist bis zu Temperaturen von 95°C hitzestabil und sein Temperaturoptimum liegt zwischen 70°C und 80°C. Der Standard-PCR-Ansatz wurde mit Reagenzien des „Taq PCR Core Kits“ (Qiagen) in einem Volumen von 25 µl durchgeführt und nach folgendem Schema pipettiert:

2,5 µl	10x Puffer (15 mM MgCl ₂)
5,0 µl	Q-Solution
0-2,0 µl	MgCl ₂ (25 mM)
0,5 µl	dNTP's (10 mM)
1,0 µl	Primer forward (20 pmol/µl)
1,0 µl	Primer reverse (20 pmol/µl)
1,0 µl	Template DNA (50 ng/µl)
0,2 µl	Taq-Polymerase
ad 25 µl	H ₂ O

Die Standard-PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

a) 1. Denaturierung	94 °C	5 min
b) Denaturierung	94 °C	30 sec
c) Primer-Bindung („annealing“)	55 °C	45 sec
d) DNA-Synthese	72 °C	45 sec
e) letzte DNA-Synthese	72 °C	5 min

Die Schritte b-d wurden 25 x wiederholt. Das PCR-Produkt wurde anschließend auf 100 µl mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Nachdem 2,0 µl der PCR-Fragmente mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.3.4.2) mit einem DNA-Längenstandard kontrolliert und deren Konzentration berechnet wurde, folgte das Cycle-Sequencing.

Es wurde eine Fällung der DNA mit 100% Ethanol und 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,6-5,2) durchgeführt. 250,0 µl 100% Ethanol und 10,0 µl Natriumacetat wurden zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde während einer 15 minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300,0 µl 70% Ethanol gewaschen. Dann folgte eine weitere Zentrifugation von 15 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet ca. 30 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 30,0 µl Formamid (Hi-DiFA) gelöst und 10 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 28,0 µl der DNA-Probe in die für die Sequenzanalyse vorgefertigten Platten gegeben und für 2 min bei 90°C denaturiert. Die Sequenzierung fand in dem ABI Prism 3100 Genetic Analyser statt. Eine Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Sequencing Analysis Software.

2.3.4.5 Linearisierung des Transkriptionsvektors

Mittels spezifischer Restriktionsenzyme wurde die Plasmid-DNA geschnitten, um die Plasmide zu linearisieren.

Ein 100,0 µl-Ansatz besitzt folgende Zusammensetzung:

x µl	Plasmid-DNA (Endkonzentration 7 µg/100 µl)
10,0 µl	10x Reaktionspuffer
10,0 µl	Restriktionsenzym (2 U/µg Plasmid)
ad 100 µl	A. bidest steril

Der Ansatz wurde ca. 4 h bei 37°C inkubiert. Um zu kontrollieren, ob der Verdau vollständig war, wurde der Verdau im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei vollständigem Verdau erfolgte die Aufreinigung der DNA gemäß dem Protokoll des „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“. Es wurden 500,0 µl Capture-Puffer und 100,0 µl des DNA-Ansatzes in die in Auffanggefäße gesetzten Säulen gegeben. Dies wurde sorgfältig gemischt und 30 sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat in den Auffanggefäßen wurde verworfen. Anschließend wurden 500,0 µl Waschpuffer in die Säule pipettiert, um Salze und andere Verunreinigungen zu entfernen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 30 sec bei 13000 rpm. Dann wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß gesetzt, 30,0 µl DEPC-H₂O zugefügt, 1 min inkubiert und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um die DNA aus der Säule zu eluieren.

2.3.5 RNA-*in-situ*-Hybridisierung

2.3.5.1 Herstellung radioaktiv markierter RNA-Sonden

Als radioaktiv markiertes Ribonukleotid wurde Uridin-5'- α -³⁵S-Thiophosphat (³⁵S- α -UTP) verwendet.

20,0 µl Markierungsansatz, der für eine linearisierte Plasmid-Probe benötigt wurde, hatte folgende Zusammensetzung:

1,5 µl	Nukleotide (10 mM, je 0,5 µl ATP, GTP, CTP)
0,5 µl	RNAse-Inhibitor
1,0 µl	400 mM DTT (=20 mM)
1,0 µl	10x Transkriptionspuffer
1,0 µl	DNA (ca. 1 µg)
3,0 µl	³⁵ S- α -UTP(=30 µCi)
2,0 µl	RNA-Polymerase (40 U)
ad 20,0 µl	DEPC-H ₂ O

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2,0 µl RNase-freie DNase zugegeben und weitere 15 min im Thermoblock bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 53,0 µl A. bidest (DEPC, 20 mM DTT) wurde der Ansatz auf eine vorbereitete 1 ml mini-Quick-spin-RNA-Säule gegeben und 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Gesamtvolumen des Eluats wurde gemessen. Dem Eluat wurden 2,0 µl entnommen und in einem Szintillationszähler die radioaktiven CPM-Werte („counts per million“) gemessen. Dann wur-

den dem Ansatz 10,0 µl E.coli-RNA (50 mg/ml) zugefügt und eine alkalische Hydrolyse der Transkripte durchgeführt, welche die Sonde auf eine Transkript-Länge von 0,1-0,2 kb schneidet. Zu lange Transkripte führen zu einer sterischen Behinderung der Hybridisierung im Gewebe und zu kurze gehen unspezifische Bindungen ein. Die gewünschte Länge kann über die Dauer der alkalischen Hydrolyse beeinflusst werden. Sie errechnet sich aus folgender Formel:

$$X = \frac{(Lo - Lf)}{(K \times Lo \times Lf)}$$

X: Inkubationszeit in min, Lo: originale Transkriptlänge in kb, Lf: gewünschte Transkriptlänge in kb, K=0,11

Zur alkalischen Hydrolyse wurde 1 Volumen RNA-Lösung mit 1 Volumen 100 mM Natriumcarbonat-Lösung (20 mM DTT, pH 10,3) versetzt und X min bei 60°C inkubiert. Durch die Zugabe von 1 Volumen 0,2 N Natriumacetat (20 mM DTT, pH 6,0) wurde die Lösung neutralisiert und die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und mindestens 2,5 Volumen 100% Ethanol bei -70°C über Nacht gefällt.

2.3.5.2 Vorbehandlung der Gefrierschnitte

Es musste bei allen Schritten eine mögliche RNase-Kontamination vermieden werden, d.h. es wurden nur RNase-freie Lösungen (mit DEPC-H₂O angesetzt) und Gefäße (bei 200°C sterilisiert) verwendet.

Die Schnitte wurden auf einer Heizplatte bei 37°C für 5 min getrocknet, 10 min in 4% Paraformaldehyd (1x PBS) nachfixiert, 5 min in 1x PBS und kurz in DEPC-H₂O gespült. Zur Entfernung alkalischer Proteine wurden die Objektträger für 20 min in 0,2 N HCl inkubiert. Anschließend wurden die Präparate nach kurzem Spülen mit DEPC-H₂O 20 min in 2x SSC bei 70°C inkubiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2 min in 65%, 85%, 95%, 100% Ethanol) entwässert und luftgetrocknet.

2.3.5.3 Hybridisierung und Waschen der Objektträger

Die radioaktiven Sonden wurden binnen zwei Wochen zur *in-situ*-Hybridisierung verwendet. Die markierte Sonde wurde vor der Hybridisierung 10 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 80% Ethanol gewaschen, ein zweites Mal zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei 37°C kurz luftge-

trocknet. Das RNA-Pellet wurde anschließend in 50% Formamid (20 mM DTT, mit RNase-Inhibitor, pH 7,0) in einer Konzentration von 800000 cpm/ μ l gelöst.

Die dafür benötigte Menge an 50%-Formamid in μ l wird mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\left(\frac{\text{gemessene CPM} - \text{Aktivität}}{2} \right)}{800000} \times \text{gemessenes Volumen} = \mu\text{l 50\% Formamid}$$

Die Hybridisierung erfolgt mit einem Hybridisierungspuffer der folgenden Zusammensetzung:

50,0%	Formamid
10,0%	10x Phosphatpuffer
24,0%	Dextransulfat
2,0%	DTT (1 M)
0,6%	Triton-X-100
13,4%	DEPC-H ₂ O

Die benötigte Menge an Hybridisierungspuffer wurde folgendermaßen berechnet:

Die vierfache Menge der benötigten 50%-Formamid-Menge zur Lösung des Sonden-Pellets wurde an Hybridisierungspuffer benötigt. Durch diese Verdünnung waren pro μ l Sonde 160000 CPM-Aktivität enthalten.

Der Hybridisierungspuffer wurde zur gelösten Sonde gegeben, gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Dann wurde die Sonde 10 min bei 80°C denaturiert.

Es wurden für jede untersuchte Schicht 2 parallele Schnitte ausgewählt, um eines mit Sonden in antisense-Orientierung zu beschichten, ein anderes mit Sonden in sense-Orientierung. Die Sonden in antisense-Orientierung binden an die gesuchte RNA, die in sense-Orientierung nicht. Die zuletzt genannten sind für die bei der Auswertung durchzuführende Negativ-Kontrolle notwendig, siehe 2.3.5.6. Auf die vorbehandelten Objektträger wurden ca. 16,0-20,0 μ l der Sonde je nach Größe des Objekts aufgetragen, mit einem sili-

konisierten Deckglas abgedeckt und mit Fixogum umklebt. Die Präparate wurden in einer feuchten Kammer bei 54°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Fixogum entfernt und die Deckgläser in einer Waschlösung mit 50% Formamid sanft abgelöst. Die Schnitte wurden zwei weitere Male für je 1 h bei 54°C in 50%-Formamid gewaschen, um nicht gebundene Sonden zu entfernen.

Danach wurden die Präparate für 15 min in TE-Puffer mit 0,3 M NaCl bei 37°C äquilibriert. Dem folgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C in TE-Puffer mit RNase A (40,0 µg/ml, in TE-Puffer mit 0,3 M NaCl). Die RNase A verdaut einzelsträngige, unspezifisch gebundene RNA-Moleküle. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min in TE-Puffer mit 0,3 M NaCl gespült und für je 30 min in 2x SSC (pH 7,0) und 0,1x SSC (pH 7,0) bei 37°C unter ständigem Rühren gewaschen. Über eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2 min in 65%, 85%, 95%, 100% Ethanol, wobei dem 65%-, 85%- und dem 95%-igen Ethanol 0,3 M Ammoniumacetat zugefügt wurde, welches für die pH-Wert-Einstellung für die Autoradiographie notwendig ist) wurden die Präparate entwässert, dann luftgetrocknet und für 1-3 Tage zur Kontrolle der Hybridisierung auf einem Röntgenfilm in einer lichtdichten Kassette exponiert.

2.3.5.4 Autoradiographie

In der Dunkelkammer wurden die Präparate mit der Fotoemulsion (Kodak NTB-2 Emulsion) 3 sec beschichtet und ca. 2 h bei 15°C getrocknet. Die Exposition erfolgte in lichtdichten Schachteln mit Kieselgel bei 4°C für 1 Woche.

Zur Entwicklung wurden die Objekte für 4 min im Kodak D 19-Entwickler bei 15°C geschwenkt. Durch das Spülen der Präparate für 10 sec in A. bidest bei 15°C wurde die Entwicklung gestoppt. Die Fixierung erfolgte in 15% Natriumthiosulfat-Lösung bei 15°C. Die dafür benötigte Zeit betrug 5 min, bzw. 2x die Zeit, die benötigt wird, bis die Emulsion farblos wird. Nach mindestens 5 minütigem Spülen mit A. bidest wurden die Präparate mit Giemsa-Lösung gefärbt (siehe 2.3.5.5), luftgetrocknet und ausgewertet.

2.3.5.5 Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung der Präparate nach der RNA-*in-situ*-Hybridisierung und Autoradiographie ermöglichte eine Auswertung und photographische Dokumentation im Hell- und Dunkelfeld.

Die Objekte wurden für 3 min in frisch angesetzter 5%-Giemsa-Lösung gefärbt, 2x mit A. bidest gespült, luftgetrocknet und mit Eukitt eingedeckt.

2.3.5.6 Auswertung

Die Auswertung des BrdU-Antikörpernachweises erfolgte mit dem Lichtmikroskop.

Die Auswertung der RNA-*in-situ*-Hybridisierung wurde mit einem Stereomakroskop durchgeführt. Die Übersichtsaufnahmen der Embryonen, bzw. Gehirne wurden im Dunkelfeld dargestellt. Im Dunkelfeld reflektieren die Silberkörner das einfallende Licht und werden so auch bei geringer Vergrößerung sichtbar. Um auszuschließen, dass es sich bei den Signalen um Artefakte handelt, wurden für jede dargestellte Schicht 2 Schnitte bearbeitet. Ein Präparat wurde mit Sonden in antisense-Orientierung beschichtet, ein weiteres mit Sonden in sense-Orientierung. In Folge dessen treten in den zuerst genannten Präparaten Signale auf, welche als Zellproliferationsareale gedeutet werden können. In den Schnitten mit den Sonden in sense-Orientierung treten, da diese Sonden nicht an die gesuchte RNA binden können, keine Signale auf. Sollten Signale auch in diesem Schnitt auftreten, so ist dieses als Artefakt und nicht als Zellproliferationsareal zu deuten. Dieser Vergleich wurde als Negativ-Kontrolle für jeden Schnitt durchgeführt. Die beschriebenen Abbildungen mit den Sonden in sense-Orientierung sind Ergebnisteil nicht dargestellt.

Des Weiteren erfolgte eine Darstellung im Hellfeld. Durch die erfolgte Giemsa-Färbung stellen sich die Strukturen in dieser Abbildung blau dar.

Die fotografische Dokumentation der Expressionsmuster erfolgte mit dem Stereomakroskop SV8 der Fa. Zeiss.

Die Auswertung der Expressionsmuster und Bestimmung der anatomischen Strukturen wurde mit folgenden Atlanten durchgeführt:

- A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Chick (Kuenzel u. Masson, 1988)
- The Atlas of Chick Development (Bellairs u. Osmond, 1998).

Des Weiteren wurde eine Veröffentlichung über den Lobus opticus (Scicolone et al., 1995) zur Zuordnung der Schichten des Lobus opticus verwandt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum Zellzyklus der embryonalen Hühnerfibroblasten

Durch Zugabe eines Thymidinüberschusses für unterschiedliche Zeiten wurde die Fibroblastenkultur der Hühnerembryonen synchronisiert. Der Thymidinüberschuss führt zu Störungen der DNA-Replikation und hemmt deshalb die Zellen in der frühen S-Phase, bzw. am G_1/S -Phase-Übergang. Abbildung 10 A zeigt das Histogramm nach einem 6-stündigen Thymidinblock. Zu diesem Zeitpunkt haben noch nicht alle Zellen die G_1 -Phase erreicht, da noch eindeutig ein G_2 -/M-Peak erkennbar ist. Die sich zuvor zeitlich voneinander unabhängig teilenden Zellen wurden nach einer 10-stündigen Thymidinüberschussbehandlung nahezu alle in der G_1 -Phase nachgewiesen. Abbildung 10 B stellt das diesem Ergebnis entsprechende Histogramm der Durchflusszytometrie dar. Da für diese Synchronisation einige Zellen einen kompletten Zellzyklus durchlaufen mussten, um wieder zum G_1 -/ S-Phase-Übergang zu gelangen und dort durch Thymidin gestoppt zu werden, kann daraus indirekt geschlossen werden, dass die Zellzyklusdauer der embryonalen Hühnerfibroblasten am Tag 6 ca. 10 Stunden beträgt.

Die Abbildung 10 C zeigt, dass 5,5 Stunden nach Lösen des Thymidinblocks die Zellteilung fortgesetzt wird.

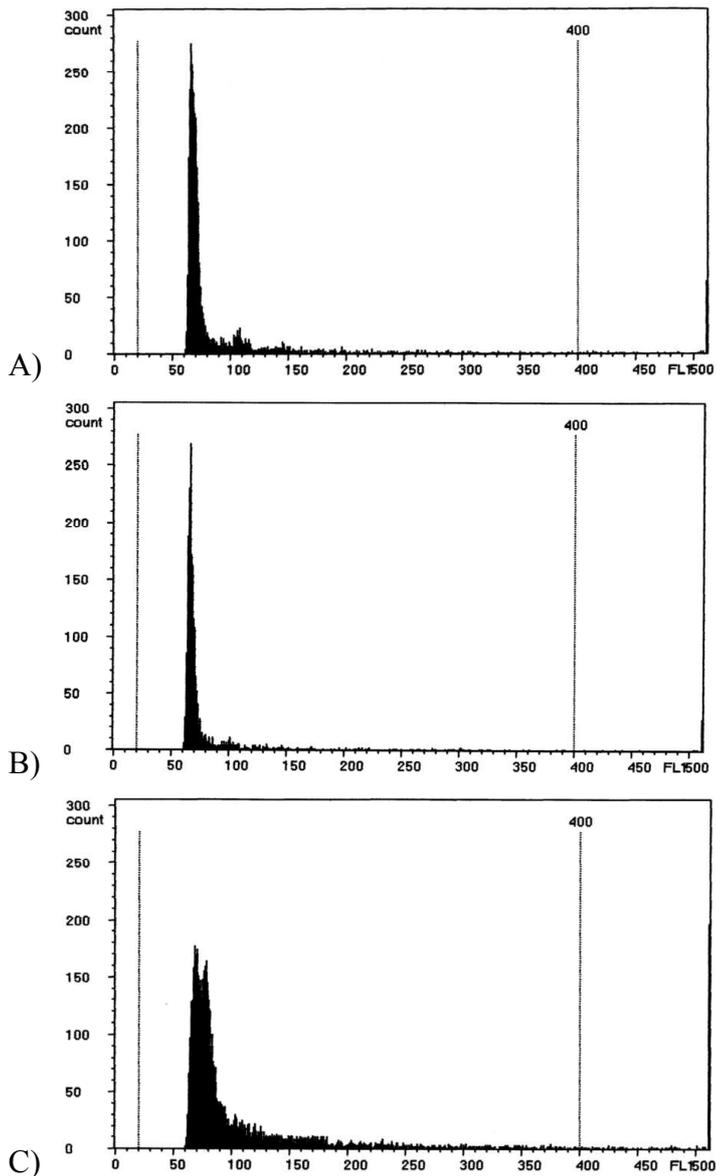


Abb. 10

Darstellung der Zellzyklusdauer 6-Tage alter embryonaler Hühnerfibroblasten anhand von Histogrammen der Durchflusszytometrie nach Synchronisation mit Thymidin. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Zellen, auf der X-Achse die Intensität des Fluoreszenzlichtes, bzw. der DNA-Gehalt aufgetragen.

A: nach 6-stündigem Thymidinblock. Es werden noch einige Zellen in der G₂-/M-Phase (doppelter DNA-Gehalt) vorgefunden.

B: nach 10-stündigem Thymidin-Block. Nahezu alle Zellen befinden sich in der G₁-Phase, bzw. am G₁-/S-Phase-Übergang.

C: 5,5 h nach Lösen des 10-stündigen Thymidinblocks. Die Zellen setzen die Zellteilung fort.

3.2 Nachweis der Zellproliferation während der Fetalentwicklung des Huhns

3.2.1 Nachweis der Zellproliferation mit dem BrdU-Antikörpernachweis

Zunächst wurde der BrdU-Antikörpernachweis an unfixierten und an mit Ethanol fixierten Embryonen durchgeführt. Der BrdU-Nachweis führte zu guten Resultaten. Das Signal der markierten Zellen zeigte sich ausschließlich im Zellkern. Das Gewebe der Hühnerembryonen ist jedoch sehr locker strukturiert, wodurch die histologische Konservierung der Gefrierschnitte mit unfixierten und mit Ethanol fixierten Hühnerembryonen unbefriedigend war. Da keine exakten Präparate hergestellt werden konnten, nützten die guten Resultate des Antikörpernachweises wenig, weil trotz der genauen Bestimmung der markierten Zellen eine exakte histologische Zuordnung in diesen Schnitten unmöglich war.

Deshalb wurde das Gewebe vor dem Einfrieren mit Paraformaldehyd fixiert. Aufgrund der zum Anfertigen der Gefrierschnitte notwendigen Paraformaldehyd-Fixierung erbrachte der Zellproliferationsnachweis mit dem BrdU-Antikörpernachweis schlechte Resultate. Das Zytoplasma wurde angefärbt, die Zellkerne nicht. Das Signal wird jedoch nur im Zellkern erwartet.

Aufgrund der guten Ergebnisse bei der Herstellung der Gefrierschnitte nach Paraformaldehydfixierung wurde diese Technik der Fixierung beibehalten. Da mit dieser Fixierung der BrdU-Antikörpernachweis schlechte Resultate erbrachte, wurde statt der BrdU-Markierung für die weiteren Untersuchungen die RNA-*in-situ*-Hybridisierung angewandt.

3.2.2 Nachweis der Zellproliferation mit der RNA-*in-situ*-Hybridisierung

Für die Untersuchungen der Proliferation des Gehirns in der Fetalentwicklung des Huhns von Tag 5 bis Tag 19 und des adulten Gehirns eines 50-Tage alten Huhns wurden Gefrierschnitte des Kopfes, bzw. des Gehirns angefertigt. Aufgrund der in 3.2.1 dargestellten Probleme wurde der Nachweis der Zellproliferation mit der RNA-*in-situ*-Hybridisierung mit einer Histon-H4-RNA-Sonde durchgeführt.

Die Signale in den folgenden Abbildungen entsprechen den Arealen, in denen Zellproliferation, bzw. DNA-Synthese und damit verbunden eine erhöhte Konzentration von mRNA für Histonproteine im Gewebe vorliegt. Dies ist am Beispiel des Testis eines adulten Hahnes veranschaulicht. In der Abbildung 11 sind Signale im Bereich der basalen Keimschicht, in welcher die Spermatogonien proliferieren, zu erkennen, nicht jedoch im Lumen, in dem die Spermiohistogenese stattfindet.

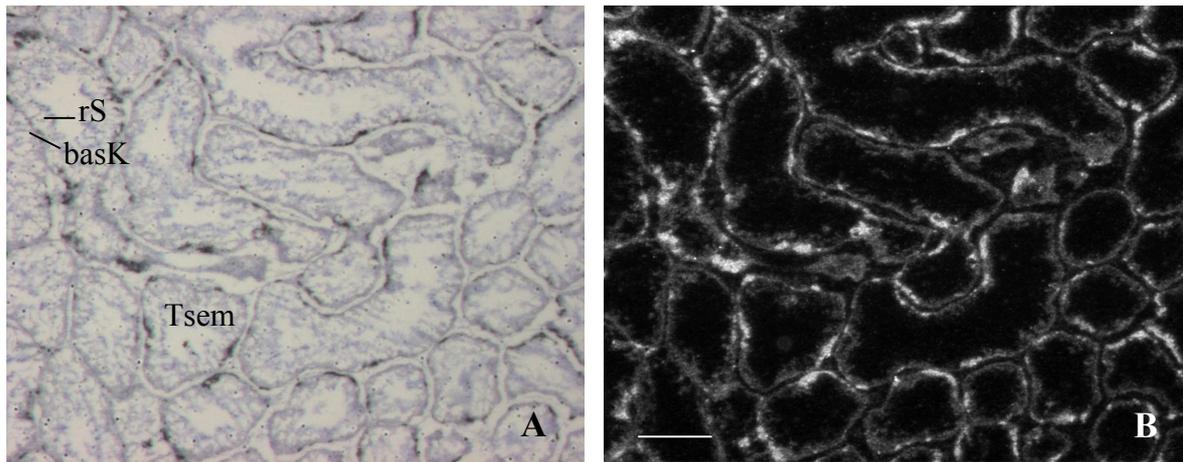


Abb. 11

Ausschnitt aus dem Testis eines adulten Hahns.

A: Hellfeld-Aufnahme. **B:** Dunkelfeld-Aufnahme. Skalierungsbalken: 200 μm .

Nach RNA-*in-situ*-Hybridisierung mit der Genprobe ggH4. Das Signal ist auf Teile der basalen Keimschicht beschränkt.

Abkürzungen:

basK - basales Keimepithel;

rS - reife Spermien;

Tsem - Tubulus seminiferus.

3.3 Untersuchung der Gehirnentwicklung des Huhns

3.3.1 Untersuchungen am 5-Tage alten Hühnerembryo

(Stadium 27 nach Hamburger/Hamilton)

Die zu den in dieser Arbeit beschriebenen Gehirnstrukturen des Huhns korrelierenden humanen Gehirnareale sind der Tabelle 4 unter 3.5 zu entnehmen.

In der Abbildung 12 B ist ein Coronarschnitt durch einen 5-Tage alten Hühnerembryo dargestellt. Als wesentliche Strukturen sind die Anlage des Gehirns, die Augen, Arcus maxillaris und mandibularis, das Herz und die Medulla spinalis zu erkennen.

Im Gehirn sind bereits klar voneinander getrennte Strukturen vorhanden. Die Ventrikel, welche in den folgenden Entwicklungsstadien zunehmend durch die starke Gewebezunahme eingengt werden, nehmen zu diesem Zeitpunkt noch viel Raum ein. Besonders starke Proliferationssignale sind in der Zona subventricularis zu erkennen. Das Auge ist in dieser Entwicklungsphase schon gut von den Hirnregionen abgrenzbar. In der Retina sind ausgeprägte Zellproliferationssignale sichtbar.

Des Weiteren sind im Arcus mandibularis, Arcus maxillaris, Cor, Medulla spinalis und in den Myotomen deutliche Proliferationssignale erkennbar.

In der Abbildung 12 D ist ein Coronarschnitt durch den Lobus opticus des 5-Tage alten Hühnerembryos dargestellt. In diesem sind zwei klar voneinander unterscheidbare Schichten zu erkennen. In der Zona generativa (=GZ) sieht man sehr starke Proliferationssignale. Die zweite Zone wird als Zona marginalis (=MZ) bezeichnet. In dieser Zone findet weniger Proliferation statt.

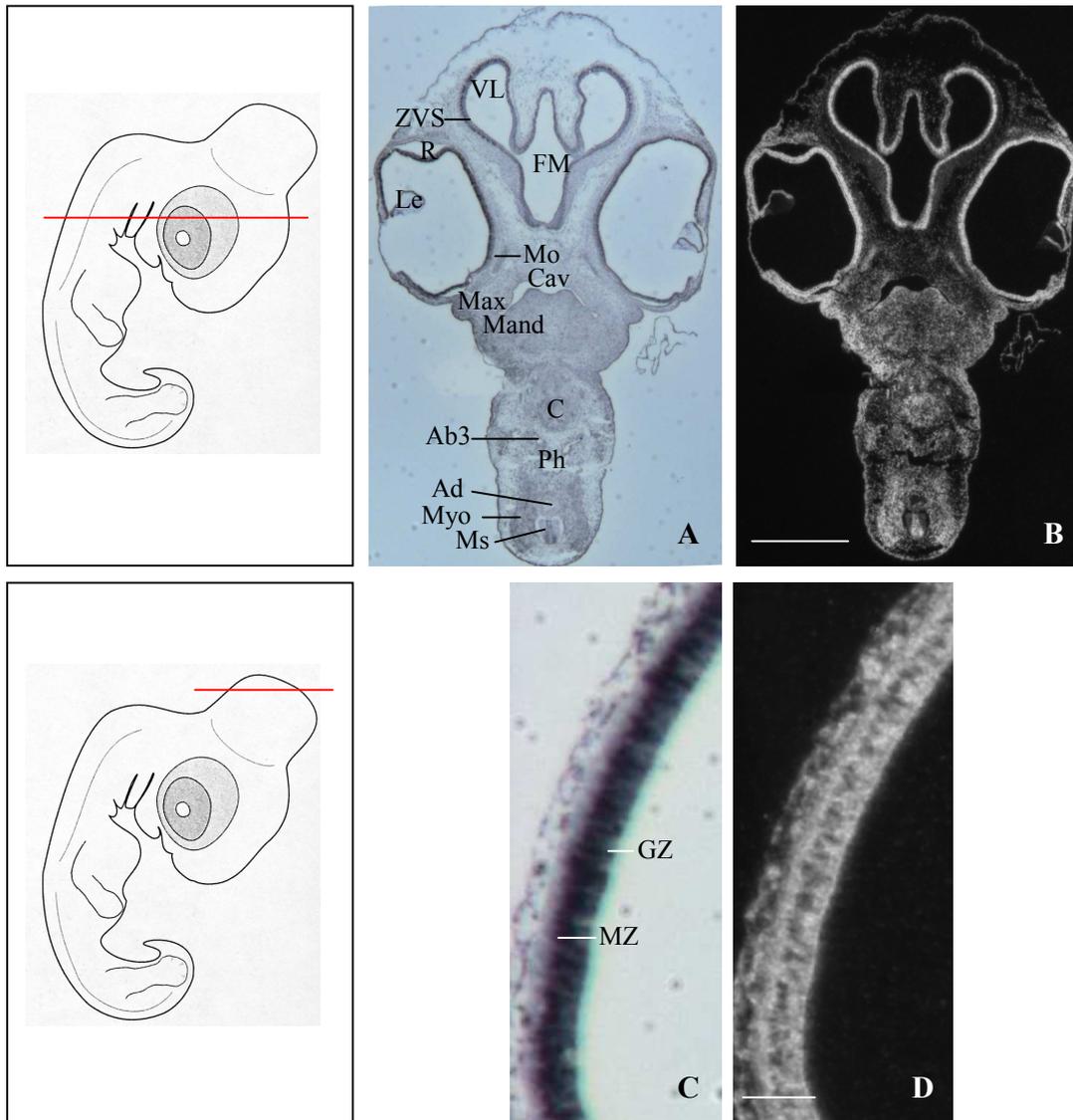


Abb. 12

Coronarschnitte durch einen 5-Tage alten Hühnerembryo (Stadium 27 nach Hamburger/Hamilton).

A und **C**: Hellfeld-Aufnahmen. **B** und **D**: Dunkelfeld-Aufnahmen. Skalierungsbalken: in **A** und **B**: 1,5 mm, in **C** und **D**: 0,2 mm.

Abkürzungen:

Ab3 – 3. Aortenbogen;
Ad – Aorta dorsalis;
C – Cor;
Cav – Cavitas oris;
FM – Foramen Monroi;
GZ – Zona generativa;
Le – Lens;
Mand – Arcus mandibularis;
Max – Arcus maxillaris;
Ms – Medulla spinalis;
Myo – Myotome;
MZ – Zona marginalis;
Ph – Pharynx;
R – Retina;
VL – Ventriculus lateralis;
ZVS – Zona subventricularis.

3.3.2 Untersuchungen am 8-Tage alten Hühnerembryo (Stadium 34 nach Hamburger/Hamilton)

Die Abbildung 13 stellt Coronarschnitte durch einen 8-Tage alten Hühnerembryo dar. In der Abbildung 13 B sind als wesentliche Strukturen das Telencephalon, das Ventrikelsystem, die Augen und der Pharynx zu erkennen. Die Proliferation im Gehirn des 8-Tage alten Hühnerembryos beschränkt sich nicht mehr auf die Zona subventricularis und die Retina, ist jedoch weiterhin in diesen Zonen am ausgeprägtesten. Ebenfalls weisen das Septum interorbitale, die Rathke'sche-Tasche und die Muskulatur des Pharynx Proliferationssignale auf.

In der Abbildung 13 D sind Zellproliferationssignale im Telencephalon, Diencephalon, Augenbläschen, der Pharynxmuskulatur und den Speicheldrüsen zu sehen. Das Telencephalon und das Diencephalon haben sich seit dem 5. Entwicklungstag stark vergrößert. Zu diesem Zeitpunkt sind das Hyperpallium, Mesopallium, Nidopallium, Striatum laterale und der Globus pallidus bereits vorhanden. Im Diencephalon bilden sich die Vorläufer des Thalamus, Hypothalamus und Epithalamus aus. Durch die Größenzunahme aller Hirnregionen werden die Ventrikel in ihrer Ausdehnung eingeschränkt. Der Plexus choroideus lässt

in dieser Abbildung der Zona subventricularis vergleichbar starke Proliferationssignale erkennen.

Als wesentliche Strukturen sind in der Abbildung 13 F der Lobus opticus, das Metencephalon, die Medulla oblongata, Medulla spinalis und Myotome zu erkennen. Der Lobus opticus weist in diesem Entwicklungsstadium bereits eine differenzierte Schichtung auf, welche im Zusammenhang mit der Abbildung 13 H näher beschrieben wird. In der Abbildung 13 F sind Zellproliferationssignale im Lobus opticus, der Zona subventricularis des Metencephalon, der Medulla oblongata und besonders ausgeprägt in der Medulla spinalis und den Myotomen erkennbar.

Die Abbildung 13 H zeigt einen Ausschnitt aus der Abbildung 13 F, in welchem der Lobus opticus dargestellt ist. Im Lobus opticus ist ein ausgeprägtes Signal in der Zona generativa sichtbar. Des Weiteren ist eine Markierung in der C“SGC“-Region zu erkennen. Diese Schicht wird sich im weiteren Verlauf zum Stratum griseum centrale (=SGC) entwickeln, weshalb sie bis zur vollständigen Ausprägung als „compartment“ bezeichnet wird. Die C“SGC“-Schicht entstand aus dem Transient cell compartment 1 (=TCC1), welche sich am 7. Entwicklungs-Tag im Gehirn der Hühnerembryonen in der Marginal-Zone des Lobus opticus bildet. Die TCCs sind vorübergehende selektive Aggregationen von Zellen. Aus dem TCC1 entsteht neben dem C“SGC“ das TCC2, welches jedoch nur schwache Proliferationssignale aufweist. Zwischen der Zona generativa und dem C“SGC“ befindet sich bereits das Stratum album centrale, welches dem adulten SAC entspricht.

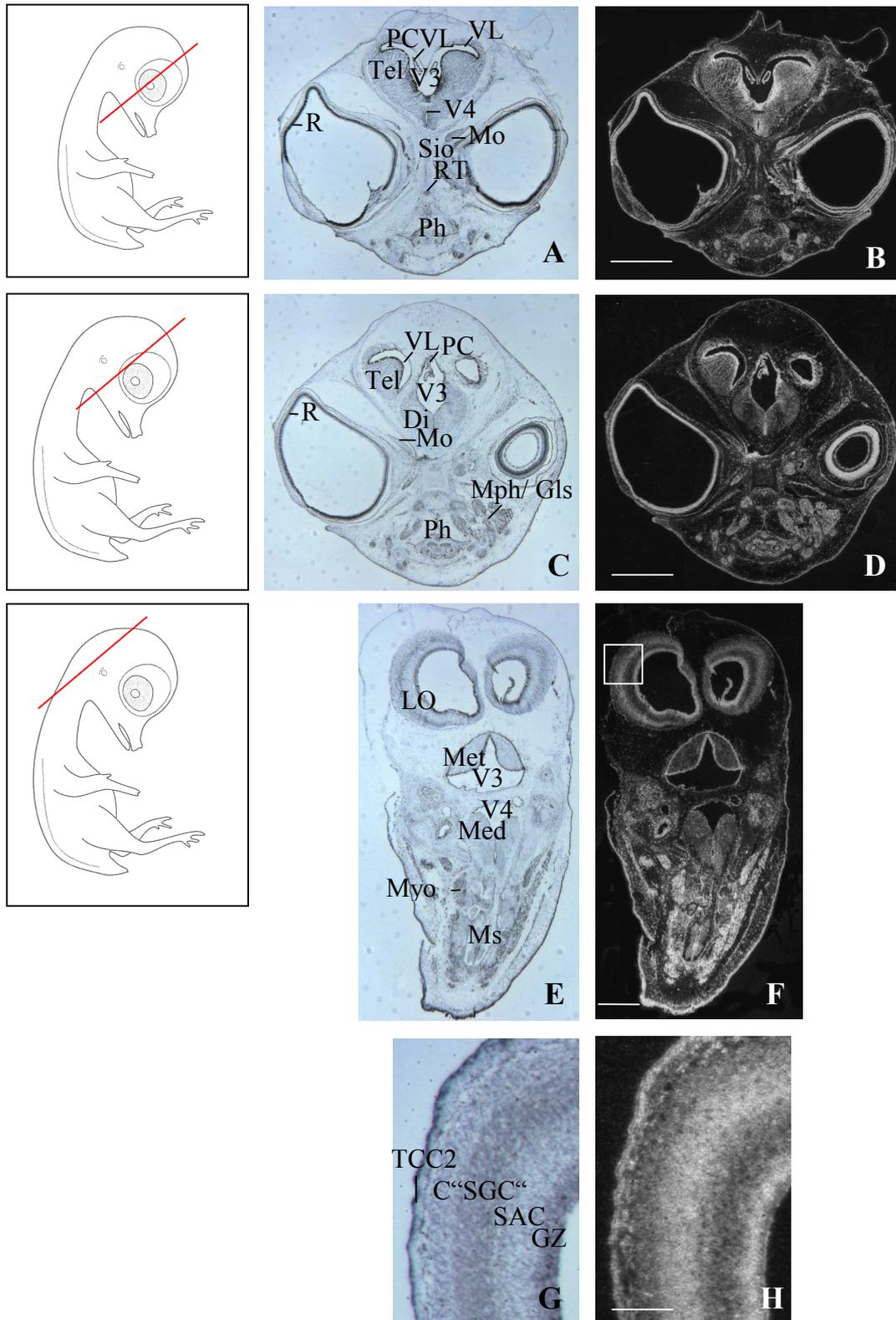


Abb. 13

Coronarschnitte durch einen 8-Tage alten Hühnerembryo (Stadium 34 nach Hamburger/Hamilton).

A, C, E und **G**: Hellfeld-Aufnahmen. **B, D, F** und **H**: Dunkelfeld-Aufnahmen. **G** und **H**: Lobus opticus, Ausschnitt aus **E** und **F**.

Skalierungsbalken: in A-D: 2,5 mm, in E und F: 1,2 mm, in G und H: 0,3 mm.

Abkürzungen:

C“SGC“ – Compartment Stratum griseum centrale;

Di – Diencephalon;

Gls – Glandulae salivariae;

GZ – Zona generativa;

LO – Lobus opticus;

Med – Medulla oblongata;

Met – Metencephalon;

Mo – Musculi oculorum;

Mph – Musculi pharyngis;

Ms – Medulla spinalis;

Myo – Myotome;

PC – Plexus choroideus;

PCVL – Plexus choroideus ventriculi lateralis;

Ph – Pharynx;

R – Retina;

RT – Rathke`sche-Tasche;

SAC – Stratum album centrale;

Sio – Septum interorbitale;

TCC2 – Transient cell compartment 2;

Tel – Telencephalon;

V3 – Ventriculus tertius;

V4 – Ventriculus quartus;

VL – Ventriculus lateralis.

3.3.3 Untersuchungen am 10-Tage alten Hühnerembryo

(Stadium 36 nach Hamburger/Hamilton)

Das Gehirn des 10-Tage alten Hühnerembryos ist im Aufbau dem adulten Hühnergehirn bereits sehr ähnlich. Es sind zu diesem Zeitpunkt schon alle wichtigen Strukturen zu erkennen, welche sich im weiteren Entwicklungsverlauf ausdifferenzieren werden.

In der Abbildung 14 sind Coronarschnitte durch einen 10-Tage alten Hühnerembryo dargestellt, in denen verschiedene Areale des Telencephalons, die Augen und der Pharynx zu erkennen sind. Die Abbildung 14 B verdeutlicht, dass die stärkste Zellproliferation weiter-

hin in der Zona subventricularis stattfindet. Im übrigen Telencephalon sind in diesem Entwicklungsstadium Areale mit leicht unterschiedlich ausgeprägten Proliferationsraten erkennbar. Während im Mesopallium, welches Bereichen des menschlichen Neocortex äquivalent ist, noch Zellteilungen stattfinden, sind im Hyperpallium apicale, das mit humanen primären visuellen Neocortexarealen korreliert, im Globus pallidus und dem Striatum laterale, welche den menschlichen Basalganglien äquivalent sind, kaum Proliferationssignale sichtbar.

Die Abbildung 14 D zeigt als wesentliche Strukturen Areale des Telencephalons, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, die Augen und den Pharynx. Der Hippocampus lässt ebenso wie die Area parahippocampalis praktisch keine Zellteilungssignale erkennen. Geringe Signale weist das Nidopallium, welches, wie das Mesopallium, ebenfalls menschlichen Neocortexbereichen äquivalent ist, auf. Im Nucleus striae terminalis sind sehr starke Signale zu erkennen.

Relativ wenig Zellteilungen finden im Nucleus rotundus, weiteren Thalamusanteilen und im Hypothalamus statt.

Die Abbildung 14 F stellt einen weiter dorsal gelegenen Coronarschnitt durch das Gehirn des 10-Tage alten Hühnerembryos dar. Gut erkennbare Strukturen sind der Lobus opticus, das Metencephalon, die Cochlea, Musculi masticatorii, Ösophagus und Trachea. Die Abbildung macht deutlich, wie schnell der Lobus opticus wächst, vergleiche Entwicklungstag 8, und sich in weitere Zellschichten differenziert. Proliferationssignale sind auch im Corpus pineale, der Cochlea, in den Musculi masticatorii, im Ösophagus und der Trachea zu erkennen.

In der Abbildung 14 H ist ein Ausschnitt aus der Abbildung 14 F dargestellt, welcher einen Coronarschnitt durch den Lobus opticus zeigt. In der Zona ventricularis des Lobus opticus sind Proliferationssignale sichtbar. Diese Schicht wurde bis zum ED 8 als Zona generativa bezeichnet. Aufgrund der im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung reduzierten Proliferation der Stammzellen wird sie ab ED 9 Zona ventricularis genannt. In der Zona subventricularis sind kaum proliferierende Zellen zu erkennen. Das Compartment "SGC" zeigt ebenfalls wenige markierte Zellen. In den Schichten C^{"h-i-j"} und TCC3, welche durch Teilung des TCC2 gebildet wurden, sind starke Proliferationssignale zu sehen.

Die Schicht C^{"h-i-j"} wird sich im folgenden zu den Schichten „h“, „i“ und „j“ des Stratum fibrosum et griseum superficiale (=SFGS) entwickeln.

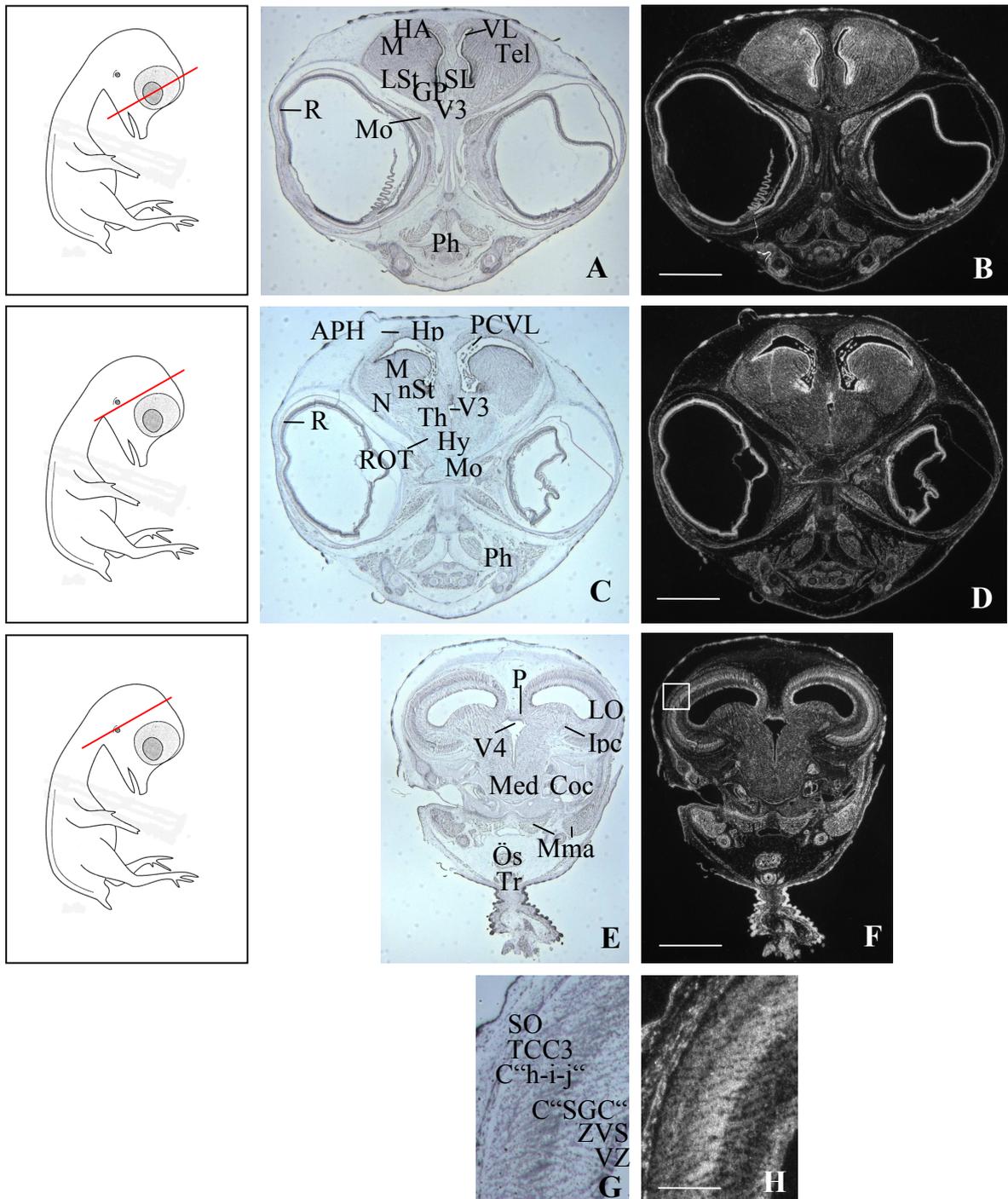


Abb. 14

Coronarschnitte durch einen 10-Tage alten Hühnerembryo (Stadium 36 nach Hamburger / Hamilton).

A, C, E und **G**: Hellfeld-Aufnahmen. **B, D, F** und **H**: Dunkelfeld-Aufnahmen. **G** und **H**: Lobus opticus, Ausschnitt aus **E** und **F**. Skalierungsbalken: in **A-F**: 2,5 mm, in **G** und **H**: 0,3 mm.

Abkürzungen:

APH – Area parahippocampalis;

Coc – Cochlea;
C“h-i-j“ – Compartment „h-i-j“;
C“SGC“ – Compartment Stratum griseum centrale;
GP – Globus pallidus;
HA – Hyperpallium accessorium;
Hp – Hippocampus;
Hy – Hypothalamus;
Ipc – Nucleus isthmi pars parvocellularis;
LO – Lobus opticus;
LSt – Striatum laterale;
M – Mesopallium;
Med – Medulla oblongata;
Mma – Musculi masticatorii;
Mo – Musculi oculorum;
N – Nidopallium;
nSt – Nucleus striae terminalis;
Ös – Ösophagus;
P – Corpus pineale;
PCVL – Plexus choroideus ventriculi lateralis;
Ph – Pharynx;
R – Retina;
ROT – Nucleus rotundus;
SL – Nucleus septalis lateralis;
SO – Stratum opticum;
TCC3 – Transient cell compartment 3;
Tel – Telencephalon;
Th – Thalamus;
Tr – Trachea;
V3 – Ventriculus tertius;
V4 – Ventriculus quartus;
VL – Ventriculus lateralis;
VZ – Zona ventricularis;
ZVS – Zona subventricularis.

Die Abbildung 15 zeigt einen Horizontalschnitt durch den Kopf eines 10-Tage alten Hühnerembryos. Die wesentlich erkennbaren Strukturen sind das Telencephalon, der Lobus opticus, das Cerebellum und die Augen. In dieser Abbildung ist das Cerebellum bereits deutlich erkennbar und weist besonders starke Proliferationssignale im External granule layer auf, eine dem menschlichen Stratum moleculare äquivalente Schicht. Im Internal granule layer ist nur wenig Proliferation nachweisbar. Diese Schicht korreliert mit dem humanen Stratum granulare.

Ausgeprägte Zellproliferationssignale sind in der Zona subventricularis, den frontalen Telencephalonarealen, in den bereits beschriebenen Schichten des Lobus opticus und der Retina erkennbar.

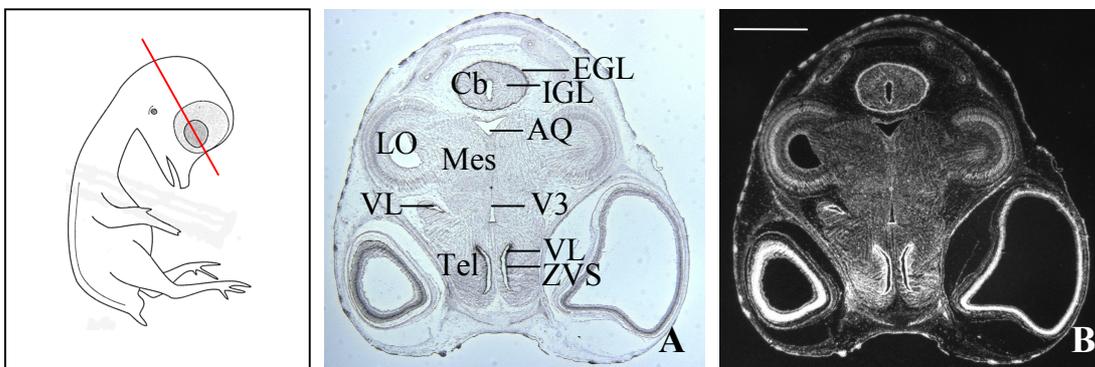


Abb. 15

Horizontalschnitt durch einen 10-Tage alten Hühnerembryo (Stadium 36 nach Hamburger/Hamilton).

A: Hellfeld-Aufnahme. **B:** Dunkelfeld-Aufnahme. Skalierungsbalken: 2,5 mm.

Abkürzungen:

AQ – Aquaeductus mesencephali;

Cb – Cerebellum;

EGL – External granule layer;

IGL – Internal granule layer;

LO – Lobus opticus;

Mes – Mesencephalon;

R – Retina;

Tel – Telencephalon;

VL – Ventriculus;

V3 – Ventriculus tertius;

ZVS – Zona subventricularis.

3.3.4 Untersuchungen am 13-Tage alten Hühnerembryo

(Stadium 39 nach Hamburger/Hamilton)

Vom 10. bis 13. Embryonaltag erfolgt eine Zunahme der Größe aller Hirnstrukturen, der basale Aufbau ist jedoch gleichbleibend. Eine Ausnahme bildet das Cerebellum, welches, wie in der Abbildung 16 erkennbar ist, sich stark differenziert hat und in seinem Schichtenaufbau dem adulten Kleinhirn strukturell vergleichbar ist.

Die Abbildung 16 zeigt einen Horizontalschnitt durch den Kopf eines 13-Tage alten Hühnerembryos. In diesem Schnitt sind die sich nun ausbildenden Federn, die Augen, das Cerebellum, der Lobus opticus und die Medulla oblongata angeschnitten.

In der Abbildung 16 D ist ein Ausschnitt aus der Abbildung 16 B dargestellt, der eine Nahaufnahme des Lobus opticus zeigt. Der grundlegende Aufbau des Lobus opticus hat sich seit dem 10. Entwicklungstag nicht verändert. Es erfolgte eine Zunahme der Dicke der Schichten. Proliferationssignale sind im Compartment „h-i-j“ stärker als in den anderen Schichten ausgeprägt.

Die Abbildung 16 F zeigt einen weiteren Ausschnitt aus der Abbildung 16 B. Er stellt eine Nahaufnahme des Kleinhirns dar, in dem ausgeprägte Proliferationssignale im External granule layer, weniger stark jedoch im Internal granule layer erkennbar sind. Die in diesem Stadium bereits erkennbare Schicht der Purkinje-Zellen weist keine Proliferationssignale auf.

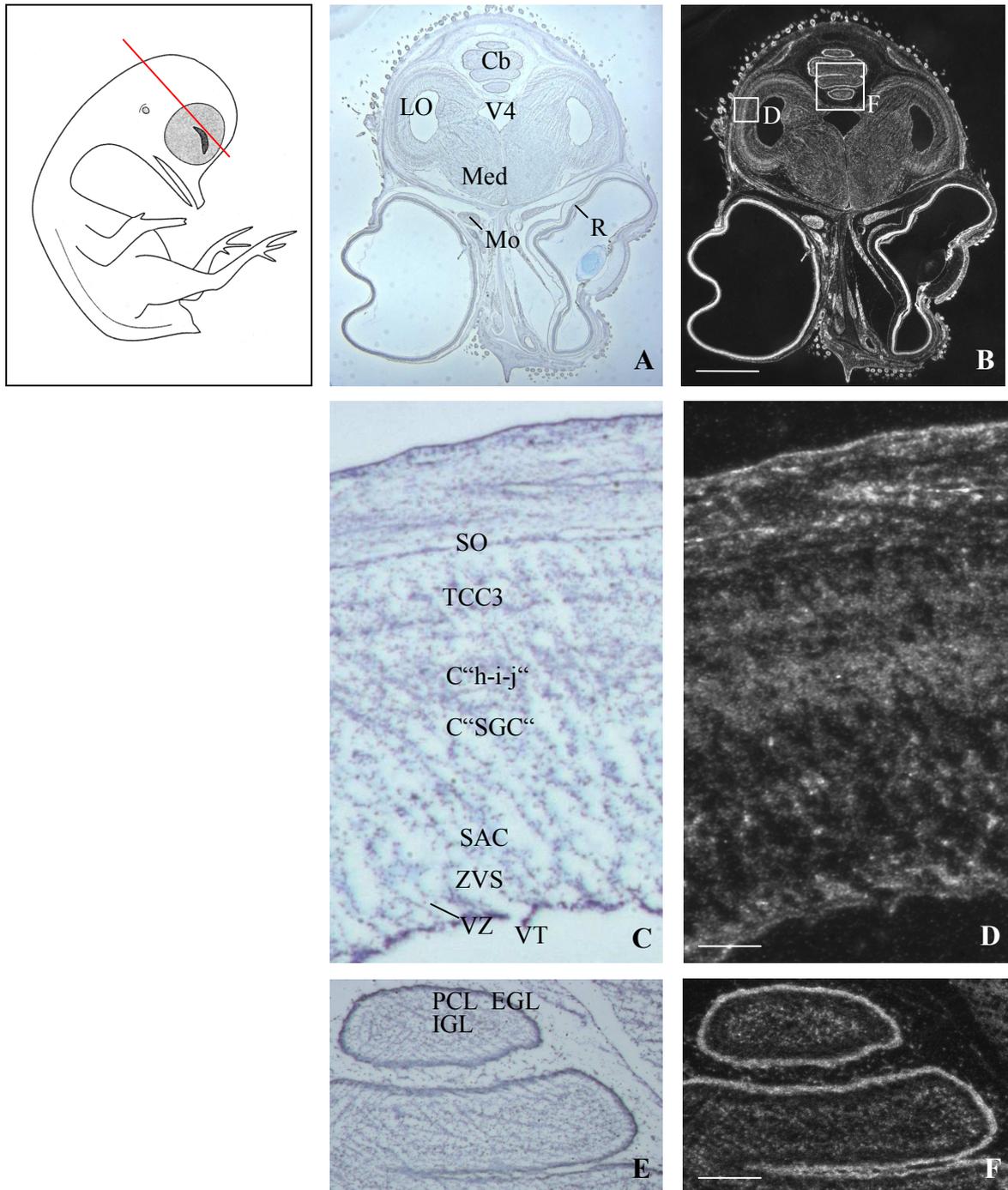


Abb. 16

Horizontalschnitt durch einen 13-Tage alten Hühnerembryo (Stadium 39 nach Hamburger/Hamilton).

A, C und E: Hellfeld-Aufnahmen. **B, D und F:** Dunkelfeld-Aufnahmen. **C und D:** Lobus opticus, Ausschnitt aus A und B. **E und F:** Cerebellum, Ausschnitt aus A und B. Skalierungsbalken: in A und B: 3,5 mm, in C und D: 0,1 mm, in E und F: 0,3 mm.

Abkürzungen:

Cb – Cerebellum;

C^{h-i-j} – Compartment „h-i-j“;
C^{SGC} – Compartment Stratum griseum centrale;
EGL – External granule layer;
IGL – Internal granule layer;
Le – Lens;
LO – Lobus opticus;
Med – Medulla oblongata;
Mo – Musculi oculorum;
PCL – Purkinje cell layer;
R – Retina;
SAC – Stratum album centrale;
SO – Stratum opticum;
TCC3 – Transient cell compartment 3;
V4 – Ventriculus quartus;
VT – Ventriculus tecti mesencephali;
VZ – Zona ventricularis;
ZVS – Zona subventricularis.

3.3.5 Untersuchungen am Gehirn eines 16-Tage alten Hühnerembryos (Stadium 42 nach Hamburger/Hamilton)

In der Abbildung 17 sind Coronarschnitte durch das Gehirn eines 16-Tage alten Hühnerembryos dargestellt. Die Abbildung 17 B zeigt den Bulbus olfactorius. Im Telencephalon stellt sich die Zona subventricularis wiederum aktiv proliferierend dar. Aus der Zone wandern zu diesem Zeitpunkt die neuronalen Zellen in den Bulbus olfactorius ein. Diese Wanderungszone ist direkt im Schnitt erfasst. Im englischen Sprachraum wird dieser Wanderungsstrom auch als „rostral migrating stream“ (RMS) bezeichnet. In der Abbildung 17 D sind starke Zellteilungssignale in der Zona subventricularis und distinkte Signale im Globus pallidus zu erkennen. In einem weiter dorsal gelegenen Schnitt, Abbildung 17 F, sind Signale im Plexus choroideus ventriculi lateralis, im Field L, welches ein Teil des Nidopallium ist, im Corpus pineale und als schmaler Zellsaum in der Zona subventricularis zu sehen. Der Hippocampus weist erneut keine Proliferationssignale auf.

Die Abbildung 17 H stellt einen weiteren Coronarschnitt durch das Gehirn des 16-Tage alten Hühnerembryos dar, in welcher als wesentliche Strukturen das Cerebellum und der Lobus opticus angeschnitten sind. Das Cerebellum weist stark ausgeprägte Zellproliferati-

onssignale auf, während im Lobus opticus zu diesem Zeitpunkt vergleichsweise weniger Zellteilungen stattfinden.

Einen Ausschnitt aus Abbildung 17 H zeigt die Abbildung 17 J, in welchem der Lobus opticus dargestellt ist. Am 16. Tag der Embryonalentwicklung des Huhns sind im Lobus opticus Markierungen in folgenden Bereichen zu sehen: Im C“h-i-j“, in den transient cell compartments 4 und 5, welche aus dem TCC3 entstanden sind, und im Stratum opticum. Die Zona subventricularis ist von der Zona ventricularis durch eine dünne fibröse Schicht, die sich im weiteren Verlauf zum Stratum fibrosum periventriculare (=SFP) entwickeln wird, getrennt. Da die Zona subventricularis dem im adulten Gehirn vorhandenen Stratum griseum periventriculare (=SGP) und die Zona ventricularis dem Ependymalepithel entspricht, werden diese Schichten nach der Trennung durch das SFP als C“SGP“ und C“Ep“ bezeichnet.

Die Abbildung 17 L, ein Ausschnitt aus der Abbildung 17 H zeigt eine Vergrößerung des Kleinhirns. Im External granule layer finden weiterhin die meisten Zellteilungen statt. Jedoch weist nun auch der Internal granule layer im Vergleich zum 13. Entwicklungstag deutlichere Proliferationssignale auf.

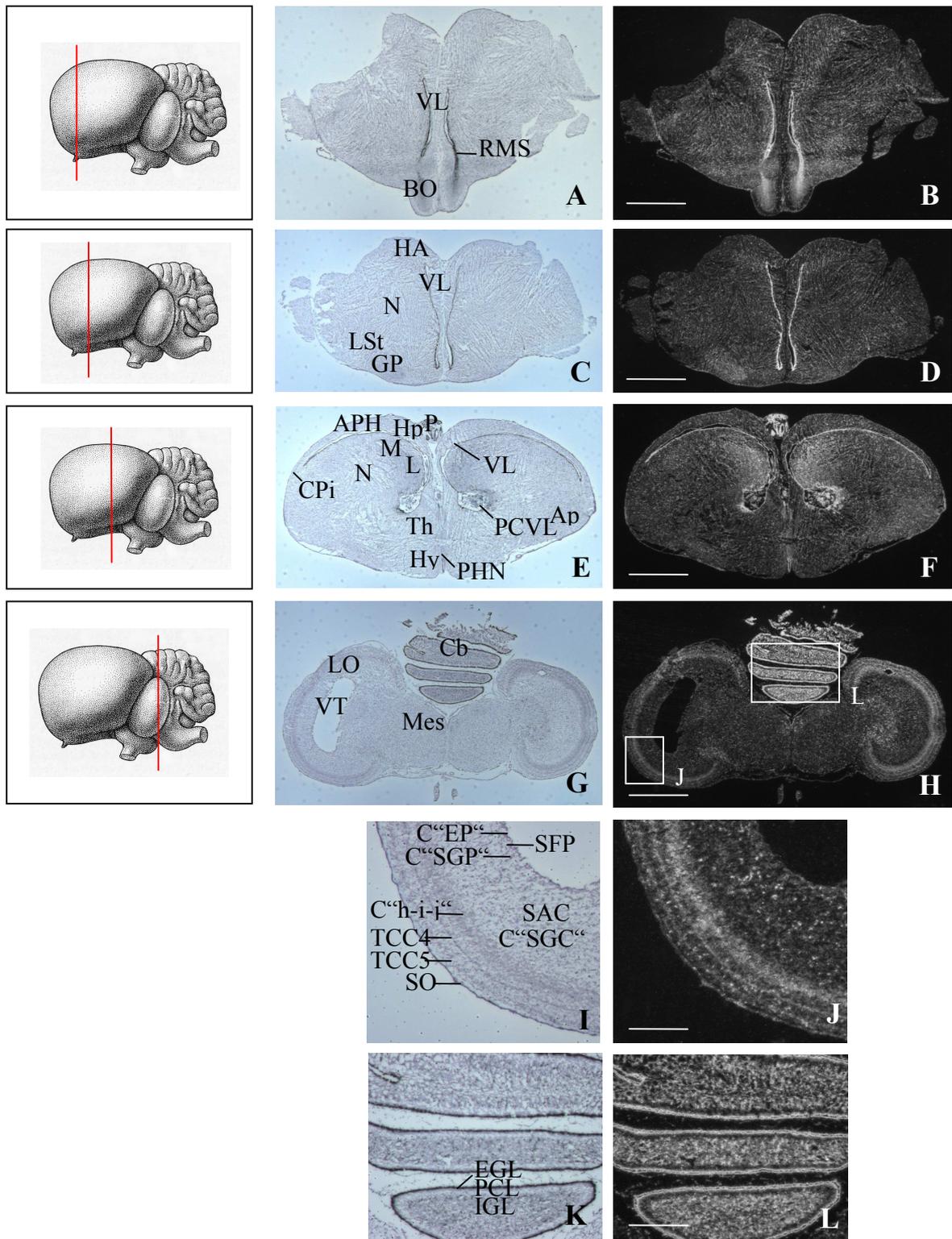


Abb. 17

Coronarschnitte durch das Gehirn eines 16-Tage alten Hühnerembryos (Stadium 42 nach Hamburger/Hamilton).

A, C, E, G, I und K: Hellfeld-Aufnahmen. B, D, F, H, J und L: Dunkelfeld-Aufnahmen. I und J: Lobus opticus, Ausschnitt aus G und H. K und L: Cerebellum, Ausschnitt aus G und H.

Skalierungsbalken: in A und B: 1,8 mm, in C-H: 2,0 mm, in I und J: 0,5 mm, in K und L: 1,0 mm.

Abkürzungen:

Ap – Arcopallium posterius;

APH – Area parahippocampalis;

BO – Bulbus olfactorius;

Cb – Cerebellum;

C"Ep" – Compartment Ependym;

C"h-i-j" – Compartment "h-i-j";

CPI – Cortex piriformis;

C"SGC" – Compartment Stratum griseum centrale;

C"SGP" – Compartment Stratum griseum periventriculare;

EGL – External granule layer;

GP – Globus pallidus;

HA – Hyperpallium apicale;

Hp – Hippocampus;

Hy – Hypothalamus;

IGL – Internal granule layer;

L – Field L;

LO – Lobus opticus;

LSt – Striatum laterale;

M – Mesopallium;

Mes – Mesencephalon;

N – Nidopallium;

P – Corpus pineale;

PCL – Purkinje cell layer;

PCVL – Plexus choroideus ventriculi lateralis;

PHN – Nucleus periventricularis hypothalami;

RMS – rostral migrating stream;

SAC – Stratum album centrale;

SFP – Stratum fibrosum periventriculare;

SO – Stratum opticum;

TCC4 – Transient cell compartment 4;

TCC5 – Transient cell compartment 5;

Th – Thalamus;

VL – Ventriculus lateralis;

VT – Ventriculus tecti mesencephali.

3.3.6 Untersuchungen am Gehirn eines 19-Tage alten Hühnerembryos (Stadium 45 nach Hamburger/Hamilton)

Der 19. Embryonaltag des Huhns lässt in der Abbildung 18 erkennen, dass, obwohl das Küken in zwei Tagen schlüpfen würde, noch relativ viele Zellteilungen im Gehirn stattfinden. Die Abbildung zeigt Coronarschnitte durch das Gehirn des 19-Tage alten Hühnerembryos.

In der Abbildung 18 B sind die eingewanderten Zellen des Bulbus olfactorius mit einer dem 16. Entwicklungstag vergleichbaren Intensität dargestellt. Das Ventrikelsystem ist in diesem Schnitt nicht angeschnitten. Weiterhin werden Zellen in der Lamina frontalis superior, die das Hyperpallium vom Mesopallium abgrenzt, und in der Lamina mesopallialis, welche das Mesopallium vom Nidopallium trennt, gebildet. Die Abbildung 18 D verdeutlicht, dass auch zu diesem späten Entwicklungszeitpunkt die Proliferationssignale in der Zona subventricularis am stärksten sind. Die Abbildung 18 F, ein Coronarschnitt, in welchem als wesentliche Strukturen das Ventrikelsystem, der Hippocampus und Areale des Telencephalons und Diencephalons angeschnitten sind, zeigt, dass das Mesopallium, das Field L, das Striatum laterale, der Ncl. rotundus und der Hypothalamus Zellproliferation aufweisen. Im Bereich des Hippocampus sind keine Signale zu sehen.

Dem 16. Embryonaltag vergleichbare Proliferationssignale sind im Lobus opticus und Cerebellum in der Abbildung 18 H erkennbar. Auch die Substantia grisea centralis und die Formatio reticularis mesencephali weisen Signale auf. Die Abbildung 18 J stellt einen Ausschnitt aus der Abbildung 18 H dar, in welchem die einzelnen Schichten des Lobus opticus gut zu erkennen sind. Im Lobus opticus des 19-Tage alten Hühnerembryos bildeten sich aus dem TCC5 zwei dünne neuronale Schichten, welche den neuronalen Schichten „a“ und „c“ des SGFS entsprechen. Das TCC4 teilte sich in die neuronalen Schichten „e“ und „g“ des SGFS. Im Stratum opticum und besonders in allen neuronalen Schichten des SGFS sind Proliferationssignale deutlich erkennbar.

In der Abbildung 18 L ist ein weiterer Ausschnitt aus der Abbildung 18 H, eine Nahaufnahme des Kleinhirns dargestellt. Im Internal granule layer hat die Signalintensität gegenüber dem 16. Entwicklungstag leicht abgenommen, während diese im External granule layer gleichbleibend stark ist.

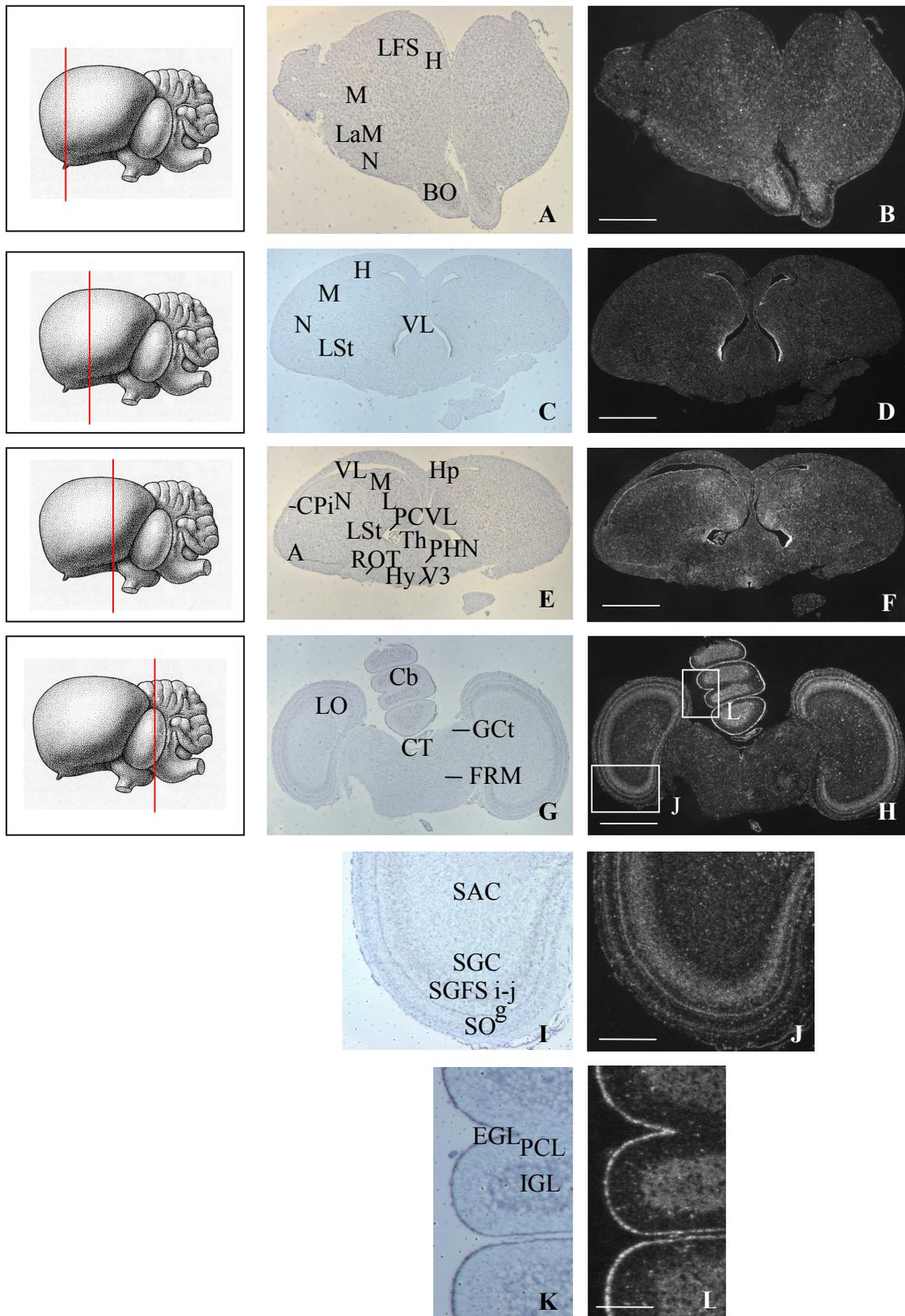


Abb. 18

Coronarschnitte durch das Gehirn eines 19-Tage alten Hühnerembryos (Stadium 45 nach Hamburger/Hamilton).

A, C, E, G, I und **K**: Hellfeld-Aufnahmen. **B, D, F, H, J** und **L**: Dunkelfeld-Aufnahmen.

I und **J**: Lobus opticus, Ausschnitt aus **G** und **H**. **K** und **L**: Cerebellum, Ausschnitt aus **G** und **H**. Skalierungsbalken: in **A** und **B**: 1,3 mm, in **C-F**: 3,0 mm, in **G** und **H**: 2,0 mm, in **I** und **J**: 0,7 mm, in **K** und **L**: 0,5 mm.

Abkürzungen:

A – Arcopallium;

APH – Area parahippocampalis;

BO – Bulbus olfactorius; Cb – Cerebellum;

CPi – Cortex piriformis;

CT – Commissura tectalis;

EGL – External granule layer;

FRM – Formatio reticularis mesencephali;

GCt – Substantia grisea centralis;

H – Hyperpallium;

Hp – Hippocampus;

Hy – Hypothalamus;

IGL – Internal granule layer;

L – Field L;

LaM – Lamina mesopallialis;

LFS – Lamina frontalis superior;

LO – Lobus opticus;

LSt – Striatum laterale;

M – Mesopallium;

N – Nidopallium;

PCL – Purkinje cell layer;

PCVL – Plexus choroideus ventriculi lateralis;

PHN – Nucleus periventricularis hypothalami;

ROT – Nucleus rotundus;

SAC – Stratum album centrale;

SGC – Stratum griseum centrale;

SGFS (i-j-g) – Stratum griseum et fibrosum superficiale (Schichten des SGFS);

SO – Stratum opticum;

Th – Thalamus;

V3- Ventriculus tertius;

VL – Ventriculus lateralis.

3.3.7 Untersuchungen am Gehirn eines adulten, 50-Tage alten Huhns

Das Gehirn des adulten, 50-Tage alten Huhns zeigt, obwohl das Huhn bereits ausgewachsen ist, immer noch deutliche Proliferationssignale. Diese sind in der Abbildung 19 D, einem Coronarschnitt durch das Gehirn des 50-Tage alten Huhns, im Cerebellum und im Lobus opticus relativ stark ausgeprägt. Im Gegensatz dazu sind in der Abbildung 19 B, einem weiteren, mehr frontal gelegenen Coronarschnitt durch das Gehirn, kaum Proliferationssignale erkennbar. Eine sehr dünne Proliferationsschicht säumt noch den Ventriculus lateralis.

In der Abbildung 19 F ist ein Ausschnitt aus der Abbildung 19 D, eine Aufnahme des Lobus opticus, dargestellt. Die Intensität der Proliferationssignale hat gegenüber dem 19. Tag der Embryonalentwicklung kaum abgenommen. Noch immer sind deutliche Signale im Stratum griseum centrale, Stratum griseum et fibrosum superficiale und im Stratum opticum zu erkennen.

Die Abbildung 19 H stellt einen Ausschnitt aus der Abbildung 19 D, eine Aufnahme des Kleinhirns dar. Die Intensität der Proliferationssignale hat sich im Internal granule layer im Vergleich zum 19. Tag der Embryonalentwicklung nicht verändert. Im External granule layer hat die Signalintensität jedoch stark abgenommen.

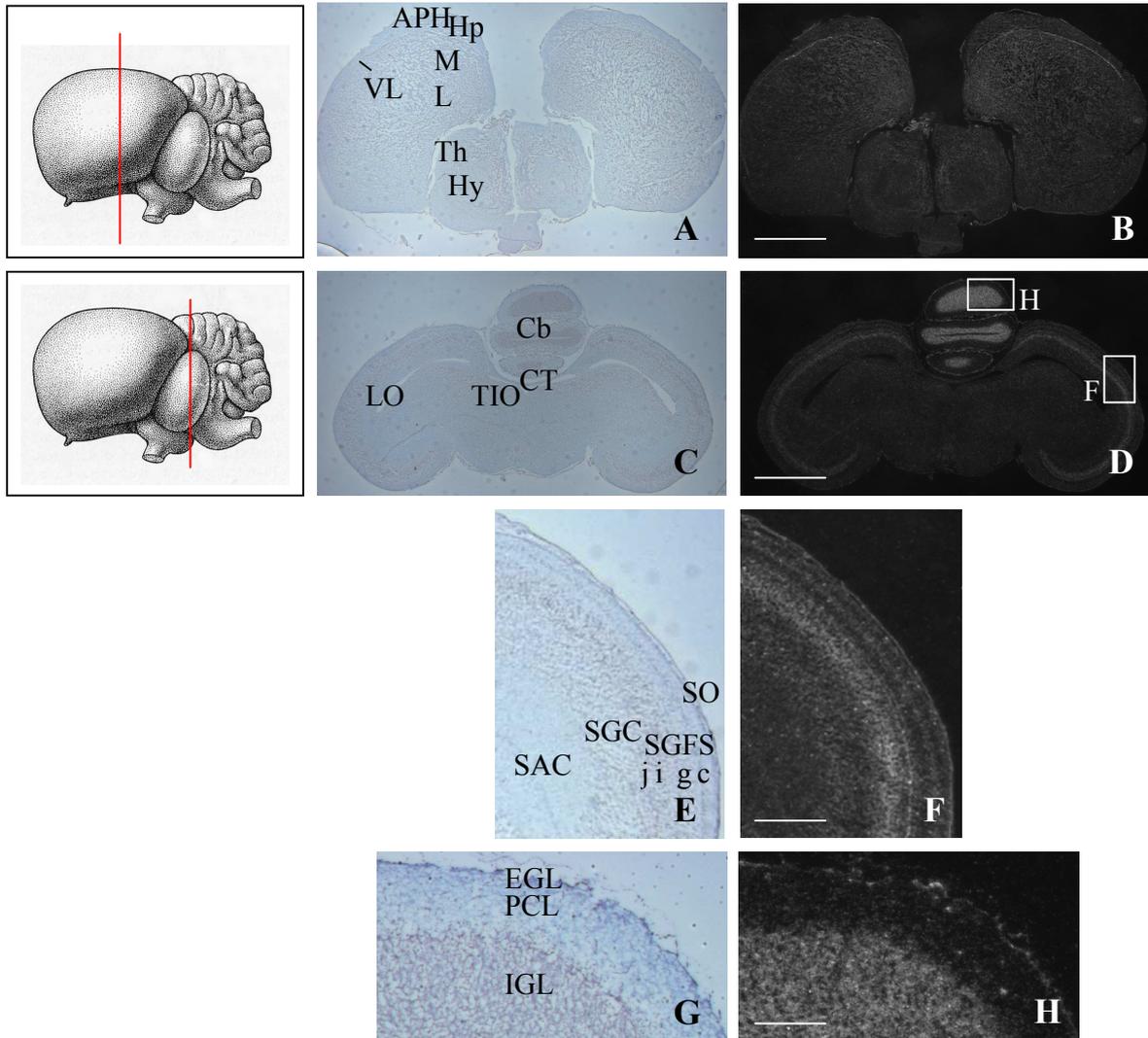


Abb. 19

Coronarschnitte durch das Gehirn des adulten, 50-Tage alten Huhns.

A, C, E und **G**: Hellfeld-Aufnahmen. **B, D, F** und **H**: Dunkelfeld-Aufnahmen. **E** und **F**: Lobus opticus, Ausschnitt aus **C** und **D**. **G** und **H**: Cerebellum, Ausschnitt aus **C** und **D**. Skalierungsbalken: in **A** und **B**: 3,6 mm, in **C** und **D**: 3,2 mm, in **E** und **F**: 0,4 mm, in **G** und **H**: 0,3 mm.

Abkürzungen:

APH – Area parahippocampalis;

Cb – Cerebellum;

CT – Commissura tectalis;

EGL – External granule layer;

Hp – Hippocampus;

Hy – Hypothalamus;

IGL – Internal granule layer;

L – Field L;

LO – Lobus opticus;

M – Mesopallium;

PCL – Purkinje cell layer;

SAC – Stratum album centrale;

SGC – Stratum griseum centrale;

SGFS (c-g-i-j) – Stratum griseum et fibrosum superficiale (Schichten des SGFS);

SO – Stratum opticum;

Th – Thalamus;

TIO – Tractus isthmo-opticus;

VL – Ventriculus lateralis.

3.4 Zusammenfassende Darstellung der Entwicklung des Lobus opticus

Der Lobus Opticus entwickelt sich aus dorsalen Anteilen des Mesencephalons. Durch die hohe Spezialisierung des Sehvermögens der Vögel hat während der Evolution eine ausgeprägte Differenzierung dieser Struktur stattgefunden: Es bildeten sich 15 Schichten. Es treten abwechselnd neuronale und fibröse Schichten auf, welche in der Tabelle 3 zusammengefasst sind.

Während der Entwicklung dieser Multi-Laminae-Struktur treten Schichten auf, die durch eine vorübergehende selektive Aggregation von Zellen entstehen und noch nicht den adulten Laminae entsprechen. Deshalb wird für die embryonalen Schichten des Lobus opticus eine andere Nomenklatur verwendet. Wenn sich die gebildeten Zellaggregationen im weiteren Entwicklungsverlauf erneut teilen, bezeichnet man diese als Transient cell compartments (=TCC). Wenn die embryonal angelegte Schicht bereits ein Vorläufer einer bestimmten adulten Schicht ist, wird dies mit einem „C“ (compartment) gekennzeichnet, z.B. C“SGC“.

Tabelle 3: Die Schichten des Lobus opticus

Abk.	Vollständige Bezeichnung	Fibrös/ neuronal	Funktion
Ep	Ependymales Epithel	Ependymal	den Ventrikel auskleidende ependymale Schicht
SFP	Stratum fibrosum periventriculare	Fibrös	Dendriten der Neuronen des Stratum griseum periventriculare
SGP	Stratum griseum periventriculare	Neuronal	Informationsverschaltung
SAC	Stratum album centrale	Fibrös	enthält Axone mit Hauptferenzen des Lobus opticus
SGC	Stratum griseum centrale	Neuronal	große, multipolare Neurone, Informationsverschaltung
SGFS	Stratum griseum et fibrosum superficiale	Fibrinös u. neuronal alternierend: 10 Laminae	komplexe Verschaltungen der Informationen
SO	Stratum opticum	Fibrös	enthält Axone der kontralateralen retinalen Ganglionzellen

Die Entwicklung des Lobus opticus des Huhns vom Tag 5 der Embryonalentwicklung bis zum adulten, 50-Tage alten Huhn wird mit den in der Abbildung 20 dargestellten Ausschnitten aus Coronarschnitten veranschaulicht.

Zunächst können im Lobus opticus des 5 Tage alten Hühnerembryos 2 Schichten voneinander unterschieden werden (siehe Abbildung 20 H). Die Zona generativa (=GZ), welche sehr starke Proliferationssignale aufweist, und die Zona marginalis (=MZ), in der nur gering ausgeprägte Signale zu erkennen sind.

Eine andauernde Proliferation der Stammzellen der GZ ist am 8. Tag der Embryonalentwicklung in der Abbildung 20 I zu erkennen. Des Weiteren sind in der C“SGC“-Region starke Proliferationssignale sichtbar. Diese Schicht, welche aus dem Transient cell compartment 1 (=TCC1) entstand, das sich am 7. Entwicklungstag im Lobus opticus der Hüh-

nerembryonen bildet, wird sich im weiteren Verlauf zum Stratum griseum centrale (=SGC) entwickeln. Aus dem TCC1 entsteht neben dem C“SGC“ das TCC2. Zwischen der Zona generativa und dem C“SGC“ befindet sich bereits das Stratum album centrale (=SAC), welches dem SAC des adulten Gehirns entspricht. Im TCC2 und im Stratum album centrale sind kaum Proliferationssignale nachweisbar.

Ab dem 10. Entwicklungstag wird die Zona generativa aufgrund der im weiteren Verlauf reduzierten Proliferation der Stammzellen als Zona ventricularis (=VZ) bezeichnet. Die abnehmende Intensität der Proliferationssignale in der Zona generativa, bzw. Zona ventricularis ist in den Abbildungen 20 H-K deutlich zu sehen. In der Zona subventricularis (=ZVS) sind kaum proliferierende Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 20 J). In den Schichten C“h-i-j“ und TCC3, welche durch Teilung des TCC2 entstanden, sind starke Proliferationssignale zu sehen. Das C“h-i-j“ wird sich zu den Schichten „h“, „i“ und „j“ des Stratum fibrosum et griseum superficiale (=SFGS) entwickeln. Die Intensität der Proliferationssignale im C“SGC“ hat im Vergleich zum 8. Tag der Embryonalentwicklung stark abgenommen.

In den folgenden Tagen hat sich der grundlegende Aufbau des Lobus opticus kaum verändert. Es erfolgte eine Zunahme der Dicke der Schichten, wie der Abbildung 20 K, einem Anschnitt des Lobus opticus des 13 Tage alten Hühnerembryos, zu entnehmen ist. Die Signalintensität des C“SGC“ hat weiterhin abgenommen.

Im Lobus opticus des 16 Tage alten Hühnerembryos ist im C“h-i-j“, in den Transient cell compartments 4 und 5, welche aus dem TCC3 entstanden sind, und im Stratum opticum Proliferation erkennbar (siehe Abbildung 20 L). Die Zona subventricularis wird von der Zona ventricularis durch eine dünne fibröse Schicht, die sich im weiteren Verlauf zum Stratum fibrosum periventriculare (=SFP) entwickeln wird, getrennt. Da die ZVS dem im adulten Gehirn vorhandenen Stratum griseum periventriculare (=SGP) und die VZ dem ependymalen Epithel entspricht, werden diese Schichten nach der Trennung durch das SFP als C“SGP“ und C“Ep“ bezeichnet.

Die Abbildung 20 M stellt den Lobus opticus des 19 Tage alten Hühnerembryos dar. Zwei Tage vor dem Schlüpfen bildeten sich aus dem TCC5 zwei dünne neuronale Schichten, welche den Schichten „a“ und „c“ des SGFS entsprechen. Das TCC4 teilte sich in die neuronalen Schichten „e“ und „g“ des SGFS. Im Stratum opticum und in allen neuronalen Schichten (a, c, e, g und i) des SGFS sind die Proliferationssignale deutlich sichtbar.

Anhand der Abbildung 20 N wird deutlich, dass im Lobus opticus des adulten Huhns noch immer Proliferation stattfindet. Die Signalintensität hat im Vergleich zum 19. Tag der

Embryonalentwicklung kaum abgenommen, und im Stratum griseum centrale, Stratum griseum et fibrosum superficiale und im Stratum opticum sind deutliche Proliferations-signale zu erkennen.

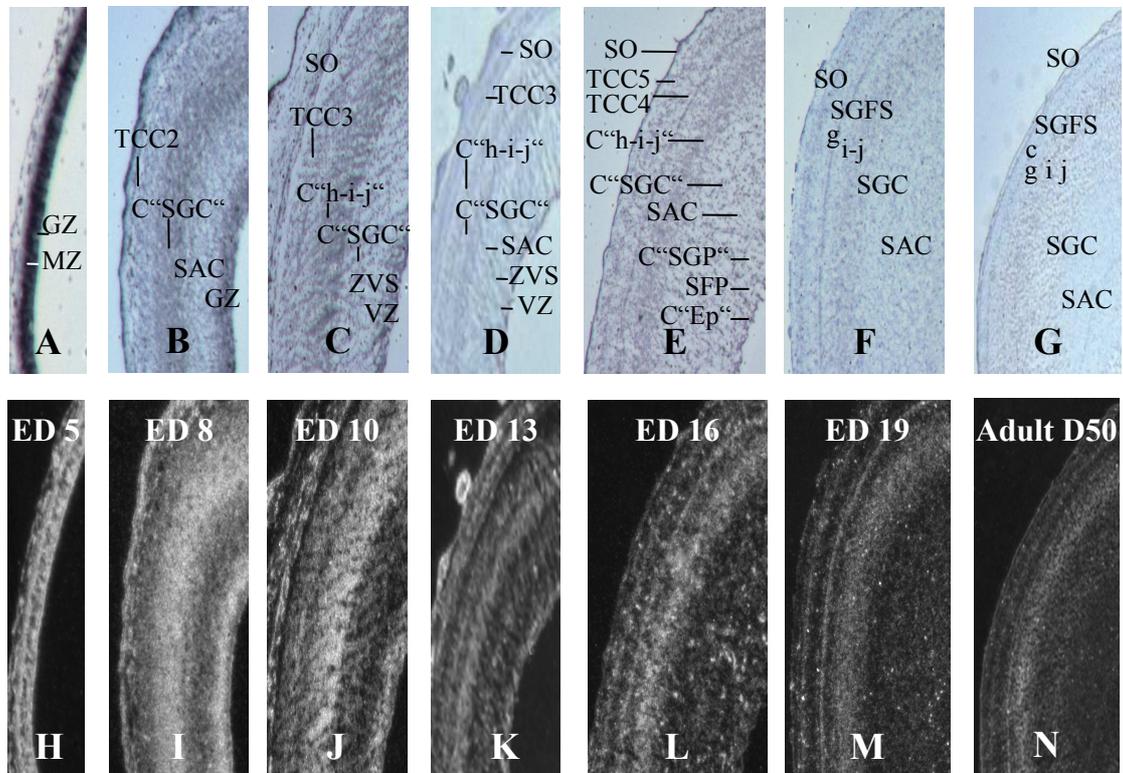


Abb. 20

Ausschnitte aus coronaren Schnitten von Hühnerembryonen der Entwicklungstage 5, 8, 10, 13, 16, 19 und adultem, 50-Tage alten Huhn. Darstellung des Lobus opticus.

A-G: Hellfeld-Aufnahmen. **H-N:** Dunkelfeld-Aufnahmen.

Abkürzungen:

C''Ep'' – Compartment Ependym;

C''h-i-j'' - Compartment h-i-j;

C''SGC'' – Compartment Stratum griseum centrale;

C''SGP'' - Compartment Stratum griseum periventriculare;

GZ – Zona generativa;

MZ – Zona marginalis;

SAC – Stratum album centrale;

SFP – Stratum fibrosum periventriculare;

SGC – Stratum griseum centrale;

SGFS (c-g-i-j) – Stratum griseum et fibrosum superficiale (Schichten des SGFS);

SO – Stratum opticum;

TCC2/3/4/5 – Transient cell compartment 2/3/4/5;

VZ – Zona ventricularis;

ZVS – Zona subventricularis.

3.5 Korrelation der Gehirnregionen von Huhn und Mensch

In der Tabelle 4 werden die Gehirnareale des Huhns den dazu äquivalenten humanen Arealen gegenübergestellt.

Tabelle 4: Korrelation der Gehirnregionen von Huhn und Mensch

Gehirnstruktur des Huhns	Äquivalente Gehirnstruktur des Menschen
Arcopallium	Limbisches System; Teile des somatomotorischen Cortex
Area parahippocampalis	Teile des Neocortex
External granule layer	Stratum moleculare (Cerebellum)
Field L = Teil des Nidopallium	Teile des Neocortex
Globus pallidus	Globus pallidus
Internal granule layer	Stratum granulare (Cerebellum)
Hippocampus	Hippocampus
Hyperpallium	Teile des Neocortex
Hyperpallium apicale	Primärer visueller Cortex
Hyperpallium densocellularum	Teile des Neocortex
Mesopallium	Teile des Neocortex
Nidopallium	Teile des Neocortex
Purkinje cell layer	Stratum ganglionare (Cerebellum)
Striatum laterale	Ncl. caudatus; Putamen

4 Diskussion

4.1 Die Zellzyklusdauer im Hühnerembryo

Die Experimente zur Bestimmung der Zellzyklusdauer wurden mit Fibroblasten von 6-Tage alten Hühnerembryonen, was dem Stadium 29 nach Hamburger/Hamilton entspricht, durchgeführt. Mithilfe der durchgeführten Experimente in dieser Arbeit wird die Dauer des Zellzyklus des Huhns auf ca. 10 h geschätzt, siehe Abb. 10.

Die rasante Zellproliferation während der ersten 24 h der Entwicklung der Hühnerembryonen kann mit einer Zellzyklusdauer von 10 h natürlich nicht erklärt werden. Diese wird aufgrund der Tatsache, dass bereits 24 h nach der Befruchtung 60000 Zellen existieren, auf 1,5 h geschätzt (Eyal-Giladi und Kovach, 1976). Ursachen für diese Differenz könnten zum einen Fehler bei der Herstellung der Fibroblastenzelllinie, bei der Anzucht, Synchronisierung oder auch bei der Messung mithilfe der Durchflusszytometrie sein. Zum anderen ist es vorstellbar, dass der Zellzyklus der Hühnerembryonen im Verlauf der Entwicklung langsamer abläuft. Dieses Phänomen ist für viele Tierarten bereits bekannt. *Drosophila* weist in den Prä-Gastrulations-Phasen eine Zellzyklusdauer von 8-23 min auf. Mit dem Beginn der Gastrulation verlaufen die Zellzyklen abrupt langsamer. Im Larvengewebe dauert ein Zellzyklus 8 h. Der Frosch, als ein Vertreter der Wirbeltiere, besitzt in den Prä-Gastrulations-Phasen eine Zellzyklusdauer von 30 min, welche im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung zunimmt (O'Farrell et al., 2004). Bei der Maus wurde während der ersten Zellteilungen eine Zellzyklusdauer von 12-24 h nachgewiesen. Zum Zeitpunkt der Gastrulation, welche bei der Maus um den Tag 6 der Embryonalentwicklung stattfindet, zeigten Zellen des embryonalen Ektoderms jedoch eine Zellzyklusdauer von 2,2 h (O'Farrell et al., 2004). Da ähnliche Ergebnisse auch bei Ratten gezeigt wurden, wird angenommen, dass dies ein allgemeines Phänomen bei den Säugetieren ist.

Homologien zwischen den extrem schnellen Zellzyklen in den Prä-Gastrulationsphasen von *Drosophila*, bzw. Frosch, und in den Gastrulationsphasen von Säugern wurden gefunden. Die G₁- und die G₂-Phase sind beispielsweise extrem kurz oder gar nicht vorhanden. Auch gleiche regulatorische Gene für diese schnellen Zellzyklen wurden entdeckt (O'Farrell et al., 2004).

Sehr interessant ist, dass beim Huhn die Gastrulation eng mit den letzten, extrem schnellen Zellzyklen gekoppelt ist. Die Gastrulation beginnt beim Huhn bereits 5 h nach Beginn der Brutwärme. Da sowohl die Prä-Gastrulations-Phasen als auch die Gastrulations-Schritte sehr schnelle Zellzyklen aufweisen, kann das Huhn als eine Art Bindeglied für die unter-

schiedliche Embryonalentwicklung bei Amphibien und Säugetieren betrachtet werden (O'Farrell et al., 2004).

Meiner Meinung nach ist das Ergebnis der Zellzyklusexperimente korrekt und zeigt, dass auch beim Huhn der Zellzyklus im Verlauf der Embryonalentwicklung langsamer abläuft. Auch wenn für die Mäuse zum Zeitpunkt der Gastrulation im Ektoderm ein extrem schneller Zellzyklus nachgewiesen wurde, verläuft der Zellzyklus zu den meisten anderen Zeitpunkten der Mausembryonalentwicklung sehr viel langsamer als bei den Hühnerembryonen, womit die schnellere Gewichtszunahme der Hühnerembryonen, siehe Tabelle 2, erklärt werden kann.

4.2 Nachweis der Zellproliferation mit dem BrdU-Antikörpernachweis

Die BrdU-Markierung der Embryonen erfolgte durch Gabe eines BrdU-Pulses. Im Gegensatz zur kumulativen Markierung hat diese Methode eine Reihe von Vorteilen, so kann sehr viel genauer bestimmt werden, welche Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt proliferieren. Die Migration der markierten Zellen kann mithilfe unterschiedlicher Überlebenszeiten genau verfolgt werden, wobei es wichtig ist zu wissen, wann die applizierte Substanz aufgebraucht ist. In der in-vitro-Kultur ist es möglich das BrdU auszuwaschen, was in vivo jedoch nicht möglich ist, da gegebene Substanzen lange im Dottersack gespeichert werden (La Vail und Cowan, 1971). Die kumulative Markierung ist weitaus weniger genau. Da sehr viele Zellen markiert sind, die jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten entstanden sind, ist das Verfolgen einzelner Zellen nahezu unmöglich. Auch das Durchmischen bzw. die Migration der Zellen übereinander hinweg ist kaum darstellbar. Zudem können die Versuchstiere durch wiederholte Injektionen stärker verletzt werden. Zur Darstellung der proliferierenden Areale zu einem bestimmten Zeitpunkt bietet die Methode der Puls-Markierung somit weitaus mehr Vorteile.

Nach der Markierung der Embryonen wurde der BrdU-Antikörpernachweis zunächst an unfixierten und an mit Ethanol fixierten Embryonen durchgeführt. Der BrdU-Nachweis führte zu guten Resultaten. Das Signal der markierten Zellen zeigte sich ausschließlich im Zellkern. Jedoch war die histologische Konservierung der Gefrierschnitte der unfixierten und mit Ethanol fixierten Hühnerembryonen unbefriedigend. Das Gewebe der Hühnerembryonen ist sehr locker strukturiert, was beim Herstellen der Gefrierschnitte zu Gewebever-schiebungen führte. Da keine exakten Präparate hergestellt werden konnten, nützten die guten Resultate des Antikörpernachweises wenig, weil trotz der genauen Bestimmung der markierten Zellen eine exakte histologische Zuordnung in diesen Schnitten unmöglich war.

Weil zum Anfertigen der Gefrierschnitte eine Paraformaldehyd-Fixierung notwendig ist, erbrachte der Zellproliferationsnachweis mit der BrdU-Antikörper-Methode nur schlechte Ergebnisse. Das Zytoplasma wurde angefärbt, die Zellkerne nicht. Das Signal wird jedoch nur im Zellkern erwartet. Die extrachromosomale DNA der Mitochondrien mit dem geringen DNA-Gehalt von $1,6 \times 10^4$ bp je Mitochondrium spielt bei der Signalgebung keine Rolle. Deshalb muss das Signal im Zytoplasma als Artefakt angesehen werden. Denkbar ist, dass einer der beiden Antikörper unspezifisch bindet, oder das NBT/X-Phosphat an endogen im Zytoplasma vorhandene Phosphatasen bindet. Die unspezifische Bindung der Antikörper wurde weitgehend durch vorherige Beladung der Bindungsstellen mit 1%igem Rinderserumalbumin verhindert. Trotz der Vorbehandlungen traten die Signale ausschließlich im Zytoplasma auf. Daher muss man annehmen, dass die Antikörper aufgrund der Fixierung nicht in den Kern gelangen konnten, da das Paraformaldehyd Protein-Querverbindungen aufbaut, welche die Zellkernmembran vernetzen und somit undurchdringbar machen. Diese Bindungen könnten durch Proteasen gelöst werden. Deshalb wurde als weiterer Vorbehandlungsschritt eine Inkubation mit Proteinase K eingeführt. Jedoch erbrachte das keine besseren Ergebnisse.

Aufgrund der guten Ergebnisse bei der Herstellung der Gefrierschnitte nach Paraformaldehyd-Fixierung wurde diese Technik der Fixierung beibehalten. Da mit dieser Fixierung der BrdU-Antikörpernachweis schlechte Resultate erbrachte, wurde statt der BrdU-Markierung für die weiteren Untersuchungen die RNA-*in-situ*-Hybridisierung angewandt.

4.3 Die Gehirnentwicklung des Huhns

4.3.1 Die Entwicklung des Telencephalons

Die Entwicklung des Telencephalons beim Huhn beginnt sehr früh. Bereits am 5. Tag der Embryonalentwicklung des Huhns konnte ich starke Proliferationssignale in der Zona subventricularis nachweisen, siehe Abb. 12 B. Dieses Proliferationsmuster ist zu jedem Entwicklungszeitpunkt und ebenfalls im adulten, 50-Tage alten Huhn zu finden, siehe Abb. 19 B. Die Zona subventricularis enthält Stammzellen zur Bildung weiter Teile des Telencephalons. Die dort gebildeten Zellen wandern in entferntere Areale und differenzieren sich dort aus (Striedter und Keefer, 2000). Dieses Proliferationsmuster wird auch bei Säugetieren beobachtet, da deren Zona subventricularis ebenfalls die neuronalen Stammzellen enthält (Boulder-Committee, 1970; Sidman und Rakic, 1982). In der Zona subventricularis von Säugetieren konnte die Proliferation der Stammzellen auch im adulten Gehirn nachgewiesen werden (Chiasson et al., 1999). Die in meiner Arbeit gezeigten Proliferations-

signale in der Zona subventricularis des adulten Huhns deuten auf Umstrukturierungs- und Zellteilungsereignisse hin, beispielsweise hervorgerufen durch Lern- und Orientierungsprozesse. Spezifische Verhaltensstudien ergaben, dass adulte Hühner oft bereit sind, für Futter zu „arbeiten“, obwohl sie dieses auch ohne Anstrengung erhalten könnten. Dieser Prozess wird als „contra-freeloading“ bezeichnet (Inglis et al., 1997) und zeigt, dass auch Tiere nach neuer Information streben, bzw. dass auch im Gehirn adulter Hühner viele Lernprozesse ablaufen.

Die Entstehung des Bulbus olfactorius des Huhns erfolgt durch die Einwanderung von neuronalen Zellen aus der Zona subventricularis (Hatten, 1999). Dieser Wanderungsstrom wird im englischen Sprachraum als „rostral migrating stream“ (RMS) bezeichnet und wurde auch in dieser Arbeit am 16-Tage alten Hühnerembryo mit starken Proliferationssignalen dargestellt, siehe Abb. 17 B. Auch im Bulbus olfactorius selbst findet noch Proliferation statt, ebenso erkennt man Signale in anderen Bereichen, wie z.B. im Field L (siehe Abb. 17 F), was darauf hindeutet, dass nicht alle Zellen in der Zona subventricularis gebildet werden und sich in entfernteren Arealen nur noch ausdifferenzieren, wobei es durch die in dieser Arbeit verwendete Methode leider nicht möglich ist, zu unterscheiden, welche Typen von Zellen entstehen.

Sehr interessant ist, dass der Hippocampus zu keinem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung und auch nicht im adulten Gehirn Proliferationssignale aufweist, siehe Abb. 14 D, 17 F, 18 F und 19 B. Mein Ergebnis bestätigt die Erkenntnis, dass sich die Stammzellen zur Bildung des Hippocampus des Huhns in den dorsalen Anteilen der Zona subventricularis befinden (Striedter und Keefer, 2000).

Zu der momentan stattfindenden Diskussion, ob sich das Telencephalon der Vögel nach dem Outside-in-Muster (Tsai et al., 1981), oder ebenfalls nach dem Inside-out-Muster (Striedter und Keefer, 2000), wie es für die Säugetiere nachgewiesen wurde (Angevine und Sidman, 1961; Berry und Rogers, 1965), siehe 1.3.1, entwickelt, kann meine Arbeit leider keinen Beitrag leisten, da mit der RNA-*in-situ*-Hybridisierung mit der Gensonde ggH4 nur eine Aussage über die zu diesem Zeitpunkt proliferierenden Zellen getroffen werden kann. Eine Beobachtung der Zellmigration und die Bestimmung des endgültigen Standortes der Zelle im Gehirn kann mit dieser Methode nicht durchgeführt werden.

4.3.2 Die Entwicklung des Lobus opticus

In meiner Arbeit bin ich insbesondere auf die Entwicklung des Lobus opticus eingegangen. Diese Struktur des Gehirns entwickelt sich aus Anteilen des Mesencephalons. Bereits am 5. Tag der Embryonalentwicklung des Huhns sind in den Abbildungen dieser Arbeit zwei klar voneinander differenzierbare Schichten erkennbar. Sehr starke Proliferationssignale sind in der Zona generativa zu erkennen, siehe Abb. 20 H. Es ist bereits bekannt, dass diese Zone die Stammzellen enthält, aus denen sich im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung die für den Lobus opticus typischen 15 Schichten entwickeln (Scicolone et al., 1995). Dagegen konnte ich in der Zona marginalis kaum Proliferationssignale nachweisen, denn sie entsteht durch Akkumulation der umgebenden Fasern (Scicolone et al., 1995). Die deutlichen Proliferationssignale der Zona generativa zeigen sich aufgrund der fortlaufenden Stammzellproliferation auch im Gehirn des 8-Tage alten Hühnerembryos. Da diese Proliferation im weiteren Verlauf reduziert wird, wird diese Schicht ab dem 9. Tag der Embryonalentwicklung als Zona ventricularis bezeichnet (Scicolone et al., 1995). Auch in meinen Abbildungen ist die Abnahme der Signalintensität in dieser Zone vom 5. bis zum 13. Tag der Embryonalentwicklung deutlich zu erkennen, siehe Abb. 20. In der Zona subventricularis des Lobus opticus sind, im Gegensatz zur Zona subventricularis des Telencephalons, keine Proliferationssignale nachweisbar, siehe z.B. Abb. 20 K. In der Zona subventricularis des Lobus opticus befinden sich keine Stammzellen. Diese Zone ist durch Einwanderung von Zellen aus der Zona ventricularis, ehemalige Zona generativa, entstanden (Scicolone et al., 1995).

Auffallend ist des Weiteren, dass in den Schichten Stratum fibrosum periventriculare, Stratum album centrale und Stratum opticum geringe bis gar keine Proliferation nachweisbar ist, siehe Abb. 20. Das könnte damit begründet werden, dass dies fibröse Schichten sind. Auch in den fibrösen Schichten des Stratum griseum et fibrosum superficiale sind kaum Proliferationssignale zu sehen.

Jedoch sind die Proliferationssignale in den neuronalen Schichten, wie Stratum griseum periventriculare und Stratum griseum centrale allenfalls nur geringgradig stärker. Eine Ausnahme ist die vorläufige Schicht des Stratum griseum centrale (C“SGC“) am 8. Entwicklungstag, siehe Abb. 20 I an welchem wahrscheinlich aufgrund der gleichzeitig zu beobachtenden Dickenzunahme dieser Schicht viele Zellen gebildet werden.

Sehr interessant ist das Stratum griseum et fibrosum superficiale. Dieses zeigt während der gesamten Embryonalentwicklung starke Proliferationssignale. Es besteht aus 10 Schichten,

alternierend fibröse und neuronale, wobei die Schichten a, c, e, g und i neuronale und die Schichten b, d, f, h und j fibröse Schichten darstellen (Scicolone et al. 1995). In den Abbildungen des 19. Entwicklungstages und des adulten Gehirns fallen vor allem in den neuronalen Schichten Proliferationssignale auf, siehe Abb. 20 M und N. Dies könnte im adulten Gehirn auf die Bildung neuer Neurone bei Umstrukturierungsprozessen, beispielsweise beim Lernen, hindeuten.

Generell findet im im Lobus opticus eines adulten Huhns im Vergleich zu anderen Hirnregionen noch immer ausgeprägte Zellproliferation statt, siehe Abb. 20 N, was auf eine Beteiligung des Lobus opticus an komplexen Lern- und Orientierungsprozessen hindeutet, welche im adulten Gehirn Umstrukturierungs- und Zellteilungsereignisse hervorrufen.

4.3.3 Die Entwicklung des Cerebellum

Der Aufbau des Cerebellums des Huhns ist dem des Menschen sehr ähnlich. Dies korreliert mit der hohen Konservierung im Aufbau des Kleinhirns in der Entwicklung der Wirbeltiere.

In den in meiner Arbeit dargestellten Abbildungen treten im gesamten Entwicklungsverlauf keine Proliferationssignale in der Purkinjzellschicht auf, siehe Abb. 16 F, 17 L, 18 L und 19 H, was mit der Tatsache übereinstimmt, dass die Purkinjzellen bereits am 4.-6. Entwicklungstag in der Ventrikularzone des 4. Ventrikels gebildet werden und anschließend tiefer in das Cerebellum wandern (Hallonet et al., 1990; Otero et al., 1993; Yurkewicz et al., 1981).

Meine Ergebnisse zeigen ab dem ED 10 ausgeprägte Proliferationssignale im External granule layer und zunächst nur geringe Signalintensitäten im Internal granule layer, siehe Abb. 15 B. Es ist bereits bekannt, dass sich im External granule layer, eine dem humanen Stratum moleculare äquivalente Schicht, Stammzellen befinden, aus welchen die Granularzellen entstehen. Diese Stammzellen sind aus der Ventrikularzone des 4. Ventrikels in den External granule layer gewandert und beginnen dort mit der klonalen Expansion (Hatten, 1999). Nach erfolgter Zellteilung wandern die Granularzellen in den Internal granule layer, eine dem humanen Stratum granulare entsprechende Schicht, und differenzieren sich dort aus (Hallonet et al., 1990; Hatten, 1999; Ryder und Cepko, 1994). Diese Migration erfolgt durch die bereits bestehende Purkinjzellschicht (Hatten, 1999). Somit stimmen die von mir dargestellten Proliferationsmuster gut mit den bekannten Stammzelllokalisationen überein.

Interessant ist, dass die Proliferationssignale in meinen Ergebnissen im Internal granule layer im Verlauf der Entwicklung an Intensität zunehmen und im adulten Gehirn sogar

stärker ausgeprägt sind als im External granule layer, siehe Abb. 19 H, was auf komplexe Umstrukturierungsprozesse und nicht mehr nur auf alleinige Größenzunahme hindeuten könnte.

4.4 Schlussfolgerung

Das Huhn als optimaler Modellorganismus rückt in vielen Forschungsgebieten immer weiter in den Vordergrund. Die derzeitigen Bemühungen, die Funktionsweise des menschlichen Gehirns, das Lernen, komplexes Denken, Gedächtnis, die Entwicklung dieser Funktionen und die dafür verantwortlichen Gene kennen zu lernen, erfordert geeignete Modelle. Um das Gehirn des Menschen zu verstehen, hilft es, das Gehirn eines Modelltieres zu analysieren, wobei sich das Huhn bewährt hat. In vielen Studien der letzten Jahre wurde der Aufbau, die Entwicklung und Funktion einzelner Hirnareale untersucht. Die vorliegende Arbeit stellt eine Übersicht über die Proliferationszonen im gesamten Gehirn des Huhns dar. Während die Proliferationsareale im Cerebellum und in der Zona subventricularis des Telencephalons bei der adulten Maus und dem adulten Huhn vergleichbar sind, fehlt beim Huhn ein Signal im Hippocampus. Es wird jedoch ein deutliches Signal im Lobus opticus beobachtet. Dies könnte ein erster Hinweis auf unterschiedliche Lernvorgänge bei der Maus, bzw. den Säugetieren und dem Huhn sein. Durch Vergleiche dieser Proliferationsmuster mit Genexpressionsmustern kann in folgenden Studien untersucht werden, welche Gene an der Proliferation beteiligt sind. In Zukunft wird es auch interessant sein, zu erforschen, in wieweit die Vögel für ihre höheren kognitiven Fähigkeiten auf die gleichen Gene zurückgreifen wie die Säugetiere.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sind die Proliferationszonen während der Gehirnentwicklung des Huhns vom 5. bis zum 19. Tag der Embryonalentwicklung und im Gehirn des adulten, 50-Tage alten Huhns dargestellt. Die Untersuchungen wurden mit der RNA(Ribonukleinsäure)-*in-situ*-Hybridisierung mit einer Sonde, welche die RNA des Histon-H4-Proteins kodiert, durchgeführt.

Des Weiteren wurde mithilfe der Durchflusszytometrie die Zellzyklusdauer von embryonalen Hühnerfibroblasten nach Synchronisation mit Thymidin untersucht.

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Die Zellzyklusdauer der 6-Tage alten, embryonalen Hühnerfibroblasten beträgt circa 10 Stunden und ist somit kürzer als beim Menschen und der Maus.
2. Im wachsenden Gehirn der Embryonen gibt es ein entwicklungspezifisches Muster der Proliferation mit hohen Proliferationsraten neben Bereichen mit geringer oder gar keiner Proliferation. So sind während der gesamten Embryonalentwicklung starke Proliferationssignale in der Zona subventricularis des Telencephalons zu erkennen. Im Hippocampus dagegen wird keine Zellproliferation beobachtet.
3. Der Lobus opticus als mesencephale Struktur spiegelt mit seinem komplexen, 15-schichtigen Aufbau einen hohen Grad an Spezialisierung wider. Auf die Darstellung der Entwicklung dieser Multi-Laminae-Struktur wurde in der vorliegenden Arbeit besonders eingegangen.
4. Das Cerebellum des Huhns ist in Relation zum menschlichen Kleinhirn sehr groß und zeigt einen hohen Grad an Faltungen. Der histologische Aufbau des Kleinhirns des Huhns ist dem des Menschen sehr ähnlich. Die in der Arbeit dargestellten Proliferationsmuster korrelieren mit den bereits bekannten Lokalisationen der Stammzellen.
5. Im adulten, 50-Tage alten Huhn sind noch immer distinkte Proliferationssignale im Gehirn, vor allem in der Zona subventricularis, im Lobus opticus und Cerebellum vorhanden.

6 Literaturverzeichnis

- Angevine, J. B., Sidman, R. L.:** Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in mouse. *Nature* 192: 766-768 (1961)
- Bellairs, R., Osmond, M.:** The atlas of chick development. Department of Anatomy and Developmental Biology, University College London, UK. Academic Press, 53-271 (1998)
- Berry, M., Rogers, A. W.:** The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *Journal of Anatomy* 99: 691-709 (1965)
- Boulder-Committee:** Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anatomical Record* 166: 257-262 (1970)
- Bourque, G., Zdobnov, E. M., Bork, P., Pevzner, P. A., Tesler, G.:** Comparative architectures of mammalian and chicken genomes reveal highly variable rates of genomic rearrangements across different lineages. *Genome Research* 15: 98-110 (2005)
- Brown, W. R. A., Hubbard, S. J., Tickle, C., Wilson, S. A.:** The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. *Nature Reviews Genetics* 4: 87-98 (2003)
- Burt, D. W., Bruley, C., Dunn, I. C., Jones, C. T., Ramage, A., Law, A. S., Morrice, D. R., Paton, I. R., Smith, J., Windsor, D., Sazanov, A., Fries, R., Waddington, D.:** The dynamics of chromosome evolution in birds and mammals. *Nature* 402: 411-413 (1999)
- Burt, D. W.:** Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 96: 97-112 (2002)

- Chiasson, B. J., Tropepe, V., Morshead, C. M., van der Kooy, D.:** Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *Journal of Neuroscience* 19(11): 4462-4471 (1999)
- Colombo, M., Broadbent, N.:** Is the avian hippocampus a functional homologue of the mammalian hippocampus? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24: 465-484 (2000)
- Cottell, D. C., Gilmartin, L., Bannigan, J. B.:** Immunohistochemical staining of BrdU labelled cells in the mouse embryo. *Journal of Microscopy* 156: 363-369 (1989)
- Durstewitz, D., Kröner, S., Güntürkün, O.:** The dopaminergic innervation of the avian telencephalon. *Progress in Neurobiology* 59: 161-195 (1999)
- Edinger, L., Wallenberg, A., Holus, G. M.:** Untersuchungen über die vergleichende Anatomie des Gehirns. 3. Das Vorderhirn der Vögel. Abhandlung. Senckenbergische Gesellschaft, Frankfurt am Main, 20: 343-426 (1903)
- Emery, N. J., Clayton, N. S.:** The mentality of crows: Convergent evolution of intelligence in corvids and apes. *Science* 306: 1903-1907 (2004)
- Eyal-Giladi, H., Kovach, S.:** From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of development of the chick. I. General morphology. *Developmental Biology* 49: 321-337 (1976)
- Eyre-Walker, A.:** Recombination and mammalian genome evolution. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 252: 237-243 (1993)
- Fernandez, A. S., Pieau, C., Repèrant, J., Boncinelli, E., Wassef, M.:** Expression of the *Emx-1* and *Dlx-1* homeobox genes define three molecular distinct domains in the telencephalon of mouse, chick, turtle and frog embryos: implications for the evolution of telencephalic subdivisions in amniotes. *Development* 125: 2099-2111 (1998)

- Hallonet, M. E. R., Teillet, M.-A., LeDouarin, N. M.:** A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. *Development* 108: 19-31 (1990)
- Hamburger, V., Hamilton, H. L.:** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88: 49-92 (1951)
- Hatten, M. E.:** Central nervous system, neuronal migration. *Annual Reviews Neuroscience* 22: 511-539 (1999)
- Hurst, L. D., Brunton, C. F. A., Smith, N. G. C.:** Small introns tend to occur in GC-rich regions in some but not all vertebrates. *Trends in Genetics* 15: 437-439 (1999)
- Inglis, I. R., Forkman, B., Lazarus, J.:** Free food or earned food? A review and fuzzy model of contrafreeloading. *Animal Behavior* 53: 1171-1191 (1997)
- International Chicken Genome Sequencing Consortium:** Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432: 695-716 (2004)
- Kahle, W.:** Taschenatlas der Anatomie, Band 3: Nervensystem und Sinnesorgane, Georg Thieme, Stuttgart New York, 7; 211 (2001)
- Kenward, B., Weir, A. A. S., Rutz, C., Kacelnik, A.:** Tool manufacture by naive juvenile crows. *Nature* 433: 121 (2005)
- Kovach, J. K., Kabai, P.:** Effects of bilateral hemispherectomy on genetically variable stimulus preferences and imprinting in quail chicks. *Brain Research* 629: 181-186 (1993)
- Kuenzel, W. J., Masson, M.:** A stereotaxic atlas of the brain of the chick (*Gallus domesticus*). Baltimore: The John Hopkins University Press, 19-166 (1988)

Lanier, T. L., Berger, E. K., Eacho, P. I.: Comparison of Bromdesoxyuridine and ³H-Thymidine for studies of hepatocellular proliferation in rodents. *Carcinogenesis* 10: 1341-1343 (1989)

La Vail, J. H., Cowan, W. M.: The development of the chick optic tectum. II. Autoradiographic studies. *Brain Research* 28:421-441.

Matsushima, T., Izawa, E., Aoki, N., Yanagihara, S.: The mind through chick eyes: Memory, Cognition and Anticipation. *Zoological Science* 20: 395-408 (2003)

McQueen, H. A., Siriaco, G., Bird, A. P.: Chicken microchromosomes are hyperacetylated, early replicating and gene rich. *Genome Research* 8: 621-630 (1998)

Medina, L., Reiner, A.: Do birds possess homologues of mammalian primary visual, somatosensory and motor cortices?. *Trends Neuro-Science* 23: 1-12 (2000)

Mey, J., Thanos, S.: Development of the visual system of the chick, 1. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Research Reviews* 32: 343-379 (1999)

Murphy, W. J., Pevzner, P. A., O'Brien, S. J.: Mammalian phylogenomics comes of age. *Trends in Genetics* 20: 631-639 (2004)

O'Farrell, P. H., Stumpff, J., Su, T. T.: Embryonic cleavage cycles: How is a mouse like a fly?. *Current Biology* 14: 35-45 (2004)

Otero, R. A., Sotelo, C., Alvarado-Mallat, R.-M.: Chick/quail chimeras with partial cerebellar grafts: an analysis of origin and migration of cerebellar cells. *Journal of Comparative Neurology* 333: 597-615 (1993)

Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S., Rubenstein, J. L.: Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6* and *Tbr-1*. *Journal of Comparative Neurology* 424: 409-438 (2000)

- Reiner, A., Medina, L., Veenman, C. L.:** Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Research Reviews* 28: 235-285 (1998)
- Reiner, A., Perkel, D. J., Bruce, L. L., Butler, A. B., Csillag, A., Kuenzel, W., Medina, L., Paxinos, G., Shimuzu, T., Striedter, G., Wild, M., Ball, G. F., Durand, S., Gunturkun, O., Lee, D. W., Mello, C. V., Powers, A., White, S. A., Hough, G., Kubikova, L., Smulders, T. V., Wada, K., Dugas-Ford, J., Husband, S., Yamamoto, K., Yu, J., Siang, C., Jarvis, E. D., Avian Brain Nomenclature Forum:** Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brain-stem nuclei. *Journal of Comparative Neurology* 473: 377-414 (2004)
- Rodionov, A. V.:** Micro versus macro, a review of structure and functions of avian micro- and macrochromosomes. *Genetika* 32: 597-608 (1996)
- Ryder, E. F., Cepko, C. L.:** Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* 12: 1011-1029 (1994)
- Sanger, F., Nicklen, S., Souelson, A.R.:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74: 5463-5467 (1977)
- Schempp, W., Sigwarth, I., Vogel, W.:** Demonstration of replication patterns corresponding to G- and R-type-banding of chromosomes after partial synchronisation of cell cultures with BrdU or dT surplus. *Human Genetics* 45: 199-202 (1978)
- Schutte, B., Reynders, M. M. J., Bosman, F. T., Blijhan, G. H.:** Effect of tissue fixation of anti-BrdU immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 35: 1343-1345 (1987)
- Scicolone, G., Pereyra-Alfonso, S., Brusco, A., Pecci Saavedra, J., Flores, V.:** Development of the laminated pattern of the chick tectum opticum. *International Journal of Developmental Neuroscience* 13: 845-858 (1995)

- Shimuzu, T.:** Evolution of the forebrain in tetrapods. In "Brain Evolution and Cognition". G. Roth, M. F. Wullimann, John-Wiley, New York, 135-184 (2001)
- Sidman, R. L., Rakic, P.:** Development of the human central nervous system. In "Histology and histopathology of the human nervous system". W. Haymaker, R. D. Adams, Springfield, 3-145 (1982)
- Smith, J., Bruley, C. K., Paton, I. R., Dunn, I., Jones, C. T., Windsor, D., Morrice, D. R., Law, A. S., Masabanda, J., Sazanov, A., Waddington, D., Fries, R., Burt, D. W.:** Differences in gene density of chicken macrochromosomes and microchromosomes. *Animal Genetics* 31: 96-103 (2000)
- Starck, D.:** Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere - 3, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 261-542 (1982)
- Striedter, G. F.:** The telencephalon of tetrapods in evolution. *Brain, Behavior and Evolution* 49: 179-213 (1997)
- Striedter, G. F., Keefer, B. P.:** Cell migration and aggregation in the developing telencephalon: pulse-labeling chick embryos with bromodesoxyuridine. *Journal of Neuroscience* 20: 8021-8030 (2000)
- The Avian Brain Nomenclature Consortium:** Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nature Reviews* 6: 151-159 (2005)
- Tsai, H. M., Garber, B. B., Larramendi, L. M. H.:** ³H-Thymidine autoradiographic analysis of telencephalic histogenesis in the chick embryo: I. Neuronal birthdates of telencephalic compartments in situ. *Journal of Comparative Neurology* 198: 275-292 (1981)
- Yurkewicz, L., Lauder, J. M., Marchi, M., Giacobini, E.:** ³H-Thymidine long survival autoradiography as a method for dating the time of neuronal origin in the chick embryo: The locus coeruleus and cerebellar purkinje cells. *Journal of Comparative Neurology* 203: 257-267 (1981)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Entstehung der Arbeit mitgewirkt haben:

Bei **Herrn Prof. Dr. W. Vogel**, dem Leiter der Abteilung Humangenetik, der mir die Arbeit in seiner Abteilung ermöglichte.

Bei **Herrn Prof. Dr. H. Hameister** für die Vergabe und Betreuung der Doktorarbeit, für die vielen hilfreichen Ratschläge und dafür, dass er sich stets Zeit für mich genommen hat.

Bei **Frau PD Dr. Eva Küppers** für die Übernahme des Koreferats.

Bei der **AG Hameister** für die tatkräftige Unterstützung, Geduld und Herzlichkeit.

Bei der **AG Speit** für die vielen wertvollen Ratschläge.

Bei **allen anderen Mitarbeitern** für die freundliche Aufnahme in der Abteilung.

Bei **Kerstin Baier** und **Herbert Heinz** für die große Hilfe bei der Computerarbeit.

Und natürlich bei **meiner Familie und Steffen** für die liebe, seelische Unterstützung.