

Aus der
Abteilung für Anatomie und molekulare Embryologie
an der Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum
Leiterin: Prof. Dr. Beate Brand-Saberi

Analyse des Expressionsmusters von Axin2 in der Entwicklung des Hühnerembryo.
Gezielte Stummschaltung von Axin2 im sich entwickelnden Innenohr des Modellorganismus Huhn.

Publikationsbasierte
Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Gesa Ecke
aus Fröndenberg
2020

Dekan: Prof. Dr. med. Ralf Gold
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Beate Brand-Saberi
Koreferent: Prof. Dr. med. Stephan Hahn

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2021

Abstract

Ecke

Gesa

Analyse des Expressionsmusters von Axin2 in der Entwicklung des Hühnerembryo.

Gezielte Stummschaltung von Axin2 im sich entwickelnden Innenohr des Modellorganismus Huhn

Einleitung In dieser Promotionsarbeit wird das Expressionsmuster der Axin2 mRNA während der embryonalen Entwicklung im Modellorganismus Huhn analysiert. Ferner wird Axin2 auf seine Funktion während der Entwicklung des Innenohrs der Hühnerembryos untersucht. Axin2 ist als wichtiger Bestandteil des kanonischen *Wnt*-Signalweges bekannt. In diesem Signalweg liefert Axin2 eine negative Rückkopplungsschleife. Das Protein hemmt die intrazelluläre Signalkaskade und das Axin2 Gen ist gleichzeitig Zielgen des *Wnt*-Signals. Es wurden bereits einige entwicklungsbiologische Prozesse in den Zusammenhang mit dem kanonischen *Wnt*-Signalweg gebracht. Die Analyse des Axin2 Expressionsmusters soll aufzeigen bei welchen dieser Prozesse verbliebene Unklarheiten über die Signalmechanismen möglicherweise durch Axin2 erklärt werden könnten. Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung des Innenohrs. Es ist bereits beschrieben, dass *Wnt*-Signale dafür von Bedeutung sind. Nach der Erfassung des Expressionsmusters von Axin2 während der Ohrentwicklung, wurde die mRNA im Innenohr des lebenden Embryo manipuliert und abgebaut. Im Anschluss wurde die Auswirkung auf die weitere Ohrentwicklung des Hühnerembryo untersucht.

Methode Für die Analyse des Expressionsmusters wurde eine RNA-Sonde hergestellt, mit der die Axin2 mRNA in der whole mount *In-situ* Hybridisierung in verschiedenen Entwicklungsstadien des Hühnerembryo detektiert und visualisiert wurde. Die Zellen des dorsalen Ohrvesikels von Embryos im Stadium HH 15 wurden mittels *in ovo* Elektroporation mit einem H1-eGFP-Axin2-RNAi Konstrukt transfiziert. Der Erfolg der Transfektion wurde nach 24h Reinkubationszeit durch ein Fluoreszenzsignal, dessen Sequenz auf dem Plasmid enthalten ist, dokumentiert (Mikroskop: Leica M 165 FC). Die durch RNA-Interferenz verminderte Axin2 mRNA im transfizierten Ohr wurde mittels *In-situ* Hybridisierung dargestellt. Nach der Transfektion wurde die Veränderung von anderen wichtigen Signalgenen der Innenohrentwicklung (*Bmp4*, *Pax2* und *Six1*) mit RNA Sonden untersucht.

Ergebnis Die vorliegende Dissertation beschreibt ein detailliertes Expressionsmuster von Axin2 in den Stadien HH 04 bis HH 32. Genauer liefert die Studie Daten über die Axin2 Expression in der frühen Embryogenese, während der Somitenentwicklung und der Entwicklung von Neuralrohr, Extremitäten, Nieren, Augen und Ohren. Die Verminderung der Axin2 Translation im Innenohr des Hühnchens resultierte in vergrößerten Ohrvesikeln, verstärkter *Bmp4* und *Six1*, sowie verminderter *Pax2* Expression.

Diskussion Die Analyse des detaillierten Expressionsmusters von Axin2 während der Entwicklung des Huhns zeigt die Bedeutung dieses Gens für zukünftige Erforschungen von Entwicklungsmechanismen auf. Weiter wird die durch Herunterregulierung von Axin2 mRNA induzierte Veränderung von Genen beschrieben, die unabdingbar für die normale Entwicklung des Innenohrs sind. Es wird postuliert, dass die Stummschaltung von Axin2 und die daraus resultierende Enthemmung der *Wnt*-Signalkaskade zu einer prämaturnen Reifung der Zellen des Innenohrs führt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Der <i>Wnt</i> - Signalweg	5
1.2	Die Entwicklung des Innenohrs	7
2	Zielsetzung	9
3	Ergebnisse und Diskussion	10
3.1	Analyse des Expressionsmusters von Axin2 in der Entwicklung des Huhns	10
3.1.1	Die frühe Entwicklung des Hühnerembryo und Axin2	10
3.1.2	Expression von Axin2 mRNA in Stadium HH 17 bis HH 22	14
3.1.3	Axin2 während der Reifung der Somiten	15
3.1.4	Transkription von Axin2 vom Stadium HH 23 bis HH 32	16
3.1.5	Das differenzierende Neuralrohr exprimiert Axin2	17
3.1.6	Expression von Axin2 während der Entwicklung der Extremitäten	19
3.1.7	Axin2 in der embryonalen Niere	20
3.1.8	Axin2 in der Augenentwicklung	21
3.1.9	Die Expression von Axin2 im Innenohr des Huhns	22
3.2	Gezielte Stummschaltung von Axin2 während der frühen Entwicklung des Innenohrs im Huhn	23
3.2.1	Die Expression von Axin2 im Innenohr nach Manipulation durch <i>in ovo</i> Elektroporation mit Axin2 RNAi ist reduziert	24
3.2.2	Bone morphogenetic Protein 4 wird durch Manipulation von Axin2 hochreguliert	26
3.2.3	Der Paired-Box Transkriptionsfaktor 2 wird durch das Stummschalten von Axin2 schwächer exprimiert	28
3.2.4	Das Homeobox Protein Six1 wird nach der Manipulation von Axin2 vermehrt exprimiert	30
3.2.5	Eine Hypothese zur Interaktion der Signalmoleküle während der Entwicklung des Innenohrs im Modellorganismus Huhn	32
4	Zusammenfassung	34
5	Literaturverzeichnis	49

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AER	Apikale ektoddermale Randleiste
APC	Adenomatous polyposis coli
Bmp4	Bone morphogenetic protein 4
BOR	Branchio-oto-renal syndrome
Ca ²⁺	Calcium
CK1	Casein-Kinase 1
Dix-Domäne	Dishevelled Axin - Domäne
Dll	Distal-less
Dlx	Distal-less Homeobox
DML	Dorso-mediale Lippe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dsh	Dishevelled
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
eGFP	enhanced Green-Fluorescent-Protein
et al.	et alii
Eya1	eyes absent 1
FAP	familäre Adenomatöse Polyposis
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fig.	Figure (Abbildung)
Fz	Frizzled
GFP	Green-Fluorescent-Protein
GOF	Gain of function
GRO-like	Groucho-like
<i>Gsk3β</i>	Glykogen Synthase Kinase 3 beta
HH	Hamburger & Hamilton
ISH	<i>In-situ</i> Hybridisierung
kDA	Kilodalton
LiCl	Lithiumchlorid
LOF	Loss-of-function
LRP5/LRP6	Low-density lipoprotein-related Receptor
mRNA	messenger ribonukleinsäure
Pax2	Paired-box Transkriptionsfaktor 2
PCP	Planar Cell Polarity
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A

PS	Primitivstreifen
PSM	präsomitisches Mesoderm
PZ	Progress Zone
RCAS	Replication-Competent ASLV (avian sarcoma-leukosis virus) long terminal repeat with a splice acceptor
RISC	RNA-induced silencing-complex
RGS	regulator of G-Protein signaling
RNAi	Ribonukleinsäure Interferenz
Six1	sine oculis 1
Shh	Sonic hedgehog
shRNA	short hairpin Ribonukleinsäure
SO	Somiten
TCF/LEF	T-cell factor & lymphoid-enhanced Factor
β TrcP	Beta - transducin repeat-containing protein
VLL	ventrolaterale Lippe
Wnt	Wingless Int-1
Wnt/Ca ²⁺	Wnt-Calcium

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Axin2 Expression von Stadium HH 04+ bis HH 16.	Seite 11
Abbildung 2:	Axin2 während der Etablierung des frühen Bauplans des Embryos.	Seite 12
Abbildung 3:	Axin2 mRNA im Reifungsprozess der Somiten.	Seite 16
Abbildung 4:	Axin2 im reifenden Neuralrohr.	Seite 18
Abbildung 5:	Axin2 mRNA in der Extremitätenentwicklung.	Seite 20
Abbildung 6:	Axin2 Expression während der Innenohrentwicklung.	Seite 23
Abbildung 7:	Verminderte Axin2 Expression im Innenohr nach <i>In ovo</i> Elektroporation.	Seite 25
Abbildung 8:	Anti-GFP-Antikörperfärbung.	Seite 25
Abbildung 9:	Vermehrte Expression von Bmp4 nach der gezielten Drosselung der Translation von Axin2.	Seite 27
Abbildung 10:	Verminderte Expression von Pax2 nach Manipulation der Axin2 mRNA.	Seite 29
Abbildung 11:	Six1 wird nach Stummschaltung von Axin2 vermehrt exprimiert.	Seite 31
Abbildung 12:	Eine mögliche Interaktion der Signalmoleküle während der Entwicklung des Innenohrs.	Seite 33

Bekanntmachung

Die Bildrechte der Fotografien in den Abbildungen 1 - 5 liegen bei PloS one und wurden hier zur besseren Lesbarkeit eingefügt.

1 Einleitung

1.1 Der *Wnt* - Signalweg

Hintergrund *Wnt*-Signalmoleküle kommen evolutionär konserviert bei einer breiten Spannweite der Spezies von Seeanemonen bis zum Menschen vor [1, 2]. Schon 1980 wurde das erste *Wnt*-Gen bei *Drosophila* entdeckt [3] (damals *int-1* genannt) und 1982 bei Mäusen erstmals in Verbindung mit Mammakarzinomen gebracht [4]. In den 90er Jahren wurden Komponenten des Signalweges entdeckt und ihre Bedeutung in der Entwicklungsbiologie und für Krankheiten erforscht [5, 6, 7, 8]. Der *Wnt*-Signalweg ist seit dem intensiv in der entwicklungsbiologischen Forschung und in der Erforschung der Pathogenese von Krankheiten und Malignomen behandelt worden.

Das Säugetier-Genom enthält 19 verschiedene *Wnt*-Gene, die auch in niederen Wirbeltieren, teilweise bis zu den Nematoden und Schwämmen, zu finden sind [9, 1]. Die resultierenden Proteine sind ungefähr 40kDA (Kilodalton) groß und besitzen konservierte, cysteinreiche Domänen [10]. Sie werden von den exprimierenden Zellen vor der Sekretion mit Lipiden versehen und vermitteln hauptsächlich parakrine Signale. Die Signale können aber auch über längere Strecken wirken [1]. Das Signal der *Wnt*-Liganden wird durch mindestens drei verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden übertragen [11, 12]. Der kanonische *Wnt*-Signalweg wurde zuerst entdeckt und ist sehr gut erforscht. Erst zu Anfang des 21. Jahrhunderts sind zusätzlich der Pathway of Planar Cell Polarity (PCP) und der *Wnt*/ Ca^{2+} - Signalweg entdeckt worden. Bei den sogenannten nicht-kanonischen Signalwegen werden einerseits die Orientierung von Epithelien (PCP) und andererseits die frühembryonale Ventralisierung des Gewebes beeinflusst (*Wnt*/ Ca^{2+}) [13, 14, 15, 16]. Einige Komponenten der *Wnt*-Transduktion spielen im kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg eine Rolle [17, 18] und einige *Wnt*-Liganden können verschiedene Signalwege auslösen [19, 20, 21, 22]. Diese Zusammenhänge erweitern die Komplexität der *Wnt*-Signale und führen dazu, dass nach mehr als 30 Jahren intensiver Forschung vieles über die *Wnt*-Mechanismen unklar bleibt.

Molekulare Grundlagen des kanonischen Signalweges Diese Arbeit befasst sich ausschließlich mit dem kanonischen *Wnt*-Signalweg in der Entwicklung des Huhns. Die zentrale Komponente der Signalübertragung ist hier das Protein β -catenin. Im Zellkern wirkt β -catenin als aktivierender Transkriptionsfaktor, indem es Repressoren der Transkription wie den Faktor Groucho von den so genannten TCF/LEF Transkriptionsfaktoren (T-cell-factor and Lymphoid-enhancer-factor) verdrängt. TCF/LEF vermittelt dann die Transkription von Zielgenen [23, 24]. In der unstimulierten Zelle wird das zytoplasmatische β -catenin kontinuierlich abgebaut. Dafür wird es durch den β -catenin-Zerstörungs-Komplex phosphoryliert, ubiquitiniert und schließlich mit einem Proteasom gespalten [25, 26]. Der Degradationskomplex ist ein großer Multiproteinkomplex. Er beinhaltet Gerüst-Proteine wie Axin und Adenomatous-Polyposis-Coli (APC), die Kinasen Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) und Casein-Kinase 1 (CK1), sowie Phosphatasen (z.B.: Protein Phosphatase 2A, PP2A) und die E3 Ubiquitinase β TrCP [27, 28].

Für die Aktivierung des kanonischen *Wnt*-Signalweges bindet der Ligand extrazellulär an den seven-pass transmembranären Rezeptor Frizzled (Fz) und an den Ko-Rezeptor LRP5 oder LRP6 (Low-

density-lipoprotein-related-Rezeptor 5&6) [29, 30, 31]. Dieser heterodimere Rezeptorkomplex bindet jetzt Teile des Zerstörungskomplexes an die zytoplasmatische Seite der Rezeptoren und inhibiert so dessen Funktion [12]. Im Folgenden steigt die Konzentration von β -catenin im Zytoplasma und der Zugang zum Nukleus wird ermöglicht.

Axin2 Axin2 ist ein Homolog des Axin1 Proteins mit ca. 45% identischer Aminosäuresequenz [32, 33]. Im kanonischen *Wnt*-Signalweg haben Axin1 und Axin2 (auch Conductin oder Axil genannt) redundante Funktionen [34]. Beide sind für den Aufbau des β -catenin-Degradations-Komplex zuständig [1]. Axin2 ist jedoch nicht wie Axin1 ubiquitär im embryonalen Gewebe exprimiert, sondern auf ein zeitlich und räumlich differenzierbares Expressionsmuster beschränkt [35, 36]. Dieses Expressionsmuster wurde bisher nur in der Entwicklung von Mausembryos beschrieben [36]. Die Proteine der Axin Familie beinhalten vier zwischen den Spezies hoch konservierte Domänen [37, 27, 38]. C-terminal findet sich neben einer Bindestelle für PP2A die so genannte DIX-Domäne, welche die Interaktion mit dem Protein Dishevelled (Dsh) vermittelt [39, 37, 40, 41]. Zentral sind Bindestellen für die GSK3b und für β -catenin vorhanden [27], während in der N-terminalen Region die so genannte RGS-Domäne die Bindung mit APC ermöglicht [32, 42]. Diese Domänen sind für die Funktion von Axin als zentrales Stütz-Protein für den β -catenin-Zerstörungs-Komplex unerlässlich. Es bringt alle wichtigen Proteine des kanonischen *Wnt*-Signalweges zusammen und ermöglicht so die Phosphorylierung von β -catenin durch die GSK3b oder die CK1 [1]. APC erleichtert den Prozess mit seinen multiplen Bindestellen für β -catenin, indem es das Protein in die Umgebung des Komplexes bringt [43, 44, 38]. Bei Ankunft eines *Wnt*-Signales wird Dsh an den zytoplasmatischen Teil von Fz gebunden [29]. Axin, sowie weitere Bestandteile des Degradations-Komplex binden an die zytoplasmatische Seite von LRP5/6 [45, 46, 47, 12]. Die Dimerisierung der Proteine Axin und Dsh über die DIX-Domäne ermöglicht die Rekrutierung von Axin an die Zellmembran [28]. Ein kürzlich vorgestelltes Modell geht von der Bildung so genannter Signalosomen aus [48]. Dabei werden an diesen initialen membranständigen Komplex weitere LRP5/6 Rezeptoren angehängt, die Axin rekrutieren. Es ist weiterhin bekannt, dass durch die GSK3b phosphoryliertes Axin β -catenin affiner bindet [27] und dass das, durch die Protein Phosphatase 1 (PP1, ebenfalls Bestandteil des Komplexes) dephosphorylierte, Axin eine höhere Affinität zu LRP5/6 aufweist [49, 50]. Ein weiteres Substrat der GSK3b sind LRP5/6 und APC [51, 46]. In beiden Fällen wird die Affinität zu den jeweiligen Bindepartnern (Axin bzw. β -catenin) durch die Phosphorylierung erhöht [52, 53, 51]. Die Besonderheit von Axin2 ist, dass seine Transkription durch die Faktoren TCF/LEF vermittelt wird [35]. Axin2 stellt als Zielgen des kanonischen *Wnt*-Signalweges also eine negative Rückkopplungsschleife dar [28, 35, 12].

Bedeutung des *Wnt*-Signalweges in der Embryologie Der *Wnt*-Signalweg ist an unzähligen Prozessen der Entwicklung von Lebewesen beteiligt. In Wirbeltieren ist er für die Bildung der posterioren Körperachse und für die normale Entwicklung des Kopfes zuständig [54, 55, 56]. Die Entwicklung des zentralen Nervensystems und die Bildung der Somiten benötigen die Funktion von *Wnt*-Signalen [57, 58]. Der *Wnt*-Signalweg ist außerdem in die Entwicklung der Extremitäten, der Nieren, des gastrointestinalen Systems, der sensorischen Organe und der Lungen involviert [1] (siehe Grigoryan et al. (2008) für einen zusammenfassenden Überblick [58]).

Die Hemmung des *Wnt*-Signalweges durch Axin1 und Axin2 ist ebenfalls von großer Bedeutung in

der Entwicklungsbiologie. So konnten Mäuse mit einer Mutation in dem Gen Axin die frühembryonale Phase nicht überleben und starben an Tag 9 bzw. 10 post coitum an schweren Fehlbildungen [59, 36]. Mauszüchtungen mit einer homozygoten Mutation von Axin2 entwickelten eine zweite hintere Körperachse und schwere Fehlbildungen des Schädels [36, 34].

Die Bedeutung von *Wnt* und Axin beim erwachsenen Organismus und bei Erkrankungen Im adulten Organismus ist der *Wnt*-Signalweg in der Regeneration von Stammzellen, z.B. in der Erneuerung des Dünndarmepithels ausgehend vom Stammzellen am Boden der Krypten und in der Hämatopoese von Bedeutung [60]. Veränderungen des *Wnt*-Signalweges wurden in der Vergangenheit zudem mit vielen verschiedenen Arten von Malignomen assoziiert [1, 61, 62]. So spielt eine Mutation von Axin2 eine sekundäre Rolle in der Entstehung von Familiärem Adenomatösen Polyposis (FAP) [63, 64]. Diese Krankheit basiert meist auf einer Mutation des APC. Nur in wenigen Fällen ist ein dysfunktionales Axin Protein als Ursache für FAP beschrieben [64]. Eine Mutation von Axin2 prädisponiert außerdem für kolorektale Karzinome [64, 65, 66]. Weiterhin wurden Veränderungen von Axin in der Literatur mit hepatozellulären Karzinomen, Ovarialkarzinomen, Endometriumkarzinomen und der Entstehung des Medulloblastoms in Verbindung gebracht [65, 67, 68, 69]. Mutationen von Axin2 können ebenfalls die angeborene Kraniosynostose, eine verfrühte Verschmelzung der Schädelknochen, verursachen [70]. Auch die familiäre Zahn-Agenesie (permanente Oligodontie), die zum Fehlen mehrerer bleibender Zähne führt, kann durch Mutationen von Axin2 verursacht werden [71, 72].

1.2 Die Entwicklung des Innenohrs

Anatomische Grundlagen zur frühen Entwicklung des Innenohrs Bei allen Wirbeltieren beginnt die Entwicklung des Innenohrs mit der Bildung der Ohrplakode, einer Verdickung des Ektoderms seitlich des Rautenhirns [73, 74, 75]. Die Plakode invaginiert in das unterliegende Mesenchym und bildet zunächst den Ohrbecher, der sich später zum Ohrbläschen schließt. Das Ohrbläschen differenziert sich weiter und bildet dorsal das Vestibularorgan und ventral den Ductus cochlearis, der sich bei Säugetieren schneckenförmig aufdreht [76].

Das Hörorgan besteht bei Vögeln aus dem ventralen Ductus cochlearis und den dazugehörigen Haarzellen [76]. Die Entwicklung des Vestibularorgans mündet in einer komplexen dreidimensionalen Struktur. Es enthält die vertikalen Bogengänge, einen anterioren (auch superiorer Bogengang genannt) und einen posterioren, sowie den horizontalen Bogengang (lateral) mit den dazugehörigen sensorischen Cristae ampullaris für die Detektion von Drehbewegungen des Kopfes [77]. Utriculus und Sacculus mit den fleckförmig angeordneten sensorischen Haarzellen erfassen lineare Beschleunigungen und zählen ebenfalls zum Gleichgewichtsorgan [78]. Eine Besonderheit des Gleichgewichtsorgans der Vögel sind die Macula neglecta und die Lagena, die Magnetfelder erspüren können [78]. Das Innenohr von Vögeln beinhaltet also acht sensorische Organe, während die Säugetiere nur sechs entwickeln.

Saccus- und Ductus endolymphaticus sind für die Produktion der Endolymphe, einer Flüssigkeit mit besonderer Ionenkonzentration, die das Innenohr ausfüllt, zuständig [78]. Obwohl es kein sensorisches Organ darstellt wird das endolymphatische System aufgrund seiner Entwicklung aus dem dorsalen Otozysten ebenfalls zum Vestibularorgan gezählt.

Molekulare Grundlagen zur frühen Entwicklung des Innenohrs Um die Bildung der höchst komplexen Strukturen des membranösen und knöchernen Innenohrlabyrinthes zu ermöglichen, werden schon die Ohrplakode, der Ohrbecher und das Ohrbläschen durch multiple Signalmoleküle an drei Achsen, der antero-posterioren, der medio-lateralen und der dorso-ventralen Achse, orientiert [79, 80]. Für diese Arbeit ist besonders die dorso-ventrale Achse relevant, da eine dorsale Identität des Ohrvesikels durch *Wnt1* und *Wnt3a* Signale aus dem dorsalen Epithel des Rautenhirns definiert wird [81]. Ventral wird das *Wnt*-Signal durch Sonic hedgehog (Shh) aus der Chorda dorsalis antagonisiert, wodurch der Otozyst hier ventralisiert wird [82]. Auf diese Weise wird das Ohrbläschen grob in den ventralen, auditorischen Teil und den dorsalen, vestibulären Teil unterteilt [83]. Die *Wnt*-Signale des dorsalen Hinterhirns sind auch für den Erhalt der Ohrplakode nötig, nicht aber für ihre Initiation [84, 85, 86, 87, 88]. Verschiedene *Wnt*-Gene werden auch im Epithel des Ohrbläschens selbst exprimiert, darunter dorsal *Wnt3a* [89]. Die Entstehung der sensorischen Haarzellen ist ebenfalls von *Wnt*-Signalen abhängig [90, 91, 92]

Der Einfluss des *Wnt*-Signalweges auf die Entwicklung des Innenohrs wird deutlich, wenn man die Studien mit Gain-of-Function (GOF) und Loss-of-Function (LOF) Experimenten betrachtet. So entwickelten doppelte *Wnt1/3a* LOF Züchtungen der Maus nur rudimentäre vestibuläre Strukturen und abweichende auditorische Komponenten des Innenohrs [81]. Bei doppelter Mutation von *Wnt1/8a* war das endolymphatische System verkleinert [93]. Die Mutation der Zielgene des kanonischen *Wnt*-Signalweges, der Homeobox Gene *Dlx5* und *Dlx6* (homolog zu dem, in Drosophila entdeckten, Distal-less Gen (Dll)), störte die Entwicklung der Bogengänge und anderer Teile des Vestibularorgans [81]. Wie empfindlich die Orientierung des Ohrvesikels ist zeigt sich durch die Fehlentwicklungen die auch Shh LOF Mäuse im Vestibularorgan aufweisen [94].

2 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit Axin2 und seiner Rolle in der negativen Rückkopplungsschleife zur Hemmung des kanonischen *Wnt*-Signalweges. Während dem kanonischen *Wnt*-Signalweg in den vergangenen 30 Jahren intensive Aufmerksamkeit zugekommen ist, wurde seine Regulation durch Axin2 seit der Entdeckung in den späten 90er Jahren in der Entwicklungsbiologie oft vernachlässigt. Aufgrund der vielfältigen und hoch komplexen Funktionen des *Wnt*-Signalweges in der Entwicklung von Lebewesen der frühen evolutionären Geschichte bis hin zur Entwicklung des Menschen und aufgrund seiner Rolle in gesunden und kranken adulten Organismen ist das genaue Verständnis dieses Signalweges von höchster Relevanz. In dieser Studie wird die Expression des Gens Axin2 während der Entwicklung des Huhns beschrieben und analysiert. Auf diese Weise kann eingeordnet werden, an welchen entwicklungsbiologischen Prozessen Axin2 beteiligt ist und wo seine Funktion weiter erforscht werden sollte. Dazu wurde die mRNA von Axin2 in fixierten Hühnerembryonen verschiedener Entwicklungsstadien in der *In-situ*-Hybridisierung detektiert, visualisiert und dokumentiert. Durch die Herstellung von histologischen Schnitten der gefärbten Embryos können genauere Aussagen über die gewebespezifische Expression von Axin2 getroffen werden. Ein genaueres Verständnis des kanonischen *Wnt*-Signalweges in der Embryologie kann der Erforschung von angeborenen Krankheiten und Fehlbildungen, dem Verständnis der Stammzellphysiologie im erwachsenen Organismus und für die Therapie der durch Mutationen im *Wnt*-Signalweg entstandenen Tumoren dienlich sein. Regulatoren der Signalkaskade wie Axin2 sind bei aktivierenden und hemmenden Mutationen des Signalweges als Therapieziel von Interesse.

Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit ist die Erforschung der Rolle von Axin2 im sich entwickelnden Innenohr des Huhns. Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte auf dem Gebiet gemacht wurden, ist das bekannte Netzwerk der Signale, die die Entwicklung des dreidimensionalen Innenohrlabyrinthes und seiner sensorischen Organe ermöglichen noch an vielen Stellen lückenhaft. Gleichzeitig sind angeborene Krankheiten des Innenohrs mit Folgen wie Schwindel oder Nystagmus und Schwerhörigkeit eine enorme Belastung für die Betroffenen mit Auswirkungen auf die Lebensqualität. Um die Ätiologie dieser Krankheiten zu verstehen und sie therapieren zu können muss das Wissen über die Entwicklung des Innenohrs weiter wachsen. Axin2 ist möglicherweise ein Gen, dessen Erforschung die grundlegenden Signale in der Ohrentwicklung besser verständlich macht. Die Expression in den Ohrvesikeln des Huhns von Stadium HH 14+ bis HH 28 wurde genauer untersucht um Axin2 dort manipulieren zu können. Danach konnte die Axin2 mRNA mittels der *in ovo* Elektroporation mit einem Axin2 RNA-Interferenz Konstrukt gezielt gespalten und die Translationsrate gedrosselt werden. Die Auswirkungen wurden im Folgenden analysiert um Axin2 in das Signalmolekülnetzwerk des sich entwickelnden Innenohrs einordnen zu können.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Analyse des Expressionsmusters von Axin2 in der Entwicklung des Huhns

Hühnerembryos in verschiedenen Stadien der Entwicklung von Hamburger und Hamilton (HH) 04+ bis HH 32 wurden gewonnen und in 4% Paraformaldehyd fixiert. Axin2 mRNA wurde mittels *In-situ* Hybridisierung detektiert und visualisiert wie in Nieto et al. 1996 beschrieben [95]. Die Embryos wurden fotografiert und das Expressionsmuster analysiert. Um genauere Aussagen über die Expression von Axin2 treffen zu können wurden diese Embryos in Agarose-Gel (2-4% je nach Größe des Embryo) eingebettet und mit dem Vibratom®(Leica) geschnitten (50µm dick). Im Folgenden ist das Expressionsmuster im ganzen Embryo und in transversalen Schnitten der einzelnen Gewebe beschrieben.

3.1.1 Die frühe Entwicklung des Hühnerembryo und Axin2

Während der frühen Entwicklung des Huhns konnte die mRNA von Axin2 ab dem Stadium HH 04+ detektiert werden. Die Abbildung 1 bildet die Embryos nach der whole mount *In-situ* Hybridisierung von Stadium HH 04+ bis Stadium HH 16 ab. Bild A.1 zeigt einen Embryo im Stadium HH 04+ mit Axin2-Expression in dem Primitivstreifen (Abb. 1, HH 04+, schwarzer Pfeil). Ab dem Entwicklungsstadium HH 07+ konnten Axin2 Transkripte zusätzlich im sogenannten Hensen'schen Knoten (entspricht dem Primitivknoten, Abb.1, B.1, HH 07+, weißer Pfeil) und in der Kopffalte (Abb.1, B.1, HH 07+, schwarzer Pfeil) nachgewiesen werden. Der Hensen'sche Knoten rückt während des Voranschreitens der Gastrulation nach kaudal (Abb. 1, B.2). Axin2 wird hier weiter stark exprimiert (Abb. 1, B.2, HH 08, schwarzer Pfeil). Auch in der Kopffalte (Abb. 1, B.2, weißer Pfeil) und im rückläufigen Primitivstreifen (Abb. 1, B.2) findet sich Axin2 mRNA. Im Stadium HH 09 (Abb. 1, C.1) ist Axin2 hauptsächlich im Kopf, sowie im Neuroporus posterior der Hühnerembryos sichtbar. Bei Erreichen des Stadiums HH 10 (Abb. 1, D.1-D.3) exprimiert das embryonale Gewebe das Gen im Kopfbereich (Abb. 1, D.1), Neuroporus posterior (Abb. 1, D.2, weißer Pfeil) und medial im kürzlich segmentierten paraxialen Mesoderm, den Somiten (Abb. 1, D.3, schwarzer Pfeil). Diese Transkription von Axin2 gewinnt in den folgenden Stadien, während des Reifungsprozess der Somiten, an Intensität (Abb. 1, HH 11: E.2, HH 14: F.1, HH 15: G.1 und G.2, HH 16: H.2, schwarze Pfeile). Weiterhin ist die Transkription von Axin2 in den Gehirnblassen der Embryos (Abb. 1, HH 11: E.1, HH 15: G.1 weißer Pfeil, HH 16: H.1) und dem Neuroporus posterior sichtbar.

Von den Embryos dieser frühen Entwicklungsstadien wurden transversale Vibratom®- Schnitte angefertigt (Abb. 2). Die Schnitthöhen der Transversalebene können Ecker et al., 2016 (Anhang) entnommen werden.

Die Schnitte durch den Primitivstreifen (Abb. 2, A.1) bzw. die Primitivgrube oder den Hensen'schen Knoten (Abb. 2, A.2-3) eines Embryos des Stadium HH 08 verdeutlichen, dass sich während dessen Entwicklung die Expression von Axin2 vom dorsalen Ektoderm ventral in das Mesenchym ausbreitet und an Quantität gewinnt.

Diese Gewebe bringen das Neuralrohr und die Chorda dorsalis hervor [96, 97]. In Abbildung 2, Bild

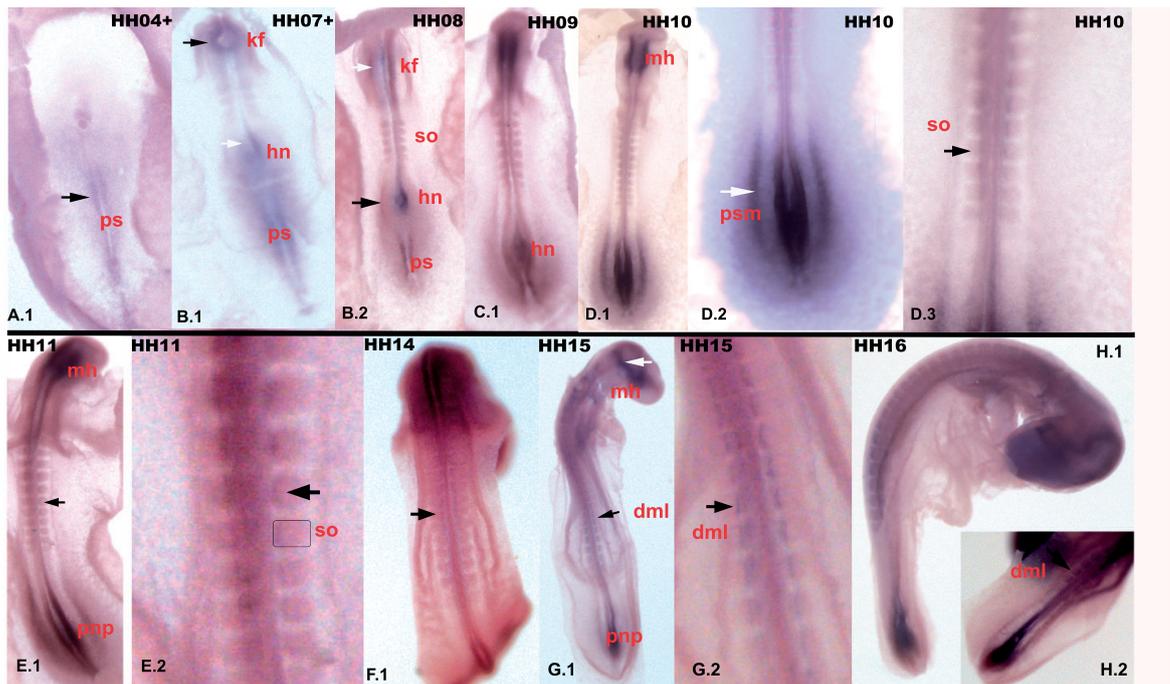


Abbildung 1: **Axin2 Expression von Stadium HH 04+ bis HH 16.** *In-situ* Hybridisierung mit einer Axin2 Sonde. ps-Primitivstreifen, kf-Kopffalte, hn-Hensen-Knoten, so-Somit, mh-Mittelhirn, psm-Präsomitische Mesoderm, dml-Dorsomediale Lippe, pnp-posteriorer Neuroporus. (Teile der Abbildung sind bereits publiziert in Ecke et al. Expression Pattern of Axin2 During Chicken Development. PloS one 11.9 (2016): e0163610.)

A.1 ist das zentral liegende prächordale Mesoderm deutlich gefärbt. Bei Erreichen des Stadiums HH 09 hat die primäre Neurulation in der Schnittebene eingesetzt (Abb. 2, B.1, B.2). Die Chorda dorsalis liegt jetzt im Gewebe und die Neuralfalteln wölben sich bilateral zur Medianebene des Embryos auf. Axin2 ist nur geringfügig medial im Epithel der Neuralfalteln exprimiert. Des Weiteren wurden Transkripte in der Chorda dorsalis detektiert. Kurz vor der Vollendung der primären Neurulation wölben sich die Neuralfalteln höher auf, während Axin2 minimal am Boden der Neuralfalte und in der Chorda dorsalis exprimiert wird (Abb. 2, HH 10: C.1, C.2). Anschließend nähern sich die Neuralfalteln einander an (Abb. 2, HH 10: C.3, C.4) und verschmelzen schließlich um das Neuralrohr zu bilden (Abb. 2, HH 14: D.1). Die Expression von Axin2 ist in diesem Prozess vernachlässigbar gering. Lateral des Neuralrohrs haben sich die epithelialen Somiten gebildet (Abb. 2, HH 10: C.4, HH 14: E.1), in deren medialen Epithel zunehmend Axin2 Transkripte zu entdecken sind (Abb. 1, HH 10: D.3, HH 11: E.2, HH 15: G.2 schwarzer Pfeil und Abb. 2, HH 15: E.1, HH 16: F.1). Bei Beginn der Deepithelialisierung der Somiten ist die Färbung kräftiger und begrenzt sich auf das dorsomediale Epithel (Abb. 2, HH 16: F.1). Gleichzeitig ist eine Expression von Axin2 im dorsomedialen Neuralrohr zu erkennen. Die Bilder G.1 bis G.3 (Abb. 2) zeigen kaudalere transversale Schnitte durch den nach distal verlagerten Primitivknoten oder Hensen'schen Knoten. Hier wird die Expression von Axin2 zentral im axialen Mesoderm des Knotens (Abb. 2, HH 10: G.1-G.2), sowie im medianen und (Abb. 2, HH 10: G.2) und prächordalen Mesoderm (Abb. 2, HH 10: G.3) deutlich.

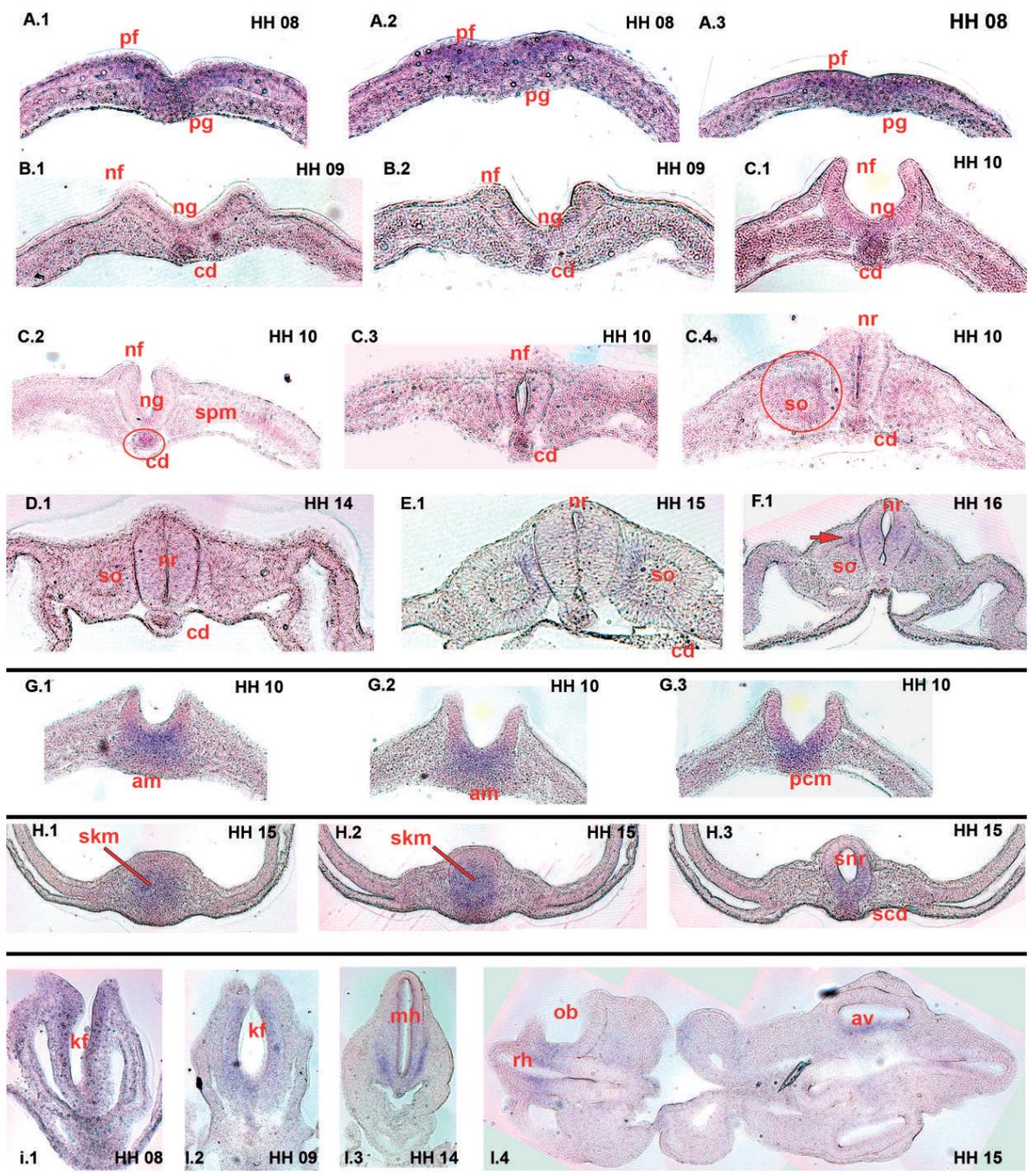


Abbildung 2: **Axin2** während der Etablierung des frühen Bauplans des Embryos. Transversalschnitte nach ISH. pf-Primitivfalte, pg-Primitivgrube, nf-Neuralfalte, ng-Neuralgrube, cd-Chorda dorsalis, spm-Segmentalplattenmesoderm, so-Somit, am-axiales Mesoderm, pcm-prächordales Mesoderm, skm-Schwanzknospenmesoderm, snr-sekundäres Neuralrohr, scd-sekundäre Chorda dorsalis, kf-Kopffalte, mh-Mittelhirn, obe-Ohrbecher, rh-Rautenhirn, av-Augenvesikel. (Teile der Abbildung sind bereits publiziert in Ecke et al. Expression Pattern of Axin2 During Chicken Development. PloS one 11.9 (2016): e0163610.)

Die Expression von Axin2 während der sekundären Neurulation, welche die Verlängerung des Neuralrohrs in die Schwanzknospe, also den kaudalsten Teil des Embryos, beschreibt [98], konnte zunächst im zentralen Mesoderm festgestellt werden (Abb. 2, HH 15: H.1). Etwas kranialer sind in HH 15 bereits die Silhouetten des sich elongierenden Neuralrohrs und der Chorda dorsalis zu erkennen. Hier sparen die Transkripte von Axin2 den am weitesten dorsalen Teil des Mesoderms aus und im ventralen Drittel stechen sie am deutlichsten hervor (Abb. 2, HH 15: H.2). Noch kranialer ist die sekundäre Neurulation beinahe vollendet (Abb. 2, HH 15: H.3). Axin2 wird hier in der ventralen Hälfte des Neuralrohrs und in dem prächordalen Mesoderm transkribiert.

Schon bei der Analyse der whole mount Embryonen war die Expression von Axin2 in der Kopffalte auffällig (Abb. 1, HH 07+ und HH 08: B.1 und B.2). Schnitte auf der Höhe des zukünftigen Mittelhirns erlauben nun genauere Aussagen zur Expression von Axin2 im sich entwickelnden Kopf (Abb. 2, I.1 bis I.4). So sind Transkripte von Axin2 im Stadium HH 08 und 09 unmittelbar vor dem Schluss des Neuroporus anterior in den medialen Neuralfalten der Kopffalte nachweisbar (Abb. 2, HH 08: I.1, HH 09: I.2). Mit Erreichen des Stadiums HH 14 und dem Verschluss des Neuroporus anterior verschwindet die Expression aus dem Neuroepithel und flankiert nun bilateral das ventrale Drittel der Gehirnblase (Abb. 2, HH 14: I.3.). Der Kopf und der Körper des Hühnerembryos drehen sich in der weiteren Entwicklung zunehmend nach rechts (Abb. 1, HH 11: E.1, HH 15: G.1, HH 16: H.1). Das Bild I.4 der Abbildung 2 zeigt daher nicht nur einen transversalen Schnitt durch die Hirnregion, sondern beinhaltet gleichzeitig Anschnitte der Schlundbögen und einen Transversalschnitt durch den Nacken des Embryos. Aus der Gehirnblase wölbt sich die Augenblase vor (Abb. 2, HH 15: I.4, av). Axin2 mRNA ist hier im medialen Epithel zu detektieren. Betrachtet man die Nackenregion in diesem Schnitt, so fällt die Expression im Rautenhirn und im direkt angrenzenden Epithel des Ohrbeckers auf (Abb. 2, HH 15: I.4, ob).

Diskussion der Expression von Axin2 während der frühen Entwicklung Die Expression von Axin2 in der frühen Entwicklung des Hühnerembryo findet sich in einigen, für den Aufbau des Embryonen wichtigen Geweben. Studien haben sich bereits extensiv mit der Rolle des damit verbundenen *Wnt*-Signalweges während der Gastrulation, Neurulation, Etablierung der Körperachsen des Embryos und der Entwicklung des Kopfes beschäftigt. Die Untersuchungen bestätigten, dass der kanonische *Wnt*-Signalweg zunächst dorsalisierend auf den Embryo wirkt und später für die Bildung einer posterioren Körperachse verantwortlich ist [118, 119]. Es ist davon auszugehen, dass diese Funktion des *Wnt*-Signalweges evolutionär hoch konserviert ist, denn diese Beobachtungen konnten in sämtlichen Wirbeltieren getroffen werden.

In verschiedenen Zuchtstadien der Maus prägten sich bei unterschiedlichen mutierten *Wnt*-Genen nur rudimentäre hintere Körperachsen aus, während die Bildung des Schwanzes vollständig ausblieb und die Segmentierung des präsomitischen Mesoderms gestört war [120, 121]. Auf ähnliche Funktion des *Wnt* - Signalweges lassen Experimente mit Embryonen des Huhns und des Krallenfrosches schließen. In beiden Modellorganismen führte eine Überaktivierung der *Wnt*-Signale zu einer Duplikatur der hinteren Körperachse und zu gestörter Entwicklung des Kopfes [122]. Die regelhafte Bildung des Kopfes von Wirbeltieren kann nur in Anwesenheit von Inhibitoren des *Wnt*-Signalweges im anterioren Gewebe des Embryo stattfinden [123, 124, 125]. Weiterhin ist interessant, dass eine ektope

Aktivierung des *Wnt*-Signalweges in verschiedenen Geweben die Bildung einer Chorda dorsalis initiieren kann [126]. Ein Gradient zwischen *Wnt*-Molekülen und dessen Inhibitoren scheint also für die Determination von ventralen bzw. dorsalen Strukturen als Grundlage für den Bauplan des embryonalen Körpers unentbehrlich zu sein. Die Expression von *Axin2* in diesen Geweben weist auf seine Rolle in diesen Prozessen hin. In enger Relation zu dem hier beschriebenen Expressionsmuster von *Axin2* stehen außerdem die Untersuchungen an *Axin* defizienten Mäusen. Es zeigte sich, dass *Axin* als Gegenspieler von kanonischen *Wnt*-Signalen dem Gewebe eine ventrale Identität verleiht und die Bildung einer posterioren Achse inhibieren kann [36]. Schon 1949 wurden Krallenfrösche mit *Axin*-Mutationen untersucht. Es zeigte sich ein fehlerhafter Schluss der Neuralfalten, gestörte Kopfbildung und eine duplizierte Allantois [127]. In beiden Versuchen erwies sich die Mutation im *Axin* Gen in der frühen embryonalen Entwicklung als letal [36, 127]. Analysen der Expression von Genen während der frühen Entwicklung konnten mehrere *Wnts* in Primitivstreifen und im Hensen'schen Knoten nachweisen [128]. Zusammen mit dem, in dieser Studie beschriebenen, besonderen Expressionsmuster von *Axin2* in der frühen Entwicklung des Huhns weisen die Erkenntnisse aus den genannten Experimenten zu der Annahme, dass auch *Axin2* die Bildung des Körpers, die Elongation der Körperachse und die Formation des Kopfes beeinflussen könnte.

3.1.2 Expression von *Axin2* mRNA in Stadium HH 17 bis HH 22

Mit Erreichen des Stadiums HH 17 wird eine Expression des Gens *Axin2* in den Extremitätenknospen sichtbar (vgl. Anhang: Ecke et al. 2016: Fig. 3: A, roter Pfeil). Außerdem lassen sich die Transkripte in Gehirn, Ohrvesikel (vgl. Anhang: Ecke et al. 2016: Fig. 3, A, schwarzer Pfeil), medialen Somiten (vgl. Anhang: Ecke et al. 2016: Fig. 3, A.1, weißer Pfeil) und Schwanzspitze nachweisen. Die Transkription in den Extremitätenknospen wird später in der Entwicklung deutlicher (vgl. Anhang: Ecke et al. 2016: Fig. 3, HH 18, B). Der erste und der zweite embryonale Schlundbogen exprimieren das Gen. Im Stadium HH 19 ist die Expression in den Extremitätenknospen deutlich zu erkennen (vgl. Anhang: Ecke et al. 2016: Fig. 3, C). Weiter wird *Axin2* im Neuralrohr, in den Rumpf- und Schwanzsomiten (vgl. Anhang: Ecke et al. 2016: Fig. 3, C und C.3), wie auch in den Schlundbögen (vgl. Anhang: Ecke et al. 2016: Fig. 3, C.2, schwarzer Pfeil) und den dorsalen Ohrbläschen (Ecke et al. 2016: Fig. 3, C.2, weißer Pfeil) transkribiert. Die Schwanzspitze zeigt eine Färbung für *Axin2* zentral im Gewebe (vgl. Anhang: Ecke et al. 2016: Fig. 3, C.3, Pfeilspitze). Bei Erreichen des Entwicklungsstadiums HH 20 (Ecke et al. 2016: Fig. 3, D) ändert sich die Expression von *Axin2* kaum. Eine Nahaufnahme der Extremitätenknospe (vgl. Anhang: Ecke et al. 2016: Fig. 3, D.1) verdeutlicht hier allerdings die starke Färbung der apikalen ektodermalen Randleiste (AER) (Ecke et al. 2016: Fig. 3, D.1, weißer Pfeil). Die Dorsalansicht des Embryos zeigt die Färbung von zwei longitudinalen Streifen im Neuralrohr (vgl. Anhang: Ecke et al. 2016: Fig. 3, D.2, weißer Pfeil) und medial in den Somiten (Ecke et al. 2016: Fig. 3, D.2, weißer Pfeil). Auch im Stadium HH 21 (Ecke et al. 2016: Fig. 3, E) bleiben die Expressionsstellen von *Axin2* ähnlich. Der schwarze Pfeil im Bild E (Ecke et al. 2016: Fig. 3) deutet auf die Expression in der Schwanzspitze des Embryos. In der dorsalen Ansicht erkennt man die Transkription in Neuralrohr und Somiten (Ecke et al. 2016: Fig. 3, E.1), während Nahaufnahmen des Kopfes die Expression in Maxillarfortsätzen, Mandibularfortsätzen und

Ohrbläschen veranschaulichen (Ecke et al. 2016: Fig. 3, HH 21: E.2). In der oberen Extremitätenknospe (Ecke et al. 2016: Fig. 3, E.3) ist vor allem der dorsale Rand und die AER (schwarzer Pfeil) stark gefärbt. Auch das Stadium HH 22 unterscheidet sich in der Expression von *Axin2* kaum von den vorherigen. Zellen der Schlundbögen (Ecke et al. 2016: Fig. 3, F, schwarzer Pfeil), der Extremitäten (Fig. 3, F.2), des Gehirns (Fig. 3, F) und des Neuralrohrs (Ecke et al. 2016: Fig. 3, F.1, schwarze Pfeile) transkribieren das Gen. Wenn man die Somiten betrachtet, ist die Expression nun eher in den Zwischenräumen vorhanden (Ecke et al. 2016: Fig. 3, HH 22: F und F.2, weiße Pfeile). Im Schwanz, der im Bild F.4 dargestellt ist (Ecke et al. 2016: Fig. 3), sind die Somiten noch unreifer, exprimieren aber *Axin2* (weißer Pfeil). Die Expression in der Schwanzspitze ist nicht mehr zentral, sondern weitet sich über die gesamte Schwanzspitze bis zum Ektoderm aus (Ecke et al. 2016: Fig. 3, F.4, schwarzer Pfeil).

3.1.3 *Axin2* während der Reifung der Somiten

In den Stadien der Entwicklung, die in der letzten Bildtafel zu sehen sind (Abb. 3), wurden transversale Schnitte angefertigt, um *Axin2* während der Reifung der Somiten zu untersuchen. Im segmentierten paraxialen Mesoderm konnte *Axin2* in den epithelialen Somiten, sowie in Teilen des Dermomyotoms nachgewiesen werden. Im Stadium HH 15 ist die mRNA im epithelialen Somiten in kleinen Mengen im mediodorsalen Epithel nachweisbar (Abb. 3, HH 15: A.1). Mit Erreichen des Stadiums HH 16 ändert sich die Expression nur bezüglich der Intensität (Abb. 3, B.1). Im Stadium HH 17 beginnt, bei noch stärkerer Färbung im medialen Epithel in ähnlicher Schnittebene, die Deepithelialisierung des runden Somiten ventral mit der Auslösung des Sklerotoms (Abb. 3, C.1)[99]. Etwas kranialer ist das ventrale Epithel des Somiten bereits deepithelialisiert. Die Expression von *Axin2* liegt weiterhin hauptsächlich mediodorsal im Somiten (Abb. 3 C.2). Im reiferen Somiten ist das Dermomyotom zu erkennen (Abb. 3, HH 17: C.3, noch kranialer). Hier ist *Axin2* ausschließlich in der dorsomedialen Lippe (DML) exprimiert. Zwei Stellen im Mesoderm, die seitlich an das ventrale Neuralrohr angrenzen, sind ebenfalls gefärbt (Abb. 3, C.3). Im Stadium HH 19 ist das Dermomyotom weiter gereift und *Axin2* wird weniger stark in der DML exprimiert (Abb. 3, D.1). Auf der Schnitthöhe des sich entwickelnden Flügels ist in Stadium HH 20 das gesamte Dermomyotom gefärbt (Abb. 3, E.1). Kaudaler exprimiert nur die dorsale Hälfte des Dermomyotoms *Axin2* mRNA (Abb. 3, HH 20: E.2).

Diskussion der Expression von *Axin2* in der Somitenentwicklung *Axin2* mRNA konnte in dieser Studie vielerorts im Reifungsprozess der Somiten nachgewiesen werden (3.1.3, Abb. 3). In der Entwicklung von Mausembryos wird *Axin2* während der Segmentierung des paraxialen Mesoderms in Mäusen oszillierend exprimiert und ist Teil der sogenannten Segmentierungsuhr [99]. Bei *Axin2*-defizienten Mäusen findet die Segmentierung mit leichter bis milder Störung statt [99, 70]. Beim Huhn konnten ausschließlich im Mesoderm der Schwanzspitze *Axin2* Transkripte nachgewiesen werden (siehe Abb. 3, F.4). Daher besteht die Möglichkeit, dass *Axin2* für die Bildung der Somiten im Hühnchen nicht erforderlich ist. Für diesen Vorgang ist ein kompliziertes Signalnetzwerk zwischen *Wnt*-Molekülen und anderen Signalen erforderlich [99]. Der entstandene Somite erhält seine dorsale Identität durch *Wnt1* und *Wnt3a* Signale aus dem dorsalen Neuralrohr [129, 130, 131], sowie durch *Wnt6*, welches im dorsalen Ektoderm exprimiert wird [132]. Diese Signale vermitteln die Bildung

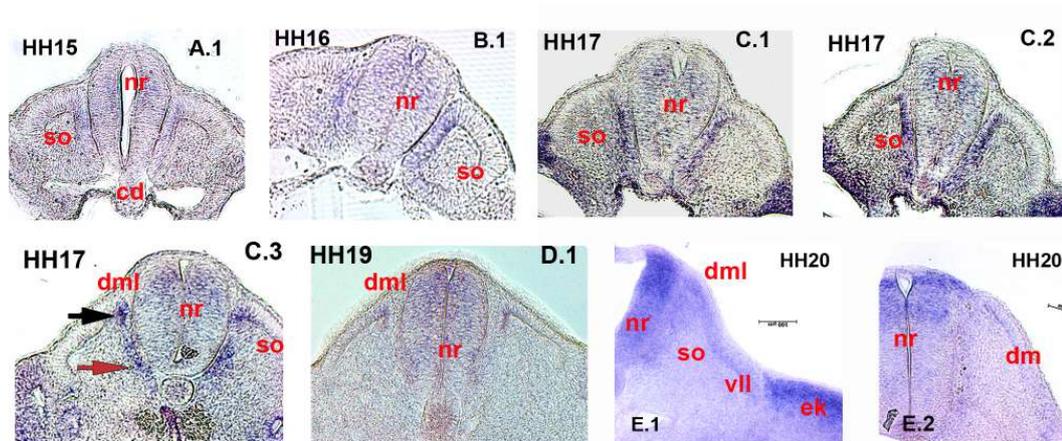


Abbildung 3: **Axin2 mRNA im Reifungsprozess der Somiten.** nr-Neuralrohr, so-Somit, cd-Chorda dorsalis, dml-Dorsomediale Lippe, vll-Ventrolaterale Lippe, ek-Extremitätenknospe, dm-Dermomyotom. (Teile der Abbildung sind bereits publiziert in Ecke et al. Expression Pattern of Axin2 During Chicken Development. PloS one 11.9 (2016): e0163610.)

des Dermomyotoms. Es wurde weiterhin postuliert, dass *Wnt11* den epithelialen Status der DML und *Wnt6* den epithelialen Status der VLL (ventrolaterale Lippe) aufrecht erhält [133]. Die Befunde dieser Studie konnten allerdings nicht reproduziert werden [134]. Außerdem wurde beschrieben, dass *Wnt1* und *Wnt3a* aus dem Neuralrohr für die Bildung der DML benötigt werden [131]. Axin2 konnte in den hier vorgestellten Experimenten in der DML und ihren Vorläufern detektiert werden (Abb. 3). Daher ist es naheliegend, dass die Regulation des *Wnt*-Signalweges durch Axin2 eine Rolle in der Entwicklung der DML und der daraus hervorgehenden Dermis spielt [134]. Die Expression von Axin2 in den Federknospen, welche ebenfalls dermalen Ursprungs sind stärkt diese Hypothese (vgl. Ecke et al. Fig. 4: H.1, I.1) [135, 134].

3.1.4 Transkription von Axin2 vom Stadium HH 23 bis HH 32

Das Expressionsmuster der Entwicklungsstadien HH 23 bis HH 29 (vgl. Ecke et al. 2016 Fig. 4: A bis G) ähnelt den vorangegangenen Stadien. Axin2 wird in Gehirn, Augen- und Ohranlagen (Ecke et al. 2016 Fig. 4: HH 24: B.1 weißer Pfeil, HH 25: C, HH 26: D.2) und den Vorsprüngen der zukünftigen Maxillar- und Mandibularbogen transkribiert (Ecke et al. 2016 Fig. 4: HH 23: A, HH 24: B.1, HH 25: C, HH 26: D.2, HH 27: E, schwarzer Pfeil, HH 28: F und HH 29: G weißer Pfeil). Das kleine Bild in Figure 4 Bild A (siehe Anhang: Ecke et al. 2016) zeigt die Expression in der Schwanzspitze des Embryos. In den wachsenden Extremitäten ist Axin2 ebenfalls detektierbar (Ecke et al. 2016 Fig. 4: HH 23: A, HH 24: B, HH 25: C, HH 26: D.1, HH 27: E). Im Stadium HH 28 (Ecke et al. 2016 Fig. 4: F) und HH 29 (Ecke et al. 2016 Fig. 4: G) erkennt man deutlich die Färbung der embryonalen Schulter (Ecke et al. 2016 Fig. 4: F und G rote Pfeile) und des distalen Mesenchym der Extremitäten, den zukünftigen Fingerzwischenräumen (Ecke et al. 2016 Fig. 4: F und G schwarze Pfeile). Kleine Veränderungen des Expressionsmusters sind in den dorsalen Ansichten erkenntlich. Die Expression in den Somiten ist noch detektierbar, wobei sie im Neuralrohr nicht mehr in zwei longitudinalen

Streifen, sondern in einem zentralen Streifen zu beobachten ist (Ecke et al. 2016 Fig. 4: HH 24: B.2, HH 25: C.1 schwarzer Pfeil, HH 26: D.3 weißer Pfeil, HH 27: E.1, weißer Pfeil). Das Bild E (Ecke et al. 2016 Fig. 4: HH 27 weißer Pfeil) eröffnet die Sicht auf eine Axin2 Expression in den Gesichtswülsten des Hühnerembryos.

Besonders interessant ist das Expressionsmuster der größten analysierten embryonalen Stadien HH 31 (Ecke et al. 2016 Fig. 4: H, H.1) und HH 32 (Ecke et al. 2016 Fig. 4: I, I.1). Hier konnte Axin2 mRNA am äußeren Ohr (Ecke et al. 2016 Fig. 4: HH 31, H und HH 32, I rote Pfeile) und in den Fingerzwischenräumen (Ecke et al. 2016 Fig. 4: HH 31, H schwarzer Pfeil, HH 32: I weißer Pfeil) nachgewiesen werden. In diesen Stadien entwickeln sich auch erste Federknospen des Huhns in der Haut über den Schulterblättern und am Rücken [100]. Die weißen Pfeile in Bild H, H.1 und I.1 (Ecke et al. 2016 Fig. 4) weisen auf diese, Axin2 transkribierenden, Federknospen. Außerdem konnte Axin2 in den, für Hühner spezifischen, Knöchelchen auf der Lederhaut des Auges detektiert werden (Ecke et al. 2016 Fig. 4: HH 32, I).

3.1.5 Das differenzierende Neuralrohr exprimiert Axin2

Während der Entwicklung des Embryos in den beschriebenen Stadien findet eine Reifung des Neuralrohrs statt. Wie auch in der Neurulation, wird Axin2 während dieser Differenzierung exprimiert. In den frühen Stadien konnte die mRNA im gesamten Neuroepithel detektiert werden (Abb. 4: HH 17: A.1). Die Expression ist schwach und über den gesamten Querschnitt des Neuralrohrs verteilt, wobei sich eine etwas dichter gefärbte Region im dorsomedialen Teil befindet (Abb. 4: HH 17: A.1 roter Pfeil). Zwei Expressionsstellen finden sich im Sklerotom, angrenzend an das ventrale Neuralrohr (Abb. 4: HH 17: A.1 schwarzer Pfeil). Die Intensität der Expression im dorsalen Drittel des Neuroepithels nimmt in späteren Stadien zu (Abb. 4: HH 19: B.1 schwarzer Pfeil). Weiter kranial ist das Neuralrohr bereits reifer und eine stärkere dorsale Axin2 Transkription lässt sich nachweisen (Abb. 4: B.2 roter Pfeil). Das mittlere Drittel des Querschnittes ist jetzt nicht mehr gefärbt, während ventral eine geringfügige gestreute Expression persistiert. Im Stadium HH 20 (Abb. 4: C.1) ist die dorsale Expression deutlicher (schwarzer Pfeil) und die Transkription seitlich im Mesoderm neben dem ventralen Neuralrohr weitet sich nach dorsal aus (rote Pfeile).

Das Bild C.2 (Abbildung 4) zeigt einen etwas kranialer entnommenen Transversalschnitt des Neuralrohrs. Das ventrale Gewebe exprimiert wenig Axin2, welches dorsal stark transkribiert wird (Abb. 4: HH 20: C.2 schwarzer Pfeil). Die Expression an den Seiten des Neuralrohrs ist intensiver und expandiert nach dorsal (Abb. 4: HH 20: C.2 rote Pfeile). Mit Erreichen des Stadiums HH 22 ist die mRNA von Axin2 auf gleicher Schnitthöhe im mediadorsalen Neuralrohr zu finden (Abb. 4: D.1). Auffällig ist die Expression im dorsal aufliegenden Ektoderm (Abb. 4: HH 22: D.1 schwarzer Pfeil). Im Stadium HH 26 (Abb. 4: E.1), HH 27 (Abb. 4: F.1) und HH 28 (Abb. 4: G.1) ist Axin2 ebenfalls im Ektoderm und zusätzlich im subektodermalen Mesenchym über dem dorsalen Neuralrohr zu finden. Außerdem konnte die mRNA in Boden- und Dachplatte des Neuralrohrs nachgewiesen werden (Abb. 4: HH 26: E.1, HH 27: F.1 roter Pfeil, HH 28 G.1). Weiterhin sind in den Bildern E.1 (HH 26) und F.1 (HH 27) der Abbildung 4 die Spinalganglions zu sehen, deren Hinterwurzel mit dem Neuralrohr in Kontakt steht und Axin2 exprimiert (schwarze Pfeile). Nach der sekundären Neurulation transkri-

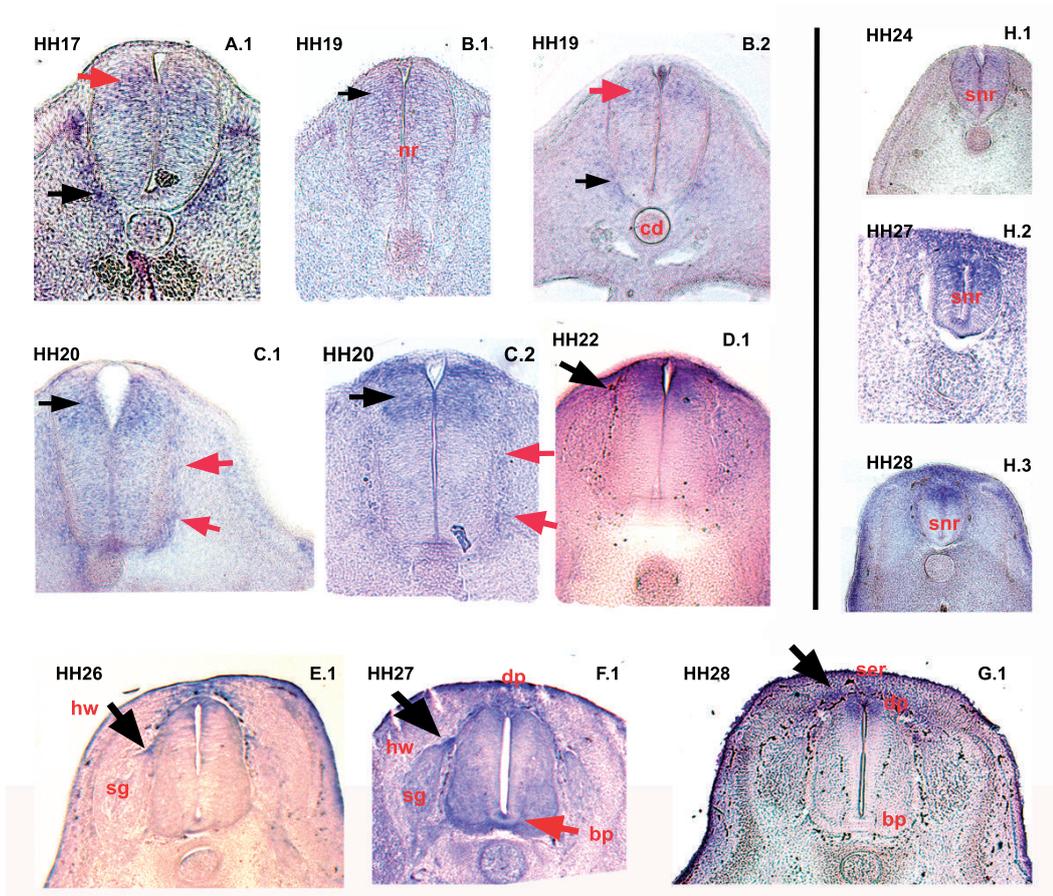


Abbildung 4: **Axin2 im reifenden Neuralrohr.** ISH mit einer Axin2 Sonde. Transversalschnitte. nr-Neuralrohr, hw-Hinterwurzel, sg-Spinalganglion, snr-Sekundäres Neuralrohr, dp-Dachplatte, bp-Bodenplatte, ser-Subektodermaler Raum. (Teile der Abbildung sind bereits publiziert in Ecke et al. Expression Pattern of Axin2 During Chicken Development. PloS one 11.9 (2016): e0163610.)

biert auch das Neuralrohr im Schwanz des Hühnerembryos Axin2. Das Muster ähnelt hier dem des primären Neuralrohrs. Zunächst ist die mRNA über das gesamte Neuralrohr verteilt (Abb. 4: HH 24: H.1), dann verschiebt sich die Expression nach dorsal (Abb. 4: HH 27: H.2, HH 28: H.3). Das Mesenchym, das dem Neuralrohr dorsal aufliegt, ist auch hier stark gefärbt (Abb. 4: H.2, H.3).

Diskussion der Axin2 Expression im Neuralrohr Vorangegangene Studien haben eine Gliederung des Neuralrohrs entlang einer dorsoventralen Achse beschrieben, wobei die ventrale Identität durch *Shh*-Signale (Sonic Hedgehog) aus der Chorda dorsalis determiniert wird und *Wnt*-Signale für die Differenzierung dorsaler Strukturen verantwortlich sind [136, 137, 138]. *Wnt3a* und *Wnt1* werden im dorsalen Neuralrohr und in der Dachplatte exprimiert [89, 136], wo sie für die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen verantwortlich sind [139]. Weiter bedingen sie die Migration der Neuralleistenzellen aus dem dorsalen Neuralrohr [138]. Die Hemmung dieser *Wnt*-Signale führte bei Mäusen zu einem unvollständigen Schluss der Neuralfalten und zu veränderter Morphologie des Neuralrohrs, wie seitlichen Aussackungen und der partiellen Abwesenheit von Boden- und Dachplatte [140]. Ei-

ne Überaktivierung der dorsalen *Wnt*-Signale beim Hühnchen vermittelte eine gestörte dorsoventrale Achsenbildung und abweichende mitogene Aktivität der neuronalen Vorläuferzellen [141]. Zusätzlich zur dorsalisierenden Funktion wurde der Einfluss von *Wnt*-Signalen auf ventrale Vorläuferzellen des Neuralrohrs beschrieben [89, 142]. Unzählige Signalmoleküle sind notwendig, um die ordnungsgemäße Entwicklung und Reifung des Neuralrohrs zu gewährleisten. Viele von ihnen interagieren auf verschiedene Arten mit dem *Wnt*-Signalweg. Daher impliziert das Expressionsmuster von *Axin2* seinen Einfluss auf die Entwicklung des Rückenmarks durch die Feinregulierung des kanonischen *Wnt*-Signalweges.

3.1.6 Expression von *Axin2* während der Entwicklung der Extremitäten

Die Entwicklung der Extremitäten der Wirbeltiere beginnt mit einer Verdickung des somatischen Seitenplattenmesoderms. Schon zu Anfang des Auswuchses der Extremitäten in HH 17 (Abb. 5, A.1 und A.2), konnte eine kräftige Färbung der mRNA von *Axin2*, insbesondere proximal-dorsal in der oberen Extremitätenknospe (Abb. 5: A.1 schwarzer Pfeil) beobachtet werden. Die untere Extremitätenknospe ist etwas weiter entwickelt und exprimiert im Stadium HH 17 weniger *Axin2*, wobei auf eine zusätzliche Expression im proximal-ventralen Gewebe hinzuweisen ist (Abb. 5, A.2 schwarzer Pfeil). Der Auswuchs der Extremitätenknospe ist bis zum Stadium HH 20 von einer intensiven Expression im dorsalen Mesenchym begleitet (Abb. 5, HH 18: B.1, HH 19: C.1, HH 20: D.1, D.2). Dazu sind Transkripte von *Axin2* in der apikalen ektodermalen Randleiste (AER), einer Verdickung des Ektoderms, die das Längenwachstum der Extremität bedingt [101], nachweisbar (Abb. 5, HH 18: B.1, HH 19: C.1, HH 20: D.1 schwarzer Pfeil, D.2). Mit Erreichen des Stadium HH 23 (Abb. 5: E.1, E.2) ist *Axin2* lediglich im Ektoderm und in der AER exprimiert. Diese Transkriptionsorte verändern sich bis zum Stadium HH 28 nicht (Abb. 5: HH 25: F.1, HH 26: G.1, HH 27: H.1, HH 28: I.1 bis I.3). Zusätzlich kann *Axin2* im Perichondrium der wachsenden Knochen gefunden werden (Abb. 5: HH 26: G.1, HH 28: I.3 schwarze Pfeile).

Diskussion der Expression von *Axin2* in der Extremitätenentwicklung Die Expression von mehreren *Wnt*-Genen in den wachsenden Extremitätenknospen wurde bereits beschrieben (siehe Review [12]). Die Bildung der AER und der Extremitätenknospe selbst hängen von *Wnt*-Signalen ab (*Wnt2b* bzw. *Wnt3a*) [143]. Das in der AER exprimierte *Wnt3a* bedingt die Expression von den Fibroblast Growth Factors (FGFs), die wiederum das unter der AER liegende Mesenchym (Progress Zone - PZ) zur Proliferation und zum starken Wachstum anregen [144]. Das dorsale Ektoderm der Extremität transkribiert das Gen *Wnt7a*, welches nicht-kanonisch ist und die dorsale Identität des Gewebes determiniert [145, 146]. In der frühen Extremitätenentwicklung ist *Wnt3a* ebenfalls im dorsalen Ektoderm exprimiert [147]. Forscher entdeckten, dass die Zielgene von *Wnt7a* auch noch mehrere Zelllagen vom Ektoderm entfernt im dorsalen Mesenchym der Extremität transkribiert wurden und folgerten, dass das *Wnt*-Signal genau diese Distanz zurücklege [148]. Es liegt nun nahe, dass kanonisches *Wnt3a* auf ähnliche Art für die Expression von *Axin2* im dorsalen Mesenchym während der frühen Extremitätenentwicklung verantwortlich sein könnte. In bereits weiter entwickelten Extremitäten konnte nachgewiesen werden, dass *Wnt*-Signale die Proliferation und Differenzierung von Bindegewebe verursacht [149]. Weiterhin wurde auch in dieser Studie eine Expression von *Axin2* im Perichondrium

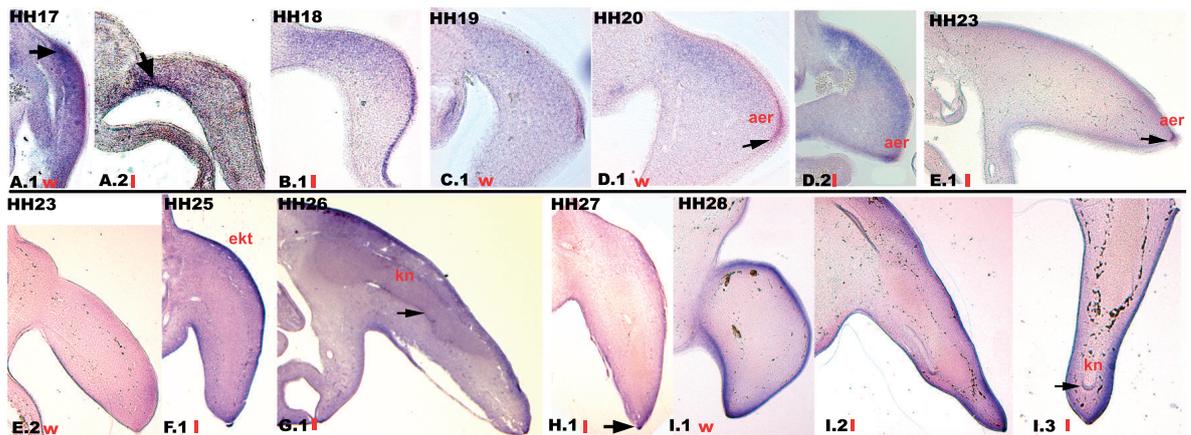


Abbildung 5: **Axin2 mRNA in der Extremitätenentwicklung.** ISH mit einer Axin2 Sonde, Transversalschritte. I-leg/Beinanlage, w-wing/Flügelanlage, aer-Apikale ektodermale Randleiste, ekt-Ektoderm, kn-Knochen. (Teile der Abbildung sind bereits publiziert in Ecke et al. Expression Pattern of Axin2 During Chicken Development. PloS one 11.9 (2016): e0163610.)

der untersuchten Mäuse entdeckt. Bei Experimenten an Hühnerembryonen konnten Mutationen in den Genen *Wnt3a* und *Wnt7a* die Expression eines Gens hervorrufen, das in der menschlichen Embryonalentwicklung eine Form der Polydaktylie verursacht [150]. Die Expression von Axin2 in den wachsenden Extremitäten des Huhns weist auf seine Funktion als Negativregulator von *Wnt*-Signalen und den damit verbundenen Einfluss auf Wachstum, Zellproliferation und Differenzierungsprozesse der Extremität hin.

3.1.7 Axin2 in der embryonalen Niere

Drei Nierengenerationen (Pronephros, Mesonephros und Metanephros) entstehen während der Entwicklung von Säugetieren und Vögeln [102]. Während der Pronephros sich in der Entwicklung vollständig wieder zurückbildet und nur rudimentäre Strukturen ausbildet, ist der Mesonephros maßgeblich an der Entwicklung der adulten Niere beteiligt und ähnelt dem Aufbau des Metanephros. In dieser Arbeit ist die Expression von Axin2 im mesonephrischen Gang dargestellt (Anhang: Ecke et al. 2016 Fig. 7). Der Mesonephros des Hühnchen dient in vielen Studien als Modell zur Untersuchung der Nierenentwicklung und soll auch hier für die Eingliederung der Rolle von Axin2 in der Organogenese der Niere dienlich sein. Axin2 wird im Stadium HH 19 auf Höhe der unteren Extremitätenknospe nur wenig im Nierengang exprimiert (Ecke et al. 2016 Fig. 7, A.1 schwarzer Pfeil). Kranialer ist im Stadium HH 20 eine stärkere Expression im Nierengang und im darüberliegenden Zölomepithel nachweisbar (Ecke et al. 2016 Fig. 7: B.1 schwarzer Pfeil). Auf Höhe der unteren Extremität sind beide Expressionsstellen noch deutlicher (Ecke et al. 2016 Fig. 7: B.2 schwarzer Pfeil). Im Stadium HH 23 (Ecke et al. 2016 Fig. 7: C.1) ist die Färbung für Axin2 in mesonephrischem Gang und Zölomepithel schwächer ausgeprägt (schwarzer Pfeil). Die Bilder D.1 (HH 26) und E.1 (HH 28) zeigen eine Axin2 Expression im Ektoderm der Kloake (Ecke et al. 2016 Fig. 7: D.1 und E.1 schwarze Pfeile).

Diskussion der Expression von Axin2 in der Nierenentwicklung Aus dem Vornierengang entsteht in der Entwicklung der mesonephrische Gang, welcher bei der Entwicklung der männlichen Gonaden eine Rolle spielt. Der mesonephrische Gang induziert die Bildung des paramesonephrischen Ganges, der die weiblichen Geschlechtswege bildet. In der Organogenese der Niere wurden bereits viele Funktionen des *Wnt*-Signalweges intensiv untersucht. *Wnt9b* und *Wnt4* werden im Nierengang und im Zölomepithel exprimiert [151, 152, 153, 154]. Für die Tubulogenese der Niere sind beide *Wnts* als Aktivatoren des kanonischen Signalweges bekannt [151, 152], obwohl sie später in der Nierenentwicklung ihre Funktion über den PCP und den Ca^{2+} - abhängigen Signalweg ausüben [155, 156, 157, 158, 154]. Die Veränderung der zellulären Antwort auf identische *Wnt*-Signale während der Entwicklung eines Organs verdeutlicht, wie komplex die Interaktionen der Signale für eine adäquate Entwicklung aufeinander abgestimmt sind. Experimente beim Krallenfrosch erlaubten das Aufstellen einer Hypothese zur Kontrolle des Signalwegwechsels durch Inversin [159, 160]. Die *Wnt*-Signale in der Niere sind weiterhin für die Orientierung des Nephrons, Zellproliferation und Zelldifferenzierung verantwortlich [161, 162, 163, 157, 164]. Einige polyzystische Nierenerkrankungen im adulten Organismus sind auf Mutationen im *Wnt*-Signalweg zurückzuführen [165, 166]. Zusammengenommen ist anzunehmen, dass Axin2 durch die Regulation des kanonischen *Wnt*-Signalweges in Nierengang und Zölomepithel einen Einfluss auf die Entwicklung der Niere und der Genitalien hat.

3.1.8 Axin2 in der Augenentwicklung

Die Entwicklung des Auges beginnt bei den Hühnerembryos mit der bilateralen Ausstülpung des Prosenzephalon in das Kopfmesenchym. Axin2 wird dabei im proximalen Epithel des Augenbeckers exprimiert (siehe Anhang: Ecke et al. 2016: Fig. 8 HH15: A.1 schwarzer Pfeil). Der transversale Schnitt durch den doppelagigen Augenbecher im Stadium HH 16 zeigt, dass sich das Linsenbläschen aus dem Ektoderm gebildet hat (Ecke et al. 2016: Fig. 8, B.1). Axin2 ist in dem proximalen Epithel des Augenbeckers detektierbar (Ecke et al. 2016: Fig. 8, HH 16: B.1 und HH 17: C.1 schwarzer Pfeil, HH 18: D.1 roter Pfeil). Mit Erreichen des Stadium HH 18 lässt sich zusätzlich eine Expression im Ektoderm und subektodermalen Mesenchym, das den Augenbecher und das Linsenbläschen umgibt, ausmachen (Ecke et al. 2016: Fig. 8: D.1, schwarzer Pfeil). Das Bild D.2 aus der Abbildung 8 in Ecke et al., 2016 (siehe Anhang) zeigt einen Schnitt durch die Peripherie des Augenbeckers und verdeutlicht, dass die Expression von Axin2 dort am stärksten ausgeprägt ist. In den Folgestadien ist eine latente Expression von Axin2 in der proximalen Schicht des Linsenbläschens zu erkennen (Ecke et al. 2016: Fig. 8: HH 19: E.1, HH 20: F.1, F.3, F.3 rote Pfeile). Hier sind Transkripte im Epithel des Augenbeckers (Ecke et al. 2016: Fig. 8: HH 19: E.1, HH 20: F.1, F.4 schwarze Pfeile) und im Ektoderm (Ecke et al. 2016: Fig. 8: HH 20: F.1, F.2, F.3) zu finden. Die proximale Epithelschicht des Augenbeckers entwickelt sich in den folgenden untersuchten Stadien zum Pigmentepithel des Auges weiter, während die distale Lage zur Retina wird [103]. Die mRNA von Axin2 ist in späteren Stadien nur noch geringfügig in der Linse detektierbar (Ecke et al. 2016: Fig. 8: HH 24: H.3 roter Pfeil, HH 26: J.2, J.3, HH 27: K.2 roter und grüner Pfeil). Außerdem findet sich eine intensive Expression in dem, das Auge bedeckende, Ektoderm (Ecke et al. 2016: Fig. 8: HH 23: G.1; HH 24: H.1, H.2 schwarze Pfeile; HH 25: I.1; HH 26: J.1; HH 27: K.1; HH 28 L.1, L.2 schwarze Pfeile). Weiterhin

konnte eine Expression von Axin2 Neuroepithelien des Nervus opticus detektiert werden (Ecke et al. 2016: Fig. 8: HH 15: I.1, HH 26: J.1, HH 27: K.1 schwarze Pfeile).

Diskussion der Expression von Axin2 in der Augenentwicklung In der Literatur finden sich viele Zusammenhänge zwischen dem *Wnt*-Signalweg und der Entwicklung des Auges. So findet die initiale Entwicklung und Entstehung der Augenanlage bei Zebrafischen nur dann statt, wenn im anterioren embryonalen Gewebe *Wnt*-Inhibitoren exprimiert werden [167, 168]. Später in der Augenentwicklung findet sich eine Expression von *Wnt2b* an ähnlichen Stellen wie Axin2, in der proximalen Epithelschicht des Augenbeckers, in der Peripherie der distalen Lage [169, 170, 171], sowie in dem proliferativen Epithel der Linsenanlage [172]. Außerdem werden *Wnt3* und *Wnt11* in der äußeren Schicht des Augenbeckers exprimiert [171]. Der Erhalt des proliferativen Status der neuronalen Vorläuferzellen in der zukünftigen Retina des Hühnerembryos ist von der Expression von *Wnt2b* abhängig [173, 174]. Außerdem wird die Regenerationsfähigkeit beschädigter retinaler Zellen über *Wnt*-Signale vermittelt [174]. Weiter wurde eine reduzierte oder fehlende Pigmentierung des Pigmentepithels als Folge der Störung der *Wnt2b* Expression beschrieben [169]. Die Expressionsstellen von Axin2 in der Linsenanlage decken sich mit Stellen an denen eine erhöhte Zellproliferation, sowie die Expression einiger *Wnt*-Liganden beschrieben wurden [175, 171, 176]. Im Hühnerembryo exprimieren die Stromazellen der sich entwickelnden Cornea *Wnt3a* und *Wnt9b* [177].

Bei einer bestimmten Form der, durch Mutationen von APC oder Axin2 verursachten Krankheit FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis, auch Gardner Syndrom genannt) tritt zusätzlich zu den polypösen Entartungen der Kolonschleimhaut eine angeborene Hypertrophie des retinalen Pigmentepithels auf [178]. Außerdem sind Fälle einer durch homozygote Mutation des Genes *Wnt3a* hervorgerufene Fehlentwicklung der Gliedmaßen, der Tetraamelie bekannt, die mit Fehlbildungen der Augen einher gehen [179]. Das Expressionsmuster von Axin2 (siehe 3.1.8) zusammen mit dem Forschungsstand zu dem Einfluss der *Wnt*-Signale auf die Augenentwicklung lassen auch hier darauf schließen, dass Axin2 und seine Regulation des kanonischen *Wnt*-Signalweges eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Augen spielen könnte.

3.1.9 Die Expression von Axin2 im Innenohr des Huhns

Besonders interessant ist die Expression von Axin2 während der Entwicklung des Innenohrs des Huhns. Die mRNA konnte in der *In-situ* Hybridisierung vom Stadium HH 14+ bis zum Stadium HH 28 dokumentiert und analysiert werden (Abbildung 6). Im Stadium HH 15 konnte eine Axin2 Expression im medialen Epithel des invaginierenden Ohrbeckers direkt angrenzend an das benachbarte Rautenhirn beobachtet werden (Abb. 6, HH 15: schwarzer Pfeil). Bei geschlossenem Ohrbläschen ist Axin2 im mediodorsalen, im dorsalen und im dorsolateralen Epithel exprimiert (Abb. 6, HH 17 und HH 18: schwarze Pfeile). Im Stadium HH 19 konnten die Transkripte von Axin2 im dorsalen Ohrbläschen detektiert werden (Abbildung 6: HH 19). Hier ist die Expression im dorsalsten Epithel am stärksten (schwarzer Pfeil) und im medialen Epithel leicht nach ventral ausgeweitet (roter Pfeil). Aus dem dorsalen Ohrbläschen entwickelt sich später der Saccus endolymphaticus [104]. Auch im Stadium HH 20 und 23 ist die mRNA von Axin2 im dorsalen Ohrbläschen nachweisbar (Abb. 6: HH 20 und 23: schwarze Pfeile).

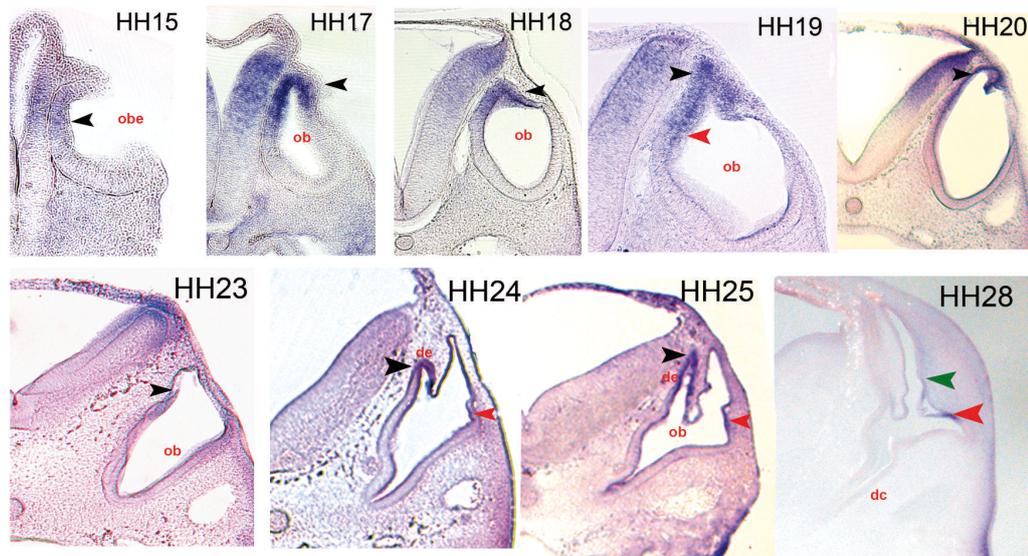


Abbildung 6: **Axin2 Expression während der Innenohrentwicklung.** Transversalschnitte nach ISH mit einer Axin2 Sonden. obe-Ohrbecher, ob-Ohrbläschen, de-Ductus endolymphaticus, dc-Ductus Cochlearis.

In den folgenden Stadien gewinnt das Innenohr an morphologischer Komplexität. Die Anlagen der Bogengänge und des Cochlea-Ganges beginnen sich zu entwickeln. Im Stadium HH 24, HH 25 und HH 28 ist Axin2 vor allem im gesamten Epithel des Saccus endolymphaticus exprimiert (Abb. 6, HH 24 und HH 25: schwarze Pfeile). Außerdem konnten Transkripte in der Aussackung der lateralen Tasche nachgewiesen werden (Abb. 6, HH 24, HH 25 und HH 28: rote Pfeile). Diese Tasche entwickelt sich zu dem horizontalen Bogengang [79]. Im Transversalschnitt durch das Innenohr des Huhns im Stadium HH 28 (Abbildung 6) ist eine Expression von Axin2 zusätzlich in der lateralen Wand der gemeinsamen Anlage der vertikalen Bogengänge detektierbar (Abb. 6, HH 28: grüner Pfeil).

Diskussion der Expression von Axin2 in der Ohrentwicklung In der Vergangenheit haben Experimente gezeigt, dass die Cristae ampullaris (sensorische Organe der Bogengänge) sich aus dem dorsalen Teil des Ohrbläschens entwickeln [83, 109]. Es wurde auch die Rolle von kanonischen *Wnt*-Signalen in der Entwicklung der sensorischen Organe des Vestibularorgans herausgestellt [109]. Da eine zeitlich und räumlich differenzierbare Expression von Axin2 nachweisbar war (siehe 3.1.9), ist anzunehmen, dass die Regulation des *Wnt*-Signalweges durch die negative Rückkopplungsschleife von Axin2 für die normale Entwicklung des Innenohrs des Huhns notwendig ist.

3.2 Gezielte Stummschaltung von Axin2 während der frühen Entwicklung des Innenohrs im Huhn

Um den Einfluss von Axin2 auf die Entwicklung des Innenohrs des Hühnerembryos genauer zu untersuchen wurde in dieser Arbeit die mRNA von Axin2 in dem Ohrbecher und in dem weiter entwickelten Ohrvesikel an den Expressionsstellen zerstört. Dazu wurden genetische Konstrukte, die für shRNA mit Zielsequenzen auf der Axin2 mRNA kodieren, mittels *in ovo* Elektroporation in die Zel-

len eingebracht. Die Transfektion wurde im Stadium HH 15 bis 16 im Ohrbecher und im Stadium HH 18 bis 19 im Ohrbläschen durchgeführt. Alle elektroporierten Embryos wurden für 24 Stunden weiter bebrütet.

3.2.1 Die Expression von Axin2 im Innenohr nach Manipulation durch *in ovo* Elektroporation mit Axin2 RNAi ist reduziert

Die Analyse von in den Stadien HH 15 bis 16 und HH 18 bis 19 elektroporierten Hühnerembryos zeigt, dass das Konstrukt bei erfolgreicher Elektroporation nach 24 Stunden von den Zielzellen transkribiert und translatiert wurde. Dies wurde anhand der Expression des Kontrollproteins Green Fluorescent Protein (GFP) sicher gestellt. Die Embryos wurden fixiert und die Expression von Axin2 wurde mittels *In-situ* Hybridisierung überprüft. Es konnte nachgewiesen werden, dass in dem manipulierten Ohr weniger Axin2 mRNA in den Zellen anzutreffen ist.

Die GFP-Expression nach erfolgreicher Elektroporation ist in Abbildung 7 in den Bildern A.1, B.1 und C.1 dokumentiert. Jeweils rechts daneben findet sich ein Foto der Hinterkopf- und Nackenregion des Embryos nach der ISH mit einer Sonde, die die Axin2 mRNA bindet (Abb. 7: A.2, B.2). Weiter ist jeweils ein Foto in stärkerer Vergrößerung abgebildet (Abb. 7: A.3, B.3, C.3). Auf den Bildern A.1 bis A.3 wurde der rechte Ohrbecher der Embryos im Stadium HH 15 bis HH 16 manipuliert. A.1 zeigt das fluoreszierende Epithel im dorsalen Ohrvesikel. An diesen Stellen wurde das Konstrukt erfolgreich in die Zellen eingebracht. Die ISH beweist, dass das verwendete Konstrukt den Abbau der Axin2 mRNA bewirkt. Die Aufnahmen A.2 und A.3 (Abb. 7) zeigen eine schwächere Axin2 Expression im rechten, manipulierten Ohrbläschen verglichen mit dem linken Ohrbläschen (schwarzer Pfeil). Die Bilder B.1, B.2 und B.3 dokumentieren die Experimente mit Embryos in Stadium HH 18 bis HH 19. Die Lokalisation der transfizierten Zellen wurde unter dem Fluoreszenz Mikroskop dokumentiert (Abb. 7: B.1). Das rechte, manipulierte Ohrbläschen exprimiert weniger Axin2 als das linke (Abb. 7: B.2 und B.3 schwarzer Pfeil). Neben der verminderten Expression von Axin2 fällt auf, dass die manipulierten Ohrbläschen größer sind als die unbehandelten (Abb. 7: A.3, B.3). Eine verminderte Expression von Axin2 als Folge der Elektroporation mit dem H1-eGFP-Axin2 RNAi Plasmid konnte insgesamt in 29 von 34 (85%) aller behandelten Embryonen nachgewiesen werden.

Die Bilder C.1, C.2 und C.3 (Abb. 7) zeigen einen Embryo, der mit einem Kontrollplasmid, welches nur die eGFP-Sequenz enthält, elektroporiert wurde. Diese Kontrollexperimente beweisen, dass die Technik selbst nicht ursächlich für die Veränderungen in der Genexpression und Morphologie des Ohrs sind.

Um die erfolgreiche Degradierung der Axin2 mRNA in den manipulierten Zellen genauer zu dokumentieren wurden nach der ISH Vibratom®-Schnitte durchgeführt, die mit einer Anti-GFP-Antikörper Färbung behandelt wurden (Abbildung 8). Alle Zellen, die mit dem Konstrukt transfiziert wurden und GFP exprimieren erscheinen nun in der Fluoreszenz Mikroskopie grün (Abb. 8: A.1, HH 15-16 und A.2, HH 18-19). Eine Aufnahme des Schnittes ohne Fluoreszenzbeleuchtung (Abb. 8: A.1.1 und A.2.1) zeigt, dass die verminderte Expression von Axin2 mit der Expression von GFP im Ohrvesikel überlappt.

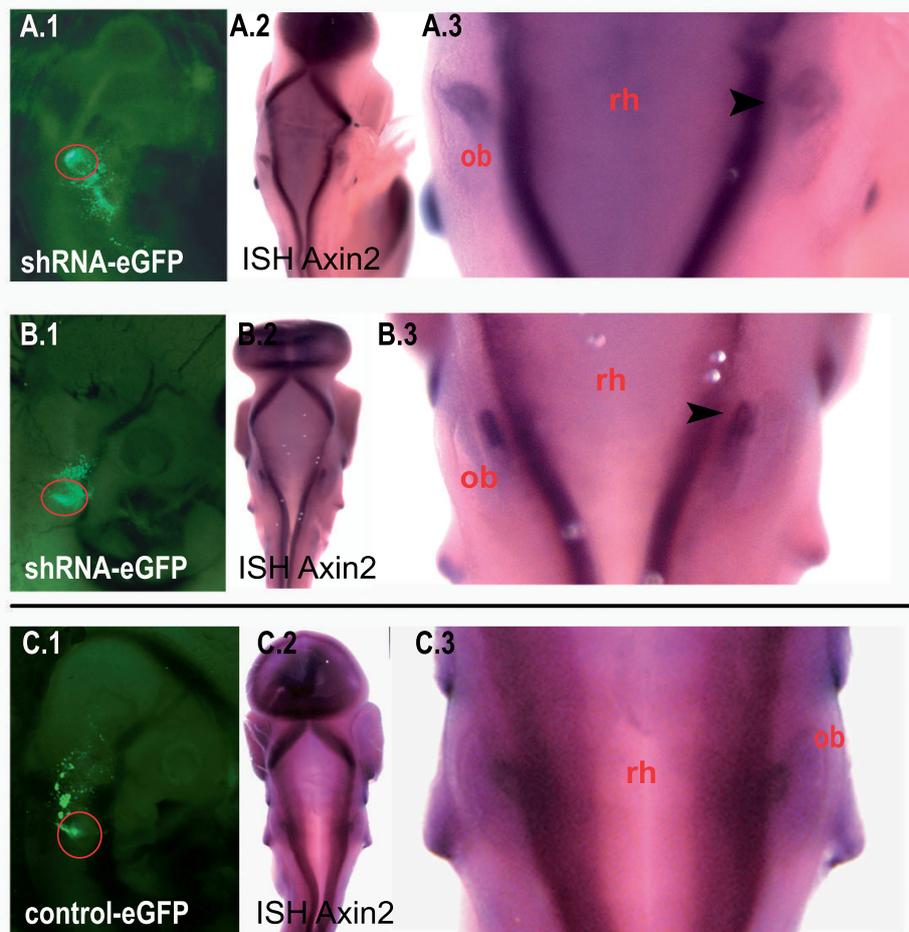


Abbildung 7: Verminderte Axin2 Expression im Innenohr nach *in ovo* Elektroporation. A.1, A.2, A.3: elektroporiert in HH 15-16; B.1, B.2, B.3: elektroporiert in HH 18-19; C.1, C.2, C.3: elektroporiert mit einem Kontrollplasmid; ob-Ohrbläschen, rh-Rautenhirn.

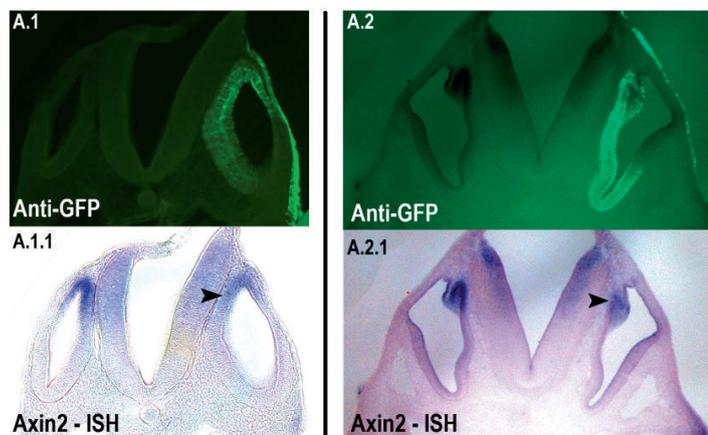


Abbildung 8: Anti-GFP-Antikörperfärbung. Transversalschnitte; A.1, A.1.1: elektroporiert in HH 15-16; A.2, A.2.1: elektroporiert in HH 18-19.

Diskussion der Ergebnisse nach gezieltem Abbau von Axin2 mRNA in der Innenohrentwicklung des Huhns

In den vorliegenden Experimenten konnte die Translation der Axin2 mRNA inhibiert werden, indem ein Konstrukt zur Zerstörung der mRNA mittels *in ovo* Elektroporation in die Zellen des Ohrbechers (HH 15-16) bzw. des Ohrbläschens (HH 18-19) eingebracht wurde. Es konnte bereits nach 24 Stunden beobachtet werden, dass das transfizierte Ohrbläschen schneller gewachsen ist und größer als das unbehandelte Ohrbläschen auf der linken Seite ist. Die Vergrößerung des Ohrbläschens nach der Manipulation von Axin2 konnte insgesamt in 101 von 124 behandelten Embryos (82%) nachgewiesen werden.

In der Vergangenheit wurden bereits einige Experimente mit jeweils entweder einer Aktivierung oder einer Hemmung des kanonischen *Wnt*-Signalweges in verschiedenen Modellorganismen und mit verschiedenen Methoden durchgeführt. Hühnerembryonen wurden zum Beispiel mit einem RCAS/ β -catenin Virus infiziert, wobei es zu einer deutlich erhöhten Aktivität von β -catenin kam [77]. Bei diesen Experimenten entwickelte sich ein kleineres, hypomorphes Vestibularorgan und ein vergrößerter Ductus cochlearis. Die Störung des *Wnt*-Signalweges in Mausembryos führte zu extremen Veränderungen und einer lediglich als rudimentär zu beschreibenden Entwicklung des Innenohrs [94, 181, 81, 93]. Verglichen mit den Ergebnissen dieser Studie ist es auffällig, dass die meisten dieser Experimente eher eine Verkleinerung der vestibulären Strukturen mit sich trugen. So resultierte eine Behandlung von Ohrbläschen der Maus mit LiCl (Lithium Chlorid) *in vitro* in stark verkleinerten Ohrbläschen. LiCl ist ein potenter Inhibitor der GSK3 β , die wie Axin2 ein Bestandteil des β -catenin Zerstörungsapparates ist [182, 20]. Die Experimente sind also mit denen dieser Arbeit vergleichbar, da sie auch eine Enthemmung des *Wnt*-Signalweges bewirken. Eine mögliche Begründung für die gegensätzlichen Ergebnisse zwischen den *in vivo* Experimenten mit Hühnerembryos und den *in vitro* Studien mit Mausgewebe könnte der Unterschied in der Lokalisation der Manipulationen sein. Riccomagno et al. (2005) aktivierten den *Wnt*-Signalweg im gesamten Ohrgewebe, während die Hemmung von Axin2 nur auf die Regionen beschränkt ist, in denen Axin2 auch exprimiert wird [81]. Dass diese von den Orten der Aktivität des kanonischen *Wnt*-Signalweges abweichen, lässt sich anhand der unterschiedlichen Expression von Axin1 und Axin2 herleiten (siehe Einleitung).

Vorangegangene Studien haben Axin2 bereits in anderen embryonalen Geweben manipuliert. Die Hemmung der Axin2 Aktivität konnte die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten *in vitro* sowie *in vivo* verstärken [70]. Mäuse mit einer inaktivierenden Mutation von Axin2 entwickelten eine vorzeitige Verschmelzung der kranialen Strukturen als Folge des überaktiven *Wnt*-Signalweges [183, 70]. Diese Symptomatik ist analog zu einem bekannten kongenialen Defekt bei Menschen, der so genannten Kraniosynostose, die mit Problemen der Atmung, des Hörens und des Sehens einhergeht. Es liegt nahe, dass möglicherweise auch die Vergrößerung der Ohrbläschen durch Deaktivierung von Axin2 als eine beschleunigte Entwicklung zu werten ist.

3.2.2 Bone morphogenetic Protein 4 wird durch Manipulation von Axin2 hochreguliert

Nachdem die gelungene Drosselung der Translation von Axin2 im Innenohr bewiesen war, wurde der Einfluss auf die Expression anderer, für die Ohrentwicklung relevanter Gene untersucht. Das

so genannte Bone morphogenetic Protein 4 (Bmp4) wird im Innenohr des Hühnerembryos an zwei Stellen exprimiert [105, 106, 107, 108]. Eine anteriore Expressionsstelle wurde als Ursprung des sensorischen Organs des anterioren und lateralen Bogengangs (Crista ampullaris anterior und Crista ampullaris lateralis) beschrieben. An der posterioren Expressionsstelle entsteht die Crista ampullaris posterioris, welche das sensorische Organ des posterioren Bogenganges darstellt [106, 108]. Bmp4 ist als Initiator der Differenzierung von Haarzellen in den vestibulären Sinnesorganen bekannt [105]. Die Bmp4 Expression wird von *Wnt*-Signalen induziert [80] und der *Wnt*-Signalweg vermittelt die Identität der dorsalen Region des Ohrbläschens [83, 109]. Außerdem entsteht das Vestibularorgan ausschließlich aus dem dorsalen Ohrbläschen [83]. Anhand dieser schon bekannten Hintergrunddaten konnte angenommen werden, dass eine Manipulation von Axin2 die Expression von Bmp4 verändert. Um dieser Hypothese nachzugehen wurde die mRNA von Bmp4 nach der Transfektion des dorsalen Ohrbläschens mit Axin2-RNAi mittels ISH untersucht.

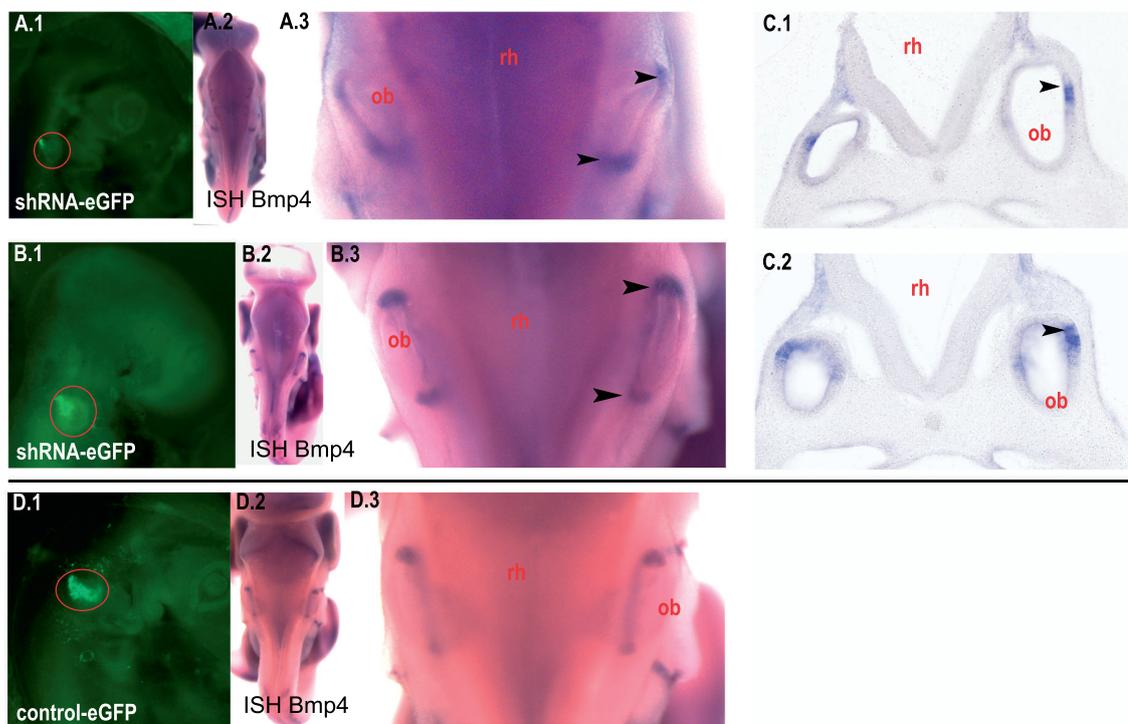


Abbildung 9: **Vermehrte Expression von Bmp4 nach der gezielten Drosselung der Translation von Axin2.** Elektroporation mit Axin2 RNAi und ISH mit einer Bmp4 Sonde; A.1, A.2, A.3: elektroporiert in HH 15-16; B.1, B.2, B.3: elektroporiert in HH 18-19. ob-Ohrbläschen, rh-Rautenhirn.

Die erfolgreich elektroporierten Embryos (GFP-Expression in Abbildung 9: HH 15-16: A.1, HH 18-19: B.1) wurden in der ISH mit einer Sonde, die Bmp4 RNA bindet, versetzt. Nach der Färbereaktion konnte nachgewiesen werden, dass die Transkription von Bmp4 im manipulierten Ohrbläschen an beiden Expressionsstellen, verglichen mit der linken Kontrollseite, vermehrt stattgefunden hat (Abbildung 9: A.2, A.3 und B.2, B.3 schwarze Pfeilspitzen). Transversalschnitte (Abb. 9 C.1, C.2) der

abgebildeten, manipulierten Embryos in Höhe der Ohrbläschen verdeutlichen die vermehrte Expression von Bmp4 (schwarze Pfeile). Dieser Effekt konnte in 27 von 30 (90%) der untersuchten Embryos beobachtet werden. Die Bmp4 Expression blieb unverändert, wenn die Elektroporation im dorsalen Ohrbläschen mit einem H1-eGFP Kontrollplasmid durchgeführt wurde (Abb. 9: D.1, D.2 und D.3).

Diskussion der Überexpression von Bmp4 durch Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges

Bmp4 ist in der Entwicklung von sensorischen und von nicht-sensorischen Bestandteilen des Vestibularorgans des Hühnerembryos, sowie des Mausembryos von Bedeutung [184, 74, 108]. Die Bogengänge und die dazugehörigen sensorischen Organe (Cristae ampullaris) entwickelten sich nach der Hemmung von Bmp4 im Vogel - Innenohr nur fehlerhaft [106, 184, 108, 80]. Die Experimente dieser Arbeit zeigen die erhöhte Expression von Bmp4 nach Aktivierung des kanonischen *Wnt*-Signalweges. Es ist bereits bekannt, dass die Transkription von Bmp4 durch die Homeobox Proteine Dlx5 und Dlx6, die Zielgene des kanonischen *Wnt*-Signalweges sind, stimuliert wird [84]. Die vorliegenden Daten aus den Experimenten der hier vorliegenden Arbeit gehen mit dieser Erkenntnis einher. Es ist ebenfalls bekannt, dass Bmp4 die Differenzierung von Haarzellen vermittelt und die für die Proliferation der Vorläuferzellen notwendige Expression von Pax2 hemmt [105]. Es bleibt jedoch zu untersuchen ob die gesteigerte Expression von Bmp4 durch die Hemmung von Axin2 die Anzahl und Funktionalität der Haarzellen im Innenohr des Huhns beeinträchtigt.

3.2.3 Der Paired-Box Transkriptionsfaktor 2 wird durch das Stummschalten von Axin2 schwächer exprimiert

Der Paired-box Transkriptionsfaktor 2 (Pax2) wird als eines der frühesten Gene in der Ohrentwicklung und in ihrem gesamten Verlauf exprimiert [110, 111, 112]. Pax2 vermittelt die Proliferation der Vorläufer von Haarzellen [111] und ist für die Differenzierung von vestibulären Haarzellen verantwortlich [112]. Das Bone morphogenetic Protein 4 ist dafür bekannt, die Pax2 Expression zu inhibieren [105].

Die Auswirkung des Abbaus der Axin2 mRNA auf die Expression von Pax2 wird in dieser Arbeit untersucht. Das Bild A.1 (Abbildung 10) zeigt im Stadium HH 15-16 mit dem Axin2 - shRNA Konstrukt elektroporierte Embryos nach 24 stündiger Reinkubation. Die GFP-Expression im dorsalen Ohrbläschenepithel ist abgebildet. Nach der ISH mit einer Ribonukleinsonde für Pax2 wurden die so behandelten Embryonen auf Veränderungen in der Expression von Pax2 untersucht. In den dorsalen Ansichten auf das Rautenhirn (Abb. 10: A.1 und größer A.2) ist deutlich erkennbar, dass Pax2 in dem transfizierten rechten Ohrbläschen schwächer transkribiert wird als auf der linken Kontrollseite. Auch nach der Elektroporation im Stadium HH 18-19 (Abb. 10: B.1 GFP-Expression) konnte dieses Ergebnis beobachtet werden (Abb. 10: B.2 und vergrößert B.3). Die Anfertigung von transversalen Schnitten durch die Ohrbläschen zeigte genauer auf, dass die Expression von Pax2 im dorsalen und dorsolateren Epithel reduziert ist und lediglich die mediale und ventrale Expression verbleibt (Abb. 10: C.1 und C.2 schwarze Pfeile). Dieser Effekt konnte in 31 von 34 (91%) behandelten Embryos nachgewiesen werden. Die Durchführung der Experimente mit einem Kontrollplasmid bewirkte keine Veränderungen in der Expression von Pax2 (Abb. 10: D.1, D.2, D.3).

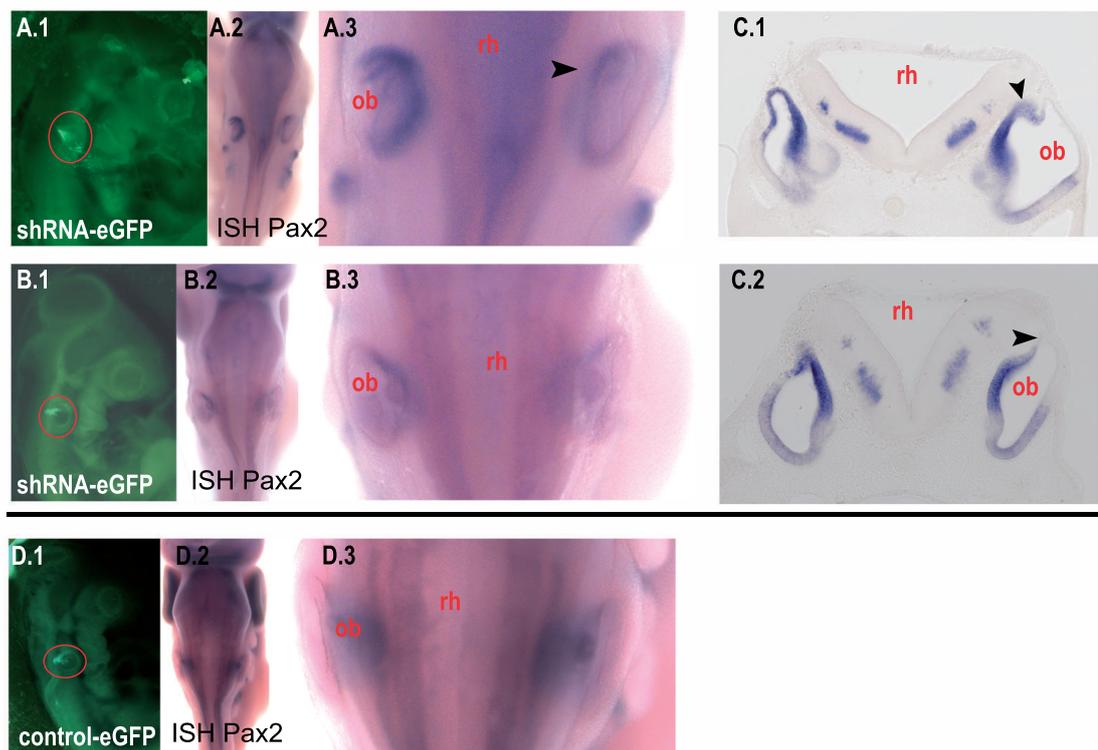


Abbildung 10: **Verminderte Expression von Pax2 nach Manipulation der Axin2 mRNA.** Elektroporation mit Axin2 RNAi und ISH mit einer Pax2 Sonde; A.1, A.2, A.3: elektroporiert in HH 15-16; B.1, B.2, B.3: elektroporiert in HH 18-19. ob-Ohrbläschen, rh-Rautenhirn.

Diskussion der gehemmten Expression von Pax2 nach herunterregulieren vom Axin2 Pax2 wird in Abhängigkeit von Sonic hedgehog (Shh) in dem entwickelnden endolymphatischen System und in allen sensorischen Vorläuferzellen exprimiert [185, 186, 187]. Auch in reifen Haarzellen konnte eine Transkription von Pax2 nachgewiesen werden [185, 112]. Die Entwicklung des Ganglion vestibulare und cochleare erfordert die Expression von Shh und Pax2, während das Vestibularorgan und das endolymphatische System auch ohne deren Einwirkung entstehen [186, 181]. Pax2 vermittelt die Proliferation von Vorläuferzellen im Innenohr und spielt in der Regeneration verletzter Haarzellen im adulten Organismus eine Rolle [111, 112, 187]. Mäuse mit einer Mutation von Pax2 wiesen erhöhte Zahlen apoptotischer Zellen im Innenohr auf, weshalb angenommen wird, dass Pax2 für den Erhalt von Zellen benötigt wird [188]. Studien an Hühner- und Mausembryos zeigten abweichende Phänotypen des Innenohrs bei Störung der Pax2 Aktivität [189, 190]. In Pax2 defizienten Mäusen konnte sich das Vestibularorgan weitestgehend normal entwickeln, nur der Sacculus und die Cochlea waren beeinträchtigt [188, 74]. Die Zielgene des *Wnt*-Signalweges *Dlx5/6* induzieren *Bmp4*, welches die Expression von Pax2 hemmt [186]. Auch in dieser Arbeit konnte die Reduktion der Pax2 Expression als Folge der *Wnt*-Induktion beobachtet werden. Die Transkription im dorsalen Epithel des Ohrbläschens wurde nach der Manipulation von Axin2 stark reduziert (Abb. 10). Eine erwägenswer-

te Folge könnte die vorzeitige Differenzierung der Haarzellvorläufer im zukünftigen Vestibularorgan sein. Die Auswirkungen auf die Funktionalität des Vestibularorgans überschreitet jedoch die Tragweite dieser Experimente und erfordern genauere Nachforschungen.

3.2.4 Das Homeobox Protein Six1 wird nach der Manipulation von Axin2 vermehrt exprimiert

Ein kennzeichnendes Gen für die Entwicklung des Innenohrs wurde zuerst in *Drosophila* durch die fehlerhafte Augenentwicklung bei Mutation entdeckt und *sine-oculis 1* genannt. In Wirbeltieren entspricht es dem homologen Homeobox Protein Six1. Das sensorische Neuroepithel des entwickelnden Innenohrs und die Neuronen des Ganglion vestibulocochleare (G VIII) exprimieren Six1 [113, 114]. Six1 ist dafür bekannt die relativen Anzahlen von Neuronen und sensorischen Zellen im Innenohr anzugleichen [115, 114]. Six1 und das Eyes absent Homolog 1 (*Eya1*) bilden einen Komplex, der für den Erhalt der Neuronen im Ganglion vestibulocochleare, nicht aber für deren initiale Entwicklung, benötigt wird [116]. Die normale Expression von *Bmp4* hängt ebenfalls von dem Six1/*Eya1* Komplex ab [117]. Experimente mit Mausembryonen konnten eine Verminderung der Six1 Expression durch eine aktivierende Mutation des β -catenin nachweisen [116]. In dieser Studie wird Six1 untersucht, um den Einfluss des *Wnt*-Signalweges und damit auch den Einfluss von Axin2 auf die neuronale und sensorische Entwicklung des Innenohrs im Hühnerembryo zu analysieren.

Nach der *in ovo* Elektroporation der Ohrbläschen mit dem Axin2-RNAi Konstrukt wurde eine ISH mit einer Sonde für Six1 durchgeführt. Die gelungene Transfektion des dorsalen Ohrbläschen wurde im Fluoreszenzmikroskop geprüft (Abb. 11: HH 15-16: A.1; HH 18-19: B.1). Nach der ISH konnte bei den im Stadium HH 15-16 elektroporierten Embryos eine gesteigerte Expression von Six1 im manipulierten Ohrbläschen und im angrenzenden Ganglion (Abb. 11: A.3 schwarzer Pfeil), verglichen mit der unberührten linken Seite (Abb. 11: A.2), nachgewiesen werden. Obwohl die normale Expression bei im Stadium HH 18-19 elektroporierten Embryos nur noch latent sichtbar ist, konnte auch hier eine Hochregulierung festgestellt werden (Abb. 11: B.2, B.3 schwarze Pfeile). Schnitte der Ohrbläschen (Abb. 11: C.1) und des Ganglion vestibulocochleare (Abb. 11: C.2) verdeutlichen das Ergebnis. Im Ohrbläschen ist die Expression im medialen Epithel und im angrenzenden periotischen Mesenchym verglichen mit der linken Seite deutlich erhöht (Abb. 11: C.1 schwarze Pfeile). Auch das Ganglion vestibulocochleare ist rechts intensiver gefärbt als auf der linken Seite (Abb. 11: C.2 schwarzer Pfeil). 24 von 26 (92%) der untersuchten Embryos weisen diese Hochregulierung von Six1 auf. Die Bilder D.1, D.2 und D.3 der Abbildung 11 zeigen einen Embryo nach Elektroporation mit einem Kontrollplasmid. Hier ist weder die Größenänderung des Ohrbläschens, noch ein Seitenunterschied in der Expression von Six1 zu beobachten.

Diskussion der vermehrten Expression von Six1 herunterregulieren von Axin2 Six1 hat während der Entwicklung des Innenohrs eine duale Funktion. Neben der Steigerung der Proliferationsrate von Haarzellen wirkt Six1 im Komplex mit *Eya1* als aktivierender Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Haarzellen vermittelt [115, 114]. Eine weitere Funktion ist die Hemmung der Transkription von Genen, welche die Differenzierung der Vorläufer zu Neuronen vermitteln. Dies geschieht wenn Six1 mit dem GRO-like Faktor (*Groucho* - like) im Komplex vorliegt

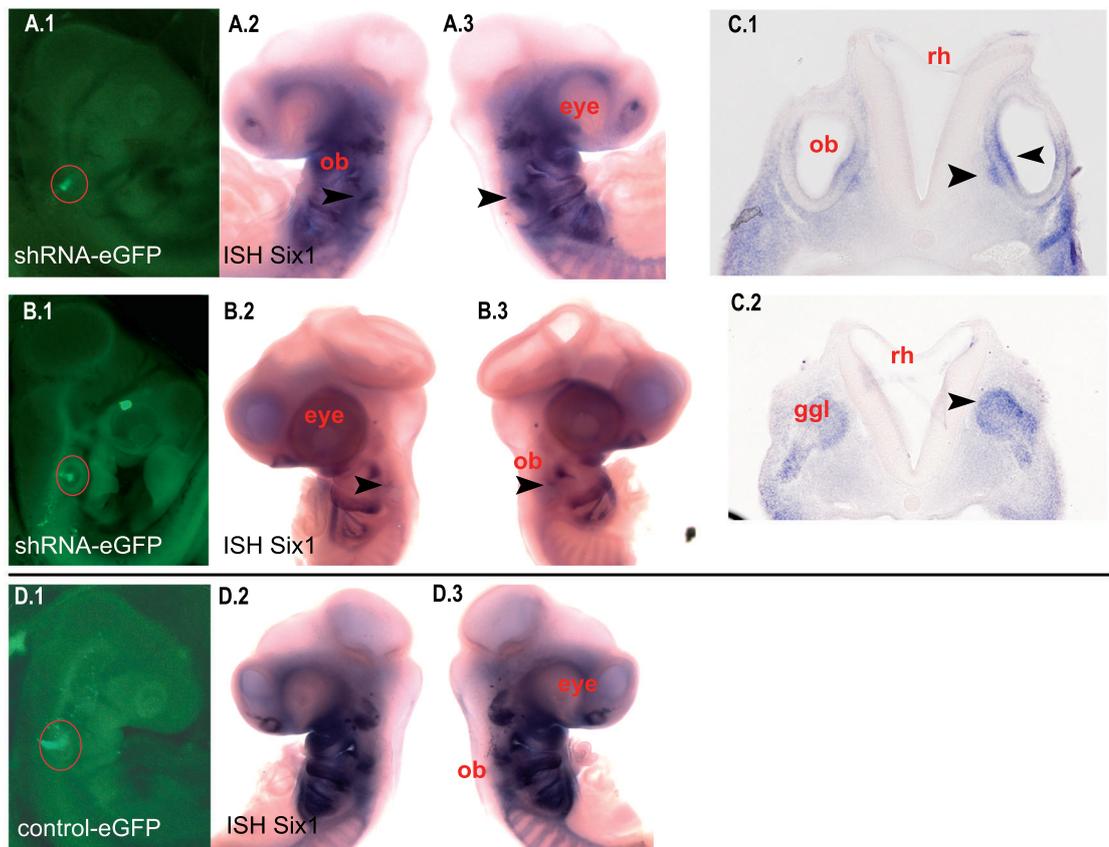


Abbildung 11: **Six1** wird nach **Stummschaltung** von **Axin2** vermehrt **exprimiert**. Elektroporation mit **Axin2** RNAi und ISH mit einer **Six1** Sonde; A.1, A.2, A.3: elektroporiert in HH 15-16; B.1, B.2, B.3: elektroporiert in HH 18-19. ob- Ohrbläschen, rh-Rautenhirn, ggl- Ganglion vestibulocochleare, eye-Eye.

[115, 191]. Es ist weiterhin bekannt, dass *Eya1* die Expression von *Six1* initiiert [191]. Experimente mit einzeln oder doppelt mutierten *Six1* und *Eya1* defizienten Mauszüchtungen zeigen, dass die Differenzierung und Erhaltung von sensorischen Zellen und Neuronen von *Six1* abhängig ist [117]. In mutierten Mäusen kam es nicht zur Entwicklung des Ganglion vestibulocochleare und sämtlicher Strukturen des Innenohrs [113, 192, 191]. Nur bei wenigen der *Six1* defizienten Mäuse entwickelten sich rudimentäre Strukturen des Vestibularorgans. Wie bereits erwähnt, wurde die Transkription von *Six1* in β -catenin aktivierten Mutanten, entgegen der Ergebnisse dieser Studie, gedrosselt [116]. Eine Überexpression von *Six1* und *Eya1* konnte ektope Neurogenese hervorrufen und führte zur verkümmerten Entwicklung der Ohrbläschen [193]. Obwohl *Six1* und *Pax2* beide die Proliferation von Vorläuferzellen bewirken und parallel im Ohrbläschen exprimiert werden, konnte bisher kein gegenseitiger Einfluss beobachtet werden [191, 113]. Die Experimente konnten jedoch nachweisen, dass nicht die Initiation, sondern der Erhalt der Transkription von *Bmp4* von *Six1* abhängt [113]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von *Six1* nach der Aktivierung des kanonischen *Wnt*-Signalweges durch den gezielten Abbau von *Axin2* verstärkt. Dieses Ergebnis geht mit der Hy-

pothese einher, dass der kanonische *Wnt*-Signalweg auf die Expression von *Six1* wirkt [116]. Diese Studie lässt allerdings nicht, wie von Freyer et al. (2010) beschreiben, auf eine negative Regulation von *Six1*, sondern eher auf eine Aktivierung der Transkription schließen [116]. Wie wichtig es ist, die genaue Regulation von *Six1* zu erforschen wird evident wenn man bedenkt, dass Mutationen in den Genen *Six1* und *Eya1* angeborene Krankheiten wie das Branchio-Oto-Renale Syndrom (BOR), das mit zahlreichen Fehlbildungen im Kopf- und Halsbereich einhergeht, verursachen [194, 195, 196].

3.2.5 Eine Hypothese zur Interaktion der Signalmoleküle während der Entwicklung des Innenohrs im Modellorganismus Huhn

Die Entthemmung des kanonischen *Wnt*-Signalweges durch RNAi induzierten Abbau der mRNA von *Axin2* enthüllt ein Netzwerk von Interaktionen und Regulationsmechanismen, die für die Entwicklung des Innenohrs im Huhn von Bedeutung sind (Abbildung 12).

Es wurde gezeigt, dass kanonische *Wnt*-Signale die Expression von *Bmp4* hervorrufen. Diese Regulation passiert durch die TCF-abhängigen Zielgene des *Wnt*-Signalweges *Dlx5/6* [181]. Wie schon zuvor beschrieben stützen die hier vorliegenden Daten die Hypothese, dass *Bmp4* die Expression von *Pax2* inhibiert [105]. Sie weisen ferner auf den übergeordneten kanonischen *Wnt*-Signalweg hin, der *Bmp4* und *Pax2* reguliert. Da die Expression von *Six1* durch Entthemmung des *Wnt*-Signalweges vermehrt wird, stärkt diese Arbeit die Hypothese, dass der kanonische *Wnt*-Signalweg auch *Six1* und *Eya1* übergeordnet ist [116]. Die Experimente zeigen, dass die Expression von *Six1* durch den *Wnt*-Signalweg gefördert wird. Eine weitere Regulation findet man durch *Shh* aus der Chorda dorsalis, das die Transkription von *Pax2* fördert. Die Hypothesen über dieses Regulationsnetzwerk sind in Abbildung 12 dargestellt.

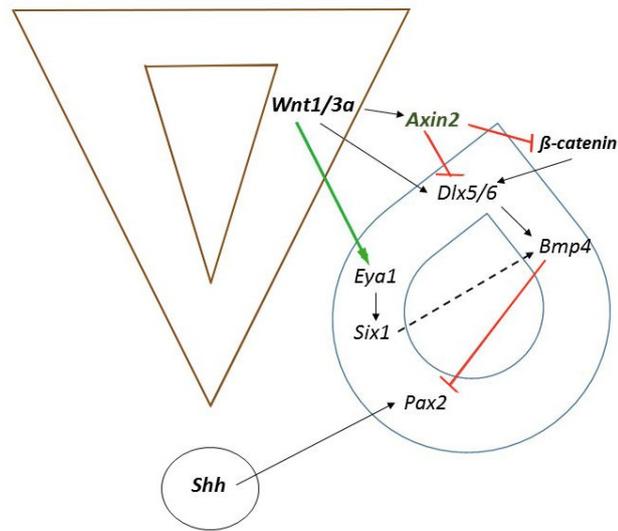


Abbildung 12: **Eine mögliche Interaktion der Signalmoleküle während der Entwicklung des Innenohrs.** Spitze Pfeile-Aktivierung, stumpfe Pfeile-Hemmung. links zentral, triangulär-Rautenhirn, darunter-Chorda dorsalis, rechts daneben-Ohrbläschen. Shh aus der Chorda dorsalis und *Wnt1/3a* aus dem dorsalen Rautenhirn etablieren die dorsoventrale Achse des Ohrbläschens. Shh induziert Pax2. Dlx5/6 und Axin2 sind Ziele der kanonischen *Wnt*-Signale (schwarze Pfeile). Axin2 begünstigt den Abbau von β -catenin (roter Pfeil) und hemmt dadurch die Expression der Zielgene Dlx5/6 (roter Pfeil). Dlx5/6 vermitteln die Expression von Bmp4 (schwarzer Pfeil), welches Pax2 suprimiert (roter Pfeil). Six1 und Eya1 sind für den Erhalt von Bmp4 notwendig (gestrichelter Pfeil). Grüner Pfeil: eine mögliche Regulation der Expression von Six1 und Eya1 durch *Wnt*.

4 Zusammenfassung

In dieser Dissertationsschrift wird das räumlich und zeitlich dynamische Expressionsmuster von Axin2 während der Entwicklung des Huhns beschrieben. In der frühen Entwicklung des Hühnerembryo ist die mRNA von Axin2 in dem Primitivstreifen und dem darunterliegenden Mesoderm, in den Neuralfalten und der Kopffalte, sowie in der sekundären Neurulation in der Schwanzknospe vorhanden. Obwohl die Expression im präsomitischen Mesoderm des Rumpfes der Embryonen nicht nachweisbar ist, exprimiert in der Schwanzknospe auch das präsomitische Mesoderm Axin2. Während der Reifung der Somiten ist Axin2 in dem medialen Epithel und später in der DML detektierbar. Seine Expression ist weiterhin in dem sich differenzierenden Neuralrohr und den Gehirnbälchen nachweisbar. Am Kopf des sich entwickelnden Embryo findet sich Axin2 außerdem in den Pharyngealbögen und den Anlagen der sensorischen Organe. Die Extremitätenanlagen und die Nierengänge exprimieren ebenfalls Axin2. Im weiter entwickelten Hühnerembryo findet sich eine Expression in den Federknospen, den Fingerzwischenräumen und dem äußeren Gehörgang. Die Expression von Axin2 in der Entwicklung von Mäusen wurde bereits beschrieben [99, 35]. Axin2 wurde dabei in dem Primitivstreifen, der Kopffalte, den Schlundbögen, dem PSM und der DML, der Schwanzknospe, den Nieren und dem Gehirn nachgewiesen. Das hier beschriebene Expressionsmuster im Huhn deckt sich mit Ausnahme des PSM mit dem von Mäusen. Das Expressionsmuster von Axin2 während der Entwicklung des Huhns soll zeigen, an welchen Stellen Axin2 vorkommt. So wird auf seine Funktion in der Entwicklung, die bei der Untersuchung des kanonischen *Wnt*-Signalweges oft vernachlässigt wird, hingewiesen.

Ein gutes Beispiel dafür führen die Experimente im Innenohr des Hühnerembryos an. Hier konnte das gezielte Ausschalten der Translation von Axin2 mRNA zeigen, wie die Regulierung des kanonischen *Wnt*-Signalweges die Entwicklung des Innenohrs beeinflusst. So führt die Transfektion der Ohrbecher bzw. -bläschen mit einem Axin2 RNAi Konstrukt zu vergrößerten Ohrbläschen, die einer beschleunigten Entwicklung zugrunde liegen könnte. Ob die Funktionalität des Innenohrs beeinflusst ist, bleibt an dieser Stelle jedoch unklar. Weiter konnten Veränderungen in der Expression der Gene *Bmp4*, *Pax2* und *Six1* als Folge des gezielten Abbaus der Axin2 mRNA nachgewiesen werden. Diese Faktoren sind für die neuronale und sensorische Entwicklung des Innenohrs unerlässlich. Die vorliegenden Ergebnisse weisen daher auch auf eine veränderte Entwicklung der Neuronen und der sensorischen Zellen im Innenohr hin. Inwiefern die Funktion des Innenohrs nach dieser Aktivierung des kanonischen *Wnt*-Signalweges beeinflusst wird, bedarf jedoch genauerer Untersuchungen.

Bekanntmachung Teile dieser Promotionsarbeit wurden bereits in Ecke et al. Expression Pattern of Axin2 During Chicken Development. PloS one 11.9 (2016): e0163610 veröffentlicht.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Clevers, H. und Nusse, R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. In: *Cell* 149.6 (2012), S. 1192–1205.
- [2] Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hroudá, M., Lentfer, J., Schmidt, H. A., Technau, U., Haeseler, A. von, Hobmayer, B., Martindale, M. Q. u. a. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. In: *Nature* 433.7022 (2005), S. 156–160.
- [3] Nüsslein-Volhard, C. und Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. In: *Nature* 287.5785 (1980), S. 795–801.
- [4] Nusse, R. und Varmus, H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. In: *Cell* 31.1 (1982), S. 99–109.
- [5] Siegfried, E., Chou, T.-B. und Perrimon, N. wingless signaling acts through zeste-white 3, the *Drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate. In: *Cell* 71.7 (1992), S. 1167–1179.
- [6] Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L.-K., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hedge, P., McKechnie, D. u. a. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. In: *Science* 253.5020 (1991), S. 661–665.
- [7] Nakamura, Y., Nishisho, I., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Yasuo, M., Miki, Y., Ando, H. und Horii, A. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene in FAP (familial polyposis coli) patients and in sporadic colorectal tumors. In: *The Tohoku journal of experimental medicine* 168.2 (1992), S. 141–147.
- [8] Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S. H., Masiarz, F. R., Munemitsu, S. und Polakis, P. Association of the APC gene product with beta-catenin. In: *Science* 262.5140 (1993), S. 1731–1734.
- [9] Garriock, R. J., Warkman, A. S., Meadows, S. M., D’Agostino, S. und Krieg, P. A. Census of vertebrate Wnt genes: isolation and developmental expression of *Xenopus* Wnt2, Wnt3, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, and Wnt16. In: *Developmental dynamics* 236.5 (2007), S. 1249–1258.
- [10] Tanaka, K., Kitagawa, Y. und Kadowaki, T. *Drosophila* segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.15 (2002), S. 12816–12823.
- [11] Dann, C. E., Hsieh, J.-C., Rattner, A., Sharma, D., Nathans, J. und Leahy, D. J. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. In: *Nature* 412.6842 (2001), S. 86–90.
- [12] Clevers, H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. In: *Cell* 127.3 (2006), S. 469–480.

- [13] Barrow, J. R. “Wnt/PCP signaling: a veritable polar star in establishing patterns of polarity in embryonic tissues”. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Bd. 17. 2. Elsevier. 2006, S. 185–193.
- [14] Katoh, M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). In: *Oncology reports* 14.6 (2005), S. 1583–1588.
- [15] Komiya, Y. und Habas, R. Wnt signal transduction pathways. In: *Organogenesis* 4.2 (2008), S. 68–75.
- [16] Kohn, A. D. und Moon, R. T. Wnt and calcium signaling: β -catenin-independent pathways. In: *Cell calcium* 38.3 (2005), S. 439–446.
- [17] Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., Vijayakumar, S., Economides, A. N. und Aaronson, S. A. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. In: *Genes & development* 24.22 (2010), S. 2517–2530.
- [18] Semenov, M. V., Habas, R., MacDonald, B. T. und He, X. SnapShot: noncanonical Wnt signaling pathways. In: *Cell* 131.7 (2007), S. 1378.
- [19] Cha, S.-W., Tadjuidje, E., Tao, Q., Wylie, C. und Heasman, J. Wnt5a and Wnt11 interact in a maternal Dkk1-regulated fashion to activate both canonical and non-canonical signaling in *Xenopus* axis formation. In: *Development* 135.22 (2008), S. 3719–3729.
- [20] Amerongen, R. van, Fuerer, C., Mizutani, M. und Nusse, R. Wnt5a can both activate and repress Wnt/ β -catenin signaling during mouse embryonic development. In: *Developmental biology* 369.1 (2012), S. 101–114.
- [21] Kestler, H. A. und Kühl, M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 363.1495 (2008), S. 1333–1347.
- [22] Tao, Q., Yokota, C., Puck, H., Kofron, M., Birsoy, B., Yan, D., Asashima, M., Wylie, C. C., Lin, X. und Heasman, J. Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. In: *Cell* 120.6 (2005), S. 857–871.
- [23] Daniels, D. L. und Weis, W. I. β -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. In: *Nature structural & molecular biology* 12.4 (2005), S. 364–371.
- [24] Willert, K. und Jones, K. A. Wnt signaling: is the party in the nucleus?. In: *Genes & development* 20.11 (2006), S. 1394–1404.
- [25] Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamiuchi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K.-i. und Nakayama, K. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of β -catenin. In: *The EMBO journal* 18.9 (1999), S. 2401–2410.

- [26] Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. und Kemler, R. β -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. In: *The EMBO journal* 16.13 (1997), S. 3797–3804.
- [27] Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S. und Kikuchi, A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. In: *The EMBO journal* 17.5 (1998), S. 1371–1384.
- [28] Huang, H. und He, X. Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights. In: *Current opinion in cell biology* 20.2 (2008), S. 119–125.
- [29] Logan, C. Y. und Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20 (2004), S. 781–810.
- [30] He, X., Semenov, M., Tamai, K. und Zeng, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way. In: *Development* 131.8 (2004), S. 1663–1677.
- [31] Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.-P. und He, X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. In: *Nature* 407.6803 (2000), S. 530–535.
- [32] Behrens, J., Jerchow, B.-A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D. und Birchmeier, W. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with β -catenin, APC, and GSK3 β . In: *Science* 280.5363 (1998), S. 596–599.
- [33] Yamamoto, H., Kishida, S., Uochi, T., Ikeda, S., Koyama, S., Asashima, M. und Kikuchi, A. Axil, a Member of the Axin Family, Interacts with Both Glycogen Synthase Kinase 3 β and β -Catenin and Inhibits Axis Formation of Xenopus Embryos. In: *Molecular and cellular biology* 18.5 (1998), S. 2867–2875.
- [34] Chia, I. V. und Costantini, F. Mouse axin and axin2/conductin proteins are functionally equivalent in vivo. In: *Molecular and cellular biology* 25.11 (2005), S. 4371–4376.
- [35] Jho, E.-h., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N. und Costantini, F. Wnt/ β -catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. In: *Molecular and cellular biology* 22.4 (2002), S. 1172–1183.
- [36] Zeng, L., Fagotto, F., Zhang, T., Hsu, W., Vasicek, T. J., Perry, W. L., Lee, J. J., Tilghman, S. M., Gumbiner, B. M. und Costantini, F. The mouse Fusedlocus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. In: *Cell* 90.1 (1997), S. 181–192.
- [37] Kikuchi, A. Roles of Axin in the Wnt signalling pathway. In: *Cellular signalling* 11.11 (1999), S. 777–788.
- [38] Nakamura, T., Hamada, F., Ishidate, T., Anai, K.-i., Kawahara, K., Toyoshima, K. und Akiyama, T. Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with β -catenin, GSK-3 β and APC and reduces the β -catenin level. In: *Genes to Cells* 3.6 (1998), S. 395–403.

- [39] Kishida, S., Yamamoto, H., Hino, S.-i., Ikeda, S., Kishida, M. und Kikuchi, A. DIX domains of Dvl and Axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate β -catenin stability. In: *Molecular and cellular biology* 19.6 (1999), S. 4414–4422.
- [40] Luo, W. und Lin, S.-C. Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways. In: *Neurosignals* 13.3 (2004), S. 99–113.
- [41] Hsu, W., Zeng, L. und Costantini, F. Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. In: *Journal of Biological Chemistry* 274.6 (1999), S. 3439–3445.
- [42] Hart, M. J., Santos, R. de los, Albert, I. N., Rubinfeld, B. und Polakis, P. Downregulation of β -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, β -catenin and GSK3 β . In: *Current Biology* 8.10 (1998), S. 573–581.
- [43] Fagotto, F., Jho, E.-h., Zeng, L., Kurth, T., Joos, T., Kaufmann, C. und Costantini, F. Domains of axin involved in protein–protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization. In: *The Journal of cell biology* 145.4 (1999), S. 741–756.
- [44] Hinoi, T., Yamamoto, H., Kishida, M., Takada, S., Kishida, S. und Kikuchi, A. Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and Axin facilitates glycogen synthase kinase-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin and down-regulates β -catenin. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.44 (2000), S. 34399–34406.
- [45] Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z. und He, X. A mechanism for Wnt coreceptor activation. In: *Molecular cell* 13.1 (2004), S. 149–156.
- [46] Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J. und He, X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. In: *Nature* 438.7069 (2005), S. 873–877.
- [47] Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A. und Niehrs, C. Casein kinase 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. In: *Nature* 438.7069 (2005), S. 867–872.
- [48] Bilić, J., Huang, Y.-L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.-M., Bienz, M. und Niehrs, C. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. In: *Science* 316.5831 (2007), S. 1619–1622.
- [49] Willert, K., Shibamoto, S. und Nusse, R. Wnt-induced dephosphorylation of axin releases β -catenin from the axin complex. In: *Genes & development* 13.14 (1999), S. 1768–1773.
- [50] MacDonald, B. T., Tamai, K. und He, X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. In: *Developmental cell* 17.1 (2009), S. 9–26.
- [51] Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S. und Polakis, P. Binding of GSK3 β to the APC- β -catenin complex and regulation of complex assembly. In: *Science* 272.5264 (1996), S. 1023–1026.

- [52] Jho, E.-h., Lomvardas, S. und Costantini, F. A GSK3 β phosphorylation site in axin modulates interaction with β -catenin and Tcf-mediated gene expression. In: *Biochemical and biophysical research communications* 266.1 (1999), S. 28–35.
- [53] Liu, X., Rubin, J. S. und Kimmel, A. R. Rapid, Wnt-induced changes in GSK3 β associations that regulate β -catenin stabilization are mediated by G α proteins. In: *Current Biology* 15.22 (2005), S. 1989–1997.
- [54] Popperl, H., Schmidt, C., Wilson, V., Hume, C., Dodd, J., Krumlauf, R. und Beddington, R. Misexpression of Cwnt8C in the mouse induces an ectopic embryonic axis and causes a truncation of the anterior neuroectoderm. In: *Development* 124.15 (1997), S. 2997–3005.
- [55] McMahon, A. P. und Moon, R. T. Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. In: *Cell* 58.6 (1989), S. 1075–1084.
- [56] Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C. und Birchmeier, W. Requirement for β -catenin in anterior-posterior axis formation in mice. In: *The Journal of cell biology* 148.3 (2000), S. 567–578.
- [57] Aulehla, A., Wiegraebe, W., Baubet, V., Wahl, M. B., Deng, C., Taketo, M., Lewandoski, M. und Pourquié, O. A β -catenin gradient links the clock and wavefront systems in mouse embryo segmentation. In: *Nature cell biology* 10.2 (2008), S. 186–193.
- [58] Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A. und Birchmeier, W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss-and gain-of-function mutations of β -catenin in mice. In: *Genes & development* 22.17 (2008), S. 2308–2341.
- [59] Perry, W. L., Vasicek, T. J., Lee, J. J., Rossi, J. M., Zeng, L., Zhang, T., Tilghman, S. M. und Costantini, F. Phenotypic and molecular analysis of a transgenic insertional allele of the mouse Fused locus.. In: *Genetics* 141.1 (1995), S. 321–332.
- [60] Nusse, R., Fuerer, C., Ching, W., Harnish, K., Logan, C., Zeng, A., Ten Berge, D. und Kalani, Y. “Wnt signaling and stem cell control”. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Bd. 73. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2008, S. 59–66.
- [61] Polakis, P. The many ways of Wnt in cancer. In: *Current opinion in genetics & development* 17.1 (2007), S. 45–51.
- [62] Gruszka, A. M., Valli, D. und Alcalay, M. Wnt Signalling in Acute Myeloid Leukaemia. In: *Cells* 8.11 (2019), S. 1403.
- [63] Polakis, P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1332.3 (1997), F127–F147.
- [64] Yan, D., Wiesmann, M., Rohan, M., Chan, V., Jefferson, A. B., Guo, L., Sakamoto, D., Caothien, R. H., Fuller, J. H., Reinhard, C. u. a. Elevated expression of axin2 and hnkd mRNA provides evidence that Wnt/ β -catenin signaling is activated in human colon tumors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.26 (2001), S. 14973–14978.

- [65] Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., Wetering, M. van de, Clevers, H., Schlag, P. M., Birchmeier, W. u. a. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. In: *Molecular and cellular biology* 22.4 (2002), S. 1184–1193.
- [66] Otero, L., Lacunza, E., Vasquez, V., Arbelaez, V., Cardier, F. und González, F. Variations in AXIN2 predict risk and prognosis of colorectal cancer. In: *BDJ open* 5.1 (2019), S. 1–6.
- [67] Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T. u. a. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. In: *Nature genetics* 24.3 (2000), S. 245–250.
- [68] Wu, R., Zhai, Y., Fearon, E. R. und Cho, K. R. Diverse mechanisms of β -catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. In: *Cancer research* 61.22 (2001), S. 8247–8255.
- [69] Dahmen, R., Koch, A., Denkhaus, D., Tonn, J., Sörensen, N., Berthold, F., Behrens, J., Birchmeier, W., Wiestler, O. und Pietsch, T. Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. In: *Cancer research* 61.19 (2001), S. 7039–7043.
- [70] Yu, H.-M. I., Jerchow, B., Sheu, T.-J., Liu, B., Costantini, F., Puzas, J. E., Birchmeier, W. und Hsu, W. The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. In: *Development* 132.8 (2005), S. 1995–2005.
- [71] Lammi, L., Arte, S., Somer, M., Järvinen, H., Lahermo, P., Thesleff, I., Pirinen, S. und Nieminen, P. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. In: *The American Journal of Human Genetics* 74.5 (2004), S. 1043–1050.
- [72] Lohi, M., Tucker, A. S. und Sharpe, P. T. Expression of Axin2 indicates a role for canonical Wnt signaling in development of the crown and root during pre-and postnatal tooth development. In: *Developmental Dynamics* 239.1 (2010), S. 160–167.
- [73] Barald, K. F. und Kelley, M. W. From placode to polarization: new tunes in inner ear development. In: *Development* 131.17 (2004), S. 4119–4130.
- [74] Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R. und Wu, D. K. Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. In: *The Journal of neuroscience* 18.9 (1998), S. 3327–3335.
- [75] Whitfield, T. T. Development of the inner ear. In: *Current opinion in genetics & development* 32 (2015), S. 112–118.
- [76] Wu, D. K., Nunes, F. D. und Choo, D. Axial specification for sensory organs versus non-sensory structures of the chicken inner ear. In: *Development* 125.1 (1998), S. 11–20.
- [77] Stevens, C. B., Davies, A. L., Battista, S., Lewis, J. H. und Fekete, D. M. Forced activation of Wnt signaling alters morphogenesis and sensory organ identity in the chicken inner ear. In: *Developmental biology* 261.1 (2003), S. 149–164.

- [78] Kido, T., Sekitani, T., Yamashita, H., Endo, S., Okami, K., Ogata, Y. und Hara, H. The Oto-lithic Organ in the Developing Chick Embryo Scanning Electron Microscopic Study on the Utricular Macula. In: *Acta oto-laryngologica* 113.2 (1993), S. 128–136.
- [79] Wu, D. K. und Kelley, M. W. Molecular mechanisms of inner ear development. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.8 (2012), a008409.
- [80] Nakajima, Y. Signaling regulating inner ear development: cell fate determination, patterning, morphogenesis, and defects. In: *Congenital anomalies* 55.1 (2015), S. 17–25.
- [81] Riccomagno, M. M., Takada, S. und Epstein, D. J. Wnt-dependent regulation of inner ear morphogenesis is balanced by the opposing and supporting roles of Shh. In: *Genes & development* 19.13 (2005), S. 1612–1623.
- [82] Brown, A. S. und Epstein, D. J. Otic ablation of smoothened reveals direct and indirect requirements for Hedgehog signaling in inner ear development. In: *Development* 138.18 (2011), S. 3967–3976.
- [83] Kil, S.-H. und Collazo, A. Origins of inner ear sensory organs revealed by fate map and time-lapse analyses. In: *Developmental biology* 233.2 (2001), S. 365–379.
- [84] Chatterjee, S., Kraus, P. und Lufkin, T. A symphony of inner ear developmental control genes. In: *BMC genetics* 11.1 (2010), S. 68.
- [85] Bok, J., Chang, W. und Wu, D. K. Patterning and morphogenesis of the vertebrate inner ear. In: *International journal of developmental biology* 51.6/7 (2007), S. 521.
- [86] Groves, A. K. und Fekete, D. M. Shaping sound in space: the regulation of inner ear patterning. In: *Development* 139.2 (2012), S. 245–257.
- [87] Domínguez-Frutos, E., Vendrell, V., Alvarez, Y., Zelarayan, L. C., López-Hernández, I., Ros, M. und Schimmang, T. Tissue-specific requirements for FGF8 during early inner ear development. In: *Mechanisms of development* 126.10 (2009), S. 873–881.
- [88] Freter, S., Muta, Y., Mak, S.-S., Rinkwitz, S. und Ladher, R. K. Progressive restriction of otic fate: the role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential. In: *Development* 135.20 (2008), S. 3415–3424.
- [89] Hollyday, M., McMahon, J. A. und McMahon, A. P. Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. In: *Mechanisms of development* 52.1 (1995), S. 9–25.
- [90] Jiang, H., Zeng, S., Ni, W., Chen, Y. und Li, W. Unidirectional and stage-dependent roles of Notch1 in Wnt-responsive Lgr5+ cells during mouse inner ear development. In: *Frontiers of medicine* (2019), S. 1–8.
- [91] Mittal, R., Debs, L. H., Nguyen, D., Patel, A. P., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Eshraghi, A. A. und Liu, X. Z. Signaling in the auditory system: implications in hair cell regeneration and hearing function. In: *Journal of cellular physiology* 232.10 (2017), S. 2710–2721.
- [92] Kelley, M. W. Generation of Human Hair Cells In Vitro: Is It All about How the Wnt Blows?. In: *Cell stem cell* 21.1 (2017), S. 11–12.

- [93] Vendrell, V., Vázquez-Echeverría, C., López-Hernández, I., Alonso, B. D., Martínez, S., Pujades, C. und Schimmang, T. Roles of Wnt8a during formation and patterning of the mouse inner ear. In: *Mechanisms of development* 130.2 (2013), S. 160–168.
- [94] Liu, W., Li, G., Chien, J., Raft, S., Zhang, H., Chiang, C. und Frenz, D. Sonic hedgehog regulates otic capsule chondrogenesis and inner ear development in the mouse embryo. In: *Developmental biology* 248.2 (2002), S. 240–250.
- [95] Nieto, M. A., Patel, K. und Wilkinson, D. G. “In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections”. In: *Methods in cell biology*. Bd. 51. Elsevier, 1996, S. 219–235.
- [96] Hamburger, V. und Hamilton, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. English. In: *Journal of morphology* 88.1 (1951), S. 49–92.
- [97] Schoenwolf, G. C. und Smith, J. L. “Mechanisms of neurulation”. In: *Developmental Biology Protocols: Volume II*. Springer, 2000, S. 125–134.
- [98] Schoenwolf, G. C. und Delongo, J. Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo. In: *American Journal of Anatomy* 158.1 (1980), S. 43–63.
- [99] Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B. und Herrmann, B. G. Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. In: *Developmental cell* 4.3 (2003), S. 395–406.
- [100] Tao, Y., Zhou, X., Liu, Z., Zhang, X., Nie, Y., Zheng, X., Li, S., Hu, X., Yang, G., Zhao, Q. u. a. Expression patterns of three JAK–STAT pathway genes in feather follicle development during chicken embryogenesis. In: *Gene Expression Patterns* (2019), S. 119078.
- [101] Saunders, J. W. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. In: *Journal of Experimental Zoology* 108.3 (1948), S. 363–403.
- [102] Saxén, L. und Sariola, H. Early organogenesis of the kidney. In: *Pediatric nephrology* 1.3 (1987), S. 385–392.
- [103] Chow, R. L. und Lang, R. A. Early eye development in vertebrates. In: *Annual review of cell and developmental biology* 17.1 (2001), S. 255–296.
- [104] Bissonnette, J. P. und Fekete, D. M. Standard atlas of the gross anatomy of the developing inner ear of the chicken. In: *Journal of Comparative Neurology* 368.4 (1996), S. 620–630.
- [105] Liu, H., Corrales, C. E., Wang, Z., Zhao, Y., Wang, Y., Liu, H. und Heller, S. BMP4 signaling is involved in the generation of inner ear sensory epithelia. In: *BMC developmental biology* 5.1 (2005), S. 1.
- [106] Chang, W., Lin, Z., Kulesa, H., Hebert, J., Hogan, B. L. und Wu, D. K. Bmp4 is essential for the formation of the vestibular apparatus that detects angular head movements. In: *PLoS Genet* 4.4 (2008), e1000050.

- [107] Oh, S.-H., Johnson, R. und Wu, D. K. Differential expression of bone morphogenetic proteins in the developing vestibular and auditory sensory organs. In: *The Journal of neuroscience* 16.20 (1996), S. 6463–6475.
- [108] Ma, J.-y., You, D., Li, W.-y., Lu, X.-l., Sun, S. und Li, H.-w. Bone morphogenetic proteins and inner ear development. In: *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 20.2 (2019), S. 131–145.
- [109] Rakowiecki, S. und Epstein, D. J. Divergent roles for Wnt/ β -catenin signaling in epithelial maintenance and breakdown during semicircular canal formation. In: *Development* 140.8 (2013), S. 1730–1739.
- [110] Groves, A. K. und Bronner-Fraser, M. Competence, specification and commitment in otic placode induction. In: *Development* 127.16 (2000), S. 3489–3499.
- [111] Li, H., Liu, H., Corrales, C. E., Mutai, H. und Heller, S. Correlation of Pax-2 expression with cell proliferation in the developing chicken inner ear. In: *Journal of neurobiology* 60.1 (2004), S. 61–70.
- [112] Warchol, M. E. und Richardson, G. P. Expression of the Pax2 transcription factor is associated with vestibular phenotype in the avian inner ear. In: *Developmental neurobiology* 69.2-3 (2009), S. 191.
- [113] Zheng, W., Huang, L., Wei, Z.-B., Silviu, D., Tang, B. und Xu, P.-X. The role of Six1 in mammalian auditory system development. In: *Development* 130.17 (2003), S. 3989–4000.
- [114] Sato, S., Furuta, Y. und Kawakami, K. Regulation of continuous but complex expression pattern of Six1 during early sensory development. In: *Developmental Dynamics* 247.1 (2018), S. 250–261.
- [115] Bricaud, O. und Collazo, A. Balancing cell numbers during organogenesis: Six1a differentially affects neurons and sensory hair cells in the inner ear. In: *Developmental biology* 357.1 (2011), S. 191–201.
- [116] Freyer, L. und Morrow, B. E. Canonical Wnt signaling modulates Tbx1, Eya1, and Six1 expression, restricting neurogenesis in the otic vesicle. In: *Developmental Dynamics* 239.6 (2010), S. 1708–1722.
- [117] Wong, E. Y., Ahmed, M. und Xu, P.-X. EYA1–SIX1 complex in neurosensory cell fate induction in the mammalian inner ear. In: *Hearing research* 297 (2013), S. 13–19.
- [118] Hikasa, H. und Sokol, S. Y. Wnt signaling in vertebrate axis specification. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.1 (2013), a007955.
- [119] Durston, A. “Time, space and the vertebrate body axis”. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Bd. 42. Elsevier. 2015, S. 66–77.
- [120] Cunningham, T. J., Kumar, S., Yamaguchi, T. P. und Duester, G. Wnt8a and Wnt3a cooperate in the axial stem cell niche to promote mammalian body axis extension. In: *Developmental Dynamics* 244.6 (2015), S. 797–807.

- [121] Takada, S., Stark, K. L., Shea, M. J., Vassileva, G., McMahon, J. A. und McMahon, A. P. Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo.. In: *Genes & development* 8.2 (1994), S. 174–189.
- [122] Niehrs, C. Regionally specific induction by the Spemann–Mangold organizer. In: *Nature Reviews Genetics* 5.6 (2004), S. 425–434.
- [123] Glinka, A., Wu, W., Onichtchouk, D., Blumenstock, C. und Niehrs, C. Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*. In: *Nature* 389.6650 (1997), S. 517–519.
- [124] Thisse, B., Wright, C. V. und Thisse, C. Activin-and Nodal-related factors control antero-posterior patterning of the zebrafish embryo. In: *Nature* 403.6768 (2000), S. 425–428.
- [125] Xu, P.-F., Houssin, N., Ferri-Lagneau, K. F., Thisse, B. und Thisse, C. Construction of a vertebrate embryo from two opposing morphogen gradients. In: *Science* 344.6179 (2014), S. 87–89.
- [126] Yasuo, H. und Lemaire, P. Role of Goosecoid, Xnot and Wnt antagonists in the maintenance of the notochord genetic programme in *Xenopus* gastrulae. In: *Development* 128.19 (2001), S. 3783–3793.
- [127] Gluecksohn-Schoenheimer, S. The effects of a lethal mutation responsible for duplications and twinning in mouse embryos. In: *Journal of Experimental Zoology* 110.1 (1949), S. 47–76.
- [128] Chapman, S. C., Brown, R., Lees, L., Schoenwolf, G. C. und Lumsden, A. Expression analysis of chick Wnt and frizzled genes and selected inhibitors in early chick patterning. In: *Developmental dynamics* 229.3 (2004), S. 668–676.
- [129] Marcelle, C., Stark, M. R. und Bronner-Fraser, M. Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. In: *Development* 124.20 (1997), S. 3955–3963.
- [130] Hirsinger, E., Duprez, D., Jouve, C., Malapert, P., Cooke, J. und Pourquié, O. Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning. In: *Development* 124.22 (1997), S. 4605–4614.
- [131] Ikeya, M. und Takada, S. Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. In: *Development* 125.24 (1998), S. 4969–4976.
- [132] Schubert, F. R., Mootosamy, R. C., Walters, E. H., Graham, A., Tumiotta, L., Münsterberg, A. E., Lumsden, A. und Dietrich, S. Wnt6 marks sites of epithelial transformations in the chick embryo. In: *Mechanisms of development* 114.1 (2002), S. 143–148.
- [133] Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S., Huang, R., Christ, B. und Scaal, M. Regulation of ectodermal Wnt6 expression by the neural tube is transduced by dermomyotomal Wnt11: a mechanism of dermomyotomal lip sustainment. In: *Development* 133.15 (2006), S. 2897–2904.

- [134] Morosan-Puopolo, G., Balakrishnan-Renuka, A., Yusuf, F., Chen, J., Dai, F., Zoidl, G., Lüdtke, T. H.-W., Kispert, A., Theiss, C., Abdelsabour-Khalaf, M. u. a. Wnt11 is required for oriented migration of dermogenic progenitor cells from the dorsomedial lip of the avian dermomyotome. In: *PloS one* 9.3 (2014), e92679.
- [135] Gong, H., Wang, H., Wang, Y., Bai, X., Liu, B., He, J., Wu, J., Qi, W. und Zhang, W. Skin transcriptome reveals the dynamic changes in the Wnt pathway during integument morphogenesis of chick embryos. In: *PloS one* 13.1 (2018), e0190933.
- [136] Chesnutt, C., Burrus, L. W., Brown, A. M. und Niswander, L. Coordinate regulation of neural tube patterning and proliferation by TGF β and WNT activity. In: *Developmental biology* 274.2 (2004), S. 334–347.
- [137] Wilson, L. und Maden, M. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. In: *Developmental biology* 282.1 (2005), S. 1–13.
- [138] Bhattacharya, D., Rothstein, M., Azambuja, A. P. und Simoes-Costa, M. Control of neural crest multipotency by Wnt signaling and the Lin28/let-7 axis. In: *eLife* 7 (2018), e40556.
- [139] Megason, S. G. und McMahon, A. P. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. In: *Development* 129.9 (2002), S. 2087–2098.
- [140] Augustine, K. A., Liu, E. T. und Sadler, T. Interactions of Wnt-1 and Wnt-3a are essential for neural tube patterning. In: *Teratology* 51.2 (1995), S. 107–119.
- [141] Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S. und Marti, E. Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. In: *Development* 135.2 (2008), S. 237–247.
- [142] Yu, W., McDonnell, K., Taketo, M. M. und Bai, C. B. Wnt signaling determines ventral spinal cord cell fates in a time-dependent manner. In: *Development* 135.22 (2008), S. 3687–3696.
- [143] Kawakami, Y., Capdevila, J., Büscher, D., Itoh, T., Esteban, C. R. und Belmonte, J. C. I. WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. In: *Cell* 104.6 (2001), S. 891–900.
- [144] Johnson, R. L. und Tabin, C. J. Molecular models for vertebrate limb development. In: *Cell* 90.6 (1997), S. 979–990.
- [145] Dealy, C. N., Roth, A., Ferrari, D., Brown, A. M. und Kosher, R. A. Wnt-5a and Wnt-7a are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. In: *Mechanisms of development* 43.2 (1993), S. 175–186.
- [146] Parr, B. A., Shea, M. J., Vassileva, G. und McMahon, A. P. Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. In: *Development* 119.1 (1993), S. 247–261.

- [147] Kengaku, M., Capdevila, J., Rodriguez-Esteban, C., De La Peña, J., Johnson, R. L., Belmonte, J. C. I. und Tabin, C. J. Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. In: *Science* 280.5367 (1998), S. 1274–1277.
- [148] Church, V. L. und Francis-West, P. Wnt signalling during limb development. In: *International Journal of Developmental Biology* 46.7 (2002), S. 927–936.
- [149] Berge, D. ten, Brugmann, S. A., Helms, J. A. und Nusse, R. Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. In: *Development* 135.19 (2008), S. 3247–3257.
- [150] Farrell, E. R. und Münsterberg, A. E. *csal1* is controlled by a combination of FGF and Wnt signals in developing limb buds. In: *Developmental biology* 225.2 (2000), S. 447–458.
- [151] Carroll, T. J., Park, J.-S., Hayashi, S., Majumdar, A. und McMahon, A. P. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. In: *Developmental cell* 9.2 (2005), S. 283–292.
- [152] Park, J.-S., Valerius, M. T. und McMahon, A. P. Wnt/ β -catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. In: *Development* 134.13 (2007), S. 2533–2539.
- [153] Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G. und McMahon, A. P. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. In: *Nature* 372.6507 (1994), S. 679–683.
- [154] Roly, Z. Y., Backhouse, B., Cutting, A., Tan, T. Y., Sinclair, A. H., Ayers, K. L., Major, A. T. und Smith, C. A. The cell biology and molecular genetics of Müllerian duct development. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 7.3 (2018), e310.
- [155] Burn, S., Webb, A., Berry, R., Davies, J., Ferrer-Vaquer, A., Hadjantonakis, A., Hastie, N. und Hohenstein, P. Calcium/NFAT signalling promotes early nephrogenesis. In: *Developmental biology* 352.2 (2011), S. 288–298.
- [156] Karner, C. M., Chirumamilla, R., Aoki, S., Igarashi, P., Wallingford, J. B. und Carroll, T. J. Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis. In: *Nature genetics* 41.7 (2009), S. 793–799.
- [157] Mccoy, K. E., Zhou, X. und Vize, P. D. Non-canonical wnt signals antagonize and canonical wnt signals promote cell proliferation in early kidney development. In: *Developmental Dynamics* 240.6 (2011), S. 1558–1566.
- [158] Tanigawa, S., Wang, H., Yang, Y., Sharma, N., Tarasova, N., Ajima, R., Yamaguchi, T. P., Rodriguez, L. G. und Perantoni, A. O. Wnt4 induces nephronic tubules in metanephric mesenchyme by a non-canonical mechanism. In: *Developmental biology* 352.1 (2011), S. 58–69.
- [159] Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O. A., Jenny, A. u. a. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. In: *Nature genetics* 37.5 (2005), S. 537–543.

- [160] Simons, M. und Mlodzik, M. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. In: *Annual review of genetics* 42 (2008), S. 517.
- [161] Iglesias, D. M., Hueber, P.-A., Chu, L., Campbell, R., Patenaude, A.-M., Dziarmaga, A. J., Quinlan, J., Mohamed, O., Dufort, D. und Goodyer, P. R. Canonical WNT signaling during kidney development. In: *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 293.2 (2007), F494–F500.
- [162] Karner, C. M., Das, A., Ma, Z., Self, M., Chen, C., Lum, L., Oliver, G. und Carroll, T. J. Canonical Wnt9b signaling balances progenitor cell expansion and differentiation during kidney development. In: *Development* 138.7 (2011), S. 1247–1257.
- [163] Lyons, J. P., Miller, R. K., Zhou, X., Weidinger, G., Deroo, T., Denayer, T., Park, J.-I., Ji, H., Hong, J. Y., Li, A. u. a. Requirement of Wnt/ β -catenin signaling in pronephric kidney development. In: *Mechanisms of development* 126.3 (2009), S. 142–159.
- [164] Schneider, J., Arraf, A. A., Grinstein, M., Yelin, R. und Schultheiss, T. M. Wnt signaling orients the proximal-distal axis of chick kidney nephrons. In: *Development* 142.15 (2015), S. 2686–2695.
- [165] Luyten, A., Su, X., Gondela, S., Chen, Y., Rompani, S., Takakura, A. und Zhou, J. Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 21.9 (2010), S. 1521–1532.
- [166] Lancaster, M. A. und Gleeson, J. G. Cystic kidney disease: the role of Wnt signaling. In: *Trends in molecular medicine* 16.8 (2010), S. 349–360.
- [167] Heisenberg, C.-P., Houart, C., Takeuchi, M., Rauch, G.-J., Young, N., Coutinho, P., Masai, I., Caneparo, L., Concha, M. L., Geisler, R. u. a. A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. In: *Genes & Development* 15.11 (2001), S. 1427–1434.
- [168] Kim, C.-H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Artinger, K. B., Chandrasekharappa, S. C., Driever, W. und Chitnis, A. B. Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. In: *Nature* 407.6806 (2000), S. 913–916.
- [169] Cho, S.-H. und Cepko, C. L. Wnt2b/ β -catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye. In: *Development* 133.16 (2006), S. 3167–3177.
- [170] Kubo, F., Takeichi, M. und Nakagawa, S. Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. In: *Development* 130.3 (2003), S. 587–598.
- [171] Jin, E.-J., Burrus, L. W. und Erickson, C. A. The expression patterns of Wnts and their antagonists during avian eye development. In: *Mechanisms of development* 116.1 (2002), S. 173–176.
- [172] Jasoni, C., Hendrickson, A. und Roelink, H. Analysis of chicken Wnt-13 expression demonstrates coincidence with cell division in the developing eye and is consistent with a role in induction. In: *Developmental dynamics* 215.3 (1999), S. 215–224.

- [173] Kubo, F., Takeichi, M. und Nakagawa, S. Wnt2b inhibits differentiation of retinal progenitor cells in the absence of Notch activity by downregulating the expression of proneural genes. In: *Development* 132.12 (2005), S. 2759–2770.
- [174] Gallina, D., Palazzo, I., Steffenson, L., Todd, L. und Fischer, A. J. Wnt/ β -catenin-signaling and the formation of Müller glia-derived progenitors in the chick retina. In: *Developmental neurobiology* 76.9 (2016), S. 983–1002.
- [175] Jidigam, V. K. und Gunhaga, L. Development of cranial placodes: insights from studies in chick. In: *Development, growth & differentiation* 55.1 (2013), S. 79–95.
- [176] Grocott, T., Johnson, S., Bailey, A. P. und Streit, A. Neural crest cells organize the eye via TGF- β and canonical Wnt signalling. In: *Nature communications* 2 (2011), S. 265.
- [177] Fokina, V. M. und Frolova, E. I. Expression patterns of Wnt genes during development of an anterior part of the chicken eye. In: *Developmental dynamics* 235.2 (2006), S. 496–505.
- [178] Traboulsi, E. I. Ocular manifestations of familial adenomatous polyposis (Gardner syndrome). In: *Ophthalmology clinics of North America* 18.1 (2005), S. 163–6.
- [179] Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J. L. und Müller, U. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. In: *The American Journal of Human Genetics* 74.3 (2004), S. 558–563.
- [180] Wu, D. K. und Oh, S.-H. Sensory organ generation in the chick inner ear. In: *The Journal of neuroscience* 16.20 (1996), S. 6454–6462.
- [181] Robledo, R. F. und Lufkin, T. Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are required for specification of the mammalian vestibular apparatus. In: *Genesis* 44.9 (2006), S. 425–437.
- [182] Hedgepeth, C. M., Conrad, L. J., Zhang, J., Huang, H.-C., Lee, V. M. und Klein, P. S. Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. In: *Developmental biology* 185.1 (1997), S. 82–91.
- [183] Wilkie, A. O. und Morriss-Kay, G. M. Genetics of craniofacial development and malformation. In: *Nature Reviews Genetics* 2.6 (2001), S. 458–468.
- [184] Gerlach, L. M., Hutson, M. R., Germiller, J. A., Nguyen-Luu, D., Victor, J. C. und Barald, K. F. Addition of the BMP4 antagonist, noggin, disrupts avian inner ear development. In: *Development* 127.1 (2000), S. 45–54.
- [185] Lawoko-Kerali, G., Rivolta, M. N. und Holley, M. Expression of the transcription factors GATA3 and Pax2 during development of the mammalian inner ear. In: *Journal of Comparative Neurology* 442.4 (2002), S. 378–391.
- [186] Riccomagno, M. M., Martinu, L., Mulheisen, M., Wu, D. K. und Epstein, D. J. Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic hedgehog. In: *Genes & development* 16.18 (2002), S. 2365–2378.

- [187] Schaefer, S. A., Higashi, A. Y., Loomis, B., Schrepfer, T., Wan, G., Corfas, G., Dressler, G. R. und Duncan, R. K. From otic induction to hair cell production: Pax2EGFP cell line illuminates key stages of development in mouse inner ear organoid model. In: *Stem cells and development* 27.4 (2018), S. 237–251.
- [188] Burton, Q., Cole, L. K., Mulheisen, M., Chang, W. und Wu, D. K. The role of Pax2 in mouse inner ear development. In: *Developmental biology* 272.1 (2004), S. 161–175.
- [189] Bouchard, M., Caprona, D. de, Busslinger, M., Xu, P. und Fritzsich, B. Pax2 and Pax8 cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation. In: *BMC developmental biology* 10.1 (2010), S. 89.
- [190] Christophorou, N. A., Mende, M., Lleras-Forero, L., Grocott, T. und Streit, A. Pax2 coordinates epithelial morphogenesis and cell fate in the inner ear. In: *Developmental biology* 345.2 (2010), S. 180–190.
- [191] Zou, D., Silviu, D., Rodrigo-Blomqvist, S., Enerbäck, S. und Xu, P.-X. Eya1 regulates the growth of otic epithelium and interacts with Pax2 during the development of all sensory areas in the inner ear. In: *Developmental biology* 298.2 (2006), S. 430–441.
- [192] Zou, D., Silviu, D., Fritzsich, B. und Xu, P.-X. Eya1 and Six1 are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes. In: *Development* 131.22 (2004), S. 5561–5572.
- [193] Ahmed, M., Xu, J. und Xu, P.-X. EYA1 and SIX1 drive the neuronal developmental program in cooperation with the SWI/SNF chromatin-remodeling complex and SOX2 in the mammalian inner ear. In: *Development* 139.11 (2012), S. 1965–1977.
- [194] Abdelhak, S., Kalatzis, V., Heilig, R., Compain, S., Samson, D., Vincent, C., Weil, D., Cruaud, C., Sahly, I., Leibovici, M. u. a. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family.. In: *Nature genetics* 15.2 (1997), S. 157–164.
- [195] Fraser, F., Sproule, J., Halal, F. und Optiz, J. M. Frequency of the branchio-oto-renal (BOR) syndrome in children with profound hearing loss. In: *American journal of medical genetics* 7.3 (1980), S. 341–349.
- [196] Ruf, R. G., Xu, P.-X., Silviu, D., Otto, E. A., Beekmann, F., Muerb, U. T., Kumar, S., Neuhaus, T. J., Kemper, M. J., Raymond, R. M. u. a. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1–SIX1–DNA complexes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.21 (2004), S. 8090–8095.

Die Publikation findet sich unter:

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163610>

Eckei, Gesa, et al. "Expression pattern of Axin2 during chicken development." *PloS one* 11.9 (2016): e0163610.

Anteile

Hiermit erkläre ich an der Verfassung und Publikation des vorliegenden Artikels zu folgenden Anteilen beteiligt gewesen zu sein:

Konzeption 20%,

Erhebung und Analyse der Daten 75%,

Verfassung des Artikels 80%

Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Beate Brand-Saberi bedanken, für ihr Vertrauen, ihre freundliche Unterstützung und Betreuung. Ohne ihre erfahrene Supervision wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank an das FORUM-Programm der medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum deren Stipendium des strukturierten Promotionsprogramms mich während meiner experimentellen Arbeit finanziell unterstützt hat.

Ich danke auch dem Team der Abteilung für Anatomie und molekulare Embryologie. Ich durfte während der Zusammenarbeit auf ein geschätztes, erfahrenes und offenes Kollegium vertrauen und habe daraus sehr wertvolle Erfahrungen gezogen.

Frau Dr. rer. nat. Marion Boeing danke ich für ihre Hilfe und Erfahrung besonders in der molekularen Biologie ohne die die Grundsteine meiner Arbeit nie hätten gesetzt werden können.

Swantje Wulf und Rana Houmany danke ich vielmals für ihr technisches Wissen, die grundlegenden Prozesse, die sie mir beibrachten und die Arbeitszeit, die sie für mich investierten, als ich selbst sie nicht aufbringen konnte.

Ganz besonderer Dank gilt darüber hinaus Dr. rer. nat. Gabriela Morosan-Puopolo für die aufopfernde Hilfe und Unterstützung, die Begeisterung, die sie immer wieder in mir zu entfachen wusste, und die unermüdliche Motivation. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können.

Gesa Ecke

Geburtsdatum 06/01/1993
Geburtsort Fröndenberg

Akademische Laufbahn

Seit Januar 2020	Weiterbildung zur Fachärztin der Kinderchirurgie im Klinikum Dortmund
Dezember 2019	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Approbation
Oktober 2018	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
September 2016	Publikation: Ecke, Gesa, et al. "Expression Pattern of Axin2 During Chick- en Development." PloS one 11.9 (2016): e0163610.
Dezember 2014	Ruhr-Universität-Bochum, Stipendiatin des FORUM – Programmes der medizinischen Fakultät, Promotionsprogramm
seit September 2014	Arbeit an einer experimentellen Dissertation in der Abteilung für molekulare Embryologie des Institutes für Anatomie der Ruhr-Universität-Bochum
August 2014	Physikum, erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit September 2012	Ruhr-Universität-Bochum, Medizinstudium
Juni 2012	Ernst Barlach Gymnasium Unna, Hochschulzugangsberechtigung, Abitur

Praktisches Jahr

07/2019 - 10/2019	Pflichttertial Innere Medizin, Knappschafts Krankenhaus Dortmund
03/2019 - 06/2019	Wahltertial Kinderchirurgie, Klinikum Dortmund, Klinik für Kinderchirurgie und Kinderurologie
11/2018 - 03/2019	Pflichttertial Chirurgie, St. Josef Hospital Bochum, Allgemein- und Viszeralchirurgie

Referenzen

Auf Anfrage

Gesa Ecke