

Aus dem Institut für Tieranatomie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tieranatomie II
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

**Relative Quantifizierung vaskulogenese- und angiogeneseassoziiierter
Wachstumsfaktoren der frühen Embryonalentwicklung des Huhns (*Gallus
gallus domesticus*) mittels der *real-time* RT-PCR**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärbiologischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Friedrich Nützel
aus
München

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.- Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.- Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz

Koreferent: Prof. Dr. M. El-Matbouli

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Inhaltverzeichnis

Inhaltverzeichnis.....	1
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Das Hühnerei als Modellsystem in der Entwicklungsbiologie.....	3
2.1.1 Allgemeines zum Modellsystem	3
2.1.2 Die frühe Embryonalentwicklung	4
2.1.3 Die Ontogenese der amniotischen Fruchthüllen.....	7
2.1.4 Die embryonale Hämatopoiese	10
2.2 Ausgewählte Botenstoffe der Blut- und Gefäßbildung	13
2.2.1 Allgemeines	13
2.2.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seine Rezeptoren Flk-1 und Flt-1	14
2.2.3 Stem Cell Factor (SCF) und sein Rezeptor c-kit.....	15
2.2.4 Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin).....	15
2.2.5 Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)	16
2.2.6 Angiopoietin-1 (Ang-1).....	17
2.2.7 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) und Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)	17
2.3 Transkriptom und Proteom	18
2.4 Die quantitative <i>real-time</i> Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (<i>real-time RT-PCR</i>).....	20
2.4.1 Allgemeines zur Methode	20
2.4.2 Der experimentelle Aufbau der Nukleotidquantifizierung	23
2.4.3 Nukleotidisolierung aus tierischem Gewebe	24
2.4.4 Reverse Transkription (RT) von Nukleotiden zur cDNA- Erststrangsynthese.....	26
2.4.5 Relative Nukleotidquantifizierung mittels <i>real-time RT-PCR</i>	27
2.4.6 Rechnergestützte Datenauswertung	29
2.4.6.1 Amplifikationseffizienz.....	29
2.4.7 Normalisierung	30

3	Material und Methoden.....	32
3.1	Probengewinnung	32
3.1.1	Untersuchungsmaterial.....	32
3.1.2	Probenexzision und Probenkonservierung	33
3.2	RNA-Isolation, DNase-Verdau und Spektrophotometrie	34
3.3	Reverse Transkription (cDNA-Erststrangsynthese)	36
3.4	Oligonukleotidkonstruktion	38
3.5	Qualitative PCR und Agarosegelelektrophorese	40
3.6	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR	43
3.7	Schmelzkurvenanalyse	50
3.8	Rechnergestützte Datenauswertung.....	52
3.8.1	Normalisierung, relative Quantifizierung und statistische Auswertung mittels des <i>Q-Gene</i> Computerprogramms	52
3.8.2	Ermittlung der Amplifikationseffizienz mittels des <i>LinRegPCR</i> - Computerprogramms.....	54
3.9	Ampliconaufreinigung und Ampliconansequenzierung	54
4	Ergebnisse	56
4.1	RNA-Isolation, Reverse Transkription und qualitative PCR	56
4.2	<i>real-time</i> RT-PCR	57
4.2.1	Quantifizierungsreaktion	57
4.2.2	Schmelzkurvenanalyse.....	59
4.2.3	Rechnergestützte Datenauswertung	61
4.2.3.1	Relative Quantifizierung	61
4.2.3.1.1	Relative Quantifizierung zweier Entwicklungszeitpunkte eines Zielgewebes zueinander	63
4.2.3.1.1.1	Entwicklungszeitpunkt E1 zu E0	63
4.2.3.1.1.2	Entwicklungszeitpunkt E2 zu E1	64
4.2.3.1.1.3	Entwicklungszeitpunkt E3 zu E2	66
4.2.3.1.1.4	Entwicklungszeitpunkt E4 zu E3	68
4.2.3.1.1.5	Entwicklungszeitpunkt E5 zu E4	70
4.2.3.1.1.6	Entwicklungszeitpunkt E6 zu E5	72
4.2.3.1.1.7	Entwicklungszeitpunkt E7 zu E6	74

4.2.3.1.2	Relative Quantifizierung zweier Zielgewebe eines Entwicklungszeitpunkts zueinander	75
4.2.3.1.2.1	Entwicklungszeitpunkt E2: Embryo zu Dottersack	76
4.2.3.1.2.2	Entwicklungszeitpunkt E3: Embryo zu Dottersack	77
4.2.3.1.2.3	Entwicklungszeitpunkt E4: Allantois zu Dottersack	78
4.2.3.1.2.4	Entwicklungszeitpunkt E5: Allantois zu Dottersack	79
4.2.3.1.2.5	Entwicklungszeitpunkt E6: Allantois zu Dottersack	80
4.2.3.1.2.6	Entwicklungszeitpunkt E7: Allantois zu Dottersack	81
4.2.3.1.3	Übersicht über die Ergebnisse aus der relativen Quantifizierung	81
4.2.3.2	Berechnung der Amplifikationseffizienz	84
4.3	Ampliconansequenzierung.....	91
5	Diskussion.....	92
6	Zusammenfassung.....	100
7	Summary.....	102
8	Literaturverzeichnis	104
9	Anhang.....	135
9.1	Verwendete Oligonukleotide	135
9.2	<i>real-time</i> RT-PCR Daten	138
9.3	PCR-Fragment-Ansequenzierungsdaten	152
9.4	Abkürzungsverzeichnis	165
10	Danksagung	167
11	Lebenslauf.....	168

1 Einleitung

Organismen müssen, im Gegensatz zu teleologisch konstruierten Maschinen, schon während ihrer Entwicklung funktionieren, i.e. leben. Daher ist die Ausbildung eines Gefäßsystems zum Zweck eines gerichteten, über einfache Diffusion hinausgehenden Nährstoff- und Atemgastransports für den heranwachsenden Hühnerembryo eine frühzeitige Notwendigkeit.

Dementsprechend lassen sich bereits zu Beginn des zweiten Bebrütungstag im Stadium acht nach Hamburger und Hamilton (8 HH, Hamburger & Hamilton 1951) Blutinseln in der *Area opaca* des Blastoderms nachweisen (Bellairs & Osmond 1998), Blut- und Gefäßzellen gehören zu den ersten ausdifferenzierten Zellen, sowie das Herz zum ersten funktionellen Organ des Embryos.

Gemäß dem zentralen Dogma des biologischen Informationsflusses von der DNA über die RNA zum Protein (Crick 1970), sollten solche phänotypisch beobachteten Merkmale ihre proximalen Ursachen in einer differentiellen Genexpression haben und sich also in Qualität und Quantität des mRNA-Gehalts der verschiedenen embryonalen Gewebe und Organe nachweisen lassen. Das sog. Transkriptom, also die Transkription von Genen einer bestimmten Auswahl des Genoms nach einem räumlichen und zeitlichen Muster und mit einer bestimmten Intensität, und deren darauffolgende Translation zum Proteom als Gesamtheit der zellulären Proteine, stellen den zentralen Aspekt der Zelldifferenzierung in der Ontogenese dar, wie dies schon 1928 von T.H. Morgan in seiner Theorie der differentiellen Genaktivität beschrieben wurde. Die Möglichkeit ein solches Transkriptionslevel der Menge nach, also quantitativ, zu erfassen, ist ein zentraler Ansatz bei der Frage nach der Genfunktion (Zamorano et al. 1996).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine molekularbiologische Beschreibung des Transkriptionsprofils (Shih et al. 2002) verschiedener bekannter vaskulo- und angiogener Botenstoffe in den Geweben der extraembryonalen Vaskulo- und Angiogenese des Hühnerembryos zu geben, wodurch sich proliferative und evtl. auch differenzierende Abläufe der Blutzell- und Blutgefäßentwicklung erfassen und zeitlich eingrenzen lassen sollten. Hierzu wurde auf die Methode der quantitativen *real-time* RT-PCR zurückgegriffen, mittels derer die Menge eines bestimmten Transkripts in einer zuvor entsprechend prozessierten Gewebeprobe bestimmt

werden kann (Bustin 2000). Im Verlauf der ersten sieben Entwicklungstage (E0-E7) wurden Gewebeprobe von den primitiven, extraembryonalen blutbildenden Organen, dem Dottersack und der Allantois bzw. der Chorioallantois (Caprioli et al. 1998, 2001), genommen und anhand der oben erwähnten molekularbiologischen Methode auf ihren mRNA- und rRNA-Gehalt hin untersucht. Diese Daten ermöglichten eine vergleichende Quantifizierung, so dass die transkriptionelle Aktivität und somit näherungsweise auch der zeitliche Verlauf der Genexpression der untersuchten Botenstoffe beschrieben werden konnte. Auf diese Weise sollte ein Genexpressionsprofil von vaskulo- bzw. angiogeneseassoziierten Cytokinen für die primitive Hämangiopoese des Hühnerembryos erstellt werden, wie dies auch schon für andere Modelle unternommen wurde (Shih et al. 2002). Die deskriptiven Erkenntnisse dieser Arbeit könnten sich in weiteren Untersuchungen zur Aufklärung von Kausalzusammenhängen zwischen molekulargenetischen Ursachen und phänotypischen Auswirkungen als hilfreich erweisen, was nicht zuletzt das Verständnis pathologischer Vaskulo- und Angiogeneseprozesse verbessern könnte.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Hühnerei als Modellsystem in der Entwicklungsbiologie

2.1.1 Allgemeines zum Modellsystem

Seine weite Verbreitung als landwirtschaftliches Nutztier, die extrauterine Entwicklung des Keims auf einer großen Dottermasse und die einfache Charakterisierung der Entwicklungsstadien innerhalb der raschen, dreiwöchigen Ontogenese prädestinierten das Hühnerei als Objekt der ersten embryologischen Studien in der Antike.

Seit den Untersuchungen von Aristoteles im 4. Jahrhundert v. Chr. stellt das Hühnerei somit eines der am besten charakterisierten Systeme zur Erforschung der tierischen Ontogenese dar. 1651 war es William Harvey, der als erster das Blastoderm des Hühnerembryos als solches ansprechen konnte und in seinem Werk "*On the Generation of Living Creatures*" mit dem Leitspruch "*Ex ovo omnia*" die Urzeugung von Leben aus unbelebter Materie ausschloss. Schließlich unternahm Marcello Malpighi 1672 die erste mikroskopische Untersuchung der Entwicklung des Hühnerembryos und identifizierte erstmalig die Neuralfurche, die Somiten sowie die Dottersackgefäße. Auch in der Diskussion zwischen den Anhängern der Epigenesis und der Präformationslehre stellte das Hühnerei ein beliebtes Modellsystem dar und 1767 war es Kaspar Friedrich Wolff, der mit seinen Beobachtungen zur Entwicklung des Darmrohrs und Herzens die *de novo* Entwicklung von Organen aus ungeformtem Gewebe beweisen konnte. In der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts zeigte sich anhand der Arbeiten von Christian Pander, Karl Ernst von Baer und Heinrich Rathke, dass die Praeformationstheorie nicht mehr haltbar war, nicht zuletzt da Pander als erster die drei Keimblätter des Hühnerembryos als solche erkannte und auch ihr organogenetisches Potential realisierte. Auch von Baer arbeitete mit Hühnerembryonen, welche er mit den Embryonen anderer Wirbeltiere verglich. Als Ergebnis seiner Studien formulierte er vier Prinzipien, die auf ein gemeinsames Grundmuster der Wirbeltierontogenese hinweisen.

Auf Grund seiner einfachen Handhabung ist das Hühnerei somit zu einem der Modellsysteme der Wirbeltierembryologie geworden. Auch zum Studium des Entwicklungsschicksals von Zellen und Geweben erwies sich das System Hühnerembryo als sehr geeignet. Die enge phylogenetische Verwandtschaft zur japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) und die damit sehr ähnliche Embryonalentwicklung ermöglichte die Erzeugung von interspezifischen Mischwesen, sog. chimären Embryonen, bei denen eine Gewebeprobe eines Wachtelembryos in einen Hühnerembryo substitutiv *in ovo* transplantiert wird. Das Entwicklungsschicksal der Wachtelzellen im Hühnerembryo lässt sich anhand des einzelnen dunklen Nucleolus dieser Zellen selektiv verfolgen. Bei der Erforschung der ontogenetischen Zellmigration als einem der wichtigsten Prinzipien der Embryonalentwicklung der Metazoa, spielte das Modellsystem Huhn ebenfalls eine wichtige Rolle und die ersten Erkenntnisse über die Auswanderung von Melanozyten aus der Neuralleiste wurden am Hühnerembryo gewonnen (Rawles 1940, Ris 1941). Das oben erwähnte Grundmuster der Vertebratenentwicklung ermöglicht es, diese Erkenntnisse, welche an Modellorganismen anderer Wirbeltierklassen, wie z. B. dem Zebrafisch (*Danio rerio*) als Vertreter der Knochenfische oder dem Huhn (*Gallus gallus domesticus*) als Vertreter der Sauropsiden, gewonnen wurden, in die medizinisch-pharmazeutische Forschung einzubringen und letztlich neben dem reinen Erkenntnisgewinn einen therapeutischen Nutzen zu erzielen.

2.1.2 Die frühe Embryonalentwicklung

Die paraphyletische Wirbeltierklasse der Vögel (*Aves*) wird zusammen mit den Kriechtieren (*Reptilia*) in der monophyletischen Gruppe der Sauropsiden geführt, die wiederum zusammen mit den Säugetieren (*Mammalia*) die Gruppe der Amnioten bildet. Diesem engen phylogenetischen Zusammenhang entsprechend weisen diese systematischen Klassen eine ähnliche Ontogenese im Hinblick auf die Gastrulation auf, die durch das Auftreten des Primitivstreifens gekennzeichnet ist. Im Unterschied zum sekundär dotterarmen Ei der Säuger handelt es sich beim Sauropsidenei um ein polytelolecithales Ei, welches discoidal und meroblastisch gefurcht wird. Die ersten Furchungsteilungen unterteilen die Keimscheibe in ein einschichtiges Blastoderm, in dem die Zellen auf Grund der unvollständigen Natur der Teilungen untereinander und mit dem Dotterzytoplasma ein Kontinuum bilden. Hierauf bewirken äquatoriale und

vertikale Furchungen die Umbildung des Blastoderms in ein fünf- bis sechsschichtiges Gewebe, in welchem die Zellen durch Verschlusskontakte (*Zonulae occludentes*) ionendicht miteinander verbunden werden (Bellairs et al. 1975, Eyal-Giladi 1991). Die Zellen des Blastoderms absorbieren hierauf Wasser vom umgebenden Eiweiß (*Albumen*) und sezernieren dieses zwischen sich und die Dottermasse, wodurch die sog. Subgerminalhöhle entsteht. Durch apoptotischen Zelltod entsteht aus dem mehrschichtigen Blastoderm die einschichtige *Area pellucida*, welche später den größten Anteil des eigentlichen Embryos bilden wird und von der mehrschichtigen, mit intrazellulären Dottervesikeln angefüllte und daher trüb erscheinenden *Area opaca* umgeben wird. Zwischen diesen beiden Abschnitten befindet sich die sog. Marginalzone (Eyal-Giladi 1997, Arendt & Nübler-Jung 1999). Diese ersten Furchungsteilungen erfolgen nach der Befruchtung bereits im Eileiter, sodass die Keimscheibe nach ihrer ca. 24-stündigen Passage durch den Genitaltrakt des Huhns aus ca. 20 000 Zellen besteht. Das entspricht im Mittel ca. einer Mitose alle 1,6 Stunden und somit einem für eine eukaryontische Zelle äußerst raschen Zellzyklus. Die an der Oberfläche verbleibenden Zellen der *Area pellucida* bilden den Epiblasten, während andere Zellen delaminieren und in die Subgerminalhöhle wandern, um dort den Hypoblasten auszubilden. Somit ist ein zweischichtiges, aus Epi- und Hypoblast bestehendes und das Blastocoel umschließendes Blastoderm entstanden. Die drei Keimblätter des Vogelembryonen werden dabei ausschließlich vom Epiblasten gebildet (Rosenquist 1972). Die Zellen des Hypoblasten haben lediglich Anteil an der Ausbildung der extraembryonalen Membranen, v.a. des Dottersacks. Der Beginn der Gastrulation ist gekennzeichnet durch das Auftreten des Primitivstreifens, einer als Verdickung des Epiblasten im Bereich der posterioren Marginalzone in Erscheinung tretenden Struktur, die sich durch einen Prozess, der als konvergente Extension bezeichnet wird, nach anterior ausbreitet. Dabei wird die Primitivfurche gebildet und an deren anteriorem Ende als Verdickung der Primitivknoten (Hensen Knoten), durch dessen trichterförmige Einsenkung migrierende Zellen in das Blastocoel migrieren können und dabei eine Epithel-zu-Mesenchymtransformation durchmachen. Die Primitivfurche ist somit das funktionelle Äquivalent zum Urmund der Amphibiengastrula und der Primitivknoten zu deren dorsaler Urmundlippe. Durch den Primitivstreifen werden die Achsen des Embryos festgelegt. Er breitet sich von posterior nach anterior aus, Zellen durchwandern ihn von dorsal nach ventral und er stellt die bilateralsymmetrische Körperachse dar.

Zellen des Epiblasten lösen ihre Basallamina auf, lösen sich aus dem Epithelverband und wandern im Rahmen einer Epithel-zu-Mesenchymtransformation durch den Primitivstreifen in das Innere des Embryonen um dort die entodermale und mesodermale Gewebe zu bilden.

Zu diesen interkalierend wandernden Zellen gehört auch eine Zellpopulation, welche sich, nachdem sie in das Blastocoel eingewandert ist, in zwei Schichten anordnet. Die Zellen der unteren Schicht verdrängen den Hypoblasten zur Seite und bilden schließlich sämtliche entodermale Organe des Embryos, sowie zusammen mit dem Hypoblasten die extraembryonalen Membranen. Von der oberen, lockeren Zellschicht gehen die mesodermale Organe des Embryos aus, sowie das, den extraembryonalen Membranen entweder am Ektoderm als Somatopleura oder am Entoderm als Splanchnopleura anliegende Mesoderm. Das Somatopleura beteiligt sich in der Folge am Aufbau von Amnion und Chorion, das Splanchnopleura am Aufbau von Allantois und Dottersack. Der Primitivstreifen wandert nunmehr, nachdem er ca. 24 h nach der Fertilisation seine maximale anteriore Ausdehnung erreicht hat, nach posterior und legt auf seinem Weg die *Chorda dorsalis* an. Die Einwanderung von zukünftigen entodermalen und mesodermalen Zellen ist nun abgeschlossen und der Epiblast besteht jetzt vollständig aus zukünftig ektodermalen Zellen. Diese beginnen unter starker Proliferation und anschließender Migration, in einem Epibolie genannten Prozess, die Dottermasse zu umschließen. Nach vollzogener Gastrulation haben sich die drei Keimblätter aus dem Epiblasten differenziert und sich solchermaßen zueinander angeordnet, dass sie ihr organogenetisches Potential entfalten können: Das Entoderm hat sich, indem es den Hypoblasten nach lateral verdrängt hat, auf die Dottermasse gelegt und beginnt ebenfalls diese zu umwachsen. Das Ektoderm ist, als einzige nicht über den Primitivstreifen eingewanderte Zellpopulation, an der Oberfläche des Embryo verblieben, wo es den epidermalen Anteil des Integument bilden wird und über die Neurulation die Nervenzellen und die diversen Neuralleistenderivate. Zwischen diesen beiden, in erster Linie epitheliale Anteile ausbildenden Keimblättern, kommt das Mesoderm mit seinen beiden Anteilen, den Somiten samt Somitenstielen und dem Seitenplattenmesoderm zu liegen. Die Somiten, in deren Anlage die ursprüngliche Metamerie der Wirbeltiere deutlich zum Ausdruck kommt, differenzieren sich zu Dermatome, Myotome und Sklerotome und bewirken so die Ausbildung der Dermis, der Skelettmuskulatur und des knorpeligen Primordialskeletts

respektive. Das Seitenplattenmesoderm spaltet sich in zwei Schichten, das somatische (parietale) und das splanchnische (viszerale) Mesoderm und umschließt so das Coelom. Während sich das somatische Blatt von innen an das Ektoderm anlegt und so das Somatopleura entsteht, welches die mesodermalen Anteile der Körperwand exklusive Dermis und Skelettmuskulatur bildet, legt sich das splanchnische Blatt von außen dem Entoderm an und bildet als Splanchnopleura Herz, Blut- und Lymphgefäße sowie die Blutzellen.

2.1.3 Die Ontogenese der amniotischen Fruchthüllen

Da Biomoleküle, allen voran die Proteine, zur Ausbildung ihrer nativen Struktur Wasser benötigen, ist das Leben ein Prozess, der ausschließlich in wässriger Lösung beobachtet werden kann.

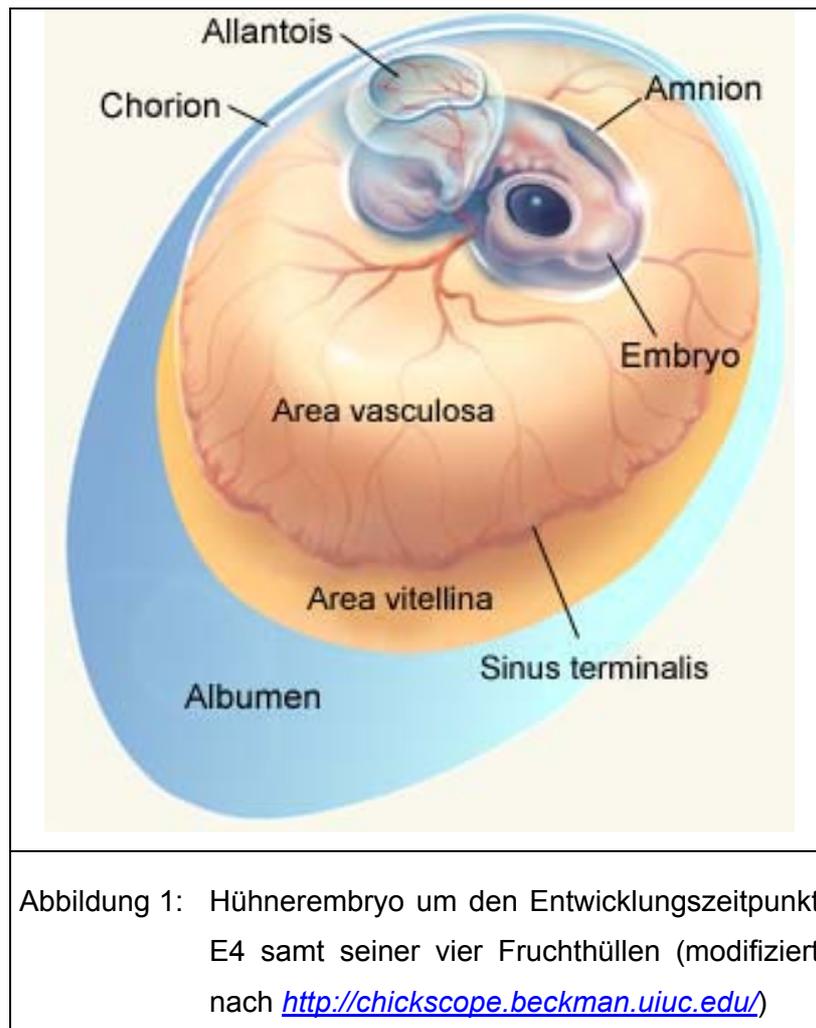
Die evolutive Neuerung der ersten Amnioten, der Reptilien, kalzifizierte Eier auszubilden, in welchen neben dem Embryo ein Satz von vier extraembryonalen Hüllen die metabolischen Bedürfnisse der heranwachsenden Frucht befriedigt, ermöglichte eine vom abiotischen Umweltfaktor Wasser weitgehend unabhängige Eroberung terrestrischer ökologischer Nischen.

Der Hypoblast und Anteile des Epiblasten stellen dabei das Zellmaterial zum Aufbau dieser Hüllen und beim E2-Hühnerembryo lässt sich bereits eine, durch die ungleiche Teilung von Epithelien bewirkte (Miller et al. 1994, 1999), Abfaltung des Embryos vom zukünftigen extraembryonalen Anteil erkennen. Es handelt sich dabei um Erweiterungen von entodermalen bzw. ektodermalen Epithelien, welche von Seitenplattenmesoderm unterlagert sind. Die epithelialen Anteile stellen hierbei die funktionalen Oberflächen, während der mesodermale Anteil die Kreislaufanbindung bewerkstelligt. Der epitheliale Anteil von Amnion und Chorion wird vom Ektoderm gestellt, wobei die Faltungsprozesse, die zu Beginn des dritten Entwicklungstages starten, bewirken, dass das Ektoderm im Amnion dem Embryo zugekehrt ist und im Chorion von ihm abgewendet liegt. Das Amnion mit der Amnionhöhle dient dem Embryo als unmittelbare Entwicklungsumgebung, wobei die vom Epithel sezernierte amniotische Flüssigkeit (*Liquor amnii*) einer Austrocknung vorbeugt und mechanischem Stress eine träge, bremsende Masse entgegensetzt. Das Amnion weist als einzige der vier Fruchthüllen keine Blutgefäße auf, was auf den fehlenden

Entodermkontakt in der Ausbildungsphase zurückgeführt wird (Pardanaud & Dieterlen-Lievre 1993).

Die äußerste Fruchthülle, das Chorion, welches in der Phylogenese der Säuger zur *Pars fetalis* der Plazenta umfunktioniert wurde, entwickelt sich aus den äußeren Schichten der Amnionfalte. Seine mesodermalen und ektodermalen Anteile breiten sich über den gesamten Embryo und die Dotterkugel aus und umschließen diese zuletzt, sodass sie in der Chorionhöhle (extraembryonales Coelom) zu liegen kommen. Das Chorion liegt bei den Sauropsiden den Eihäuten und der Kalkschale an und dient, beim Huhn in enger struktureller wie auch funktioneller Verknüpfung mit der gut vaskularisierten Allantois, dem respiratorischen Gasaustausch (Romanoff 1960).

Der Dottersack, welcher sich aus der *Area opaca* ableitet, wird gebildet durch die Umwachsung der Dottermasse durch das Entoderm und letztlich auch durch das splanchnische Mesoderm. Mit dem Dottersackstiel bzw. -gang (*Ductus omphalomesentericus*) besitzt er eine Verbindung zum Darm. Er ist die erste funktionsfähige Fruchthülle und dient den Sauropsiden der *in ovo*-Ernährung, wobei zu Aminosäuren verdautes Dotterprotein, bestehend v.a. aus Lipovitellinen und Phosvitin, über den Blutstrom in der *Vena omphalomesenterica* zum Embryo transportiert wird. Ein Transport von Dotter über den Dottersackgang findet nicht statt. Um E2 ist der Dottersack außerdem Bildungsstätte von Blutinseln im Rahmen der extraembryonalen Vaskulogenese und ca. 48 h nach der Eiablage haben sich diese Blutinseln zu einem primären Kapillarplexus organisiert, der bereits Anschluss an das embryonale Gefäßsystem besitzt (Bellairs & Osmond 1998). Dieser vaskularisierte, proximale Anteil des Dottersacks wird als *Area vasculosa* bezeichnet. Der *Sinus terminalis* trennt als deutliches Randgefäß diesen Bereich von der gefäßfreien *Area vitellina* und zeigt gleichzeitig die maximale distale Ausdehnung des Seitenplattenmesoderms an (s. Abb. 1).



Die Allantois, die ihren Namen von dem griechischen Wort *allantoeid* (schlauchförmig) hat, bildet sich, beim Huhn um E3 (18 HH), als entodermale Ausstülpung mit Mesodermüberzug aus dem embryonalen Enddarm (engl.: posterior intestinal portal, PIP) und wächst als Bläschen in das extraembryonale Coelom der Chorionhöhle aus, um schließlich zwischen den Entwicklungszeitpunkten E4 und E5 herum mit dem Chorion zur Chorioallantois zu verschmelzen (Sethi & Brookes 1970). Diese Fusion findet in den folgenden Entwicklungstagen in vollem Umfang des Eies statt und um E16 bedeckt die Chorioallantois auch den größten Teil des Dottersacks und verschmilzt auch teilweise mit ihm (Romanoff 1960). Bei der Ausbildung der Chorioallantois kommt es zur Assoziation des splanchnischen Mesoderms der Allantois mit dem parietalen Mesoderm des Chorion unter lokaler Rückbildung des extraembryonalen Coeloms. Somit besteht die Chorioallantois aus Anteilen aller drei Keimblätter. Neben ihrer Funktion als Auffangorgan für die toxischen Endprodukte des N-Stoffwechsels, dient sie im Verbund mit dem Chorion als Chorioallantois

(Allantochorion) als respiratorische Oberfläche und auch der Mobilisierung von Ca^{2+} aus der Kalkschale zum Zwecke der Biomineralisation beim Aufbau des definitiven Knochenskeletts (Tuan 1987, Simkiss 1991).

2.1.4 Die embryonale Hämatopoiese

Die ontogenetische Ausbildung des Blutgefäßsystems sowie der Blutzellen steht ganz im Zeichen des Zusammenspiels von Seitenplattenmesoderm und Entoderm, welche zusammen das Splanchnopleura darstellen. Man geht von einer gemeinsamen Vorläuferzelle der Endothel- und Blutzellen aus, dem Hämangioblasten. Dieser entstammt dem Mesoderm, kann allerdings lediglich vom Entoderm induziert werden (Pardanaud & Dieterlen-Lievre 1993). Auf das Vorkommen einer solchen Vorläuferzelle mit einem zweifachen Entwicklungspotential weisen mehrere Untersuchungsergebnisse hin. Zum einen exprimieren Angioblasten und hämatopoetische Stammzellen (HSZ) eine Reihe gemeinsamer Oberflächenantigene und Transkriptionsfaktoren wie etwa SCL/tal-1 (Kallianpur et al. 1994; Sanchez et al. 1999), GATA-2 (Yamamoto et al. 1990; Dorfman et al. 1992), VEGFR-2/flk-1 und Tie-2 (Shalaby et al. 1997; Hamaguchi et al. 1999) und CD34 (Young et al. 1995; Taviani et al. 1996; Wood et al. 1997). Die eingeschränkte Entwicklung sowohl der HSZ als auch der Angioblasten in Fisch-, Amphibien und Säugetierembryonen mit einer einzelnen Mutation (Orkin & Zon 1997) ist ein weiterer Hinweis auf den Ursprung aus einer gemeinsamen Zelllinie. *In vitro* konnte außerdem gezeigt werden, dass eine einzelne Zelllinie sich sowohl zu Endothelzellen als auch zu hämatopoetischen Stammzellen differenzieren kann (Choi et al. 1998). Auch die *in vivo* Produktion von HSZ aus Endothelzellen konnte beim Vogel nachgewiesen werden (Jaffredo et al. 1998, 2000). Während Hämangioblasten, intraembryonalen sowie extraembryonalen Ursprungs, generell dem entodermassozierten Mesoderm, also dem Splanchnopleura, entstammen und sämtliche HSZ sowie das Endothel der visceralen Organe ausbilden, bilden die den Somiten entsprungenen Angioblasten die Endothelauskleidung der Körperwand samt Extremitäten (Pardanaud & Dieterlen-Lievre 1993, 1999; Pardanaud et al. 1996). Lediglich das ektodermassozierte Mesoderm des Somatopleura besitzt kein hämangiogenetisches Potential, wofür das avaskuläre Amnion als Beispiel dienen kann.

Prinzipiell werden zwei Arten der Blutgefäßbildung voneinander unterschieden, die Vaskulogenese, bei der Blutgefäße *de novo* und *in situ* aus mesodermalem Gewebe entstehen und die Angiogenese, bei der es sich um die Erweiterung und Modifikation eines bereits vorhandenen Gefäßsystems handelt. Zu Beginn der Vaskulogenese, wenn der Primitivstreifen seine maximale Ausdehnung erfahren hat (Pardanaud et al. 1987), differenzieren sich Zellen des splanchnischen Mesoderms, durch das Entoderm induziert, zu Hämangioblasten (Shalaby et al, 1997), welche sich daraufhin zu Zellaggregaten verdichten, den sog. Blutinseln. Die inneren, rundlichen Zellen dieser Blutinseln werden zu den HSZ, aus welchen die lymphatischen Stammzellen und über die Blutstammzellen auch sämtliche zelluläre Bestandteile des Blutes hervorgehen. Die äußeren, spindelförmigen Zellen differenzieren sich zu den Angioblasten, welche sich in der zweiten Phase der Vaskulogenese zu den definitiven Endothelzellen (EZ) weiterentwickeln. In der abschließenden dritten Phase bilden die EZ Gefäßröhren, welche sich zu einem Gefäßnetzwerk zusammenschließen, dem sog. primären Kapillarplexus (engl.: primary capillary plexus).

Bei den Amnioten, also den drei Wirbeltierklassen mit extraembryonalen Fruchthüllen, bilden sich solche primären Kapillargeflechte sowohl extraembryonal als auch intraembryonal unabhängig voneinander. In den extraembryonalen Blutinseln des Dottersacks führt die Aggregation der Hämangioblasten, die Differenzierung zu den zentralen, rundlichen HSZ und den peripheren, länggestreckten Angioblasten und schließlich die Assoziation mehrerer solcher Blutinseln zur Ausbildung der Dottersackvenen (*Venae vitellinae*). Hierbei kommt es durch Proliferation, Migration und Endothelzellinteraktion zur Ausbildung von Gefäßröhren mit umliegender Basallamina (Hanahan 1997, Risau 1997). Für das Erlangen eines hämangiopoetischen Potentials scheint der zumindest transiente Kontakt zum Entoderm, wie er im Dottersack gegeben ist, notwendig (Miura & Wilt 1969; Wilt 1965). Bei der Maus konnten durch den Kontakt mit Entoderm sowohl HSZ als auch Endothelzellen induziert werden (Belaoussoff et al. 1998) und im Vogelmodell bewirkte der vorübergehende Kontakt von parietalem Mesoderm oder Somiten mit Entoderm ebenfalls einen hämangiopoetischen Stimulus (Pardanaud & Dieterlen-Lievre 1999). Die Natur dieser, vom Entoderm ausgehenden Induktion ist Gegenstand aktueller Forschung und mit dem diffusiblen Protein VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ist ein Botenstoff identifiziert worden, der zum einen vom

visceralen Entoderm produziert wird (Dumont et al. 1995; Flamme et al. 1995; Wilting et al. 1997; Miquerol et al. 1999), zum anderen schon bei heterozygoten Mutanten zu einem totalen Ausfall der Hämangiopoese im Dottersack führt (Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996). Ebenso wie beim Dottersack handelt es sich bei der Allantois um eine entodermale Ausstülpung des embryonalen Darmrohrs, welche von visceralem Seitenplattenmesoderm überzogen ist. Die Allantois genügt also von ihrem Keimblattaufbau her der prinzipiellen Voraussetzung um ein hämangiopoetisches Potenzial zu besitzen und dieses konnte im Experiment sowohl für die Maus (Downs & Harmann 1997,) als auch für die Wachtel gezeigt werden (Caprioli et al. 1998, Caprioli et al. 2001). Die Gruppe um Caprioli entfernte dazu die Allantoisanlage von Wachtelembryonen bevor die Allantois vaskularisiert worden war und verpflanzte diese in das Coelom von Hühnerembryonen. Im Knochenmark der Hühner konnte daraufhin sowohl HSZ als auch Endothelzellen von Wachteln nachgewiesen werden, was auf eine Produktion von Hämangioblasten durch die Allantois hinweist (Caprioli et al. 1998). Es zeigte sich, dass sich das Gefäßsystem der Allantois aus intrinsischen Vorläuferzellen, also durch Vaskulogenese, entwickelt (Caprioli et al. 1998). Ebenso konnte die Produktion von HSZ nachgewiesen werden (Caprioli et al. 1998) und auch Blutinseln bzw. blutinselähnliche Strukturen konnten identifiziert werden (Caprioli et al. 2001). Das Mesoderm der Allantois bringt also ebenfalls Endothelzellen wie auch HSZ hervor und die Allantois ist somit, mit einer Verzögerung von ca. zwei Tagen, neben dem Dottersack der zweite Ort der extraembryonalen Hämangiopoese (Caprioli et al. 1998, 2001). Diese Population von embryonalen HSZ hat jedoch während der Ontogenese nur vorübergehenden Bestand. Die definitiven HSZ des Adulten entwickeln sich aus mesodermalem Gewebe im Bereich der Aorta und in der Aortenwand (Dieterlen-Lievre & Martin 1981, Cormier & Dieterlen-Lievre 1988). Studien an Wirbeltieren aus verschiedenen Klassen, wie etwa den Säugetieren (Kubai & Auerbach 1983, Godin et al. 1993, Medvinsky et al. 1993), haben dies bestätigt und man spricht in diesem Zusammenhang von der sog. Aorta-Gonaden-Mesonephros Region (AGM). Das intraembryonale Gefäßsystem entsteht aus einzelnen, nicht mit der Bildung von HSZ assoziierten Angioblastenvorläufern, welche sich im splanchnischen Mesoderm eines sich entwickelnden Organs aus Mesenchym differenzieren oder dem paraxialen Mesoderm entstammen (Pardanaud et al. 1996).

Auf die Vaskulogenese folgt eine Phase des modifizierenden Wachstums bereits bestehender Gefäßsysteme, die Angiogenese. Der primäre Kapillarplexus wird dabei aus- und umgebaut und es vollzieht sich eine funktionelle Differenzierung in arterielle, kapilläre und venöse Gefäße, die ihr morphologisches Äquivalent in unterschiedlichem Durchmesser, Wandaufbau und Grad der dichotomen Verzweigung der Gefäße aufweisen. Der zentrale molekulare Mechanismus der transmembranen Informationsvermittlung der Angiogenese besteht im VEGF/VEGF-Rezeptor-System (s. Kap. 2.2.). VEGF bewirkt eine Lockerung der interzellulären Kontakte der juvenilen Endothelzellen des primären Kapillarplexus und einen enzymatischen Abbau der extrazellulären Matrix. Dies ermöglicht den Endothelzellen unter proliferativen und migratorischen Prozessen neue Gefäße auszubilden. Eine bestehende Kapillare kann außerdem durch Einwachsen von Endothelzellen in das Lumen, dem Einziehen einer Trennwand entsprechend, in zwei Gefäße getrennt werden. Dieser Vorgang wird intussuszeptives Kapillarwachstum genannt (Caduff et al. 1986, Burri et al. 1990). Die Auflockerung des Endothelzellverbands ermöglicht außerdem die Assoziation mehrerer Kapillaren unter Fusion der einzelnen Lumina und so die Ausbildung von arteriellen und venösen Gefäßen größeren Durchmessers.

2.2 Ausgewählte Botenstoffe der Blut- und Gefäßbildung

2.2.1 Allgemeines

Auf molekularer Ebene spielt sich das Leben als diffusionslimitierte Kollision und Interaktion von Biomolekülen in wässriger Lösung ab. Die Partner dieser Wechselwirkung sind z.B. Enzym und Substrat, wobei es zu einer spezifischen Reaktion kommen kann, oder auch Rezeptor und Ligand, wobei die Bindung des adäquaten Liganden letztlich eine Konformationsänderung von zytoplasmatischen Domänen transmembraner Rezeptoren bzw. zytosolisch gelösten und daher diffusiblen Rezeptoren bewirkt. Auf diese Weise können Signale aus dem extrazellulären Raum über die Diffusionsbarriere Plasmamembran ins Zellinnere gelangen. Man spricht in diesem Zusammenhang von transmembraner Signaltransduktion und es handelt sich hierbei um ein Grundprinzip der biologischen Informationsvermittlung, das im Verband mit den beiden großen Leitungssystemen

der Vertebraten, dem Kreislaufsystem und dem Nervensystem, eine generalisierte Koordination des Stoffwechsels der verschiedenen Organsysteme auf äußere Reize und wechselnde Umweltbedingungen ermöglicht (in Wehner & Gehring: Zoologie)

In den Kapiteln 2.2.2 bis 2.2.7 werden solche Rezeptoren bzw. deren Liganden, die eine starke Korrelation mit der Neubildung von Blutgefäßen und Blutzellen bzw. der Differenzierung von Endothelzellen aufweisen in ihrer biologischen Wirkung kurz charakterisiert. Lediglich bei VE-Cadherin handelt es sich nicht um einen Rezeptor bzw. Liganden, sondern um ein endothelzellspezifisches, interzelluläres Adhäsionsmolekül.

2.2.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seine Rezeptoren Flk-1 und Flt-1

Das Protein Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) samt seiner beiden Rezeptoren Flt-1 (VEGFR-1) und KDR/Flk-1 (VEGFR-2) ist einer der wichtigsten Induktoren des Gefäßwachstums, sowohl im physiologischen Zusammenhang als auch in der Tumorangio-genese (Ferrara & Davis-Smyth 1997, Shibuya et al. 1999, Mustonen & Alitalo 1995), indem es für Endothelzellen eine mitogene (Ferrara & Davis-Smyth 1997) sowie, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, eine antiapoptotische Wirkung ausübt (Gerber et al. 1998 a, Gerber et al. 1998 b, Benjamin et al. 1999, Yuan et al. 1996). VEGF wird von mesenchymalen Zellen in der Umgebung der Blutinseln sezerniert und die Hämangioblasten und Angioblasten besitzen je zwei Rezeptortypen für VEGF, Flk-1 und Flt-1 (Millauer et al. 1993). Flk-1 besitzt eine starke Tyrosinkinaseaktivität nach VEGF-Bindung und in den VEGF-Allelen homozygot mutante Mäuse sterben in der Embryonalentwicklung aufgrund der Abwesenheit von Blutinseln (Ferrara et al. 1996) und folglich auch von Endothelzellen und nur sehr geringer Hämatopoese ab (Millauer et al. 1993, Sawano et al. 1996, Shalaby et al. 1995). Flt-1 hingegen besitzt zwar eine ca. zehnfach stärkere Affinität für VEGF, die VEGF-induzierte Tyrosinkinaseaktivität ist jedoch um eine Größenordnung schwächer (Waltenberger et al. 1994, Seetharam 1995). Während die für das Flt-1-Gen homozygot mutanten Mäuse aufgrund eines überschießenden Wachstums von EZ und einem unregulierten Wachstum von Blutgefäßen embryonal absterben (Fong et al. 1995), zeigen solche mit lediglich deletierter Tyrosinkinaseaktivität eine beinahe physiologische Blutgefäßentwicklung

(Hiratsuka et al. 1998). Der extrazellulären Domäne des Flt-1 Rezeptor wird somit eine Abfangfunktion für VEGF zugesprochen (Hiratsuka et al. 1998) und im Flk-1 Rezeptor der eigentliche positive Signaltransduktor für VEGF gesehen. Das Flt-1 Gen kodiert für zwei Transkripte, den membranständigen Rezeptor und eine kürzere cytosolisch Form des Rezeptors, sFlt-1 (soluble Flt-1), welche auch bei der Maus vorkommt und eine wichtige Rolle als antiangiogenetisches Molekül zur negativen Regulation des VEGF-Rezeptorsystems in der Plazenta spielt (He et al. 1999, Yamaguchi et al. 2002). Auch für das Huhn konnten eine membrangebundene und eine lösliche Form des Flt-1 Rezeptors nachgewiesen werden, wobei die Aminosäuresequenz eine ähnlich schwache Tyrosinkinaseaktivität vermuten lässt und also eine ähnliche Abfangfunktion für VEGF (Yamaguchi et al. 2002).

2.2.3 Stem Cell Factor (SCF) und sein Rezeptor c-kit

Die Typ III Rezeptortyrosinkinase und ihr Ligand Stem Cell Factor spielen eine wichtige Rolle in der Melanogenese, Fruchtbarkeit und der Hämatopoese (Ashman 1999). Das Rezeptor-Liganden System wirkt wachstumsfördernd für primitive hämatopoetische Zellen und der c-kit Rezeptor ist typisch für hämatopoetische Zellen (Broudy 1997).

Es konnte gezeigt werden, dass SCF durch seine antiapoptotische Wirkung ein Überlebensfaktor für primitive (Li & Johnson 1994), nicht jedoch für weiter differenzierte hämatopoetische Zellen ist (Borge et al. 1997). SCF bewirkt außerdem eine Differenzierung von unreifen hämatopoetischen Zellen zu Mastzellen (Valent et al. 1992, Irani et al. 1992) und eine Steigerung der Erythroidzellkoloniebildung (Ashman 1999, Lyman & Jacobsen 1998). Die c-kit Expression wird mit der Reifung aller hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme der Mastzellen herunterreguliert und periphere Blutzellen sind bis auf die CD34+ zirkulierenden Stamm- oder Vorläuferzellen c-kit negativ (To et al. 1994).

2.2.4 Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin)

Die Cadherine stellen eine Superfamilie von Ca^{2+} -bindenden transmembranen Proteinen dar, welche eine Verbindung der extrazellulären Matrix (EZM) zum Cytoskelett vermitteln (Angst et al. 2001). VE-Cadherin ist dabei als

endothelzellspezifisches Cadherin (Petzelbauer et al. 2000, Dejana et al. 2000) an den *Zonulae adhaerentes* lokalisiert (Dejana et al. 2001) und stabilisiert so den Endothelzellverband. Durch Bindung von VEGF an seine Rezeptoren kommt es zur Phosphorylierung der cadherinassoziierten Catenine, wodurch der Zellverband destabilisiert wird und Zellteilung sowie Gefäßwachstum möglich werden (Ukropec et al. 2000). Nachdem die Zellen Konfluenz erreicht haben und unter dem Einfluss der Kontaktinhibition stehen, nimmt der Phosphorylierungsgrad der Catenine stark ab und der einschichtige Zellverband wird wieder durch VE-Cadherin gefestigt. Auf diese Weise wird das, für die innere Gefäßwand so typische, einschichtige Plattenepithel u. a. durch die Wirkung von VE-Cadherin aufrechterhalten (Caveda et al. 1996). Endothelzellen ohne funktionelles VE-Cadherin zeigen außerdem eine verminderte Reaktion auf die antiapoptotische Wirkung von VEGF (Carmeliet et al. 1999), sodass VE-Cadherin mittelbar auch als Überlebensfaktor für Endothelzellen gelten kann.

2.2.5 Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)

Die Familie der FGFs stellt eine Ansammlung von 20 parakrin wirkenden Wachstumsfaktoren dar, welche ihre Wirkung durch die Bindung an einen bzw. mehrere der vier Rezeptortyrosinkinasen FGF-Rezeptor 1-4 (FGFR 1-4) entfalten (Powers et al. 2000). FGF-2, der auch basic FGF (bFGF) genannt wird, bindet an alle vier der RTKs und ist u.a. für Endothelzellen und Fibroblasten mitogen und chemotaktisch (Gospodarowicz et al. 1989), erhöht die Genexpression von VEGF (Gualandris & Presta 1995), Integrinen und anderen Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (Brooks 1996) und induziert die Ausbildung von röhrenförmigen Strukturen aus Endothelzellen in einer Kollagenmatrix (Montesano et al. 1986). Ebenso ist FGF-2 notwendig für die Entwicklung blutinselbildender Hämangioblasten aus dem splanchnischen Mesoderm, wie dies an Zellen der Vogelkeimscheibe gezeigt werden konnte (Flamme & Risau 1992). Die Bildung von FGF-2 in der Chorioallantois des Huhns und die Bedeutung für die Vaskularisierung dieses Organs konnte ebenfalls experimentell ermittelt werden (Ribatti et al. 1995). Genknockout-Versuche an Mäusen weisen auf eine Rolle von FGF-2 bei der Regulation der Aussprossung von Gefäßen nach Gewebsverletzungen hin (Miller et al. 2000).

2.2.6 Angiopoietin-1 (Ang-1)

Angiopoietin-1 ist ein weiterer parakriner Botenstoff, der von periendothelialen Zellen abgegeben wird, über die Rezeptortyrosinkinase Tie-2 spezifisch auf Endothelzellen wirkt und so deren Aussprossen bewirkt (Davis et al. 1996). Ang-1 bzw. Tie-2 defiziente Mäuse entwickeln embryonal zwar ein primäres Gefäßsystem, eine Reifung und Stabilisierung dieser Gefäße durch Rekrutierung von Perizyten tritt jedoch nicht ein was am Tag 12,5 zum intrauterinen Tod führt (Suri et al. 1996). Eine Überexpression von Ang-1 in transgenen Mäusen verursacht starke Hypervaskularisation (Suri et al. 1998), was die Bedeutung dieses Proteins für die Gefäßentwicklung unterstreicht. Im Vogelembryo konnte eine Expression von Ang-1 im umliegenden Mesenchym von venösem Endothel nachgewiesen werden (Moyon et al. 2001).

2.2.7 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) und Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)

Die Mitglieder der Familie der BMP wurden ursprünglich auf Grund ihrer Fähigkeit, Knochenwachstum zu induzieren, entdeckt und gehören der in struktureller Verwandtschaft stehenden TGF- β Superfamilie an. Vom Rest dieser Superfamilie unterscheiden sie sich jedoch durch das Vorhandensein von sieben und nicht neun konservierten Cysteinen im reifen Protein. BMP2 und BMP4 stehen in enger Verwandtschaft zu dem *Drosophila*-Protein Decapentaplegic. Humanes BMP4 kann das *Drosophila*-Homologon substituieren.

Im Krallenfrosch *Xenopus laevis* wirkt BMP4 als Induktor der Ausbildung epidermaler Strukturen aus Ektoderm (Wilson & Hemmati-Brivanlou 1995) und übt einen ventralisierenden Effekt auf das Mesoderm aus, sodass sich Blutzellen und Bindegewebe ausbilden (Hemmati-Brivanlou & Thomsen 1995, Dosch et al. 1997). Gleichzeitig ist es ein Supressor von Genen, welche die Differenzierung neuraler Strukturen aus Ektoderm einleiten (Suzuki et al. 1997, Yamamoto et al. 2000). Die wirksame Dosis von BMP4 ist dabei eine Funktion der Konzentration von BMP4 und seiner Antagonisten *Chordin*, *Noggin* und *Follistatin*, welche vom Organisator I sezerniert werden. BMP2 und BMP4 sind essentiell bei der Differenzierung von Hämangioblasten aus Seitenplattenmesoderm (Maeno et al. 1996, Davidson et al.

2000). Ektopisch appliziert können diese Morphogene in *Xenopus* die Bildung von Gefäßen und Blutzellen initiieren und die Störung der BMP-Signalkaskade, welche über sich autophosphorylierende Membranrezeptoren und die cytoplasmatischen Proteine SMAD1, SMAD4 und SMAD5 läuft, verhindert die Ausbildung von Blutzellen (Maeno et al. 1994, Hemmati-Brivanlou & Thomsen 1995). Über eine regulierende Wirkung auf die Stammzellnische besitzen die BMP über den BMP-Rezeptor Typ IA auch im Adulten einen Einfluss auf die Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen (Zhang et al. 2003).

2.3 Transkriptom und Proteom

Die Gesamtheit der genetischen Information eines Organismus stellt dessen Genom dar, wobei sich dieses im eukaryontischen System aus nukleärer und mitochondrialer DNA zusammensetzt. Der in Genen organisierte Bruchteil des Genoms wird durch RNA-Polymerasen in ein RNA-Korrelat, in erster Linie die mRNA, übersetzt, welches als Makromolekül entlang seines Konzentrationsgradienten aus dem Zellkern über die Kernporen ins Zytosol an die Ribosomen diffundieren kann. Die mRNA ist somit die nach einem exakten Programm ausgewählte Transportform der Erbinformation auf dem ontogenetischen Weg vom Genotyp zum Phänotyp (Gilbert SF 2003).

Die Gesamtheit aller dieser mRNA-Moleküle einer Zelle bzw. eines Gewebes zu einem diskreten Entwicklungszeitpunkt stellt dessen Transkriptom dar. Dieses dient als Matrize zur Proteinbiosynthese an den Ribosomen, wodurch das Proteom als Gesamtheit aller Proteine einer Zelle bzw. eines Gewebes entsteht. Die Proteine stellen die biologische Exekutive dar, unter deren Regie auch andere biologische Molekülgruppen wie Lipide, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren synthetisiert und im Rahmen der biologischen Selbstorganisation den Phänotyp des Organismus entstehen lassen, so dass dieser mit seiner Umwelt in Wechselwirkung treten kann um seinen Lebensreproduktionserfolg zu maximieren (Dawkins R 1999).

In erster Näherung kann man davon ausgehen, dass die mRNA eines Gens, welches transkribiert worden ist, auch translatiert wird und in einer Studie zur Beziehung von Transkriptom und Proteom zeigte sich dass zwischen den korrespondierenden mRNA- und Proteingehalten eines Gewebes ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,6$ besteht (Ideker et al. 2001).

Bei dieser vereinfachenden Darstellung wird jedoch außer acht gelassen, dass es neben den translationell aktiven, an eine Vielzahl von Ribosomen, den sog. Polysomen gebundenen mRNAs auch solche im Cytosol vorkommen, welche an einzelne Ribosomen, den sog. Monosomen, gebunden vorliegen und nicht translatiert werden. Ein ständiger Wechsel zwischen diesen beiden Aktivitätszuständen stellt den wichtigsten Kontrollmechanismus der Translation dar (Hegde et al. 2003). Während die Regulation der mRNA-Halbwertszeit als Reaktion auf verschiedene Stimuli (Ross 1995, Guhaniyogi und Brewer 2001) ein Regulationsparameter ist, der sich im RNA Gehalt der Zelle widerspiegelt, lassen sich die posttranskriptionellen Regulationen der Genexpression nicht mehr auf der Ebene der Nukleotide erfassen. Die Tatsache der unvollständigen Korrelation von Nukleotid- und Proteinexpressionsdaten lässt sich teilweise auch durch methodische Unzulänglichkeiten erklären. So konnten nur ca. 80% der Ergebnissen aus *microarray*-Experimenten mittels der quantitativen *real-time* RT-PCR bestätigt werden (Jenson et al. 2003) und dies obwohl beide Methoden auf Ebene der Nukleotidquantifizierung arbeiten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Transkription oftmals der limitierende Schritt auf dem Weg vom Gen zum Protein ist (aus Wehner & Gehring 1995) was auch in deren komplexer Regulation über eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren zum Ausdruck kommt, so dass die transkriptionelle Aktivität eines Gens bzw. des Genoms als notwendige, nicht jedoch hinreichende Bedingung, einen guten Anhaltspunkt für die Proteinzusammensetzung im Gewebe darstellt.

Dementsprechend ist es in der Literatur durchaus üblich, wenn auch nicht ganz präzise, bei Untersuchungen auf Ebene der mRNA von einer Genexpressionsstudie zu sprechen, wobei die Translation übergangen wird. *Sensu strictu* handelt es sich bei Untersuchungen der mRNA-Zusammensetzung eines Gewebes, wie dies auch in der vorliegenden Arbeit unternommen wurde, um Gentranskriptionsanalysen.

2.4 Die quantitative *real-time* Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (*real-time RT-PCR*)

2.4.1 Allgemeines zur Methode

Bei der quantitativen *real-time* RT-PCR (rt-RT-PCR), bisweilen auch quantitative kinetische PCR genannt, handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, mittels derer die Anzahl an Nukleotidmatrizen in einer wässrigen Lösung bestimmt wird. So kann die rt-RT-PCR u.a. zur Quantifizierung der transkriptionellen Aktivität eines ausgewählten Gens in einem bestimmten Gewebe zu einem diskreten Zeitpunkt eingesetzt werden und stellt so eine Methode zur quantitativen Analyse der Gentranskription *sensu strictu* und der Genexpression *sensu lato* dar.

Die Methode stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR dar, anhand derer eine Nukleotidmatrize über eine enzymkatalysierte Reaktion in einem periodischen Temperaturprogramm exponentiell vervielfältigt werden kann. Die beiden Stränge einer DNA-Doppelhelix werden dabei einer Serie von Erhitzungs- und Abkühlungsschritten unterzogen, welche sequentiell zu Strangtrennung, sequenzspezifischer Oligonukleotidanlagerung und enzymabhängiger Oligonukleotidverlängerung führen. So dient jeder der beiden Einzelstränge als Matrize zur Synthese des Komplementärstrangs und mit jedem Temperaturzyklus kommt es zu einer Verdoppelung der Einzelstrangsequenz innerhalb der Oligonukleotidbindungsstellen.

Diese Reaktion wurde von dem amerikanischen Chemiker Kary Mullis entwickelt (Mullis *et al.* 1986) und brachte ihm 1993 den Nobelpreis für Chemie ein. Durch Verwendung eines thermostabilen Enzyms aus dem Eubakterium *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.* 1988) konnte das Amplifikationspotential der PCR voll ausgeschöpft werden, so dass die Verfügbarkeit spezifischer DNA-Sequenzen keinen limitierenden Faktor mehr in der molekularbiologischen Praxis darstellt.

Etwa fünf Jahre nach der Entwicklung der konventionellen PCR wurden Möglichkeiten entwickelt, das PCR-Produkt direkt im eigentlichen Reaktionsgefäß nachzuweisen (Holland *et al.* 1991; Higuchi *et al.* 1992), so dass ein größerer Probendurchsatz möglich wurde. In einer Weiterführung ihres Ansatzes gelang es Higuchi *et al.* mittels einer CCD-Kamera den Fluoreszenzanstieg, der sich mittels des dsDNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid proportional zur Anhäufung

des PCR-Produkt verhielt, über den Verlauf einer PCR kontinuierlich zu messen (Higuchi *et al.* 1993). Auf diese Weise war es möglich, den stetigen Zuwachs an Reaktionsprodukt mit fortschreitenden Thermozyklen zu messen und es zeigte sich, dass eine benutzerdefinierte Fluoreszenzintensität, der sog. Schwellenwert (engl.: threshold), nach umso weniger Zyklen erreicht wurde, umso höher die Matrizenanzahl im anfänglichen Reaktionsansatz war. Die Fluoreszenzintensität einer solchen Reaktion kann also, unter Vernachlässigung der variablen Amplifikationseffizienz, als Funktion der anfänglichen Matrizenkonzentration und der Zyklusanzahl beschrieben werden und die Zyklusanzahl bis zum Erreichen des Schwellenwerts ermöglicht es, die anfängliche Matrizenanzahl zu berechnen. Der Amplifikationszyklus bei dem die Fluoreszenz den Schwellenwert erreicht, bezeichnet man als Schwellenwertzyklus (SWZ, engl.: threshold cycle).

Higuchi *et al.* nannten diese Methode aufgrund der Eigenschaft über den Fluoreszenzanstieg die Produktanhäufung mit der Zeit, also die Reaktionskinetik der PCR, aufzeichnen zu können, "*kinetic PCR*". Da diese Aufzeichnung zeitgleich mit dem Ablauf der Amplifikationsreaktion stattfindet, also in Echtzeit, wurde die Methode auch unter dem Namen "*real-time PCR*" bekannt. Im Bereich der Fluoreszenzdetektion sind inzwischen mehrere, voneinander unabhängige Systeme entwickelt worden, wobei man prinzipiell eine indirekte von einer direkten Detektion unterscheiden kann.

Von indirekter Detektion spricht man, wenn der Anstieg der Fluoreszenzintensität nicht unmittelbar durch den Zuwachs an dsDNA verursacht wird, sondern durch eine dazu gekoppelte Reaktion. Die gängigsten indirekten Detektionssysteme sind *Taqman*TM (Holland *et al.* 1991; Gibson *et al.* 1996, Heid *et al.* 1996), *Molecular Beacons* (Tyagi & Kramer 1996), *Scorpions* (Whitcombe *et al.* 1999) und *Hybridisation Probes* (Wittwer *et al.* 1997).

Bei der direkten Methode handelt es sich um dsDNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie den dsDNA-Interkalator Ethidiumbromid und den asymmetrischen Cyaninfarbstoff *SYBR Green I*^R (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) (Schneeberger *et al.* 1996, Morrison *et al.* 1998), die erst nach Bindung an dsDNA zu starken Fluorophoren werden. Auf Grund der besseren Fluoreszenzeigenschaften und der geringeren Mutagenität (Singer *et al.* 1999) wird vom kommerziellen Anbieter inzwischen ausschließlich *SYBR Green I*^R in den vorgefertigten Reaktionslösungen verwendet. Die Fluoreszenzintensität dieser Fluorophore, die im Fall von *SYBR*

Green I^R an die kleine Furche der dsDNA binden und daraufhin ihre Fluoreszenzaktivität ca. 100-fach steigern, ist somit proportional zur Konzentration an dsDNA im Reaktionsansatz. Da diese Farbstoffe sequenzunabhängig an dsDNA binden wird die Spezifität der PCR bei der direkten Detektion lediglich durch das verwendete Oligonukleotidpaar vermittelt. Eine Überprüfung der Spezifität der direkten Methode wird durch die sog. Schmelzpunktbestimmung bzw. Schmelzkurvenanalyse des PCR-Produkts erreicht (Ririe *et al.* 1997), mittels derer die für ein bestimmtes Amplicon charakteristische Schmelztemperatur bestimmt werden kann. Auf diese Weise können unspezifische Nebenprodukte der PCR, welche als dsDNA ebenfalls ein Fluoreszenzsignal geben, vom spezifischen Reaktionsprodukt unterschieden werden. Die *real-time* RT-PCR wird daher auch als eine Methode zur gelfreien mRNA-Detektion (Muller *et al.* 2002) bezeichnet, womit gemeint ist, dass die Spezifität der Amplifikationsprodukte auch ohne die elektrophoretische Auftrennung mittels einer Agarosegelelektrophorese zu überprüfen ist. Verglichen mit der TaqMan-gestützten *real-time* RT-PCR ist die SYBR *Green I^R*-gestützte *real-time* RT-PCR wesentlich einfacher und vielseitiger in der Anwendung. Hinsichtlich der Sensitivität sind sich die beiden Detektionssysteme ebenbürtig und bezogen auf die Präzision der ermittelten Daten ist die SYBR-Green-Methode überlegen (Schmittgen *et al.* 2000 a). Ein weiterer Vorzug der *real-time* RT-PCR im allgemeinen ist die Tatsache, dass die Methode mit den Schwellenwertzyklen (SWZ) diskrete Werte als Ergebnisse hervorbringt, die sich einer statistischen Auswertung unterziehen lassen (Livak & Schmittgen 2001, Muller *et al.* 2002, Simon 2003) und so die Präzision der Untersuchung zu bestimmen ist. Die große Bedeutung der Nukleotidquantifizierung für die biomedizinische Grundlagenforschung sowie für die molekulare Diagnostik (Schweitzer & Kingsmore 2001) hat zur Entwicklung einer Reihe verschiedener Techniken geführt, wobei die *real-time* RT-PCR sich durch die höchste Sensitivität und die höchste Flexibilität unter allen quantitativen Methoden auszeichnet (Wang & Brown 1999). Ihr Einsatzgebiet ist sehr vielfältig und reicht von der Untersuchung gewebespezifischer Genexpression (Bustin *et al.* 2000) über die Detektion bakterieller (Goerke *et al.* 2001) und viraler RNA (Greijer *et al.* 2002, Mackay *et al.* 2002) in klinischen Gewebeproben bis hin zur Identifikation von Mikrometastasen (Bustin *et al.* 1999), Neuroblastomen (Cheung & Cheung 2001), Prostatakrebs (Gelmini *et al.* 2001) und Leukämie (Buonamici *et al.* 2002) sowie zur klinischen Tumorcharakterisierung

(Bustin & Dorudi 1998, Mocellin et al. 2003). Ein Überblick über Einsatzgebiete, Möglichkeiten und kritische Aspekte der *real-time* RT-PCR findet sich in den beiden Übersichtsarbeiten von Bustin (Bustin 2000, Bustin 2002).

2.4.2 Der experimentelle Aufbau der Nukleotidquantifizierung

Der methodische Weg der Nukleotidquantifizierung aus tierischem Gewebe mittels *real-time* RT-PCR umfasst eine Sequenz von Einzelschritten, wobei die Präzision und Validität der endgültigen Ergebnisse durch die vorgeschalteten Arbeitsschritte limitiert wird. Somit ist angefangen bei der Probengewinnung über die Isolation der zellulären RNA bis hin zur Umschreibung dieser in Erststrang-cDNA und deren Quantifizierung in der *real-time* RT-PCR besondere Sorgfalt erforderlich. Im Folgenden sollen diese Methoden in ihrem Zusammenhang kurz geschildert werden, um darauf in den nächsten Kapiteln im Einzelnen genauer auf sie einzugehen. Bei der molekularbiologischen Arbeit mit tierischem Probenmaterial steht die Haltung und evtl. auch die Tötung des Tieres am Anfang der Probengewinnung und besonders bei der Tötung ist darauf zu achten, dass diese sich nicht in irgendeiner undefinierten Weise auf den Stoffwechsel des Tieres auswirkt und so die Gewinnung einer repräsentativen Probe erschwert. Aus einer solchen Probe in Form eines definierten Gewebestückes ist zunächst die gesamte zelluläre RNA zu isolieren, wobei die Probe unmittelbar nach der Excision in ein konservierendes Milieu wie etwa eine hochkonzentrierte chaotrope Salzlösung zu verbringen ist. Die Gesamtheit der mRNA, die nur einen Bruchteil von wenigen Prozent der zellulären Gesamt-RNA ausmacht (Axel *et al.* 1976), stellt sowohl in Qualität wie auch in Quantität das sog. Transkriptom des betrachteten Gewebes bzw. Organs dar und ist als der transkriptionell aktive Anteil des Genoms zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt zu betrachten. Die darauf folgende enzymkatalysierte Umschreibung (Reverse Transkription, RT) der RNA in eine komplementäre DNA-Kopie (Erststrang-cDNA) ist notwendig, da das in der PCR verwendete Enzym lediglich DNA, nicht jedoch RNA, als Matrize akzeptiert. Außerdem zeichnet sich DNA gegenüber RNA durch eine viel höhere Stabilität gegenüber Abbauprozessen aus, was die Notwendigkeit in Systemen mit Temperaturen im Bereich von 0 °C zu arbeiten stark verringert. Eine solchermaßen gewonnene DNS-Sequenz dient hierauf in der PCR als Matrize für die Amplifikation, wobei die streng exponentielle Natur der

Vervielfältigung unter Berücksichtigung der durchlaufenen Amplifikationszyklen Rückschlüsse auf die anfängliche Anzahl an cDNA-Matrizen im Reaktionsansatz ermöglicht. Da im Idealfall in der Reversen Transkription für jedes mRNA-Molekül genau ein cDNA Molekül synthetisiert worden ist, entspricht dies einer mittelbaren Quantifizierung der mRNA in der untersuchten Gewebeprobe. Die gewonnenen Daten, welche in Wiederholungsansätzen erhoben werden und somit immer Mittelwerte mit ihrer entsprechenden Standardabweichung darstellen, sind hierauf noch mittels statistischer Verfahren auf ihre Präzision hin zu prüfen.

2.4.3 Nukleotid isolation aus tierischem Gewebe

Die Isolation von DNA- und proteinfreier, unverdauter RNA stellt den ersten molekularbiologischen Arbeitsschritt auf dem Weg zur Quantifizierung dar, Dieser Schritt bedarf auf Grund der Labilität der RNA besonderer Sorgfalt. Zum einen ermöglicht die gegenüber der DNS zusätzlich vorhandene 2'OH-Gruppe der RNA eine autokatalytische Hydrolyse im alkalischen Milieu. Zum anderen sind RNA-hydrolysierende Enzyme, sog. RNasen, ubiquitär vorhanden.

Nachdem aus dem zu untersuchenden Gewebe eine repräsentative Probe unter sterilen und RNase-freien Bedingungen gewonnen worden ist, besteht zum einen die Möglichkeit, diese direkt im Anschluss einer RNA-Isolation zu unterziehen oder die Probe zur Lagerung in ein konservierendes Milieu zu verbringen. Dies bietet den Vorteil eine Vielzahl von Proben gewinnen zu können, bevor man diese simultan einer RNA-Isolation unterzieht. Dadurch wird eine identische Probenverarbeitung gewährleistet.

Tierisches Gewebe wird zur Konservierung üblicherweise in flüssigen Stickstoff verbracht und so schockgefroren um jegliche Abbauprozesse zu unterbinden. Alternativ besteht die Möglichkeit die Gewebeprobe in eine hochkonzentrierte chaotrope Salzlösung zu verbringen, wodurch degradative Enzyme in diesem extrem unphysiologischen Milieu denaturiert und somit inaktiv vorliegen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass eine solchermaßen gelagerte Probe ihre native Konsistenz weitestgehend beibehält. Unabhängig von der gewählten Konservierungsmethode werden die Proben zur Langzeitlagerung bei -80 °C aufbewahrt.

Eine Einschränkung vieler quantitativer Methoden ist die mangelnde räumliche Auflösung der gewonnenen Daten, *i.e.* es können keine Rückschlüsse auf die Lokalisation der untersuchten Nukleotide im Gewebe bzw. Organ gemacht werden. Lediglich die *in situ*-Hybridisierung liefert diese Positionsinformation und erlaubt zugleich eine, wenn auch nur grobe, quantitative Abschätzung (Bustin 2000). Es ist daher bei der Probenexzision besonderes Augenmerk darauf zu richten, dass das verwendete Gewebestück, welches aus methodischen Gründen eine max. Masse von 100 mg haben darf, sowohl klar definiert im Bezug auf seinen strukturellen Kontext im Gewebe bzw. Organ ist, als auch exemplarisch für das betrachtete Gewebe bzw. Organ ist. Andernfalls besteht die Gefahr eines Stichprobenfehlers, der den gewonnenen Daten allerdings kaum anzusehen ist und sich nur bei mehrfacher Wiederholung des Experiments in einer starken Streuung der Daten äußern würde.

Diesem kann durch die Kombination mehrerer Einzelproben zu einer Gesamtprobe entgegengewirkt werden, wodurch eine gegenseitige Mittelung der einzelnen Stichprobenfehler angestrebt wird. Da in der vorliegenden Arbeit RNA-Extraktionen aus Gesamtgewebeproben von Embryo, Dottersack und Allantois bzw. Chorioallantois durchgeführt wurden, welche aus einer Vielzahl unterschiedlich differenzierter Zelltypen bestehen, kann es sich bei den in der *real-time* RT-PCR gewonnenen Daten nur um die vereinigten und zum Organenexpressionsprofil gemittelten Genexpressionsprofile dieser Zelltypen handeln (Bustin 2002). Einen Ausweg aus dieser Beschränkung stellt die „Laser Capture Microdissection“ (LCM, Emmert-Buck et al. 1996) dar, mittels derer einzelne und definierte Zellen aus dem Gewebeverband unbeschädigt herausgelöst und der Genexpressionsanalyse zugeführt werden können (Walch et al. 2001).

Bei den in der molekularbiologischen Praxis angewandten Methoden zur RNA-Extraktion aus Gesamtgewebeproben handelt es sich um die Essigsäure/Ethanol-Fällung (Chirgwin *et al.* 1979), bei der chaotrope Salze und anionische Detergentien zur Lyse der Zellen und Solubilisierung der Nukleinsäuren verwendet werden, die selektive RNA-Fällung mit Lithiumchlorid (Cathala *et al.* 1983), bei der die RNA in ein Lithiumsalz überführt wird, die Guanidiniumsothiocyanat/Säure/Phenol-Extraktionen (Chomczynski & Sacchi 1987), welche eine wenig arbeitsintensive Einzelschrittmethode darstellt und die Silicagelmembran-Technik wie sie z.B. im RNeasy-Kit angewendet wird (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). In einer

vergleichenden Studie der ersten vier Methoden (Gruffat *et al.* 1996) zeigte sich die Überlegenheit der Methode nach Chirgwin *et al.* hinsichtlich Ausbeute und Integrität der RNA. Neben diesen beiden Parametern muss die Reinheit einer Isolation kritisch betrachtet werden, wobei sich v.a. die Kontamination mit genomischer DNA (gDNA) als problematisch erweist. Eine Kontamination mit genomischer DNA verfälscht zum einen die Resultate der photometrischen RNA-Konzentrationsbestimmung, zum anderen stellen die betreffenden Gensequenzen eine Matrize für die Primer dar, welche die Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung verfälschen. In der Praxis zeigt sich, dass keine der Isolationsmethoden eine vollständige Trennschärfe im Hinblick auf Desoxy- und Oxyribonukleinsäuren besitzt, so dass sich in der RT-PCR immer auch gDNA nachweisen lässt (Bustin 2002). Ein sich an die eigentliche Isolationsprozedur anschließender bzw. zwischengeschalteter Verdau mit DNase I hat sich hierbei bewährt (Bustin 2002), wobei der Verdau auf der Silicagelmembran nicht absolut quantitativ erfolgt. Dies wird auch vom Hersteller eingeräumt (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, persönliche Kommunikation) und liegt v.a. an der im Vergleich zu einer wässrigen Lösung eingeschränkten Diffusion von Enzym und Substrat auf der Silicagelmatrix.

2.4.4 Reverse Transkription (RT) von Nukleotiden zur cDNA-Erststrangsynthese

Da die in der PCR verwendete DNA-Polymerase ein DNA-abhängiges Enzym ist, also eine DNA-Matrize zur Ausübung ihrer Polymeraseaktivität benötigt, ist es im Rahmen einer PCR-gestützten Genexpressionsanalyse notwendig die isolierten RNA-Sequenzen in eine komplementäre, einzelsträngige DNA-Kopie (Erststrang-cDNA, first-strand cDNA) umzuschreiben. Diese enzymkatalysierte Reaktion nennt man auf Grund der Umkehrung des gemäß dem zentralen Dogma der Molekularbiologie von der RNA zur DNA gerichteten Informationsflusses Reverse Transkription (RT). Dabei bedient man sich einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, einer Reversen Transkriptase, wie sie in Retroviren vorkommt. Die Existenz eines solchen Enzyms wurde Mitte der 1960er Jahre postuliert (Temin 1964) und Ende der 1980er Jahre wurde die RT mit der PCR zur RT-PCR kombiniert um zelluläre RNA zu amplifizieren (Veres *et al.* 1987). verwendet. Den beiden kommerziell erhältlichen Enzymen Omniscript™ –bzw. Sensiscript™ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

wird dabei eine überdurchschnittliche Sensitivität und Prozessivität nachgesagt (Bosch et al. 2000) und sie besitzen zudem eine RNase H-Aktivität, wodurch die RNA-Sequenz des im Lauf der RT gebildeten RNA/DNA-Hybriden hydrolysiert wird. Dies bewirkt, dass von jeder RNA-Sequenz maximal eine DNA-Kopie gebildet werden kann und es nicht zu einer das Genexpressionsmuster verzerrenden Vervielfältigung einzelner Sequenzen kommt. Eine eins-zu-eins Umschreibung sämtlicher RNA-Sequenzen im Reaktionsansatz wäre wünschenswert, in der molekularbiologischen Praxis hat sich allerdings gezeigt, dass die Enzyme lediglich mit einer Effizienz im Bereich von 20 % arbeiten (Curry et al. 2002). Die RT steuert somit die größten Schwankungen im experimentellen Aufbau der *real-time* RT-PCR bei (Ovstebo et al. 2003).

2.4.5 Relative Nukleotidquantifizierung mittels *real-time* RT-PCR

Die RT-PCR ist die gängigste Methode zur Charakterisierung zellulärer Genexpressionsmuster (Orlando et al. 1998) und die *real-time* RT-PCR als eine in der Praxis gut handhabbare (Wall & Edwards 2002) und hinsichtlich Sensitivität und Reproduzierbarkeit unübertroffene (Mouillesseaux et al. 2003) Weiterentwicklung der RT-PCR stellt momentan die gebräuchlichste ihrer Varianten dar (Bustin 2002). Die *real-time* RT-PCR basiert auf der fluoreszenzlichtvermittelten Detektion der Produktakkumulation während der logarithmischen Amplifikationsphase der PCR. Zur Erzeugung und Auswertung der Ergebnisse der quantitativen *real-time* RT-PCR gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche Ansätze, die absolute und die relative Quantifizierung. In der absoluten Quantifizierung wird die genaue Anzahl an Transkripten im Reaktionsansatz ermittelt, indem man mittels einer Verdünnungsreihe bekannter Transkriptkonzentrationen eine Standardkurve erstellt und sie mit der betrachteten Probe in Bezug setzt (Bustin 2000). Die relative Quantifizierung hingegen ermittelt die mengenmäßige Veränderung der Transkription eines ausgewählten Zielgens im Verhältnis zu einer benutzerdefinierten Kontrolle, z.B. zu einer unbehandelten Kontrollgruppe oder zu einer Probe zum Zeitpunkt t_0 (Livak & Schmittgen 2001). Die Ergebnisse aus der relativen Quantifizierung stellen daher immer ein einheitsloses Vielfaches bzw. einen Bruchteil (engl. fold change) der Referenzprobe dar. Zwar beinhalten diese Ergebnisse einen geringeren Informationsgehalt als die exakt ermittelten Transkriptzahlen aus der absoluten

Quantifizierung, erweisen sich jedoch für die meisten Fragestellungen als hinreichend (Livak & Schmittgen 2001, Pfaffl 2001), zumal die absolute Quantifizierung mit einigen methodischen Schwierigkeiten behaftet ist (Ferre 1992, Souza et al. 1996, Overbergh et al. 1999, Ramakers et al. 2003). Bei der relativen Quantifizierung wird das Expressionsverhältnis von Probe und Kontrolle eines Zielgens (ZG) ermittelt, indem die Differenz der Anzahl ihrer Schwellenwertzyklen als Potenz zu ihrer Amplifikationseffizienz (AE), welche im Idealfall gleich zwei ist, genommen wird. Dieser Wert wird zu einem Referenzgen (RG) ins Verhältniss gestellt, für welches ganz analog das Expressionsverhältnis von Probe und Kontrolle errechnet wurde (s. Tabelle 1, Livak & Schmittgen 2001, Pfaffl 2001). Das Referenzgen sollte ein von der zellulären Konzentration her stabiles Transkript liefern, also im Idealfall transkriptionell absolut unreguliert sein (Pfaffl 2001), wodurch eine Normalisierung von evtl. in unterschiedlichen Mengen zur RNA-Isolation eingesetzter Zellanzahlen in Kontroll- und Probeansatz bzw. eine Kompensation von RT- und PCR-spezifischen Effizienzschwankungen in Kontrolle und Probe oder von Pipettiergenauigkeiten erreicht wird. Letztlich sollen durch die Normalisierung die methodischen Unzulänglichkeiten ausgeschaltet werden, so dass lediglich biologische Effekte, i.e. transkriptionelle Regulation, einen Einfluss auf die quantifizierten Mengen der Zielgen-mRNA, i.e. PCR-Matrize, haben. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer normalisierten Genexpression (Muller et al. 2002)

Bezeichnung der Formel	Mathematische Formulierung
Relatives Expressionsverhältnis	$(AE_{ZG})^{\Delta SWZ_{ZG}(\text{Kontrolle} - \text{Probe})} / (AE_{RG})^{\Delta SWZ_{RG}(\text{Kontrolle} - \text{Probe})}$

Tabelle 1: Formel zur Berechnung der normalisierten Genexpression (nach Pfaffl 2001)

Inzwischen sind verschiedene Computerprogramme zur Auswertung der SWZ-Daten einer *real-time RT-PCR* und deren Weiterverarbeitung in einer relativen Quantifizierung entwickelt worden (Muller et al. 2002, Pfaffl et al. 2002, Simon 2003).

2.4.6 Rechnergestützte Datenauswertung

2.4.6.1 Amplifikationseffizienz

Die exponentielle Natur der PCR-Amplifikation lässt sich mit der Formel $N_Z = N_0 \cdot (AE)^Z$ beschreiben, wobei es sich bei N_Z um die Matrizenanzahl nach Z Zyklen handelt und bei N_0 um die initiale Matrizenanzahl. Unter der AE versteht man den Wirkungsgrad der Amplifikationsreaktion. Eine exakte Verdoppelung der dsDNA Matrize mit jedem Zyklus entspräche einer AE von 2 (100%) und stellt einen theoretischen Wert dar. Bei der relativen Quantifizierung, in der hinsichtlich cDNA und Primer verschiedene Proben miteinander verrechnet werden, geht man, unter Berücksichtigung einiger Kriterien, von einer identischen und konstanten AE von Ziel- und Referenzgenamplicon aus (Livak 2001). In der Literatur wird eine Diskrepanz der AE der beiden Amplicons von bis zu 20% beschrieben (Kamphuis et al. 2001), welche sich v.a auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Oligonukleotide zurückführen lässt. Doch schon wesentlich geringere Unterschiede in der AE wirken sich in der relativen Quantifizierung deutlich aus und verfälschen die Ergebnisse (Ramakers et al. 2003). Alternativ lassen sich durch die Erstellung einer parallel zu den eigentlichen Probenreaktionen ablaufenden Standardkurve die AE der Ziel- und Referenzgenampliconvervielfältigung aus der Steigung einer Eichgerade bestimmen (s. Tab. 2, Formel 1) (Kamphuis et al. 2001, Meijerink et al. 2001). Da auch dieser Ansatz von einer konstanten AE im Verlauf der PCR ausgeht und Kontaminationen von inhibitorischen Substanzen in den eigentlichen Probenreaktionen nicht aufdecken kann, erweist er sich als problematisch. Ramakers et al. (Ramakers et al. 2003) haben eine Methode entwickelt anhand derer sich die AE einer individuellen Reaktion anhand der Fluoreszenzdaten, als eigentlich gemessenen Rohdaten, ermitteln lässt. Die Methode, welche mittels einer linearen Regressionsanalyse die Steigung der PCR-Amplifikationskurve in ihrer logarithmischen Phase bestimmt und daraus die AE ableitet (s. Tab. 2, Formel 2), kommt ohne unbewiesene Annahmen aus und stellt somit eine gute Möglichkeit zur Bestimmung der AE dar.

Name der Formel	Mathematische Formel
Formel1: Amplifikationseffizienz aus Standardkurve (Livak 2001, Meijerink et al. 2001)	$AE = 10^{-1/\text{Steigung}}$
Formel 2: Amplifikationseffizienz aus der linearen Regressionsanalyse (Ramakers et al. 2003)	$AE = 10^{\text{exp Steigung}}$

Tabelle 2: Formeln zur Berechnung der PCR-Amplifikationseffizienz

2.4.7 Normalisierung

Um die Transkriptionslevel von Proben verschiedenen Ursprungs miteinander vergleichen zu können, bedarf es einer Standardisierung der eingesetzten Gewebemenge (letztlich der eingesetzten Anzahl an Zellen) aus welcher die quantifizierte mRNA des Zielgens ursprünglich stammt (Tricarico et al. 2002). Dieser Bezug ist für experimentelle Ansätze, die aus der Zellkultur kommen, durchaus sinnvoll. Stammen die Proben allerdings direkt aus einem Organismus, lässt sich die verwendete Zellanzahl nur schwer ermitteln. Die Proportionalität der Zellanzahl zur Gewebemasse ist aufgrund des variablen Anteils an extrazellulärer Matrix und interstitieller Flüssigkeit nur schwach. Die aus dem Gewebe isolierte Masse an RNA, welche zu ca. 90% von der ribosomalen RNA stammt (Bustin 2000), weist eine bessere Korrelation zur Zellanzahl auf und wird in der Praxis durchaus zur Normalisierung eingesetzt (Bustin 2000). Die Methode der Wahl ist eine zum Zielgen parallel geschaltete Quantifizierung einer zellulären mRNA oder rRNA, bzw. deren cDNA, welche optimalerweise in sämtlichen Geweben des untersuchten Organismus mit einer konstanten, gegenüber Umwelteinflüssen invarianten Intensität transkribiert wird, also eine absolute Proportionalität zur Zellanzahl besitzt. Auf ein solches internes Referenzgen ließen sich sämtliche Zielgene beziehen (Karge et al. 1998). Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre zeigten allerdings, dass es ein solches optimales internes Referenzgen nicht gibt. Am häufigsten wurden in den letzten Jahren zu diesem Zweck das Gen für Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH), β -Actin und 18S rRNA bzw. 28S rRNA benutzt, wobei sich v.a. bei ersten beiden Genen zeigte, dass sie ihre Transkriptionsintensität durchaus variiert (Oliveira et al. 1999, Thellin et al. 1999, Zhong et al. 1999, Hamalainen et al. 2001, Selvey et al.

2001, Deindl et al. 2002, Glare et al. 2002) und sie somit den Ansprüchen an ein internes Referenzgen nicht genügen. Ribosomale RNA (rRNA), wird nicht von der sämtliche mRNAs transkribierenden RNA-Polymerase II, sondern von der RNA-Polymerase I umgeschrieben (Paule & White 2000) und ihre Transkriptionsintensität bzw. zelluläre Konzentration scheint invarianter gegenüber Umwelteinflüssen zu sein als die der mRNA (Barbu & Dautry 1998). In verschiedenen Untersuchungen konnte die Überlegenheit der rRNA gegenüber den beiden anderen Kandidaten für ein endogenes Referenzgen gezeigt werden (de Leeuw et al. 1989, Mansur et al. 1993, Bathia et al. 1994, Zhong & Simmons 1999) und rRNA wird in vielen Arbeiten als Referenzgen verwendet (Blanquicett et al. 2002, Thellin et al. 1999, Bond et al. 2002, Schmittgen et al. 2000 b). In anderen Studien wurde allerdings auch für die rRNA eine gewisse transkriptionelle Regulation festgestellt (Solanas et al. 2001, Raaijmakers et al. 2002) und rRNA stößt in der Literatur somit auch auf Ablehnung in ihrer Funktion als bevorzugtes endogenes Referenzgen (Tricarico et al. 2002, Radonic et al. 2003). In dem Bestreben ein quantitativ stabil transkribiertes Gen aufzufinden wurden zahlreiche weitere Genloci wie etwa Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase, Peptidyl-Prolylisomerase, Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, TATA-boxbindendes Protein, α -Tubulin oder β 2-Mikroglobulin untersucht, doch zeigte sich, dass alle diese Gene in gewissem Ausmaß reguliert sind (Thellin et al. 1999, Vandesompele et al. 2002, Blanquicett et al. 2002, Tricarico et al. 2002). Unter der Annahme, dass es nicht das optimale endogene Referenzgen für alle Modellsysteme gibt, wurden Methoden entworfen mittels derer man innerhalb einer Reihe potenzieller Referenzgene diejenigen mit der stabilsten Transkriptionsintensität ermitteln kann (Vandesompele et al. 2002, Radonic et al. 2003). Im Rahmen der Arbeit von Radonic et al. 2003 zeigte sich, dass die RNA-Polymerase II sowohl hinsichtlich ihrer Prävalenz in den untersuchten Geweben, als auch bezüglich der Stabilität der Transkriptionsintensität gegenüber regulativen Einflüssen den Ansprüchen an ein endogenes Referenzgen hinreichend genügt.

3 Material und Methoden

3.1 Probengewinnung

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Die Gewebeproben wurden von Hühnerembryonen (*Gallus gallus domesticus*) Rasse LSL (Lohmann selected Leghorn) genommen. Die befruchteten Eier wurden vom Institut für Geflügelkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der LMU München zur Verfügung gestellt. Bebrütet wurden die Eier in einem automatischen Brutgerät (Sicherheitsbrüter Compact S 84, Ehret GmbH & Co.KG, Emmendingen, Deutschland)) des Instituts für Physiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München. Um den Einfluss individueller Schwankungen zu reduzieren wurden für jeden Gewebetyp, je nach Entwicklungszeitpunkt Embryo, Allantois bzw. Chorioallantois oder Dottersack, im Folgenden auch Zielorgane genannt, Proben von drei Embryonen eines Alters zur weiteren Verarbeitung vereinigt.

Gewebe Alter	Embryo	Dottersack	Allantois bzw. Chorioallantois
E0	X		
E1	X		
E2	X	X	
E3	X	X	
E4		X	X
E5		X	X
E6		X	X
E7		X	X

Tabelle 3: Übersicht über die zur RNA-Isolation und anschließender Genexpressionsanalyse verwendeten Gewebeproben aus Hühnerembryonen

Proben vom Dottersack konnten erst ab dem EZP E2 gewonnen werden, solche von der Allantois/ Chorioallantois erst ab dem EZP E4. Entsprechend dienten Proben von *in toto* homogenisierten Embryonen als Ersatz.

3.1.2 Probenexzision und Probenkonservierung

Die Probenentnahme zum Zweck der RNA-Gewinnung hatte generell nicht nur unter sterilen, sondern auch RNase-freien bzw. RNase-inaktivierenden Bedingungen zu erfolgen. Entsprechend wurden die benutzten Arbeitsoberflächen mit einer RNase-inaktivierenden Lösung behandelt (RNaseZap®, Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, England), metallische Arbeitswerkzeuge wie Pinzetten, Spatel, Skalpell usw. wurden mit 96 %igem Ethanol benetzt und über dem Bunsenbrenner abgeflammt. Nichtfeuerfeste Werkzeuge wie Kunststoffbehältnisse, wurden ausschließlich als werksseitig sterilisierte Einmalerzeugnisse benutzt.

Die Hühnereier wurden, nachdem sie zu den definierten Zeitpunkten aus dem Brutkasten entnommen worden waren, mit einem ethanolgetränktem Zellstofftuch abgerieben und der auf dem Ei verbliebene Alkohol durch Entflammung entfernt. Zur Eröffnung der Kalkschale wurde das Ei in der Transversalen, etwa auf halber Höhe, angeschlagen und der Embryo samt Dotter und Weißer in eine, mit bis zur vollständigen Benetzung der Bodenfläche mit sterilem PBS-Puffer (s. Tab. 4) gefüllte Petrischale entleert.

Bestandteil	Menge
NaCl	42,5 g
Na ₂ HPO ₄	6,35 g
NaH ₂ PO ₄	1,95 g
Aqua bidest.	ad 5000 ml, pH 7,2 – 7,4

Tabelle 4: Zusammensetzung des PBS-Puffers

Hierauf wurden, mit dem unbewaffneten Auge bzw. unter dem Binokular, die Zielorgane identifiziert und unter Zuhilfenahme von Pinzette und Augenschere Gewebeproben mit einer Masse von ca. 30-100 mg genommen. Diese wurden zweimalig mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß, welches zuvor mit 1ml einer RNase-inaktivierenden Salzlösung (RNAlater®, Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, England) versehen worden war, verbracht. Dabei war darauf zu achten, dass die Proben in mindestens einer Dimension eine Ausdehnung von 5 mm nicht überschritten und dass das Volumen der Salzlösung mindestens das zehnfache des Probenvolumens betrug. Diese beiden Kriterien waren zu erfüllen um

eine optimale Diffusion der Salzlösung in das Probengewebe und damit eine Konservierung der Probe zu gewährleisten. Um den Gewebeproben möglichst wenig Zeit für Prozesse wie Enzyminduktion oder RNA-Degradation zu geben, die zu einer artifiziiellen Veränderungen des Genexpressionsmusters führen würden, wurden die Arbeitsschritte bis zur Verbringung in die RNAlater®-Lösung möglichst rasch durchgeführt. Zur Langzeitlagerung wurden die Proben im Gefrierschrank bei -80°C aufbewahrt. Gemäß den Herstellerangaben konnte bei einer solchen Lagerung von der Konservierung intakter und undegradierter RNA ausgegangen werden, was eine Grundvoraussetzung für eine valide Genexpressionsanalyse darstellt.

3.2 RNA-Isolation, DNase-Verdau und Spektrophotometrie

Die Gewebeproben von Allantois und Dottersack eines bestimmten Entwicklungszeitpunkts wurden, nachdem sie auf Eis aufgetaut worden waren, mit dem Skalpell bzw. einer Augenschere in Portionen von 5-10 mg geschnitten. Diese Portionen dreier verschiedener Embryonen eines bestimmten Gewebes und Entwicklungszeitpunkts wurden zu einer Gesamtprobe von max. 30 mg vereinigt. Diese Obergrenze für die Gesamtprobenmasse war notwendig um die RNA-Isolationskapazität der gewählten Methode (RNeasy®, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) von 100 μg nicht zu überschreiten. Auf diese Weise sollten Schwankungen sowohl des Entwicklungszustands der einzelnen Eier, als auch Schwankungen bezüglich der Probenentnahme aus den topologisch nicht vollkommen homogenen Zielorganen ausgeglichen werden. Anschließend wurden die 30 mg-Gesamtproben jeweils in ein 2 ml-Reaktionsgefäß, das bereits mit 600 μl RLT-Puffer (RNeasy®, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) befüllt worden war, verbracht und mittels eines Rotor-Stator Homogenisatorsystems disruptiert und homogenisiert. Bei der Antriebseinheit dieses Systems handelte es sich dabei um den Ultra Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland). Als Dispergierwerkzeuge wurden Kunststoffwerkzeuge (Omni Tip Disposable Rotor-Stator Generator Probes, Omni International, Inc., Marietta, USA) benutzt, wobei jede Gewebeprobe mit einem separaten Werkzeug bearbeitet wurde. Die Gefahr einer Kreuzkontamination zwischen den Proben konnte somit in diesem Arbeitsschritt ausgeschlossen werden. Unter Disruption versteht man die vollständige mechanische Denaturierung des Plasmamembranverbands sowie der Kern- und Organellenmembranen. Da auf diese

Weise die gesamte zelluläre RNA der Isolationsmethode erst zugänglich gemacht wird, ist dies ebenfalls eine Grundvoraussetzung für die Probenprozessierung im Rahmen einer zuverlässigen Genexpressionsanalyse. Unter Homogenisierung versteht man die Ausübung von mechanischen Scherkräften auf die genomische DNA und andere hochmolekulare Biomoleküle zur Verringerung der Viskosität des durch die Disruption entstandenen Zellslysats. Die Proben wurden diesem Zellaufschlussverfahren jeweils dreimal ca. 15 s bei 30 000 Umdrehungen/s unterzogen bis makroskopisch keine Gewebestücke mehr zu erkennen waren und der Puffer gleichmäßig getrübt war. Des Weiteren wurde gemäß den Herstellerangaben zur Isolation von zellulärer Gesamt-RNA aus tierischem Gewebe verfahren (RNeasy® Mini Handbook, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), wobei die RNeasy-Silicagelsäule in Schritt acht für fünf min mit dem Puffer RW1 bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wie dies vom Hersteller bei potenziellen Problemen mit DNA-Kontaminationen vorgeschlagen wird. Da sich in den ersten Isolationen eine erhebliche Kontamination des Isolats mit genomischer DNA zeigte, wurde der im Protokoll optional vorgesehene DNase-Verdau mit DNase I (RNase-Free DNase Set, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wie vom Hersteller vorgesehene (RNeasy® Mini Handbook, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Elution der RNA von der Gelmatrix wurde mit sterilem und RNase-freiem Wasser vom kommerziellen Anbieter (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) durchgeführt, wobei jeweils 50 µl eingesetzt wurden und mit diesem Volumen nach der ersten Elution eine zweite Elution zur Erhöhung der Ausbeute durchgeführt wurde. Zur Bestimmung von Quantität und Qualität der gewonnenen RNA wurde die UV-Absorptionsspektrophotometrie angewandt. Dabei wird die Eigenschaft von Nukleotidsequenzen Licht der Wellenlänge im Bereich um 260 nm zu absorbieren ausgenutzt. Mittels eines Umrechnungsfaktors wurde der Absorptionswert in eine RNA- bzw. DNA-Konzentration überführt. Die RNA-Eluate wurden dafür 1/25 in TE-Puffer verdünnt (3 µl RNA-Eluat in 72 µl RNase-freies Wasser) und in der dafür vorgesehenen Küvette in einem Spektrophotometer (SmartSpec™ 3000, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) der Messung unterzogen, wobei jeder ermittelte Wert dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung entsprach. Zur Bestimmung der Reinheit der RNA-Isolate wurde der Quotient der UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Eine Verunreinigung der Isolate, v. a. mit Protein würde sich in einer höheren Absorption bei 280 nm auswirken und somit den Wert des Quotienten

erniedrigen. Bei Werten um 1,9 ist von einem weitgehend proteinfreien RNA-Isolat auszugehen. Da die Bestimmung dieses Absorptionsquotienten auch stark vom pH der Lösung abhängt (Wilfinger et al. 1997) wurde wie bereits oben erwähnt in einem gepufferten System gearbeitet. Die RNA-haltigen wässrigen Eluate wurden zur Langzeitlagerung im Gefrierschrank bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Die konservierenden Eigenschaften der verwendeten Puffer ermöglichten es die Probenprozedur bei Raumtemperatur durchzuführen.

3.3 Reverse Transkription (cDNA-Erststrangsynthese)

Zur Umschreibung der zellulären RNA in ihr komplementäres Einzelstrang-DNA-Korrelat (Erststrang-cDNA, im weiteren cDNA genannt) wurde auf das Omniscript™ bzw. das Sensiscript™ RT-System (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) zurückgegriffen. Die Systeme, bestehend aus Reverser Transkriptase, zehnfach konzentrierter Reaktionspuffer, dNTP-Mischung (5 mM) und RNase-freiem Wasser, wurden auf Trockeneis angeliefert und umgehend in einen Gefrierschrank bei -20°C eingelagert.

Die RT-Reaktionen wurden als 20 μl -Reaktionen auf Eis angesetzt, wodurch unkontrollierte cDNA-Synthese und RNA-Abbau verhindert werden sollten. Um eine möglichst homogene Verteilung der verschiedenen Reaktionskomponenten und damit vergleichbare RT-Effizienzen in den verschiedenen Reaktionsansätzen zu erreichen, wurden alle Reaktionskomponenten mit Ausnahme der RNA-Lösung als einzige gewebe- und entwicklungszeitpunktspezifischer Komponente als Stammlösung angesetzt. Dabei wurde gemäß den Angaben des Herstellers verfahren (Handbuch für den Omniscript™ RT-Kit, 10/2000, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) und pro Reaktionsansatz 2 μl Oligonukleotide (Random Decamere 50 μM , MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland), 2 μl zehnfach konzentrierter Reaktionspuffer, 2 μl dNTPs (5 mM) und 0,5 μl RNase-Inhibitor (40 Units/ μl , Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, England) und 1 μl des hitzeempfindliche RT-Enzyms eingesetzt. Pro Reaktionsansatz wurden hierauf 7,5 μl der zuvor homogenisierten Stammlösung in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß verbracht und als letzte Reaktionskomponente 12,5 μl der gewebe- und entwicklungszeitpunktspezifischen, auf Eis aufgetauten, RNA-Lösung hinzugefügt. Die RNA-Lösungen waren vorher auf

64 ng RNA/ μl verdünnt worden, so dass im endgültigen Reaktionsansatz 800 ng RNA vorhanden waren. Das endgültige 20 μl Reaktionsvolumen wurde durch mehrmaliges Aufnehmen mit der Pipette homogenisiert und in der Tischzentrifuge kurz auf den Grund des Reaktionsgefäßes abzentrifugiert.

Reaktionskomponente	Volumen (μl)	Konzentration in der Reaktion
Oligonukleotide (50 μM)	2,0	5,0 μM
10x Reaktionspuffer	2,0	1x
dNTPs (5 mM)	2,0	0,5 mM
RNase-Inhibitor (40 U/ μl)	0,5	1 U/ μl
RT-Enzym	1,0	--
RNA-Lösung (64 ng/ μl)	12,5	40 ng/ μl
Gesamtvolumen	20,0	

Tabelle 5: RT-Pipettierschema

Die Reaktionslösungen wurde hierauf in einem Thermocycler (iCyclerTM, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) für 60 min auf die optimale Reaktionstemperatur der Reversen Transkriptase von 37 °C erwärmt und abschließend für 5 min auf 93 °C erhitzt. Diese terminale Denaturierung des RT-Enzyms verhindert, dass das Enzym, welches als Bestandteil des RT-Reaktionsansatzes auch ein Bestandteil des PCR-Reaktionsansatz werden wird, in seinem nativen Zustand mit der Taq-Polymerase in Kontakt kommt, wodurch es inhibitorische Auswirkungen auf die PCR hätte (Chandler et al. 1998). Nachdem die Proben im Thermocycler auf 4 °C heruntergekühlt worden waren, wurden sie bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert. Parallel zu jedem Reaktionsansatz wurde ein sog. RT-Minus Kontrolle durchgeführt, in welcher anstelle des RT-Enzyms das entsprechende Volumen steriles und RNase-freies Wasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) verwendet wurde. In Abwesenheit des katalysierenden Enzyms konnte es nicht zur Synthese von ssDNA kommen. Sollte sich in der anschließenden PCR doch eine Matrize für eine Amplifikationsreaktion finden, wies dies auf eine, den DNase-Verdau überstandene, Verunreinigung mit genomischer DNA hin. Generell wurde das OmniscriptTM-Enzym (Qiagen GmbH,

Hilden, Deutschland) verwendet, lediglich bei der Reversen Transkription der RNA der Embryonen vom Entwicklungszeitpunkt E0 von der, auf Grund der geringen RNA-Extraktionseffizienz für diese Proben, nur ca. 40 ng RNA eingesetzt werden konnten, sollte sich laut Hersteller das Sensiscript™ RT-System (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) besser eignen und wurde entsprechend analog zum Omniscript™-Enzym verwendet.

Zum Einsatz als Einzelstrang-DNA-Matrize in der *real-time* RT-PCR wurden die RT-Reaktionsansätze 1/40 mit sterilem Wasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) verdünnt, so dass eine Konzentration von 1 ng RNA bzw. cDNA-Korrelat/ μl zustande kam.

3.4 Oligonukleotidkonstruktion

Sämtliche in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotidpaare wurden eigens entworfen und beim kommerziellen Anbieter (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) zur Synthese in Auftrag gegeben. Die Nukleotidsequenzen der jeweiligen Zielgene wurde der NCBI-Nukleotiddatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) entnommen und die entsprechenden, über eine Teilsequenz von ca. 20 bp identischen bzw. komplementären Oligonukleotide mittels eines frei verfügbaren Computerprogramms (*Primer3*: <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3 WWW.cgi>), welches in der Literatur empfohlen wird (Bustin 2002), entworfen (s. Tab. 6).

Die Oligonukleotidsequenzen für das Zielgen VEGF wurden dabei so gewählt, dass sie in Konsensussequenzen aller Isoformen banden und somit alle Splicevarianten von VEGF in der *real-time* RT-PCR erfasst wurden. Die Sequenzen des Flt-1_cons Oligonukleotidpaars waren so gewählt, dass sowohl das für das lösliche, wie für das membranständige Protein kodierende Transkript erfasst wurde, also ebenfalls an einer Konsensussequenz band. Ein geeignetes Oligonukleotidpaar, welches lediglich die lösliche Form von Flt-1 erfasst hätte, wäre wünschenswert gewesen, ließ sich jedoch auf Grund der geringen Sequenzunterschiede zur Konsensussequenz nicht finden. Die benutzerdefinierten Parameter des *Primer3*-Computerprogramms wurden dabei so eingestellt, dass das zu amplifizierende Amplicon ein Größe von 300 bp nicht überschreiten würde. Dies war vorteilhaft, da sich ein zu großes

Amplifikationsprodukt mindernd auf die Amplifikationseffizienz auswirkt (Bustin 2000, Ginzinger 2002).

Zielgen	Nukleotidsequenz	Amplicongröße (bp)	Accession-Nr.
Flk-1_v	ggagtttcccagagaccgac	89	AB066660
Flk-1_r	caatcccaaaggcatcagc		
Flt-cons_v	tcgcctctctgccgtctc	166	AB065372
Flt-cons_r	tgtctgccattcagctca		
Flt-ms-v	cgaggaaatacagcaagaatcag	244	AB065372
Flt-ms_r	gaagagggtcagcaggagc		
VEGF_v	agaatgtgtccctgtggatgtg	80	AB011078
VEGF_r	gcgctatgtgctgactctgatg		
c-kit_v	gacaggaggagggttgcttac	208	D13225
c-kit_r	agatgaaatgacttgaggagg		
SCF_v	accaacactgaattgaacaacaaga	87	D13516
SCF_r	accccaatgccacacaaag		
VE-Cad._v	tctcatcctgtgctgctttcatc	78	AF522067
VE-Cad._r	ctttcccactgccaccaaac		
FGF2_v	agcgatccgcacatcaaac	110	M95707
FGF2_r	agcaatctgccatcctccttc		
Ang1_v	gaagtcaatggaggaggatgga	110	AJ539549
Ang1_r	tcacctgatgggctacaaaac		
BMP2_v	tgggtttgtggtggagggtg	195	NM_204358
BMP2_r	cgctgtttgtgttcgcttg		
BMP4_v	ccgaccacctaactccac	177	X75915
BMP4_r	accctccaccaccatctc		
18S rRNA_v	ctcaacacgggaaacctcac	265	M59389
18S rRNA_r	cggacatctaagggcatcac		

Tabelle 6: Sämtliche in der *real-time* RT-PCR verwendete Oligonukleotide (_v: vorwärts, _r: rückwärts) einschließlich der Länge des jeweiligen Amplifikationsprodukts (bp) und der NCBI-Identifikationsnummer des Zielgens (Accession-Nr.)

Der Parameter Schmelztemperatur (*Primer T_m*) wurde dem Programm mit 61 bis 63 °C vorgegeben, was ein in der Literatur etabliertes Zweischnitt-Amplifikationsprogramm mit einem kombinierten Anlagerungs- und Elongationsschritt bei 60°C für 60 s ermöglichte (Hamalainen et al. 2001, Kipar et al. 2001, Chu et al. 2002, Liu & Saint 2002 a & b, Menne et al. 2002, Tricarico et al. 2002). Bei diesem Zweischnittthermoprotokoll kommt es nach einer kurzen thermischen Denaturierung der dsDNA in ihre Einzelstränge zu einem einminütigen kombinierten Anlagerungs- und Amplifikationszyklus bei 60°C. Der GC-Gehalt (*Primer GC%*) der Oligonukleotide wurde mit 20 bis 80 % vorgegeben und eine Oligonukleotidlänge im Bereich von ca. 20 Basen angestrebt. Die beiden Komplementaritätsparameter (*Max Self Complementarity, Max 3' Self Complementarity*) wurden dahingehend optimiert, dass sie möglichst geringe Zahlenwerte aufwiesen. Dies sollte die Amplifikation unerwünschter Nebenreaktionsprodukte, sog. Primer-Dimere, weniger wahrscheinlich machen. Solche Nebenreaktionen verringern ganz allgemein die Amplifikationseffizienz der PCR. In der *SYBR Green I*-gestützten *real-time* RT-PCR ist die Amplifikation von unspezifischen Produkten besonders kritisch zu bewerten, da dieses rein dsDNA spezifische Fluorophor keine Unterscheidung von spezifischem und unspezifischem Amplifikationsprodukt in der PCR selber zulässt. Die Oligonukleotide wurden in gefriergetrocknetem Zustand geliefert, mit sterilem Wasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) zu einer Konzentration von 100 µM aufgenommen und bei –20°C aufbewahrt. Von diesen Stammlösungen wurden Aliquots der jeweiligen Oligonukleotidpaare in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß verbracht und mit sterilem Wasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) auf 1,2 µM verdünnt, so dass die zusammengehörigen Vorwärts- und Rückwärtsoligonukleotide eines Zielgens bereits in einer Lösung kombiniert vorlagen. Diese Aliquots wurden zur täglichen *real-time* RT-PCR-Routine eingesetzt und maximal 6 Wochen lang bei 4°C gelagert, wonach sie erneut aus der Stammlösung angesetzt wurden.

3.5 Qualitative PCR und Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der Spezifität der Oligonukleotide für die entsprechenden Zielgene wurden die Amplifikationsprodukte der entworfenen Oligonukleotide aus einer

konventionellen PCR einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Die PCR-Reaktionsansätze setzten sich aus 25 µl eines zweifachkonzentrierten Master-Mixes (2x Thermo-Start^R PCR Master Mix, Abgene, Hamburg, Deutschland), bestehend aus Reaktionspuffer samt 5 mM MgCl₂, Thermo-Start^R DNA-Polymerase sowie den vier Deoxynukleotidtriphosphaten zu je 0,4 mM, 12,5 µl cDNA und 12,5 µl der 1,2 mM Lösung des spezifischen Oligonukleotidpaares zusammen. Das Dreikomponentengemisch zu 50 µl wurde homogenisiert, auf den Boden des PCR-Reaktionsgefäßes zentrifugiert und in einen Thermocycler (iCyclerTM, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) verbracht. Dort wurde die im Reaktionsansatz enthaltene Thermo-Start^R DNA-Polymerase für 15 min bei 95 °C hitzeaktiviert und daraufhin für 40 Zyklen einem Zweischnittprogramm von 15 s bei 95 °C und 60 s bei 60 °C ausgesetzt. Nach Beendigung des letzten Amplifikationszyklus wurden die Reaktionsansätze vom Thermocycler auf 4°C heruntergekühlt und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikationsprodukte nach ihrer Größe wurde ein 2%iges-Agarosegel (Metaphor Agarose, FMC Bioproducts, Rockland, USA) mit 16 Probestaschen hergestellt und in eine DNA Pocket bloc-Elektrophoresekammer (Biozym Diagnostics, Hess. Oldendorf, Deutschland) gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war wurde es mit 60 ml TBE-Puffer (s. Tab. 7) überschichtet, 15 µl des PCR-Reaktionsansatzes mit 2 µl Blaupuffer (s. Tab. 8) vermischt und in eine der Probestaschen des Gels pipettiert. In eine der Taschen wurden 2 µl ein dsDNA-Größenstandard (578 bp-Marker Roche V, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) vermischt mit 10 µl Aqua bidest. und 2 µl Blaupuffer gegeben.

Bestandteil	Menge
Tris (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland)	108 g
Borsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)	55 g
EDTA (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland)	9 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml, pH 8 mit Essigsäure eingestellt

Tabelle 7: Zusammensetzung des 10fach TBE-Puffers

Bestandteil	Menge
Ficoll-400 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)	1,5 g
EDTA (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland)	0,3722 g
SDS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)	0,1 g
Bromphenolblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)	0,025 g
Aqua bidest.	ad 10 ml

Tabelle 8: Zusammensetzung des 10fach Blaupuffers

Nachdem das Gel mit allen Proben beladen worden war, wurde eine Spannung an die Elektrophoresekammer angelegt und zwar so dass sich die Probenfächer kathodenwärts befanden, die DNA-Proben im elektrischen Feld also zur Anode wandern würden. Nachdem die ersten 10 min eine Spannung von 15 V angelegt worden war, wurde die Spannung auf 35 V (Power Supply Modell 1000/500, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) erhöht und solange beibehalten bis die Front des Blaupuffers am gegenüberliegenden, anodenwärts gelegenen Ende des

Gels angekommen war. Dem TBE-Puffer in der Gelkammer wurden nun 15 µl einer 0,5 %igen Lösung mit Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) hinzugegeben. Dieses Molekül lagert sich als interkalierendes Fluorophor zwischen die Basenpaare der dsDNA ein, worauf sich seine Fluoreszenzausbeute ca. 20-30fach steigert und es mit einem Absorptionsmaximum bei 302 nm und 366 nm und einem Emissionsmaximum bei 590 nm, also innerhalb des sichtbaren Spektrums, zu fluoreszieren beginnt (Sambrook & Russell 2001). Die Auswertung des Gels erfolgte unter UV-Licht mittels des Transilluminators TFX-20M (Vilbert Lourmat, Marne-LaVallée, Frankreich). Für die Dokumentation wurde das Instant Camera System Polaroid MP 4+ (Polaroid, Cambridge, USA) und Polaroid Schwarz-Weiß-Filme vom Typ 667 (Polaroid, Cambridge, USA) verwendet.

3.6 Quantitative *real-time* RT-PCR

Der *real-time* RT-PCR Pipettieransatz bestand aus drei Komponenten, der gewebe- und entwicklungszeitpunktspezifischen cDNA, dem ziel- bzw. referenzgenspezifischen Oligonukleotidpaar und dem unspezifischen, zweifachkonzentrierten SYBR Green I Master-Mix (SYBR-MM) (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), welcher die attenuierte Taq-Polymerase in ihrem Reaktionspuffer samt der vier Oligonukleotidtriphosphate, 2,5 mM Mg²⁺ und den dsDNA-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I beinhaltete. Der SYBR-MM wurde in tiefgefrorenem Zustand vom Hersteller geliefert, vor der Verwendung aufgetaut und mit dem passiven Referenzfarbstoff Fluorescein (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) in einer Verdünnung von 1/50 000 versehen, sodass es in der endgültigen Reaktionslösung 1/100 000 vorlag. Fluorescein dient dem *real-time* Thermocycler als passiver Referenzfarbstoff zur Bestimmung der sog. *well factors* (engl.), welche vom iCycler-Programm vor jedem PCR-Lauf bestimmt werden mussten und zur Kompensierung von systemintrinsic Fehlern und Pipettierfehlern dienten. Einmal aufgetaut wurde der SYBR-MM bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Wie schon in der RT wurden die Reaktionskomponenten des PCR-Laufs eines Entwicklungstages als Stammlösung angesetzt um die Reaktionsbedingungen möglichst identisch zu halten. Dabei wurde pro Reaktionsansatz 3,75 µl verdünnter RT-Reaktionsansatz, welcher der PCR als

Matrize diente, zu einer Konzentration von 1 ng mRNA bzw. cDNA-Korrelat/ μl eines bestimmten Gewebes und Alters, z.B. Allantoisisolat vom Entwicklungszeitpunkt E5, mit 7,5 μl SYBR-MM pro Reaktionsansatz homogen vermischt und Aliquots von 12,15 μl in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Diesen Aliquots wurde 3,75 μl des genspezifischen Oligonukleotidpaares hinzugefügt, so dass sich ein endgültiges Reaktionsvolumen von 15 μl ergab. Die 1/4-Verdünnung, welche der RT-Reaktionsansatz im PCR-Reaktionsansatz erfuhr ergab in Kombination mit der 1/40-Verdünnung der RT-Ansätze (s.o.) eine Verdünnung von 1/160, so dass der störende Einfluss des RT-Reaktionsmilieus mit seinem andersartigen Reaktionspuffer zu vernachlässigen war. Da im Verlauf des Pipettierens Volumen v.a. durch Adsorption der Reaktionslösung an den Einmalspitzen der Pipetten verloren ging, war es notwendig ein größeres Volumen für die drei Komponenten der Stammlösung zu verwenden als es der Summe der einzelnen 15 μl -Reaktionsansätze entsprochen hätte. So wurden *in praxi* pro Reaktionsansatz 8,5 μl SYBR-MM mit 4,25 μl cDNA homogen vermischt und von diesen theoretisch vorhandenen 12,75 μl lediglich 12,15 μl mit 4,05 μl genspezifischem Oligonukleotidpaar homogen vermischt. Von den daraus resultierenden theoretisch vorhandenen 16,20 μl wurde das endgültige Reaktionsvolumen von 15,00 μl in ein Reaktionsgefäß einer 96-Lochplatte (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) verbracht. Da die Reaktionen als Triplikate angesetzt wurden, wurde jeweils das Dreifache des angegebenen Volumens pipettiert. Das geringe Reaktionsvolumen von 15 μl mit seinem großen Oberflächen-Volumen Verhältnis ermöglichte eine rasche und homogene Temperaturänderung im Verlauf der PCR innerhalb des Reaktionsansatzes und hielt außerdem den Verbrauch der teilweise limitierten Reagenzien (v.a. cDNA) gering.

Reaktioskomponente (Konzentration)	Pipettiertes Volumen (μl)	Volumen in der Reaktion (μl)	Konzentration in der Reaktion
cDNA-Lösung (1 ng/ μl)	4,25	3,75	0,25 ng/ μl
SYBR-MM (2x)	8,50	7,50	1x
Oligonukl.paar (1,2 μM)	4,05	3,75	0,3 μM
	--	= 15,00	--

Tabelle 9: *real-time* RT-PCR-Pipettierschema

Nachdem die Lochplatte mit allen Reaktionsansätzen beschickt worden war, wurde sie mit einer transparenten Klebefolie (iCycler iQ Optical Qual Tape, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) abgeschlossen, wodurch einerseits ein Verdunsten der Reaktionsansätze vermieden wurde, andererseits aber der Austritt von Fluoreszenzlicht zur Detektion im optischen Modul des *real-time* Thermocyclers (iCycler, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) gewährleistet war. Die Lochplatte wurde daraufhin in die dafür vorgesehene Aussparung des *real-time* Thermocyclers (iCycler, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) verbracht. Die Anordnung der Reaktionen auf der Lochplatte, sowie das Reaktionsvolumen von 15 µl, waren bereits vor Beginn der Pipettierarbeiten in die entsprechende Maske der iCycler-software (iCycler™ iQ, Optical System Software, Version 3.0a, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) eingegeben, so dass dem PCR-Lauf nur noch ein Dateiname zugeordnet werden musste und das zuvor entworfene Temperaturprogramm (s. Tab. 10) damit gestartet werden konnte. Die sog. *well factors* (engl.) wurden dynamisch bestimmt, also anhand der Probenreaktionsansätze auf der experimentellen Lochplatte selbst (iCycler-Programmparameter: *Select well factor source: Experimental Plate*).



Abbildung 2: iCycler iQ Real-Time PCR Detektionssystem (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) bestehend aus Thermocycler (untere Hälfte) und optischem Modul (obere Hälfte).

Da es sich bei der verwendeten Taq-Polymerase (HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) um ein attenuiertes Enzym handelte, welches erst thermisch zu aktivieren ist, startete das Temperaturprofil mit einem einmaligen

Erhitzen der Reaktionen auf 95 °C für insgesamt knapp 15 min (s. Tab. 10). Darauf begann das eigentliche, aus zwei, für 40 Zyklen wiederholten, Schritten bestehende Amplifikationsprogramm. Einem 15 s langen Schritt bei 95 °C, in welchem die, erstmalig im zweiten Zyklus vorliegende dsDNA thermisch denaturiert, i.e. aufgeschmolzen wurde, folgte ein 60 s langer Schritt bei 60 °C, in welchem sich zuerst die Oligonukleotide an die komplementären Teilsequenzen ihrer Zielgen-cDNA anlagern sollten, i.e. hybridisieren, und darauf die dsDNA-abhängige Taq-Polymerase die Elongation einleitete. Die sich von Zyklus zu Zyklus theoretisch genau verdoppelnde dsDNA stellte vermittels ihrer kleinen Furche den Bindungspartner für das SYBR-Green I dar, welches daraufhin mit einem Excitationsmaximum bei 494 nm und einem Emissionsmaximum bei 521 nm zu fluoreszieren begann. Dieses, der vorhandenen Menge an dsDNA proportionale Signal wurde von dem, mit einer CCD-Kamera versehenen, optischem Modul des *real-time* Thermocycler (iCyclerTM iQ, Optical System Software, Version 3.0a, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) gemessen und über einen PC auf einem Monitor als relative Fluoreszenzintensität gegen die Zyklusanzahl (*Background Subtracted RFU/Cycle*) abgebildet (s. Abb. 3).

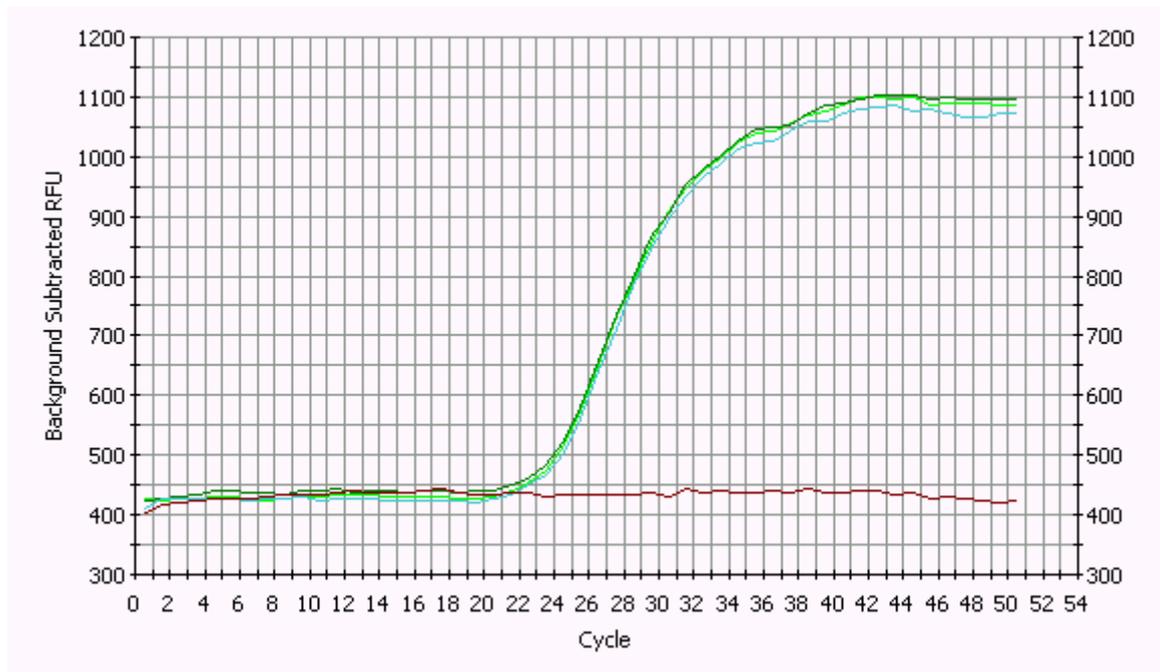


Abbildung 3: Zweifach lineare Abbildung der Amplifikationsreaktion eines Dreifachansatzes einer Probe (grün) und einer Negativkontrolle (braun) ohne Basislinienkorrektur (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: PCR-Zyklusanzahl). (iCycler™ iQ, Optical System Software, Version 3.0a, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)

Abschnitt	Wiederholungen	Schritt	Dauer (min:sec)	Temp.-endpunkt (°C)	Schmelzkurve	Temp.abfall (°C)
1	1	1	14:45	95.0		
2	40	1	00:15	95.0		
		2	01:00	60.0		
3	1	1	00:30	95.0	+	
4	150	1	00:10	95.0	+	0.2
5	1	1				

Tabelle 10: Temperaturprogramm der *real-time* RT-PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse (iCycler™ iQ, Optical System Software, Version 3.0a, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)

Nach Beendigung des PCR-Laufs und der direkt daran angeschlossenen Schmelzkurvenanalyse wurden die Fluoreszenzdaten aus dem hintergrundsfluoreszenzkorrigierten in den basislinienkorrigierten Modus (iCycler-Programmparameter: *Select Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted*) überführt, in dem sie dermaßen verrechnet wurden, dass die Basislinie sämtlicher RFU/Zyklus-Graphen der ersten Zyklen, vor dem Auftreten messbarer Fluoreszenz, der Nulllinie der RFU-Achse (y-Achse) entsprach (s. Abb. 4).

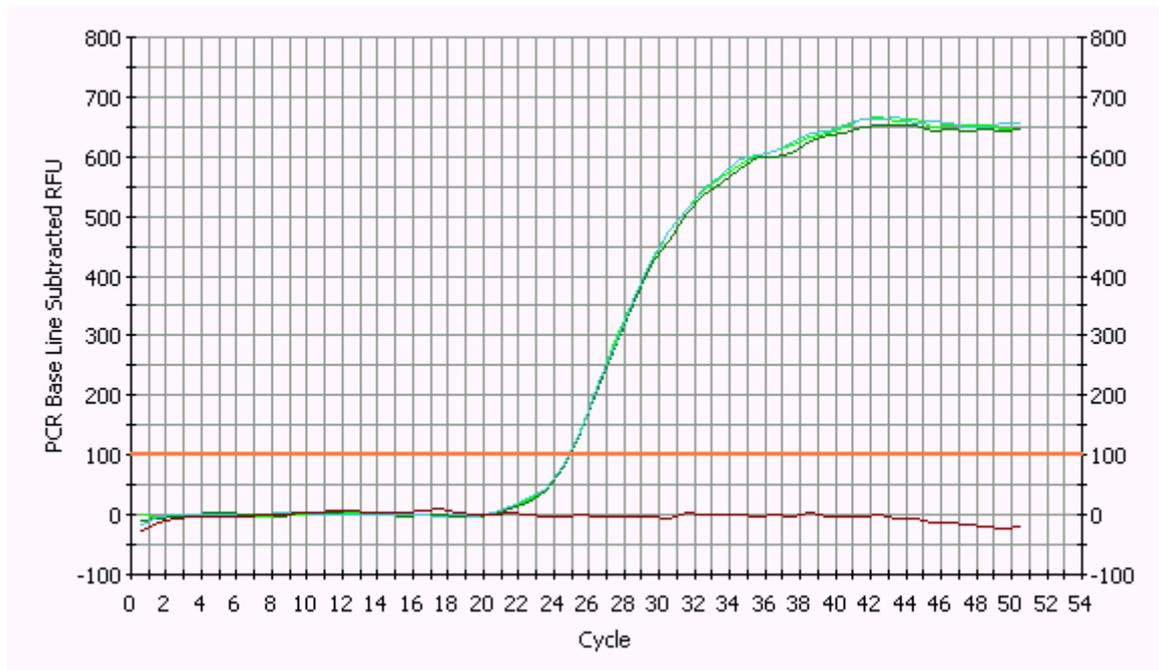


Abbildung 4: Zweifach lineare Abbildung der Amplifikationsreaktion eines Dreifachansatzes (grün) und einer Negativkontrolle (braun) mit Basislinienkorrektur. Schwellenwert (oranger Balken) auf 100 RFU eingestellt (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: PCR-Zyklusanzahl). (iCycler™ iQ, Optical System Software, Version 3.0a, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)

Die dafür notwendige Basislinienkorrektur wurde entsprechend der Herstellerempfehlung (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) im automatischen Modus vom Programm durchgeführt (iCycler-Programmparameter: *Baseline Cycles: Auto Calculated*). Der RFU-Schwellenwert wurde als benutzerdefinierter Parameter (iCycler-Programmparameter: *Threshold Position: User Defined*) so gewählt, dass er mitten in die logarithmische Phase (log-Phase) der

Amplifikation fiel. Diese log-Phase kennzeichnete sich durch einen linearen Anstieg in der Betrachtung mit logarithmisch aufgetragenen RFU-Werten auf der y-Achse (s. Abb. 5).

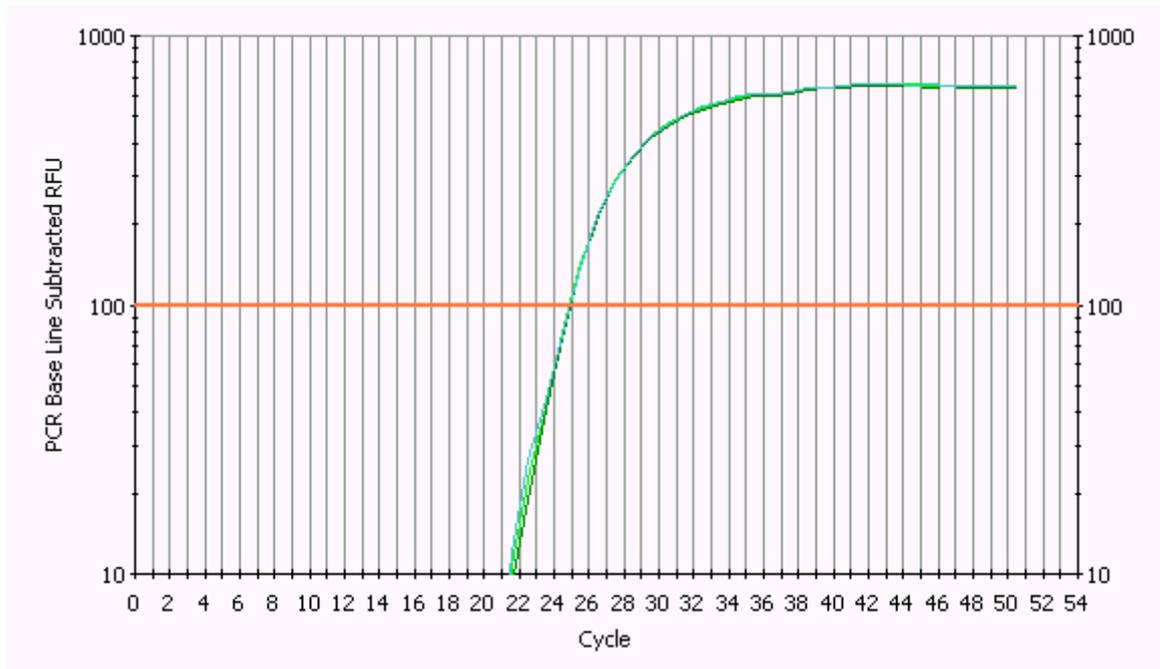


Abbildung 5: : Einfach logarithmische Darstellung der Amplifikationsreaktion eines Dreifachansatzes einer Probe mit Basislinienkorrektur; Schwellenwert auf 100 RFU eingestellt (y-Achse: \log_{10} relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: PCR-Zyklusanzahl). (iCycler™ iQ, Optical System Software, Version 3.0a, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)

Als Negativkontrollen wurden in jedem PCR-Lauf sog. Wasserkontrollen (engl.: No Template Controls) für jedes der 12 verwendeten Oligonukleotidpaare und RT-Minus-Kontrollen für jeden im Lauf verwendeten RT-Reaktionsansatz durchgeführt. In den Wasserkontrollen wurde dem Reaktionsansatz an Stelle des RT-Reaktionsansatzes steriles Wasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) hinzugefügt. Ohne DNA-Matrize konnte es nicht zur Amplifikation des spezifischen Produkts kommen, so dass die Entstehung von Amplifikationsprodukten auf eine unspezifische Hybridisierung der Oligonukleotide durch partielle Selbstkomplementarität bzw. eine Kontamination des Reaktionsansatzes mit DNA hinwies. Eine negative RT-Minus Kontrolle stellte sicher, dass es sich bei einer Amplifikation nicht um genomische DNA aus der RNA-Isolation als Matrize handelte.

Zur Normalisierung gegen Abweichungen der verschiedenen cDNA-Reaktionsansätze hinsichtlich der Effizienz in RNA-Isolation und Reverser Transkription sowie zur Normalisierung von Schwankungen hinsichtlich des Pipettierens, also der in der PCR eingesetzten Menge an cDNA-Matrize, wurde das Referenzgen 18S rRNA verwendet.

Da die *real-time* RT-PCR mit den Schwellenwertzyklen diskrete Werte als Ergebnisse hervorbringt, sind diese Ergebnisse auch einer statistischen Auswertung zugänglich. Sämtliche Reaktionsansätze der *real-time* RT-PCR wurden dreifach als sog. Triplikate angesetzt und dem iCycler-Programm als solche deklariert. Somit konnten von der iCycler-Software die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der Schwellenwertzyklen als Maß für ihre Präzision errechnet werden.

3.7 Schmelzkurvenanalyse

Unmittelbar im Anschluss an eine *real-time* RT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt mittels derer sich der Schmelzpunkt der Amplifikationsprodukte bestimmen lässt. Der spezifische Schmelzpunkt eines Amplicons ist dabei definiert als diejenige Temperatur, bei der die Änderung der Fluoreszenzintensität mit der Änderung der Temperatur ($-dRFU/dT$) maximal ist. Durch Auftragen des Wertes $-dRFU/dT$ auf der y-Achse gegen die Temperatur auf der x-Achse ergibt sich die Schmelzkurve als ein zweidimensionales Profil (s. Abb. 6).

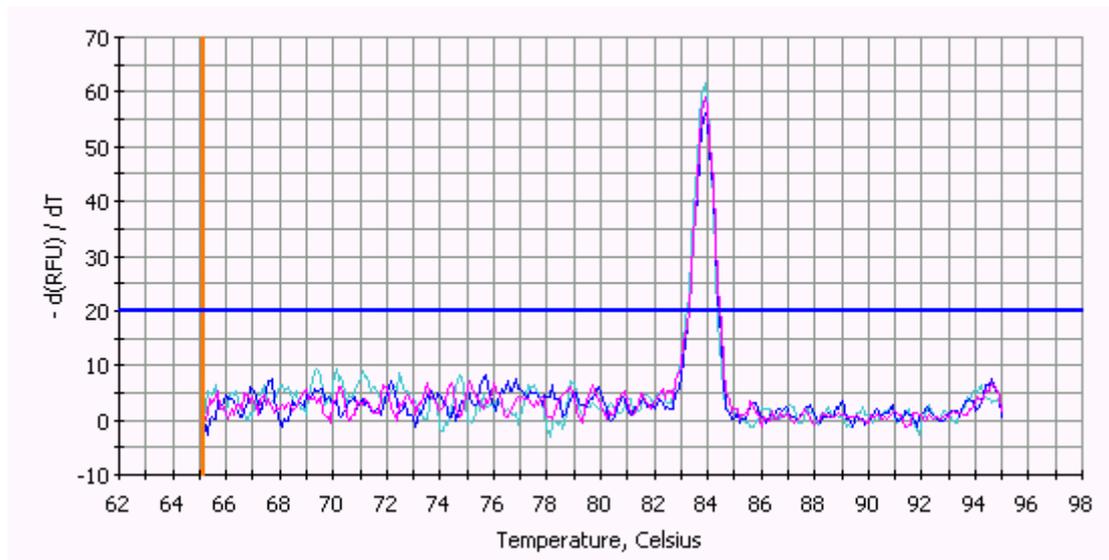


Abbildung 6: Schmelzkurvenprofil für die Amplifikationsprodukte eines Dreifachreaktionsansatz des 18S rRNA Oligonukleotidpaares. Der Schmelzpunkt liegt bei knapp 84 °C. (y-Achse: $-dRFU/dT$ x-Achse: Temperatur in °C). (iCycler™ iQ, Optical System Software, Version 3.0a, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)

Da der rein dsDNA-spezifische Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I Amplifikationsprodukte aller Art unabhängig von ihrer Sequenz bindet und daraufhin ein Fluoreszenzsignal gibt, war dies notwendig um spezifische Amplifikationsprodukte von möglicherweise gebildeten, unspezifischen anhand von Schmelzpunkt und Profil der Schmelzkurve unterscheiden zu können. Hierzu wurden die Reaktionsansätze nach dem letzten Amplifikationszyklus für 1 min auf 95 °C erhitzt und darauf die Temperatur alle 10 s in 0,2 °C-Schritten auf 65 °C abgesenkt (s.Tab. 10). Die konstant sinkende Temperatur erlaubte es den DNA-Einzelsträngen sich mit ihren komplementären Stränge zum doppelsträngigen Amplifikationsprodukt zusammenzulagern und zwar abhängig von Größe und GC-Gehalt des Amplicons, wobei größere und solche mit einem höheren GC-Gehalt bereits bei einer höheren Temperatur assoziierten. Die schrittweise Renaturierung zum doppelsträngigen Amplicon konnte über einen kontinuierlichen Fluoreszenzanstieg beobachtet werden und nach Beendigung des Schmelzkurvenprogramms bildete die iCycler-software die Daten als $-dRFU/d\text{Temperatur}$ gegen Temperatur ab, wodurch die Kurven zu Graphen mit Gipfeln transformiert wurden. Das Maximum eines solchen Gipfels stellt

die Temperatur der maximalen Fluoreszenzänderung dar und wird als Schmelzpunkt des Amplicons bezeichnet.

Zur Bearbeitung wurden die Schmelzkurvendaten des iCycler-Programms in Microsoft^R Excel^R importiert, so dass die Mittelwerte und Standardabweichungen der Reaktionsansätze einer Triplikatgruppe als Maß für die Präzision der Schmelzpunkte gebildet werden konnten.

3.8 Rechnergestützte Datenauswertung

3.8.1 Normalisierung, relative Quantifizierung und statistische Auswertung mittels des *Q-Gene* Computerprogramms

Zur Berechnung der Expressionslevel der Zielgene relativ zum Referenzgen 18S rRNA, i.e. zur Normalisierung gegen das Referenzgen (Pfaffl 2001), sowie zur Relation der Expressionslevel der unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkte zueinander und zur statistischen Bearbeitung der Daten wurde auf das Computerprogramm *Q-Gene* (Muller et al. 2002) zurückgegriffen. Die Werte der Schwellenwertzyklen der Ziel- und Referenzgene wurden aus der iCycler-software in eine Microsoft^R Excel^R-Tabelle importiert, so umgestellt, dass jedem Zielgen das Referenzgen aus dem entsprechenden PCR-Lauf zugeordnet war und hierauf in das *Q-Gene Core Module* des *Q-Gene* Programms eingefügt. Somit war es möglich die Mittlere Normalisierte Expression (MNE, engl.: Mean Normalized Expression) des betrachteten Gens zu errechnen, indem die SWZ-Werte eines Dreifachansatzes von Ziel- bzw. Referenzgen gemittelt wurden und der Quotient von Referenz- und Zielgenexpressionslevel gebildet wurde (s. Tab. 11, Muller et al. 2002)

Name der Formel	Mathematische Formel
Mittlere Normalisierte Expression (MNE)	$(AE_{RG})^{SWZ_{RG, Mittel}} / (AE_{ZG})^{SWZ_{ZG, Mittel}}$

Tabelle 11: Formel zur Berechnung der Mittleren Normalisierten Expression (Muller et al. 2002)

Zur relativen Quantifizierung, also zur Relation der verschiedenen Entwicklungsstadien zueinander und der verschiedenen Gewebe zueinander, wurden die MNE-Werte zweier aufeinanderfolgender Entwicklungsstadien bzw. zweier verschiedener Gewebe in das *Q-Gene Database Module* (s. Tab. 12, Muller et al. 2002) eingefügt, wobei die Werte des späteren Entwicklungszeitpunkts E_x als Gruppe A ausgewiesen wurden, und im Zähler zu stehen kamen und die des früheren Entwicklungszeitpunkts E_{x-1} als Gruppe B und im Nenner des Quotienten zu stehen kamen. Das Ergebnis einer solchen Relation war ein einheitsloser Wert, der die MNE des Entwicklungszeitpunkts E_x als Vielfaches bzw. Bruchteil der MNE des Entwicklungszeitpunkts E_{x-1} auswies.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	A/B	SA	VK (%)
E1	Embryo	Flt-1_cons	3,62E-05	2,93E-06	5,61	1,51	26,84
E0	Embryo	Flt-1_cons	6,45E-06	1,65E-06			
E1	Embryo	VEGF	1,17E-04	8,22E-06	3,18	0,40	12,60
E0	Embryo	VEGF	3,69E-05	3,87E-06			
E1	Embryo	SCF	2,04E-05	2,17E-06	1,85	0,30	16,24
E0	Embryo	SCF	1,10E-05	1,35E-06			

Tabelle 12: Beispiel für die Bearbeitung und Darstellung der Expressionsdaten mittels des *Q-Gene Database Module* des *Q-Gene*-Computerprogramms (Muller et al. 2002)

Als Maß für die Präzision der SWZ wurde die Standardabweichung der MNE bestimmt, wobei die Fehlerfortpflanzung im Verlauf der verschiedenen Verrechnung der SWZ nach der Gausschen Differentialgleichung zur Berechnung der Fehlerfortpflanzung vom *Q-Gene* Programm berücksichtigt wurde (Tabelle 2, Gleichungen 4-6 in Muller et al. 2002). Im *Q-Gene Database Module* wurde vom Benutzer noch eine Spalte angelegt, in welcher die Standardabweichung (SA) des Expressionsverhältnisses A/B zum Quotienten A/B in Bezug gesetzt und mit 100 multipliziert wurde. Dies entsprach dem Variationskoeffizienten (VK) der relativen Quantifizierung und ein Wert von unter 20 % wurde dabei angestrebt.

3.8.2 Ermittlung der Amplifikationseffizienz mittels des *LinRegPCR*-Computerprogramms

Zur Berechnung der Amplifikationseffizienz der einzelnen Reaktionen wurde das PC-Programm *LinRegPCR* (Ramakers et al. 2003) verwendet. Mit diesem lässt sich eine lineare Regressionsanalyse der Fluoreszenzdaten der einzelnen Amplifikationszyklen einer Reaktion durchführen. Die Fluoreszenzrohdaten pro Zyklus wurden dazu aus dem iCycler-Programm in eine Microsoft^R Excel^R-Tabelle eingefügt und von dort in das *LinRegPCR* Programm importiert. Mittels des im Programm standardmäßig verfügbaren Anpassungsalgorithmus „bester Korrelationskoeffizient mit mindestens drei Datenpunkten“ wurde eine lineare Regressionsgerade durch die RFU-Datenpunkte gelegt und vom Benutzer unter Berücksichtigung des Korrelationskoeffizient und der AE durch Hinzufügen bzw. Herausnehmen von Datenpunkten optimiert. Die Steigung dieser Geraden wurde vom Programm anhand von Formel 2 aus Tabelle 2 nach Ramakers et al. 2003 in die Amplifikationseffizienz umgerechnet. Hierauf wurden die erzeugten Daten in eine Microsoft^R Excel^R-Tabelle importiert, der Mittelwert und die Standardabweichung für den Dreifachansatz eines einzelnen Ziel- bzw. Referenzgens berechnet und die Daten in dieser Form abgespeichert. Nachdem diese Auswertungen für sämtliche Reaktionen aller Entwicklungszeitpunkte E0-E7 durchgeführt worden waren, wurden anhand einer Microsoft^R Excel^R-Tabelle die AE-Werte jedes einzelnen Oligonukleotidpaares aller PCR-Läufe gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

3.9 Ampliconaufreinigung und Ampliconansequenzierung

Um die Identität der Amplifikationsprodukte zu bestimmen und somit die Spezifität der Oligonukleotide nachzuweisen, wurden die Nukleotidsequenzen der Amplicons vom kommerziellen Anbieter durch Ansequenzierung bestimmt. Dazu war es notwendig die dsDNA-Amplicons aus dem PCR-Reaktionsansatz zu isolieren. Dies wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) vorgenommen. Dabei wurde gemäß den Angaben des Herstellers verfahren (QIAquick PCR Purification Kit Protocol) und der PCR-Reaktionsansatz mit dem 5 x Volumen PB-Puffer vermischt und 60 s in einem QIAquick Spin-Säulchen abzentrifugiert, wodurch die Silicagelmatrix mit der DNA beladen wurde. Der

Durchfluss wurde verworfen und auf das Säulchen 0,75 ml PE-Puffer, welcher zuvor mit Ethanol versetzt worden war, pipettiert. Dieser Waschpuffer wurde für 60 s durch das Säulchen abzentrifugiert, der Durchfluss verworfen und das Säulchen für 60 s trocken zentrifugiert. Hierauf wurde das Säulchen in eine steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt, 50 µl steriles Aqua bidest. zentral auf das Säulchen pipettiert und nach einminütiger Inkubationszeit für 60 s abzentrifugiert. Sämtliche Zentrifugationen wurden bei einer Beschleunigung von ca. 10 000 x g durchgeführt. Hierauf wurde die Konzentration und Reinheit der Eluate photometrisch bestimmt. Die Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung im Sequenzieransatz bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Zur Ansequenzierung wurden 30 µl der Eluate zum kommerziellen Anbieter GATC BIOTECH (GATC BIOTECH, Konstanz, Deutschland) verschickt, bei welchem sie nach dem *Run24 Supreme* Modus ansequenziert wurden. Die Spezifität der auf diese Weise ermittelten Ampliconsequenzen wurden durch einen Abgleich mit den Sequenzen der NCBI-Nukleotiddatenbank (NCBI BLAST: Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)) ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 RNA-Isolation, Reverse Transkription und qualitative PCR

Als Ausgangsmaterial für die Genexpressionanalyse mittels *real-time* RT-PCR wurde aus den Geweben der Embryonen die zelluläre Gesamt-RNA gewonnen.

Durch die Amplifikation von spezifischen dsDNA-Amplicons in den RT-Minus-Kontrollen der *real-time* RT-PCR, in denen es aufgrund der Abwesenheit der Reversen Transkriptase im RT-Reaktionsansatz nicht zur Synthese von cDNA kommen konnte, zeigte sich, dass die verwendete Methode zur Isolation von RNA keine absolute Trennschärfe in Bezug auf DNA und RNA besitzt. Erst unter Einschaltung eines spezifischen Verdauers der Desoxyribonukleinsäure mit DNase I (RNase-Free DNase Set, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) konnte die genomische DNA durch enzymkatalysierte Hydrolyse größtenteils aus der RNA-Präparation entfernt werden. In den Reaktionsansätzen für das Referenzgen 18S rRNA, dessen Genlocus mehrfach im haploiden Genom vorkommt, konnten noch immer DNA-Matrizen in den RT-Minus-Kontrollen nachgewiesen werden. Der SWZ für diese RT-Minus-Kontrollen lag im Bereich von Zyklus 25 bis 35, also mindestens 15 Zyklen nach dem SWZ der 18S rRNA Probe. Bei einer angenommenen AE von 95 % entspricht dies weniger als dem 22 000sten Teil der Matrizenanzahl in der RT-Minus-Kontrolle verglichen mit der Probe. Genomische DNA war als ein mRNA-Anzahl verzerrender Störfaktor nach dem DNase I-Verdau also zu vernachlässigen. Der Einsatz des Omniscript™ bzw. Sensiscript™ RT-Systems (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) erwies sich durch die fehlende Notwendigkeit, die RNA-Sekundärstruktur in einem gesonderten Zyklus in Abwesenheit der thermolabilen RT thermisch zu denaturieren, als sehr benutzerfreundlich und erlaubte ein unkompliziertes Ansetzen der Reaktionen. Vor ihrem Einsatz in der komplexeren *real-time* RT-PCR wurden die 12 Oligonukleotidpaare (s. Tab. 6) in der qualitativen PCR auf Spezifität hinsichtlich ihrer Zielensequenzen überprüft.

In der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese zeigten die in der qualitativen PCR verwendeten Oligonukleotidpaare einzelne Amplifikationsprodukte der erwarteten Größe, was ihren Einsatz in der *real-time* RT-PCR rechtfertigte.

4.2 real-time RT-PCR

4.2.1 Quantifizierungsreaktion

Die verdünnten cDNA-Reaktionsansätze wurden als Matrizen in der quantitativen *real-time* RT-PCR eingesetzt und der Verlauf der Reaktion konnte mittels eines PC's und des iCycler-Programms (iCycler™ iQ, Optical System Software, Version 3.0a, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) auf einem Monitor verfolgt werden. Es zeigten sich dabei bei einer zweifach linearen Abbildung der relativen Fluoreszenzstärke (y-Achse: PCR Base Line Subtracted RFU) gegen die Zyklusanzahl (x-Achse: Cycle) die typischen sigmoidalen Amplifikationskurven (s. Abb. 7)

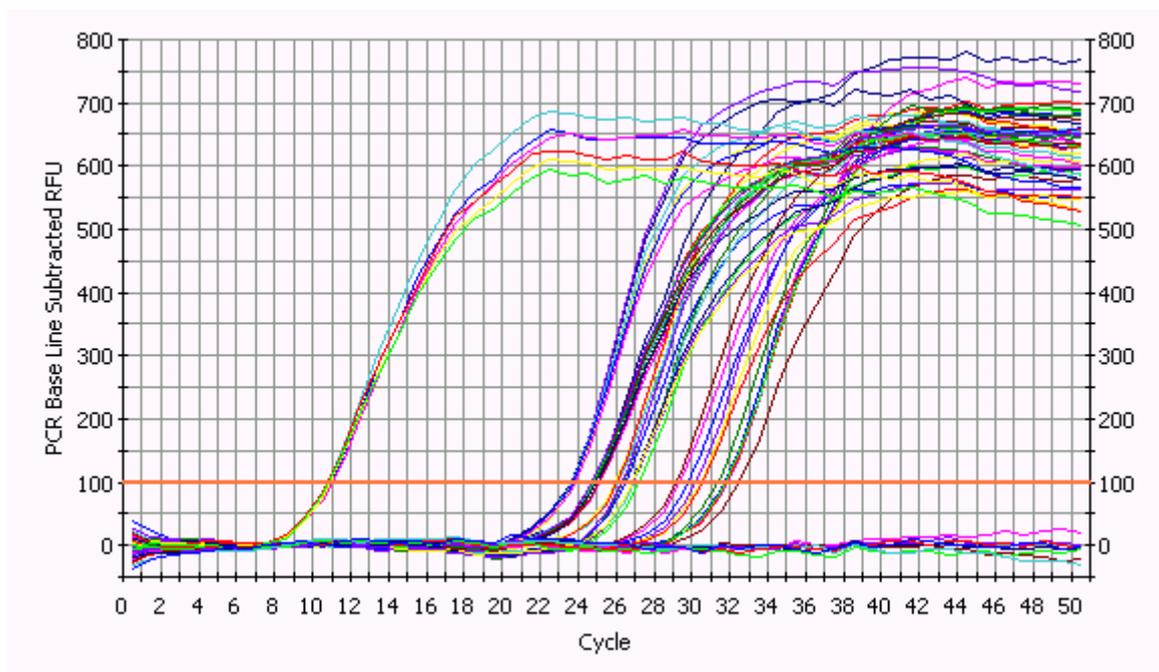


Abbildung 7: Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Proben und Negativkontrollen vom Entwicklungszeitpunkt E2; Schwellenwert auf 100 RFU eingestellt (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: PCR-Zyklusanzahl). (iCycler™ iQ, Optical System Software, Version 3.0a, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)

In den ersten Amplifikationszyklen war vom optischen Modul des iCycler kein Fluoreszenzanstieg zu detektieren, da dieser von der Hintergrundfluoreszenz im Reaktionsansatz maskiert wurde. Erst nach ca. 8 Zyklen für das Referenzgen 18S rRNA bzw. ca. 20 – 30 Zyklen für die verschiedenen Zielgene (s. Abb. 7) wurde der mit der exponentiellen Amplifikation gekoppelte Anstieg der Fluoreszenz für das optische Modul messbar indem er aus der Hintergrundfluoreszenz heraustrat. In der linearen Abbildung der Amplifikationskurve äußerte sich dies durch einen parabelhaften Anstieg über die von Anfang an bestehende Hintergrundfluoreszenz. Schon ca. 3 - 6 Zyklen nach diesem initialen Anstieg wies die Amplifikationskurve nur noch einen linearen Anstieg auf, was in der Reaktionskinetik dem Ende der exponentiellen Phase und dem Beginn der linearen Phase entsprach. Diese fiel kontinuierlich bis auf eine Steigung von null ca. 15 -20 Zyklen nach dem initialen Anstieg ab, was das Ende der Amplifikation aufzeigte. Eine diskrete Abtrennung der einzelnen Phasen voneinander ist auf Grund des fließenden Übergangs nicht möglich. Unabhängig vom Beginn der spezifischen Fluoreszenzdetektion, also von der anfänglichen Matrizenanzahl im Reaktionsansatz und von der Größe des Amplicons befand sich dieser Sättigungsbereich für die verschiedenen Amplicons in einem weiten Bereich von ca. 200 – 800 RFU. In der halblogarithmischen Darstellung \log_{10} RFU gegen Zyklusanzahl stellte sich der Bereich der exponentielle Amplifikation als Gerade dar (s. Abb. 7) und lies sich entsprechend leichter eingrenzen. Es zeigte sich, dass ein Schwellenwert von 100 RFU für die PCR-Läufe der Entwicklungstage E0 – E5 die Amplifikationskurven in ihrer exponentiellen Phase schnitt. Lediglich für die Entwicklungstage E6 und E7 wurde der Fluoreszenzschwellenwert bei 50 bzw. 20 RFU angesetzt da in diesen beiden PCR-Läufen die Fluoreszenz generell geringer war. Sämtliche Reaktionen wurden als Dreifachansätze durchgeführt und so konnten vom iCycler-Programm die Mittelwerte und die Standardabweichung der Schwellenwertzyklen bestimmt werden. Die Standardabweichungen lagen in einem Bereich von ca. 0,05 bis 1 Schwellenwertzyklus, wobei Reaktionen deren Amplifikationskurven erst nach ca. 30 Zyklen anstiegen, generell eine höhere Standardabweichung aufwiesen und bestimmte Oligonukleotidpaare (v.a. Flt-1_ms) auch durch eine weitere Streuung der Schwellenwertzyklen auffielen (s. Anhang).

4.2.2 Schmelzkurvenanalyse

Zur Ermittlung der Spezifität der Amplifikationsprodukte wurde direkt im Anschluss an jeden *real-time* RT-PCR Lauf ein Thermoprotokoll zur Schmelzkurvenanalyse sämtlicher Reaktionsansätze durchgeführt. Dabei ergaben sich Schmelzkurvenprofile wie in Abb. 8 beispielhaft dargestellt.

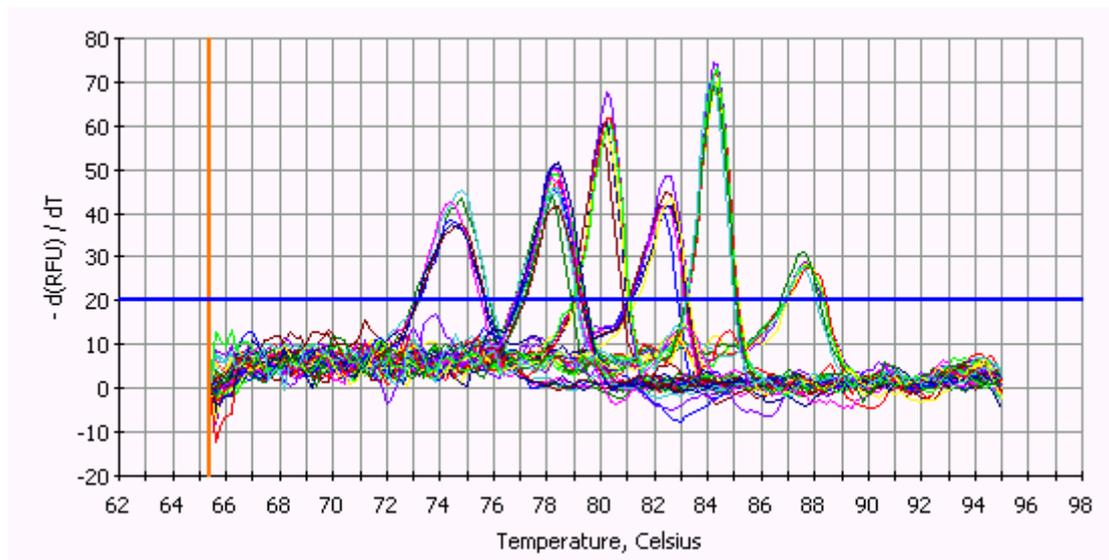


Abbildung 8: Schmelzkurvenprofil der Reaktionsansätze vom Entwicklungszeitpunkt E3 (y-Achse: $-d(RFU) / dT$, x-Achse: Temperatur in $^{\circ}C$). (iCyclerTM iQ, Optical System Software, Version 3.0a, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)

Alle Fluoreszenzanstiege überhalb eines benutzerdefiniert eingestellten RFU-Schwellenwerts, dargestellt durch den horizontalen blauen Balken in Abbildung 8 wurden dabei vom iCycler-Programm als Gipfel (engl.: peak) identifiziert und bekamen eine numerische Kennzeichnung (*ID*) zur eindeutigen Identifizierung. Neben der Schmelztemperatur, welche unabhängig von dem vom Benutzer eingestellten y-Achsen-Schwellenwert war, wurde ein Gipfel von einer Anfangstemperatur, einer Endtemperatur und der über der x-Achse bzw. dem y-Achsen-Schwellenwert eingeschlossenen Fläche charakterisiert. Zusätzlich wurde anhand der Tabellenkalkulation das arithmetische Mittel (AM) und die Standardabweichungen (SA) für die Schmelztemperatur der einzelnen Triplikatgruppen gebildet. Die Standardabweichung innerhalb der einzelnen Triplikatgruppen lag in einem Bereich von ca. 0,0 bis 0,3 $^{\circ}C$. Die

Schmelztemperaturmittelwerte der Triplikate gleicher Oligonukleotidpaare aus den unterschiedlichen PCR-Läufen zeigten, wie zu erwarten war, ähnliche Werte. Die Mittelwerte der Schmelztemperaturen sämtlicher Triplikatansätze wurden in einer Tabelle (s. Tab. 13) zusammengefasst und wiederum das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung identischer Oligonukleotidpaare aus den verschiedenen Läufen gebildet. Es zeigte sich, dass die Schmelztemperatur für einige Amplicons (Flk-1, Flt-1_cons, Flt-1_ms, c-kit, VE-Cad) in den verschiedenen Läufen sehr ähnlich war, was sich in einer geringen Standardabweichung von ca. 0,2 °C äußerte. Generell lag die Standardabweichung im Bereich von 0,2 bis 0,8 °C. Lediglich für die Oligonukleotidpaare FGF-2, BMP2 und BMP4 zeigte sich in den Läufen vom Entwicklungszeitpunkt E5, E6 und E7 eine um ca. 2 bis 3 °C tiefere Schmelztemperatur als in den vorhergehenden Läufen und somit eine höhere Standardabweichung bezogen auf dem Mittelwert aus allen Läufen.

	E0-Emb.	E1-Emb.	E2-Emb.	E2-DS	E3-Emb.	E3-DS	E4-Alla.	E4-DS
Oligonukl.								
Flk-1	n.d.	79,8	79,4	79,7	79,7	79,9	79,5	79,8
Flt-1_cons	n.d.	87,7	87,6	87,4	87,7	87,6	87,6	87,6
Flt-1_ms	n.d.	82,6	82,2	82,3	82,3	82,5	82,3	82,5
VEGF	80,5	78,5	78,1	78,1	78,3	78,3	78,3	78,1
c-kit	n.d.	80,5	80	80,2	80,1	80,3	80,1	80,4
SCF	76,8	74,6	74,5	74,3	74,7	74,5	74,5	74,5
VE-Cad	n.d.	81,2	80,5	80,7	80,9	81,1	80,7	80,8
FGF-2	79,7	81,2	79,8	79,9	79,5	79,7	79,7	79,7
Ang-1	n.d.	78	78,1	78,3	78,3	78,3	78	78,3
BMP2	84,2	84,8	84,3	84,3	84,8	84,6	84,5	84,7
BMP4	87,4	87,3	87,3	87,2	87,5	87,6	87,6	87,3
18S rRNA	86,3	84,1	83,9	83,9	84,3	84,3	84,2	84,1

Tabelle 13

	E5-Alla.	E5-DS	E6-Alla.	E6-DS	E7-Alla.	E7-DS	AM	SA
Fik-1	79,2	79,4	79,3	79,3	79,2	79,4	79,7	0,2
Flt-cons	87,4	87,2	87,2	87,1	87,3	87,2	87,6	0,1
Flt-ms	81,9	82,2	82	82,2	81,9	82,1	82,4	0,1
VEGF	77,9	78	77,9	77,9	78,2	78	78,5	0,8
c-kit	79,8	80	79,8	80,1	79,7	79,9	80,2	0,2
SCF	74,2	74,1	74,2	74	74	74,1	74,8	0,8
VE-Cad	80,5	80,7	80,4	80,7	80,5	80,7	80,8	0,2
FGF2	78,1	78,1	78	78	77,9	77,7	79,9	0,5
Ang1	79,1	79,4	79,2	79,4	79	79,3	78,2	0,1
BMP2	81,7	82	81,7	82	81,6	81,7	84,5	0,2
BMP4	85	84,9	85,1	85,1	84,9	84,9	87,4	0,1
18S rRNA	83,8	83,8	83,8	83,8	83,7	83,7	84,4	0,7

Tabelle 13: Aus den Triplikatanalysen gemittelte Schmelzpunkte (°C) der Amplifikationsprodukte aus den durchgeführten PCR-Läufen. Arithmetisches Mittel (AM) und Standardabweichung (SA) der Schmelzpunkte eines bestimmten Amplifikats sämtlicher Läufe (Alla: Allantois, DS: Dottersack, n.d.: nicht detektierbar).

Während die Schmelztemperatur der Amplifikationsprodukte gleicher Oligonukleotidpaare in den Läufen zu den verschiedenen Entwicklungstagen gewissen Schwankungen unterlag, wies das Profil und hier v.a. die Höhe der einzelnen Schmelzkurven auf die Erzeugung spezifischer Amplifikationsprodukte in sämtlichen zur Auswertung verwendeten Reaktionen hin.

4.2.3 Rechnergestützte Datenauswertung

4.2.3.1 Relative Quantifizierung

Mittels des Computerprogramms *Q-Gene* (Muller et al. 2002) wurden die Schwellenwertzyklusdaten aus der *real-time* RT-PCR dermaßen verrechnet, dass die zum Referenzgen 18S rRNA normalisierten Expressionswerte (Mittlere Normalisierte Expression: MNE) eines Oligonukleotidpaares, Entwicklungstages und Gewebes, also z.B. BMP2 in der Allantois vom Entwicklungszeitpunkt E4, als Vielfaches bzw. Bruchteil der Expressionswerte des vorhergehenden Entwicklungstages des gleichen

Gewebes und Zielgens zum Ausdruck kamen. Außerdem wurden ab dem Entwicklungszeitpunkt E2, ab welchem frühestens zwei Gewebe untersucht wurden, die Expressionswerte der verschiedenen Gewebe eines einzelnen Entwicklungstages und Oligonukleotidpaares miteinander verglichen, also die MNE des Embryos zu der MNE des Dottersacks (Entwicklungszeitpunkte E2-E3) bzw. die MNE aus der Allantois zu der MNE aus dem Dottersack (Entwicklungszeitpunkte E4-E7) in Relation gesetzt.

Für die Datenverarbeitung mittels *Q-Gene* wurde für alle Oligonukleotidpaare eine AE von 95 % angenommen. Dieser Wert ergab sich anhand der Amplifikation mehrerer Standardkurven (Kamphuis et al. 2001, Meijerink et al. 2001) für verschiedene Oligonukleotidpaare unter der Bedingung einer Schmelzkurve mit lediglich einem Gipfel und einer einzelnen Bande der erwarteten Größe in der Agarosegelelektrophorese.

Die zum Referenzgen 18S rRNA normalisierten Expressionswerte (MNE) der einzelnen Zielgene stellten sich dabei als einheitsloser Quotient dar und lagen im Bereich von $5,5 \times 10^{-4}$ bis $2,8 \times 10^{-8}$. Dieser bei einem Bruchteil von eins liegende Zahlenwert spiegelt den sehr hohen Anteil der ribosomalen RNA im Verhältnis zur betrachteten mRNA-Spezies wider. Die mittleren normalisierten Expressionswerte der einzelnen Oligonukleotidpaare aus den verschiedenen PCR-Läufen sind im folgenden in tabellarischer Form wie diese vom Computerprogramm *Q-Gene* erstellt wurde wiedergegeben (s. Tab. 14-26). Lediglich die rechte Spalte zur Berechnung des Variationskoeffizienten (VK) wurde vom Benutzer hinzugefügt. Die zwei Spalten mit den Standardabweichungen (SA) beziehen sich dabei auf die jeweils eine Spalte weiter links liegenden Spalten. In der Spalte mit der Bezeichnung *A/B* bzw. *X/Y* wird jeweils der Quotient der beiden mittleren normalisierten Expressionswerte der beiden betrachteten Entwicklungszeitpunkte E_x und E_{x-1} eines Gewebetyps (*A/B*) bzw. der beiden betrachteten Gewebetypen eines Entwicklungszeitpunkts (*X/Y*) gebildet, also die eigentliche Berechnung zur relative Quantifizierung durchgeführt. Dieser Wert entspricht dem relativen Expressionsverhältnis nach Pfaffl (Pfaffl 2001) und stellt das Ergebnis der relativen Quantifizierung dar. Als solches ist dieser Wert durch Fettdruck hervorgehoben.

4.2.3.1.1 Relative Quantifizierung zweier Entwicklungszeitpunkte eines Zielgewebes zueinander

Es wurden die Transkriptionslevel der Entwicklungszeitpunkte E0 bis E7 miteinander verglichen. Dazu wurden die MNE-Werte zweier aufeinanderfolgender Entwicklungszeitpunkte E_x , z.B. E3, und E_{x-1} , z.B. E2, eines Zielgewebes dermaßen in Bezug zueinander gesetzt, dass der MNE-Wert des späteren EZP (A in den Tabellen 14 -20) im Zähler zu stehen kam und der des früheren EZP (B in den Tabellen 14 - 20) im Nenner.

4.2.3.1.1.1 Entwicklungszeitpunkt E1 zu E0

Von den Entwicklungszeitpunkten (EZP) E0 und E1 standen lediglich Proben von *in toto*-homogenisierten Embryonen zur Verfügung, deren MNE-Werte zum Zweck der relativen Quantifizierung zueinander in Bezug gesetzt wurden.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	A/B	SA	VK (%)
E1	Embryo	Flt-1_cons	3,62E-05	2,93E-06	5,61	1,51	26,84
E0	Embryo	Flt-1_cons	6,45E-06	1,65E-06			
E1	Embryo	VEGF	1,17E-04	8,22E-06	3,18	0,40	12,60
E0	Embryo	VEGF	3,69E-05	3,87E-06			
E1	Embryo	SCF	2,04E-05	2,17E-06	1,85	0,30	16,24
E0	Embryo	SCF	1,10E-05	1,35E-06			
E1	Embryo	FGF2	1,80E-06	1,82E-07	0,55	0,24	43,58
E0	Embryo	FGF2	3,28E-06	1,39E-06			
E1	Embryo	BMP2	1,47E-04	1,05E-05	2,18	0,87	39,99
E0	Embryo	BMP2	6,73E-05	2,65E-05			
E1	Embryo	BMP4	2,86E-05	1,13E-06	0,44	--	--
E0	Embryo	BMP4	6,51E-05	--			

Tabelle 14: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der Entwicklungszeitpunkte E0 und E1.

Da die Ausbeute der RNA-Isolation vom Entwicklungszeitpunkt E0 um ca. eine Zehnerpotenz geringer war als die der übrigen Entwicklungszeitpunkte, ließen sich einige der Zielgene (Flk-1, Flt-1_ms, c-kit, VE-Cad, Ang-1) in der *real-time* RT-PCR nicht nachweisen. Auch solche Zielgene die sich nachweisen ließen, zeigten größere Werte für die Schwellenwertzyklen (s. Anhang) und wiesen z.T. eine große Streuung

hinsichtlich der Schwellenwertzyklen innerhalb der Triplikatgruppen auf, was in der hohen Standardabweichung und einem Variationskoeffizienten von über 20% zum Ausdruck kommt. Der Dreifachansatz für das Zielgen BMP 4 wies lediglich eine positive Reaktion auf, sodass keine Standardabweichung zu bestimmen war.

4.2.3.1.1.2 Entwicklungszeitpunkt E2 zu E1

Vom Entwicklungszeitpunkt E2 standen Proben vom Embryo und vom Dottersack zur Verfügung. Da vom EZP E1 keine entsprechende Dottersackprobe vorlag wurden beide Proben zu der E1-Embryoprobe in Bezug gesetzt,.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	A/B	SA	VK (%)
E2	Embryo	Flk-1	3,47E-05	3,16E-06	0,46	0,05	11,64
E1	Embryo		7,61E-05	5,51E-06			
E2	Dottersack	Flk-1	3,81E-05	2,93E-06	0,50	0,05	10,56
E1	Embryo		7,61E-05	5,51E-06			
E2	Embryo	Flt-1_cons	8,25E-05	7,42E-06	2,28	0,28	12,11
E1	Embryo		3,62E-05	2,93E-06			
E2	Dottersack	Flt-1_cons	8,87E-05	2,10E-06	2,45	0,21	8,44
E1	Embryo		3,62E-05	2,93E-06			
E2	Embryo	Flt-1_ms	7,62E-07	1,28E-07	1,59	0,46	29,17
E1	Embryo		4,80E-07	1,14E-07			
E2	Dottersack	Flt-1_ms	9,38E-07	9,40E-08	1,95	0,51	25,86
E1	Embryo		4,80E-07	1,14E-07			
E2	Embryo	VEGF	2,04E-04	9,22E-06	1,74	0,14	8,33
E1	Embryo		1,17E-04	8,22E-06			
E2	Dottersack	VEGF	1,89E-04	6,75E-06	1,61	0,13	7,85
E1	Embryo		1,17E-04	8,22E-06			
E2	Embryo	c-kit	2,19E-06	1,92E-07	0,46	0,07	15,37
E1	Embryo		4,79E-06	6,05E-07			
E2	Dottersack	c-kit	4,11E-06	5,47E-07	0,86	0,16	18,35
E1	Embryo		4,79E-06	6,05E-07			
E2	Embryo	SCF	2,19E-05	1,63E-06	1,07	0,14	13,00
E1	Embryo		2,04E-05	2,17E-06			
E2	Dottersack	SCF	2,32E-05	4,88E-07	1,14	0,12	10,86
E1	Embryo		2,04E-05	2,17E-06			

Tabelle 15

E2	Embryo	VE-Cad	8,95E-05	3,70E-06	1,63	0,13	8,13
E1	Embryo		5,50E-05	3,85E-06			
E2	Dottersack	VE-Cad	9,05E-05	4,13E-06	1,65	0,14	8,36
E1	Embryo		5,50E-05	3,85E-06			
E2	Embryo	FGF-2	3,73E-06	2,35E-07	2,08	0,25	11,95
E1	Embryo		1,80E-06	1,82E-07			
E2	Dottersack	FGF-2	3,93E-06	1,13E-07	2,19	0,23	10,54
E1	Embryo		1,80E-06	1,82E-07			
E2	Embryo	Ang-1	1,16E-06	1,02E-07	42,19	6,75	16,00
E1	Embryo		2,75E-08	3,68E-09			
E2	Dottersack	Ang-1	3,43E-06	1,55E-07	124,74	17,59	14,10
E1	Embryo		2,75E-08	3,68E-09			
E2	Embryo	BMP2	4,01E-05	1,11E-06	0,27	0,02	7,67
E1	Embryo		1,47E-04	1,05E-05			
E2	Dottersack	BMP2	3,64E-05	4,97E-06	0,25	0,04	15,41
E1	Embryo		1,47E-04	1,05E-05			
E2	Embryo	BMP4	1,84E-05	9,15E-07	0,64	0,04	6,36
E1	Embryo		2,86E-05	1,13E-06			
E2	Dottersack	BMP4	1,79E-05	1,13E-06	0,63	0,05	7,43
E1	Embryo		2,86E-05	1,13E-06			

Tabelle 15: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der Entwicklungszeitpunkte E1 und E2.

Der Anstieg des Zielgens Ang-1 in beiden Proben vom Entwicklungszeitpunkt E2 gegenüber der E1-Probe stellte den stärksten Wechsel des Transkriptionslevels aller in der Arbeit untersuchten Proben dar, wobei zu beachten ist, dass mit dem Dottersack und dem Embryo zwei heterologe Gewebe verglichen wurden. Die Standardabweichung der Genexpressionswerte zeigte sich gegenüber der E1/E0-Quantifizierung wesentlich niedriger. Lediglich die beiden Dreifachansätze des Zielgens Flt-1_ms zeigten einen Variationskoeffizienten von über 20%.

4.2.3.1.1.3 Entwicklungszeitpunkt E3 zu E2

Von den Entwicklungszeitpunkten E2 und E3 wurden Proben vom Embryo und vom Dottersack jeweils zueinander in Bezug gesetzt.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	A/B	SA	VK (%)
E3	Embryo	Flk-1	5,08E-05	2,81E-06	1,46	0,16	10,67
E2	Embryo		3,47E-05	3,16E-06			
E3	Dottersack	Flk-1	3,41E-05	3,53E-06	0,90	0,12	12,88
E2	Dottersack		3,81E-05	2,93E-06			
E3	Embryo	Flt-1_cons	7,14E-05	4,16E-06	0,87	0,09	10,72
E2	Embryo		8,25E-05	7,42E-06			
E3	Dottersack	Flt-1_cons	7,06E-05	4,33E-06	0,80	0,05	6,58
E2	Dottersack		8,87E-05	2,10E-06			
E3	Embryo	Flt-1_ms	2,37E-06	2,75E-07	3,11	0,64	20,45
E2	Embryo		7,62E-07	1,28E-07			
E3	Dottersack	Flt-1_ms	2,37E-06	4,72E-07	2,53	0,56	22,29
E2	Dottersack		9,38E-07	9,40E-08			
E3	Embryo	VEGF	1,24E-04	6,67E-06	0,61	0,04	7,03
E2	Embryo		2,04E-04	9,22E-06			
E3	Dottersack	VEGF	1,77E-04	1,17E-05	0,94	0,07	7,54
E2	Dottersack		1,89E-04	6,75E-06			
E3	Embryo	c-kit	5,91E-06	7,55E-07	2,70	0,42	15,49
E2	Embryo		2,19E-06	1,92E-07			
E3	Dottersack	c-kit	9,03E-07	2,18E-07	0,22	0,06	27,53
E2	Dottersack		4,11E-06	5,47E-07			
E3	Embryo	SCF	4,81E-05	4,97E-06	2,20	0,28	12,73
E2	Embryo		2,19E-05	1,63E-06			
E3	Dottersack	SCF	5,11E-05	3,21E-06	2,20	0,15	6,62
E2	Dottersack		2,32E-05	4,88E-07			
E3	Embryo	VE-Cad	7,07E-05	3,23E-06	0,79	0,05	6,16
E2	Embryo		8,95E-05	3,70E-06			
E3	Dottersack	VE-Cad	6,57E-05	4,06E-06	0,73	0,06	8,67
E2	Dottersack		9,05E-05	5,51E-06			
E3	Embryo	FGF-2	9,68E-06	3,82E-07	2,60	0,19	7,45
E2	Embryo		3,73E-06	2,35E-07			

Tabelle16

E3	Dottersack	FGF-2	3,28E-06	3,58E-07	0,84	0,09	11,28
E2	Dottersack		3,93E-06	1,13E-07			
E3	Embryo	Ang-1	2,48E-05	2,03E-06	21,35	2,57	12,04
E2	Embryo		1,16E-06	1,02E-07			
E3	Dottersack	Ang-1	1,33E-05	1,19E-06	3,87	0,39	10,02
E2	Dottersack		3,43E-06	1,55E-07			
E3	Embryo	BMP2	9,59E-05	5,38E-06	2,39	0,15	6,26
E2	Embryo		4,01E-05	1,11E-06			
E3	Dottersack	BMP2	6,50E-05	3,10E-06	1,78	0,26	14,46
E2	Dottersack		3,64E-05	4,97E-06			
E3	Embryo	BMP4	2,44E-05	1,87E-06	1,33	0,12	9,15
E2	Embryo		1,84E-05	9,15E-07			
E3	Dottersack	BMP4	1,88E-05	4,14E-06	1,05	0,24	22,92
E2	Dottersack		1,79E-05	1,13E-06			

Tabelle 16: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der Entwicklungszeitpunkte E2 und E3.

Das Zielgen Ang-1 zeigte in der Probe vom Embryo abermals eine starke Hochregulation im Vergleich zum Vortag.

Der Variationskoeffizient der meisten Proben blieb unter 20%.

4.2.3.1.1.4 Entwicklungszeitpunkt E4 zu E3

Vom Entwicklungszeitpunkt E4 stand erstmals neben einer Probe vom Dottersack eine Probe von der Allantois zur Verfügung. Da eine entsprechende Allantoisprobe vom Entwicklungszeitpunkt E3 nicht vorhanden war, wurde diese zur E3-Embryoprobe in Bezug gesetzt.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	A/B	SA	VK (%)
E4	Allantois	Flk-1	6,64E-05	4,42E-06	1,31	0,11	8,66
E3	Embryo		5,08E-05	2,81E-06			
E4	Dottersack	Flk-1	4,03E-05	3,15E-06	1,18	0,15	12,96
E3	Dottersack		3,41E-05	3,53E-06			
E4	Allantois	Flt-1_cons	5,79E-05	1,50E-06	0,81	0,05	6,38
E3	Embryo		7,14E-05	4,16E-06			
E4	Dottersack	Flt-1_cons	7,30E-05	5,07E-06	1,03	0,10	9,27
E3	Dottersack		7,06E-05	4,33E-06			
E4	Allantois	Flt-1_ms	7,30E-07	9,79E-08	0,31	0,05	17,74
E3	Embryo		2,37E-06	2,75E-07			
E4	Dottersack	Flt-1_ms	8,33E-07	1,32E-07	0,35	0,09	25,43
E3	Dottersack		2,37E-06	4,72E-07			
E4	Allantois	VEGF	2,53E-04	8,94E-06	2,04	0,13	6,44
E3	Embryo		1,24E-04	6,67E-06			
E4	Dottersack	VEGF	2,28E-04	1,42E-05	1,29	0,12	9,12
E3	Dottersack		1,77E-04	1,17E-05			
E4	Allantois	c-kit	1,26E-06	1,41E-07	0,21	0,04	16,96
E3	Embryo		5,91E-06	7,55E-07			
E4	Dottersack	c-kit	4,14E-06	5,25E-07	4,58	1,25	27,23
E3	Dottersack		9,03E-07	2,18E-07			
E4	Allantois	SCF	1,38E-05	6,89E-07	0,29	0,03	11,47
E3	Embryo		4,81E-05	4,97E-06			
E4	Dottersack	SCF	2,85E-05	2,09E-06	0,56	0,05	9,66
E3	Dottersack		5,11E-05	3,21E-06			
E4	Allantois	VE-Cad	9,48E-05	1,53E-05	1,34	0,22	16,79
E3	Embryo		7,07E-05	3,23E-06			

Tabelle 17

E4	Dottersack	VE-Cad	6,61E-05	5,42E-06	1,01	0,10	10,26
E3	Dottersack		6,57E-05	4,06E-06			
E4	Allantois	FGF-2	9,17E-06	5,38E-07	0,95	0,07	7,07
E3	Embryo		9,68E-06	3,82E-07			
E4	Dottersack	FGF-2	1,47E-06	1,34E-07	0,45	0,06	14,19
E3	Dottersack		3,28E-06	3,58E-07			
E4	Allantois	Ang-1	2,44E-06	2,70E-07	0,10	0,01	13,75
E3	Embryo		2,48E-05	2,03E-06			
E4	Dottersack	Ang-1	6,59E-06	6,67E-07	0,50	0,07	13,51
E3	Dottersack		1,33E-05	1,19E-06			
E4	Allantois	BMP2	3,16E-04	1,06E-04	3,30	1,12	34,09
E3	Embryo		9,59E-05	5,38E-06			
E4	Dottersack	BMP2	4,54E-05	7,62E-06	0,70	0,12	17,44
E3	Dottersack		6,50E-05	3,10E-06			
E4	Allantois	BMP4	5,03E-05	1,82E-05	2,06	0,76	36,98
E3	Embryo		2,44E-05	1,87E-06			
E4	Dottersack	BMP4	1,36E-05	2,05E-06	0,72	0,19	26,71
E3	Dottersack		1,88E-05	4,14E-06			

Tabelle 17: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der Entwicklungszeitpunkte E3 und E4

Die beiden Dreifachansätze des Zielgens BMP4 und der Ansatz des Zielgens BMP2 aus der Allantois wiesen einen Variationskoeffizienten von über 30% auf.

4.2.3.1.1.5 Entwicklungszeitpunkt E5 zu E4

Zu den Entwicklungszeitpunkten E4 und E5 wurden Proben von der Allantois bzw. Chorioallantois und Proben vom Dottersack zueinander in Bezug gesetzt.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	A/B	SA	VK (%)
E5	Allantois	Flk-1	9,77E-05	1,09E-05	1,47	0,19	13,00
E4	Allantois		6,64E-05	4,42E-06			
E5	Dottersack	Flk-1	3,71E-05	3,56E-06	0,92	0,11	12,39
E4	Dottersack		4,03E-05	3,15E-06			
E5	Allantois	Flt-1_cons	1,04E-04	1,15E-05	1,79	0,20	11,40
E4	Allantois		5,79E-05	1,50E-06			
E5	Dottersack	Flt-1_cons	5,84E-05	8,31E-06	0,80	0,13	15,84
E4	Dottersack		7,30E-05	5,07E-06			
E5	Allantois	Flt-1_ms	1,48E-06	1,62E-07	2,02	0,35	17,31
E4	Allantois		7,30E-07	9,79E-08			
E5	Dottersack	Flt-1_ms	8,33E-07	9,66E-08	1,00	0,20	19,62
E4	Dottersack		8,33E-07	1,32E-07			
E5	Allantois	VEGF	4,99E-04	5,44E-05	1,97	0,23	11,45
E4	Allantois		2,53E-04	8,94E-06			
E5	Dottersack	VEGF	2,65E-04	1,67E-05	1,16	0,10	8,88
E4	Dottersack		2,28E-04	1,42E-05			
E5	Allantois	c-kit	6,30E-06	6,89E-07	4,98	0,78	15,61
E4	Allantois		1,26E-06	1,41E-07			
E5	Dottersack	c-kit	1,40E-05	1,11E-06	3,37	0,51	14,98
E4	Dottersack		4,14E-06	5,25E-07			
E5	Allantois	SCF	5,32E-05	6,08E-06	3,86	0,48	12,47
E4	Allantois		1,38E-05	6,89E-07			
E5	Dottersack	SCF	3,72E-05	2,77E-06	1,31	0,14	10,46
E4	Dottersack		2,85E-05	2,09E-06			
E5	Allantois	VE-Cad	3,79E-04	4,44E-05	4,00	0,80	19,96
E4	Allantois		9,48E-05	1,53E-05			
E5	Dottersack	VE-Cad	9,40E-05	1,58E-05	1,42	0,27	18,69
E4	Dottersack		6,61E-05	5,42E-06			
E5	Allantois	FGF-2	1,77E-05	1,93E-06	1,93	0,24	12,37
E4	Allantois		9,17E-06	5,38E-07			

Tabelle 18

E5	Dottersack	FGF-2	1,03E-05	9,24E-07	6,97	0,89	12,79
E4	Dottersack		1,47E-06	1,34E-07			
E5	Allantois	Ang-1	1,67E-05	2,02E-06	6,82	1,12	16,38
E4	Allantois		2,44E-06	2,70E-07			
E5	Dottersack	Ang-1	4,23E-06	1,05E-06	0,64	0,17	26,79
E4	Dottersack		6,59E-06	6,67E-07			
E5	Allantois	BMP2	5,61E-04	7,29E-05	1,77	0,64	36,05
E4	Allantois		3,16E-04	1,06E-04			
E5	Dottersack	BMP2	1,25E-04	8,65E-06	2,76	0,50	18,14
E4	Dottersack		4,54E-05	7,62E-06			
E5	Allantois	BMP4	1,53E-04	1,68E-05	3,04	1,15	37,80
E4	Allantois		5,03E-05	1,82E-05			
E5	Dottersack	BMP4	3,37E-05	2,08E-06	2,48	0,40	16,31
E4	Dottersack		1,36E-05	2,05E-06			

Tabelle 18: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der Entwicklungszeitpunkte E4 und E5.

Für die Dreifachansätze der Zielgene BMP2 und BMP4 aus der Allantois ergaben sich Variationskoeffizienten von über 30 %.

4.2.3.1.1.6 Entwicklungszeitpunkt E6 zu E5

Von den Entwicklungszeitpunkten E5 und E6 wurden Proben von der Allantois bzw. Chorioallantois und Proben vom Dottersack jeweils zueinander in Relation gesetzt.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	A/B	SA	VK (%)
E6	Allantois	Flk-1	8,56E-05	8,66E-06	0,88	0,13	15,06
E5	Allantois		9,77E-05	1,09E-05			
E6	Dottersack	Flk-1	4,47E-05	2,33E-06	1,21	0,13	10,93
E5	Dottersack		3,71E-05	3,56E-06			
E6	Allantois	Flt-1_cons	9,30E-05	6,70E-06	0,89	0,12	13,24
E5	Allantois		1,04E-04	1,15E-05			
E6	Dottersack	Flt-1_cons	5,56E-05	3,82E-06	0,95	0,15	15,81
E5	Dottersack		5,84E-05	8,31E-06			
E6	Allantois	Flt-1_ms	3,62E-06	2,74E-07	2,45	0,33	13,30
E5	Allantois		1,48E-06	1,62E-07			
E6	Dottersack	Flt-1_ms	2,70E-06	1,88E-07	3,24	0,44	13,53
E5	Dottersack		8,33E-07	9,66E-08			
E6	Allantois	VEGF	3,87E-04	2,76E-05	0,77	0,10	13,03
E5	Allantois		4,99E-04	5,44E-05			
E6	Dottersack	VEGF	2,50E-04	1,42E-05	0,94	0,08	8,49
E5	Dottersack		2,65E-04	1,67E-05			
E6	Allantois	c-kit	1,20E-05	1,08E-06	1,91	0,27	14,14
E5	Allantois		6,30E-06	6,89E-07			
E6	Dottersack	c-kit	2,02E-05	1,28E-06	1,45	0,15	10,19
E5	Dottersack		1,40E-05	1,11E-06			
E6	Allantois	SCF	5,75E-05	4,05E-06	1,08	0,15	13,43
E5	Allantois		5,32E-05	6,08E-06			
E6	Dottersack	SCF	4,72E-05	1,69E-06	1,27	0,10	8,26
E5	Dottersack		3,72E-05	2,77E-06			
E6	Allantois	VE-Cad	4,21E-04	3,83E-05	1,11	0,16	14,84
E5	Allantois		3,79E-04	4,44E-05			
E6	Dottersack	VE-Cad	5,85E-05	9,96E-06	0,62	0,15	23,91
E5	Dottersack		9,40E-05	1,58E-05			
E6	Allantois	FGF-2	1,89E-05	3,32E-06	1,07	0,22	20,68
E5	Allantois		1,77E-05	1,93E-06			

Tabelle 19

E6	Dottersack	FGF-2	1,48E-05	9,42E-07	1,44	0,16	11,03
E5	Dottersack		1,03E-05	9,24E-07			
E6	Allantois	Ang-1	3,72E-05	3,37E-06	2,23	0,34	15,12
E5	Allantois		1,67E-05	2,02E-06			
E6	Dottersack	Ang-1	7,01E-06	6,03E-07	1,66	0,44	26,26
E5	Dottersack		4,23E-06	1,05E-06			
E6	Allantois	BMP2	4,17E-04	3,17E-05	0,74	0,11	15,07
E5	Allantois		5,61E-04	7,29E-05			
E6	Dottersack	BMP2	6,38E-05	6,03E-06	0,51	0,06	11,70
E5	Dottersack		1,25E-04	8,65E-06			
E6	Allantois	BMP4	1,23E-04	1,28E-05	0,80	0,12	15,12
E5	Allantois		1,53E-04	1,68E-05			
E6	Dottersack	BMP4	3,55E-05	1,53E-06	1,05	0,08	7,53
E5	Dottersack		3,37E-05	2,08E-06			

Tabelle 19: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der Entwicklungszeitpunkte E5 und E6.

Der Variationskoeffizient einiger Zielgene (VE-Cad aus Dottersack, FGF-2 aus Allantois, Ang-1 aus Dottersack) lag über 20 %.

4.2.3.1.1.7 Entwicklungszeitpunkt E7 zu E6

Zu den Entwicklungszeitpunkten E6 und E7 wurden Proben von der Allantois bzw. Chorioallantois und Proben vom Dottersack jeweils miteinander verglichen.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	A/B	SA	VK (%)
E7	Allantois	Flk-1	1,14E-04	9,75E-06	1,34	0,18	13,22
E6	Allantois		8,56E-05	8,66E-06			
E7	Dottersack	Flk-1	3,73E-05	7,39E-06	0,84	0,17	20,47
E6	Dottersack		4,47E-05	2,33E-06			
E7	Allantois	Flt-1_cons	1,48E-04	1,41E-05	1,59	0,19	11,95
E6	Allantois		9,30E-05	6,70E-06			
E7	Dottersack	Flt-1_cons	5,77E-05	1,04E-05	1,04	0,20	19,27
E6	Dottersack		5,56E-05	3,82E-06			
E7	Allantois	Flt-1_ms	5,24E-06	1,30E-06	1,45	0,37	25,90
E6	Allantois		3,62E-06	2,74E-07			
E7	Dottersack	Flt-1_ms	1,79E-06	8,67E-07	0,66	0,32	48,96
E6	Dottersack		2,70E-06	1,88E-07			
E7	Allantois	VEGF	6,20E-04	4,66E-05	1,60	0,17	10,38
E6	Allantois		3,87E-04	2,76E-05			
E7	Dottersack	VEGF	2,82E-04	5,14E-05	1,13	0,22	19,11
E6	Dottersack		2,50E-04	1,42E-05			
E7	Allantois	c-kit	1,04E-05	5,95E-07	0,87	0,09	10,65
E6	Allantois		1,20E-05	1,08E-06			
E7	Dottersack	c-kit	2,76E-05	5,08E-06	1,37	0,27	19,44
E6	Dottersack		2,02E-05	1,28E-06			
E7	Allantois	SCF	1,99E-05	1,47E-06	0,35	0,04	10,20
E6	Allantois		5,75E-05	4,05E-06			
E7	Dottersack	SCF	2,64E-05	4,82E-06	0,56	0,10	18,58
E6	Dottersack		4,72E-05	1,69E-06			
E7	Allantois	VE-Cad	3,74E-04	3,06E-05	0,89	0,11	12,24
E6	Allantois		4,21E-04	3,83E-05			
E7	Dottersack	VE-Cad	7,07E-05	2,04E-05	1,21	0,41	33,53
E6	Dottersack		5,85E-05	9,96E-06			
E7	Allantois	FGF-2	1,15E-05	7,05E-07	0,61	0,11	18,62
E6	Allantois		1,89E-05	3,32E-06			
E7	Dottersack	FGF-2	1,14E-05	2,49E-06	0,77	0,18	22,81
E6	Dottersack		1,48E-05	9,42E-07			

Tabelle 20

E7	Allantois	Ang-1	1,22E-05	1,25E-06	0,33	0,05	13,68
E6	Allantois		3,72E-05	3,37E-06			
E7	Dottersack	Ang-1	4,86E-06	9,13E-07	0,69	0,14	20,66
E6	Dottersack		7,01E-06	6,03E-07			
E7	Allantois	BMP2	3,40E-04	2,08E-05	0,81	0,08	9,76
E6	Allantois		4,17E-04	3,17E-05			
E7	Dottersack	BMP2	4,79E-05	8,99E-06	0,75	0,16	21,01
E6	Dottersack		6,38E-05	6,03E-06			
E7	Allantois	BMP4	1,22E-04	1,45E-05	0,99	0,16	15,79
E6	Allantois		1,23E-04	1,28E-05			
E7	Dottersack	BMP4	2,48E-05	4,64E-06	0,70	0,13	19,23
E6	Dottersack		3,55E-05	1,53E-06			

Tabelle 20: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der Entwicklungszeitpunkte E6 und E7.

Der Variationskoeffizient der Proben einiger Zielgene (Flk-1 aus Dottersack, Flt-1_ms aus Allantois, FGF-2 aus Dottersack, Ang-1 aus Dottersack, BMP2 aus Dottersack) lag knapp über 20 %. Die Proben der Zielgene Flt-1_ms aus Dottersack und VE-Cad aus Dottersack lagen mit ihrem Variationkoeffizienten deutlich über 40 bzw. 30 %. Über die Entwicklungszeitpunkte E2 bis E7 betrachtet, wiesen die relativen Expressionswerte A/B aus dem Gewebetyp Dottersack ca. zweimal öfter einen Variationskoeffizienten von über 20 % auf als die relativen Expressionswerte aus den übrigen Gewebetypen.

4.2.3.1.2 Relative Quantifizierung zweier Zielgewebe eines Entwicklungszeitpunkts zueinander

Vom Entwicklungszeitpunkt E2 an lagen zwei unterschiedliche Gewebetypen zur Untersuchung der Genexpression vor. Somit konnten die MNE-Werte der verschiedenen Gewebe eines Entwicklungsstadiums und Oligonukleotidpaares zueinander in Bezug gesetzt werden. Entgegengesetzt zu den Berechnungen in 4.2.3.1.1 wurde der Parameter Zielgewebe also variiert, während der Parameter Entwicklungszeitpunkt fixiert wurde. Die MNE-Werte für den Embryo (EZP E2 –E3) bzw. die Allantois/Chorioallantois (EZP E4-E7) kamen dabei im Zähler (X in den

Tabellen 21 -26) zu stehen und die MNE-Werte für den Dottersack im Nenner (Y in den Tabellen 21 -26).

4.2.3.1.2.1 Entwicklungszeitpunkt E2: Embryo zu Dottersack

Vom EZP E2 standen Proben vom Embryo und vom Dottersack zur Verfügung, welche zueinander in Bezug gesetzt wurden.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	X/Y	SA	VK (%)
E2	Embryo	Flk-1	3,47E-05	3,16E-06	0,91	0,11	11,92
E2	Dottersack		3,81E-05	2,93E-06			
E2	Embryo	Flt-1_cons	8,25E-05	7,42E-06	0,93	0,09	9,30
E2	Dottersack		8,87E-05	2,10E-06			
E2	Embryo	Flt-1_ms	7,62E-07	1,28E-07	0,81	0,16	19,59
E2	Dottersack		9,38E-07	9,40E-08			
E2	Embryo	VEGF	2,04E-04	9,22E-06	1,08	0,06	5,76
E2	Dottersack		1,89E-04	6,75E-06			
E2	Embryo	c-kit	2,19E-06	1,92E-07	0,53	0,08	15,93
E2	Dottersack		4,11E-06	5,47E-07			
E2	Embryo	SCF	2,19E-05	1,63E-06	0,94	0,07	7,74
E2	Dottersack		2,32E-05	4,88E-07			
E2	Embryo	VE-Cadherin	8,95E-05	3,70E-06	0,99	0,07	7,35
E2	Dottersack		9,05E-05	5,51E-06			
E2	Embryo	FGF-2	3,73E-06	2,35E-07	0,95	0,07	6,94
E2	Dottersack		3,93E-06	1,13E-07			
E2	Embryo	Ang-1	1,16E-06	1,02E-07	0,34	0,03	9,89
E2	Dottersack		3,43E-06	1,55E-07			
E2	Embryo	BMP2	4,01E-05	1,11E-06	1,10	0,15	13,93
E2	Dottersack		3,64E-05	4,97E-06			
E2	Embryo	BMP4	1,84E-05	9,15E-07	1,02	0,08	8,01
E2	Dottersack		1,79E-05	1,13E-06			

Tabelle 21: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der beiden Gewebetypen Embryo und Dottersack vom Entwicklungszeitpunkt E2

Mit Ausnahme der Zielgene c-kit und Ang-1 fallen die sehr ähnlichen MNE-Werte in Embryo und Dottersack auf, was sich in einem MNE-Quotienten X/Y um den Wert 1 ausdrückt.

4.2.3.1.2 Entwicklungszeitpunkt E3: Embryo zu Dottersack

Vom EZP E3 standen Proben vom Embryo und vom Dottersack zur Verfügung, welche zueinander in Bezug gesetzt wurden.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	X/Y	SA	VK (%)
E3	Embryo	Flk-1	5,08E-05	2,81E-06	1,49	0,17	11,70
E3	Dottersack		3,41E-05	3,53E-06			
E3	Embryo	Flt-1_cons	7,14E-05	4,16E-06	1,01	0,09	8,50
E3	Dottersack		7,06E-05	4,33E-06			
E3	Embryo	Flt-1_ms	2,37E-06	2,75E-07	1,00	0,23	23,10
E3	Dottersack		2,37E-06	4,72E-07			
E3	Embryo	VEGF	1,24E-04	6,67E-06	0,70	0,06	8,50
E3	Dottersack		1,77E-04	1,17E-05			
E3	Embryo	c-kit	5,91E-06	7,55E-07	6,55	1,79	27,30
E3	Dottersack		9,03E-07	2,18E-07			
E3	Embryo	SCF	4,81E-05	4,97E-06	0,94	0,11	12,10
E3	Dottersack		5,11E-05	3,21E-06			
E3	Embryo	VE-Cadherin	7,07E-05	3,23E-06	1,08	0,08	7,70
E3	Dottersack		6,57E-05	4,06E-06			
E3	Embryo	FGF-2	9,68E-06	3,82E-07	2,95	0,34	11,60
E3	Dottersack		3,28E-06	3,58E-07			
E3	Embryo	Ang-1	2,48E-05	2,03E-06	1,87	0,23	12,10
E3	Dottersack		1,33E-05	1,19E-06			
E3	Embryo	BMP2	9,59E-05	5,38E-06	1,48	0,11	7,40
E3	Dottersack		6,50E-05	3,10E-06			
E3	Embryo	BMP4	2,44E-05	1,87E-06	1,30	0,30	23,30
E3	Dottersack		1,88E-05	4,14E-06			

Tabelle 22: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der beiden Gewebetypen Embryo und Dottersack vom Entwicklungszeitpunkt E3.

Der Variationskoeffizient der Zielgene Flt-1_ms, c-kit und BMP4 lag über 20%.

4.2.3.1.2.3 Entwicklungszeitpunkt E4: Allantois zu Dottersack

Ab dem Entwicklungszeitpunkt E4 lagen Proben von der Allantois vor, deren MNE-Werte zu denen aus dem Dottersack in Bezug gesetzt wurden.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	X/Y	SA	VK (%)
E4	Allantois	Flk-1	6,64E-05	4,42E-06	1,65	0,17	10,26
E4	Dottersack		4,03E-05	3,15E-06			
E4	Allantois	Flt-1_cons	5,79E-05	1,50E-06	0,79	0,06	7,41
E4	Dottersack		7,30E-05	5,07E-06			
E4	Allantois	Flt-1_ms	7,30E-07	9,79E-08	0,88	0,18	20,74
E4	Dottersack		8,33E-07	1,32E-07			
E4	Allantois	VEGF	2,53E-04	8,94E-06	1,11	0,08	7,19
E4	Dottersack		2,28E-04	1,42E-05			
E4	Allantois	c-kit	1,26E-06	1,41E-07	0,31	0,05	16,88
E4	Dottersack		4,14E-06	5,25E-07			
E4	Allantois	SCF	1,38E-05	6,89E-07	0,48	0,04	8,88
E4	Dottersack		2,85E-05	2,09E-06			
E4	Allantois	VE-Cadherin	9,48E-05	1,53E-05	1,43	0,26	18,11
E4	Dottersack		6,61E-05	5,42E-06			
E4	Allantois	FGF-2	9,17E-06	5,38E-07	6,23	0,67	10,81
E4	Dottersack		1,47E-06	1,34E-07			
E4	Allantois	Ang-1	2,44E-06	2,70E-07	0,37	0,06	14,97
E4	Dottersack		6,59E-06	6,67E-07			
E4	Allantois	BMP2	3,16E-04	1,06E-04	6,97	2,62	37,58
E4	Dottersack		4,54E-05	7,62E-06			
E4	Allantois	BMP4	5,03E-05	1,82E-05	3,70	1,45	39,20
E4	Dottersack		1,36E-05	2,05E-06			

Tabelle 23: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der beiden Gewebetypen Allantois und Dottersack vom Entwicklungszeitpunkt E4.

Die Zielgene BMP2 und BMP4 fielen durch einen hohen Variationskoeffizienten von knapp 40% auf.

4.2.3.1.2.4 Entwicklungszeitpunkt E5: Allantois zu Dottersack

Vom EZP E5 standen Proben von der Allantois und vom Dottersack zur Verfügung, welche zueinander in Bezug gesetzt wurden.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	X/Y	SA	VK (%)
E5	Allantois	Fik-1	9,77E-05	1,09E-05	2,63	0,39	14,73
E5	Dottersack		3,71E-05	3,56E-06			
E5	Allantois	Flt-1_cons	1,04E-04	1,15E-05	1,78	0,32	18,06
E5	Dottersack		5,84E-05	8,31E-06			
E5	Allantois	Flt-1_ms	1,48E-06	1,62E-07	1,77	0,28	15,94
E5	Dottersack		8,33E-07	9,66E-08			
E5	Allantois	VEGF	4,99E-04	5,44E-05	1,89	0,24	12,58
E5	Dottersack		2,65E-04	1,67E-05			
E5	Allantois	c-kit	6,30E-06	6,89E-07	0,45	0,06	13,53
E5	Dottersack		1,40E-05	1,11E-06			
E5	Allantois	SCF	5,32E-05	6,08E-06	1,43	0,19	13,64
E5	Dottersack		3,72E-05	2,77E-06			
E5	Allantois	VE-Cadherin	3,79E-04	4,44E-05	4,03	0,83	20,48
E5	Dottersack		9,40E-05	1,58E-05			
E5	Allantois	FGF-2	1,77E-05	1,93E-06	1,73	0,24	14,14
E5	Dottersack		1,03E-05	9,24E-07			
E5	Allantois	Ang-1	1,67E-05	2,02E-06	3,94	1,09	27,61
E5	Dottersack		4,23E-06	1,05E-06			
E5	Allantois	BMP2	5,61E-04	7,29E-05	4,47	0,66	14,73
E5	Dottersack		1,25E-04	8,65E-06			
E5	Allantois	BMP4	1,53E-04	1,68E-05	4,54	0,57	12,57
E5	Dottersack		3,37E-05	2,08E-06			

Tabelle 24: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der beiden Gewebetypen Allantois und Dottersack vom Entwicklungszeitpunkt E5.

Die Zielgene VE-Cadherin und Ang-1 wiesen einen Variationskoeffizienten von über 20% auf.

4.2.3.1.2.5 Entwicklungszeitpunkt E6: Allantois zu Dottersack

Vom EZP E6 standen Proben von der Allantois und vom Dottersack zur Verfügung, welche zueinander in Bezug gesetzt wurden.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	X/Y	SA	VK (%)
E6	Allantois	Flk-1	1,07E-04	1,02E-05	2,11	0,33	15,60
E6	Dottersack		5,04E-05	6,19E-06			
E6	Allantois	Flt-1_cons	1,11E-04	8,18E-06	1,65	0,18	10,98
E6	Dottersack		6,73E-05	5,50E-06			
E6	Allantois	Flt-1_ms	4,86E-06	4,59E-07	2,03	0,41	19,98
E6	Dottersack		2,39E-06	4,20E-07			
E6	Allantois	VEGF	5,02E-04	3,60E-05	1,62	0,17	10,73
E6	Dottersack		3,09E-04	2,47E-05			
E6	Allantois	c-kit	1,54E-05	1,58E-06	0,63	0,08	12,63
E6	Dottersack		2,43E-05	1,79E-06			
E6	Allantois	SCF	7,66E-05	5,65E-06	1,46	0,15	10,27
E6	Dottersack		5,26E-05	3,76E-06			
E6	Allantois	VE-Cadherin	4,84E-04	6,05E-05	7,08	1,60	22,63
E6	Dottersack		6,84E-05	1,29E-05			
E6	Allantois	FGF-2	2,40E-05	3,13E-06	1,29	0,20	15,90
E6	Dottersack		1,86E-05	1,69E-06			
E6	Allantois	Ang-1	4,20E-05	4,18E-06	5,33	0,70	13,19
E6	Dottersack		7,88E-06	6,82E-07			
E6	Allantois	BMP2	5,20E-04	3,76E-05	6,62	0,80	12,02
E6	Dottersack		7,85E-05	7,53E-06			
E6	Allantois	BMP4	1,48E-04	1,29E-05	3,80	0,48	12,64
E6	Dottersack		3,89E-05	3,56E-06			

Tabelle 25: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der beiden Gewebetypen Allantois und Dottersack vom Entwicklungszeitpunkt E6.

Lediglich das Zielgen VE-Cadherin zeigte einen Variationskoeffizienten von über 20%.

4.2.3.1.2.6 Entwicklungszeitpunkt E7: Allantois zu Dottersack

Vom EZP E7 standen Proben von der Allantois und vom Dottersack zur Verfügung, welche zueinander in Bezug gesetzt wurden.

EZP	Gewebe	Zielgen	MNE	SA	X/Y	SA	VK (%)
E7	Allantois	Flk-1	1,14E-04	9,75E-06	3,06	0,66	21,55
E7	Dottersack		3,73E-05	7,39E-06			
E7	Allantois	Flt-1_cons	1,48E-04	1,41E-05	2,56	0,52	20,37
E7	Dottersack		5,77E-05	1,04E-05			
E7	Allantois	Flt-1_ms	5,24E-06	1,30E-06	2,93	1,60	54,43
E7	Dottersack		1,79E-06	8,67E-07			
E7	Allantois	VEGF	6,20E-04	4,66E-05	2,20	0,43	19,73
E7	Dottersack		2,82E-04	5,14E-05			
E7	Allantois	c-kit	1,04E-05	5,95E-07	0,38	0,07	19,25
E7	Dottersack		2,76E-05	5,08E-06			
E7	Allantois	SCF	1,99E-05	1,47E-06	0,75	0,15	19,67
E7	Dottersack		2,64E-05	4,82E-06			
E7	Allantois	VE-Cadherin	3,74E-04	3,06E-05	5,29	1,59	30,03
E7	Dottersack		7,07E-05	2,04E-05			
E7	Allantois	FGF-2	1,15E-05	7,05E-07	1,01	0,23	22,75
E7	Dottersack		1,14E-05	2,49E-06			
E7	Allantois	Ang-1	1,22E-05	1,25E-06	2,52	0,54	21,40
E7	Dottersack		4,86E-06	9,13E-07			
E7	Allantois	BMP2	3,40E-04	2,08E-05	7,09	1,40	19,74
E7	Dottersack		4,79E-05	8,99E-06			
E7	Allantois	BMP4	1,22E-04	1,45E-05	4,92	1,09	22,17
E7	Dottersack		2,48E-05	4,64E-06			

Tabelle 26: Q-Gene Expressionsdaten der relativen Quantifizierung der beiden Gewebetypen Allantois und Dottersack vom Entwicklungszeitpunkt E7.

4.2.3.1.3 Übersicht über die Ergebnisse aus der relativen Quantifizierung

Anhand zweier Tabellen sollen die Resultate aus der Quantifizierung zweier EZPs eines Gewebetyps zueinander (s. Tab.27) bzw. eines EZPs zweier Gewebe zueinander (s. Tab. 28) anschaulich dargestellt werden.

Gewebe	EZP	E0		E1		E2		E3
	Zielgen							
Embryo bzw. <i>Allantois</i>	Flk-1	n.d.		7,60E-05	↘	3,50E-05	→	5,10E-05
Dottersack	Flk-1	--			↘	3,80E-05	→	3,40E-05
Embryo bzw. <i>Allantois</i>	Flt-1_cons	6,50E-06	↗	3,60E-05	↗	8,30E-05	→	7,10E-05
Dottersack	Flt-1_cons	--			↗	8,90E-05	→	7,10E-05
Embryo bzw. <i>Allantois</i>	Flt-1_ms	n.d.		4,80E-07	→	7,60E-07	↗	2,40E-06
Dottersack	Flt-1_ms	--			→	9,40E-07	↗	2,40E-06
Embryo bzw. <i>Allantois</i>	VEGF	3,70E-05	↗	1,20E-04	→	2,00E-04	→	1,20E-04
Dottersack	VEGF	--			→	1,90E-04	→	1,80E-04
Embryo bzw. <i>Allantois</i>	c-kit	n.d.		4,80E-06	↘	2,20E-06	↗	5,90E-06
Dottersack	c-kit	--			→	4,10E-06	↘	9,00E-07
Embryo bzw. <i>Allantois</i>	SCF	1,10E-05	→	2,00E-05	→	2,20E-05	↗	4,80E-05
Dottersack	SCF	--			→	2,30E-05	↗	5,10E-05
Embryo bzw. <i>Allantois</i>	VE-Cad	n.d.		5,50E-05	→	9,00E-05	→	7,10E-05
Dottersack	VE-Cad	--			→	9,00E-05	→	6,60E-05
Embryo bzw. <i>Allantois</i>	FGF-2	3,30E-06	→	1,80E-06	↗	3,70E-06	↗	9,70E-06
Dottersack	FGF-2	--			↗	3,90E-06	→	3,30E-06
Embryo bzw. <i>Allantois</i>	Ang-1	n.d.		2,80E-08	↑	1,20E-06	↑	2,50E-05
Dottersack	Ang-1	--			↑	3,40E-06	↗	1,30E-05
Embryo bzw. <i>Allantois</i>	BMP2	6,70E-05	↗	1,50E-04	↘	4,00E-05	↗	9,60E-05
Dottersack	BMP2	--			↘	3,60E-05	→	6,50E-05
Embryo bzw. <i>Allantois</i>	BMP4	6,50E-05	↘	2,90E-05	→	1,80E-05	→	2,40E-05
Dottersack	BMP4	--			→	1,80E-05	→	1,80E-05

Tabelle 27

Legende:

n.d.:

nicht detektierbar



A/B = ca. 1, Variationskoeffizient < 20 % (Fettdruck)

A/B = 2 - 5, Variationskoeffizient < 20 % (Fettdruck)

E3		E4		E5		E6		E7
5,10E-05	→	6,60E-05	→	9,80E-05	→	8,60E-05	→	1,10E-04
3,40E-05	→	4,00E-05	→	3,70E-05	→	4,50E-05	→	3,70E-05
7,10E-05	→	5,80E-05	→	1,00E-04	→	9,30E-05	→	1,50E-04
7,10E-05	→	7,30E-05	→	5,80E-05	→	5,60E-05	→	5,80E-05
2,40E-06	↘	7,30E-07	↗	1,50E-06	↗	3,60E-06	→	5,20E-06
2,40E-06	↘	8,30E-07	→	8,30E-07	↗	2,70E-06	→	1,80E-06
1,20E-04	↗	2,50E-04	↗	5,00E-04	→	3,90E-04	→	6,20E-04
1,80E-04	→	2,30E-04	→	2,70E-04	→	2,50E-04	→	2,80E-04
5,90E-06	↘	1,30E-06	↗	6,30E-06	↗	1,20E-05	→	1,00E-05
9,00E-07	↗	4,10E-06	↗	1,40E-05	→	2,00E-05	→	2,80E-05
4,80E-05	↘	1,40E-05	↗	5,30E-05	→	5,80E-05	↘	2,00E-05
5,10E-05	→	2,90E-05	→	3,70E-05	→	4,70E-05	→	2,60E-05
7,10E-05	→	9,50E-05	↗	3,80E-04	→	4,20E-04	→	3,70E-04
6,60E-05	→	6,60E-05	→	9,40E-05	→	5,90E-05	→	7,10E-05
9,70E-06	→	9,20E-06	→	1,80E-05	→	1,90E-05	→	1,20E-05
3,30E-06	↘	1,50E-06	↗	1,00E-05	→	1,50E-05	→	1,10E-05
2,50E-05	↘	2,40E-06	↗	1,70E-05	↗	3,70E-05	↘	1,20E-05
1,30E-05	↘	6,60E-06	→	4,20E-06	→	7,00E-06	→	4,90E-06
9,60E-05	↗	3,20E-04	→	5,60E-04	→	4,20E-04	→	3,40E-04
6,50E-05	→	4,50E-05	↗	1,30E-04	→	6,40E-05	→	4,80E-05
2,40E-05	↗	5,00E-05	↗	1,50E-04	→	1,20E-04	→	1,20E-04
1,80E-05	→	1,40E-05	↗	3,40E-05	→	3,60E-05	→	2,50E-05

Tabelle 27: Ergebnisse der relativen Quantifizierung zweier EZPs eines Gewebes.



A/B = 5 - 10, Variationskoeffizient < 20 % (Fettdruck)

A/B > 10, Variationskoeffizient > 20 % (Normaldruck)

Zielgen \ EZP	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Flk-1	D ≈ E	D ≈ E	A ≈ D	A > D	A > D	A > D
Flt-1_cons	D ≈ E	D ≈ E	A ≈ D	D ≈ A	D ≈ A	A > D
Flt-1_ms	D ≈ E	D ≈ E	D ≈ A	A ≈ D	A > D	A > D
VEGF	D ≈ E	D ≈ E	D ≈ A	D ≈ A	D ≈ A	A > D
c-kit	D ≈ E	E >> D	D > A	D > A	D ≈ A	D > A
SCF	D ≈ E	D ≈ E	D > A	D ≈ A	D ≈ A	D ≈ A
VE-Cad	D ≈ E	D ≈ E	D ≈ A	A > D	A >> D	A >> D
FGF-2	D ≈ E	E > D	A >> D	D ≈ A	D ≈ A	D ≈ A
Ang-1	D > E	D ≈ E	D > A	A > D	A >> D	A > D
BMP2	D ≈ E	D ≈ E	A >> D	A > D	A >> D	A >> D
BMP4	D ≈ E	D ≈ E	A > D	A > D	A > D	A > D

Tabelle 28: Ergebnisse der relativen Quantifizierung zweier Gewebe eines EZPs
(A: Allantois, D: Dottersack, E: Embryo).

Legende:

D ≈ E: D/E = ca. 1, Variationskoeffizient < 20 % (Fettdruck)

D > E: D/E = 2-5, Variationskoeffizient < 20 % (Fettdruck)

D >> A: D/A > 5, Variationskoeffizient > 20 % (Normaldruck)

4.2.3.2 Berechnung der Amplifikationseffizienz

Zur Bestimmung der AE aus den iCycler-Fluoreszenzrohdaten RFU/ Zyklus wurde eine lineare Regressionsanalyse mit dem PC-Programm *LinRegPCR* (Ramakers et al. 2003) durchgeführt (s. Abb. 9-14). Die Qualität einer solchen Regressionsgerade wurde bestimmt durch ihren Korrelationskoeffizienten, welcher möglichst bei eins liegen sollte, ihre Steigung, i.e. AE (s. Tab.2, Formel 2), und die Anzahl an Datenpunkten durch welche sie lief (s. Abb. 12, Abb.14). Nachdem die Geraden von dem Programm nach dem Kriterium „bester Korrelationskoeffizient mit mindestens drei Datenpunkten“ (engl.: best correlation coefficient, with a minimum of 3 points) durch die RFU-Datenpunkte gelegt worden war, wurden sie noch manuell vom Benutzer dahingehend optimiert, i.e. Datenpunkte in die Regressionsgerade einbezogen bzw. ausgeschlossen, dass ihre Steigung eine AE im zu erwartenden Bereich zwischen ca. 70% und knapp 100% ergab wobei ein KK von min. 0,999 angestrebt wurde. Die Geraden liefen dabei zumeist durch drei bis vier (s. Abb. 12,

Abb. 14), in Ausnahmefällen nur zwei und optimalerweise (Ramakers et al. 2003) vier bis sechs RFU-Datenpunkte. Mehr als sechs Datenpunkte ließen sich in keiner Amplifikationskurve der logarithmischen Amplifikationsphase zuordnen, da die PCR nach der exponentiellen über eine lineare Amplifikationsphase in eine Sättigungsphase übergeht, in welcher die Amplifikationseffizienz auf 0% abfällt (Kains 2000). Entsprechend sucht keiner der Optimierungsalgorithmen des Programms nach Regressionsgeraden durch mehr als sechs Datenpunkte und von den Autoren wird dies auch als maximal zu verwendende Anzahl an Datenpunkten angegeben (Ramakers et al. 2003). In der Regressionsanalyse machte sich die Einbeziehung solcher Datenpunkte der linearen bzw. Sättigungsphase, i.e. postlogarithmischen Phasen, durch ein Absinken der Amplifikationseffizienz bemerkbar und war also zu vermeiden. Da der Fluoreszenzschwellenwert zur Ermittlung der SWZ ebenfalls ausschließlich in den logarithmischen Bereich zu legen war, der postlogarithmische Bereich also nicht zur Erzeugung von SWZ-Daten herangezogen wurde, konnte dieses Absinken der AE vernachlässigt werden. Neben der Bestimmung der AE der einzelnen Reaktionen eines PCR-Laufs konnte also mittels der Regressionsanalyse der gemeinsame Bereich der exponentiellen Amplifikation aller Reaktionen eines Laufs bestimmt werden. Dies ermöglichte eine gezielte Einstellung des Fluoreszenzschwellenwerts. Für die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte erwies sich die Lage der oberen Grenze der exponentiellen Amplifikation im Bereich von ca. 100 bis 150 relativen Fluoreszenzeinheiten.

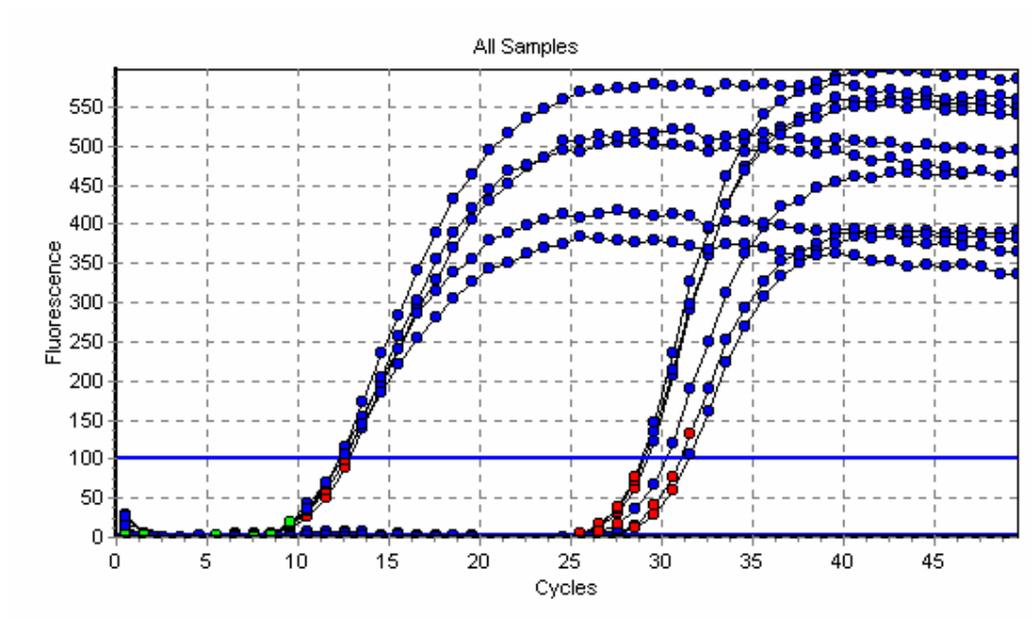


Abbildung 9: *real-time* RT-PCR Amplifikationskurven in der zweifach linearen Darstellung nach dem *LinRegPCR*-Computerprogramm (Ramakers et al. 2003). Fluoreszenzdatenpunkte sind durch farbige Kreise gekennzeichnet. Der horizontale blaue Balken bei 100 Fluoreszenzeinheiten kennzeichnet die ungefähre obere Grenze der exponentiellen Amplifikation (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: PCR-Zyklusanzahl).

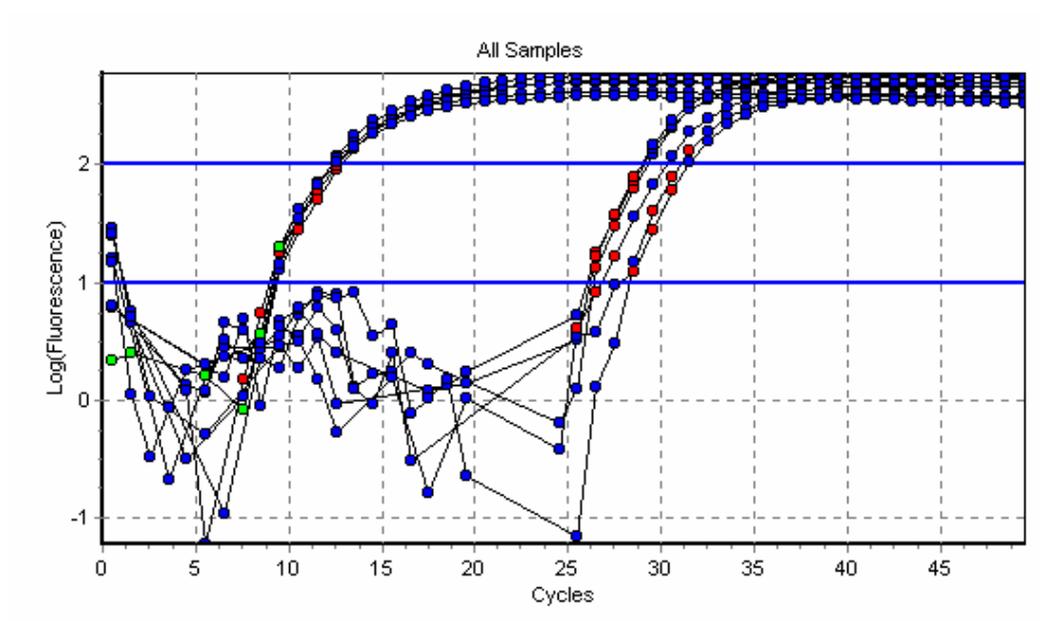


Abbildung 10: Einfach logarithmische Darstellung der Abbildung 9 nach dem *LinRegPCR*-Computerprogramm (Ramakers et al. 2003). Der Bereich der detektierbaren exponentiellen Amplifikation ist durch die beiden horizontalen blauen Balken eingegrenzt (y-Achse: \log_{10} relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: PCR-Zyklusanzahl).

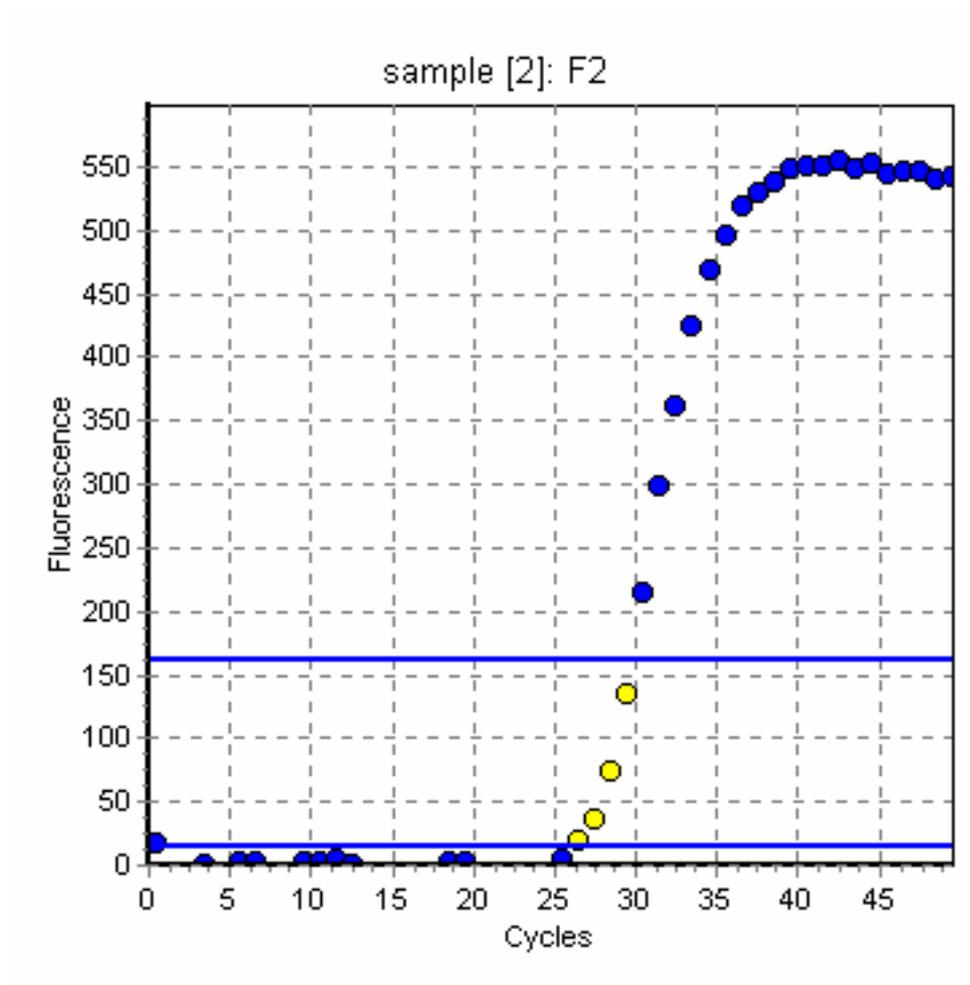


Abbildung 11: Lineare Darstellung einer beispielhaften Amplifikationskurve. Die vier gelben Fluoreszenzdatenpunkte liegen im Bereich der exponentiellen Amplifikation und wurden zur Ermittlung der AE mittels der linearen Regressionsanalyse herangezogen (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: PCR-Zyklusanzahl) (aus *LinRegPCR*, Ramakers et al. 2003).

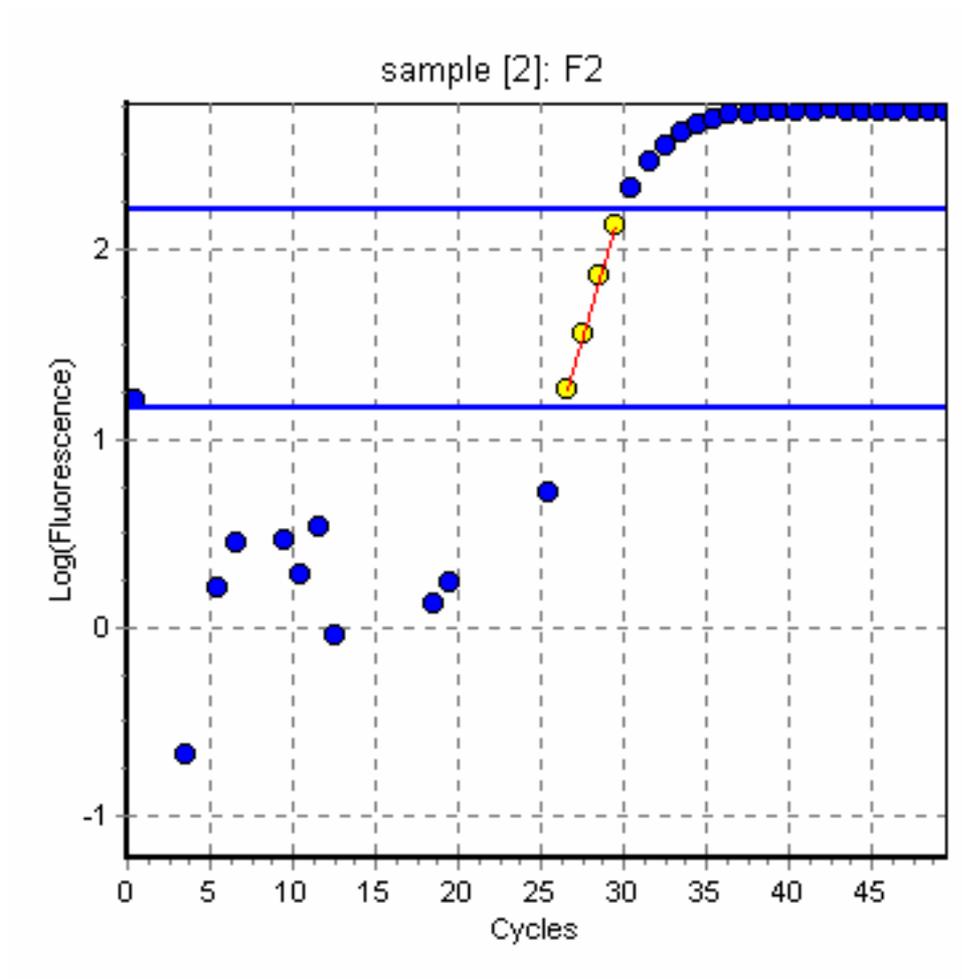


Abbildung 12: Einfach logarithmische Darstellung der Abbildung 11. Die rote Regressionsgerade geht durch vier gelben Fluoreszenzdatenpunkte und besitzt einen Korrelationskoeffizienten von $R = 0,99966$. Die Steigung von 0,2951 ergibt nach der Formel 2 aus Tabelle 2 eine AE von 1,973 bzw. 97,3 % (y-Achse: \log_{10} relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: PCR-Zyklusanzahl) (aus *LinRegPCR*, Ramakers et al. 2003).

Auch bei der Verwendung der RFU-Datenpunkte der ersten, von der Optik über einen deutlichen Fluoreszenzanstieg messbaren Amplifikationszyklen kam es zu unbrauchbaren Ergebnissen. Es zeigte sich, dass sich diese ersten RFU-Datenpunkte von Zyklus zu Zyklus weit über 100% anstiegen, was dem theoretischen Optimum der Replikation entsprochen hätte. Eine Verdrei- bis Vervierfachung der ersten detektierbaren Fluoreszenzdatenpunkte konnte nicht selten beobachtet werden (s. Abb. 13, Abb. 14). In der Regressionsanalyse wirkte sich dies in einem Anstieg der AE auf unrealistisch hohe Werte über 2,0, i.e. über 100 %, aus (s. Abb.

13, Abb. 14). Somit konnten also die ersten ein bis ca. vier RFU-Datenpunkte der initial detektierbaren log-Phase nicht in die lineare Regressionsanalyse miteinbezogen werden, was die Anzahl der zur Ermittlung einer Regressionsgeraden geeigneten Datenpunkte für die meisten Reaktionen auf drei bis vier reduzierte.

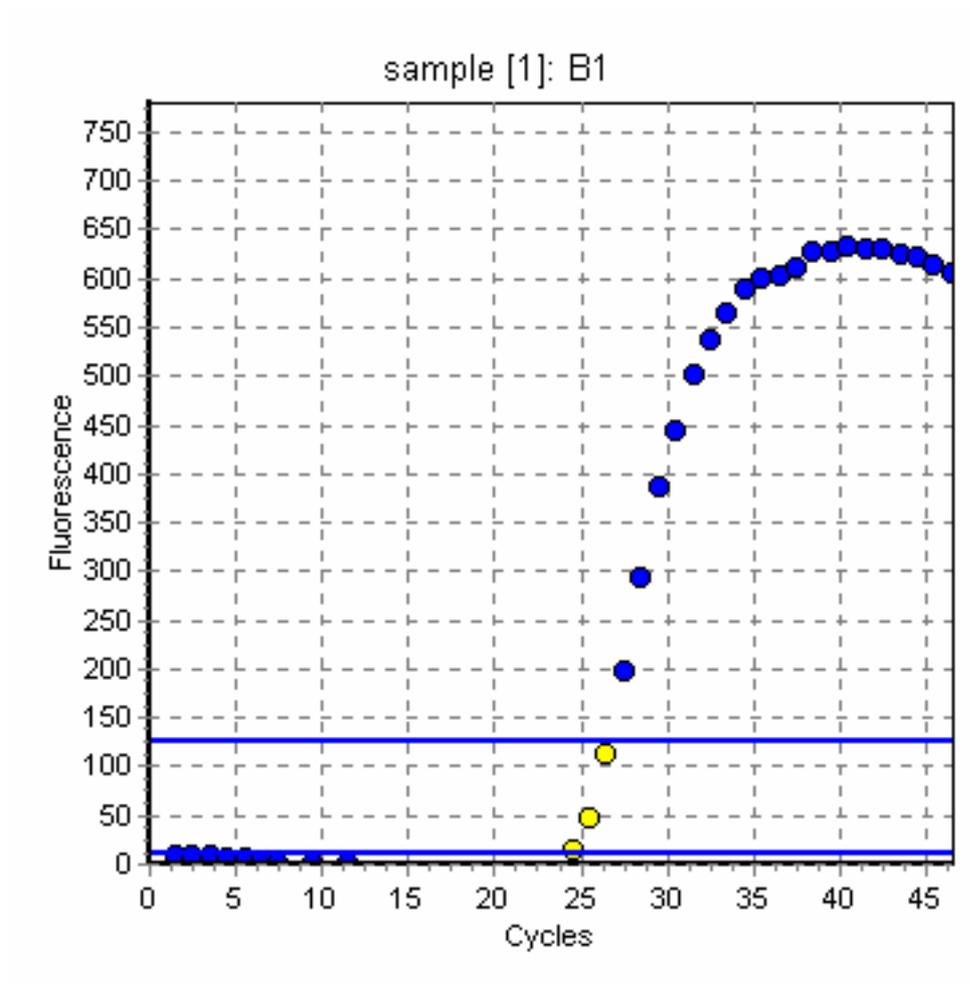


Abbildung 13: Zweifach lineare Darstellung einer Amplifikationskurve mit überexponentiellem Fluoreszenzanstieg der gelben Datenpunkte innerhalb der beiden horizontalen Balken von 14 auf 47 und 113 Fluoreszenzeinheiten Amplifikation (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: PCR-Zyklusanzahl) (aus *LinRegPCR*, Ramakers et al. 2003).

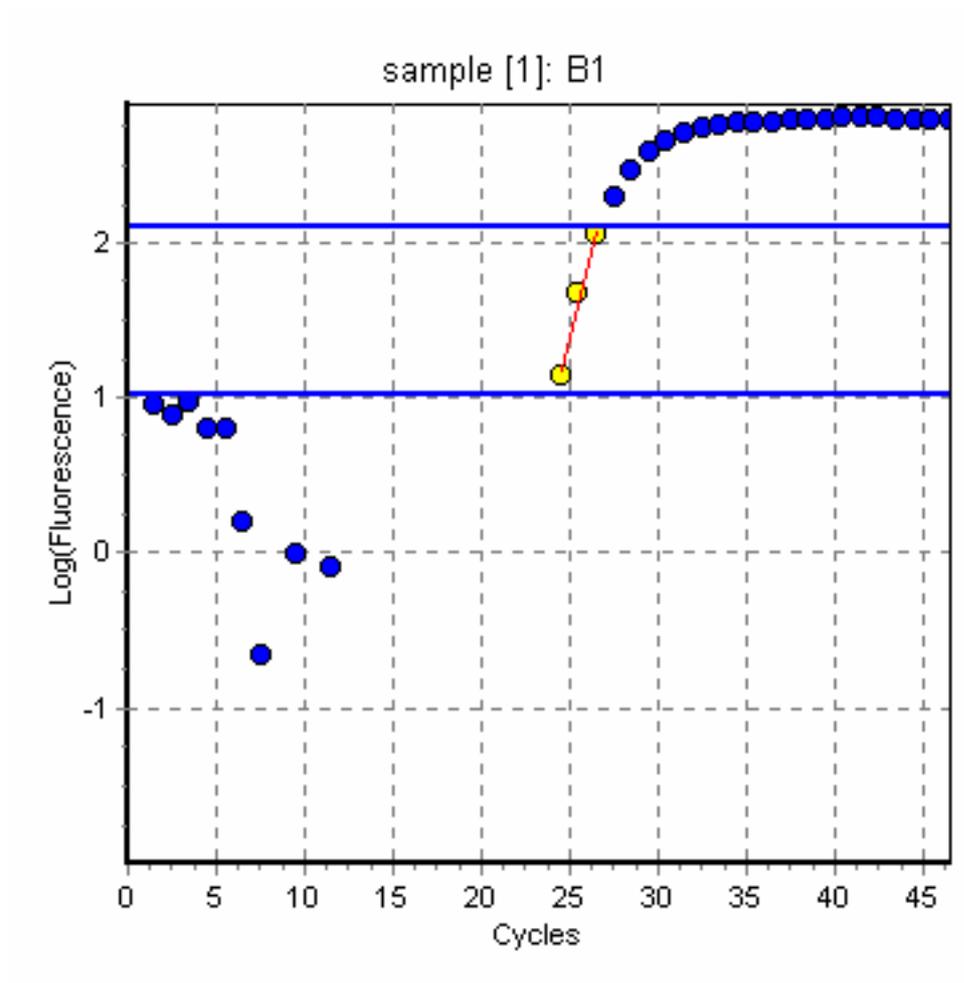


Abbildung 14: Einfach logarithmische Darstellung der Abbildung 13. Die rote Regressionsgerade geht durch die drei gelben Fluoreszenzdatenpunkte. Bei einer Steigung der Regressionsgeraden von 0,4552 ergibt sich nach der Formel 2 aus Tabelle 2 eine Amplifikationseffizienz von 2,852 bzw. 185,2 %. Die Gerade weist einen Korrelationskoeffizienten von 0,99431 auf (y-Achse: \log_{10} relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: PCR-Zyklusanzahl) (aus *LinRegPCR*, Ramakers et al. 2003).

4.3 Ampliconansequenzierung

Die Sequenz der Amplifikationsprodukte aller 12 Oligonukleotidpaare wurde durch Ansequenzierung vom kommerziellen Anbieter (GATC BIOTECH, Konstanz, Deutschland) bestimmt. Ein Abgleich der solchermaßen ermittelten Sequenzen mit den Sequenzen der NCBI-Nukleotiddatenbank (NCBI BLAST: Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)) zeigte eine Sequenzidentität der Amplicons mit der Zielgenesequenz von mindestens 21 Nukleotiden (VE-Cadherin) bis hin zu 217 Nukleotiden (18S rRNA). Diese Ansequenzierung wurde für jedes Oligonukleotidpaar nur von einer Stichprobe der Gesamtheit der Reaktionen für die Entwicklungszeitpunkte E0 bis E7 unternommen. Durch analoge Profile in der Schmelzkurvenanalyse ließen sich die Spezifität der ansequenzierten Amplifikationsprodukte auf die übrigen Amplifikationsprodukte übertragen. Die Spezifität der 12 Oligonukleotidpaare für ihre jeweiligen Zielgenesequenzen sämtlicher Reaktionen der verschiedenen Entwicklungstage und Gewebe war somit bestätigt.

5 Diskussion

Die drei zur Genexpressionsanalyse mittels *real-time* RT-PCR herangezogenen Gewebetypen Embryo, Dottersack und Allantois/Chorioallantois zeigten über den betrachteten Entwicklungszeitraum von E0 bis E7 vielfache Änderungen des Transkriptionslevels der betrachteten Zielgene, die sich in ihrer Gesamtheit als ein Expressionsmuster beschreiben lassen (Latil et al. 2003, Sirisuma et al. 2003, Yamamoto et al. 2004). Für den Entwicklungszeitraum E0 bis E1 konnten lediglich Proben von *in toto* homogenisierten Embryonen bearbeitet werden, wobei die MNE-Werte vom EZP E0 durch eine hohe Streuung auffielen und die relative Quantifizierung von den EZP E1 zu E0 (s. Tab. 14) entsprechend kritisch zu betrachten ist. Des weiteren ist zu beachten, dass bei der Quantifizierung der aufeinanderfolgender EZP E1 und E2 mit den Gewebetypen Embryo und Dottersack (s. Tab. 15) und der EZP E3 und E4 mit Embryo und Allantois/Chorioallantois (s. Tab. 17) zwei unterschiedliche Gewebe zu zwei unterschiedlichen EZPs miteinander verglichen wurden, also nicht nur ein Parameter (EZP) sondern zwei (EZP und Gewebetyp) variiert wurden. Änderungen des Transkriptionslevels zu diesen EZPs können also neben der von einem Tag zum nächsten fortschreitenden Entwicklung auch den Wechsel von einem Gewebe zu einem anderen Gewebe als Ursache haben, bzw. eine Kombination dieser beiden Faktoren. Da zum EZP E1 noch keine Probe vom Dottersack vorlag bzw. zum EZP E3 noch keine Probe von der Allantois, konnten diese Proben nur zu einem heterologen Gewebetyp (Embryo) verglichen werden. Unterschiedliche Transkriptionslevel zu diesen beiden EZPs ließen sich also auf Änderungen mit der Zeit, also von einem EZP zum folgenden EZP, aber auch auf Unterschiede aufgrund der unterschiedlichen Herkunft der isolierten RNA zurückführen.

Für das Zielgen Flk-1 ergab sich über den betrachteten Entwicklungszeitraum von E0 bis E7 in allen Gewebetypen ein stabiles Transkriptionslevel. Es konnte keine Regulation über eine differentielle Gentranskription festgestellt werden. Ab dem EZP E5 lag das Transkriptionslevel in der Allantois/Chorioallantois um das ca. 2-3fache über dem Transkriptionslevel im Dottersack. Dies kann im Zusammenhang mit den intensiven Vaskularisierungsprozessen der Allantois gesehen werden, die um diesen

Zeitpunkt mit dem Chorion zur Chorioallantois verschmilzt (Sethi & Brookes 1970). Die MNE lag mit 10^{-5} - 10^{-4} im oberen Bereich der betrachteten Zielgene. Die relative Quantifizierung des Zielgens Flt-1_cons, welches sowohl die membranständige wie auch die lösliche Form des Rezeptors erfasste, zeigte von E0 auf E1 ca. eine Verfünffachung des MNE-Werts. Dieser frühe Anstieg ist allerdings aufgrund der geringen Präzision der Daten vom EZP E0 kritisch zu betrachten. Es folgt sowohl in Embryo wie auch im Dottersack von E1 auf E2 eine Verdoppelung des MNE-Werts, woraufhin das Transkriptionslevel sich bis einschließlich E7 im Bereich von 6×10^{-5} – 1×10^{-4} bewegt, so dass man ebenfalls von einem stabilen Transkriptionsprofil sprechen kann. Im Vergleich der heterologen Gewebe zueinander zeigten sich ähnliche MNE-Werte. Lediglich zu E7 konnte in der Allantois/Chorioallantois ein ca. 2,5fach höherer Wert nachgewiesen werden. Das Zielgen Flt-1_ms konnte erstmals zum EZP E1 nachgewiesen werden, wobei MNE-Werte um 10^{-7} eine Quantifizierung am oberen Ende der Nachweisgrenze der *real-time* RT-PCR bedeuten und eine entsprechend kritische Bewertung der Daten bedarf. Das Zielgen zeigte in den drei untersuchten Geweben zwischen E1 und E7 ein leichtes auf und ab des Transkriptionslevels, wobei die MNE letztlich in einem Bereich von 10^{-6} verblieb. Entsprechend waren die MNE-Werte im Vergleich der Gewebe zueinander ähnlich. Nur zu den EZPs E5 und E7 wies die Allantois/Chorioallantois eine zweifach- bzw. dreifach höheren MNE-Wert als der Dottersack auf. Die MNE-Werte für Flt-1_ms lagen mit 10^{-7} - 10^{-6} bei ca. 1/100 – 1/10 der MNE-Werte des Zielgens Flt-1_cons, setzt man eine ähnliche AE der beiden Oligonukleotidpaare voraus. Somit macht die lösliche Form des Rezeptors den überwiegenden Anteil der beiden Formen aus. Im Zusammenhang mit der hohen Affinität für VEGF (Waltenberger et al. 1994, Seetharam 1995) erscheint eine im Vergleich zu Flk-1 geringere Konzentration biologisch aktiven, also membranständigen, Flt-1-Proteinrezeptors durchaus möglich. Das Transkript des VEGF-Zielgens konnte erstmals zum EZP E0 nachgewiesen werden. Von E0 auf E1 zeigte sich ca. eine Verdreifachung der MNE, woraufhin das Transkriptionslevel in der Allantois/Chorioallantois noch leicht anstieg, im Dottersack stabil blieb und im Bereich einer MNE von 10^{-4} zu liegen kam. Im Vergleich der verschiedenen Gewebe zueinander ergaben sich abermals Quotienten von ca. 1. Lediglich zum EZP E7 zeigte die Allantois einen gut doppelt so hohen MNE-Wert wie der Dottersack, was den bisherigen Beobachtungen entsprach.

Im VEGF-Rezeptor-Ligandensystem mit seinen vier untersuchten Zielgenen ließen sich somit mit Ausnahme des Zielgens Flt-1_cons zwischen E0 und E1 keine transkriptionellen Regulationen der Größenordnung 10 und höher ermitteln. Eine Regulation der Genexpression über differentielle Transkription findet also nur in beschränktem Rahmen statt. Im Vergleich der Gewebe zueinander fiel auf, dass die Allantois/Chorioallantois v.a. gegen Ende des betrachteten Entwicklungszeitraums generell höhere MNE-Werte aufwies als der Dottersack, während Dottersack und Embryo sehr ähnliche Werte aufwiesen.

Als weiteres Rezeptor-Ligandensystem wurden die Transkripte zu den beiden Proteinen c-kit und SCF quantifiziert, wobei die Änderungen der MNE von einem EZP zum nächsten in einer Größenordnung von 0,2 bis 5 und sich somit ebenfalls nur eine transkriptionelle Regulation in der Größenordnung von 10^1 zeigte. c-kit konnte erstmals zum EZP E1 nachgewiesen werden. Anfänglich sowohl im Embryo als auch im Dottersack leicht auf- und abpendelnde MNE-Werte stiegen im Dottersack ab dem EZP E3 leicht an, um sich bei einem MNE-Wert von ca. 2×10^{-5} zu stabilisieren. In der Allantois konnte von der ersten Probe von E4 an ein Anstieg des Transkriptionslevels nachgewiesen werden. Ein MNE-Wert von 1×10^{-5} zum EZP E7 stellte ca. eine zehnfache Steigerung gegenüber dem Wert zum EZP E4 dar. Das Transkript des Liganden SCF wurde bereits zum EZP E0 nachgewiesen. Im Embryo ergab sich von E0 nach E3 eine Steigerung des MNE-Werts um knapp das fünffache auf $4,8 \times 10^{-5}$. In der Allantois ergab sich anfänglich eine ähnlich hohe Steigerung der Transkription, welche dann jedoch von E6 nach E7 wieder fast auf den MNE-Wert von E4 abfiel. Das Transkriptionslevel im Dottersack erwies sich als stabil, sodass der MNE-Wert von E7 dem ersten MNE-Wert von E2 sehr ähnlich war. Inwieweit ein über mehrere EZPs leicht auf- und abpendelndes Transkriptionslevel das Ergebnis biologischer Regulation ist oder ein methodisches Artefakt lässt sich eventuell durch mehrfache Wiederholung der Versuche ermitteln, konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden.

Die mRNA des interzellulären Adhäsionsproteins VE-Cadherin konnte erstmals zum EZP E1 nachgewiesen werden und zeichnete sich generell durch ein stabiles Transkriptionsniveau aus. Im Dottersack bewegte sich die MNE über den betrachteten Entwicklungszeitraum von E2 bis E7 zwischen 9×10^{-5} und 6×10^{-5} und kann somit als kaum differentiell reguliert betrachtet werden. Im Embryo verhielt sich

die Transkription ganz ähnlich und lediglich in der Allantois/Chorioallantois zeigte sich von E4 auf E5 ein ca. vierfacher Anstieg auf einen MNE-Wert von knapp 4×10^{-4} . Während sich die Expressionslevel von VE-Cadherin in Embryo und Dottersack in derselben Größenordnung bewegten, zeigte die Allantois/Chorioallantois ab E5 einen MNE-Wert der knapp eine Größenordnung über dem des Dottersacks lag. Da VE-Cadherin ein endothelzellspezifisches Adhäsionsmolekül ist (Petzelbauer et al. 2000, Dejana et al. 2000), weist dies auf einen höheren Anteil an Endothelzellen im Gewebe der Allantois/Chorioallantois hin als im Gewebe des Dottersacks. Die zum EZP E7 gegenüber dem Dottersack erhöhten Transkriptionswerte für VEGF und VE-Cadherin in der Allantois/Chorioallantois können im Zusammenhang mit einer gegenüber dem Dottersack gesteigerten mitogenen und antiapoptotischen Aktivität gesehen werden. Das Transkript zum FGF-2-Protein konnte bereits zum EZP E0 nachgewiesen werden, der MNE-Wert befand sich allerdings mit ca. 3×10^{-6} an der Detektionsschwelle der *real-time* RT-PCR. Im Gewebe des Embryos verdreifachte sich das Transkriptionslevel bis hin zu E3 und auch in der Allantois/Chorioallantois zeigte von E4 an ganz ähnliche MNE-Werte, welche zu E7 bei ca. 1×10^{-5} lagen. Im Dottersack halbierte sich die MNE von E2 bis zu E4 von ca. 4×10^{-6} auf ca. 2×10^{-6} , um sich dann von E4 auf E5 um das Siebenfache zu steigern und bis hin zu E7 auf einem Niveau von ca. 1×10^{-5} zu verbleiben. Im Dottersack zeigte sich also vom EZP E4 auf E5 ein im Rahmen der Arbeit außergewöhnlich starker Anstieg des Transkriptionslevels, wodurch das Transkriptionsniveau des Dottersacks auf das der Allantois/Chorioallantois angehoben wurde. Während der frühe Anstieg des Transkriptionslevels im Embryo mit der essentiellen Rolle von FGF-2 bei der Differenzierung von Hämangioblasten in der initialen Phase der Vaskulogenese (Flamme & Risau 1992) im Einklang steht, scheint der starke Anstieg im Dottersack von E4 auf E5, also erst 2 bis 3 Tage nach den ersten morphologisch beobachtbaren Vaskulogeneseprozessen, relativ spät zu erfolgen. Das FGF-2-Transkript stellte eines der wenigen Transkripte dar, dessen MNE-Wert zum EZP E7 annähernd die gleiche Größe des Wertes der Allantois/Chorioallantois zeigte. Für die übrigen Transkripte zeigte sich, dass sie in der Allantois/Chorioallantois zum EZP E7 ca. drei- bis zehnfach stärker transkribiert wurden als im Dottersack. Lediglich c-kit stellte hierbei eine Ausnahme dar, dessen MNE-Wert zum EZP E7 im Dottersack ungefähr das dreifache dessen der Allantois/Chorioallantois betrug. Im gemeinsam

betrachteten Entwicklungszeitraum von Allantois/Chorioallantois und Dottersack von E4 bis hin zu E7 wies die Allantois/Chorioallantois 25 mal ein höheres Transkriptionslevel auf als der Dottersack, während der Dottersack lediglich fünfmal einen höheren MNE-Wert zeigte. Insgesamt kann man also von einer stärkeren transkriptionellen Aktivität in der Allantois/Chorioallantois im Vergleich zum Dottersack sprechen, welche im Verlauf des betrachteten Entwicklungszeitpunkts relativ zum Dottersack auch noch stetig zunimmt (s. Tab. 28).

Das Transkript des Angiopoietin-1-Gens konnte erstmals zum EZP E1 nachgewiesen werden, allerdings mit einem Transkriptionslevel in der Größenordnung von 10^{-8} MNE, also ca. eine Zehnerpotenz unterhalb des Bereichs einer präzisen Quantifizierung. Ausgehend von diesem kritisch zu betrachtenden Wert kommt es zu einer ungefähr einhundertfachen Steigerung zum EZP E2 in beiden untersuchten Geweben. Im embryonalen Gewebe folgt eine Steigerung um das zwanzigfache zum EZP E3, während sich das Transkriptionslevel im Dottersack lediglich um das vierfache erhöht. Zum EZP E3 hat die Transkriptionsintensität des Ang-1-Zielgens ihr Maximum erreicht und fällt in der Folge zum EZP E4 im Dottersack auf ca. die Hälfte ab um bis zum EZP E7 auf einem Transkriptionslevel von ca. 5×10^{-6} zu verbleiben. In der ersten Allantois/Chorioallantois zum EZP E4 zeigt sich ein geringeres Transkriptionslevel als in den bisher betrachteten Proben, zum EZP E5 steigt dieses allerdings um ca. das siebenfache an und erreicht somit das Niveau der Embryoprobe von E3. Das Angiopoietin-1-Gen erreicht somit in Embryo und Dottersack zum EZP E3 sein Maximum, während sich in der Allantois/Chorioallantois erst zum EZP E6 die höchste Transkriptionsintensität zeigt. Diese verzögerte Transkription eines Botenstoffs, welcher eine wichtige Rolle bei der stabilisierend wirkenden Interaktion von EZ und Perizyten spielt (Suri et al. 1996) überrascht aufgrund der morphologischen Verhältnisse nicht und kann mit der, im Laufe der Embryonalentwicklung zunehmenden Bedeutung der Allantois/Chorioallantois für die Stoffwechselbedürfnisse des Embryos gesehen werden, welche sich im fortlaufenden Größenwachstum und in der Vaskularisierung dieses extraembryonalen Organs manifestiert (Hamburger & Hamilton 1992). Das Transkriptionslevel von Ang-1 lag vom EZP E5 an bis E7 in der Allantois/Chorioallantois entsprechend über dem Level im Dottersack. Die Transkripte zu den Wachstumsfaktor BMP2 und BMP4 konnten im Embryo bereits zum EZP E0 nachgewiesen werden und stellten mit einem MNE-Wert von ca.

7×10^{-6} die in diesem Entwicklungsstadium am stärksten transkribierten Faktoren dar. BMP2 zeigte im Embryo daraufhin ein auf und ab des Transkriptionslevels um schließlich auf ein Niveau von ca. 10^{-4} zum EZP E3 zu gelangen. Das BMP2-Transkriptionslevel in der Allantois verhielt sich vom EZP E4 bis zum letzten betrachteten EZP E7 stabil und lag im Bereich von ca. 5×10^{-4} MNE-Einheiten. Im Dottersack zeigte BMP2 ebenso eine recht stabile Transkriptionsintensität und lag im Bereich von ca. 5×10^{-5} MNE-Einheiten. Lediglich zum EZP E5 zeigte die Transkription einen Anstieg auf über den zweifachen Wert, um dann zum EZP E6 hin wieder auf den ursprünglichen Wert abzufallen. Im Vergleich der Gewebe zueinander zeigten sich in Embryo und Dottersack ganz ähnliche Transkriptionslevel, wohingegen die Allantois/Chorioallantois zu den verschiedenen EZPs E4 bis E7 knapp den zehnfachen MNE-Wert des Dottersacks aufwies. Der, wie oben bereits erwähnt, vergleichsweise hohe MNE-Wert für BMP4 zum EZP E0 im Embryo fällt zum EZP E1 auf knapp die Hälfte ab und verbleibt in der Folge bei ca. 2×10^{-5} . In der Allantois/Chorioallantois zeigte sich in den ersten beiden betrachteten Entwicklungstagen ein Anstieg auf ca. 10^{-4} MNE-Einheiten wobei dieser Wert bis hin zu E7 stabil blieb. Im Dottersack ergab sich zum ersten betrachteten EZP ein Wert von ca. 2×10^{-5} der sich ohne größere Änderungen bis zu EZP E7 fortsetzte. Analog zu den Verhältnissen bei BMP2 zeigten sich bei BMP4 ganz ähnliche Transkriptionswerte in Embryo und Dottersack, während die Allantois einen ca. fünffach höheren MNE-Wert aufwies. Diese Tatsachen gliedern sich in das bisher beobachtete Schema einer, mit einer generell höheren transkriptionellen Aktivität assoziierten, verzögerten Vasculo- und Hämatopoiese in der Allantois/Chorioallantois ein, deren Voraussetzung eine BMP-gesteuerte Differenzierung von Blutinseln aus mesodermalen Gewebe ist (Hemmati-Brivanlou & Thomsen 1995, Maeno et al. 1996, Dosch et al. 1997, Davidson et al. 2000).

Bei sämtlichen durchgeführten Berechnungen zur relativen Quantifizierung wurden ausschließlich Reaktionsansätze gleicher Oligonukleotidpaare verglichen, i.e. es wurde z.B. kein MNE-Wert des Zielgens Flk-1 mit einem MNE-Wert des Zielgens BMP2 in Bezug gesetzt. Auf diese Weise konnten die evtl. unterschiedlichen AE der verschiedenen Oligonukleotidpaare vernachlässigt werden. Eine Variation der AE eines Oligonukleotidpaares in Abhängigkeit von der durchlaufenen Zykluszahl könnte jedoch zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen und wäre mit den angewandten Methoden kaum zu erfassen gewesen. Mittels der linearen Regressionsanalyse (s.

4.2.3.2) sollte eine solche zyklusabhängige AE nachzuweisen sein, allerdings ließen die Unzulänglichkeiten der computergestützten Regressionsanalyse, i.e. der Mangel an validen RFU-Datenpunkten, eine solche Überprüfung nicht zu. Während der Übergang von der exponentiellen in eine lineare Amplifikation und schließlich das Ausbleiben jeglicher Vervielfältigung ein PCR-intrinsisches Faktum darstellt (Morrison & Gannon 1994), scheint die übermäßige Vervielfachung der initialen RFU-Datenpunkte ein bisher kaum beachtetes Problem darzustellen. Auch eine Rücksprache mit dem Hersteller des verwendeten Thermocyclers bzw. optischen Moduls (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA, persönliche Mitteilung) ergab diesbezüglich keine Klärung. Ein Außendienstmitarbeiter der Roche Diagnostics GmbH (Roche Diagnostics GmbH, Außendienst Forschungslabor, Vertrieb Deutschland), bei welcher dieses Phänomen ebenfalls beobachtet wurde, wies auf die Möglichkeit hin, dass es nach dem Massenwirkungsgesetz bei einem starken Überschuss an Oligonukleotiden, dNTPs und Enzym im Verhältnis zu den Matrizenmolekülen auch bei der Elongationstemperatur von 60°C zu einer Denaturierung zumindest eines Bruchteils der dsDNA mit anschließender spezifischer Oligonukleotidanlagerung und erneuter Amplifikation kommen könnte. So würden innerhalb eines Temperaturzyklusses mehr als ein Amplifikationszyklus ablaufen, wodurch sich mehrere AEs < 2 zu einer scheinbar einzigen AE > 2 aufsummieren würden. Da in den allerersten Zyklen, vor dem Auftreten eines messbaren Fluoreszenzanstiegs, die Reaktionskomponenten in noch größerem Überschuss gegenüber den ssDNA-Matrizenmolekülen vorliegen, ist mit diesem Effekt der Aufsummierung von einzelnen Amplifikationszyklen innerhalb eines Temperaturzyklusses vom ersten Zyklus an zu rechnen. Die Verwendung eines PCR-Thermoprotokolls mit einer kombinierten Oligonukleotidanlagerung und –verlängerung bei lediglich 60°C sollte geeignet sein diesen Effekt noch abzuschwächen, da bei der sonst üblichen Elongationstemperatur von 72°C ein noch größerer Anteil der Amplifikationsprodukte zu Einzelsträngen denaturiert werden würde. In der Literatur wird zwar von einer dynamischen AE gesprochen (Rutledge 2004), über das Phänomen einer frühen überexponentiellen Amplifikation konnten jedoch keine Beiträge gefunden werden. Eine weitere Ursache für eine überexponentielle AE wäre die parallele Amplifikation alternativer Matrizenmoleküle, i.e. genomischer DNA. Dies ist jedoch auf Grund der Ergebnisse aus den RT-Minus-Kontrollen sowie den Sequenzierungsergebnissen auszuschließen.

Für die Ermittlung der AE vieler Reaktionen konnten nur drei RFU-Datenpunkte der logarithmischen Phase zugeordnet und somit herangezogen werden, obwohl von Ramakers et al. eine Verwendung von vier bis sechs Punkten empfohlen wird (Ramakers et al. 2003). Dies war unumgänglich, da frühere Datenpunkte die oben erwähnte unrealistische RFU-Vervielfachung weit über eine Verdoppelung zeigten und spätere RFU-Datenpunkte bereits in die Sättigungsphase fielen. Die Tatsache, dass einer der drei im *LinRegPCR*-Programm verfügbaren Anpassungsalgorithmen die Regressionsgerade durch mindestens drei Datenpunkte mit optimalem Korrelationskoeffizienten aufstellte, was den eigenen Empfehlungen der Autoren zuwiderläuft, zeigt, dass die Autoren um das Problem mangelnder Datenpunkte aus der logarithmischen Phase wissen. Obwohl die obere Grenze der exponentiellen Amplifikation für die durchgeführten Reaktionsansätze bei ca. 150 RFU lag, wurden für die Regressionsanalyse z.T. Datenpunkte über dieser Grenze herangezogen. Dies war für einen Teil der Reaktionsansätze notwendig um auf eine Datenpunktanzahl von mindestens 3 zu gelangen. Die Verwendung solcher Datenpunkte der linearen Amplifikationsphase konnte außerdem den übermäßigen Anstieg der initialen Datenpunkte kompensieren, was zu realistischen Werten für die AE im Bereich von ca. 1,8 – 2,0 führte. Da eine solche Kompensation zweier voneinander unabhängiger Fehlerquellen abzulehnen ist, wurden die über das *LinReg*-Computerprogramm ermittelten AE der einzelnen Oligonukleotidpaare nicht für die relative Quantifizierung mittels *Q-Gene* herangezogen und stattdessen eine AE von 1,95 (95%) für sämtliche Oligonukleotidpaare postuliert. Aus der Bestimmung der AE über die simultane Amplifikation von Verdünnungsreihen zur Erstellung einer Standardkurve (Kamphuis et al. 2001, Meijerink et al. 2001) zeigte sich *in praxi* für verschieden Oligonukleotidpaare unter der Bedingung einer Schmelzkurve mit lediglich einem Gipfel und einer einzelnen Bande der erwarteten Größe in der Agarosegelelektrophorese etwa dieser Wert. Eine exakte, vorannahmenfreie Bestimmung der individuellen AE einer jeden Reaktion anhand der linearen Regressionsanalyse wäre dem sicher vorzuziehen gewesen, erwies sich allerdings aufgrund des Phänomens der frühen überexponentiellen RFU-Vervielfachung als nicht praktikabel.

6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, im Rahmen einer ersten Orientierungsstudie, eine molekularbiologische Beschreibung des Transkriptionsprofils verschiedener vasculo-, angio-, und hämatogener Botenstoffe (Flk-1, Flt-1, VEGF, c-kit, SCF, VE-Cadherin, FGF-2, Ang-1, BMP2, BMP4) in den Geweben der frühen Gefäß- und Blutzellbildung des Hühnerembryos zu geben. Hierzu wurde auf die Methode der quantitativen *real-time* RT-PCR zurückgegriffen, mittels derer die Menge definierter Transkripte in zuvor entsprechend prozessierten Gewebeproben bestimmt werden kann.

Im Verlauf der ersten sieben Entwicklungstage (E0-E7) wurden Gewebeproben von den beiden extraembryonalen hämangiopoetischen Organen, dem Dottersack und der Allantois bzw. der Chorioallantois, sowie vom Embryo selbst genommen und anhand der oben erwähnten molekularbiologischen Methode auf ihren mRNA-Gehalt hin untersucht. Die solchermaßen gewonnenen Daten ermöglichten eine relative, also das Transkriptionslevel verschiedener Proben miteinander vergleichende, Quantifizierung, so dass die transkriptionelle Aktivität und somit näherungsweise auch der zeitliche Verlauf der Genexpression der untersuchten Botenstoffe im ersten Drittel der Embryonalentwicklung des Huhns beschrieben werden konnte.

Es konnte gezeigt werden, dass die Intensität der Transkription der betrachteten Gene in der Allantois/Chorioallantois generell höher war als im Dottersack und dieses Ungleichgewicht vom EZP E4 zum EZP E7 noch stetig zunahm. Somit ist in der Allantois/Chorioallantois in diesem Zeitraum von einem stärkeren vaskulo- und angiogenetischen Geschehen auszugehen als im Dottersack und der höhere Gehalt an VE-Cadherin-mRNA weist dementsprechend auch auf einen vergleichsweise höheren Anteil an Endothelzellen im Gewebe der Allantois/Chorioallantois hin.

Für die Zielgene Flk-1, Flt-1_cons, VEGF und VE-Cadherin konnten lediglich geringe Schwankungen im zellulären mRNA-Gehalt der betrachteten Organe über den untersuchten Entwicklungszeitraum beobachtet werden, sodass man insgesamt von einer stabilen Transkriptionsintensität dieser Faktoren sprechen kann.

Für die Zielgene Flt-1_ms, c-kit, SCF, BMP2 und BMP4 zeigten sich sowohl geringe Steigerungen sowie Verminderungen des mRNA-Gehalts über den Entwicklungszeitraum, die von einem Entwicklungstag zum darauf folgenden im

Bereich vom 0,2 bis 5fachen des Transkriptionslevels vom Vortag lagen. Differentielle Transkriptionsintensitäten die sich von einem EZP zum nächsten um den Faktor 5 und mehr unterschieden konnte lediglich für die Zielgene FGF-2 und Ang-1 festgestellt werden. So ergab sich für FGF-2 im Dottersack bzw. für Ang-1 in der Allantois/Chorioallantois vom EZP E4 auf den EZP E5 ein ca. 700 %iger Anstieg des Transkriptionslevels, was die Bedeutung der korrelierenden, vasculogenese- und angiogenesefördernden Proteine für die Ontogenese v.a. des Gefäßsystems dieser Organe zu genau diesem Entwicklungszeitpunkt zum Ausdruck bringt. Im Embryo konnte vom EZP E1 auf den EZP E2 eine ca. 40fache Steigerung des zellulären mRNA-Gehalts von Ang-1 festgestellt werden, welcher zum EZP E3 hin noch eine ca. 20fache Steigerung folgte. Vom EZP E1 auf den EZP E3 ergibt sich somit ein Anstieg um einen Faktor von knapp 10^3 , was der bei weitem stärksten beobachteten Regulation der in der Arbeit betrachteten Gene entspricht. Im Dottersack zeigte sich ein vergleichbar hoher mRNA-Gehalt für Ang-1, so dass, unter der Annahme einer effizienten Translation, eine außerordentlich wichtige Funktion des entsprechenden Proteins für die Reifung des primären Kapillarplexus im Embryo wie auch im Dottersack, nach 3 Tagen der extrauterinen Entwicklung postuliert werden kann. Die Bestimmung der individuellen Amplifikationseffizienz einer jeden Reaktion der *real-time* RT-PCR anhand der rechnergestützten linearen Regressionsanalyse ergab für die ersten Zyklen mit detektierbarer Amplifikation und entsprechendem Fluoreszenzlichtanstieg über die Hintergrundfluoreszenz oftmals eine Vervielfachung auf weit über den doppelten bis hin zum vierfachen RFU-Wert. Dies widerspricht dem theoretischen Maximum einer exponentiellen Amplifikation zur Basis zwei und könnte der Effekt eines starken mengenmäßigen Ungleichgewichts der limitierten Matrizenmoleküle zu den übrigen, v.a zu Beginn der Reaktion im Überschuss vorliegenden, PCR-Edukten der Reaktion sein. Eine genauere Betrachtung der Reaktionskinetik in der exponentialen Phase der PCR erscheint für eine noch exaktere Nukleotidquantifizierung sinnvoll.

7 Summary

Relative quantification of vasculo- and angiogenesis associated growth factors in the early embryologic development of the chick (*Gallus gallus domesticus*) by *real-time* RT-PCR.

Aim of the study was the description of the transcriptional profile of different vasculogenic, angiogenic and haematogenic growth factors (Flk-1, Flt-1, VEGF, c-kit, SCF, VE-Cadherin, FGF-2, Ang-1, BMP2, BMP4) in the tissues of early vessel- and blood cell formation of the chick embryo. For this purpose the quantitative *real-time* RT-PCR was used, with which the amount of defined transcripts in previously processed tissue samples can be determined.

In the course of the first seven days (E0 – E7) of embryologic development tissue samples of the two extraembryonic haemangiopoetic organs, the yolk sac and the allantois/chorioallantois, as well as of the embryo itself were taken and the mRNA-quantity of the numbered factors determined as mentioned above. By this means a comparison of the transcriptional levels in the different samples was achieved and enabled relative quantification. So the transcriptional activity and the approximate time course of gene expression of the investigated growth factors in the first third of chick development could be determined.

It was shown that the transcriptional activity of the genes of interest was generally higher in the allantois/chorioallantois compared to the yolk sac. This imbalance even grew constantly from embryonic age E4 to E7. Thus in the allantois/chorioallantois a more intense vasculogenesis/angiogenesis compared to the yolk sac was taking place and according to that the higher amount of VE-Cadherin suggested a higher fraction of endothelial cells in the tissues of the allantois/chorioallantois. The target genes Flk-1, Flt-1_cons, VEGF und VE-Cadherin showed only small fluctuations of the cellular mRNA content over the course of the observed development, *i.e.* they were transcribed with a quite stable intensity. For the target genes Flt-1_ms, c-kit, SCF, BMP2 und BMP4 minor increases as well as minor decreases of the cellular mRNA content were observed, which varied from one day of embryologic development to the next with a factor in the range of 0,2 to 5. Differential transcriptional intensities higher than that were only observed for FGF-2 and Ang-1.

For FGF-2 in the yolk sac, respectively Ang-1 in the allantois/chorioallantois, an approximate sevenfold increase of the transcriptional level from E4 to E5 could be shown. This may underline the importance of the correlated proteins for the ontogenesis of these organs at that point of time. In the embryo from E1 to E2 an approximate 40fold increase of the cellular mRNA content of Ang-1 was observed, which was followed by an about 20fold increase up to E3. From E1 to E3 these increases summed up to an almost 1000fold increase, which was by far the strongest regulational activity observed in this study. In the yolk sac a similarly high amount of Ang-1 mRNA was detected, suggesting an effective translation, great importance of the correlating angiogenic proteins for the maturation of the primary capillary plexuses in the embryo as well as in the yolk sac after three days of extrauterine development can be postulated.

The determination of the individual amplification efficiency of each reaction of the *real-time* RT-PCR with the help of computer-based linear regression analysis resulted for the first cycles with detectable amplification and according increase in fluorescence-intensity in a multiplication to far over the double up to the fourfold RFU-value from one cycle to the next. This contradicts the theoretical maximum of an exponential amplification to the base of two and could be the result of a quantitative imbalance in the limited matrix-molecules compared to the other, prominent at the beginning of the reaction in extense present, PCR-educts. An intense observation of the reaction kinetics of exponential phase PCR-amplification seems helpful for an even more exact nucleotide-quantification.

8 Literaturverzeichnis

Angst BD, Marcozzi C, Magee AI.

The cadherin superfamily.

J Cell Sci. 2001 Feb;114(Pt 4):625-6.

Arendt D, Nubler-Jung K.

Rearranging gastrulation in the name of yolk: evolution of gastrulation in yolk-rich amniote eggs.

Mech Dev. 1999 Mar;81(1-2):3-22. Review.

Aristoteles

The Generation of Animals

Harvard University Press, Cambridge, MA, 1990

Ashman LK.

The biology of stem cell factor and its receptor C-kit.

Int J Biochem Cell Biol. 1999 Oct;31(10):1037-51. Review.

Axel R, Feigelson P, Schutz G.

Analysis of the complexity and diversity of mRNA from chicken liver and oviduct.

Cell. 1976 Feb;7(2):247-54.

Barbu V, Dautry F.

Northern blot normalization with a 28S rRNA oligonucleotide probe.

Nucleic Acids Res. 1989 Sep 12;17(17):7115.

Bellairs R, Breathnach AS, Gross M.

Freeze-fracture replication of junctional complexes in unincubated and incubated chick embryos.

Cell Tissue Res. 1975 Sep 17;162(2):235-52.

Bellairs R, Osmond M

The Atlas of Chick Development

Academic Press, San Diego, California, 1998

Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Podes D, Keshet E.

Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal.

J Clin Invest. 1999 Jan;103(2):159-65.

Bhatia P, Taylor WR, Greenberg AH, Wright JA.

Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential.

Anal Biochem. 1994 Jan;216(1):223-6.

Belaousoff M, Farrington SM, Baron MH.

Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo.

Development. 1998 Dec;125(24):5009-18.

Blanquicett C, Johnson MR, Heslin M, Diasio RB.

Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies.

Anal Biochem. 2002 Apr 15;303(2):209-14.

Bond BC, Virley DJ, Cairns NJ, Hunter AJ, Moore GB, Moss SJ, Mudge AW, Walsh FS, Jazin E, Preece P.

The quantification of gene expression in an animal model of brain ischaemia using TaqMan *real-time* RT-PCR.

Brain Res Mol Brain Res. 2002 Oct 15;106(1-2):101-16.

Borge OJ, Ramsfjell V, Cui L, Jacobsen SE.

Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin.

Blood. 1997 Sep 15;90(6):2282-92.

Bosch I, Melichar H, Pardee AB.

Identification of differentially expressed genes from limited amounts of RNA.

Nucleic Acids Res. 2000 Apr 1;28(7):E27.

Brooks PC.

Role of integrins in angiogenesis.

Eur J Cancer. 1996 Dec;32A(14):2423-9. Review.

Broudy VC.

Stem cell factor and hematopoiesis.

Blood. 1997 Aug 15;90(4):1345-64. Review.

Buonamici S, Ottaviani E, Testoni N, Montefusco V, Visani G, Bonifazi F, Amabile M, Terragna C, Ruggeri D, Piccaluga PP, Isidori A, Malagola M, Baccarani M, Tura S, Martinelli G.

Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state.

Blood. 2002 Jan 15;99(2):443-9.

Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S.

Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients.

Br J Cancer. 1999 Apr;79(11-12):1813-20.

Bustin SA.

Absolute quantification of mRNA using *real-time* reverse transcription polymerase chain reaction assays.

J Mol Endocrinol. 2000 Oct;25(2):169-93. Review.

Bustin SA.

Quantification of mRNA using *real-time* reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.

J Mol Endocrinol. 2002 Aug;29(1):23-39. Review.

Caprioli A, Jaffredo T, Gautier R, Dubourg C, Dieterlen-Lievre F.

Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Feb 17;95(4):1641-6.

Caprioli A, Minko K, Drevon C, Eichmann A, Dieterlen-Lievre F, Jaffredo T.

Hemangioblast commitment in the avian allantois: cellular and molecular aspects.

Dev Biol. 2001 Oct 1;238(1):64-78.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A.

Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.

Nature. 1996 Apr 4;380(6573):435-9.

Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E.

Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis.

Cell. 1999 Jul 23;98(2):147-57.

Cathala G, Savouret JF, Mendez B, West BL, Karin M, Martial JA, Baxter JD.

A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid.

DNS. 1983;2(4):329-35.

Caveda L, Martin-Padura I, Navarro P, Breviario F, Corada M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E.

Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin).

J Clin Invest. 1996 Aug 15;98(4):886-93.

Chandler DP, Wagnon CA, Bolton H Jr.

Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR.

Appl Environ Microbiol. 1998 Feb;64(2):669-77.

Cheung IY, Cheung NK.

Quantitation of marrow disease in neuroblastoma by *real-time* reverse transcription-PCR.

Clin Cancer Res. 2001 Jun;7(6):1698-705.

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ.

Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.

Biochemistry. 1979 Nov 27;18(24):5294-9.

Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G.

A common precursor for hematopoietic and endothelial cells.

Development. 1998 Feb;125(4):725-32.

Chomczynski P, Sacchi N.

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9.

Chu Y, Heistad DD, Knudtson KL, Lamping KG, Faraci FM.

Quantification of mRNA for endothelial NO synthase in mouse blood vessels by *real-time* polymerase chain reaction.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Apr 1;22(4):611-6.

Cormier F, Dieterlen-Lievre F.

The wall of the chick embryo aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E. Development. 1988 Feb;102(2):279-85.

Crick F.

Central dogma of molecular biology.

Nature. 1970 Aug 8;227(258):561-3.

Curry J, McHale C, Smith MT.

Low efficiency of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase during reverse transcription of rare t(8;21) fusion gene transcripts.

Biotechniques. 2002 Apr;32(4):768, 770, 772, 754-5.

Davidson AJ, Zon LI.

Turning mesoderm into blood: the formation of hematopoietic stem cells during embryogenesis.

Curr Top Dev Biol. 2000;50:45-60. Review.

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD.

Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning.

Cell. 1996 Dec 27;87(7):1161-9.

Dawkins R

The Extended Phenotype

Oxford University Press, Oxford, England, 1999.

Deindl E, Boengler K, van Royen N, Schaper W.

Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries.

Mol Cell Biochem. 2002 Jul;236(1-2):139-46.

Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O, Bazzoni G.

The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability.

Int J Dev Biol. 2000;44(6):743-8. Review.

Dejana E, Spagnuolo R, Bazzoni G.

Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration.

Thromb Haemost. 2001 Jul;86(1):308-15. Review.

de Leeuw WJ, Slagboom PE, Vijg J.

Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control.

Nucleic Acids Res. 1989 Dec 11;17(23):10137-8.

Dieterlen-Lievre F, Martin C.

Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development.

Dev Biol. 1981 Nov;88(1):180-91.

Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH.

Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells.

J Biol Chem. 1992 Jan 15;267(2):1279-85.

Dosch R, Gawantka V, Delius H, Blumenstock C, Niehrs C.

Bmp-4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*.

Development. 1997 Jun;124(12):2325-34.

Downs KM, Harmann C.

Developmental potency of the murine allantois.

Development. 1997 Jul;124(14):2769-80.

Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML.

Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development.

Dev Dyn. 1995 May;203(1):80-92.

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA.

Laser capture microdissection.

Science. 1996 Nov 8;274(5289):998-1001.

Eyal-Giladi H

The early embryonic development of the chick, an epigenetic process.

Crit. Rev. Poultry Biol. 1991 3: 143-166

Eyal-Giladi H.

Establishment of the axis in chordates: facts and speculations.

Development. 1997 Jun;124(12):2285-96. Review.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW.

Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene.

Nature. 1996 Apr 4;380(6573):439-42.

Ferrara N, Davis-Smyth T.

The biology of vascular endothelial growth factor.

Endocr Rev. 1997 Feb;18(1):4-25. Review.

Ferre F.

Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth.
PCR Methods Appl. 1992 Aug;2(1):1-9. Review.

Flamme I, Risau W.

Induction of vasculogenesis and hematopoiesis *in vitro*.
Development. 1992 Oct;116(2):435-9.

Flamme I, Breier G, Risau W.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo.

Dev Biol. 1995 Jun;169(2):699-712.

Gelmini S, Tricarico C, Vona G, Livi L, Melina AD, Serni S, Cellai E, Magrini S, Villari D, Carini M, Serio M, Forti G, Pazzagli M, Orlando C.

Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the measurement of prostate-specific antigen mRNA in the peripheral blood of patients with prostate carcinoma using the taqman detection system.

Clin Chem Lab Med. 2001 May;39(5):385-91.

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N.

Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells.

J Biol Chem. 1998 May 22;273(21):13313-6.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N.

Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation.

J Biol Chem. 1998 Nov 13;273(46):30336-43.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM.

A novel method for real time quantitative RT-PCR.

Genome Res. 1996 Oct;6(10):995-1001.

Gilbert SF

Developmental Biology (Seventh Edition)

Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA, 2003

Ginzinger DG.

Gene quantification using *real-time* quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream.

Exp Hematol. 2002 Jun;30(6):503-12. Review.

Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH.

beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels.

Thorax. 2002 Sep;57(9):765-70.

Godin IE, Garcia-Porrero JA, Coutinho A, Dieterlen-Lievre F, Marcos MA.

Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors.

Nature. 1993 Jul 1;364(6432):67-70.

Goerke C, Bayer MG, Wolz C.

Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR.

Clin Diagn Lab Immunol. 2001 Mar;8(2):279-82.

Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J.

Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Oct;86(19):7311-5.

Greijer AE, Adriaanse HM, Dekkers CA, Middeldorp JM.

Multiplex *real-time* NASBA for monitoring expression dynamics of human cytomegalovirus encoded IE1 and pp67 RNA.

J Clin Virol. 2002 Feb;24(1-2):57-66.

Gruffat D, Piot C, Durand D, Bauchart D.

Comparison of four methods for isolating large mRNA: apolipoprotein B mRNA in bovine and rat livers.

Anal Biochem. 1996 Nov 1;242(1):77-83.

Guhaniyogi J, Brewer G.

Regulation of mRNA stability in mammalian cells.

Gene. 2001 Mar 7;265(1-2):11-23. Review.

Gualandris A, Presta M.

Transcriptional and posttranscriptional regulation of urokinase-type plasminogen activator expression in endothelial cells by basic fibroblast growth factor.

J Cell Physiol. 1995 Mar;162(3):400-9.

Hamaguchi I, Huang XL, Takakura N, Tada J, Yamaguchi Y, Kodama H, Suda T.

In vitro hematopoietic and endothelial cell development from cells expressing TEK receptor in murine aorta-gonad-mesonephros region.

Blood. 1999 Mar 1;93(5):1549-56.

Hamalainen HK, Tubman JC, Vikman S, Kyrola T, Ylikoski E, Warrington JA, Lahesmaa R.

Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative *real-time* RT-PCR.

Anal Biochem. 2001 Dec 1;299(1):63-70.

Hamburger V, Hamilton HL.

A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951.

Dev Dyn. 1992 Dec;195(4):231-72.

Hanahan D.

Signaling vascular morphogenesis and maintenance.
Science. 1997 Jul 4;277(5322):48-50.

Harvey W.

Exercitationes de generatione animalium: quibus accedunt quaedam de partu,
de membranis ac humoribus uteri et de conceptione.
1651, London.

He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS.

Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1)
pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity.
Mol Endocrinol. 1999 Apr;13(4):537-45.

Hegde PS, White IR, Debouck C.

Interplay of transcriptomics and proteomics.
Curr Opin Biotechnol. 2003 Dec;14(6):647-51.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM.

Real time quantitative PCR.
Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94.

Hemmati-Brivanlou A, Thomsen GH.

Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and
activities of BMP-2 and BMP-4.
Dev Genet. 1995;17(1):78-89.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R.

Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.
Biotechnology (N Y). 1992 Apr;10(4):413-7.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.

Kinetic PCR analysis: *real-time* monitoring of DNA amplification reactions.
Biotechnology (N Y). 1993 Sep;11(9):1026-30.

Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M.

Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Aug 4;95(16):9349-54.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH.

Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 15;88(16):7276-80.

Ideker T, Thorsson V, Ranish JA, Christmas R, Buhler J, Eng JK, Bumgarner R, Goodlett DR, Aebersold R, Hood L.

Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network.

Science. 2001 May 4;292(5518):929-34.

Irani AM, Nilsson G, Miettinen U, Craig SS, Ashman LK, Ishizaka T, Zsebo KM, Schwartz LB.

Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells.

Blood. 1992 Dec 15;80(12):3009-21.

Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lievre F.

Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny.

Development. 1998 Nov;125(22):4575-83.

Jaffredo T, Gautier R, Brajeul V, Dieterlen-Lievre F.

Tracing the progeny of the aortic hemangioblast in the avian embryo.

Dev Biol. 2000 Aug 15;224(2):204-14.

Jenson SD, Robetorye RS, Bohling SD, Schumacher JA, Morgan JW, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS.

Validation of cDNA microarray gene expression data obtained from linearly amplified RNA.

Mol Pathol. 2003 Dec;56(6):307-12.

Kainz P.

The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations.

Biochim Biophys Acta. 2000 Nov 15;1494(1-2):23-7.

Kallianpur AR, Jordan JE, Brandt SJ.

The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis.

Blood. 1994 Mar 1;83(5):1200-8.

Kamphuis W, Schneemann A, van Beek LM, Smit AB, Hoyng PF, Koya E.

Prostanoid receptor gene expression profile in human trabecular meshwork: a quantitative *real-time* PCR approach.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001 Dec;42(13):3209-15.

Karge WH 3rd, Schaefer EJ, Ordovas JM.

Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method.

Methods Mol Biol. 1998;110:43-61.

Kipar A, Leutenegger CM, Hetzel U, Akens MK, Mislin CN, Reinacher M, Lutz H.

Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes.

Vet Immunol Immunopathol. 2001 Feb 10;78(3-4):305-15.

Kubai L, Auerbach R.

A new source of embryonic lymphocytes in the mouse.

Nature. 1983 Jan 13;301(5896):154-6.

Latil A, Bieche I, Chene L, Laurendeau I, Berthon P, Cussenot O, Vidaud M.
Gene expression profiling in clinically localized prostate cancer: a four-gene
expression model predicts clinical behavior.
Clin Cancer Res. 2003 Nov 15;9(15):5477-85.

Li CL, Johnson GR.
Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine
hematopoietic long-term repopulating cells.
Blood. 1994 Jul 15;84(2):408-14.

Liu W, Saint DA.
A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain
reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics.
Anal Biochem. 2002 a Mar 1;302(1):52-9.

Liu W, Saint DA.
Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics.
Biochem Biophys Res Commun. 2002 b Jun 7;294(2):347-53.

Livak KJ
ABI Prism 7700 Sequence Detection System. User bulletin 2
PE Applied Biosystems 2001.

Livak KJ, Schmittgen TD.
Analysis of relative gene expression data using *real-time* quantitative PCR and
the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method.
Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lyman SD, Jacobsen SE.
c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet
distinct activities.
Blood. 1998 Feb 15;91(4):1101-34. Review.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A.

Real-time PCR in virology.

Nucleic Acids Res. 2002 Mar 15;30(6):1292-305. Review.

Maeno M, Ong RC, Suzuki A, Ueno N, Kung HF.

A truncated bone morphogenetic protein 4 receptor alters the fate of ventral mesoderm to dorsal mesoderm: roles of animal pole tissue in the development of ventral mesoderm.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Oct 25;91(22):10260-4.

Maeno M, Mead PE, Kelley C, Xu RH, Kung HF, Suzuki A, Ueno N, Zon LI.

The role of BMP-4 and GATA-2 in the induction and differentiation of hematopoietic mesoderm in *Xenopus laevis*.

Blood. 1996 Sep 15;88(6):1965-72.

Malpighi M

De formatione pulli in ovo.

1672, London.

Mansur NR, Meyer-Siegler K, Wurzer JC, Sirover MA.

Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNS glycosylase gene in normal human cells.

Nucleic Acids Res. 1993 Feb 25;21(4):993-8.

Medvinsky AL, Samoylina NL, Muller AM, Dzierzak EA.

An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse.

Nature. 1993 Jul 1;364(6432):64-7.

Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tonnissen E, Goodsaid F,

Raemaekers J.

A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNS samples in quantitative *real-time* PCR.

J Mol Diagn. 2001 May;3(2):55-61.

Menne S, Wang Y, Butler SD, Gerin JL, Cote PJ, Tennant BC.

Real-time polymerase chain reaction assays for leukocyte CD and cytokine mRNAs of the Eastern woodchuck (*Marmota monax*).

Vet Immunol Immunopathol. 2002 Aug;87(1-2):97-105.

Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A.

High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis.

Cell. 1993 Mar 26;72(6):835-46.

Miller SA, Bresee KL, Michaelson CL, Tyrell DA.

Domains of differential cell proliferation and formation of amnion folds in chick embryo ectoderm.

Anat Rec. 1994 Feb;238(2):225-36.

Miller SA, Adornato M, Briglin A, Cavanaugh M, Christian T, Jewett K, Michaelson C, Monoson T, Price F, Tignor J, Tyrell D.

Domains of differential cell proliferation suggest hinged folding in avian gut endoderm.

Dev Dyn. 1999 Dec;216(4-5):398-410.

Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C.

Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice.

Mol Cell Biol. 2000 Mar;20(6):2260-8. Erratum in: Mol Cell Biol 2000 May;20(10):3752.

Miquerol L, Gertsenstein M, Harpal K, Rossant J, Nagy A.

Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele.

Dev Biol. 1999 Aug 15;212(2):307-22.

Miura Y, Wilt FH.

Tissue interaction and the formation of the first erythroblasts of the chick embryo.

Dev Biol. 1969 Feb;19(2):201-11.

Mocellin S, Rossi CR, Marincola FM.

Quantitative *real-time* PCR in cancer research.

Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2003;51(5):301-13. Review.

Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L.

Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis *in vitro*.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Oct;83(19):7297-301.

Morgan TH

Experimental Embryology

Columbia University Press 1927, New York

Morrison C, Gannon F.

The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR.

Biochim Biophys Acta. 1994 Oct 18;1219(2):493-8.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT.

Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.

Biotechniques. 1998 Jun;24(6):954-8, 960, 962.

Mouillesseaux KP, Klimpel KR, Dhar AK.

Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green *real-time* RT-PCR.

J Virol Methods. 2003 Aug;111(2):121-7.

Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Breant C, Eichmann A.

Selective expression of angiopoietin 1 and 2 in mesenchymal cells surrounding veins and arteries of the avian embryo.

Mech Dev. 2001 Aug;106(1-2):133-6.

Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z.

Processing of gene expression data generated by quantitative *real-time* RT-PCR.

Biotechniques. 2002 Jun;32(6):1372-4, 1376, 1378-9. Erratum in: Biotechniques.

2002 Sep;33(3):514.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.

Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-73.

Mustonen T, Alitalo K.

Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis.

J Cell Biol. 1995 May;129(4):895-8. Review.

Oliveira JG, Prados RZ, Guedes AC, Ferreira PC, Kroon EG.

The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is inappropriate as internal control in comparative studies between skin tissue and cultured skin fibroblasts using Northern blot analysis.

Arch Dermatol Res. 1999 Dec;291(12):659-61.

Orkin SH, Zon LI.

Genetics of erythropoiesis: induced mutations in mice and zebrafish.

Annu Rev Genet. 1997;31:33-60. Review.

Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M.

Developments in quantitative PCR.

Clin Chem Lab Med. 1998 May;36(5):255-69. Review.

Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C.

Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR.

Cytokine. 1999 Apr;11(4):305-12.

Ovstebo R, Haug KB, Lande K, Kierulf P.

PCR-based calibration curves for studies of quantitative gene expression in human monocytes: development and evaluation.

Clin Chem. 2003 Mar;49(3):425-32.

Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlen-Lievre F, Buck CA.

Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells.

Development. 1987 Jun;100(2):339-49.

Pardanaud L, Dieterlen-Lievre F.

Emergence of endothelial and hemopoietic cells in the avian embryo.

Anat Embryol (Berl). 1993 Feb;187(2):107-14.

Pardanaud L, Luton D, Prigent M, Bourcheix LM, Catala M, Dieterlen-Lievre F.

Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis.

Development. 1996 May;122(5):1363-71.

Pardanaud L, Dieterlen-Lievre F.

Manipulation of the angiopoietic/hemangiopoietic commitment in the avian embryo.

Development. 1999 Feb;126(4):617-27.

Paule MR, White RJ.

Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III.

Nucleic Acids Res. 2000 Mar 15;28(6):1283-98. Review.

Petzelbauer P, Halama T, Groger M.

Endothelial adherens junctions.

J Investig Dermatol Symp Proc. 2000 Dec;5(1):10-3. Review.

Pfaffl MW.

A new mathematical model for relative quantification in *real-time* RT-PCR.

Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L.

Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in *real-time* PCR.

Nucleic Acids Res. 2002 May 1;30(9):e36.

Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A.

Fibroblast growth factors, their receptors and signaling.

Endocr Relat Cancer. 2000 Sep;7(3):165-97. Review.

Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A.

Guideline to reference gene selection for quantitative *real-time* PCR.

Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jan 23;313(4):856-62.

Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF.

Assumption-free analysis of quantitative *real-time* polymerase chain reaction (PCR) data.

Neurosci Lett. 2003 Mar 13;339(1):62-6.

Raaijmakers MH, van Emst L, de Witte T, Mensink E, Raymakers RA.

Quantitative assessment of gene expression in highly purified hematopoietic cells using *real-time* reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Exp Hematol. 2002 May;30(5):481-7.

Rawles, M E

The pigment-forming potency of early chick blastoderm.

Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1940 26, 86-94.

Ribatti D, Urbinati C, Nico B, Rusnati M, Roncali L, Presta M.

Endogenous basic fibroblast growth factor is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane.

Dev Biol. 1995 Jul;170(1):39-49.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT.

Product differentiation by analysis of DNS melting curves during the polymerase chain reaction.

Anal Biochem. 1997 Feb 15;245(2):154-60.

Ris H.

An Experimental Study on the Origin of Melanophores in Birds

Physiol.Zoolog 1941 14; 48-69

Risau W.

Mechanisms of angiogenesis.

Nature. 1997 Apr 17;386(6626):671-4. Review.

Romanoff A

The Avian Embryo. Structure and Functional Development

Macmillan, New York, 1960

Rosenquist GC.

Endoderm movements in the chick embryo between the early short streak and head process stages.

J Exp Zool. 1972 Apr;180(1):95-103.

Ross J.

mRNA stability in mammalian cells.

Microbiol Rev. 1995 Sep;59(3):423-50. Review.

Rutledge RG.

Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications.

Nucleic Acids Res. 2004 Dec 15;32(22):e178.

Sambrook J, Russell D

Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Third Edition)

2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sanchez M, Gottgens B, Sinclair AM, Stanley M, Begley CG, Hunter S, Green AR.

An SCL 3' enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors.

Development. 1999 Sep;126(17):3891-904.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.

Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M.

Flt-1 but not KDR/Fik-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor.

Cell Growth Differ. 1996 Feb;7(2):213-21.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW.

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and *real-time* methods.

Anal Biochem. 2000 Oct 15;285(2):194-204.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA.

Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by *real-time*, quantitative RT-PCR.

J Biochem Biophys Methods. 2000 b Nov 20;46(1-2):69-81.

Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R.

Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNS stain.

PCR Methods Appl. 1995 Feb;4(4):234-8.

Schweitzer B, Kingsmore S.

Combining nucleic acid amplification and detection.

Curr Opin Biotechnol. 2001 Feb;12(1):21-7. Review.

Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M.

A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF.

Oncogene. 1995 Jan 5;10(1):135-47.

Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving MG, Griffiths LR.

Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR.

Mol Cell Probes. 2001 Oct;15(5):307-11.

Sethi N, Brookes M.

Ultrastructure of the blood vessels in the chick allantois and chorioallantois.

J Anat. 1971 May;109(1):1-15.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC.

Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice.

Nature. 1995 Jul 6;376(6535):62-6.

Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J.

A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis.

Cell. 1997 Jun 13;89(6):981-90.

Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L.

Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. Curr Top Microbiol Immunol. 1999;237:59-83. Review.

Shih SC, Robinson GS, Perruzzi CA, Calvo A, Desai K, Green JE, Ali IU, Smith LE, Senger DR.

Molecular profiling of angiogenesis markers. Am J Pathol. 2002 Jul;161(1):35-41.

Simkiss K

Fluxes during embryogenesis

Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and reptiles
Cambridge University Press, Cambridge, 1991

Simon P.

Q-Gene: processing quantitative *real-time* RT-PCR data. Bioinformatics. 2003 Jul 22;19(11):1439-40.

Singer VL, Lawlor TE, Yue S.

Comparison of SYBR Green I R R I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test).

Mutat Res. 1999 Feb 2;439(1):37-47.

Srisuma S, Biswal SS, Mitzner WA, Gallagher SJ, Mai KH, Wagner EM.
Identification of genes promoting angiogenesis in mouse lung by transcriptional profiling.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Aug;29(2):172-9.

Solanas M, Moral R, Escrich E.
Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal RNA content in rat mammary tumors.
Anal Biochem. 2001 Jan 1;288(1):99-102.

Souaze F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P.
Quantitative RT-PCR: limits and accuracy.
Biotechniques. 1996 Aug;21(2):280-5.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD.
Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis.
Cell. 1996 Dec 27;87(7):1171-80.

Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD.
Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1.
Science. 1998 Oct 16;282(5388):468-71.

Suzuki A, Ueno N, Hemmati-Brivanlou A.
Xenopus msx1 mediates epidermal induction and neural inhibition by BMP4.
Development. 1997 Aug;124(16):3037-44.

Tavian M, Coulombel L, Luton D, Clemente HS, Dieterlen-Lievre F, Peault B.
Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo.
Blood. 1996 Jan 1;87(1):67-72.

Temin HM.

The participation of DNA in Rous Sarcoma virus production.
Virology. 1964 Aug;23:486-94.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E.

Housekeeping genes as internal standards: use and limits.
J Biotechnol. 1999 Oct 8;75(2-3):291-5.

To LB, Haylock DN, Dowse T, Simmons PJ, Trimboli S, Ashman LK, Juttner CA.

A comparative study of the phenotype and proliferative capacity of peripheral blood (PB) CD34+ cells mobilized by four different protocols and those of steady-phase PB and bone marrow CD34+ cells.
Blood. 1994 Nov 1;84(9):2930-9.

Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C.

Quantitative *real-time* reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies.
Anal Biochem. 2002 Oct 15;309(2):293-300.

Tuan RS.

Mechanism and regulation of calcium transport by the chick embryonic chorioallantoic membrane.
J Exp Zool Suppl. 1987;1:1-13. Review.

Tyagi S, Kramer FR.

Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization.
Nat Biotechnol. 1996 Mar;14(3):303-8.

Ukropec JA, Hollinger MK, Salva SM, Woolkalis MJ.

SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin.

J Biol Chem. 2000 Feb 25;275(8):5983-6.

Valent P, Spanblochl E, Sperr WR, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H, Strobl H, Geissler K, Bettelheim P, Lechner K.

Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture.

Blood. 1992 Nov 1;80(9):2237-45.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.

Accurate normalization of *real-time* quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.

Genome Biol. 2002 Jun 18;3(7).

Veres G, Gibbs RA, Scherer SE, Caskey CT.

The molecular basis of the sparse fur mouse mutation.

Science. 1987 Jul 24;237(4813):415-7.

Walch A, Specht K, Smida J, Aubele M, Zitzelsberger H, Hofler H, Werner M.

Tissue microdissection techniques in quantitative genome and gene expression analyses.

Histochem Cell Biol. 2001 Apr;115(4):269-76. Review.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH.

Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor.

J Biol Chem. 1994 Oct 28;269(43):26988-95.

Wang T, Brown MJ.

mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection.

Anal Biochem. 1999 Apr 10;269(1):198-201.

Wehner R, Gehring W

Zoologie,

Thieme, Stuttgart, 1995

Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P.

Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.

Biotechniques. 1997 Mar;22(3):474-6, 478-81.

Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A.

Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4.

Nature. 1995 Jul 27;376(6538):331-3.

Wilt FH.

Erythropoiesis in the chick embryo: The role of endoderm.

Science. 1965 Mar 26;147:1588-90.

Wilting J, Eichmann A, Christ B.

Expression of the avian VEGF receptor homologues Quek1 and Quek2 in blood-vascular and lymphatic endothelial and non-endothelial cells during quail embryonic development.

Cell Tissue Res. 1997 May;288(2):207-23.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP.

Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNS amplification.

Biotechniques. 1997 Jan;22(1):130-1, 134-8.

Wood HB, May G, Healy L, Enver T, Morriss-Kay GM.

CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis.

Blood. 1997 Sep 15;90(6):2300-11.

Yamaguchi S, Iwata K, Shibuya M.

Soluble Flt-1 (soluble VEGFR-1), a potent natural antiangiogenic molecule in mammals, is phylogenetically conserved in avians.

Biochem Biophys Res Commun. 2002 Mar 1;291(3):554-9.

Yamamoto M, Ko LJ, Leonard MW, Beug H, Orkin SH, Engel JD.

Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family.

Genes Dev. 1990 Oct;4(10):1650-62.

Yamamoto TS, Takagi C, Ueno N.

Requirement of Xmsx-1 in the BMP-triggered ventralization of Xenopus embryos.

Mech Dev. 2000 Mar 1;91(1-2):131-41.

Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Izawa H, Kobayashi M, Emi N, Komori K, Naoe T, Takamatsu J, Murohara T.

Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: therapeutic effect by stem cell transplantation.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Dec;24(12):e192-6.

Young PE, Baumhueter S, Lasky LA.

The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development.

Blood. 1995 Jan 1;85(1):96-105.

Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK.

Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec 10;93(25):14765-70.

Zamorano PL, Mahesh VB, Brann DW.

Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. A minireview.

Neuroendocrinology. 1996 May;63(5):397-407. Review.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L.

Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size.

Nature. 2003 Oct 23;425(6960):836-41.

Zhong H, Simons JW.

Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia.

Biochem Biophys Res Commun. 1999 Jun 16;259(3):523-6.

9 Anhang

9.1 Verwendete Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide werden im Folgenden dargestellt wie sie vom Computerprogramm *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.www.cgi>) erstellt und spezifiziert wurden. Die Nukleotidsequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Flk-1

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	12	20	61.03	60.00	3.00	1.00	ggagtttccagagaccgac
RIGHT PRIMER	100	19	61.55	52.63	3.00	2.00	caatcccaaaggcatcagc

PRODUCT SIZE: 89, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

Flt-1_cons

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	214	18	62.89	66.67	2.00	0.00	tcgcctctctgccgtctc
RIGHT PRIMER	379	19	62.68	52.63	3.00	1.00	tgtctgccattcacgctca

PRODUCT SIZE: 166, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

Flt-1_ms

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	2330	23	60.26	43.48	3.00	1.00	cgaggaaatacagcaagaatcag
RIGHT PRIMER	2573	19	60.09	63.16	2.00	2.00	gaagagggtcagcaggagc

PRODUCT SIZE: 244, PAIR ANY COMPL: 2.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

VEGF

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	281	22	62.18	50.00	3.00	0.00	agaatgtgtccctgtggatgtg
RIGHT PRIMER	360	22	63.33	54.55	4.00	1.00	gcgctatgtgctgactctgatg

PRODUCT SIZE: 80, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

c-kit

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	3721	21	60.12	57.14	2.00	0.00	gacaggaggagggttgcttac
RIGHT PRIMER	3928	22	60.36	45.45	3.00	0.00	agatgaaatgacttgtgggagg

PRODUCT SIZE: 208, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

SCF

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	1254	25	62.00	36.00	4.00	0.00	accaacactgaattgaacaacaaga
RIGHT PRIMER	1340	20	63.02	50.00	3.00	0.00	accccaatgccacacaag

PRODUCT SIZE: 87, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

VE-Cad

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	2777	23	63.95	47.83	3.00	0.00	tctcatcctgtgctgctttcatc
RIGHT PRIMER	2854	20	62.77	55.00	3.00	0.00	cttcccactgccaccaaac

PRODUCT SIZE: 78, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

FGF-2

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIM	272	19	62.19	52.63	4.00	0.00	agcgatccgcacatcaaac
RIGHT PRIM	381	21	62.89	52.38	4.00	0.00	agcaatctgccatcctccttc

PRODUCT SIZE: 110, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

Ang-1

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIM	92	22	62.62	50.00	4.00	0.00	gaagtcaatggaggaggatgga
RIGHT PRIM	201	22	63.35	50.00	4.00	0.00	tcacctgatgggctaccaaacc

PRODUCT SIZE: 110, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

BMP2

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	660	19	62.87	57.89	1.00	0.00	tgggtttgtggtggagggtg
RIGHT PRIMER	854	20	62.86	50.00	2.00	0.00	cgctgtttgtgtttcgcttg

PRODUCT SIZE: 195, PAIR ANY COMPL: 2.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

BMP4

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	1028	19	61.57	63.16	2.00	0.00	ccgaccacctcaactccac
RIGHT PRIMER	1204	19	62.18	63.16	2.00	0.00	accctccaccaccatctc

PRODUCT SIZE: 177, PAIR ANY COMPL: 2.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

18S rRNA

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	1164	20	60.55	55.00	2.00	0.00	ctcaacacgggaaacctcac
RIGHT PRIMER	1428	20	60.48	55.00	3.00	0.00	cggacatctaaggcatcac

PRODUCT SIZE: 265, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

9.2 *real-time* RT-PCR Daten

Im Folgenden sind die Daten der in der Arbeit durchgeführten *real-time* RT-PCR-Läufe aufgeführt wie sie das iCycler-Programm (iCycler™ iQ, Optical System Software, Version 3.0a, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) geliefert hat. Die Reaktionsansätze eines EZPs sind jeweils in einer Tabelle gemeinsam als Triplikate aufgeführt. Nicht zur Auswertung herangezogene Reaktionsansätze sind nicht aufgeführt. Durch eine Leerzeile voneinander getrennte Reaktionsansätze wurden in separaten PCR-Läufen durchgeführt.

Entwicklungszeitpunkt E0

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
B5	Embryo	Flt-1_cons	2	32,58		32,49		1,34E-01	
B6	Embryo	Flt-1_cons	2	32,39		32,49		1,34E-01	
B10	Embryo	VEGF	4	30,2		30,22		1,20E-01	
B11	Embryo	VEGF	4	30,35		30,22		1,20E-01	
B12	Embryo	VEGF	4	30,12		30,22		1,20E-01	
C4	Embryo	scf	6	32,11		32,03		2,03E-01	
C5	Embryo	scf	6	31,8		32,03		2,03E-01	
C6	Embryo	scf	6	32,18		32,03		2,03E-01	
C10	Embryo	18S rRNA	8	15,15		14,94		2,51E-01	
C11	Embryo	18S rRNA	8	14,67		14,94		2,51E-01	
C12	Embryo	18S rRNA	8	15		14,94		2,51E-01	
A1	Embryo	BMP2	1	33,67		33,43		1,01E+00	
A2	Embryo	BMP2	1	32,32		33,43		1,01E+00	
A3	Embryo	BMP2	1	34,3		33,43		1,01E+00	
A8	Embryo	BMP4	3	33,48		33,48		N/A	
B4	Embryo	18S rRNA	5	19,2		19,05		1,33E-01	
B5	Embryo	18S rRNA	5	18,99		19,05		1,33E-01	
B6	Embryo	18S rRNA	5	18,95		19,05		1,33E-01	
A1	Embryo	FGF-2	1	34,11		33,35		1,10E+00	
A2	Embryo	FGF-2	1	32,09		33,35		1,10E+00	
A3	Embryo	FGF-2	1	33,85		33,35		1,10E+00	
B7	Embryo	18S rRNA	7	14,44		14,44		2,99E-02	
B8	Embryo	18S rRNA	7	14,41		14,44		2,99E-02	
B9	Embryo	18S rRNA	7	14,47		14,44		2,99E-02	

Tabelle 29: *real-time* RT-PCR-Daten des PCR-Laufes zum Entwicklungstag E0.

Entwicklungszeitpunkt E1

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
D1	Embryo	Flk-1	1	25,79		25,71		9,82E-02	
D2	Embryo	Flk-1	1	25,74		25,71		9,82E-02	
D3	Embryo	Flk-1	1	25,6		25,71		9,82E-02	
D4	Embryo	Flt-1_cons	2	26,93		26,82		1,33E-01	
D5	Embryo	Flt-1_cons	2	26,87		26,82		1,33E-01	
D6	Embryo	Flt-1_cons	2	26,67		26,82		1,33E-01	
D7	Embryo	Flt-1_ms	3	33,92		33,3		5,95E-01	
D8	Embryo	Flt-1_ms	3	33,24		33,3		5,95E-01	
D9	Embryo	Flt-1_ms	3	32,73		33,3		5,95E-01	
D10	Embryo	VEGF	4	25,07		25,06		8,43E-02	
D11	Embryo	VEGF	4	24,97		25,06		8,43E-02	
D12	Embryo	VEGF	4	25,14		25,06		8,43E-02	
E1	Embryo	c-kit	5	30,17		29,85		2,86E-01	
E2	Embryo	c-kit	5	29,76		29,85		2,86E-01	
E3	Embryo	c-kit	5	29,62		29,85		2,86E-01	
E5	Embryo	SCF	6	27,55		27,68		1,87E-01	
E6	Embryo	SCF	6	27,81		27,68		1,87E-01	
E7	Embryo	VE-Cad	7	26,18		26,2		8,68E-02	
E8	Embryo	VE-Cad	7	26,12		26,2		8,68E-02	
E9	Embryo	VE-Cad	7	26,29		26,2		8,68E-02	
E10	Embryo	FGF-2	8	31,56		31,32		2,08E-01	
E11	Embryo	FGF-2	8	31,18		31,32		2,08E-01	
E12	Embryo	FGF-2	8	31,22		31,32		2,08E-01	
F1	Embryo	Ang-1	9	37,43		37,58		3,03E-01	
F2	Embryo	Ang-1	9	37,37		37,58		3,03E-01	
F3	Embryo	Ang-1	9	37,93		37,58		3,03E-01	
F4	Embryo	18S rRNA	10	11,67		11,51		1,58E-01	
F5	Embryo	18S rRNA	10	11,51		11,51		1,58E-01	
F6	Embryo	18S rRNA	10	11,35		11,51		1,58E-01	
A4	Embryo	BMP2	2	22,93		23,03		1,84E-01	
A5	Embryo	BMP2	2	23,24		23,03		1,84E-01	
A6	Embryo	BMP2	2	22,92		23,03		1,84E-01	
A10	Embryo	BMP4	4	25,37		25,48		9,52E-02	
A11	Embryo	BMP4	4	25,52		25,48		9,52E-02	
A12	Embryo	BMP4	4	25,55		25,48		9,52E-02	
B7	Embryo	18S rRNA	6	9,81		9,82		3,23E-02	
B8	Embryo	18S rRNA	6	9,85		9,82		3,23E-02	
B9	Embryo	18S rRNA	6	9,78		9,82		3,23E-02	

Tabelle 30: *real-time* RT-PCR-Daten des PCR-Laufes zum Entwicklungstag E1.

Entwicklungszeitpunkt E2

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
B1	Embryo	Flk-1	1	26,35		26,32		2,10E-01	
B2	Embryo	Flk-1	1	26,1		26,32		2,10E-01	
B3	Embryo	Flk-1	1	26,52		26,32		2,10E-01	
B7	Yolk sac	Flk-1	11	26,33		26,12		1,93E-01	
B8	Yolk sac	Flk-1	11	25,96		26,12		1,93E-01	
B9	Yolk sac	Flk-1	11	26,05		26,12		1,93E-01	
B4	Embryo	Flt-1_cons	2	25,18		25,03		2,08E-01	
B5	Embryo	Flt-1_cons	2	25,11		25,03		2,08E-01	
B6	Embryo	Flt-1_cons	2	24,79		25,03		2,08E-01	
B10	Yolk sac	Flt-1_cons	12	24,81		24,85		3,53E-02	
B11	Yolk sac	Flt-1_cons	12	24,88		24,85		3,53E-02	
B12	Yolk sac	Flt-1_cons	12	24,85		24,85		3,53E-02	
C7	Embryo	Flt-1_ms	13	31,85		31,66		2,53E-01	
C8	Embryo	Flt-1_ms	13	31,76		31,66		2,53E-01	
C9	Embryo	Flt-1_ms	13	31,37		31,66		2,53E-01	
C1	Yolk sac	Flt-1_ms	3	31,72		32,04		4,24E-01	
C2	Yolk sac	Flt-1_ms	3	31,88		32,04		4,24E-01	
C3	Yolk sac	Flt-1_ms	3	32,52		32,04		4,24E-01	
C4	Embryo	VEGF	4	23,62		23,67		5,07E-02	
C5	Embryo	VEGF	4	23,67		23,67		5,07E-02	
C6	Embryo	VEGF	4	23,72		23,67		5,07E-02	
C10	Yolk sac	VEGF	14	23,65		23,71		8,07E-02	
C11	Yolk sac	VEGF	14	23,69		23,71		8,07E-02	
C12	Yolk sac	VEGF	14	23,8		23,71		8,07E-02	
E7	Embryo	c-kit	15	29,82		29,45		3,38E-01	
E8	Embryo	c-kit	15	29,37		29,45		3,38E-01	
E9	Embryo	c-kit	15	29,15		29,45		3,38E-01	
E1	Yolk sac	c-kit	5	30,23		30,46		2,03E-01	
E2	Yolk sac	c-kit	5	30,55		30,46		2,03E-01	
E3	Yolk sac	c-kit	5	30,6		30,46		2,03E-01	
E4	Embryo	SCF	6	27,2		27,02		1,62E-01	
E5	Embryo	SCF	6	26,92		27,02		1,62E-01	
E6	Embryo	SCF	6	26,92		27,02		1,62E-01	
E10	Yolk sac	SCF	16	26,83		26,85		1,90E-02	
E11	Yolk sac	SCF	16	26,86		26,85		1,90E-02	
E12	Yolk sac	SCF	16	26,87		26,85		1,90E-02	
F7	Embryo	VE-Cad	17	24,76		24,82		1,09E-01	
F8	Embryo	VE-Cad	17	24,94		24,82		1,09E-01	
F9	Embryo	VE-Cad	17	24,75		24,82		1,09E-01	
F1	Yolk sac	VE-Cad	7	24,92		24,91		1,35E-02	
F2	Yolk sac	VE-Cad	7	24,89		24,91		1,35E-02	
F3	Yolk sac	VE-Cad	7	24,9		24,91		1,35E-02	
F4	Embryo	18S	8	10,85		10,95		1,04E-01	
F5	Embryo	18S	8	10,93		10,95		1,04E-01	
F6	Embryo	18S	8	11,06		10,95		1,04E-01	
F10	Yolk sac	18S	18	10,93		10,88		5,34E-02	
F11	Yolk sac	18S	18	10,83		10,88		5,34E-02	
F12	Yolk sac	18S	18	10,87		10,88		5,34E-02	

Tabelle 31

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
C1	Embryo	BMP2	1		24,7		24,65		5,47E-02
C2	Embryo	BMP2	1		24,59		24,65		5,47E-02
C3	Embryo	BMP2	1		24,66		24,65		5,47E-02
C10	Yolk sac	BMP2	4		24,24		24,6		3,19E-01
C11	Yolk sac	BMP2	4		24,71		24,6		3,19E-01
C12	Yolk sac	BMP2	4		24,84		24,6		3,19E-01
C4	Embryo	BMP4	2		25,83		25,82		1,19E-01
C5	Embryo	BMP4	2		25,93		25,82		1,19E-01
C6	Embryo	BMP4	2		25,69		25,82		1,19E-01
D1	Yolk sac	BMP4	5		25,64		25,66		2,80E-02
D2	Yolk sac	BMP4	5		25,69		25,66		2,80E-02
D3	Yolk sac	BMP4	5		25,64		25,66		2,80E-02
C7	Embryo	18S	3		9,48		9,49		4,49E-02
C8	Embryo	18S	3		9,45		9,49		4,49E-02
C9	Embryo	18S	3		9,54		9,49		4,49E-02
D4	Yolk sac	18S	6		9,46		9,29		1,60E-01
D5	Yolk sac	18S	6		9,28		9,29		1,60E-01
D6	Yolk sac	18S	6		9,14		9,29		1,60E-01
A4	Embryo	FGF-2	2		27,89		27,73		3,38E-01
A5	Embryo	FGF-2	2		27,97		27,73		3,38E-01
A6	Embryo	FGF-2	2		27,35		27,73		3,38E-01
A7	Yolk sac	FGF-2	3		26,94		27		6,17E-02
A8	Yolk sac	FGF-2	3		27,07		27		6,17E-02
A9	Yolk sac	FGF-2	3		27		27		6,17E-02
B1	Embryo	Ang-1	5		28,8		28,95		1,85E-01
B2	Embryo	Ang-1	5		29,16		28,95		1,85E-01
B3	Embryo	Ang-1	5		28,9		28,95		1,85E-01
B4	Yolk sac	Ang-1	6		27,03		27,17		1,50E-01
B5	Yolk sac	Ang-1	6		27,16		27,17		1,50E-01
B6	Yolk sac	Ang-1	6		27,33		27,17		1,50E-01
B10	Embryo	18S	8		8,94		8,98		4,32E-02
B11	Embryo	18S	8		8,96		8,98		4,32E-02
B12	Embryo	18S	8		9,03		8,98		4,32E-02
C1	Yolk sac	18S	9		8,72		8,68		3,66E-02
C2	Yolk sac	18S	9		8,65		8,68		3,66E-02
C3	Yolk sac	18S	9		8,66		8,68		3,66E-02

Tabelle 31: *real-time* RT-PCR-Daten des PCR-Laufes zum Entwicklungstag E2.

Entwicklungszeitpunkt E3

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
B1	Embryo	Flk-1	1	26,13		26,04		1,10E-01	
B2	Embryo	Flk-1	1	26,08		26,04		1,10E-01	
B3	Embryo	Flk-1	1	25,92		26,04		1,10E-01	
B4	Yolk sac	Flk-1	2	27,15		26,89		2,31E-01	
B5	Yolk sac	Flk-1	2	26,8		26,89		2,31E-01	
B6	Yolk sac	Flk-1	2	26,72		26,89		2,31E-01	
B7	Embryo	Flt-1_cons	3	25,63		25,53		1,19E-01	
B8	Embryo	Flt-1_cons	3	25,4		25,53		1,19E-01	
B9	Embryo	Flt-1_cons	3	25,57		25,53		1,19E-01	
B10	Yolk sac	Flt-1_cons	4	25,89		25,8		7,75E-02	
B11	Yolk sac	Flt-1_cons	4	25,75		25,8		7,75E-02	
B12	Yolk sac	Flt-1_cons	4	25,77		25,8		7,75E-02	
C1	Embryo	Flt-1_ms	5	30,33		30,63		2,87E-01	
C2	Embryo	Flt-1_ms	5	30,9		30,63		2,87E-01	
C3	Embryo	Flt-1_ms	5	30,67		30,63		2,87E-01	
C4	Yolk sac	Flt-1_ms	6	31,26		30,88		5,01E-01	
C5	Yolk sac	Flt-1_ms	6	30,32		30,88		5,01E-01	
C6	Yolk sac	Flt-1_ms	6	31,07		30,88		5,01E-01	
C7	Embryo	VEGF	7	24,74		24,71		1,05E-01	
C8	Embryo	VEGF	7	24,59		24,71		1,05E-01	
C9	Embryo	VEGF	7	24,79		24,71		1,05E-01	
C10	Yolk sac	VEGF	8	24,54		24,42		9,95E-02	
C11	Yolk sac	VEGF	8	24,35		24,42		9,95E-02	
C12	Yolk sac	VEGF	8	24,39		24,42		9,95E-02	
D1	Embryo	c-kit	9	29,63		29,26		3,18E-01	
D2	Embryo	c-kit	9	29,06		29,26		3,18E-01	
D3	Embryo	c-kit	9	29,1		29,26		3,18E-01	
D4	Yolk sac	c-kit	10	32,04		32,33		6,11E-01	
D5	Yolk sac	c-kit	10	31,92		32,33		6,11E-01	
D6	Yolk sac	c-kit	10	33,03		32,33		6,11E-01	
D7	Embryo	SCF	11	26,15		26,12		2,51E-01	
D8	Embryo	SCF	11	25,86		26,12		2,51E-01	
D9	Embryo	SCF	11	26,36		26,12		2,51E-01	
D10	Yolk sac	SCF	12	26,26		26,29		8,12E-02	
D11	Yolk sac	SCF	12	26,22		26,29		8,12E-02	
D12	Yolk sac	SCF	12	26,38		26,29		8,12E-02	
F1	Embryo	VE-Cad	13	25,63		25,54		7,34E-02	
F2	Embryo	VE-Cad	13	25,49		25,54		7,34E-02	
F3	Embryo	VE-Cad	13	25,52		25,54		7,34E-02	
F4	Yolk sac	VE-Cad	14	25,86		25,91		7,84E-02	
F5	Yolk sac	VE-Cad	14	26		25,91		7,84E-02	
F6	Yolk sac	VE-Cad	14	25,87		25,91		7,84E-02	
F8	Embryo	FGF-2	15	28,55		28,53		3,14E-02	
F9	Embryo	FGF-2	15	28,5		28,53		3,14E-02	
F10	Yolk sac	FGF-2	16	30,68		30,4		2,45E-01	
F11	Yolk sac	FGF-2	16	30,24		30,4		2,45E-01	
F12	Yolk sac	FGF-2	16	30,27		30,4		2,45E-01	

Tabelle 32

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
G1	Embryo	Ang-1	17	27,33		27,12		1,92E-01	
G2	Embryo	Ang-1	17	26,96		27,12		1,92E-01	
G3	Embryo	Ang-1	17	27,06		27,12		1,92E-01	
G4	Yolk sac	Ang-1	18	28,42		28,31		1,87E-01	
G5	Yolk sac	Ang-1	18	28,09		28,31		1,87E-01	
G6	Yolk sac	Ang-1	18	28,4		28,31		1,87E-01	
G7	Embryo	18S rRNA	19	11,34		11,23		9,32E-02	
G8	Embryo	18S rRNA	19	11,16		11,23		9,32E-02	
G9	Embryo	18S rRNA	19	11,21		11,23		9,32E-02	
G10	Yolk sac	18S rRNA	20	11,55		11,49		1,39E-01	
G11	Yolk sac	18S rRNA	20	11,33		11,49		1,39E-01	
G12	Yolk sac	18S rRNA	20	11,59		11,49		1,39E-01	
D7	Embryo	BMP2	7	23,41		23,39		2,32E-02	
D8	Embryo	BMP2	7	23,37		23,39		2,32E-02	
D9	Embryo	BMP2	7	23,41		23,39		2,32E-02	
E4	Yolk sac	BMP2	10	24,45		24,42		4,61E-02	
E5	Yolk sac	BMP2	10	24,44		24,42		4,61E-02	
E6	Yolk sac	BMP2	10	24,37		24,42		4,61E-02	
D10	Embryo	BMP4	8	25,29		25,44		1,41E-01	
D11	Embryo	BMP4	8	25,5		25,44		1,41E-01	
D12	Embryo	BMP4	8	25,55		25,44		1,41E-01	
E7	Yolk sac	BMP4	11	26,72		26,28		5,56E-01	
E8	Yolk sac	BMP4	11	26,47		26,28		5,56E-01	
E9	Yolk sac	BMP4	11	25,65		26,28		5,56E-01	
E1	Embryo	18S rRNA	9	9,6		9,54		1,47E-01	
E2	Embryo	18S rRNA	9	9,65		9,54		1,47E-01	
E3	Embryo	18S rRNA	9	9,38		9,54		1,47E-01	
E10	Yolk sac	18S rRNA	12	9,85		9,98		1,16E-01	
E11	Yolk sac	18S rRNA	12	10,06		9,98		1,16E-01	
E12	Yolk sac	18S rRNA	12	10,04		9,98		1,16E-01	

Tabelle 32: *real-time* RT-PCR-Daten des PCR-Laufes zum Entwicklungstag E3.

Entwicklungszeitpunkt E4

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
B1	Allantois	Flk-1	1	26,8		26,65		1,72E-01	
B2	Allantois	Flk-1	1	26,68		26,65		1,72E-01	
B3	Allantois	Flk-1	1	26,47		26,65		1,72E-01	
B4	Yolk sac	Flk-1	2	27,4		27,26		1,24E-01	
B5	Yolk sac	Flk-1	2	27,2		27,26		1,24E-01	
B6	Yolk sac	Flk-1	2	27,17		27,26		1,24E-01	
B7	Allantois	Flt-1_cons	3	26,91		26,85		4,80E-02	
B8	Allantois	Flt-1_cons	3	26,81		26,85		4,80E-02	
B9	Allantois	Flt-1_cons	3	26,84		26,85		4,80E-02	
B10	Yolk sac	Flt-1_cons	4	26,42		26,37		8,72E-02	
B11	Yolk sac	Flt-1_cons	4	26,27		26,37		8,72E-02	
B12	Yolk sac	Flt-1_cons	4	26,41		26,37		8,72E-02	
C1	Allantois	Flt-1_ms	5	33,06		33,4		3,46E-01	
C2	Allantois	Flt-1_ms	5	33,4		33,4		3,46E-01	
C3	Allantois	Flt-1_ms	5	33,75		33,4		3,46E-01	
C4	Yolk sac	Flt-1_ms	6	33,12		33,06		3,77E-01	
C5	Yolk sac	Flt-1_ms	6	32,66		33,06		3,77E-01	
C6	Yolk sac	Flt-1_ms	6	33,41		33,06		3,77E-01	
C7	Allantois	VEGF	7	24,74		24,65		8,13E-02	
C8	Allantois	VEGF	7	24,6		24,65		8,13E-02	
C9	Allantois	VEGF	7	24,6		24,65		8,13E-02	
C10	Yolk sac	VEGF	8	24,69		24,67		2,89E-02	
C11	Yolk sac	VEGF	8	24,63		24,67		2,89E-02	
C12	Yolk sac	VEGF	8	24,67		24,67		2,89E-02	
D1	Allantois	c-kit	9	32,41		32,58		2,87E-01	
D2	Allantois	c-kit	9	32,42		32,58		2,87E-01	
D3	Allantois	c-kit	9	32,91		32,58		2,87E-01	
D4	Yolk sac	c-kit	10	30,97		30,66		2,88E-01	
D5	Yolk sac	c-kit	10	30,4		30,66		2,88E-01	
D6	Yolk sac	c-kit	10	30,62		30,66		2,88E-01	
D7	Allantois	SCF	11	29,03		29		1,19E-01	
D8	Allantois	SCF	11	29,11		29		1,19E-01	
D9	Allantois	SCF	11	28,87		29		1,19E-01	
D10	Yolk sac	SCF	12	27,86		27,77		1,05E-01	
D11	Yolk sac	SCF	12	27,66		27,77		1,05E-01	
D12	Yolk sac	SCF	12	27,81		27,77		1,05E-01	
F1	Allantois	VE-Cad	13	26,51		26,12		4,14E-01	
F2	Allantois	VE-Cad	13	26,16		26,12		4,14E-01	
F3	Allantois	VE-Cad	13	25,68		26,12		4,14E-01	
F4	Yolk sac	VE-Cad	14	26,66		26,52		1,37E-01	
F5	Yolk sac	VE-Cad	14	26,38		26,52		1,37E-01	
F6	Yolk sac	VE-Cad	14	26,5		26,52		1,37E-01	
F7	Allantois	FGF-2	15	29,78		29,61		1,45E-01	
F8	Allantois	FGF-2	15	29,51		29,61		1,45E-01	
F9	Allantois	FGF-2	15	29,55		29,61		1,45E-01	
F10	Yolk sac	FGF-2	16	32,31		31,96		4,42E-01	
F11	Yolk sac	FGF-2	16	31,46		31,96		4,42E-01	
F12	Yolk sac	FGF-2	16	32,11		31,96		4,42E-01	

Tabelle 33

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
G1	Allantois	Ang-1	17	31,64		31,59			2,85E-01
G2	Allantois	Ang-1	17	31,29		31,59			2,85E-01
G3	Allantois	Ang-1	17	31,85		31,59			2,85E-01
G4	Yolk sac	Ang-1	18	30,15		29,97			2,09E-01
G5	Yolk sac	Ang-1	18	30,01		29,97			2,09E-01
G6	Yolk sac	Ang-1	18	29,74		29,97			2,09E-01
G8	Allantois	18S rRNA	19	12,22		12,24			3,71E-02
G9	Allantois	18S rRNA	19	12,27		12,24			3,71E-02
G10	Yolk sac	18S rRNA	20	12,28		12,1			1,58E-01
G11	Yolk sac	18S rRNA	20	11,97		12,1			1,58E-01
G12	Yolk sac	18S rRNA	20	12,06		12,1			1,58E-01
F1	Allantois	BMP2	13	21,91		21,61			2,61E-01
F2	Allantois	BMP2	13	21,44		21,61			2,61E-01
F3	Allantois	BMP2	13	21,47		21,61			2,61E-01
F10	Yolk sac	BMP2	16	24,04		24,53			4,32E-01
F11	Yolk sac	BMP2	16	24,87		24,53			4,32E-01
F12	Yolk sac	BMP2	16	24,67		24,53			4,32E-01
F4	Allantois	BMP4	14	23,86		24,36			4,33E-01
F5	Allantois	BMP4	14	24,65		24,36			4,33E-01
F6	Allantois	BMP4	14	24,57		24,36			4,33E-01
G1	Yolk sac	BMP4	17	26,49		26,33			3,89E-01
G2	Yolk sac	BMP4	17	26,62		26,33			3,89E-01
G3	Yolk sac	BMP4	17	25,89		26,33			3,89E-01
F7	Allantois	18S rRNA	15	10,02		9,54			6,75E-01
F9	Allantois	18S rRNA	15	9,06		9,54			6,75E-01
G4	Yolk sac	18S rRNA	18	9,51		9,55			3,89E-02
G5	Yolk sac	18S rRNA	18	9,59		9,55			3,89E-02
G6	Yolk sac	18S rRNA	18	9,56		9,55			3,89E-02

Tabelle 33: *real-time* RT-PCR-Daten des PCR-Laufes zum Entwicklungstag E4.

Entwicklungszeitpunkt E5

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
B1	Allantois	Flk-1	1	26,39		26,35		7,26E-02	
B2	Allantois	Flk-1	1	26,27		26,35		7,26E-02	
B3	Allantois	Flk-1	1	26,4		26,35		7,26E-02	
B4	Yolk sac	Flk-1	2	27,86		27,61		2,32E-01	
B5	Yolk sac	Flk-1	2	27,56		27,61		2,32E-01	
B6	Yolk sac	Flk-1	2	27,41		27,61		2,32E-01	
B7	Allantois	Flt-1_cons	3	26,33		26,26		6,24E-02	
B8	Allantois	Flt-1_cons	3	26,25		26,26		6,24E-02	
B9	Allantois	Flt-1_cons	3	26,2		26,26		6,24E-02	
B10	Yolk sac	Flt-1_cons	4	27,11		26,93		3,54E-01	
B11	Yolk sac	Flt-1_cons	4	26,52		26,93		3,54E-01	
B12	Yolk sac	Flt-1_cons	4	27,16		26,93		3,54E-01	
C1	Allantois	Flt-1_ms	5	32,66		32,63		4,45E-02	
C2	Allantois	Flt-1_ms	5	32,58		32,63		4,45E-02	
C3	Allantois	Flt-1_ms	5	32,65		32,63		4,45E-02	
C4	Yolk sac	Flt-1_ms	6	33,61		33,29		2,84E-01	
C5	Yolk sac	Flt-1_ms	6	33,21		33,29		2,84E-01	
C6	Yolk sac	Flt-1_ms	6	33,06		33,29		2,84E-01	
C7	Allantois	VEGF	7	23,87		23,91		3,47E-02	
C8	Allantois	VEGF	7	23,93		23,91		3,47E-02	
C9	Allantois	VEGF	7	23,93		23,91		3,47E-02	
C10	Yolk sac	VEGF	8	24,79		24,67		1,29E-01	
C11	Yolk sac	VEGF	8	24,53		24,67		1,29E-01	
C12	Yolk sac	VEGF	8	24,68		24,67		1,29E-01	
D1	Allantois	c-kit	9	30,5		30,46		3,93E-02	
D2	Allantois	c-kit	9	30,42		30,46		3,93E-02	
D3	Allantois	c-kit	9	30,45		30,46		3,93E-02	
D4	Yolk sac	c-kit	10	29,27		29,07		1,80E-01	
D5	Yolk sac	c-kit	10	28,91		29,07		1,80E-01	
D6	Yolk sac	c-kit	10	29,04		29,07		1,80E-01	
D7	Allantois	SCF	11	27,28		27,26		9,27E-02	
D8	Allantois	SCF	11	27,16		27,26		9,27E-02	
D9	Allantois	SCF	11	27,35		27,26		9,27E-02	
D10	Yolk sac	SCF	12	27,58		27,6		1,68E-01	
D11	Yolk sac	SCF	12	27,45		27,6		1,68E-01	
D12	Yolk sac	SCF	12	27,78		27,6		1,68E-01	
E1	Allantois	VE-Cad	21	24,41		24,32		1,13E-01	
E2	Allantois	VE-Cad	21	24,37		24,32		1,13E-01	
E3	Allantois	VE-Cad	21	24,19		24,32		1,13E-01	
E4	Yolk sac	VE-Cad	22	26,41		26,22		4,23E-01	
E5	Yolk sac	VE-Cad	22	26,51		26,22		4,23E-01	
E6	Yolk sac	VE-Cad	22	25,73		26,22		4,23E-01	
E7	Allantois	FGF-2	23	28,95		28,91		3,26E-02	
E8	Allantois	FGF-2	23	28,89		28,91		3,26E-02	
E9	Allantois	FGF-2	23	28,89		28,91		3,26E-02	
E10	Yolk sac	FGF-2	24	29,34		29,53		2,11E-01	
E11	Yolk sac	FGF-2	24	29,76		29,53		2,11E-01	
E12	Yolk sac	FGF-2	24	29,5		29,53		2,11E-01	

Tabelle 34

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
F1	Allantois	Ang-1	25	29,15		29			1,42E-01
F2	Allantois	Ang-1	25	28,98		29			1,42E-01
F3	Allantois	Ang-1	25	28,87		29			1,42E-01
F4	Yolk sac	Ang-1	26	30,96		30,86			6,34E-01
F5	Yolk sac	Ang-1	26	31,44		30,86			6,34E-01
F6	Yolk sac	Ang-1	26	30,18		30,86			6,34E-01
F7	Allantois	18S rRNA	27	12,77		12,52			2,80E-01
F8	Allantois	18S rRNA	27	12,59		12,52			2,80E-01
F9	Allantois	18S rRNA	27	12,22		12,52			2,80E-01
F10	Yolk sac	18S rRNA	28	12,22		12,33			9,85E-02
F11	Yolk sac	18S rRNA	28	12,39		12,33			9,85E-02
F12	Yolk sac	18S rRNA	28	12,39		12,33			9,85E-02
G1	Allantois	BMP2	29	23,7		23,74			1,87E-01
G2	Allantois	BMP2	29	23,57		23,74			1,87E-01
G3	Allantois	BMP2	29	23,94		23,74			1,87E-01
G4	Yolk sac	BMP2	30	25,83		25,79			1,50E-01
G5	Yolk sac	BMP2	30	25,91		25,79			1,50E-01
G6	Yolk sac	BMP2	30	25,62		25,79			1,50E-01
G7	Allantois	BMP4	31	25,7		25,68			4,27E-02
G8	Allantois	BMP4	31	25,71		25,68			4,27E-02
G9	Allantois	BMP4	31	25,63		25,68			4,27E-02
G10	Yolk sac	BMP4	32	27,85		27,75			1,28E-01
G11	Yolk sac	BMP4	32	27,61		27,75			1,28E-01
G12	Yolk sac	BMP4	32	27,8		27,75			1,28E-01

Tabelle 34: *real-time* RT-PCR-Daten des PCR-Laufes zum Entwicklungstag E5.

Entwicklungszeitpunkt E6

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
B1	Allantois	Flk-1	1	26,19		25,97		1,87E-01	
B2	Allantois	Flk-1	1	25,85		25,97		1,87E-01	
B3	Allantois	Flk-1	1	25,88		25,97		1,87E-01	
B4	Yolk sac	Flk-1	2	27,03		26,9		1,17E-01	
B5	Yolk sac	Flk-1	2	26,83		26,9		1,17E-01	
B6	Yolk sac	Flk-1	2	26,83		26,9		1,17E-01	
B7	Allantois	Flt-1_cons	3	25,85		25,85		3,97E-02	
B8	Allantois	Flt-1_cons	3	25,89		25,85		3,97E-02	
B9	Allantois	Flt-1_cons	3	25,81		25,85		3,97E-02	
B10	Yolk sac	Flt-1_cons	4	26,39		26,57		1,60E-01	
B11	Yolk sac	Flt-1_cons	4	26,71		26,57		1,60E-01	
B12	Yolk sac	Flt-1_cons	4	26,61		26,57		1,60E-01	
C1	Allantois	Flt-1_ms	5	30,79		30,71		7,07E-02	
C2	Allantois	Flt-1_ms	5	30,69		30,71		7,07E-02	
C3	Allantois	Flt-1_ms	5	30,65		30,71		7,07E-02	
C4	Yolk sac	Flt-1_ms	6	31,22		31,1		1,64E-01	
C5	Yolk sac	Flt-1_ms	6	31,17		31,1		1,64E-01	
C6	Yolk sac	Flt-1_ms	6	30,91		31,1		1,64E-01	
C7	Allantois	VEGF	7	23,73		23,72		3,43E-02	
C8	Allantois	VEGF	7	23,74		23,72		3,43E-02	
C9	Allantois	VEGF	7	23,68		23,72		3,43E-02	
C10	Yolk sac	VEGF	8	24,39		24,32		1,31E-01	
C11	Yolk sac	VEGF	8	24,17		24,32		1,31E-01	
C12	Yolk sac	VEGF	8	24,4		24,32		1,31E-01	
D1	Allantois	c-kit	9	28,84		28,92		1,44E-01	
D2	Allantois	c-kit	9	29,08		28,92		1,44E-01	
D3	Allantois	c-kit	9	28,82		28,92		1,44E-01	
D4	Yolk sac	c-kit	10	28,21		28,08		1,50E-01	
D5	Yolk sac	c-kit	10	28,12		28,08		1,50E-01	
D6	Yolk sac	c-kit	10	27,92		28,08		1,50E-01	
D7	Allantois	SCF	11	26,58		26,57		1,25E-02	
D8	Allantois	SCF	11	26,56		26,57		1,25E-02	
D9	Allantois	SCF	11	26,57		26,57		1,25E-02	
D10	Yolk sac	SCF	12	26,83		26,82		6,19E-02	
D11	Yolk sac	SCF	12	26,87		26,82		6,19E-02	
D12	Yolk sac	SCF	12	26,75		26,82		6,19E-02	
E1	Allantois	VE-Cad	21	23,74		23,59		1,50E-01	
E2	Allantois	VE-Cad	21	23,59		23,59		1,50E-01	
E3	Allantois	VE-Cad	21	23,44		23,59		1,50E-01	
E4	Yolk sac	VE-Cad	22	26,98		26,49		4,34E-01	
E5	Yolk sac	VE-Cad	22	26,14		26,49		4,34E-01	
E6	Yolk sac	VE-Cad	22	26,36		26,49		4,34E-01	
E7	Allantois	FGF-2	23	28,71		28,24		4,15E-01	
E8	Allantois	FGF-2	23	27,92		28,24		4,15E-01	
E9	Allantois	FGF-2	23	28,08		28,24		4,15E-01	
E10	Yolk sac	FGF-2	24	28,38		28,55		1,46E-01	
E11	Yolk sac	FGF-2	24	28,66		28,55		1,46E-01	
E12	Yolk sac	FGF-2	24	28,61		28,55		1,46E-01	

Tabelle 35

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
F1	Allantois	Ang-1	25	27,06		27,22		1,51E-01	
F2	Allantois	Ang-1	25	27,26		27,22		1,51E-01	
F3	Allantois	Ang-1	25	27,35		27,22		1,51E-01	
F4	Yolk sac	Ang-1	26	29,75		29,67		2,13E-01	
F5	Yolk sac	Ang-1	26	29,83		29,67		2,13E-01	
F6	Yolk sac	Ang-1	26	29,43		29,67		2,13E-01	
F7	Allantois	18S rRNA	27	12,16		11,95		1,83E-01	
F8	Allantois	18S rRNA	27	11,86		11,95		1,83E-01	
F9	Allantois	18S rRNA	27	11,83		11,95		1,83E-01	
F10	Yolk sac	18S rRNA	28	11,87		11,9		7,18E-02	
F11	Yolk sac	18S rRNA	28	11,85		11,9		7,18E-02	
F12	Yolk sac	18S rRNA	28	11,98		11,9		7,18E-02	
G1	Allantois	BMP2	29	23,56		23,6		7,43E-02	
G2	Allantois	BMP2	29	23,69		23,6		7,43E-02	
G3	Allantois	BMP2	29	23,56		23,6		7,43E-02	
G4	Yolk sac	BMP2	30	26,62		26,36		2,36E-01	
G5	Yolk sac	BMP2	30	26,31		26,36		2,36E-01	
G6	Yolk sac	BMP2	30	26,16		26,36		2,36E-01	
G7	Allantois	BMP4	31	25,65		25,43		1,99E-01	
G8	Allantois	BMP4	31	25,26		25,43		1,99E-01	
G9	Allantois	BMP4	31	25,38		25,43		1,99E-01	
G10	Yolk sac	BMP4	32	27,3		27,24		8,48E-02	
G11	Yolk sac	BMP4	32	27,28		27,24		8,48E-02	
G12	Yolk sac	BMP4	32	27,14		27,24		8,48E-02	

Tabelle 35: *real-time* RT-PCR-Daten des PCR-Laufes zum Entwicklungstag E6.

Entwicklungszeitpunkt E7

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
B1	Allantois	Flk-1	1		23,5		23,87		8,19E-01
B2	Allantois	Flk-1	1		23,3		23,87		8,19E-01
B3	Allantois	Flk-1	1		24,81		23,87		8,19E-01
B4	Yolk sac	Flk-1	2		26,07		25,82		2,19E-01
B5	Yolk sac	Flk-1	2		25,68		25,82		2,19E-01
B6	Yolk sac	Flk-1	2		25,71		25,82		2,19E-01
B7	Allantois	Flt-1_cons	3		23,25		23,01		2,03E-01
B8	Allantois	Flt-1_cons	3		22,91		23,01		2,03E-01
B9	Allantois	Flt-1_cons	3		22,88		23,01		2,03E-01
B10	Yolk sac	Flt-1_cons	4		25,19		25,17		4,26E-02
B11	Yolk sac	Flt-1_cons	4		25,19		25,17		4,26E-02
B12	Yolk sac	Flt-1_cons	4		25,12		25,17		4,26E-02
C1	Allantois	Flt-1_ms	5		28,61		28,02		6,27E-01
C2	Allantois	Flt-1_ms	5		28,08		28,02		6,27E-01
C3	Allantois	Flt-1_ms	5		27,36		28,02		6,27E-01
C4	Yolk sac	Flt-1_ms	6		30,71		30,37		1,17E+00
C5	Yolk sac	Flt-1_ms	6		31,33		30,37		1,17E+00
C6	Yolk sac	Flt-1_ms	6		29,07		30,37		1,17E+00
C7	Allantois	VEGF	7		21,03		20,87		1,40E-01
C8	Allantois	VEGF	7		20,79		20,87		1,40E-01
C9	Allantois	VEGF	7		20,79		20,87		1,40E-01
C10	Yolk sac	VEGF	8		22,81		22,79		8,81E-02
C11	Yolk sac	VEGF	8		22,87		22,79		8,81E-02
C12	Yolk sac	VEGF	8		22,7		22,79		8,81E-02
D1	Allantois	c-kit	9		26,93		26,99		5,76E-02
D2	Allantois	c-kit	9		27,04		26,99		5,76E-02
D3	Allantois	c-kit	9		27		26,99		5,76E-02
D4	Yolk sac	c-kit	10		26,15		26,27		1,05E-01
D5	Yolk sac	c-kit	10		26,32		26,27		1,05E-01
D6	Yolk sac	c-kit	10		26,34		26,27		1,05E-01
D7	Allantois	SCF	11		25,94		26,02		1,33E-01
D8	Allantois	SCF	11		25,94		26,02		1,33E-01
D9	Allantois	SCF	11		26,17		26,02		1,33E-01
D10	Yolk sac	SCF	12		26,42		26,34		8,08E-02
D11	Yolk sac	SCF	12		26,25		26,34		8,08E-02
D12	Yolk sac	SCF	12		26,34		26,34		8,08E-02
E1	Allantois	VE-Cad	21		21,8		21,63		1,64E-01
E2	Allantois	VE-Cad	21		21,6		21,63		1,64E-01
E3	Allantois	VE-Cad	21		21,48		21,63		1,64E-01
E4	Yolk sac	VE-Cad	22		25,39		24,86		5,87E-01
E5	Yolk sac	VE-Cad	22		24,23		24,86		5,87E-01
E6	Yolk sac	VE-Cad	22		24,97		24,86		5,87E-01
E7	Allantois	FGF-2	23		26,89		26,84		8,22E-02
E8	Allantois	FGF-2	23		26,89		26,84		8,22E-02
E9	Allantois	FGF-2	23		26,75		26,84		8,22E-02
E10	Yolk sac	FGF-2	24		27,57		27,6		3,24E-01
E11	Yolk sac	FGF-2	24		27,94		27,6		3,24E-01
E12	Yolk sac	FGF-2	24		27,29		27,6		3,24E-01

Tabelle 36

Position	Tissue	Identifier	Replicate #	Threshold	Cycle (Ct)	Ct	Mean	Ct	Std. Dev.
F1	Allantois	Ang-1	25	26,99		26,75		2,29E-01	
F2	Allantois	Ang-1	25	26,71		26,75		2,29E-01	
F3	Allantois	Ang-1	25	26,54		26,75		2,29E-01	
F4	Yolk sac	Ang-1	26	28,8		28,87		1,46E-01	
F5	Yolk sac	Ang-1	26	29,04		28,87		1,46E-01	
F6	Yolk sac	Ang-1	26	28,78		28,87		1,46E-01	
G1	Allantois	BMP2	29	21,71		21,77		7,88E-02	
G2	Allantois	BMP2	29	21,74		21,77		7,88E-02	
G3	Allantois	BMP2	29	21,86		21,77		7,88E-02	
G4	Yolk sac	BMP2	30	25,57		25,45		1,44E-01	
G5	Yolk sac	BMP2	30	25,48		25,45		1,44E-01	
G6	Yolk sac	BMP2	30	25,29		25,45		1,44E-01	
G7	Allantois	BMP4	31	23,58		23,3		2,72E-01	
G8	Allantois	BMP4	31	23,03		23,3		2,72E-01	
G9	Allantois	BMP4	31	23,3		23,3		2,72E-01	
G10	Yolk sac	BMP4	32	26,58		26,44		1,41E-01	
G11	Yolk sac	BMP4	32	26,3		26,44		1,41E-01	
G12	Yolk sac	BMP4	32	26,42		26,44		1,41E-01	
F7	Allantois	18S rRNA	27	9,84		9,81		1,35E-01	
F8	Allantois	18S rRNA	27	9,93		9,81		1,35E-01	
F9	Allantois	18S rRNA	27	9,66		9,81		1,35E-01	
F10	Yolk sac	18S rRNA	28	10,57		10,55		4,68E-01	
F11	Yolk sac	18S rRNA	28	10,08		10,55		4,68E-01	
F12	Yolk sac	18S rRNA	28	11,01		10,55		4,68E-01	

Tabelle 36: *real-time* RT-PCR-Daten des PCR-Laufes zum Entwicklungstag E7.

9.3 PCR-Fragment-Ansequenzierungsdaten

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Nukleotidsequenzbestimmung durch den kommerziellen Anbieter (GATC BIOTECH, Konstanz, Deutschland) dargestellt. Die ermittelten Sequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben. Außerdem sind die Ergebnisse des Abgleichs der solchermaßen gewonnenen Sequenzen mit den Sequenzen der NCBI-Nukleotiddatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) widergegeben.

Sequenzierungsansatz 1 (Flk-1 Amplifikationsprodukt):

nagataacctntgtggcgntggagctttggccagnecatagaagctgatgcctttgggat

>gi|50746980|ref|XM_420704.1| LocusLink info PREDICTED: Gallus gallus flk-1 receptor (LOC395323), mRNA

Length = 4131

Score = 61.9 bits (31), Expect = 1e-07

Identities = 40/42 (95%), Gaps = 1/42 (2%)

Strand = Plus / Plus

Query: 20

tggagctttggcca-gncatagaagctgatgcctttgggat 60

Sbjct: 2646

tggagctttggccaagtcatagaagctgatgcctttgggat 2687

Sequenzieransatz 2 (Flt-1 cons Amplifikationsprodukt):

**tgCCCCGCCgCTGCTCTCAGGGACCGTGCTGCTGGGAGCCGCCTTCCTGCTCG
CAGGATCGACTTCAGGATCAAAATTGAAAGTTCCTGTGCTGAGCGTGAATGGC
AGAc**

gi|18652862|dbj|AB065373.1| LocusLink info UniGene info Gallus gallus mRNA for
soluble vascular endothelial growth factor

receptor-1, complete cds

Length = 2344

Score = 204 bits (103), Expect = 3e-50

Identities = 110/111 (99%), Gaps = 1/111 (0%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1

tgccccgccgctgctctcagggaccgtgctgctgggagccgccttctgctcgaggat 59

Sbjct: 268

tgccccgcagctgctctcagggaccgtgctgctgggagccgccttctgctcgaggat 327

Query: 60

cgacttcaggatcaaaaattgaaagttcctgtgctgagcgtgaatggcagac 110

Sbjct: 328

cgacttcaggatcaaaaattgaaagttcctgtgctgagcgtgaatggcagac 378

Sequenzieransatz 3 (Flt-1 ms):

**AAGAGGAGGACGAAGGACTTTATCAGTGCATAGCCACCAACTTGAAGGGGTC
 TGTGGAGAGCACAGCGTATGTCACAGTACAAGGCACAGTGGAGAGATCGAAC
 CTGGAGCTGATAACCCTGACCTGTACCTGTGTGGCTGCAACGCTTTTCTGGCT
 CCTGCTGACCCTCTTCaa**

>gi|18652860|dbj|AB065372.1| LocusLink infoUniGene info Gallus gallus mRNA for
 vascular endothelial growth factor receptor-1,

complete cds

Length = 4272

Score = 345 bits (174), Expect = 2e-92

Identities = 174/174 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1

aagaggaggacgaaggactttatcagtgcatagcccaccaactgaaggggtctgtggaga 60

Sbjct: 2401

aagaggaggacgaaggactttatcagtgcatagcccaccaactgaaggggtctgtggaga 2460

Query: 61

gcacagcgtatgtcacagtacaaggcacagtggagagatcgaacctggagctgataacc 120

Sbjct: 2461

gcacagcgtatgtcacagtacaaggcacagtggagagatcgaacctggagctgataacc 2520

Query: 121

tgacctgtacctgtgtggctgcaacgcctttctggctcctgctgacctcttca 174

Sbjct: 2521

tgacctgtacctgtgtggctgcaacgcctttctggctcctgctgacctcttca 2574

Sequenzieransatz 4 (VEGF Amplifikationsprodukt):

nnnnnccgttccagtnagnatgcagnnattaaccccatcagagtcagcaca

>gi|27368067|gb|AY168004.1| LocusLink infoUniGene info Gallus gallus vascular
endothelial growth factor mRNA, complete

cds, alternatively spliced

Length = 579

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.072

Identities = 21/21 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 30

aaccccatcagagtcagcaca 50

Sbjct: 329

aaccccatcagagtcagcaca 349

Sequenzieransatz 5 (c-kit Amplifikationsprodukt):

**gaGACATCTTATCTTGGCAGGAGCAGAAGCAAAAATTCTATCCTGAGGGCCC
 TTTGCTTATCTTATGATATGCAGGTGAATATTTCCACAGGCTGGCTTGGATAA
 TGCTCTCAGGAAAGGGCTCTTCCTCCACAAGTCATTTTCATCTACTGTAAGCA
 ACCCTCCTCCTGt**

>gi|303532|dbj|D13225.1|CHKCKITP LocusLink infoUniGene info Gallus gallus
 mRNA for c-kit protein, complete cds

Length = 5044

Score = 297 bits (150), Expect = 4e-78

Identities = 150/150 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1

gagacatcttatcttggcaggagcagaagcaaaaaattctatcctgagggcccttgctt 60

Sbjct: 3779

Gagacatcttatcttggcaggagcagaagcaaaaaattctatcctgagggcccttgctt
 tt 3838

Query: 61

Atcttatgatatgcagggtgaatattccacaggctggcttgataatgctctcagga
 aa 120

Sbjct: 3839

Atcttatgatatgcagggtgaatattccacaggctggcttgataatgctctcagga
 aa 3898

Query: 121

gggctcttctcccacaagtcatttcatct 150

Sbjct: 3899

gggctcttctcccacaagtcatttcatct 3928

Score = 48.1 bits (24), Expect = 0.006

Identities = 24/24 (100%)

Strand = Plus / Minus

Query: 150

tactgtaagcaaccctcctcctgt 173

Sbjct: 3745

tactgtaagcaaccctcctcctgt 3722

Sequenzieransatz 6 (SCF Amplifikationsprodukt):

gaggcttacagactattcttatgtgaatatctactttgtgtggcattgggggtacannnn

>gi|391648|dbj|D13516.1|CHKSTCF LocusLink infoUniGene info Gallus gallus
mRNA for stem cell factor, complete cds

Length = 1489

Score = 73.8 bits (37), Expect = 3e-11

Identities = 37/37 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 17

tcttatgtgaatatctactttgtgtggcattgggggt 53

Sbjct: 1304

tcttatgtgaatatctactttgtgtggcattgggggt 1340

Sequenzieransatz 7 (VE-Cad Amplifikationsprodukt):

ngacctcgatacgctggaccacaggtttggtggcagtggggaaagaannn

>gi|23452344|gb|AF522067.1| LocusLink infoUniGene info Gallus gallus vascular
endothelial cadherin precursor, mRNA, complete

cds

Length = 4565

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.066

Identities = 21/21 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 19

cacaggtttggtggcagtggg 39

Sbjct: 2830

cacaggtttggtggcagtggg 2850

Sequenzieransatz 8 (FGF-2 Amplifikationsprodukt):

**AtcaatnaaGGCGTAAGTGCAAacnnnctTTCTGGCTATGAAGGAGGATGGCAGAT
TGc**

>gi|45382174|ref|NM_205433.1| LocusLink infoUniGene info Gallus gallus fibroblast
growth factor (BFGF), mRNA

Length = 574

Score = 75.8 bits (38), Expect = 7e-12

Identities = 49/52 (94%), Gaps = 1/52 (1%)

Strand = Plus / Plus

Query: 8 aaggcgtaagtgcaaacnnnctttctggctatgaaggaggatggcagattgc 59

Sbjct: 330 aaggcgtaagtgcaaaccgctttctggctatgaaggaggatggcagattgc 380

Sequenzieransatz 9 (Ang-1 Amplifikationsprodukt):

**nccatcacacgaaagaggcagcctagatttcagaaaggctggaaagaatacaaaaatgggtttggtagccc
atcaggtga**

>gi|37496539|emb|AJ539549.1|GGA539549 LocusLink infoUniGene info Gallus
gallus partial mRNA for Angiopoietin-1 (ANG-1 gene)

Length = 478

Score = 113 bits (57), Expect = 5e-23

Identities = 64/65 (98%), Gaps = 1/65 (1%)

Strand = Plus / Plus

Query: 17

ggcagcctagatttcagaaaggctggaaagaatacaaaaatgggtttggtagcccatca 75

Sbjct: 137

Ggcagcctagatttcagaaaggctggaaagaatacaaaaatgggtttggtagcccaca 196

Query: 76

ggtga 80

Sbjct: 197

ggtga 201

Sequenzieransatz 10 (18S rRNA Amplifikationsprodukt):

**GaTTGAGAGCTCTTTCTCGATTCCGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTT
GGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTCTGGCATGCT
AACTAGTTACGCGACCCCGAGCGGTCGGCGTCCAACCTTCTTAGAGGGACAA
GTGGCGTTCAGCCACCCGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGA
TGTCc**

>gi|7262899|gb|AF173612.1|AF173612 Gallus gallus 18S ribosomal RNA gene,
complete sequence

Length = 1737

Score = 430 bits (217), Expect = e-118

Identities = 217/217 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1

gattgagagctctttctcgattccgtgggtgggtgcatggccggttcttagttggtgga 60

Sbjct: 1211

gattgagagctctttctcgattccgtgggtgggtgcatggccggttcttagttggtgga 1270

Query: 61

gcgattgtctggttaattccgataacgaacgagactctggcatgctaactagttacgcg 120

Sbjct: 1271

gcgattgtctggttaattccgataacgaacgagactctggcatgctaactagttacgcg 1330

Query: 121

acccccgagcggtcggcgtccaacttcttagagggacaagtggcgttcagccacccgaga 180

Sbjct: 1331

acccccgagcggtcggcgtccaacttcttagagggacaagtggcgttcagccacccgaga 1390

Query: 181

ttgagcaataacaggtctgtgatgcccttagatgtcc 217

Sbjct: 1391

ttgagcaataacaggtctgtgatgcccttagatgtcc 1427

Sequenzieransatz 11 (BMP2 Amplifikationsprodukt):

**CAGGTCTTTACATCAGGATGAAGATAGCTGGTCTCAGCTCAGGCCGTTGTTAG
 TGACGTTTGGGCATGATGGCAAGGGACACCCGCTCCACAAAAGAGAAAAGCG
 TCAAGCGAAACACAAACAGc**

>gi|34556453|gb|AY237249.1| LocusLink infoUniGene info Gallus gallus bone
 morphogenetic protein 2 mRNA, complete cds

Length = 1179

Score = 248 bits (125), Expect = 2e-63

Identities = 125/125 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 caggtctttacatcaggatgaagatagctggctctcagctcaggccgttgtagtgacggt 60

Sbjct: 729 caggtctttacatcaggatgaagatagctggctctcagctcaggccgttgtagtgacggt 788

Query: 61 tgggcatgatggcaagggacacccgctccacaaaagagaaaagcgtaagcgaaacacaa
 120

Sbjct: 789 tgggcatgatggcaagggacacccgctccacaaaagagaaaagcgtaagcgaaacacaa
 848

Query: 121 acagc 125

Sbjct: 849 acagc 853

Sequenzieransatz 12 (BMP4 Amplifikationsprodukt):

**GTCACTCcgCATCCccaGGCCTGCTGCGTGCCACGGAGCTGAGCGCCATCTC
 CATGCTCTACCTGGATGAGTATGACAAGGTGGTGGCTGAAAACTACCAGGAG
 ATGGTGGTGGAGGGGTa**

>gi|45384537|ref|NM_205237.1| LocusLink infoUniGene info Gallus gallus bone
 morphogenetic protein 4 (BMP-4), mRNA

Length = 1243

Score = 210 bits (106), Expect = 5e-52

Identities = 113/114 (99%), Gaps = 1/114 (0%)

Strand = Plus / Plus

Query: 9 gcatccccaggcctgctgctgctgccacggagctgagcgccatctccatgctctacctgg 67

Sbjct: 1091 gcatcccaaggcctgctgctgctgccacggagctgagcgccatctccatgctctacctgg 1150

Query: 68 atgagtatgacaaggtggtgctgaaaaactaccaggagatggtggtggaggggt 121

Sbjct: 1151 atgagtatgacaaggtggtgctgaaaaactaccaggagatggtggtggaggggt 1204

9.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AE	Amplifikationseffizienz
AGM	Aorta-Gonaden-Mesonephros
Alla.	Allantois
AM	Arithmetisches Mittel
bp	base pairs (engl.)
CCD	Charge Coupled Device (engl.)
DNA	Desoxyribonucleic Acid (engl.)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DS	Dottersack
dsDNA	double stranded Desoxyribonucleic Acid (engl.)
E	embryonales Alter in Tagen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Emb.	Embryo
EZ	Endothelzelle
EZM	Extrazelluläre Matrix
EZP	Entwicklungszeitpunkt
gDNA	genomic Desoxyribonucleic Acid (engl.)
h	Stunden
HH	Entwicklungsstadium nach Hamburger & Hamilton
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
KK	Korrelationskoeffizient
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
µl	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MNE	Mittlere Normalisierte Expression
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (engl.)

NCBI	National Centre for Biotechnology Information (engl.)
n.d.	nicht detektierbar
ng	Nanogramm
PBS	phosphatgepufferte Saline
PC	Personal Computer (engl.)
PCR	Polymerase Chain Reaction (engl.)
PIP	posterior intestinal portal (engl.)
RFU	Relative Fluorescence Units (engl.)
RG	Referenzgen
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid (engl.)
RT	Reverse Transkription
SA	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssDNA	single stranded Desoxyribonucleic Acid (engl.)
SWZ	Schwellenwertzyklus
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming Growth Factor- β (engl.)
U	Unit (engl.)
ZG	Zielgen

10 Danksagung

Für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz, sowie für die Beratung während der Anfertigung der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz herzlich danken.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Tieranatomie II, die mich bei den praktischen Arbeiten unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Schuster für die kompetente und tatkräftige Unterstützung, Herrn S. Baidl für die Hilfe in technischen Fragestellungen und Frau M. Kazior für die unkomplizierte Bearbeitung bürokratischer Angelegenheiten.

Bei meinem Kommilitonen Dipl. Biol. D. Marquardt möchte ich mich ganz herzlich für kritische Stellungnahmen und stets rasche Unterstützung bedanken.

11 Lebenslauf

Geboren als Friedrich Ludwig Nützel am 25.01.1975 in München. Sohn von Dr. med. Hans Wolfgang Nützel und Dr. med. Doris Nützel, geb. Renner.

1981 -1985: Besuch der Gebele-Grundschule in München.

1985 – 1994: Besuch des humanistischen Wilhelms-Gymnasiums in München mit abschließender Erlangung der allgemeinen Hochschulreife.

1994 – 1995: Absolvierung des einjährigen Wehrdienstes bei der Bundeswehr.

1996 – 2001: Studium der Biologie mit Hauptfach Biochemie/ Zellbiologie an der TU München zum Dipl. Biol.

Seit April 2002: Anstellung als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Tieranatomie II der tierärztlichen Fakultät der LMU München und Anfertigung der Dissertation.