

# **Molekulare Charakterisierung der Proepikardentwicklung**

**Dissertation**

zur Erlangung des

naturwissenschaftlichen Doktorgrades der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Jan Schlüter**

aus

Wolfenbüttel

Würzburg 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Brand

Gutachter: PD Dr. Jörg Männer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Inhaltsverzeichnis

<b>Summary</b>	8
<b>Zusammenfassung</b>	9
<b>1. Einleitung</b>	10
1.1 Die frühe Kardiogenese im Hühnerembryo	11
1.2 Molekulare Grundlagen der Kardiogenese	12
1.2.1 Die Rolle des Endoderms in der Induktion kardialer Vorläuferzellen	12
1.2.2 Kardiale Transkriptionsfaktoren und die Spezifizierung des kardialen Mesoderms	14
1.2.3 Transkriptionelle Regulation kardialer Reifungsprozesse und der Kammerentwicklung	16
1.3 Die Entwicklung des Epikards	19
1.3.1 Das Proepikard als Ursprung des Epikards	19
1.3.2 Die Kolonisierung des Herzens durch proepikardiale Zellen	21
1.3.3 Proepikardiale Markergene	23
1.3.4 Die Interaktion von Epikard und Myokard	25
1.3.5 Die Entwicklung der Koronargefäße	26
1.4 Die links/rechts-Asymmetrie der Körperachse	29
1.4.1 Der Nodal-Signalweg und die Determinierung der links/rechts - Asymmetrie	29
1.4.2 Der Nodal flow	32
1.4.3 Frühe Mechanismen des Symmetriebruches – Ionenflux und Apoptose	36
1.4.4 Lateralisierung des Herzens	37
1.5 Ziele dieser Arbeit	39
<b>2. Material und Methoden</b>	40
2.1 Material	40
2.1.1 Geräte	40
2.1.2 Verbrauchsmaterial	41

2.1.3	Computerprogramme	41
2.1.4	Chemikalien	41
2.1.5	Wachstumsfaktoren und Antikörper	43
2.1.6	Enzyme	44
2.1.7	Pharmakologische Reagenzien	45
2.1.8	Bakterienstämme und Vektoren	45
2.1.9	DNA-Marker	45
2.1.10	Hühnerembryonen	46
2.1.11	Primer	46
2.1.12	Proben für „whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierungen	47
2.2	Methoden	47
2.2.1	DNA-analytische Methoden	47
2.2.2	Mini-Präparation	48
2.2.3	Restriktionsverdau	48
2.2.4	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	49
2.2.5	Transformation	49
2.2.6	Herstellung von Glycerin-Stocks	50
2.2.7	RNA-Isolierung	50
2.2.8	cDNA-Synthese	51
2.2.9	Primerentwurf	52
2.2.10	Endpunkt-PCR	52
2.2.11	Sequenzierung	53
2.2.12	Echtzeit-PCR (Real time PCR)	54
2.2.13	Kultivierung tierischer Zellen	56
2.2.13.1	Explantatkulturen	56
2.2.13.2	Kultivierung und Konditionierung proepikardialer Primärkulturen	56
2.2.13.3	Kultivierung von überexprimierenden und Kontrollzelllinien	56
2.2.13.4	Infektion von Fibroblasten mit RCAS-Konstrukten	57
2.2.13.5	Aggregation von Zellen für die Implantation	57
2.2.14	Manipulation am Hühnerembryo	57
2.2.14.1	Präparation von Hühnerembryonen und dem proepikardialen Organ	58
2.2.14.2	Kultivierung von Embryonen	58

2.2.14.3	Implantation von Depotperlen _____	58
2.2.14.4	Antisense-Oligonukleotid-Behandlung _____	59
2.2.14.5	Elektroporation <i>in ovo</i> und <i>ex ovo</i> _____	59
2.2.14.6	Applikation von pharmakologischen Reagenzien _____	60
2.2.14.7	Dissektion der Darmporte _____	61
2.2.14.8	Herstellung von Wachtel-Huhn Chimären _____	61
2.2.15	„Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung (ISH) _____	62
2.2.15.1	RNA-Probensynthese _____	62
2.2.15.2	Vorbehandlung _____	63
2.2.15.3	Hybridisierung _____	63
2.2.15.4	Post-Hybridisierungsschritte _____	64
2.2.15.5	Antikörperadsorption _____	64
2.2.15.6	Abwaschen des nicht gebundenen Antikörpers und Färbung	65
2.2.15.7	Inaktivierung des ersten Antikörper und zweite Färbung _____	65
2.2.15.8	Histologische Analysen der gefärbten Embryonen _____	66
2.2.15.9	Photographische Dokumentation _____	67
2.2.16	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) _____	67
2.2.17	„Whole mount“-Antikörpernachweis mittels gekoppelter Meerrettich- Peroxidase _____	67
2.2.17.1	Vorbehandlung der Embryonen _____	67
2.2.17.2	Vorbehandlung des Antikörpers _____	68
2.2.17.3	Antikörperadsorption und Färbung _____	68
2.2.17.4	Photographische Dokumentation	
2.2.18	Immunfluoreszenz _____	69
2.2.18.1	Färbungsprotokolle _____	69
2.2.18.2	Dokumentation mit dem Fluoreszenzmikroskop _____	70
2.2.19	3D-Rekonstruktion konfokaler Bilderstapel _____	70
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> _____	<b>72</b>
3.1	Die Expressionsmuster proepikardialer Markergene _____	72
3.1.1	<i>TBX18</i> ist ein früher proepikardialer Marker im Huhn und im Frosch _____	72

3.1.2	Die asymmetrische Expression von <i>WT1</i> im <i>Sinus venosus</i> und im Proepikard _____	74
3.1.3	<i>CFC</i> weist eine differentielle Expression im venösen Pol des Herzens auf _____	75
3.2	Die Rolle von BMP in der Proepikardentwicklung _____	77
3.2.1	<i>BMP2/4</i> zeigen eine differentielle Expression im Sinusmyokard und im Proepikard _____	77
3.2.2	Die Expression von <i>TBX18</i> in proepikardialen Explantaten wird von BMP moduliert _____	79
3.2.3	BMP induziert <i>in vitro</i> die Differenzierung proepikardialer Zellen in kardiale Myozyten _____	80
3.2.4	Die unilaterale Expression von <i>TBX18</i> im <i>Sinus venosus</i> ist abhängig von BMP-Signalen _____	82
3.3	Die asymmetrische Proepikardentwicklung _____	84
3.3.1	Der <i>Sinus venosus</i> weist eine asymmetrische Proliferation und Apoptose auf _____	84
3.3.2	Die Induktion des <i>Cardia bifida</i> -Phänotyps führt zu einer asymmetrischen Epikardentwicklung _____	85
3.3.3	Die asymmetrische Expression von <i>TBX18</i> im venösen Pol steht nicht unter dem Einfluss von SHH _____	87
3.3.4	Der Verlust von CFC im Hensenschen Knoten hat keinen Einfluss auf die Determination der unilateralen <i>TBX18</i> -Expression _____	89
3.3.5	Die Induktion bilateraler <i>NODAL</i> -Expressionsdomänen kann die asymmetrische <i>TBX18</i> Expression nicht randomisieren _____	90
3.3.6	Der links/rechts - Mediator PITX2 determiniert nicht die Lateralität proepikardialer <i>TBX18</i> -Expression _____	91
3.3.7	Die Lateralität der proepikardialen Entwicklung wird durch einen frühen asymmetrischen Ionenflux vermittelt _____	92
3.3.8	Die Inhibition der Apoptose im Primitivstreifen führt zu einer Randomisierung der links/rechts-Achse und der PE -Anlage _____	95
3.3.9	FGF-Signale im Hensenschen Knoten sind induktiv für die asymmetrische proepikardiale <i>TBX18</i> -Expression _____	98

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	101
4.1	Die proepikardiale Expression von <i>TBX18</i> , <i>WT1</i> und <i>CFC</i>	101
4.2	Die Rolle von BMP in der Entwicklung des Proepikards	104
4.2.1	<i>BMP2/4</i> sind im Sinusmyokard und im Proepikard exprimiert	104
4.2.2	BMP ist eine wichtige Determinante für die Ausbildung der proepikardialen Identität	105
4.2.3	Das epikardiale Schicksal und das Differenzierungspotential proepikardialer Zellen	106
4.3	Die asymmetrische Proepikardentwicklung	110
4.3.1	Die unilaterale Induktion des Proepikards	110
4.3.2	Der linksseitige NODAL-PITX2-Signalweg ist nicht für die asymmetrische Induktion des Proepikards verantwortlich	112
4.3.3	Der frühe Bruch der Symmetrie durch asymmetrischen Ionenflux und Apoptose im Primitivstreifen beeinflusst die proepikardiale Lateralität	113
4.3.4	Die rechtsseitige FGF-Signalgebung im Hensenschen Knoten determiniert die asymmetrische Induktion des Proepikards	115
4.4	Das Proepikard – Ein Zusammenspiel regulatorischer Netzwerke etabliert die Progenitoren des koronaren Blutgefäßsystems	118
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	121
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	134
6.1	Abkürzungen	134
6.2	Lebenslauf	136
6.3	Eigene Publikationen	137
6.4	Teilnahme an wissenschaftlichen Tagungen	138
6.5	Eidesstattliche Erklärung	139
6.6	Danksagung	140

## Summary

The proepicardium (PE) is a progenitor population of cells, which gives rise to the coronary blood vessel system of the heart. The aim of this study was to unravel the underlying mechanisms of the induction of proepicardial development in the chick. Two main topics were hereby addressed, (1) investigation of the role of BMP (*bone morphogenetic protein*), a member of the TGF $\beta$ -superfamily, during the induction of the PE and (2) the molecular mechanisms, which underlie the asymmetrical development of the PE.

The analysis of *TBX18*, *CFC* and *WT1* expression shows that these genes serve as proepicardial markers. *BMP4* is also expressed in the PE, but significantly weaker than *BMP2* that was known to be expressed in the sinus myocardium. Studies of proepicardial explants revealed, that treatment with recombinant BMP2 leads to differentiation into contractile cardiomyocytes. One can assume that proepicardial cells react after stimulation with growth factors like BMP2 by leaving the epicardial lineage and adopting a myocardial fate.

In the second topic, the role of the NODAL-PITX2 pathway in the asymmetrical PE development was analyzed. Manipulations of Hensens node at stage HH 4 were performed to induce leftsided marker gene expression on the right side. However, none of these manipulations as well as a forced overexpression of *PITX2* in sinuatrial progenitors had an influence on the expression of *TBX18* in the right sinus. In contrast, inhibition of asymmetrical ionflux and prevention of apoptosis in the primitive streak randomized *TBX18* expression and lead to the induction of bilateral PE Anlagen. The application of FGF8 on the left side of the node also lead to induction of bilateral *TBX18* expression domains and the loss of FGF on the right side was followed by a loss of rightsided *TBX18* expression. Presumably, the laterality of proepicardial cells is not only determined by an early asymmetrical ionflux and apoptosis in the primitive streak, but also via rightsided FGF signaling in the node which acts independently of the leftsided NODAL-PITX2 pathway.

## Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der molekularen Grundlagen der Proepikardentwicklung im Huhn. Das Proepikard (PE) stellt die Vorläuferpopulation des Koronargefäßsystems dar. Es wurden zwei Schwerpunkte bearbeitet, zum einen die Rolle von einem Mitglied der TGF $\beta$ -Superfamilie (BMP, *bone morphogenetic protein*) während der Induktionsphase des PE und zweitens die molekularen Mechanismen, welche der links/rechts Asymmetrie der PE Entwicklung zugrunde liegen.

Die Expressionsmuster von *TBX18*, *WT1*, *CFC* weisen diese als proepikardiale Marker aus. *BMP4* wird ebenfalls im PE exprimiert, wenngleich wesentlich schwächer als *BMP2* im benachbarten Sinusmyokard. Durch *in vitro* Experimente mit proepikardialen Primärkulturen wurde festgestellt, dass die Zugabe von rekombinatem BMP2 einen Teil der Zellen zu Kardiomyozyten differenzieren lässt. Daher wird angenommen, dass ein Teil der proepikardialen Zellen konzentrationsabhängig auf Wachstumsfaktoren reagieren und in der Lage sind, die epikardiale Linie zu verlassen und ein myokardiales Schicksal anzunehmen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle des NODAL-PITX2-Signalweges in Bezug auf die Unilateralität des Proepikards im Hühnchen analysiert. Dazu wurden Manipulationen des Hensenschen Knotens im HH Stadium 4 durchgeführt, mit dem Ziel linksseitige Markergene auf der rechten Seite ektopisch zu induzieren. Keine dieser Manipulationen, als auch eine virale Überexpression von *PITX2* in sinuatrialen Progenitoren *in vivo*, liess eine Veränderung der *TBX18*-Lateralität erkennen, obwohl die *PITX2*-Expression randomisiert war. Dagegen führte die Inhibition des asymmetrischen Ionenflusses sowie der Apoptose im Primitivstreifen zu einer völligen Randomisierung der *TBX18*-Expression, sowie unter anderem der Entwicklung bilateraler Proepikardien. Die Induktion bilateraler *TBX18*-Expressionsdomänen war ebenfalls durch ektopisches FGF8 auf der linken Seite des Knotens zu beobachten. Der Verlust der rechtsseitigen FGF Signalgebung im Knoten resultierte in einem Verlust der rechtsseitigen *TBX18*-Expression im Sinus. Daraus kann geschlossen werden, dass proepikardiale Progenitoren nicht nur durch den asymmetrischen Ionenfluss sowie Apoptose im Primitivstreifen in ihrer Lateralität festgelegt werden, sondern auch von rechtsseitigen FGF-Signalen im Knoten und unabhängig vom linkseitigen NODAL-PITX2-Signalweg lateralisiert werden.

## 1. Einleitung

Herz-Kreislaufkrankungen sind die weltweit häufigste Todesursache (WHO, 2005). Insbesondere die Länder mit niedrigen und mittleren Einkommen sind mit über 80% am stärksten betroffen. Doch auch in den hochentwickelten Industrienationen, ist eine Zunahme an einschlägigen Erkrankungen zu verzeichnen.

Erkrankungen der Herzkranzgefäße spielen hierbei eine wesentliche Rolle. Die wichtigsten Risikofaktoren sind einerseits zurückzuführen auf den individuellen Lebenswandel, andererseits gelten auch genetische Prädispositionen als wichtige Risikofaktoren.

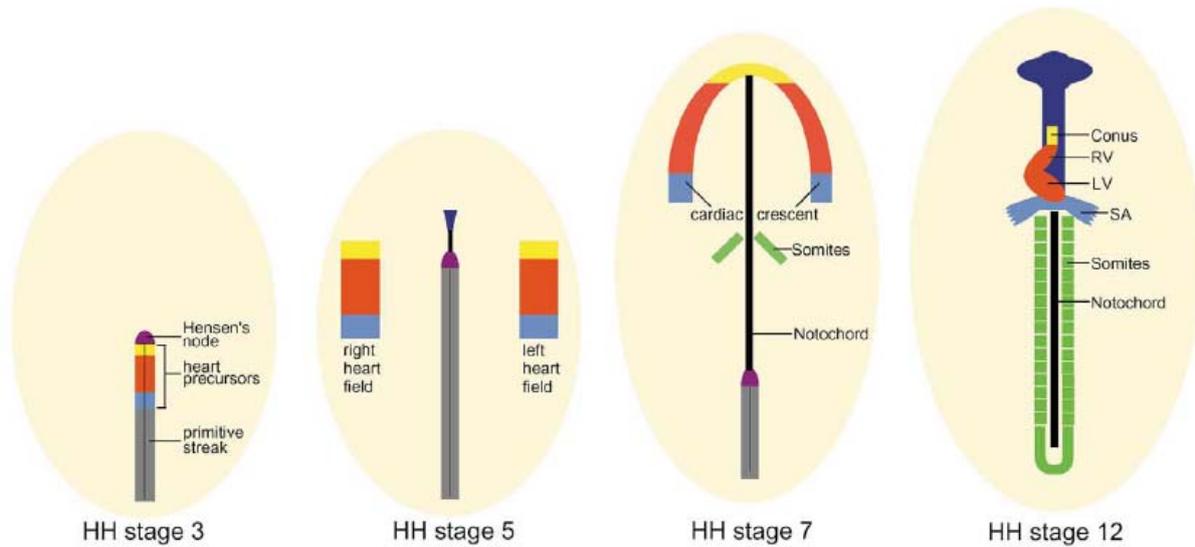
Die Zellen der Herzkranzgefäße gehen aus proepikardialen Vorläuferzellen hervor, welche sich am venösen Pol des embryonalen Herzens als eine transiente Akkumulation mesothelialer Zellen entwickeln (Männer, 1999). Gekennzeichnet durch starke Proliferation, nehmen proepikardiale Zellen Kontakt mit dem Ventrikel auf und bilden das Epikard. Epikardiale Zellen weisen ein breites Differenzierungspotential auf. Sie entwickeln sich in verschiedene Zelltypen des Herzens, das subepikardiale, intramyokardiale und subendokardiale Bindegewebe, sowie die verschiedenen Zelltypen des Koronargefäßsystems. Das Proepikard (PE) wird bei einigen Vertebraten wie z.B. den Vögeln asymmetrisch auf der rechten Seite des bilateralen Sinus ausgebildet. Die links/rechts-Asymmetrie der inneren Organe wird bei den Vertebraten durch ein komplexes Netzwerk um den zentralen NODAL-PITX2-Signalweg vermittelt. Zu welchem Zeitpunkt proepikardiale Vorläuferzellen lateralisiert werden und welche Rolle Faktoren aus dem hochkonservierten NODAL-PITX2-Signalweg bei diesem Prozess spielen, ist bislang ungeklärt.

Durch entsprechende Expressionstudien und manipulative Eingriffe am Hühnerembryo könnte man ein Verständnis für die Entstehung dieser pluripotenten kardialen Progenitorpopulation und deren molekularer Determinanten entwickeln, mit der Zielsetzung einer verbesserten klinischen Diagnostik und potentiellen therapeutischen Ansätzen.

## 1.1 Die frühe Kardiogenese im Hühnerembryo

Das Herz ist das erste Organ, das während der Embryonalentwicklung der Vertebraten seine Funktion aufnimmt, obwohl es zu diesem Zeitpunkt seine Entwicklung noch nicht abgeschlossen hat. Im Hühnerembryo fängt es ab Hamburger und Hamilton Stadium 10 (HH10, Hamburger and Hamilton, 1951) an zu schlagen, bei der Maus ab Stadium E8. Vor der Gastrulation befinden sich die myokardialen Vorläuferzellen in der posterioren Hälfte des Epiblasten. Durch konvergente Ingression des Epiblasten entsteht der Primitivstreifen, innerhalb dessen die Herzvorläuferzellen (HH3) bereits die antero-posteriore Anordnung einnehmen, die der im späteren tubulären Herzen entspricht (Abb.1). Die Gliederung in Ausflusstrakt, Ventrikel und Atrium scheint also zu diesem Zeitpunkt bereits determiniert (Garcia-Martinez und Schoenwolf, 1993), wobei Schicksalsanalysen ergeben haben, dass die Positionen der kardialen Vorläuferzellen nach Verlassen des Primitivstreifens im HH Stadium 4 im lateralen Plattenmesoderm nicht unbedingt ihrer zukünftigen antero-posterioren Anordnung im embryonalen Herzen entsprechen (Redkar et al., 2001). Die Zellen scheinen sich vielmehr in darauffolgenden Stadien erneut zu sortieren und sich entsprechend ihrer zukünftigen Position im Herzen auszurichten. Im Stadium HH 5 liegen also die Herzvorläufer in sogenannten bilateralen Herzfeldern im anterioren lateralen Plattenmesoderm (LPM). Das LPM besteht aus dem somatischen und dem splanchnischen Blatt, welche das intraembryonale Coelom bilden, wobei sich die Herzfelder im splanchnischen Blatt befinden. Die Herzfelder weisen eine mediolaterale Polarität auf, welche mit der craniocaudalen Polarität des späteren Herzschauches korreliert (Kelly et al., 2001, Abu-Issa und Kirby, 2007). Die Herzfelder dehnen sich zunächst nach anterior aus, und durchlaufen im HH Stadium 7 auf der ventralen Seite des Vorderdarms einen bidirektionalen Fusionsprozess (Abb.1). Dieser Prozess wird durch die innere Faltung des äußersten bilateralen splanchnischen Mesoderms eingeleitet. Durch die ventrale Fusion entsteht eine transiente Schmetterlingskonfiguration des sogenannten prä-tubulären Herzens und führt schliesslich zur Bildung des linearen Herzschauches im Stadium HH 9 (Brand, 2003; Moreno-Rodriguez et al., 2006, Mjaatvedt et al., 2001).

## 1. Einleitung



### Abb.1 Die frühe Kardiogenese

Im Stadium HH 3 sind die kardialen Vorläufer bereits im Primitivstreifen entlang ihrer späteren antero-posterioren Position ausgerichtet. Nach Verlassen des Primitivstreifens fusionieren die bilateralen Herzfelder anterior durch innere Auffaltung des splanchnischen Mesoderms und bilden den kardialen Halbmond im Stadium HH 7. Die bidirektionale anteroposteriore Fusion ermöglicht schließlich die Bildung eines linearen Herzschlauches. Rot: Ventrikel, blau: *Sinus venosus*, gelb: Ausflusstrakt, grün: Somiten. (entnommen aus Brand, 2003).

## 1.2 Molekulare Grundlage der Kardiogenese

### 1.2.1 Die Rolle des Endoderm in der Induktion kardialer Vorläuferzellen

Herzvorläuferzellen sind im frühen Hühnerembryo zum HH Stadium 3 im anterioren Drittel des Primitivstreifens sowie im benachbarten Epiblast anzutreffen. Anhand ihrer antero – posterioren Anordnung ist bereits schon zu diesem Zeitpunkt eine Voraussage ihrer späteren Position im tubulären Herzen möglich (Garcia- Martinez and Schoenwolf, 1993). Demnach würden caudal positionierte Zellen eher posteriore Strukturen bilden und rostral liegende Zellen entsprechend anteriore Strukturen. Durch Kokultivierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass sich kardiale Vorläuferzellen in Anwesenheit von Hypoblastgewebe in kardiales Mesoderm entwickeln. Darüberhinaus führt die Substitution des Hypoblasten durch Aktivin

## 1. Einleitung

oder TGF $\beta$  ebenfalls zur Induktion kardialen Mesoderms (Yatskievych et al., 1997). Wahrscheinliche Kandidaten sind TGF $\beta$ -Moleküle wie Nodal oder Vg1, da sie in der Region exprimiert werden und denselben Signalweg wie Aktivin über die Rezeptoren ACTR-II A / II B und ALK4/7 verwenden (Cheng et al. 2003, Massague et al., 2000).

Die Ingression mesendodermaler Vorläufer des Epiblasten und die Bildung des Primitivstreifens führt zur Etablierung des Mesoderms sowie der Verdrängung des Hypoblasten durch das prospektive Endoderm. Ab diesem Zeitpunkt stehen Endoderm und Mesoderm in unmittelbarem Kontakt. Im *Xenopus* wurde gezeigt, dass die Induktion kardialen Mesoderms auf dem Antagonismus von kanonischen Wnt-Signalen durch den endodermalen Homeodomain Faktor Hex beruht (Foley and Mercola, 2005). Hierbei scheint die repressive transkriptionelle Aktivität von Hex ausschlaggebend für die Induktion zu sein. Auch im Huhn ist der WNT-Antagonismus durch DKK-1 und Crescent für die anteriore Induktion kardialen Mesoderms verantwortlich (Marvin et al., 2001). Es konnte allerdings ebenfalls eine herzinduzierende Funktion für WNT11 nachgewiesen werden, welches eine mesodermale Expression in der posterioren Region der Herzfelder aufweist (Eisenberg und Eisenberg, 1999). WNT11 gehört nicht zum kanonischen Wnt-Signalweg, sondern aktiviert PKC und CamKII und inhibiert darüber hinaus möglicherweise zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin (Kühl et al., 2000; Pandur et al., 2002).

Durch Inhibition von kanonischen WNT-Signalen wird die Aktivität des im Endoderm exprimierten TGF $\beta$ -Liganden BMP2 (*bone morphogenetic protein*) ermöglicht, dem eine essentielle Rolle in der Kardiogenese zukommt (Schultheiss et al., 1997, Andree et al., 1998, Schlange et al., 2000). Dass diese Rolle hochkonserviert erscheint, zeigt die Funktion des *Drosophila* Homolog Dpp (*Decapentaplegic*). Dpp ist verantwortlich für die Induktion des *tinman* Gens, welches seinerseits essentiell für die Herzentwicklung der Fliege ist (Frasch, 1999). Jedoch ist BMP allein nicht ausreichend für die Definition der herzbildenden Region. Die bis auf das posteriore Mesoderm ausgedehnte Expression von BMP2 ist nicht in der Lage, myokardiale Vorläufer zu spezifizieren (Andree et al., 1998). Die dazu benötigten Faktoren sind Mitglieder der Fibroblast Growth Factor (FGF)-Familie. Durch Kombination von BMPs und FGFs nimmt auch posteriores Mesoderm, welches normalerweise Blutzellen bildet, ein kardiales Schicksal an (Alsan und Schultheiss, 2002; Lough et al., 1996; Reifers et al., 2000; Sugi and Lough, 1995).

## 1. Einleitung

### 1.2.2 Kardiale Transkriptionsfaktoren und die Spezifizierung kardialen Mesoderms

Die volle kardiogene Spezifizierung ist von einer kontinuierlichen BMP2-Aktivität abhängig. Gleichzeitig ist hingegen eine kurze aber frühere FGF-Aktivität essentiell für die Induktion mesodermaler Zellen in kardiale Vorläuferzellen und die Expression kardialer Marker (Barron et al., 2000). Die Zebrafisch *Fgf8* Mutante *acerebellar (ace)* zeigt den Verlust kardialer Markerexpression und weist schwere ventrikuläre Entwicklungsstörungen auf (Reifers et al., 2000). Das Fehlen von *Bmp4* in der Maus zieht den Verlust von *Fgf8* nach sich, so dass man schliessen kann, dass *Fgf8* durch *Bmps* reguliert wird (Fujiwara et al., 2002).

Der BMP-Antagonist *Noggin* ist in der Lage, BMP zu binden und myokardiale Differenzierung zu verhindern (Schlange et al., 2000; Ladd et al., 1998, Schultheiss and Lassar, 1997; Schultheiss et al., 1997). Ähnlich wie in *dpp* Mutanten in *Drosophila* (Frasch et al., 1995) oder *swirl*-Mutanten im Zebrafisch (Kishimoto et al., 1997), führen fehlende *Bmp*-Signale zum Verlust kardialer Marker wie *tinman* oder dem Vertebratenhomolog *Nkx2.5*. In der Maus entsteht durch den Verlust von *Bmp2* nur ein relativ milder Phenotyp mit abnormaler Herzentwicklung, die Spezifizierung kardialen Mesoderms findet gleichwohl statt (Zhang und Bradley, 1996). Dies mag an der redundanten Wirkung noch vorhandener *Bmp*-Isoformen liegen. Die Abhängigkeit der Expression kardialer Marker von BMP2 ist im Huhn bis zur molekularen kardialen Determination im HH Stadium 8 gegeben (Schlange et al., 2000).

Einer der prominentesten kardialen Marker ist das bereits genannte Homeobox-Gen *NKX2.5*. Es gehört zur NK-Familie von Homeobox-Transkriptionsfaktoren und zeigt im Hühnchen bereits im HH Stadium 5 eine antero-laterale mesodermale Expression und ist später im embryonalen Herzen, insbesondere im Ventrikel präsent. Daneben sind im Huhn *NKX2.3* und *NKX2.8* (Buchberger et al., 1996; Brand et al., 1997), in der Maus zusätzlich *Nkx2.6* im Herzen exprimiert (Tanaka et al., 2000), wobei wahrscheinlich Redundanz mit *Nkx2.6* für das Fehlen eines embryonalen Phänotyps in der *Nkx2.5*-Mausmutante verantwortlich ist. Im Zebrafisch führt die ektopische Überexpression von *nkx2.5* zu vergrößerten Herzen und myokardialer Hyperplasie (Chen and Fishman, 1996).

## 1. Einleitung

Die Gene der Gata-Familie kodieren für Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren welche eine wichtige Rolle in der Entwicklung des embryonalen Herzens einnehmen. In *Drosophila* trägt das *Gata*-Gen *pannier* die Verantwortung für die kardiale Identität mesodermaler Zellen (Gajewski et al., 1999). Dabei koorporiert es mit *tinman* und ektopisch überexprimiert sind beide in der Lage, kardiale Expressionsdomänen stark zu expandieren. Die drei Gata-Gene *Gata4-6* in Vertebraten werden alle im Herzen exprimiert (Molkentin, 2000). Der Verlust von *Gata4* in der Maus führt zur Ausbildung bilateraler Herzschläuche, der sogenannten *cardia bifida*. *Gata5*-Mausmutanten sind lebensfähig, die Zebrafischmutante weist allerdings ebenfalls einen *cardia bifida*-Phänotyp auf. Im Fisch führt die Überexpression von *gata5* zu ektopischer *nkx2.5* Expression mit entsprechend ektopischer kardialer Differenzierung (Reiter et al., 1999). *Gata6*-defiziente Mäuse sterben bereits früh nach der Implantation. Neuere Untersuchungen weisen Gata6 zusammen mit Gata4 eine essentielle Rolle bei der Induktion myokardialer Genexpression zu. (Morisey et al. 1998, Sodhi et al., 2006; Zhao et al., 2008). Im Zebrafisch scheinen *gata5* und *gata6* eine redundante Funktion in der Spezifizierung kardiogenen Mesoderms aufzuweisen (Holtzinger et al., 2007).

Bereits kurz nach *Nkx2.5* und den *Gata*-Genen werden Mitglieder der *Myocyte enhancer factor 2* (MEF2) Familie in der frühen Herzanlage exprimiert (Edmondson et al., 1994; Lin et al., 1997; Morrisey et al., 1997) In Vertebraten liegen vier *Mef2*-Gene vor, in *Drosophila* dagegen nur ein einziges (Black and Olson, 1998). Die *Mef2*-Gene spielen keine Rolle bei der Muskelspezifizierung, sondern bei der Differenzierung von Glattmuskel-, Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen, wie der Verlust von *Mef2* in *Drosophila* zeigen konnte (Bour et al., 1995; Lilly et al., 1995). Auch in vitro Studien in der Maus zeigten eine Blockade der Differenzierung von Myoblasten durch eine dominant negative Form von Mef2 (Ornatsky et al., 1997). Der Verlust von *Mef2c* führt zu Looping Defekten, dem Verlust des rechten Ventrikels und abnormalem Ausflusstrakt, was diesem Gen eine Rolle in der Entwicklung des sekundären oder anterioren Herzfeldes zuweist (Lin et al., 1997). Der kardiale Phänotyp der *Mef2c*-Mausmutante ist dem der *Isl1*-Mutante sehr ähnlich (Cai et al., 2003; Lin et al., 1997). *Isl1* (*Isl1*) ist ein LIM-Homeodomänen-Trankriptionsfaktor und in der Maus im anterioren Herzfeld exprimiert, das heisst im splanchnischen Mesoderm als auch im ventralen Vorderdarmendoderm der pharyngealen Region.

## 1. Einleitung

Zusätzlich dazu ist *Isl1* auch transient im gesamten Herzfeld exprimiert. Nach der Fusion des Herzschlauches wurde es bislang aus der Modellvorstellung eines primären lateralen und sekundären medialen Herzfeldes angenommen, das Strukturen wie der linke Ventrikel und Atrium aus dem primären Herzfeld hervorgehen, hingegen rechter Ventrikel und Ausflusstrakt aus dem anterioren oder sekundären Herzfeld entstehen. Tatsächlich verlieren die Herzen der *Isl1*-Mausmutante die Identität des rechten Ventrikels und Strukturen des Ausflusstraktes fehlen völlig (Cai et al., 2003). Allerdings wird die Vorstellung eines primären und sekundären Herzfeldes durch neuere Erkenntnisse noch weiterentwickelt werden müssen. Jüngere Studien zeigen, dass Zellen, die während der Entwicklung *Isl1* exprimiert haben, sich nahezu im gesamten Herzen wiederfinden lassen (Sun et al., 2007). Es scheint dennoch klar, dass die Herzfelder eine mediolaterale Polarität aufweisen, welche mit der craniocaudalen Polarität des Herzschlauches korreliert (Abu-Issa und Kirby, 2007).

### 1.2.3 Transkriptionelle Regulation kardialer Reifungsprozesse und der Kammerentwicklung

Der primitive embryonale Herzschlauch durchläuft in der weiteren Entwicklung eine Reihe von komplexen Reifungsprozessen. Diese führen in terrestrischen Vertebraten zur Bildung eines Herzens mit vier Kammern (Abb.2). Diese Prozesse beinhalten das gerichtete *looping* des Herzschlauches, wodurch eine charakteristische Konfiguration entsteht, die im Folgenden durch das *ballooning* die Herzkammern entstehen lässt.

Ähnlich wie in der *Mef2c*-Mausmutante führt der Verlust des Transkriptionsfaktors *Hand2* in der Maus zu einer Hypoplasie des rechten Ventrikels. Die basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren (bHLH) *Hand1/2* zeigen eine überlappende Expression im embryonalen Herzen. *Hand1* ist präferentiell im linken Ventrikel, *Hand2* dagegen im rechten Ventrikel exprimiert (Cross et al. 1995; Srivastava et al., 1995). Diese beiden Faktoren scheinen für die Entwicklung des Ventrikels in redundanter und Dosis-abhängiger Weise essentiell zu sein (McFadden und Barbosa et al., 2004). Tatsächlich verliert die Zebrafischmutante *hands off* einen Großteil ihrer ventrikulären Präkursoren (Yelon et al., 2000).

Eine weitere Familie von Transkriptionsfaktoren, die T-Box-Faktoren, agieren in ihrer Vielzahl zusammen mit den bereits beschriebenen Transkriptionsfaktoren *Nkx2.5* und *Gata4* in

## 1. Einleitung

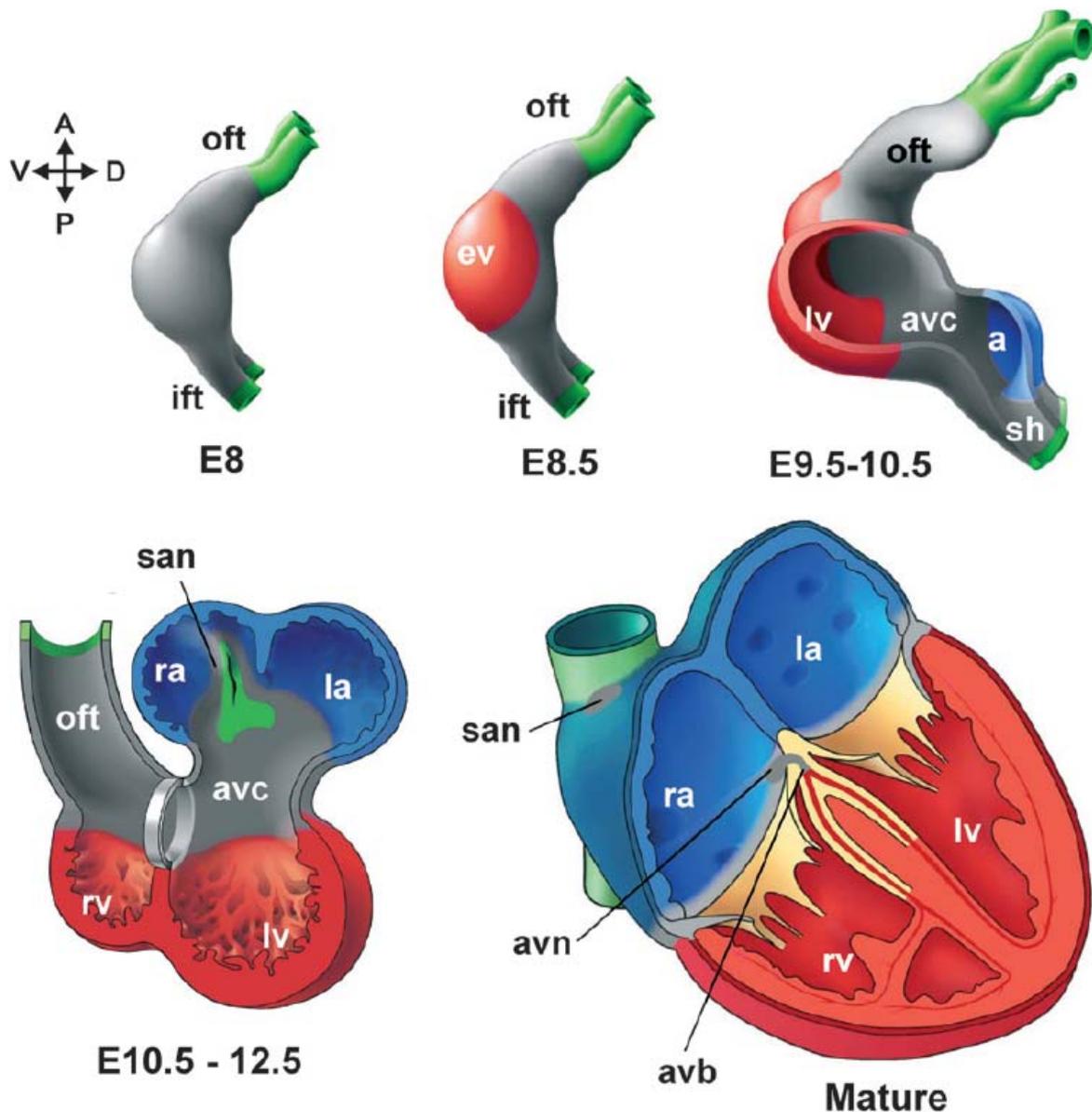
einem komplexen regulatorischen Netzwerk. Die im Herzen exprimierten T-Box-Faktoren lassen sich in zwei Gruppen aufteilen, die Tbx1-Subfamilie bestehend aus Tbx1, 18 und 20 und die Tbx2-Subfamilie bestehend aus Tbx2, 3 und 5 (Naiche et al., 2005). Der Verlust von *Tbx5* führt zur Ausprägung des Holt-Oram-Syndroms (HOS) mit kardialen Septierungsdefekten (Basson et al., 1997), wobei die Kooperation von Tbx5 mit Nkx2.5 kardiale Differenzierung induziert (Hiroi et al., 2001). Diese Zusammenarbeit ist essentiell für die Differenzierung der Herzkammern, welche durch die Induktion von *Nppa* (*Natriuretic Precursor Peptide*) gekennzeichnet ist.

Zusammen mit Tbx2 und Tbx3, welche *Nppa* im AV-Kanal reprimieren, entsteht eine molekulare Vernetzung, welche das embryonale Herz während seiner Entwicklung entsprechend ausformt (Bruneau et al., 2001b, Christoffels et al., 2007).

Der Einflusstrakt, welcher durch einen frühen anteroposterioren Gradienten von Retinsäure in seinem caudalen Schicksal beeinflusst wird (Rosenthal und Xavier-Neto, 2001) ist nicht durch *Nkx2.5*-Expression gekennzeichnet. Der venöse Pol des Herzens ist in seiner Entwicklung vielmehr auf eine *Nkx2.5*-unabhängige *Tbx18*-Expression angewiesen, welche die Morphogenese und myokardiale Differenzierung reguliert (Christoffels et al., 2006). Gleichzeitig werden BMPs in Huhn und Maus im *Sinus venosus* des Herzens und im *Septum transversum* stark exprimiert (Hogan, 1996; Kruithof et al., 2006) und *Gata4*-Mausmutanten zeigen sowohl die Regulation von *Gata4* durch *Bmp4* als auch massive venöse Missbildungen (Rojas et al., 2005). Auch retinsäuredefiziente Wachteln weisen missgebildete Atrien und den Verlust von *GATA4* Expression auf (Dersch und Zile, 1993; Kostetskii et al., 1999).

Das embryonale Herz wird von zwei extrakardialen Zellpopulationen kolonisiert. Die hoch migratorischen Neuralleistenzellen, welche unter anderem für die Entwicklung des Ausflusstraktes, der Reorganisation der pharyngealen Arterien und der Septierung des *conotruncus* verantwortlich sind (Kirby and Waldo, 1995), entstammen dem Neuralrohr. Am venösen Pol bildet sich eine Zellpopulation die als Proepikard bezeichnet wird. Diese Zellen wachsen auf das Herz und bilden das Epikard, aus dem Zellen des Koronargefäßsystems hervorgehen (Männer et al., 2001).

## 1. Einleitung



### Abb.2: Reifung des primitiven Herzschlauches zum vierkammerigen Herzen

Der primitive lineare Herzschlauch ist in der Entwicklung anteroposteriorer Strukturen wie dem Ventrikel (rot) oder atrialen Strukturen (blau) bereits früh determiniert. Er durchläuft einen looping Prozess, der zu einer Konfiguration führt, welche die weitere Entwicklung der Ventrikel, der Atrien und des Ausflusstraktes ermöglicht. Durch Ausreifung und Septierung der Kammern und entsprechend reguliertem Dickenwachstum erfolgt die Entwicklung in ein vierkammeriges Herz (entnommen aus Moormann et al., 2004).

## 1.3 Die Entwicklung des Epikards

### 1.3.1 Das Proepikard als Ursprung des Epikard

Der alte Begriff des Epimyokards hat seinen Ursprung in primitiven Chordaten wie den *Ascidien*. Diese besitzen bereits ein Myoepithel, welches ein Kontinuum mit einer perikardialen Wand bildet (Satou et al, 2004). Zwar liegt dem wesentlich leistungsfähigeren Herzen der Vertebraten ebenfalls die grundsätzliche Funktion des Pumporgans zugrunde, jedoch ist der Aufbau bedeutend komplexer. Dies wird bereits durch die Septierung in vier Kammern, welche zwei parallele Kreisläufe ermöglichen, deutlich. Das extrakardial entstehende Epikard des Vertebratenherzens korreliert mit einer höheren Pumpleistung der wesentlich dickeren Myokardwand. Die höhere Leistungsfähigkeit des Herzmuskels kann nur durch eine effiziente Durchblutung durch Koronargefäße und die erforderliche Festigung durch entsprechende Bindegewebe erreicht werden.

Durch embryologische Techniken (Männer, 1993) und detaillierte elektronenmikroskopische Aufnahmen (Ho and Shimada, 1978) wurde gezeigt, dass das Epikard seinen Ursprung in einer extrakardialen Vorläuferpopulation hat, dem Proepikard (PE).

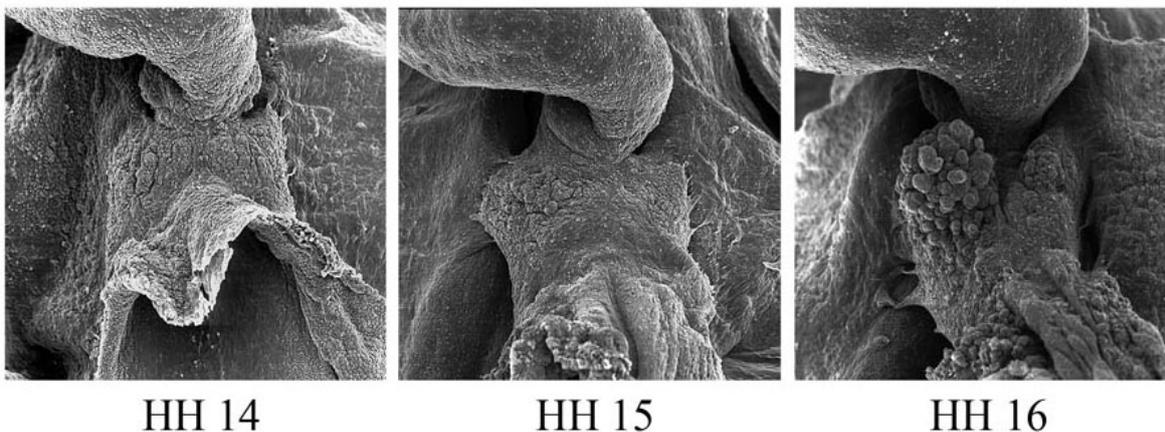
Das PE ist eine Akkumulation von mesothelialen Zellen auf dem *Sinus venosus*. Diese Vorläuferzellen sind durch starke Proliferation und weitere Rekrutierung von Mesenchym aus der perikardialen Wand und dem Sinushorn in der Lage, eine charakteristische Morphologie mit bläschenartiger Oberfläche zu entwickeln. Ähnlich wie auch der primitive Herzschauch, stellen proepikardiale Zellen offenbar ein Derivat des splanchnischen Mesoderms dar. Vom venösen Pol aus besiedelt das Proepikard sekundär das embryonale Herz und bildet das Epikard, welches die Grundlage für die Entwicklung der Koronargefäße darstellt.

Zum HH Stadium 13/14 werden im Hühnerembryo unilateral auf dem rechten Sinushorn blasenartige Auswüchse des perikardialen Mesothels sichtbar. Diese rechte Anlage wächst weiter, bis es zum Kontakt mit dem Herzen im Stadium HH17/18 kommt. Eine linke Anlage bildet sich dagegen verspätet, bleibt auch weiterhin retardiert und scheint nicht an der Epikardentwicklung teilzunehmen (Abb.3; Männer et al, 2001). Auch im *Xenopus* entwickelt sich das PE nach 42 Stunden nur auf der rechten Seite der Einflussbahn (Männer, persönl. Korrespondenz). In der Maus bilden sich von Beginn an bilaterale PE-Anlagen, welche

## 1. Einleitung

fusionieren, bevor es zur Bildung des Epikards kommt (Schulte et al., 2007). Die bilaterale Ausbildung kann auch in Fischen und in den primitivsten Vertebraten, den *Agnatha* (Kieferlosen), beobachtet werden. Im Katzenhai, der zu den primitiven *Gnathostomata* (Kiefermäuler) gehört, wird eine bilaterale PE Anlage gebildet, dessen rechte Seite über eine Brücke Kontakt zum Herzen aufnimmt (Munoz-Chapuli et al., 1994, Pombal et al., 2008). Auch im kieferlosen Meeresneunauge ist eine asymmetrische Kolonisierung des Herzens durch proepikardiale Zellen zu beobachten. Die rechte Anlage nimmt nach 17 Tagen *post fertilisation* (dpf) Kontakt mit dem Ventrikel auf. Nachdem sich das Epikard gebildet hat, bricht der Kontakt mit dem Herzen ab und es entwickeln sich aus der bilateralen Anlage die linken und rechten pronephridischen externen Glomeruli (Pombal et al., 2008).

Die molekularen Mechanismen der Induktion und Spezifizierung der proepikardialen Zellen sind bislang noch nicht ausreichend geklärt. Die unilaterale Entwicklung des PE im Hühnerembryo sowie im Froschembryo lässt vermuten, dass proepikardiale Zellen zu einem gewissen Zeitpunkt dem links/rechts-Asymmetrie-Signalweg unterliegen.



### **Abb.3 Die unilaterale PE-Entwicklung im Huhn**

Rasterelektronische Aufnahmen während der frühen PE-Entwicklung. Im HH Stadium 14 werden erste Bläschen proepikardialer Zellen auf dem rechten Sinushorn sichtbar. Diese entwickeln sich durch starke Proliferation in ein unilaterales Proepikard (PE), welches zum HH Stadium 16/17 seine volle Grösse erreicht hat, bevor es den Ventrikel bewächst. Das linke Sinushorn zeigt dagegen eine völlig retardierte PE-Anlage, welche offenbar an der Epikardenwicklung keinen Anteil hat (entnommen aus Schulte et al., 2007).

## 1. Einleitung

### 1.3.2 Die Kolonisierung des Herzens durch proepikardiale Zellen

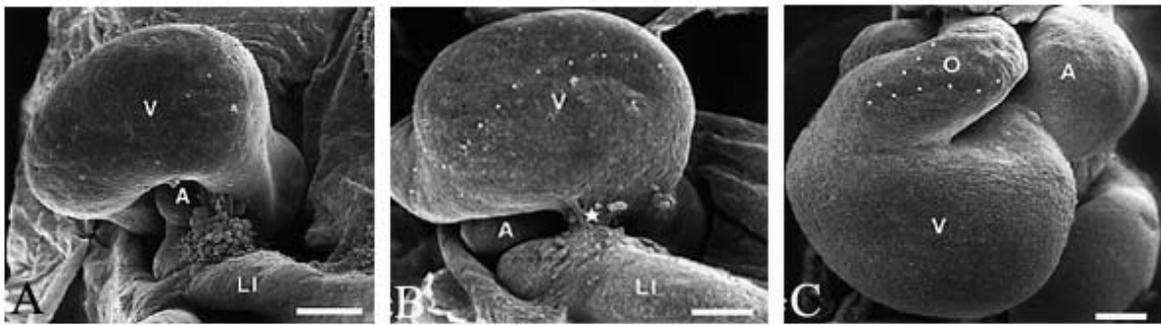
Die Prozesse des proepikardialen Zelltransfers können sind unterschiedlich in Organismen mit unilateraler und bilateraler PE-Entwicklung. In Vögeln und im *Xenopus* ist das PE durch starke unilaterale Proliferation epithelialer Zellen gekennzeichnet, wobei es zumindest in Vögeln zusätzlich zur Rekrutierung mesenchymaler Zellen kommt. Im Stadium HH 17/18 nehmen die proepikardialen Zellen über eine extrazelluläre Matrixbrücke Kontakt mit der dorsalen Seite des Ventrikel auf (Abb.4). Wird diese Brücke durch Heparinase zerstört, kommt es zu schwerwiegenden epikardialen Entwicklungsstörungen (Nahirney et al., 2003). Haben die PE-Zellen den Ventrikel erreicht, so öffnen sich die epithelialen Bläschen und entlassen mesenchymale Zellen. Diese bilden einen Teil des subepikardialen Mesenchyms. Der grösste Teil der subepikardialen Mesenchymzellen wird jedoch aus epithelialisierten Zellen durch eine epithel-mesenchymale Transition generiert (Munoz-Chapuli et al., 2002).

Die sekundäre Gewebebrücke ist bei Vögeln und im *Xenopus* der Hauptübertragungsweg proepikardialer Zellen auf das Herz (Männer, 1993; Männer, unpublizierte Beobachtung). Der kontinuierlichen Besiedlung des Ventrikels folgt die des Atriums und Teilen des Ausflusstraktes. Der distale Teil des Ausflusstraktes, der *Truncus arteriosus*, wird allerdings nicht von Zellen des PE epithelialisiert. Der Ursprung des Epikard liegt hier wahrscheinlich in perikardialem Mesothel, welches von der perikardialen Wand stammt, die in Verbindung mit dem Ausflusstrakt steht (Perez-Pomares et al., 2003).

In der Maus entwickelt das PE epitheliale Zysten, welche nicht kontinuierlich über eine sekundäre Gewebebrücke auf das Herz gelangen (Schulte et al., 2007). Vielmehr kommt es zu einer Absetzung epithelialer Vesikel, welche die perikardiale Höhle frei passieren. Die ungewollte Verteilung proepikardialer Zellen im *Peritoneum* wird offenbar bei Säugetieren durch das *Septum transversum*, welches die Pleurahöhle abschliesst, verhindert. Nach der Landung auf dem embryonalen Ventrikel flachen sich die proepikardialen Vesikel ab und wachsen zu einem Epikard zusammen. Die Bildung proepikardialer Zysten wird durch die Polarisierung epithelialer Zellen durch die Etablierung sogenannter apikaler kortikaler Domänen induziert. Dieser Prozess wird durch das Zellpolaritätsprotein Par3 vermittelt, welches in Lage ist, Komplexe mit Par6 und aPKC einzugehen, um epitheliale Zellpolarität zu ermöglichen (Hirose et al., 2006) Diese Zysten- medierte Kolonisierung des Herzens durch

## 1. Einleitung

proepikardiale Zellen ist unter den Säugetieren offenbar der präferentielle Mechanismus (Komiya et al., 1987; Viragh und Challice, 1981). Gleichwohl scheint in Ratten als auch in Mäusen ein Besiedlungsmechanismus proepikardialer Zellen zu existieren, der ähnlich wie in Vögeln über eine Matrixbrücke gerichtet ist. Hierbei scheinen proepikardiale Bläschen auszuwachsen und in Kontakt mit dem Herzen zu treten, wobei es zur Absetzung epithelialer Zysten kommt, welche schliesslich das Epikard bilden (Nesbitt et al., 2006; Rodgers et al., 2008).



### **Abb.4: Epikardentwicklung beim Hühnerembryo**

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Hühnerherzens während der Besiedelung durch proepikardiale Zellen. (A) HH Stadium 16 Embryo. Das PE ist voll ausgebildet. (B) Aufnahme eines HH Stadium 18+ Embryos, bei dem die Gewebebrücke (Sternchen) bereits entwickelt ist. Das Epikard hat den dorsalen Teil des Ventrikels bereits überwachsen. Die punktierte Linie zeigt die Epikardialisierungsgrenze an. (C) Im HH Stadium 24 ist das Herz bis auf den distalen Teil des Ausflusstraktes mit Epikard überwachsen. A - primitives Atrium, LI - Leberanlage, O - Ausflusstrakt, P - Proepikard, V - Ventrikel; Maßstab = 200  $\mu$ m. (entnommen aus Männer et al., 2000)

### 1.3.3 Proepikardiale Markergene

Durch Expressionsstudien und funktionelle Experimente konnten bereits eine Reihe proepikardialer Markergene identifiziert werden. Die T-Box-Transkriptionsfaktoren *TBX5* und *TBX18* zeigen eine signifikante epikardiale Expression (Haenig und Kispert, 2004; Hatcher et al., 2004, Kraus et al., 2001; Watt et al., 2004; Yamagashi et al., 2004). *TBX5* scheint eine zentrale Rolle bei der migratorischen Aktivität proepikardialer Zellen auf den embryonalen Ventrikel zu spielen. Die Überexpression von *TBX5* im Hühnchen führt zum Verlust epikardialer Strukturen, so dass eine dosisabhängige Funktion von *TBX5* bei der Kolonisierung des Herzens durch PE-Zellen angenommen wird (Hatcher et al., 2004). Das PDZ-LIM-Protein *LMP4* ist in der Lage, die subzelluläre Lokalisation von *TBX5* zu modulieren. *LMP4* kann *TBX5* binden, in das Zytoplasma verbringen und dadurch die transkriptionelle Aktivität von *TBX5* regulieren (Camarata et al., 2007). *TBX18* ist ein myokardialer Marker, der auch im Epikard eine prominente Expression aufweist (Haenig und Kispert, 2004). Die Mausmutante von *TBX18* zeigt jedoch keinen epikardialen Phänotyp. Im Hühnchen wird *TBX18* bereits früh im lateralen Plattenmesoderm und später im Herzen exprimiert. Die Expression zieht sich auf den venösen Pol zurück und persistiert im Proepikard und im Epikard. *TBX18* markiert das intermediäre Mesoderm, die Genitalfurche und ist auch in der anterioren Somitenhälfte und den Extremitäten zu detektieren (Haenig und Kispert, 2004). Im Zebrafisch wird *TBX18* in ähnlicher Weise in Ventrikel, Atrium und *Sinus venosus* exprimiert (Begemann et al., 2002).

Das Wilms' Tumor Suppressor Gen *WT1* kodiert für einen Zinkfinger Transkriptionsfaktor und ist ähnlich wie *TBX18* ein Marker des intermediären Mesoderms. In *Wt1*-Mutanten ist eine abnormale Entwicklung der Niere, Gonaden, Milz und Nebenniere zu beobachten. Im Hühnerembryo sind nephridisches Coelomesothel und endodermale Vorläuferpopulationen von Darm, Leber und Lunge wichtige Expressionsdomänen (Carmona et al., 2001). Durch den Verlust von *Wt1* entsteht jedoch auch ein schwerer kardialer Phänotyp (Wagner et al., 2003). Das Epikard sowie die ventrikuläre Myokardwand sind unterentwickelt, was in diesen Embryonen zu einem lethalen Phänotyp führt. *WT1* ist ein bedeutender epikardialer Marker, der im Proepikard, im Epikard und auch transient in epikardialen Derivaten exprimiert wird (Perez-Pomares et al., 2002). Im Zebrafisch ist *Wt1* ebenfalls ein grundlegender Faktor für die Epikardentwicklung (Sercula, 2008). In Rattenherzen konnte gezeigt werden, dass

## 1. Einleitung

induzierte Hypoxie Zellen aus dem Koronargefäßsystem veranlasst, die Expression von *Wt1* erneut zu aktivieren (Wagner et al., 2002). *Wt1* agiert als transkriptioneller Repressor von Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren oder anderen Transkriptionsfaktoren bei der Kontrolle von Zellteilung und Differenzierung (Patek et al., 1999). Die räumliche Nähe von Leberanlage und *sinus venosus* während der Embryonalentwicklung führte zu Experimenten im Hühnchen, bei denen sich implantiertes Leberprimordium im lateralen Plattenmesoderm als Induktor für ektoische *WT1*- und *TBX18*-Expression herausstellte (Ishii et al., 2007). Dies könnte bedeuten, dass die Induktion proepikardialer Identität unter anderem von Signalen aus der Leber abhängt.

Der bHLH Transkriptionsfaktor *Epicardin* weist ein ähnliches Expressionsmuster wie *Wt1* auf. Neben der Expression in den Gonaden und dem urogenitalen System wird es auch im Proepikard und im Epikard exprimiert (Robb et al., 1998).

Der Kompetenzfaktor *CFC* ist ein weiterer proepikardialer Marker im Hühnerembryo. Dieser Faktor gehört wie *one-eyed pinhead (oep)* im Zebrafisch (Zhang et al., 1998), *FRL* in *Xenopus* (Kinoshita et al., 1995) und *Cfc1/Cfc2* in der Maus zu der Familie der EGF-CFC-Faktoren (Schier und Shen, 2000). Die Zebrafischmutante *oep* zeigt, ähnlich wie die *Cfc2*-Mausmutante, den völligen Verlust axialer Strukturen. *Cfc1*-Defizienz führt zu einem embryonal-lethalen Phänotyp durch fehlende Mesoderminduktion, wobei in heterozygoten Embryonen Defekte in der links/rechts-Asymmetrie, wie z.B. eine Randomisierung der Herzkrümmung auftreten (Ding et al., 1998; Schier and Talbot, 2001; Xu et al., 1999). EGF-CFC-Faktoren agieren als Korezeptoren für TGF $\beta$ -Wachstumsfaktoren wie *Nodal* und sind essentiell für die Bindung an die entsprechenden Rezeptorkomplexe TypI: ALK 4/7 und TypII: ActRIIA/IIB. *CFC* kann über einen GPI-Linker an die Plasmamembran binden und wirkt dort wahrscheinlich als Korezeptor und Kolligand für *Nodal* (Schlange et al., 2001). Im frühen Hühnerembryo zeigt die *CFC* Expression einen antero-posterioren Gradienten im Epiblasten (Schlange et al., 2001). *CFC* wird im anterioren Teil des Primitivstreifens und im Hensenschen Knoten exprimiert, wo es später unilateral linksseitig persistiert. *CFC* kann im lateralen Plattenmesoderm und im Stadium HH 10 im Myokard des primitiven Herzschauches nachgewiesen werden. Darüberhinaus ist *CFC* in der Etablierung der links-rechts-Asymmetrie involviert, da es für die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Expression von *NODAL*, *CER1*, *PITX2* und *BAPX1* von großer Bedeutung ist (Schlange et al., 2001). Die Rolle von *CFC* in der Proepikardentwicklung ist bislang noch nicht aufgeklärt worden.

### 1.3.4 Die Interaktion von Epikard und Myokard

Das Myokard scheint in seiner Entwicklung von der Besiedlung durch proepikardiale Zellen abhängig zu sein. Die Herzen von *Wt1*-Mausmutanten, welche durch einen Verlust des Epikards gekennzeichnet sind, weisen eine hypoplastische myokardiale Kompaktschicht auf. Die dünne Ventrikelwand dieser Herzen kann die erforderliche Pumpleistung nicht erbringen, was zum einem embryonal-lethalen Phänotyp führt (Wagner et al., 2003). Diese Beobachtung kann auch in RXR-alpha-defizienten Mäusen gemacht werden (Gruber et al., 1996). RXR-alpha ist der Rezeptor für Retinsäure, wobei das Schlüsselenzym der Retinsäuresynthese RALDH2 ein ähnliches Expressionmuster wie WT1 im Epikard zeigt. Das Epikard scheint also direkten Einfluss auf die Myokardentwicklung durch Stimulierung myokardialer Proliferation zu nehmen. So spielen neben der Nährstoffversorgung durch Koronargefäße auch morphogenetische Signale aus dem Epikard eine wesentliche Rolle für die Ausbildung einer leistungsfähigen myokardialen Kompaktschicht (Wada et al., 2003).

Darüberhinaus wird epikardialen Zellen verstärkt die Fähigkeit zur Stimulierung myokardialer Regeneration zugesprochen. Dies wäre ein therapeutischer Durchbruch und muss äußerst kritisch betrachtet werden, da das Herz bislang als nicht oder nur unzureichend zur Regeneration fähig galt. Eine Ausnahme scheint hier der Zebrafisch zu sein. Werden in adulten Zebrafischherzen apikale Verletzungen induziert, kommt es zu einer Aktivierung des gesamten Epikards, welche sich in verstärkter *TBX18*- und *RALDH2*-Expression äussert. Darauf folgend persistiert diese hohe Expression beider Faktoren in der verletzten Region und es kommt zur Invasion epikardialer Zellen. Die FGF-abhängige Induktion einer koronaren Neovaskulogenese scheint hierbei entsprechend der embryonalen Entwicklung abzulaufen und wird als essentiell für die weitere myokardiale Regeneration betrachtet (Lepilina et al., 2006). Jedoch wurde auch schon in Säugetieren versucht, eine Epikard-induzierte myokardiale Regeneration zu zeigen. Die Implantation humaner adulter Epikardzellen in infarktierte Mausherzen schien die ventrikuläre Leistungsfähigkeit zu verbessern und verstärkte die myokardiale Vaskularisierung (Winter et al., 2007).

### 1.3.5 Die Entwicklung der Koronargefäße

Den Beginn der allgemeinen Entwicklung der Blutgefäße markiert die Zusammenlagerung von Gefäßvorläuferzellen (Vaskulogenese), diese setzt sich anschließend durch gerichtete Proliferation der terminalen Gefäßenden fort (Angiogenese). Die frühere Annahme, die Vaskulogenese der Koronargefäße hätte ihren Ursprung in der Aortenwurzel, wurde widerlegt und ist der Tatsache des epikardialen Ursprungs gewichen (Männer, 1999). Der Besiedlung des embryonalen Herzens durch proepikardiale Zellen folgt die Bildung des Epikards, dessen Zellen in der weiteren Entwicklung das Koronargefäßsystem ausbilden.

Das Epikard ist ein epithelialer Zellverband mit einer Basallamina, welche die Adhäsion an das Myokard gewährleistet. Unterhalb dieser Basallamina befindet sich der subepikardiale Raum, welcher vorwiegend aus Matrixproteinen wie Fibronectin, Kollagen Typ I, IV, V und VI und Proteoglykanen besteht. Hier befinden sich ebenfalls große Mengen an mesenchymalen Zellen, welche hauptsächlich durch epithel-mesenchymale Transition (EMT) epikardialer Zellen entstehen (Nahirney et al., 2003). Es gibt Hinweise, dass Fgf1, 2 und 7 im Zusammenspiel mit Tgf $\beta$ -Faktoren die EMT regulieren (Morabito et al., 2001). Neuere Untersuchungen zeigen einen stimulierenden Einfluss von Tgf $\beta$ 1-3, welcher durch den Integrin-Liganden Vcam1 über die Modulierung der Rho-Aktivität inhibiert wird (Dokic und Dettmann, 2007). Unter dem Einfluss der Transkriptionsfaktoren Ets-1/ 2 wird die Basallamina durch proteolytischen Verdau partiell abgebaut, welches die EMT einleitet (Lie-Venema, 2003). Der Verlust dieser Faktoren hat das Fehlen epikardialen Mesenchyms zur Folge und die Bildung der Herzgefäße ist gestört (Lie-Venema et al., 2003). Die entstandenen fibroblastoiden Mesenchymzellen sind stark migratorisch und dringen auch in das Myokard ein, insbesondere im Bereich der atrioventrikulären und conoventrikulären Furche (Munoz-Chapuli et al., 2002). Dies wird wahrscheinlich durch Faktoren wie Raldh2 ermöglicht, welches die mesenchymalen Zellen durch Bereitstellung retinoider Signale vor einer terminalen Differenzierung bewahrt (Kastner et al., 1997). Diese Zellen epikardialen Ursprungs sind fähig zu Endothel- (Perez-Pomares et al., 2002) und Glattmuskelzellen der Koronargefäße oder Zellen der atrioventrikulären Klappen zu differenzieren (Abb. 5; Männer et al., 2001).

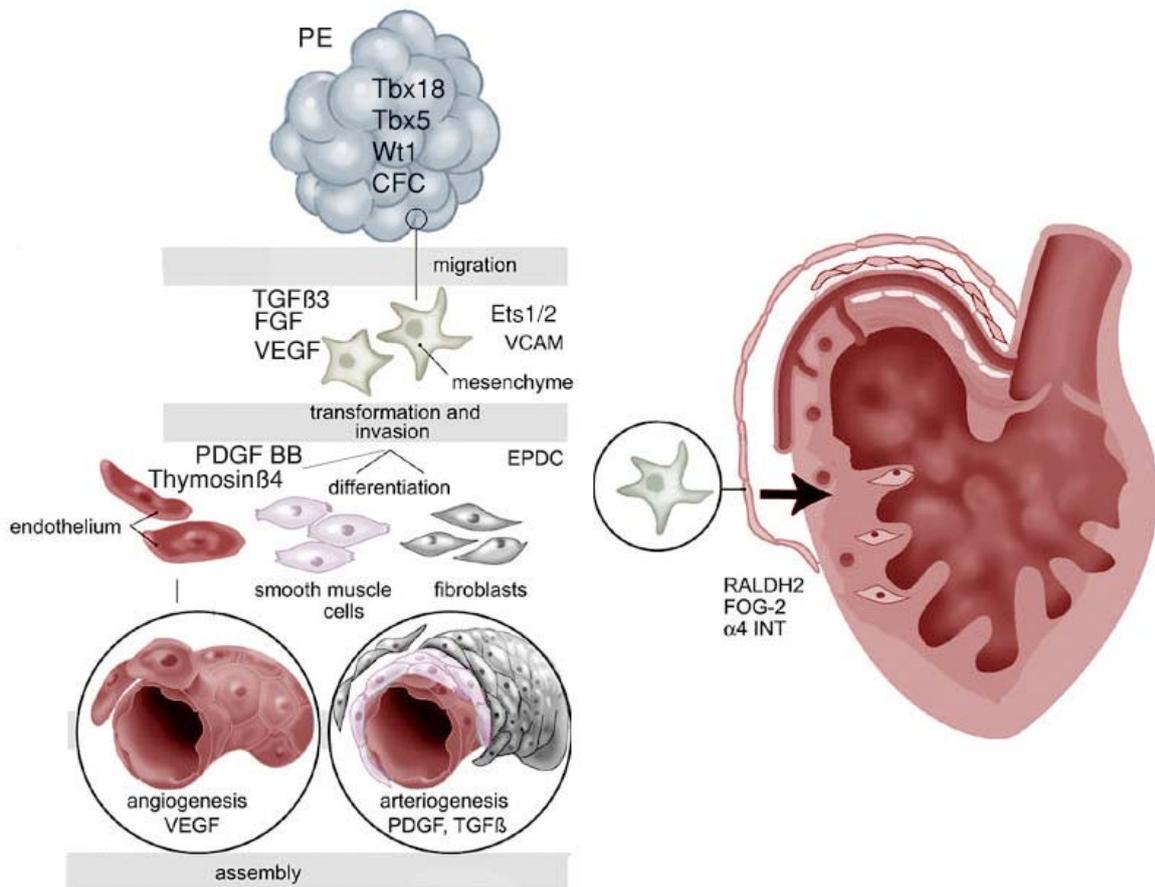
Das Myokard sezerniert während der Vaskulogenese neben Fgf- und Tgf $\beta$ -Liganden den Wachstumsfaktor Vegf (*vascular endothelial growth factor*). Dieser Faktor veranlasst

## 1. Einleitung

Mesenchymzellen in Endothelzellen zu differenzieren. (Abb.5; Morabito et al., 2001). Gefäßvorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen sind in der Lage in Anwesenheit von Pdgf (*platelet derived growth factor*) in Glattmuskelzellen und in Anwesenheit von Vegf in Endothelzellen differenzieren. Dass diese Zellen (EPDCs, epicardium derived cells) beide Rezeptoren Vegfr-2 und Pdgfr besitzen, spricht für einen gemeinsamen Vorläufer von Koronargefäßzellen.

Das G-Aktin Monomer bindende Protein Thymosin $\beta$ 4 ist verantwortlich für Umstrukturierungen des Zytoskeletts und damit essentiell für die Migration von Zellen. Thymosin $\beta$ 4 kann darüber hinaus das Wachstum epikardialer Explantate stimulieren, sowie adulte Epikardzellen veranlassen in Endothel- und Glattmuskelzellen sowie Fibroblasten zu differenzieren (Smart et al., 2007). Es scheint in Mäusen bereits in der Embryonalentwicklung sowie in ischämischen adulten Herzen als Induktor der Vaskulogenese eine Rolle zu spielen und ist demnach ein weiterer wichtiger Faktor in der Koronargefäßentwicklung (Smart et al., 2007). Es bedarf trotz dieser Einsichten allerdings noch eingehender Studien, um insbesondere die potentiellen Mechanismen der Neovaskulogenese in adulten Organismen zu verstehen.

## 1. Einleitung



### Abb. 5. Entwicklung der Koronargefäße aus epikardialen Zellen

Die epithelialen proepikardialen Zellen werden durch ein Zusammenspiel verschiedener myokardialer Wachstumsfaktoren, wie Fgfs und Tgfβ, sowie Vegf zu einer epithelial mesenchymalen Transition veranlasst. Diese hoch transformatorischen und invasiven Zellen reagieren auf Faktoren wie Pdgf und Thymosinβ4 und differenzieren in Endothel-, Glattmuskelzellen sowie Fibroblasten. Diese Zelltypen nehmen an der Angiogenese teil und bilden das Koronargefäßsystem. Es sind unter anderem Faktoren wie Raldh2, welche die Invasion der mesenchymalen Zellen in das Myokard ermöglichen, da sie die Zellen vor einer terminalen Differenzierung bewahren (Entnommen und modifiziert aus Poelmann et al., 2002).

## 1.4 Die links/rechts-Asymmetrie der Körperachse

### 1.4.1 Der Nodal-Signalweg und die Determinierung der links/rechts-Asymmetrie

Die Anordnung der inneren Organe in Vertebraten unterliegt einer ausgeprägten links/rechts-Asymmetrie. Im Menschen befinden sich Leber und Galle auf der rechten Seite, während der Magen, Pankreas und Milz auf der linken Seite liegen. Auch das Herz ist asymmetrisch ausgebildet. Man spricht bei einer korrekten asymmetrischen Konfiguration der inneren Organe von einem *situs solitus*. Ist diese Konfiguration vollständig spiegelbildlich angeordnet, wird dies als *situs inversus totalis* bezeichnet. Es können auch Isomerien einzelner Organe auftreten, was bei einer linkseitigen Isomerie zu einem Verlust rechter Organe führen kann (Splitt et al., 1996). Den asymmetrischen Aufbau findet man ebenfalls bei vielen anderen Vertretern des Tierreiches, so bei den primitiven Chordaten als auch bei Seeigeln, Schnecken, *C. elegans* und *Drosophila* (Hutter und Schnabel, 1995; Palmer, 2004; Shibazaki et al., 2004; Duboc et al., 2005; Hozumi et al., 2006; Speder et al., 2006). Für die Determination dieser links/rechts-Asymmetrie ist der konservierte NODAL-PITX2-Signalweg verantwortlich, welcher im Folgenden am Beispiel des Huhns erörtert werden soll. Unter den ersten asymmetrisch exprimierten Genen im gastrulierenden Hühnerembryo befinden sich der Aktivin Typ IIa Rezeptor (*ACVR2A*), Sonic Hedgehog (*SHH*) und der TGF $\beta$ -Faktor NODAL (Levin et al., 1995). *ACVR2A* wird zum HH Stadium 4 ausschliesslich auf der rechten Seite exprimiert. *SHH* wird zunächst symmetrisch im Hensenschen Knoten exprimiert, bereits ein Stadium später ist die Expression auf der linken Seite deutlich stärker. Darauf folgend ist die Expression von *NODAL* zum HH Stadium 6-7 auf der linken Seite benachbart zum Knoten zu beobachten, welche sich im nächsten Stadium auf das linke laterale Plattenmesoderm (LPM) ausdehnt. Die rechtseitige Applikation von *SHH* führt zu ektopischer Expression von *NODAL*, so dass *NODAL* offenbar der Kontrolle von *SHH* unterliegt (Levin et al., 1995; Paga-Westphal and Tabin, 1998). Der Knoten selbst wird von der Peripherie lateralisiert, wobei Aktivin $\beta$  als Kandidat für die Induktion der asymmetrischen *SHH*-Expression in Frage kommt (Levin et al., 1997). Diese Induktion scheint allerdings nicht direkt zu erfolgen, sondern über ein regulatorisches Netzwerk,

## 1. Einleitung

welches unter anderem BMP4, MTF2 und MID1 beinhaltet (Abb.6; Monsoro-Burq und LeDouarin, 2001).

Darüberhinaus wird der Notchligand *Delta-like 1* auf der linken Seite des Knoten exprimiert und kontrolliert über andere Faktoren die Expression von *NODAL* (Raya et al., 2004). Die ektopische Expression von Notchliganden sowie die Blockade der Notch-Signaltransduktion führte zu Misexpression von *NODAL* sowie einer veränderten Herzkrümmung (Ramsdell, 2005; Tabin, 2005; Hirokawa et al., 2006; Raya und Belmonte, 2006; Shiratori und Hamada, 2006).

Die linksseitige Expression von *NODAL* ist nur transient und verschwindet bis zum HH Stadium 10, allerdings induziert sie die Expression des links-rechts Mediators *PITX2*, welcher wesentlich länger während der Organogenese persistiert. *PITX2* ist ein Homeobox Gen der *bicoid* Klasse, welches Zellen im LPM irreversibel lateralisiert (Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; StAmand et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999).

Die Inhibition von SHH auf der rechten Seite durch Aktivin $\beta$ B und BMP4 induziert die rechtseitige Expression von *FGF8*, welche wiederum von FGF18 moduliert werden kann (Boettger et al., 1999; Granata und Quaderi, 2003; Ohuchi et al., 2000). FGF8 ist in der Lage den transkriptionellen Repressor SNAI1 im rechten lateralen Plattenmesoderm zu induzieren (Isaac et al., 1997). SNAI1 inhibiert die Expression von *PITX2*, ohne SNAI1 ist eine ektopische rechtsseitige *PITX2*-Expressionsdomäne zu beobachten (Patel et al., 1999).

Der Transfer von NODAL vom Knoten in das linke LPM scheint einen weiteren Faktor zu benötigen, der im paraxialem Mesoderm exprimiert wird (Levin et al., 1995; Pagan-Westphal and Tabin, 1998). Im Hühnchen konnte CER1 (Caronte), ein Mitglied der Cerberus /Dan Familie isoliert werden, welches für diese Aufgabe in Frage kommt (Rodriguez Esteban et al., 1999; Yokouchi et al., 1999). *CER1* wird zunächst auf der linken Seite des Hensenschen Knotens perinodal exprimiert und später im HH Stadium7 dehnt sich die Expression in das paraxiale Mesoderm und das LPM aus. Die *CER1*-Expression steht unter der Kontrolle von SHH, allerdings zeigen neuere Studien, dass CER1 im Huhn als ein negativer Regulator von NODAL funktioniert (Tavares et al., 2007). Die negative Regulation des Nodalfaktors Southpaw (spaw) durch das Cerberus verwandte Protein Charon konnte bereits vorher im Zebrafish gezeigt werden (Hashimoto et al., 2004). So scheint die Rolle von CER1, welches BMP binden und antagonisieren kann, eine Prävention der Ausbreitung der NODAL-Domäne

## 1. Einleitung

zu sein. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen, welche eine Abhängigkeit der *NODAL* Expression von BMPs im LPM zeigen (Abb.6; Schlange et al., 2002; Piedra et al., 2002). Auch in der Maus besteht eine Abhängigkeit von BMP4 für *NODAL* (Fujiwara et al., 2002). Diese Abhängigkeit beruht auf der essentiellen Interaktion von *NODAL* und *CFC*, um die entsprechende *NODAL*-Signaltransduktion zu aktivieren. *CFC* wird wiederum von BMP reguliert und sorgt dafür, dass das LPM kompetent für linksseitige *NODAL*-Signale wird (Schlange et al., 2002). *CER1* im paraxialem Mesoderm könnte also durch BMP-Antagonismus diese Kompetenz verhindern. Dies wäre ein grundlegender Mechanismus um die Mittellinie, welche durch *CFC*-abhängige *LEFTY1*-Expression gekennzeichnet ist, vor etwaigen BMP-Signalen zu bewahren und somit die linksseitige *NODAL* Expression zu stabilisieren. *LEFTY1* ist ein TGF $\beta$ -Faktor und wirkt in der Mittellinie als negativer Regulator von *NODAL*, indem es *CFC* oder *NODAL* direkt binden kann (Cheng et al., 2003). Die Expression von *CER1*, beziehungsweise *CER1*-Homologen wie *Charon* im Zebrafisch oder *Dand5* in der Maus sind sehr divergent. Bilateral exprimiert im Zebrafisch, wird *CER1* im Hühnchen linksseitig und *Dand5* in der Maus rechtsseitig exprimiert, was innerhalb der Vertebraten stark divergierende Strategien der Aktivierung und Kontrolle der *Nodal*-Expression erkennbar macht. Dies wird im Huhn ebenfalls durch den fehlenden TGF $\beta$ -Faktor *Lefty2* deutlich, welcher in der Maus als negativer Regulator von *Nodal* wirkt. Es ist somit nicht unwahrscheinlich, dass *CER1* im Huhn die Rolle von *Lefty2* in der Maus übernommen hat.



## 1. Einleitung

*enhancement and lateral inhibition*, „SELI“) vorgeschlagen (Nakamura et al., 2006). Die *Shh*-Expression zeigt dagegen keinerlei Asymmetrie im Knoten, sondern scheint für die Regulation der Mittellinie eine Rolle zu spielen (Tsukui et al., 1999). Für den Bruch der Symmetrie im Knoten wird in der Maus ein Mechanismus etabliert, der bereits früh als theoretisches Modell postuliert wurde, der sogenannte *Nodal flow* (Brown und Wolpert, 1990, Nonaka et al., 1998). Der *Nodal flow* beruht auf dem Prinzip eines gerichteten Flusses, welcher durch rotierende Monozilien epithelialer Zellen am Boden des Knotens erzeugt wird. Tatsächlich zeigen *iv* (*inverses viscerum*) Mäuse, welche Mutationen des für die Motilität der Monozilien erforderlichen links-rechts Dyneins (*Lrd*) aufweisen, Randomisierungen der links/rechts-Asymmetrie (Supp et al., 1997, 1999). Darüberhinaus konnte durch artifizielle Umkehr des Flusses gleichfalls eine Umdrehung der links/rechts-Achse erreicht werden (Nonaka et al., 2002). Die Beobachtung rotierender Zilien in der Knotengrube führte zu verschiedenen Modellvorstellungen, wie sich dieser transiente Fluss auf die links/rechts Identität perinodaler Zellen auswirken könnte (Abb. 7). Es konnte bereits der Transport sogenannter *Nodal vesicular parcels* (NVPs) nachgewiesen werden, welche im Knoten transportiert werden. Diese Vesikel enthalten *Shh* und Retinsäure und werden durch nodale Zellen in den Knoten abgesetzt, wobei sie durch den Fluss auf der linken Seite akkumulieren. Der Vorgang der Vesikelsekretion scheint von FGF8 abhängig zu sein, da er durch den FGF Rezeptorantagonisten SU5402 blockiert werden konnte (Tanaka et al., 2005). Hier wird die unterschiedliche Rolle von FGF8 bei der Ausbildung der Knotenasymmetrie deutlich. Im Hühnchen für die rechtsseitige *PITX2* Repression über *SNAI1* verantwortlich, wird FGF8 in der Maus als linksseitige Determinante impliziert. Im Gegenteil dazu weisen Daten im Kaninchen FGF8 wiederum als rechtseitige Determinante aus (Fischer et al., 2002). Die Wirkungsweise des asymmetrischen *Shh*-Transportes muss hingegen noch geklärt werden, da der Rezeptor *patched* (*Ptch1*) im Knoten symmetrisch exprimiert wird (Zhang et al., 2001). Daher ist auch der Verlust asymmetrischer Nodalexpression durch Abwesenheit von *Shh* in der Maus vielmehr durch fehlende Kontrolle der Mittellinie zu erklären (Meyers und Martin, 1999).

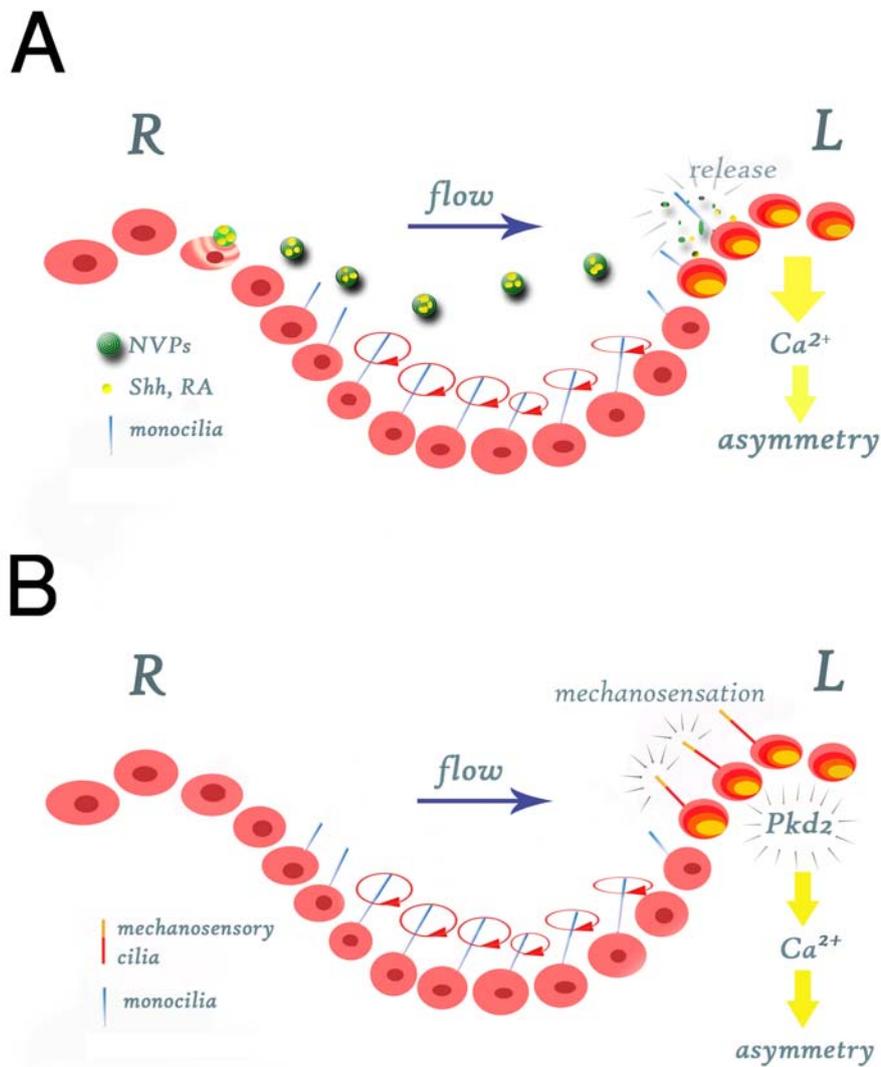
Eine andere Modellvorstellung des *Nodal flow* geht von der mechanosensorischen Detektion durch spezielle periphere Zilien aus, welche den erzeugten Flüssigkeitsstrom messen können. Dies beruht auf der Tatsache, dass zwei verschiedene Arten von Zilien im Knoten identifiziert wurden (McGrath et al., 2003). Die Zilien im Knoten sind durch Assoziation mit *Lrd* und dem

## 1. Einleitung

Calciumkanal Polycystin2 gekennzeichnet, wohingegen die peripheren Zilien nur Polycystin2 aufweisen. Auf der linken Seite des Knotens ist eine erhöhte Konzentration von intrazellulären Calciumionen nachweisbar. Dies scheint die Aktivität des Polycystin2 in die Etablierung der links-rechts Achse zu involvieren, da Polycystin2- sowie Lrd-defiziente Mäuse einen Verlust dieser linkseitigen Calciumerhöhung als auch eine defekte links/rechts Asymmetrie aufweisen (Pennekamp et al., 2002, McGrath et al., 2003). Die Umsetzung einer ziliären mechanischen Reizung in asymmetrische Genexpression durch unilateral erhöhte Calciumkonzentrationen ist allerdings noch weitgehend ungeklärt

Der Kupffersche Vesikel im Zebrafisch stellt ein Äquivalent des Knotens dar und spielt ebenfalls eine grundlegende Rolle in der Etablierung der links/rechts Achse. Der Verlust der intraflagellaren Transportproteine Ift88 (Polaris) und Ift57 (Hippi) führt zu Störungen des *Nodal flow* und somit zu Randomisierungen der links/rechts-Achse (Amack und Yost, 2004; Bisgrove et al., 2005; Essner et al., 2005; Kramer-Zucker et al., 2005). Auch im Zebrafisch konnte ein asymmetrischer Calciumstrom um den Kupfferschen Vesikel herum beobachtet werden, dessen Inhibition durch Blockade der sarko/endoplasmatischen Retikulum ATPase (SERCA) ebenfalls zu aberranter links/rechts-Musterbildung führt (Sarmah et al., 2005).

In der Festlegung der link/rechts-Asymmetrie scheint der innerhalb einer Organisatorstruktur generierte *Nodal flow* unter den Vertebraten verbreitet zu sein. Es konnte bislang allerdings im Hühnchen keine klare Evidenz für einen *Nodal flow*, wie man ihn in der Maus und im Fisch beschreiben konnte, erbracht werden. Gleichwohl ist auch im Frosch ein *Nodal flow* nachgewiesen worden (Schweickert et al., 2007). Dieser beinhaltet intraflagellare Proteine wie Ift88, Lrd als auch den Ionenkanal Polycystin2, welche wie in der Maus auch im Frosch in die links/rechts-Musterbildung impliziert worden sind (Qiu et al., 2005).



### Abb.7: Modellvorstellungen des Nodal flow

(A) Durch Rotation am Boden des Knotens befindlicher Zilien wird ein stetiger Flüssigkeitsstrom (*Nodal flow*) generiert. Dieser *Nodal flow* ist in der Lage, *nodal vesicular parcels* (NVPs) auf der linken Seite zu akkumulieren. Die NVPs werden von perinodalen Zellen abgesetzt und enthalten SHH und Retinsäure. Durch den asymmetrischen Überschuss an NVPs kommt es zur Freisetzung von SHH und Retinsäure auf der linken Seite des Knotens, was wiederum zu einer erhöhten Konzentration von intrazellulären Calciumionen auf der linken Seite führt. Durch einen bislang unbekanntem Mechanismus wird hierdurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche zur Determinierung der link/rechts-Achse durch entsprechende asymmetrische Genexpression führt. (B) Ein alternatives Modell schlägt die mechanische Reizung spezieller perinodaler Zilien durch den *Nodal flow* vor, welche über den Calciumkanal Polycystin2 (Pkd2) zur Aktivierung asymmetrischer Genexpression führt (Entnommen aus: Schlueter und Brand, 2007).

## 1. Einleitung

### 1.4.3 Frühe Mechanismen des Symmetriebruches - Ionenflux und Apoptose

Der Hensensche Knoten zeigt bereits im Stadium HH 4 eine morphologische Asymmetrie, also bereits vor der asymmetrischen Expression von *SHH* (Dathe, 2002). Dies zeigt die frühe Etablierung der links/rechts-Achse durch Signalwege, welche den Embryo bereits vor der Knotenasymmetrie lateralisieren. Der gastrulierende Embryo weist spätestens nach der Induktion des Primitivstreifens eine klar definierte links/rechts-Achse auf. Tatsächlich scheinen die linke und rechte Hälfte des Blastoderms bereits im Stadium HH2 miteinander zu kommunizieren (Levin und Mercola, 1999). Diese Kommunikation verläuft über die sogenannten *gap junctions*, also über Zell-Zellkontakt. Es kommt zur Ausbildung einer Links-Isomerie, wenn diese Kommunikation gestört wird (Levin und Mercola, 1999). Die *gap junction*-Kommunikation verläuft über den Transport von Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht. Im *Xenopus* als auch im Huhn konnte durch ektopische Antagonisten von Serotoninrezeptoren ein signifikanter Anstieg an Embryonen mit Heterotaxie beobachtet werden (Fukomoto et al., 2005). Dies macht Serotonin zu einem möglichen Transportkandidaten in der Zell-Zellkommunikation.

Bereits im Stadium HH 3-4 zeigt der Hühnerembryo im Primitivstreifen ein asymmetrisches Membranpotential, wobei die linke Seite des Primitivstreifens stärker depolarisiert ist als die rechte Seite (Levin et al., 2002). Dieses asymmetrische Membranpotential wird von einer  $H^+/K^+$ -ATPase generiert, dessen Inhibition durch pharmakologische Reagenzien wie Omeprazole zur Randomisierung der links/rechts-Achse führt. Darüberhinaus scheint die Aktivität dieser ATPase hochkonserviert zu sein, da sie nicht nur im Huhn, *Xenopus* oder Zebrafisch, sondern auch in *Ciona* (Shimeld und Levin, 2006) und Seeigeln (Duboc et al., 2005; Hibino et al., 2006) in die Etablierung der links/rechts-Achse involviert ist. Ein weitere Protonenpumpe, welche für die links/rechts-Musterbildung von Bedeutung ist, ist eine  $H^+$ -V-ATPase, dessen Aktivität zunächst in *Xenopus* entdeckt wurde. Auch im Huhn ist diese ATPase aktiv und agiert oberhalb von SHH in der Lateralisierung des Embryos (Adams et al., 2006). Die Modellvorstellung geht bislang von einem asymmetrischen Membranpotential im Primitivstreifen aus, welches durch die Aktivität der genannten ATPasen etabliert und aufrechterhalten wird. Durch dieses Membranpotential kommt es zur Ausbildung eines Gradienten von Determinanten mit niedrigem Molekulargewicht über die *gap junction* Kommunikation. Im Primitivstreifen selbst wird das asymmetrische Membranpotential durch

## 1. Einleitung

Apoptose der Mittellinie aufrechterhalten. Wird diese Apoptose blockiert, so kommt es aller Ansicht nach zu partiellem Verlust der Mittellinie, welches zu aberranter links/rechts-Asymmetrie mit entsprechend bilateraler Expression von NODAL führt (Kelly et al., 2002). Es ist noch nicht völlig geklärt, wie diese frühe Etablierung der Asymmetrie im Primitivstreifen durch lateralisierte Genexpression in den Knoten übertragen wird. Neuere Untersuchungen im Kaninchen weisen auf ein Zusammenspiel von FGF8 und *gap junctions* bei der rechtseitigen Repression von NODAL hin (Feistel und Blum, 2008).

### 1.4.4 Lateralisierung des Herzens

Im Huhn durchläuft der lineare Herzschlauch ab Stadium HH 10 als erstes Organ eine asymmetrische Entwicklung. Durch anteroposteriore Rotation, sowie durch gerichtete Krümmung erlangt der Herzschlauch eine Konfiguration, die als Rechtskrümmung oder auch Dextroloop bezeichnet wird (Männer, 2004). *PITX2*, das Zielgen des Signalmoleküls NODAL ist die Determinante für linksseitige Identität und wird auch im Herzschlauch sowie im linken Sinus exprimiert (Campioni et al., 2001; Schweickert et al., 2000). Die Überexpression sowie der Verlust von *PITX2* im Huhn als auch im Frosch zeigen einen Zusammenhang von linksseitiger *PITX2* Expression und rechtsgerichteter Herzkrümmung (Campioni et al., 1999; Linask et al., 2002). In der Maus führte der völlige Verlust von *Pitx2* allerdings nicht zu randomisiertem looping, sondern lediglich zu einer Rechtsisomerie der Atrien (Kitamura et al., 1999; Liu et al., 2001). Darüberhinaus scheinen asymmetrische Organe, darunter auch die Lunge und der Darm, in ihrer Morphogenese von der Dosis der *PITX2*-Expression abzuhängen. Offenbar hängt die Richtung des Herzloopings nicht direkt von *PITX2* ab, wie verschiedene Studien belegen. Der Verlust von *SNAIL* im Huhn führt zur Randomisierung des Herzloopings bei normaler linksseitiger *PITX2* Expression (Patel et al., 1999). Auch in *RALDH2*-defizienten Mäusen werden ungekrümmte Herzen beobachtet, wobei die *PITX2*-Expression nicht betroffen ist (Niederreither et al., 2001). Demnach scheint *PITX2* das Herzlooping nur sekundär zu beeinflussen. Allerdings scheint *PITX2* während der Kardiogenese offenbar in die Kontrolle der Zellproliferation involviert zu sein, da eine Überexpression im *Xenopus* zu einer Hyperplasie des Herzens führt (Campioni et al., 1999).

## 1. Einleitung

Die Kopplung von Herzlooping und embryonaler Lateralität wird wahrscheinlich durch NODAL gewährleistet. Ektopische rechtseitige Überexpression von *NODAL* im Huhn als auch ein hypomorphes Nodalallel in der Maus führen zu aberrantem Herzlooping (Levin et al., 1995; Lowe et al., 2001). Die Expression von *Nodal*, wie auch das Herzlooping in der Maus sind wiederum abhängig von *Cited2* (Weninger et al., 2005). Dieser transkriptionelle Koaktivator ist einer der frühesten asymmetrischen Marker im Herzfeld und weist im Hühnerembryo bereits im Stadium HH 5 eine transiente rechtsseitige Expression im rechten lateralen Plattenmesoderm auf (Schlange et al., 2000a). Der Verlust von *Hand1* mit einhergehender abnormaler Herzkrümmung weist diesem bHLH Transkriptionsfaktors eine Rolle in der kardialen links/rechts-Musterbildung zu (Srivastava et al., 1995). Die Expression von *Hand1* ist insbesondere im Atrium und prospektiven linken Ventrikel ausgeprägt (Biben und Harvey, 1997). Eine weitere Determinante in diesem Zusammenhang stellt *Bmp4* dar. Es kontrolliert nicht nur, wie *Bmp2*, die Expression von *Nkx2.5* und *Hand1*, sondern konnte im Zebrafisch wie auch im Frosch mit der Morphogenese der Herzkrümmung in Verbindung gebracht werden (Breckenridge et al., 2001; Chen et al., 1997). Das Matrixprotein Flectin weist ebenfalls eine Asymmetrie im primitiven Herzschlauch auf. Im Huhn und in der Maus wird Flectin auf der linken Seite des linearen Herzens in der *cardiac jelly* zwischen Myokard und Endokard stärker exprimiert (Tsuda et al., 1996,1998). Die Behandlung mit Flectin-Antikörper im Hühnerembryo führte zu einer signifikanten Randomisierung der Herzkrümmung (Linask et al., 2002). Einen weiteren Aspekt der Lateralisierung der Herzanlage stellt die *Pitx2*-abhängige asymmetrische Entwicklung der Branchialbogenarterien dar. *Pitx2* induziert hier offenbar im sekundären Herzfeld eine dynamische morphologische Asymmetrie, welche einen veränderten Blutfluss im Ausflusstrakt zur Folge hat. Diese Veränderung der Hämodynamik führt durch differentielle Aktivität des *Pdgfr* (*platelet derived growth factor receptor*) und *Vegfr2* (*vascular endothelial growth factor receptor 2*) zu einer asymmetrischen Arterienentwicklung (Yashiro et al., 2007).

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollten im Modellorganismus Huhn zwei Themen bearbeitet werden. Zunächst wurde die Funktion von BMP in der Induktion der proepikardialen Entwicklung analysiert. Dies setzte eine umfassende Expressionsstudie proepikardialer Marker, sowie BMP2/4 am venösen Pol des Herzens voraus. Diese Untersuchungen zeigten unter anderem eine starke myokardiale Expression von BMP2 und eine weitaus schwächere unilaterale Expression von BMP4 im Proepikard (PE). Durch *in vitro* Experimente sollte der Einfluss von ektopischem BMP auf die proepikardiale Identität analysiert werden. Es zeigte sich, dass ein Teil dieser Zellen unter dem Einfluss von BMP ein myozytäres Schicksal annehmen konnten. Gleichwohl schien der ansteigende Verlust von BMP-Signalen mit einer proportionalen Reduktion proepikardialer Markerexpression einherzugehen. Dieses deutet auf eine Dosisabhängigkeit der proepikardialen Identität von lokalen BMP-Signalen hin, welche durch entsprechende *in vivo* Experimente bestätigt wurde.

Der zweite Schwerpunkt bestand in der Analyse der Mechanismen, welcher der asymmetrischen Entwicklung des PE zugrunde liegen. Hierzu wurden manipulative Eingriffe am Hensenschen Knoten des Hühnerembryos vorgenommen, mit dem Ziel, den linksseitigen NODAL-PITX2-Signalweg auf der rechten Seite zu induzieren. Diese Eingriffe führten zu einer aberranten links/rechts-Musterbildung des Embryos, zeigten aber keinen Einfluss auf die Lateralität proepikardialer Zellen. Dagegen führte die Inhibition der rechtsseitigen FGF-Aktivität am Hensenschen Knoten zu einem Verlust der asymmetrischen *TBX18*-Expression, ektopisches FGF8 auf der linken Seite zur Induktion bilateraler *TBX18*-Expressionsdomänen. Auch die Manipulation des frühembryonalen asymmetrischen Ionenfluxes, sowie die Inhibition der Apoptose im Primitivstreifen führten zu einer völligen Randomisierung der PE-Anlage. Diese Resultate zeigen nicht nur die Unabhängigkeit der asymmetrischen PE-Entwicklung von der linksseitigen NODAL-PITX2-Signalkaskade, sondern stellen die rechtsseitige FGF-Signalgebung im Knoten als induktiv für asymmetrische *TBX18*-Expression heraus. Darüberhinaus weisen sie auf eine frühe Determination der Lateralität extrakardialer Organanlagen wie dem PE hin, welche auf asymmetrischem Ionenflux und Etablierung einer apoptotischen Mittellinie im Primitivstreifen beruht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Bakterieninkubator	G24 Environmental Incubator
Binokular	Leica MZ FLIII
Brutschrank	Heraeus
Clean Bench	Heraeus
Digitalkamera	Polaroid
Elektroporator	
Eppendorfgefäßschüttler	Eppendorf Thermomixer 5436
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Gefrierschneider, Jung Frigocut 2800 E	Leica
Gelapparatur	BIO RAD
Heizblock	Techne DRIDB-Block 24
Kühlzentrifuge, Rotor	Beckmann
Konfokales Lasermikroskop	Leica
Magnetrührer	IKAMAG RCT
Mikroskop	Leica DMR-BE
PCR-Maschine	TR Thermocycler, BIO RAD
Photoapparate	Leica Wild MPS 48
Real time PCR -Maschine	Biorad, Biozym
Sequenziermaschine	Perkin Elmer
Spannungsquellen	Biometra
	BIO RAD
Tischzentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415C
Vortexer	Certomat MW
Wärmewasserbad	GFL 1083
Zellinkubator	Heraeus

## 2. Material und Methoden

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Falconröhrchen 15ml, 50ml	Falcon
Fibronectin-chamberslides 4 wells	Becton Dickinson Labware
Glasdeckgläschen (22x 22mm)	Assistant-Firma
Greinerröhrchen	Greiner bio-one
96-well plate, weiss	Biozym
8-well strip	Biozym
Objektträger und Deckgläser	Schütt
Petrischalen	Nunc
Plastikpipette	Brand Products
Qiagen Plasmidaufreinigungskit	Qiagen
Qiagen Real time-PCR kit	Qiagen
Sterilfilter Minisart NML	Sartorius
Zellkulturmedien	Invitrogen
Zellkulturschalen	Nunc

### 2.1.3 Computerprogramme

Amira 3.0  
DNA Star/ Primer select  
Sequencher  
Editseq  
Opticon Monitor 2  
MetaMorph

### 2.1.4 Chemikalien

Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat)	Boehringer

## 2. Material und Methoden

Big Dye	PE Applied Biosystems
Chicken Embryo Extrakt	ICN
Chick Serum (CS)	Gibco
DAB (Diaminobenzidine)	Sigma
Dextran- Blau	Fluka
Digoxigenin-11-UTP	Boehringer
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	Gibco
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
EDTA (Ethylenediaminetetraaceticacid)	Roth
Entellan	Sigma
Essigsäure	J. T. Baker
Ethanol	Fluka
Eth D1 (Ethidiumhomodimer-D1)	Molecular Probes
Formamid	Merck
FCS (fötales Kälberserum)	PAA
Glukose	Roth
Glutamin	PAA
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Serva
Guanidinium thiocyanat	Fluka
Haemotoxilin	Sigma
HBSS (Hank´s Balanced Salt Solution)	Gibco
Hefe-tRNA	Roche
Heparin	Sigma
HEPES	Roth
Isopropanol	Roth
Levamisol	Sigma
M199	Gibco
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka

## 2. Material und Methoden

Methanol	Merck
Moviol 4-88	Calbiochem
NBT (Nitro blue tetrazolium chlorid)	Boehringer
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdesoxycholat	Sigma
Nuclear Fast Red	Vector Laboratories
OCT- Gefriermedium	Polysciences
Paraformaldehyd	Merck
PEG-6000 (Polyethylenglykol)	Merck
Penicillin	PAA
Phenolrot	Sigma
Ribonukleotide	Boehringer
Salzsäure	Riedel-de Haen
Schwarze Tinte	Pelikan
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Roth
SSC	Roth
Streptomycin	PAA
TEMED (N´N´N´N´-Tetramethylethyldiamin)	Serva
TritonX-100	BIO RAD
Tris	Biomol
Tween-20	Fluka
Tyrode`s saline	Gibco
Wasserstoffperoxid	Merck

### 2.1.5 Wachstumsfaktoren und Antikörper

Rekombinantes BMP2	R+D Systems
Rekombinantes Noggin	R+D Systems
Rekombinantes FGF8	R+D Systems
anti-Digoxigenin-AK Fab-Fragmente	Boehringer
Maus-RALDH2-AK	freundliche Gabe von Peter McCaffrey

## 2. Material und Methoden

Kaninchen-WT1-AK	Santa Cruz
QCPN-AK (Mediumüberstand)	
Mouse-anti-VMHC	Developmental Studies MF20 Hybridoma Bank, University of Iowa, Departement of Biological Science, Iowa City, Iowa
Mouse-anti-BrdU	Roche
anti-FITC-AP	Roche
anti-DIG-POD	Roche
anti-FITC-POD	Roche
anti-Maus HRP	Dianova
anti-Kaninchen HRP	Dianova
Anti-mouse-Alexa555	Molecular Probes
Anti-mouse-Fab-FITC	Dianova
Anti-rabbit-FITC	Dianova
Anti-mouse-FITC	Dianova
Tyramid Signal Amplifikation Kit (TSA <sup>TM</sup> Plus Fluorescence Systems)	PerkinElmer <sup>TM</sup>

### 2.1.6 Enzyme

AMV-Reverse Transkriptase	Promega
RQ1 DNase	Promega
Hot star Taq-Polymerase	Biozym
Proteinase K	Boehringer
Restriktionsendonukleasen	New England's Biolabs
RNase A	Boehringer
RNasin RNase-Inhibitor	Promega
Takara Taq-Polymerase	Biowhittaker
T3/T7/ -RNA-Polymerasen	Promega
Trypsin	PAA

## 2. Material und Methoden

### 2.1.7 Pharmakologische Reagenzien

Omeprazole	Sigma
Serotonin-Rezeptor-Inhibitor	Sigma
Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK)	Sigma

### 2.1.8 Bakterienstämme und Vektoren

<i>E. coli xll blue</i>	rec A1, end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17, sup E44, rel A1, lac[F <sup>+</sup> proAB, lacqZ M13, Tn10(tet <sup>r</sup> ); Cat. No. 200268, Stratagene
ChEST-Klone (Chicken EST-Klone)	MRC geneservice, RZPD
RCAS/ FGFR1, 2	Freundliche Gabe von Dr. Annette Neubüser
RCAS-BP(A)/ FGFR4	Freundliche Gabe von Dr. Marianne Bronner Fraser (Marcelle et al., 2002)
pCAGGS-GFP	Freundliche Gabe von Dr. Dr. C. Redies mit Genehmigung von Dr. Hidesato Ogawa
RCAS-BP(A)/ Alkalische Phosphatase	Freundliche Gabe von Dr. Constance Cepko (Fekete und Cepko, 1993)
RCAS-BP(A)/ Pitx2a	Freundliche Gabe von Dr. Yiping Chen (Yu et al., 2001)
RCAS-BP(A)/ SHH	Freundliche Gabe von Dr. Cliff Tabin (Levin et al, 1995)

### 2.1.9 DNA-Marker

Alle verwendeten Marker	MBI Fermentas
-------------------------	---------------

## 2. Material und Methoden

### 2.1.10 Hühnerembryonen

Die befruchteten Bruteier wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld), befruchtete Bruteier von der Firma Lohmann (Cuxhaven) bezogen. Befruchtete Wachteleier wurden von der Firma Finkle bezogen (Aletshausen).

### 2.1.11 Primer

Die Primer, für die Real-time-PCR und die Endpunkt-PCR zur Detektion proepikardialer Markergene, wurden als synthetische Oligonukleotide von der Firma Roth bestellt.

Gen	Primerpaarsequenz	Fragmentgröße	Anlagerungs- temperatur	Zyklenzahl
<i>TBX18</i>	5'-CATATGTGCAGACACT-3' 5'-TGCATAGTCCCTGT-3'	227 bp	48°C	40
<i>Wt1</i>	5'-AGCCAGCAAGCCATTCGCAACC-3' 5'-TTCTCATTTTCATATCCTGTCC-3'	355 bp	58°C	45
<i>Nkx2.5</i>	5'-GGATCCCTCCTCGTTGCTCTCG-3' 5'-TGGGAAGATCTGCAAGAGGTGG-3'	102 bp	58°C	45
<i>CFC</i>	5'-CTCAAGCTTCCCGAAGGAATA-3' 5'-GTTCAAGCTTCACAAGTCC-3'	635 bp	53°C	29
<i>AMHC1</i>	5'-GCGGGTCCAGCTTCTCCACTCC-3' 5'-CCTTGACACGCCGCTCTGACTT-3'	412 bp	59°C	38
<i>Popdc2</i>	5'-CTGAGGAAGGACCGCTACATT-3' 5'-CAGCCTGCTGTTCCCTAGAGC-3'	570bp	55°C	45
<i>VMHC1</i>	5'-GCTACAAACACCAAGCAG-3' 5'-TCTTATATCTGGGAGCCAGG-3'	211 bp	60°C	40
<i>dHAND</i>	5'-CGGGGCTCAGGGTTCAGTTC-3' 5'-TGCCACCAGGAGCGGTTAT-3'	521bp	70°C	40
<i>BMP4</i>	5'-TAACCGAATGCTGATGGTCA-3' 5'-GCTGAGGTTGAAGACGAAGC-3'	420bp	60°C	40
<i>GAPDH</i>	5'-ACGCCATCACTATCTCCAG-3' 5'-CAGGCCTTCACTACCCTCTTG-3'	578 bp	52°C	28

## 2. Material und Methoden

Zur Sequenzierung wurden folgende Primer verwendet:

T7            5`- GTAATACGACTCACTATAGGGC-3`

T3            5`- AATTAACCCTCACTAAAGGG-3`

### 2.1.12 Proben für „whole-mount“ *in situ* Hybridisierung

Für die Synthese von „antisense RNA“ wurden folgende Konstrukte, welche in pKS (-) kloniert sind, eingesetzt:

Gen	Probe	Linearisierung	RNA-Polymerase
<i>WT1</i>	1300 bp, freundliche Gabe von Dr. Toshiyuki Kudo, Itoham Foods Inc., Ibaraki, Japan	XbaI	T7
<i>TBX18</i>	1000bp Est cDNA-Klon	NotI	T3
<i>CFC</i>	1000 bp, HindIII-SalI Fragment	SalI	T7
<i>BMP2</i>	460bp fragment (Andree et al., 1998)	EcoRI	T3
<i>BMP4</i>	766bp EstcDNA-Klon	EcoRI	T7
<i>Pitx2</i>	1000bp (St Amand et al., 1998)	EcoRI	T7
<i>Nodal</i>	500bp (Levin et al., 1995)	EcoRI	T3
<i>XTbx18</i>	1500bp, EST cDNA-Klon	SmaI	T7

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA-analytische Methoden

LB-Medium:                    10 g NaCl; 10 g Tryptone; 5 g Yeast-Extract; add. 1000 mL mit bidest. H<sub>2</sub>O; (Ampicillin)

LB-Platten:                    10 g NaCl; 10 g Tryptone; 5 g Yeast- Extract; 15 g Agar-Agar; add. 1000 mL mit bidest. H<sub>2</sub>O; (Ampicillin)

## 2. Material und Methoden

### 2.2.2 Mini-Präparation

GET-Lösung:	50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 4 mg/mL Lysozym; 10 µg/ mL RNase
Lysis-Puffer:	0,2 M NaOH; 1 % SDS
Hochsalz-Lösung:	60 mL 5 M Kaliumacetat; 11,5 mL Eisessig; 28,5 mL bidest. H <sub>2</sub> O

Die Mini-Präparation erfolgt nach der Alkalischen Lysis Methode von Birnboim und Doly, modifiziert von D. Ish-Horowicz.

Hierzu werden 3 mL Antibiotika enthaltendes LB-Medium mit der Bakterienkultur angeimpft und für 12- 20 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Von der Suspension werden nacheinander 1,5 mL in ein Eppendorfgefäß überführt und die Bakterien durch kurze Zentrifugation (1 Minute) bei geringer Geschwindigkeit (max. 5000x g) pelletiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wird in 150 µL GET-Lösung durch Schütteln resuspendiert und für 5 Minuten inkubiert. Zur Lyse der Zellen werden 300 µL Lysis-Puffer dazugegeben, 3x invertiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgt, durch Zugabe von 225 µL Hochsalz-Lösung, ausgiebiges Schütteln (10 Sekunden) und Inkubation für 5 Minuten auf Eis, die Fällung der Proteine und genomischer DNA. Die Suspension wird für 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und dies, nach Transfer des Überstandes, so lange wiederholt, bis kein Pellet mehr sichtbar ist. Aus dem nun klaren Überstand, wird mit 2 Volumen Isopropanol die Plasmid-DNA gefällt, das Pellet 2x mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 25 µL H<sub>2</sub>O mit 2,5 µg RNase A gelöst. Die Plasmid-DNA wird bei -20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

### 2.2.3 Restriktionsverdau

Die Restriktionen werden in einem Volumen von 20 µl angesetzt. Verwendung fanden die von New England Biolabs mitgelieferten Puffer.

## 2. Material und Methoden

### **Reaktionansatz:**

5  $\mu\text{L}$  DNA (5 $\mu\text{g}$ )

2  $\mu\text{L}$  10x Puffer (1,2,3, 4 oder spezieller Puffer für ein bestimmtes Enzym)

2  $\mu\text{L}$  10x BSA (wenn für das verwendete Enzym notwendig)

2  $\mu\text{L}$  Enzym

add. 10  $\mu\text{L}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$

Die Reaktion wird für 1-4 Stunden bei 37 °C durchgeführt und das Produkt zur Überprüfung oder Klonierung mit einem 1-2% (je nach Fragmentgröße) Agarosegel aufgetrennt.

### **2.2.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt mit dem QIAEX II Gel Extraktionskit von Qiagen. Die zu isolierende DNA-Bande wird unter UV-Licht ausgeschnitten und abgewogen. Zu einem Volumen Gel werden drei Volumen QX1-Puffer und 10  $\mu\text{L}$  der Silikalperlensuspension hinzugefügt. Das Gemisch wird, zum Lösen des Gels und der Bindung der DNA an die Perlen, für 10 Minuten bei 50 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Perlen für 30 Sekunden und maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Perlen einmal mit 500  $\mu\text{L}$  QX1-Puffer und zweimal mit 500  $\mu\text{L}$  PE-Puffer gewaschen und luftgetrocknet. Zur Elution der DNA, werden nun die Perlen für 5 Minuten bei 50 °C mit 20  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  inkubiert und der Überstand nach kurzer Zentrifugation in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

### **2.2.5 Transformation**

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli* Bakterien, werden 5  $\mu\text{L}$  (5  $\mu\text{g}$ ) des Ansatzes zu 100  $\mu\text{L}$  kompetenter *E. coli xll* blue gegeben. Das Gemisch wird anschließend mit der Pipette vorsichtig durchmischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wird mit dem Ansatz bei 42 °C für 1 Minute einen Hitzeschock durchgeführt und anschließend auf Eis überführt. Um die Bakterien jetzt zur Vermehrung zu bringen, werden 150  $\mu\text{L}$  LB Medium dazugegeben und der Ansatz für 1 Stunde unter möglichst leichtem Schütteln bei 37 °C

## 2. Material und Methoden

inkubiert. Während dessen werden Ampicillin-Agarplatten im Brutschrank vorgewärmt. Der Ansatz wird nun mit einem Drigalskispatel ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert

### 2.2.6 Herstellung von Glycerin-Stocks

650 µL der Bakterienkultur werden mit 350 µL 80 % igem Glycerin versetzt, durch Schütteln gemischt und bei –80 °C eingefroren.

### 2.2.7 RNA-Isolierung

Lösung D:

- 4 M Guanidinium Isothiocyanat
- 25 mM Na-Citrat pH7.2
- 0,5 % Sacrosyl
- 0,1 M 2-Mercaptoethanol

Die Total-RNA wurde aus Geweben gemäß der Guanidinium-Isothiocyanat Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) isoliert.

Die in sterilem 1x PBS präparierten Gewebe, werden direkt im Anschluss bei – 80°C zur Lagerung eingefroren. Zur RNA-Isolierung werden die Explantate direkt in 200 µL Lösung D aufgetaut und durch Auf- und Abpipettieren solubilisiert. Hinzu gibt man 20 µL 2M Na Acetat, pH 4, 200 µL Phenol und 40 µL Chlorophorm/Isoamylalkohol (94/1) und schüttelt nach jeder Zugabe für 10 Sekunden. Das Gemisch wird für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 4°C und 15000x g zentrifugiert. Die wässrige Phase im Überstand, welche die RNA enthält, wird vorsichtig mit der Pipette abgezogen und durch Zugabe von 1 µL Glykogen (35 mg/mL) und 500 µL Ethanol gefällt. Das RNA-Pellet wird 2x mit 70 % igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 40 µL H<sub>2</sub>O gelöst. Um DANN-Reste aus der Lösung zu entfernen, wird diese nach Zugabe von 10 µL 5x Transkriptionspuffer, 2 µL RQ1 DNase und 1 µL RNasin für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Eine erneute Extraktion mit einem Volumen Chloroform folgt. Die RNA im wässrigen Überstand wird mit 10 µL 2M Na Acetat, pH 4,5 und 150 µL Ethanol über Nacht gefällt, das Pellet wieder 2x mit 80 % igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10µl Wasser aufgenommen. Die RNA-Lösung wird bis zum Gebrauch bei – 80°C aufbewahrt.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.8 cDNA-Synthese

Da nur geringe embryonale Gewebemengen isoliert wurden, sind mehrere Explantate vereinigt worden, um aus deren RNA eine cDNA zu synthetisieren.

#### **Ansatz zur Anlagerung des Oligo-dT-Primers:**

9  $\mu\text{L}$  der Total-RNA-Präparation

1  $\mu\text{L}$  oligo (dT)<sub>15</sub>-Primer (0,5  $\mu\text{g}$ )

Nach gutem Mischen, wird der Ansatz für 3 Minuten auf 65 °C erhitzt und direkt im Anschluss auf Eis abgekühlt.

#### **cDNA Synthese Reaktionsansatz:**

10  $\mu\text{L}$  des Anlagerungsansatzes

5  $\mu\text{L}$  5xAMV-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 42°C; 250 mM KCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5 mM Spermidin)

2,5  $\mu\text{L}$  DTT (100 mM), 2,5  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM)

0,7  $\mu\text{L}$  RNAsin RNase-Inhibitor (40 U/ $\mu\text{L}$ )

0,7  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O

0,7  $\mu\text{L}$  *Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase* (AMV-RT, 23 U/ $\mu\text{L}$ )

Der Reaktionsansatz wird für 60 Minuten bei 42°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch 2 min Inkubation bei 100°C abgestoppt. Die cDNA Lösung wurde bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.9 Primerentwurf

Zum Entwurf der Primer für die Amplifikation proepikardialer, myokardialer und perikardialer Markergene, wurden die cDNA-Sequenzen aus der Hühnchen Datenbank „BBSRC Chicken EST Project“ ([www.chick.umist.ac.uk/](http://www.chick.umist.ac.uk/)) oder dem „NCBI Nukleotide search“ ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) herausgesucht und mit Hilfe des Programms „Primerselect“ von DNASTAR nach geeigneten Primern gesucht.

### 2.2.10 Endpunkt-PCR

Für den Ansatz der PCR-Reaktion wurde für die Enzyme und Puffer ein „Mastermix“ für alle Ansätze erstellt und die cDNA zu dem vorgelegten Mix gegeben. Die Konzentration der verschiedenen cDNA's wird oftmals variiert, um die Banden relativ vergleichen zu können.

#### **PCR- Ansatz**

x  $\mu$ L cDNA

25 pmol Oligonukleotid for

25 pmol Oligonukleotid rev

1,5  $\mu$ L dNTPs

1,2  $\mu$ L 10x Puffer

0,2  $\mu$ L rTaq- Polymerase

add. 20  $\mu$ L mit bidest. H<sub>2</sub>O

## 2. Material und Methoden

### PCR- Programm

95 °C	5 Minuten	} Anzahl der Zyklen
95 °C	1 Minute	
Anlagerungstemperatur ( siehe Tabelle 1)	1 Minute	
72 °C	1 Minute pro kb des Fragments	
72 °C	5 Minuten	
4 °C	Pause	

Die Ansätze werden nach der Reaktion, zur Analyse der amplifizierten Produkte, in einem 1 % igen Agarosegel aufgetrennt und photographiert.

### 2.2.11 Sequenzierung

Die Sequenzierreaktion wird mit dem ABI Prism TM 310 Analyzer (Perkin Elmer) durchgeführt. Die für die PCR verwendete DNA wurde mit einer Minipräparation (alkalische Lyse) hergestellt. Hierbei wird nach der Proteinfällung mehrmals zentrifugiert und die DNA mehrmals gewaschen.

### Reaktionsansatz

2 µL Premix (Big Dye)

1 µL Plasmid- DNA

1 µL Oligonukleotid (10 pmol/ µL)

6 µL H<sub>2</sub>O

## 2. Material und Methoden

### PCR- Programm

96 °C	30 Sekunden	} 25x
50 °C	15 Sekunden	
60 °C	4 Minuten	
4 °C	Pause	

Das PCR Produkt wird anschließend mit 90 µL H<sub>2</sub>O, 10 µL 3M Natriumacetat pH 4,6 und 250 µL 100 % igem Ethanol gefällt und das Pellet 3x mit 70 % igem Ethanol gewaschen. Um das Pellet besser sehen zu können, wird dem Ansatz 1 µL Dextran-Blau (20 mg/ mL) zugefügt. Das Pellet wird anschließend, durch 2 Minuten Zentrifugation in der Speedvac getrocknet und mit 12,5 µL TSR Puffer (Template Suppression Reagent) versetzt. Um die DNA besser zu lösen, wird das Gemisch für ca. 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die DNA für 2 Minuten bei 90°C denaturiert und der Ansatz bis zur Sequenzierung bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.2.12 Echtzeit-PCR (Real time PCR)

Mit Hilfe von Real Time-PCR-Maschinen kann die Expression von proepikardialen sowie myokardialen Markergenen relativ quantifiziert werden. Jeweils drei bis sechs cDNA´s aus Proepikard, Perikard und Atrium werden miteinander verglichen. Verwendung findet hierbei das „SYBR Green Real time PCR Kit“ von Qiagen. Der Detektion des Amplifikates dient der Fluoreszenzfarbstoff „SYBR Green“, denn er lagert sich in doppelsträngige DNA ein. Die Reaktion ist durch die verwendete „Hot Star Taq Polymerase“ sehr spezifisch, da sie ohne einen 15-minütigen Hitzeschritt nicht startet.

Die Auswertung erfolgt unter Einbeziehung der Effizienz des jeweiligen PCR-Laufes, welches die Erstellung einer Standardreihe voraussetzt, mit Hilfe folgender Formel:

$$r = \frac{E_{Tbx18}^{cT(Peri)-cT(PrES)}}{E_{GAPDH}^{cT(Peri)-cT(PrES)}}$$

## 2. Material und Methoden

Die Ratio  $r$  wird gebildet aus dem Quotienten der Effizienzen  $E$ . Durch das ubiquitär exprimierte Gen *GAPDH* (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) wird der Lauf normalisiert. Das gewährleistet die relative Quantifizierung, da jeder gemessene Wert seinen entsprechenden Abgleich erfährt. Die CT-Werte sind die Zyklenzahlen, bei denen das gemessene Fluoreszenzsignal gerade höher als das Hintergrundsignal ist. Wenn man den Ablauf der Amplifikation betrachtet, also der Punkt an dem die exponentielle Phase der Amplifikation in die lineare übergeht.

Um die Daten zu verifizieren werden mindestens 3-6 Messungen pro cDNA durchgeführt, wobei auffällig abweichende Werte nicht berücksichtigt wurden. Die anderen Werte werden mit Hilfe einer Schmelzpunktanalyse überprüft. Reaktionsansätze mit mehr als einem Schmelzpunkt, also mehr als einem spezifischen Amplifikat, werden ebenfalls nicht berücksichtigt.

### **Reaktionsansatz:**

25  $\mu$ l SYBR Green Mastermix

0,3  $\mu$ M Primer forward

0,3 $\mu$ M Primer reverse

23  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

1  $\mu$ l cDNA

### **PCR-Programm:**

15 min 95°C Aktivierung der HotStar Taq-Polymerase

15 s 94°C Denaturierung

30s 50-60°C Anlagerung

30s 72°C Extension

Zyklenzahl: 35-45

## 2. Material und Methoden

### 2.2.13 Kultivierung tierischer Zellen

#### 2.2.13.1 Explantatkulturen

Proepikardiale Organe werden zunächst in 4-well Zellkulturschalen mit serumfreiem Medium M199 kultiviert. Nach 12- 16 Stunden erfolgt die Zugabe von 2µg/ml BMP2 oder FGF2 beziehungsweise 50µg/ml Noggin. Nach maximal 3 Tagen wurde die RNA isoliert (3.2.7) und eine cDNA synthetisiert (3.2.8).

#### 2.2.13.2 Kultivierung und Konditionierung proepikardialer Primärkulturen

Die Proepikardien werden in PBS steril explantiert und in M199 kultiviert. Nach 12-16 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden 500µl Medium zugesetzt. Das Medium wird wahlweise mit 2µg/ml BMP2 oder FGF2 oder 50µg/ml Noggin zu diesem Zeitpunkt konditioniert. Danach setzt man die Inkubation für weitere 48 Stunden fort. Es folgen die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese, um die Genexpression mit Hilfe der Real time-PCR (3.2.12) relativ zu quantifizieren.

Alternativ werden Proepikardien auf Fibronectin-beschichteten Kammerobjektträgern kultiviert, um die Dokumentation folgender Antikörpernachweise zu ermöglichen. Die Kultivierung und Konditionierung erfolgt wie beschrieben.

#### 2.2.13.3 Kultivierung von überexprimierenden und Kontrollzelllinien

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien DF1(Fibroblastenzelllinie), Q2bn (hBMP2/AS-BMP2) und QCPN (Anti-Wachtel-AK) erfolgt mit folgendem Medium:

45% DMEM, 45% HAM's F12, 2% Hühnerserum, 8% fötales Kälberserum (FCS), 800µg/ml G418, 100U/ml Penicillin – 100mg/ml Streptomycin, 20mM Glutamin

## 2. Material und Methoden

Zellen werden in flüssigem Stickstoff über längere Zeit gelagert. Dazu werden konfluente 10 cm Kulturschalen trypsinisiert, die Zellen bei 1000U/min zentrifugiert und in Einfriermedium (DMEM, 10% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und aliquotiert.

### **2.2.13.4 Infektion von Fibroblasten mit RCAS-Konstrukten**

Um embryonale Fibroblasten mit viralen RCAS-Konstrukten zu infizieren, muss zunächst eine Transfektion mit Lipofektamine erfolgen, bei der in 90% konfluenten 35mm Kulturschalen das entsprechende Konstrukt zusammen mit Lipofektamine inkubiert wird. Nach mehreren Passagen wird eine Kontrollfärbung (siehe ISH) mit den Zellen durchgeführt, welche mit einem RCAS-AP-Konstrukt transfiziert wurden, um auf die Infektionseffizienz rückzuschliessen.

### **2.2.13.5 Aggregation von Zellen für die Implantation**

Zum Zwecke der Implantation in den Embryo werden Zellen abtrypsinisiert und auf Bakterienkulturschalen ausgesät. Hierbei sollen die Zellen nicht adhären, sondern Zellaggregate bilden, welche nach ein bis zwei Tagen eine ausreichende Grösse erreicht haben sollten.

### **2.2.14 Manipulation am Hühnerembryo**

Die befruchteten Brut-Eier werden mit 70 % igem Ethanol abgetupft und für die gewünschte Dauer, im Brutschrank bebrütet. Nach entsprechender Manipulation werden die Embryonen bis zum gewünschten Stadium weiter bebrütet. Die im Anschluss präparierten Embryonen werden in 4 % Paraformaldehyd in 1x PBS bei 4 °C fixiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.14.1 Präparationen von Hühnerembryonen und dem proepikardialen Organ

4 % Paraformaldehyd:	4 g Paraformaldehyd in 50 mL sterilem H <sub>2</sub> O unter Erwärmen lösen; 2 Tropfen 2 M NaOH; 10 mL 10x PBS; add. 100 mL mit bidest. H <sub>2</sub> O
10x PBS:	80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; add. 1000 mL mit bidest. H <sub>2</sub> O
1x PBS:	100 mL 1x PBS; 900 mL bidest. H <sub>2</sub> O

Das Proepikard wird mit einem Mikroskalpell explantiert. Dabei ist jegliche Kontamination durch Sinusmyokard zu vermeiden. Von den isolierten proepikardialen Organen werden entweder 3 bis 8 Stück zur RNA-Isolierung vereinigt (3.2.7) oder sie werden vorbereitet für die Kultivierung.

### 2.2.14.2 Kultivierung von Embryonen

Die Kultur von Embryonen erfolgt nach dem Protokoll von S.Chapman (Chapman et al., 2001, Improved Method for chick Whole-Embryo Culture using a Filter Paper Carrier, Dev Dyn. 220:284-289). Hierbei wird mit Hilfe eines Filterpapierringes, der auf den Embryo aufgelegt wird, versucht, die Oberflächenspannung der Vitellinmembran zu erhalten. Nach dem Ausschneiden des Embryos kann dieser nun dorsal oder ventral auf eine Albumin-Agar-Platte aufgebracht werden, die das Nährsubstrat für einige Tage darstellt.

Albumin-Agar (80 Platten):	120 ml Albumin, 120ml Saline ( 7,19g NaCl/1l H <sub>2</sub> O) 100U/ml Penicillin – 100mg/ml Streptomycin
----------------------------	--

### 2.2.14.3 Implantation von Depotperlen

Heparin-beschichtete Depotperlen (Sigma) werden als Trägermaterial für wasserlösliche Proteine wie hBMP2 oder Noggin (R+DSYSTEMS) eingesetzt. Die Perlen werden zunächst

## 2. Material und Methoden

einige Male in PBS gewaschen und anschliessend mit NODAL-Protein in der Konzentration  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  oder FGF8-Protein ( $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) eine Stunde lang inkubiert, bevor man sie in den Embryo mit Hilfe einer scharfen Wolframnadel implantiert.

### 2.2.14.4 Antisense-Oligonukleotid-Behandlung

Die Behandlung mit CFC-Antisense-Oligonukleotiden erfolgt in der Embryokultur. Um eine lokale Applikation auf der flachen Huhn-Gastrula zu erzielen, werden die Oligos in Pluronic Gel (Sigma) gelöst, welches die Eigenschaft besitzt, in kaltem Zustand flüssig zu sein und in warmem Zustand zu gelieren. Auf diese Weise kann man den Hensenschen Knoten gezielt für einige Stunden dem Einfluss der Oligonukleotide aussetzen und so den Verlust von CFC in der Knotenregion analysieren.

### 2.2.14.5 Elektroporation *in ovo* und *ex ovo*

Mit Hilfe der Elektroporation (Tss20 Ovodyne Elektroporator) können RCAS-Konstrukte in verschiedene Regionen eines Embryos transfiziert werden. Hierzu wird die DNA-Lösung in die betreffende Region mikroinjiziert (Mikrinjektor IM300 Narishige). Um diesen Vorgang besser beurteilen zu können, wird die DNA in einer Fast Green Lösung verdünnt. Es werden optimalerweise  $2-4\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA benötigt. Danach hängt die erfolgreiche Transfektion vom Einsatz der beiden Elektroden ab, welche drei bis vier definierte Pulse von 10-30 V an den Embryo anlegen. Hierbei ist der Abstand der Elektroden und das Alter des Embryos entscheidend für den Widerstand und somit die Stromstärke. Die Elektroporation kann *in ovo* oder auch in Kultur erfolgen, wobei für die Manipulation *in ovo*, das Ei zunächst fenestriert werden muss. Im Allgemeinen ist die Kultur insbesondere für jüngere Stadien (HH3-7) aufgrund der besseren Sichtbarkeit zu empfehlen.

## 2. Material und Methoden

Volt:	10-30V	Färbelösung: 0,1% Fast Green (Sigma)
Pulse Länge:	20-50ms	1% Methylcellulose (Sigma)
Pulse Intervall:	200-500ms	

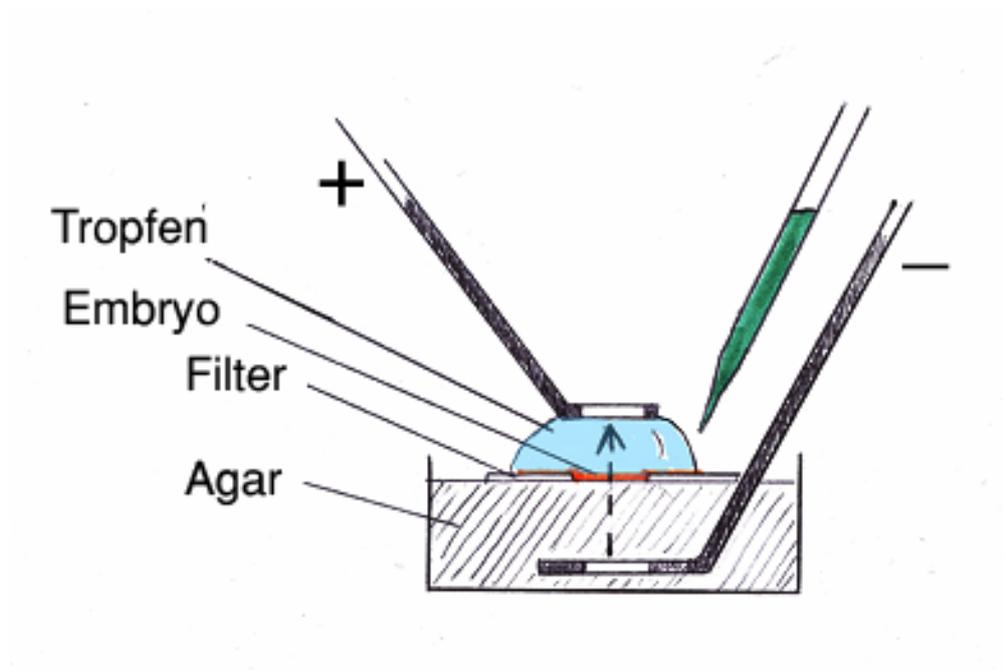


Abb.8 : Aufbau der Elektroden zur *ex ovo* Elektroporation

### 2.2.14.6 Applikation von pharmakologischen Reagenzien

Eine Methode um Embryonen sehr früh zu manipulieren, ohne sie durch mechanische Eingriffe zu belasten besteht darin, das Nährsubstrat, mit Reagenzien zu versetzen um deren Effekt zu studieren. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die entsprechend Droge auf den kultivierten Embryo zu tropfen. Der Protonenpumpen-Inhibitor Omeprazole sowie der Serotoninrezeptor-Inhibitor GR381108 können in dem Substrat der Embryokultur, also dem Albumin entsprechend verdünnt werden und der Embryo wird, wie bereits beschrieben, kultiviert. Für die Omeprazole-Kulturen werden 10mg Omeprazole in 6ml 0,1x MMR gelöst und dann in 54 ml Albumin verdünnt. Dies entspricht einer Konzentration von

## 2. Material und Methoden

50 $\mu$ M. Der Serotoninrezeptor-Inhibitor wird in einer Konzentration von 2mM mit einer globalen Injektion in das unbebrütete Ei eingebracht. Der Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (Sigma) wird in einer Konzentration von 10 $\mu$ M auf den Embryo nach 12-14 Stunden Bebrütung getropft beziehungsweise *in ovo* durch eine fenestrierte Eischale in einem Volumen von 1-4 $\mu$ l unter die Vitellinmembran injiziert.

1x MMR (Marc's modified Ringer solution)                      1M NaCL, 20mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>  
20mM CaCL<sub>2</sub>, 50mm HEPES    pH 7,5

### 2.2.14.7 Dissektion der Darmforte

Mit Hilfe einer im Bunsenbrenner geschärften Wolframnadel kann die Darmforte eines Hühnerembryos im Stadium HH 7-8 vertikal durchtrennt werden. Dieser Eingriff verhindert die ventrale Fusion des Darmrohres und verursacht eine sogenannte *cardia bifida*. *In ovo* muss der Schnitt von dorsal gesetzt werden, deshalb bietet sich auch hier die Kultivierung des Embryos an. Der Embryo entwickelt sich ansonsten weitgehend normal und kann ohne weiteres bis zum Stadium 25 bebrütet werden.

### 2.2.14.8 Herstellung von Wachtel-Huhn Chimären

Die Herstellung eines chimären Organismus kann zur Schicksalanalyse von Zellen und ganzen Zellverbänden verwendet werden. Um das Schicksal mesodermaler Vorläuferzellen zu untersuchen wird im Stadium HH4 ein laterales mesendodermales Transplantat aus einem kultivierten Wachtelembryo ausgeschnitten und in einen Hühnerembryo gleichen Alters eingesetzt. Dabei muss auf die korrekte Orientierung des Transplantats geachtet werden. Verläuft dieser Eingriff erfolgreich, so nimmt das Wachtelgewebe an der Entwicklung teil und es entsteht eine Chimäre. Mit entsprechenden Wachtel-spezifischen Antikörpern kann man nun die transplantierten Zellen aufspüren und eine Zellschicksalsstudie durchführen

### 2.2.15 „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung (ISH)

Die hier verwendete Methode basiert auf: D. G. Wilkinson (1992). Whole Mount *in situ* hybridisation. In: *In situ* hybridisation: A practical approach. IRL Press, Oxford.

#### 2.2.15.1 RNA-Probensynthese

Dig-Mix :	250 nM Digoxigenin UTP; 200 nM UTP; je 450 nM CTP, ATP und GTP
FITC-Mix:	250 nM FITC UTP; 200 nM UTP; je 450 nM CTP, ATP und GTP
1x TE Puffer:	10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA

Die für Synthese eingesetzte Plasmid-DNA, wird über QUIAGEN-Säulen aufgereinigt. Welches Restriktionsenzym und welche RNA Polymerase für die Synthese der „antisense RNA“ eingesetzt wurde, ist in Tabelle 1 aufgeführt.

#### Reaktionsansatz

- 4 µL 5x Transkriptionspuffer
- 2 µL 0,1 M DTT (in 10 mM NaAc(pH 5.2))
- 2 µL Nukleotid- Mix (Dig-Mix)
- 1 µL linearisiertes Plasmid (1 µg/ µL)
- 0,7 µL RNasin (40 U/ µL)
- 1 µL T3/T7 -RNA-Polymerase

Der Ansatz wird für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wird zum Verdau der Plasmid-DNA 2 µL DNase (1 U/ µL) zugegeben und für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die synthetisierte RNA wird mit 100 µL 1x TE, 10 µL LiCl und 300 µL Ethanol für mindestens 30 Minuten bei -20 °C gefällt, das Pellet mit 70 % igem Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und in 80 µL TE-Puffer aufgenommen. Zur Analyse der Synthese und Aufreinigung wird nach der RNA Synthese, dem DNase- Verdau und der Fällung je 1 µL des Gemisches aufbewahrt und mit einem 1% igem Agarosegel aufgetrennt. Die RNA wird bis zum Einsatz bei -20°C aufbewahrt.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.15.2 Vorbehandlung

PBT: 1x PBS; 0,1 % Tween-20

Alle Waschschrirte erfolgen, falls nicht anders angegeben, für 5 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Embryonen werden zur Entwässerung in einer aufsteigenden Methanolreihe ( 25 %, 50 %, 75 % MeOH/PBT) gewaschen und können hier in 100 % Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Zur Weiterbearbeitung folgt eine umgekehrte Methanolreihe und ein zweifacher Waschschrirte in PBT. Nun werden die Embryonen mit 6 % Wasserstoffperoxid in PBT für 1 Stunde gebleicht. Während dieser Zeit werden mit einer feinen Insektennadel Löscher in die geschlossenen Hohlräume der Embryonen gestochen um unspezifische Färbungen zu verhindern, da nichtgebundene RNA und Antikörper besser abgewaschen werden können. Es folgen drei Waschschrirte mit PBT. Im nächsten Schrirte werden die Embryonen mit 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Proteinase K in PBT behandelt. Die Inkubationsdauer ist altersabhängig und erfolgt für die HH Stadien 11–13 3 Minuten, HH Stadien 14-18 7 Minuten, HH Stadien 19-22 10 Minuten und HH Stadien 23 und älter für 15 Minuten.

Zum Stoppen der Reaktion werden die Embryonen für 20 Minuten in 2  $\text{mg}/\text{mL}$  Glycin in PBT gewaschen. Es folgen drei Waschschrirte mit PBT und eine Refixierung für 20 Minuten in 0,2 % Glutaraldehyd/ 4 % Paraformaldehyd in PBT. Die Fixierlösung wird durch drei Waschschrirte in PBT entfernt.

### 2.2.15.3 Hybridisierung

Hybridisierungslösung: 50% Formid; 5x SSC, pH 4.5; 1 % SDS, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tRNA;  
50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Heparin

Zur Prähybridisierung werden die Embryonen für 3 Stunden bei  $70^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Nun wird die bereits vorgewärmte RNA-Probe hinzugefügt und für weitere 12-16 Stunden bei der Hybridisierungstemperatur von  $70^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Der Hybridisierungsmix kann anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und wiederverwendet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.15.4 Post-Hybridisierungsschritte

Lösung 1:	50% Formamid; 5x SSC, pH 4.5; 1% SDS
Lösung 2:	0,5 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0,1% Tween-20
Lösung 3:	50% Formamid; 2x SSC, pH 4.5
10x TBST:	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 25 mL 1 M Tris-HCl, pH 7.5; add. 100 mL bidest.H <sub>2</sub> O

Vor Gebrauch wird das 10x TBST auf die einfache Konzentration verdünnt, Tween-20 zu einer Konzentration von 1 % und Levamisol zu einer Konzentration von 2 mM zugesetzt.

Nach der Hybridisierung muss möglichst alle ungebundene RNA abgewaschen werden. Hierzu wird 2x 30 Minuten mit Lösung 1 bei 70°C, 10 Minuten mit Lösung 1 / Lösung 2 (1/1) bei 70°C und 2x 5 Minuten mit Lösung 2 bei Raumtemperatur gewaschen. Hierauf folgt eine 30 Minuten lange Inkubation mit 100 µg/mL RNase A in Lösung 2, um die gesamte einzelsträngige RNA zu verdauen. Es folgt ein Waschschritt mit Lösung 2 und mit Lösung 3. Danach 30 Minuten mit Lösung 3 bei 60 °C und noch 3 mal 5 Minuten mit 1x TBST.

### 2.2.15.5 Antikörperadsorption

Um unspezifische Antikörperbindungen zu verringern, werden die Embryonen für 1 Stunde mit 10 % hitzeinaktiviertem Schafserum geblockt. Die Anzahl der unspezifisch bindenden Antikörper wird durch folgende Prozedur weiter verringert. Es wird 22,5 mg Embryopuder mit 3,75 mL TBST für 30 Minuten bei 70 °C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. 37,5 µL Schafserum, welches vorher für 30 Minuten bei 70 °C hitzeinaktiviert wurde und 7,5 µL Anti-Digoxigenin-Antikörper, werden hinzugefügt und für mindestens 1 Stunde bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 4 °C, wird der Überstand mit 150 µL Schafserum versetzt und auf 15 mL mit 1x TBST aufgefüllt. Bei den Embryonen wird nun das 10 % ige Serum entfernt und mit dem so behandelten Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.15.6 Abwaschen des nicht gebundenen Antikörpers und Färbung

NTMT: 100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 9.5; 50 mM MgCl<sub>2</sub>;  
1 % Tween-20, 2 mM Levamisol

Färbelösung: 4,5 µL NBT, 3,5 µL BCIP (100 mg/mL bzw. 50 mg/mL in  
Dimethylformamid) in 1mL NTMT

Die Embryonen werden dreimal 5 Minuten mit TBST, viermal 1 Stunde mit TBST, einmal mit NTMT über Nacht bei 4°C und anschließend noch weitere dreimal für 5 Minuten mit NTMT gewaschen. Zur Färbung werden sie dann mit der Färbelösung im Dunkeln unter Schwenken bis zur gewünschten Farbintensität inkubiert. Dauert dies länger und die Färbelösung schlägt von gelb nach rosa um, wird sie ausgetauscht. Die gefärbten Embryonen werden anschließend bei 4°C mit 4 % Paraformaldehyd / PBT über Nacht fixiert und bis zum Photographieren bei 4°C in PBS aufbewahrt.

### 2.2.15.7 Inaktivierung des ersten Antikörpers und zweite Färbung

Falls mit zwei RNA-Sonden gleichzeitig hybridisiert wurde, besteht die Möglichkeit, mit einem zweiten Antikörperschritt eine Doppelfärbung zu realisieren. Hierfür muss der erste AP-gekoppelte Antikörper durch einen sauren Glycin-Puffer inaktiviert werden.

Glycin-Puffer: 100mMol pH 2,2

Nach der Inaktivierung folgen Waschschrte: 3 x 10 min PBT und 4 x 20 min TBST woraufhin ein zweites Mal mit 10% Schafserum geblockt wird und daraufhin im anti-FITC-AP-Antikörper über Nacht inkubiert wird. Der Antikörper wird gründlich abgewaschen und anschliessend wird in NTMT-Puffer diesmal mit Fast Red Tabletten als AP-Substrat gefärbt, welches einen roten Farbniederschlag ergibt.

### 2.2.15.8 Histologische Analysen der gefärbten Embryonen

Von den gefärbten Embryonen werden mit dem Cryostat 15-20 µm dicke Schnitte angefertigt. Hierzu werden die Embryonen über Nacht bei 50°C in 7,5 % Gelatine/ 15 % Saccharose in PBT inkubiert und anschließend in dieser Lösung mit Hilfe von Kunststoffformen in Blöcke eingebettet. Die Blöcke werden darauf ausgeschnitten und in, durch Trockeneis gekühltes, Isopentan eingefroren und bei -20°C gelagert. Die Schnitte werden mit beschichteten Objektträgern aufgenommen und dort in 7,5 % Gelatine/ 15% Saccharoselösung unter Deckgläsern eingedeckelt. Um Pilzkontaminationen und Austrocknen zu verhindern, werden die Deckglasränder mit Nagellack versiegelt. Alternativ erfolgt die Eindeckelung mit Entellan nach einer Nuclear Fast Red-Gegenfärbung. Da Entellan ein auf Xylol basierendes Harz ist, müssen die Schnitte eine aufsteigende Ethanolreihe durchlaufen, an deren Ende zwei Waschschrte mit Xylol stehen.

#### **Nuclear Fast Red-Färbung:**

Alle Schritte gelten, falls nicht anders angegeben für 5 min.

- Schnitte 2x in PBS waschen
- 20- 40s in filtrierter Nuclear Fast Red-Lösung
- 2x in PBS waschen
- 1x in 30% Ethanol
- 1x in 50% Ethanol
- 1x in 80% Ethanol
- 1x in 100% Ethanol
- 2x in Xylol
- Eindeckelung in Entellan

### **2.2.15.9 Photographische Dokumentation**

Ganze Embryonen werden unter dem Binokular (Leica WILD M10), Schnitte unter dem Mikroskop digital aufgenommen und mit „Adobe Photoshop“ bearbeitet.

### **2.2.16 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)**

Das hier verwendete Protokoll wurde adaptiert von Marcos Simeos Costa (persönliche Korrespondenz). Es entspricht in seinen Grundzügen dem bereits beschriebenen ISH-Protokoll. Jedoch wird hier nicht mit einem alkalische Phosphatase-Substrat gearbeitet, sondern mit Peroxidase-gekoppelten Anti-Dig, beziehungsweise Anti-FITC Antikörpern. Diese binden wiederum Cy3 oder Cy5-gekoppelte Tyramide äusserst effizient, für ein rotes oder grünes Fluoreszenzsignal. Als fluoreszierende Gegenfärbung kann eine 5-minütige DAPI-Färbung eingesetzt werden. Der Vorteil dieser Methode liegt in seiner Signalverstärkung und seiner höheren zellulären Auflösung. Die Auswertung erfolgt hierbei mit einem Stereomikroskop mit entsprechender UV-Lampe oder einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

### **2.2.17 „Whole mount“-Antikörpernachweis mittels gekoppelter Meerrettich-Peroxidase**

Im Gegensatz zur *in situ* Hybridisierung, bei der ein Transkript nachgewiesen wird, soll mit der Antikörperfärbung der Nachweis des entsprechenden Proteins erbracht werden.

#### **2.2.17.1 Vorbehandlung der Embryonen**

Die isolierten Embryonen werden zunächst 3x in PBS gewaschen und in Methanol/ DMSO in einem Verhältnis 4:1 über Nacht bei 4°C fixiert. Um die endogene Peroxidase zu blockieren

## 2. Material und Methoden

werden die Embryonen 2-3 Stunden bei Raumtemperatur in Methanol/ DMSO/ 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4:1:1 inkubiert. Es folgt das Blocken mit PBS/ 2% BSA/ 0,1% Triton für 2x 1 Stunde bei Raumtemperatur

### 2.2.17.2 Vorbehandlung des Antikörpers

0,05M Tris-HCl                      6,1g Tris, 850 ml H<sub>2</sub>O

Alle verwendeten Lösungen sofern sie nicht weiter deklariert werden, sind in vorherigen Methoden beschrieben.

Zu 0,5ml TBST werden 5 mg Embryopuder gegeben und für 30 Minuten auf 70°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis werden 5 µl BSA und 2,5 µl Antikörper für eine 1:200 Verdünnung dazugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 4°C wird das Embryopuder für 10 Minuten heruntergefugt und der Überstand in 10ml TBST verdünnt, was nun einer Verdünnung von 1:4000 (Anti-RALDH2) entspricht.

### 2.2.17.3 Antikörperadsorption und Färbung

DAB:                      Diaminobenzidin

Die Embryonen werden über Nacht im Primärantikörper inkubiert und anschließend 5x 1 Stunde mit TBST bei 4°C gewaschen. Dieselbe Inkubation erfahren die Embryonen mit dem Sekundärantikörper an welchen die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Dieser wird in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Auch hier muss 5x 1 Stunde mit TBST gewaschen werden. Es folgen 2x 5 Minuten waschen in Tris-HCl pH 7.6. Als Substrat wird parallel eine DAB-Tablette in 10 ml Tris-HCl gelöst. Die Embryonen werden für 30 – 45 Minuten im Dunkeln in dieser Lösung inkubiert. Es folgt die Zugabe von Wasserstoffperoxid in 1:100000 Verdünnung. Die Farbreaktion verläuft im Dunkeln ungefähr 10 bis 45 min. Im Anschluß wird 2x in TBST gewaschen und die Embryonen in PBS bei 4°C aufbewahrt.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.18 Immunfluoreszenz

#### 2.2.18.1 Färbungsprotokolle

Die Zellen oder Gewebeschnitte werden für 10 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Methanol fixiert, nachdem sie durch dreimaliges Waschen mit PBS von Medium befreit worden sind. Mit einem Fettstift („PAP-Pen“) werden die Zellen nun umrandet, um den Antikörperverbrauch gering zu halten. Nach zweimaligem Waschen in PBS folgt das Blocken in PBS/ 1%BSA für 30 min. Nun wird 1 Stunde mit zwei Primärantikörpern, in diesem Fall gegen WT1 und MF20, inkubiert. Der WT1-Antikörper stammt aus dem Kaninchen und wird 1:50 verdünnt, wohingegen der MF20-Antikörper aus der Maus stammt und nur 1:10 verdünnt wird. Die Zellen werden 3x in PBS gewaschen und 1 Stunde mit den TRITC- und FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Von diesem Schritt ab muss im Dunkeln gearbeitet werden, da das Fluoreszenzsignal sehr kurzlebig ist. Nachdem nicht gebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt sind, wird im letzten Schritt DAPI-Reagenz in einer 1:1000 Verdünnung in PBS hinzugegeben, welches die Zellkerne blau anfärbt. Nach 5 Minuten wird das Reagenz mit PBS abgewaschen, da sonst auch RNA mitangefärbt wird und auch das Cytosol blau fluoresziert. Die Eindeckelung erfolgt mit Moviol. Die Objektträger werden über Nacht getrocknet und bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### Primärantikörper:

Anti-vMHC (MF20)	1:10
Anti Wt1	1:50
Anti Caspase-AK	1:100
Anti-BrDU	1:100
QCPN-AK	unverdünnter Medienüberstand
RALDH2-AK	1:4000

#### Sekundär-Antikörper:

Anti-Maus POD	1:200
---------------	-------

## 2. Material und Methoden

Anti-Kaninchen POD	1:200
Mouse-anti-BrdU	1:100
anti-DIG-POD	1:100
anti-FITC-POD	1:100
Anti-mouse-Alexa555	1:500
Anti-mouse-Fab-FITC	1:100
Anti-rabbit-FITC	1:100
Anti-mouse-FITC	1:100

### 2.2.18.2 Dokumentation mit dem Fluoreszenzmikroskop

Das Fluoreszenzmikroskop bietet die Möglichkeit mittels der Software MetaMorph die drei Kanäle FITC, TRITC und DAPI nacheinander einzeln zu photographieren und die Bilder im Anschluss übereinander zu legen um auf die Lokalisation der angefärbten Proteine rückzuschliessen. Eine Besonderheit des konfokalen Mikroskops besteht in der Möglichkeit, nicht nur mehrere Kanäle gleichzeitig zu erfassen, sondern auch durch ein Gewebe hindurch auf optischen Ebenen die Kanäle anzuregen. Dadurch entstehen sogenannte Stapel, welche wiederum zusammengefügt, eine dreidimensionale Darstellung des gefärbten Gewebes ermöglichen.

### 2.2.19 3D-Rekonstruktion konfokaler Bilderstapel

Die Herstellung von Fluoreszenz-gefärbten Serienschnitten kann mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops dazu genutzt werden, eine 3D-Rekonstruktion mit der Amira-Software zu realisieren. Es kann durchaus auch auf herkömmliche Histologie verzichtet und ausschliesslich konfokal erstellte Stapelaufnahmen für die Erstellung eines 3D-Modells verwendet werden. Dies bietet sich insbesondere bei der Analyse Whole-mount gefärbter

## 2. Material und Methoden

Präparate an und bedeutet im Allgemeinen eine grosse Zeitersparnis. Die Stapelaufnahmen werden in die Amira-Software eingeladen und je nach Bedarf die Auflösung reduziert (Resampling). Dann erfolgt eventuell eine Ausrichtung der verschiedenen Sektionen (Alignment). Der grundlegende Schritt bedeutet die Herstellung eines Markierungsfeldes (Label field), bei der auf jedem einzelnen Schnitt die gefärbten Areale markiert werden. Diese bilden nun die Grundlage für die Generierung einer aus Polygonen bestehenden Oberfläche (Surface module), welche mit verschiedenen Parametern modifiziert und auch mit Hilfe eines Filmmoduls animiert werden kann. Diese Art der Darstellung ermöglicht eine sehr genaue Volumen- und Oberflächenberechnung eines gefärbten Gewebes, sei es eine Proteindistribution oder eine mittels FISH detektierte mRNA.

## 3. Ergebnisse

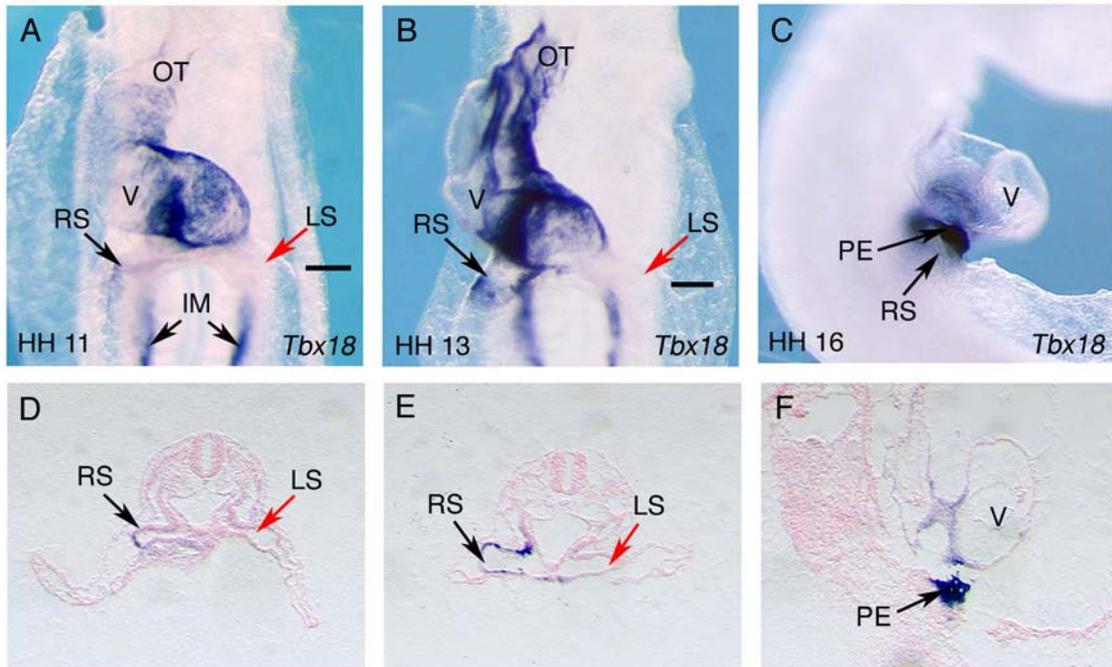
### 3.1 Das Expressionsmuster proepikardialer Markergene

#### 3.1.1 *TBX18* ist ein früher proepikardialer Marker im Huhn und im Frosch

Der T-Box Transkriptionsfaktor *Tbx18* wird in der Maus zunächst ubiquitär im primitiven Herzschauch und später im Epikard exprimiert (Kraus et al., 2001). Die Morphogenese und kardiale Differenzierung des venösen Pols wird massgeblich von einer *Nkx2.5*-unabhängigen *Tbx18* Expression vermittelt (Christoffels et al., 2006).

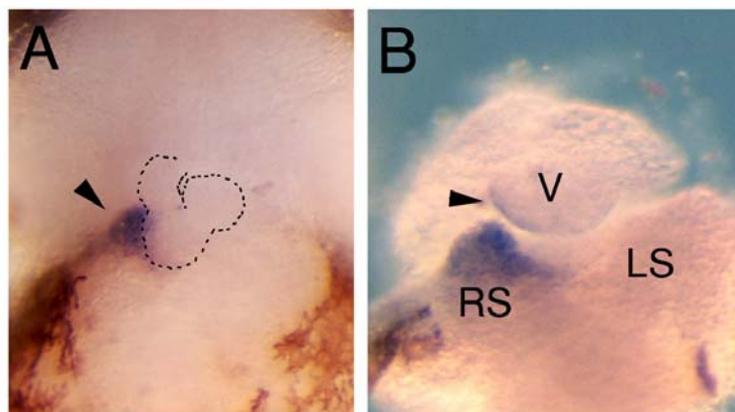
Im Hühnerembryo weist *TBX18* eine myokardiale Expression im tubulären Herzen als auch eine signifikante Expression im intermediären Mesoderm auf (Haenig und Kispert, 2004). Bereits zum Stadium HH 11 wird die Expression im Herzen schwächer und beginnt sich auf den venösen Pol zurückzuziehen. *TBX18* weist hier eine klare Asymmetrie auf, da die Expression nur im rechten Sinus detektiert werden kann (Abb. 9, A, D). Diese Expressionsdomäne im rechten Sinusrohr reduziert sich im Stadium HH13/14 auf die morphologisch erkennbare frühe PE Anlage (Abb. 9. B, E). In den weiteren Stadien wird *TBX18* im rechtseitigen PE stark exprimiert. Ab Stadium HH 15 kann eine schwache *TBX18* Expression auch in der linken retardierten PE-Anlage nachgewiesen werden. Nachdem die proepikardialen Zellen Kontakt mit dem Ventrikel aufgenommen haben und die Bildung des Epikards initiieren, persistiert die *TBX18*-Expression (Haenig und Kispert, 2004). Dies kann auch in der Maus beobachtet werden, wobei die *Tbx18*-Mausmutante allerdings keinen epikardialen Phänotyp zeigt (Kraus et al., 2001). Wir haben die Expression von *TBX18* auch im Frosch untersucht. Dazu wurde ein entsprechender EST-Klon verwendet. Im Frosch ist *tbx18* ebenfalls ein proepikardialer Marker und kann nach 40-42h in der rechtseitigen PE-Anlage detektiert werden (Abb.10). Ähnlich wie im Huhn und in der Maus bleibt die Expression von *tbx18* auch im Frosch während der Epikardialisierung erhalten.

### 3. Ergebnisse



#### Abb. 9: Das Expressionsmuster von *TBX18* im Huhn während der PE Induktion

Im Stadium HH 11 ist bereits eine schwache Asymmetrie der *TBX18*-Expression im Sinus zu beobachten. Im intermediären Mesoderm wird *TBX18* dagegen bilateral exprimiert (A-E). Die ausgeprägte myokardiale Expression zieht sich in den darauffolgenden Stadien asymmetrisch auf die sinuatriale Region zurück und persistiert im rechten Sinushorn und der PE-Anlage (C, F). V: Ventrikel, RS: rechter Sinus, LS: linker Sinus, OT: Ausflusstrakt, IM: intermediäres Mesoderm



#### Abb. 10: Die *tbx18* Expression im venösen Pol von *Xenopus*

Im Frosch wird *tbx18* nach 41h unilateral im rechten Sinushorn exprimiert (A). Ähnlich wie im Huhn, persistiert die Expression von *tbx18* in der asymmetrischen PE Anlage (B). V: Ventrikel, RS: rechter Sinus, LS: linker Sinus, Pfeil in B: Epikard

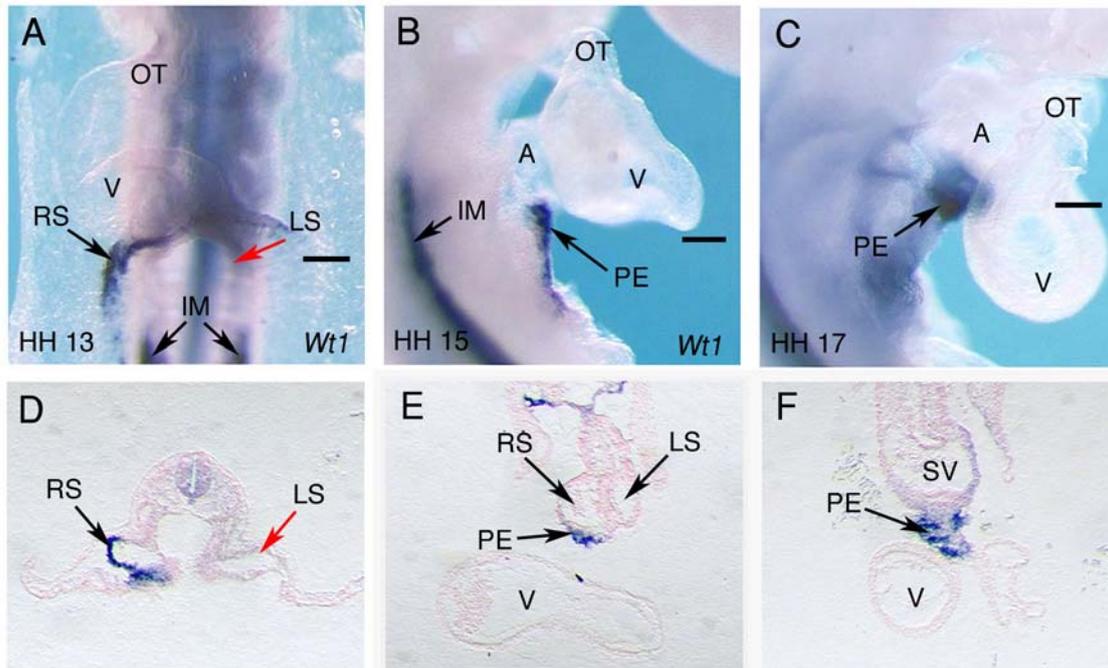
#### 3.1.2 Die asymmetrische Expression von *WT1* im *Sinus venosus* und im Proepikard

Der Zinkfingertranskriptionsfaktor *WT1* wird im Epikard und in Mesenchymzellen, welche in das Myokard einwandern, exprimiert (Perez-Pomares et al., 2002). Auch das Mesothel viszeraler Organprimordien, wie z.B. der Niere sowie endodermale Organanlagen sind wichtige Expressionsdomänen (Carmona et al., 2001). *Wt1*-defiziente Mäuse entwickeln hypoplastische Ventrikel (Wagner et al, 2003), was auf die fehlende Interaktion von Epikard und Myokard in diesen Tieren hinweist (1.3.5).

*WT1* weist im Stadium HH 13 im Huhn eine starke Expression im rechten Sinus auf. Gleichzeitig wird *WT1* bilateral im intermediären Mesoderm exprimiert (Abb. 11; A, B, D, E). Dies erinnert an das Expressionsmuster des T-Box Faktors *TBX18*. Allerdings markiert *WT1* im Gegensatz zu *TBX18* zu keiner Zeit das Myokard. Während der weiteren Entwicklung des Proepikards wird *WT1* insbesondere in den Epithelzotten stark exprimiert (Abb. 11, C, F). Im Stadium HH 17 ist das Proepikard voll ausgewachsen und nimmt kurz darauf Kontakt mit dem Ventrikel auf, um das Epikard zu bilden. Die *WT1*-Expression bleibt auch in epikardialen Zellen erhalten, bis diese schliesslich zu Zellen des Koronargefäßsystems differenzieren (Perez-Pomares et al., 2002). *WT1* agiert in diesem Kontext wahrscheinlich als Repressor der Differenzierung.

Im Zebrafisch konnte *wtl* ebenfalls als proepikardialer Marker etabliert werden. Durch den Verlust von *wtl* findet im Fisch praktisch keine Epikardentwicklung mehr statt, die Morphanten weisen perikardiale Ödeme sowie Ödeme im Pronephros auf (Serluca, 2007).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 11: Das Expressionsmuster von *WT1***

*WT1* wird von Stadium HH 13 an ausschliesslich im rechten Sinus exprimiert, der linke Sinus weist zu keinem Zeitpunkt *WT1* Expression auf. Im intermediären Mesoderm wird *WT1* dagegen bilateral exprimiert. In den darauffolgenden Stadien zieht sich die venöse Expression auf die proepikardialen Zellen zurück und persistiert dort insbesondere in den Epithelzotten der PE-Anlage. Im Myokard kann keine *WT1* Expression beobachtet werden. A: Atrium, LS: linker Sinus, RS: rechter Sinus, IM: intermediäres Mesoderm, OT: Ausflusstrakt, PE: Proepikard, SV: *Sinus venosus*, V: Ventrikel

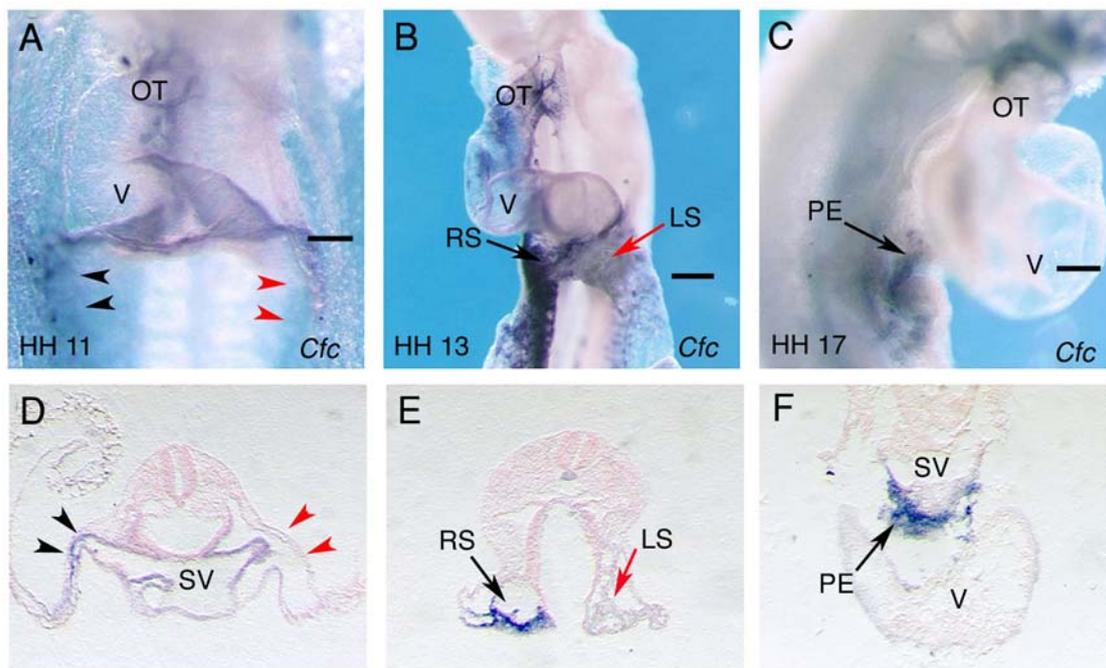
#### **3.1.3 *CFC* weist eine differentielle Expression im venösen Pol des Herzens auf**

Während der Entwicklung des Hühnerembryos wird *CFC* bereits früh in einem antero-posterioren Gradienten im Epiblasten sowie im anterioren Primitivstrifen und dem Hensschen Knoten exprimiert (Schlange et al., 2001). Im Stadium HH 7 ist die Expression von *CFC* im lateralen Plattenmesoderm (LPM) und ab Stadium HH 10 im Myokard des primitiven Herzschlauches zu beobachten.

Die bilaterale Expression im LPM scheint ab Stadium HH 11 eine leichte Asymmetrie aufzuweisen, die rechte Seite zeigt eine stärkere Expression (Abb. 12, A, D). Im Stadium HH 13 ist die Expression noch im ganzen Herzschlauch zu beobachten. Der Sinus weist eine

### 3. Ergebnisse

deutlich rechtseitige *CFC*-Expression auf, welche sich bis auf das LPM erstreckt (Abb. 12, B, E). In den darauffolgenden Stadien zieht sich die Expression an die beiden Pole des Herzschlauches zurück (Abb. 12, C). Am venösen Pol bilden sich auf dem rechten Sinushorn die proepikardialen Zellen, welche *CFC* stark exprimieren. Ähnlich wie die anderen proepikardialen Marker *WT1* und *TBX18* zeigt *CFC* in den Epithelzellen des PE eine besonders starke Expressionsdomäne (Abb12, F)



**Abb. 12: Das Expressionmuster von *CFC* in den HH Stadien 11-17**

Die bilaterale Expression von *CFC* im LPM zeigt im Stadium HH 11 eine stärkere Ausprägung auf der rechten Seite (A, D). Diese Asymmetrie verstärkt sich während der weiteren Entwicklung, so dass im Stadium HH 13 die Expression im rechten Sinus besonders stark ausgeprägt ist und sich bis in das rechte LPM ausdehnt (B, E). Die Expression beschränkt sich in darauffolgenden Stadien auf die rechtsseitig entstehenden Epithelbläschen der proepikardialen Zellen (C, F). A: Atrium, LS: linker Sinus, RS: rechter Sinus, IM: intermediäres Mesoderm, OT: Ausflustrakt, PE: Proepikard, SV: *Sinus venosus*, V: Ventrikel

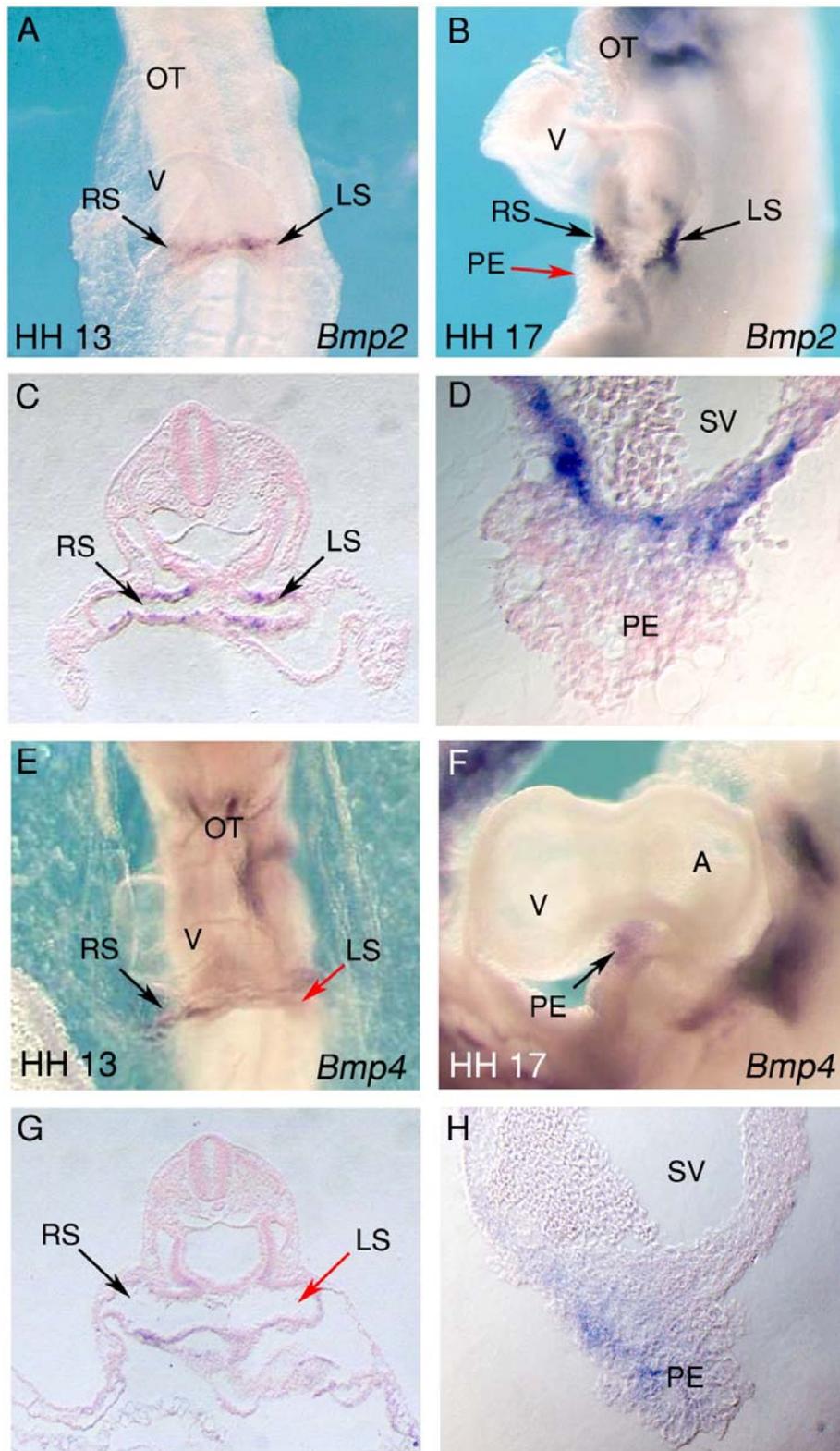
## 3.2 Die Rolle von BMP in der Proepikardentwicklung

### 3.2.1 *BMP2/4* zeigen eine differentielle Expression im Sinusmyokard und im Proepikard

*BMP2* ist ein essentieller Faktor in der frühen Kardiogenese, da es unter anderem die Expression kardialer Markergene wie *NKX2.5* kontrolliert (Schultheiss et al., 1997, Andree et al., 1998, Schlange et al., 2000). Doch auch in der späteren kardialen Morphogenese ist *BMP2* von Bedeutung. Im Hühnerembryo weist *BMP2* im Stadium HH 13 im *Sinus venosus* eine bilaterale Expressionsdomäne auf, die in ihrer antero-posterioren Ausdehnung stark begrenzt ist (Abb. 13, A, C). Die Expression am venösen Pol persistiert in den folgenden Stadien, wobei sie auf das Sinusmyokard beschränkt bleibt. Im Stadium HH 17 wird *BMP2* an den beiden Polen des Herzschlauches exprimiert, wobei die Expression in diesem Stadium mit der von *CFC* überlappt. Das Proepikard weist während seiner ganzen Entwicklung keine *BMP2* Expression auf. Die Histologie zeigt die starke Expression von *BMP2* in der myokardialen Wand des *Sinus venosus*. Das aus dem Sinus ausgewachsene proepikardiale Epithel, sowie das rekrutierte Mesenchym sind offensichtlich frei von *BMP2*-Expression (Abb. 13, B, D).

Im Gegensatz zu *BMP2* zeigt *BMP4* eine asymmetrische Expression im *Sinus venosus*. Im Stadium HH 13 ist eine schwache Expression von *BMP4* im rechten Sinus zu detektieren, welche sich weiter nach posterior ausdehnt, als es bei *BMP2* zu beobachten ist (Abb, 13, E, G). Bis in das Stadium HH 17 bleibt eine schwache Expression im rechten Sinus erhalten. Zu diesem Zeitpunkt ist im voll entwickelten Proepikard eine *BMP4* Expression zu beobachten, welche deutlich schwächer als die sinomyokardiale Expression von *BMP2* erscheint (Abb: 13, H)

### 3. Ergebnisse



**Abb. 13: Die Expression von BMP2/4 im venösen Pol und im Proepikard**

BMP2 wird bilateral im Sinusmyokard von Stadium HH 13 bis 17 exprimiert (A-D). Dagegen zeigt BMP4 zunächst eine schwache unilaterale Expression im Sinus und später im Proepikard (E-H). A: Atrium, LS: linker Sinus, RS: rechter Sinus, OT: Ausflusstrakt, PE: Proepikard, SV: *Sinus venosus*, V: Ventrikel

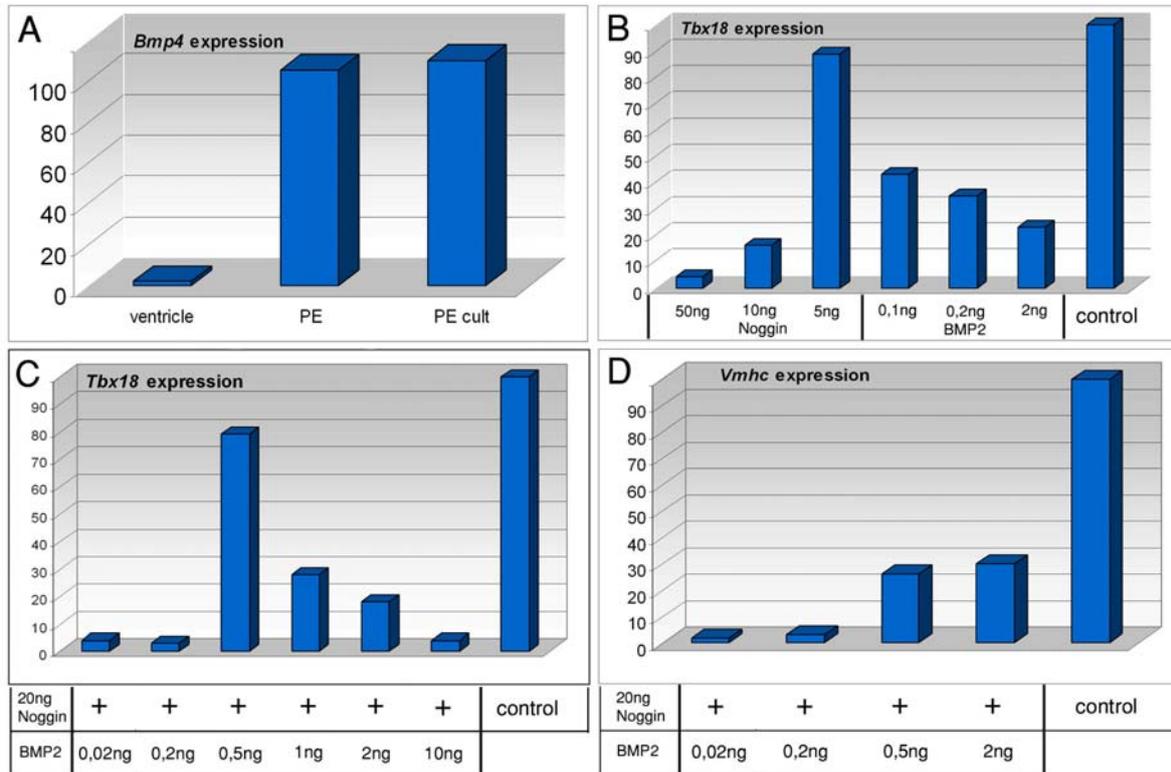
### **3.2.2 Die Expression von *TBX18* in proepikardialen Explantaten wird von BMP moduliert**

Um ein Verständnis für die potentielle Rolle von BMP in der Induktion proepikardialer Identität zu entwickeln, wurde ein Primärkultursystem mit proepikardialen Zellen etabliert. Hierfür wurden Proepikardien aus Hühnerembryonen der Stadien HH 17 explantiert und mit serumfreiem Medium inkubiert. Nach 12 Stunden wurde das Medium mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinatem BMP2 und Noggin versetzt. Nach 60 Stunden wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Im Anschluss erfolgte die Expressionsanalyse des proepikardialen Markers *TBX18* sowie des myokardialen Markers *VMHC* mittels Real-time PCR.

Die Zugabe einer relativ hohen Konzentration von 50ng Noggin führt zu einem weitgehenden Verlust der *TBX18*-Expression. Die Behandlung mit 10 ng und 5 ng Noggin zeigt einen Schwellenwert an, da die Expression von *TBX18* von 5ng kaum betroffen ist, allerdings durch 10 ng Noggin um 80% reduziert wird (Abb. 14, B). Die *TBX18*-Expression reagiert auf ansteigende Konzentrationen von BMP2 im Gegensatz dazu mit einem stetigen linearen Verlust. Um den Antagonismus von BMP2 und Noggin zu beleuchten, wurden die PE-Explantate gleichzeitig mit einer ansteigenden Konzentration von BMP2 und einer konstanten Konzentration von Noggin behandelt. Hierbei wurden 20ng Noggin zusammen mit 0,02 bis 10ng BMP2 eingesetzt. Hierbei wird deutlich wie der Überschuss an Noggin zunächst nicht nur das endogene BMP, sondern auch die geringen ektopischen Mengen von 0,02 und 0,2 ng BMP2 antagonisiert, was zu einem nahezu völligen Verlust der *TBX18*-Expression führt. Offenbar sind 0,5ng BMP2 in der Lage diesen Effekt von 20 ng Noggin auszugleichen, da *TBX18* auf Kontrollniveau exprimiert wird. Hier zeigt sich wieder der bereits beobachtete Schwellenwert, der durch Übermaß an ektopischem BMP2 überschritten wird, was sich wiederum in linearem Verlust der *TBX18*-Expression widerspiegelt (Abb. 14, C). Der Überschuss an BMP2 in PE-Explantaten führt nicht nur zum Verlust der *TBX18*-Expression, sondern gleichzeitig zur Induktion myokardialer Marker wie *VMHC* (*ventricular moysin heavy chain*). Dies zeigt, wie die proepikardiale Identität auf eine definierte geringe BMP-Konzentration angewiesen ist, wobei höhere BMP-Konzentrationen ein myokardiales Genprogramm in PE-Zellen aktivieren können. Dies kann mit den bereits beschriebenen

### 3. Ergebnisse

Expressionsmustern von *BMP2/4* im venösen Pol korreliert werden, welche eine starke Expression im Sinusmyokard und eine schwächere Expression im PE zeigen (4.2.1).



**Abb. 14: Die proepikardiale Identität beruht auf einer geringen Dosis von BMP-Signalen**

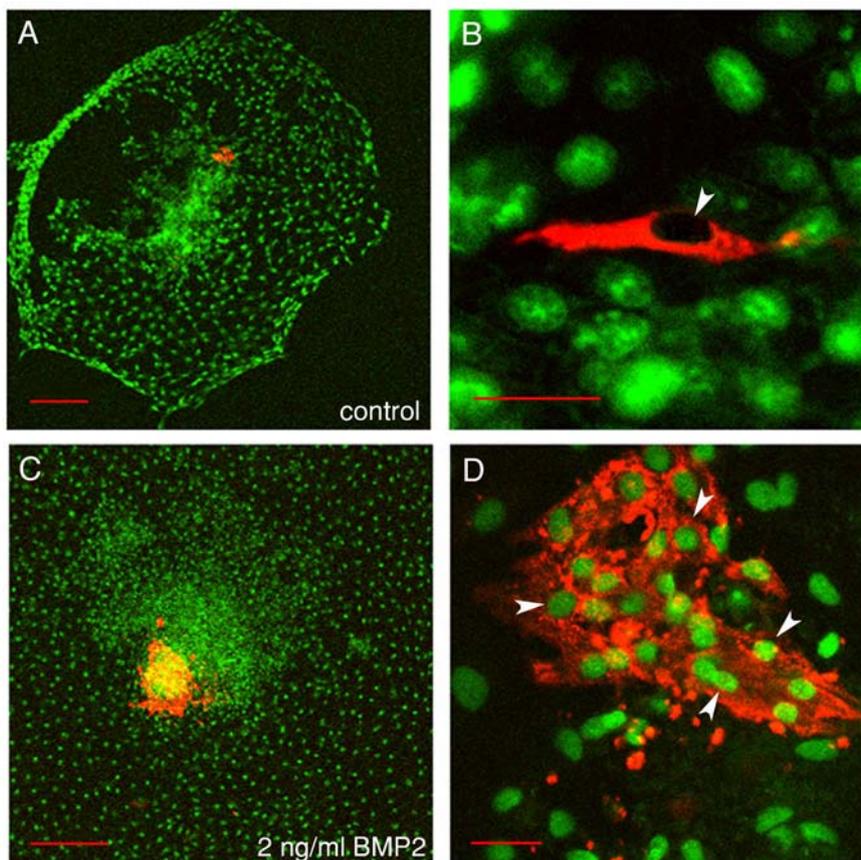
*BMP4* wird sowohl im PE, als auch in PE-Explantaten auf gleichem Niveau exprimiert (A). Durch hohe Dosen von 50 ng Noggin wird *TBX18* in PE Explantaten stark herunterreguliert, wobei geringe Konzentrationen von 5 ng kaum die Expressionshöhe von *TBX18* verändern (B). Der Anstieg der ektopischen *BMP2*-Konzentration hat dagegen einen eher linearen Verlust der *TBX18* Expression zur Folge. Der Noggin-*BMP2* Antagonismus moduliert die proepikardiale Identität. Eine intermediäre Konzentration von *BMP2* scheint hierbei essentiell für die volle *TBX18*-Expression (C). Durch Überschuss an *BMP2* werden myokardiale Marker wie *VMHC* hochreguliert (D).

#### 3.2.3 *BMP* induziert *in vitro* die Differenzierung proepikardialer Zellen in kardiale Myozyten

Die proepikardialen Explantate bilden nach der Adhäsion an die Kulturschale ein konzentrisches Epithel welches aus dem zentralen Zellaggregat auswächst. Verläuft die Explantation erfolgreich und werden die PE-Zellen nicht durch myokardiales Sinusgewebe

### 3. Ergebnisse

kontaminiert, so bleiben die Zellen epithelial und exprimieren proepikardiale Marker wie WT1 (Abb. 15, A). Wird das Kulturmedium mit 2ng/ml rekombinatem BMP2 konditioniert, so aktivieren einige PE-Zellen ein myokardiales Genprogramm, was die Bildung kontraktiler Myozyten hervorruft (Abb.15, C). Es entstehen regelrechte Cluster von Myozyten, welche insbesondere in der Nähe des zentralen Zellaggregates zu finden sind. Die Doppelfärbung der Explantate mit Antikörpern gegen WT1 und VMHC zeigt eine Kolokalisation beider Marker (Abb. 15, D). Offenbar sind einige PE-Zellen in der Lage auf die Stimulanz durch BMP2 mit einem myozytären Schicksal zu reagieren. Dies spricht für eine gewisse Plastizität undifferenzierter proepikardialer Zellen. Darüberhinaus scheinen proepikardiale Explantate diverse Zelltypen aufzuweisen, welche sich in ihrer Fähigkeit auf Wachstumsfaktoren zu reagieren und ein anderes zelluläres Schicksal anzunehmen unterscheiden.



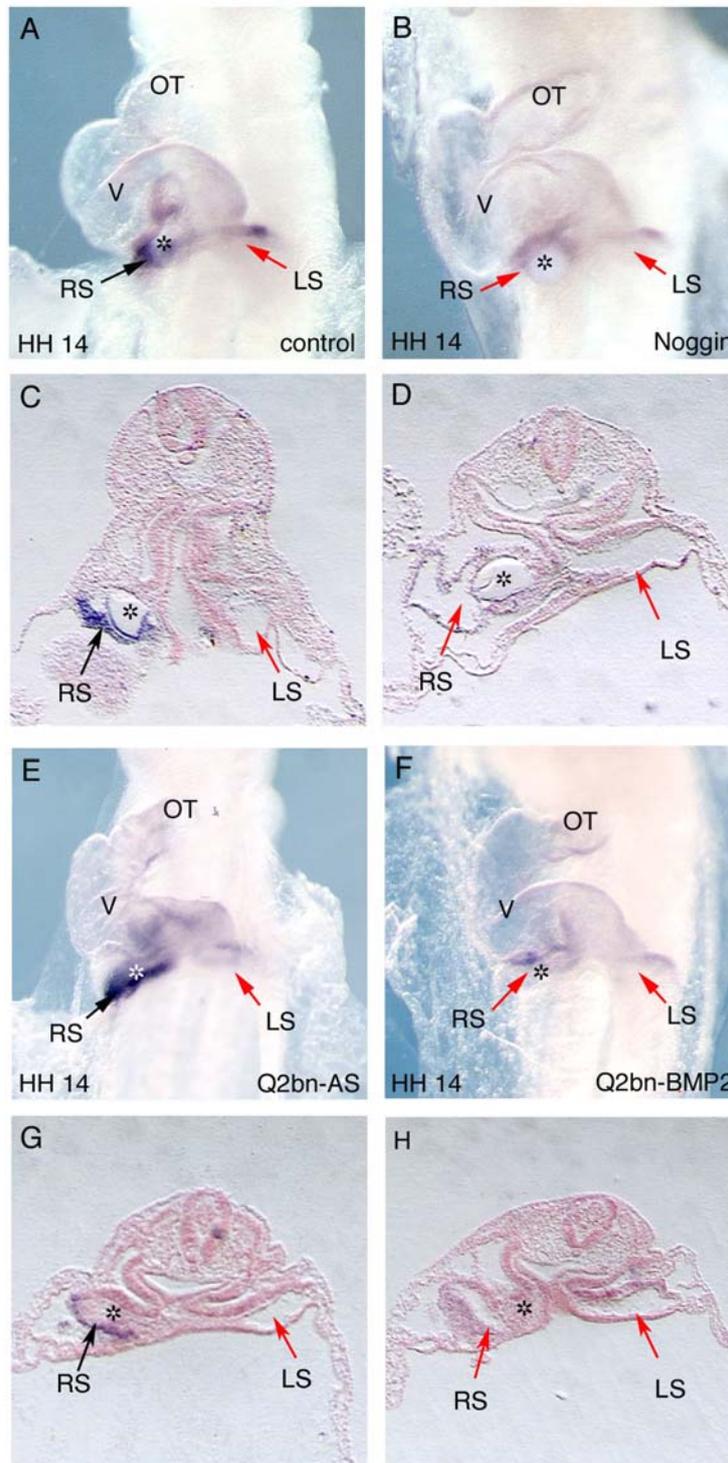
#### **Abb. 15: BMP2 induziert Myozyten in proepikardialen Explantaten**

Die Konditionierung mit rekombinatem BMP2 führt in proepikardialen Explantatkulturen, im Gegensatz zur Kontrolle (A, B) zur Bildung kontraktiler Myozyten, welche sich durch nukleäre WT1-Expression als proepikardiale Zellen ausweisen (C, D). Maßstab A, C = 100µm; B, D = 10µm

### **3.2.4 Die unilaterale Expression von *TBX18* im *Sinus venosus* ist abhängig von BMP-Signalen**

Die in proepikardialen Explantaten erhaltenen *in vitro* Befunde, dass BMP die Expression proepikardialer Marker wie *TBX18* moduliert, sollte durch ektopisches Überangebot von BMP2 und Noggin im venösen Pol des Hühnerembryos verifiziert werden. Hierzu wurden Depotperlen mit Noggin beladen, beziehungsweise Zellen der BMP2-exprimierenden Zelllinie Q2bn aggregiert. Diese wurden in den rechten Sinus von Stadium HH 10/11 Embryonen implantiert, welche zuvor in Kultur genommen wurden. Die Depotperlen wurden zerteilt, um sie in der Sinusröhre festzusetzen. Die Q2bn-Zellaggregate hingegen konnten in den Sinus einwachsen und permanent BMP2 sezernieren. Die Auswertung erfolgte zum Stadium HH 14 mittels *in situ* Hybridisierung. Die Implantation von Noggin führte im rechten Sinus zu einem Verlust der *TBX18*-Expression (87%, n = 23) (Abb. 16, A-D). Das ektopische BMP2 der implantierten Zellen zeigte ebenfalls einen deutlichen Effekt, da in 63% (n = 19) der Embryonen keine asymmetrische Expression von *TBX18* nachgewiesen werden konnte (Abb. 16, E-H).

### 3. Ergebnisse



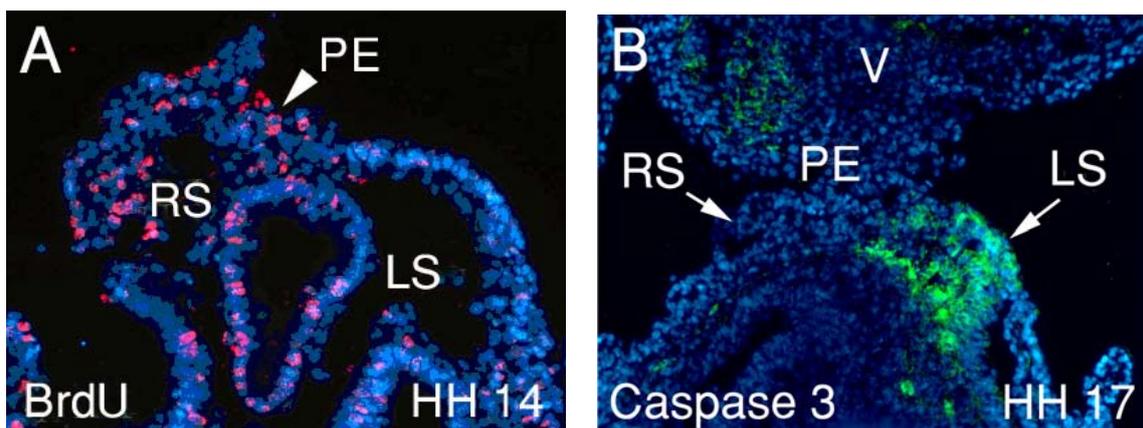
**Abb. 16: Die *TBX18*-Expression im *Sinus venosus* ist abhängig von BMP-Signalen**

Die Implantation von Noggin beziehungsweise BMP2-sezernierenden Zellen hat einen direkten Verlust der *TBX18*-Expression im rechten Sinus zur Folge (A, B, E, F). Die Histologie macht die Lage der implantierten Depotperle oder Zellaggregate deutlich (Sternchen), in dessen Nähe keine Expression zu detektieren ist (D, H). LS: linker Sinus, RS: rechter Sinus, OT: Ausflusstrakt, PE: Proepikard, V: Ventrikel

### 3.3 Die asymmetrische Proepikardentwicklung

#### 3.3.1 Der *Sinus venosus* weist eine asymmetrische Proliferation und Apoptose auf

Im Hühnerembryo beginnt der *Sinus venosus* im Stadium HH 14 eine asymmetrische Wachstumsphase zu durchlaufen. Durch den immunhistochemischen Nachweis von Bromdesoxy-Uridin (BrdU) wird deutlich, wie im rechten Sinus eine verstärkte Proliferation aktiviert wird (Abb. 17, A). Das BrdU wurde im Stadium HH 13/14 für 2- 4 Stunden auf die Embryonen appliziert. Bereits in diesem Stadium beginnt das Proepikard seine Gestalt anzunehmen und die charakteristische bläschenartige Oberfläche zu entwickeln. Die asymmetrische Entwicklung des *Sinus venosus* bleibt allerdings nicht auf unilaterales proepikardiales Wachstum beschränkt. Im Stadium HH 17 kann im linken Sinus eine signifikante Caspase 3-Aktivität nachgewiesen werden. Caspase 3 ist ein wichtiger Mediator für die Ausführung des programmierten Zelltodes (Apoptose). Die Expressionsdomäne der aktiven Caspase 3 ist räumlich abgegrenzt und bleibt auf den linken Sinus beschränkt. Die asymmetrische Aktivierung von programmiertem Zelltod ist offenbar Teil eines linksseitigen Mechanismus, welcher die Ausprägung bilateraler PE-Anlagen nachhaltig unterdrücken soll.



**Abb. 17: Der *Sinus venosus* ist durch asymmetrische Proliferation und Apoptose gekennzeichnet.**

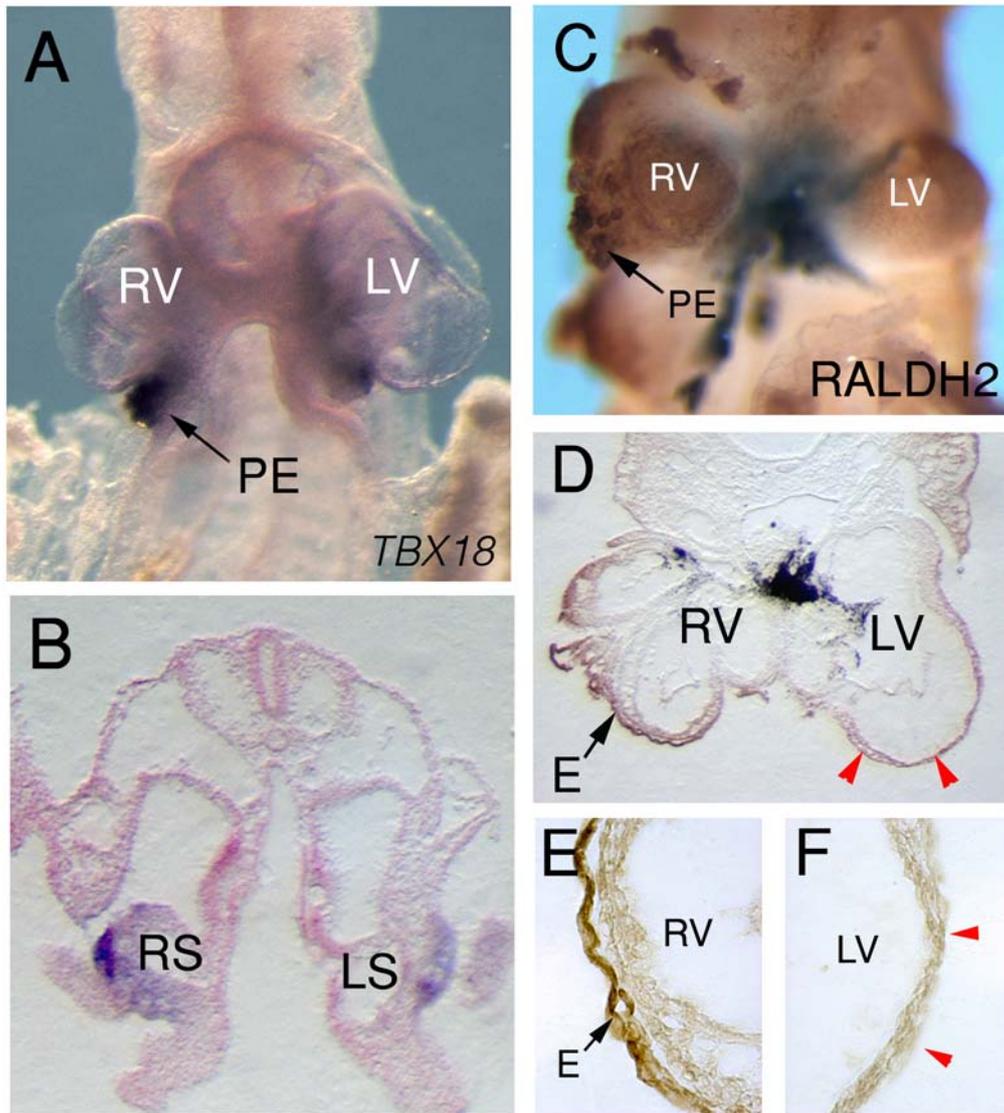
Ab dem Stadium HH 14 wird im rechten Sinus eine starke Proliferation aktiviert, welche zur Bildung des Proepikards führt (A). Im Stadium HH 17 ist im linken Sinus eine signifikante Aktivität von Caspase 3 nachzuweisen, welche die Ausbildung einer bilateralen PE-Anlage verhindert (B). LS: linker Sinus, RS: rechter Sinus, PE: Proepikard, V: Ventrikel

### **3.3.2 Die Induktion des *Cardia bifida*-Phänotyps führt zu einer asymmetrischen Epikardentwicklung**

Die ventrale Fusion des Vorderdarms ist ein grundlegender Schritt, welcher die Entstehung eines linearen Herzschlauches ermöglicht. Durch innere Auffaltung schliesst sich der endodermale Vorderdarm und die äußersten Spitzen des splanchnischen mesodermalen Blattes fusionieren. Dieser Prozess kann im Hühnerembryo mechanisch im Stadium HH 7-8 unterbrochen werden, indem man die Darmforte medial durchtrennt. Dieser Eingriff führt zur Ausbildung zweier unabhängig schlagender Ventrikel. Dieser Phänotyp wird als *Cardia bifida* (Spaltherz) bezeichnet.

In Hühnerembryonen mit einer *Cardia bifida* verläuft die Induktion des Proepikards asymmetrisch. Wie in unbehandelten Embryonen auch, entwickelt sich das Proepikard auf dem rechten Sinus und ist durch eine starke *TBX18*-Expression gekennzeichnet (Abb. 18, A, B). Werden die Embryonen allerdings länger bebrütet, werden die Konsequenzen der asymmetrischen PE-Entwicklung deutlich. Die Färbung mit dem epikardialen Marker RALDH2 zeigt den unilateralen epikardialen Bewuchs des rechten Ventrikels (Abb. 18, C). Der linke Ventrikel dagegen scheint völlig frei von Epikard zu sein. Die Histologie dieser Herzen macht nicht nur den Verlust des Epikards erkennbar, sondern zeigt im Detail auch den Effekt, den dieser Verlust auf die myokardiale Wand des Ventrikels hat. Die myokardiale Kompaktschicht ohne Epikard ist wesentlich dünner, der gesamte linke Ventrikel wirkt im Gegensatz zum rechten Ventrikel dilatiert (Abb. 18, D, E, F). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass im Hühnerembryo tatsächlich nur die rechte PE-Anlage an der Bildung des Epikards beteiligt ist, sowie dass proepikardiale Progenitoren bereits vor der Fusion der Herzfelder lateralisiert sind und dass eine Rolle des Ventrikels zumindest in der Induktion des PE äußerst unwahrscheinlich ist.

### 3. Ergebnisse



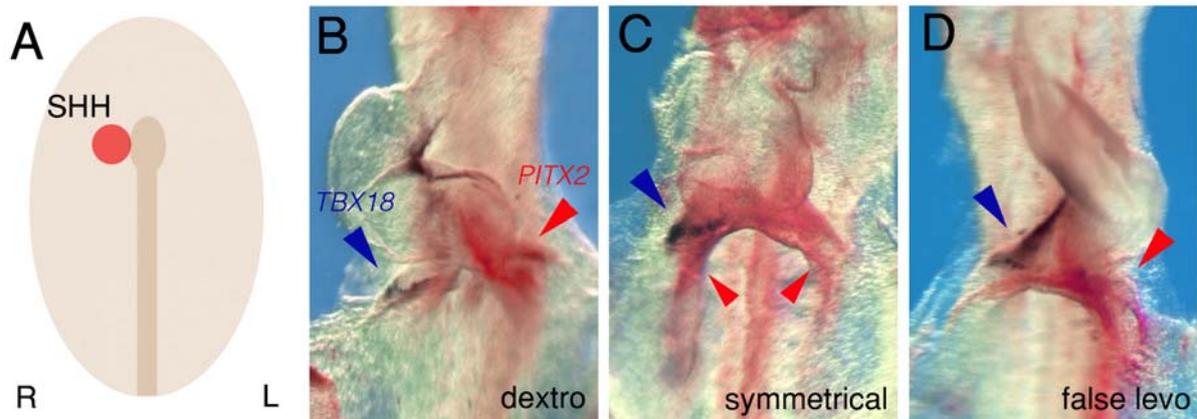
**Abb. 18: Asymmetrische Epikardentwicklung in *Cardia bifida*-Embryonen**

Die Induktion der asymmetrischen PE-Entwicklung verläuft normal in *Cardia bifida* Embryonen. Die rechte Seite exprimiert *TBX18* deutlich stärker (A, B). Der unilaterale Bewuchs der Herzen mit proepikardialen Zellen führt zu einem rechten epikardialisierten Ventrikel und einem linken epikardfreien Ventrikel (C, D, E). Der linke Ventrikel weist darüberhinaus eine dünne Myokardwand und ein dilatiertes Lumen auf (F).

### 3.3.3 Die asymmetrische Expression von *TBX18* im venösen Pol steht nicht unter dem Einfluss von SHH

Um den Effekt linkseitig exprimierter Gene auf die rechtseitige Induktion des Proepikards zu untersuchen, wurden verschiedene Manipulationen des Hensenschen Knotens im Stadium HH4 durchgeführt. Ab diesem Zeitpunkt beginnt der Knoten asymmetrisch *SHH* auf der linken Seite zu exprimieren. *PITX2* wird im linken lateralen Plattenmesoderm sowie im linken Sinus exprimiert und steht dort unter der Kontrolle von NODAL, dessen linkseitige Induktion im Knoten wiederum von SHH abhängt. Aus diesem Grund wurden auf der rechten Seite des Knotens Zellaggregate implantiert, welche mit einem SHH-RCAS-Konstrukt transfiziert waren. Dieser Eingriff beeinflusst die Konfiguration der Herzkrümmung, sowie die Expression von *PITX2*. Es treten verschiedene Herzkonfigurationen auf, der Großteil der Herzen weist die normale Rechtskrümmung (dextro) auf (69%, n = 42/61), daneben existieren völlig ungekrümmte Herzen (14,7%, n = 9/61) als auch linksgekrümmte Herzen (levo) (15%, n = 10/61). Die ungeloopten Herzen weisen eine bilaterale *PITX2*-Expression im *Sinus venosus* auf (Abb. 19, B). Allerdings ist die Beurteilung der Herzkrümmung morphologisch mitunter äußerst schwierig und so ist sie allein kein ausreichendes Kriterium für die Bestimmung des links/rechts Musters, wie es anhand sogenannter „false loops“ deutlich wird. Diese Krümmungen können einen *situs inversus* suggerieren, der allerdings durch die Markergenanalyse nicht verifiziert werden kann (Abb.19, C). Kontrollembryonen, in welche Alkalische-Phosphatase-exprimierende Zellaggregate implantiert wurden, zeigen keine Veränderung der Herzkrümmung oder der Markergenexpression (n = 19). Am interessantesten war die Expressionsanalyse von *TBX18* und *PITX2* in den deutlich ungekrümmten Herzen. Trotz bilateraler Expression von *PITX2*, wird *TBX18* unverändert im rechten Sinus exprimiert (Abb. 19, B). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die asymmetrische *TBX18*-Expression nicht durch den von SHH ektopisch induzierten NODAL-*PITX2*-Signalweg auf der rechten Seite moduliert werden kann.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 19: Ektopische Überexpression von SHH auf der rechten Seite des Hensenschen Knotens im Stadium HH 4.**

Der *Sinus venosus* exprimiert asymmetrisch *TBX18* auf der rechten und *PITX2* auf der linken Seite, das Herz krümmt sich nach rechts (dextro) (B). Die Implantation von SHH exprimierenden Zellen auf der rechten Seite des Knotens führt zur Beeinflussung der Herzkrümmung (C, D). Ungekrümmte Herzen weisen bilaterale *PITX2*-Expressionsdomänen auf (C, rote Pfeile). Gleichzeitig ist die rechtsseitige Expression von *TBX18* nicht betroffen (C, blauer Pfeil).

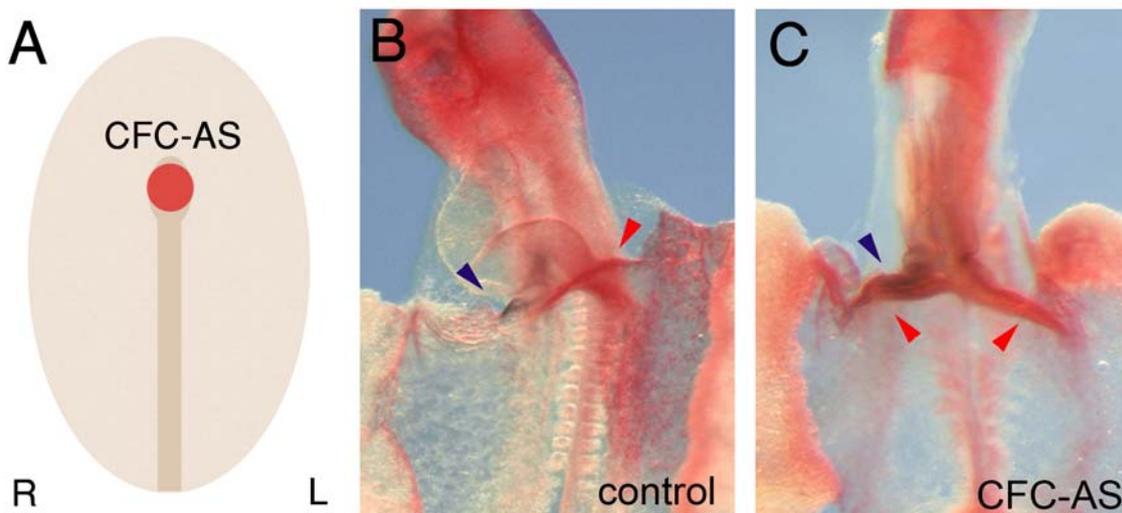
Implantation/ Behandlung	Marker- gene	Lateralität der Genexpression Häufigkeit (%)				
		n	rechts	bilateral	fehlt	links
<b>SHH</b>	<i>TBX18</i>	61	61	-	-	-
	<i>PITX2</i>	61	-	9 (14,7)	-	52 (85,3)
<b>Kontrolle</b>	<i>TBX18</i>	19	19	-	-	-
	<i>PITX2</i>	19	-	-	-	19
<hr/>						
<b>NODAL</b>	<i>TBX18</i>	21	21	-	-	-
	<i>NODAL</i>	24	-	10 (41,6)	-	14 (58,4)
<b>Kontrolle</b>	<i>TBX18</i>	9	9	-	-	-
	<i>NODAL</i>	9	-	-	-	9
<hr/>						
<b>CFC-AS</b>	<i>TBX18</i>	48	48	-	-	-
	<i>PITX2</i>	48	-	16 (33,2)	-	32 (66,8)
<b>Kontrolle</b>	<i>TBX18</i>	16	16	-	-	-
	<i>PITX2</i>	16	-	-	-	16

**Tabelle 1: Häufigkeit von Embryonen mit aberranter Expression von *TBX18* und *PITX2* nach Implantation von SHH und NODAL sowie Behandlung mit CFC-Antisense Oligonukleotiden.**

### 3.3.4 Der Verlust von CFC im Hensenschen Knoten hat keinen Einfluss auf die Determination der unilateralen *TBX18* Expression

Der Verlust von CFC führt zu einer defekten Mittellinie, welche sich durch CFC-abhängige *LEFTY1*-Expression auszeichnet. Dies führt in der Folge zu bilateraler *PITX2*-Expression, da *NODAL* die Mittellinie ungehindert überschreiten kann (Schlange et al., 2001). Die Applikation von CFC antisense/sense Oligonukleotiden auf den Hensenschen Knoten im Stadium HH 4 erfolgte mit Hilfe von *Pluronic Gel*. Dies ist ein oberflächenaktives Agens und erleichtert das Penetrieren der Oligonukleode durch die Zellmembran. Dieses Agens geliert bei Temperaturen von 37°C und ermöglicht so eine lokale Applikation.

Die Behandlung mit Kontrolloligonukleotiden zeigt keinen Effekt auf die Expression von *TBX18* und *PITX2* sowie die Herzkrümmung (n = 16) (Abb.20, A). Der Einsatz von CFC-antisense Nukleotiden dagegen führt bei einem Teil der Embryonen zu ungekrümmten (18,7%, n = 9/48), als auch linksgekrümmten Herzen (14,5%, n = 7/48). Darüberhinaus ist eine bilaterale Expression von *PITX2* bei den behandelten Embryonen zu beobachten (33,2%). Die rechtsseitige Expression von *TBX18* ist in diesen Embryonen nicht verändert (Tab. 1; Abb. 20, B). Dies steht in Übereinstimmung mit den Daten, welche aus der rechtsseitigen Überexpression von *SHH* gewonnen werden konnten (4.3.3).



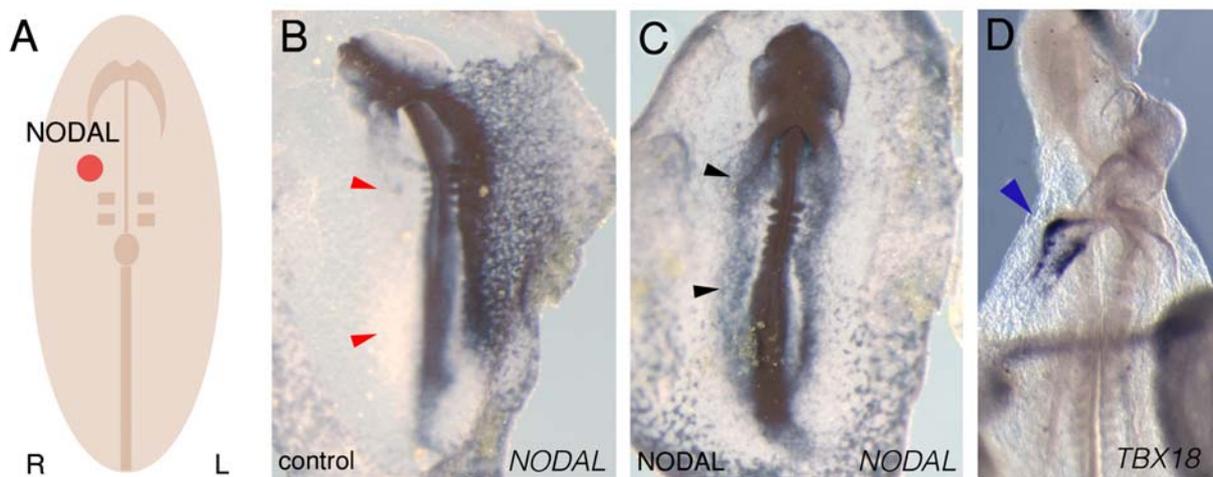
**Abb. 20: Die Behandlung mit CFC-antisense Oligonukleotiden**

Werden Hühnerembryonen im Stadium HH 4 mit CFC antisense-Oligonukleotiden behandelt (A), so führt das zu dem Verlust der Mittellinie und der Etablierung symmetrischer *NODAL*-Expressionsdomänen. Diese induzieren bilaterale *PITX2*-Expression (C). Die rechtseitige Expression von *TBX18* im Sinus ist davon jedoch nicht betroffen (C). blauer Pfeil: *TBX18*-Expression, rote Pfeile: *PITX2*-Expression.

### 3.3.5 Die Induktion bilateraler *NODAL*-Expressionsdomänen kann die asymmetrische *TBX18*-Expression nicht randomisieren

Im Hühnerembryo induziert SHH eine linkseitige Expressionsdomäne von *NODAL* im Hensenschen Knoten (Pagan-Westphal und Tabin, 1998) Daraufhin ist *NODAL* in der Lage sich selbst im linken lateralen Plattenmesoderm (LPM) mit Hilfe von CFC zu induzieren (Schlange et al., 2001). Neuere Untersuchungen zeigen, dass *NODAL* sich selbst und *CER1* auch im rechten LPM induzieren kann (Tavares et al., 2007). Diese Erkenntnisse sollten genutzt werden, um eine robuste *NODAL*-Expressionsdomäne auf der rechten Seite zu erzeugen und deren Einfluss auf die asymmetrische *TBX18*-Expression zu untersuchen. Dazu wurden Heparin-Depotperlen mit 0,1mg/ml *NODAL*-Protein beladen und zum Stadium 6/7 in das rechte LPM implantiert.

Diese Manipulation führt zur Ausbildung bilateraler *NODAL*-Expressionsdomänen (41,6%), welche im Stadium HH 9 detektiert werden können (Tab. 1; Abb. 21, B). *TBX18* ist durch die Induktion von *NODAL* nicht betroffen, da in keinem Embryo eine Veränderung der Expression festgestellt werden kann (n = 21), gleichwohl führt die ektopische *NODAL*-Expression zu aberranter Herzkrümmung (38%, n = 8/21) (Abb. 21, C).



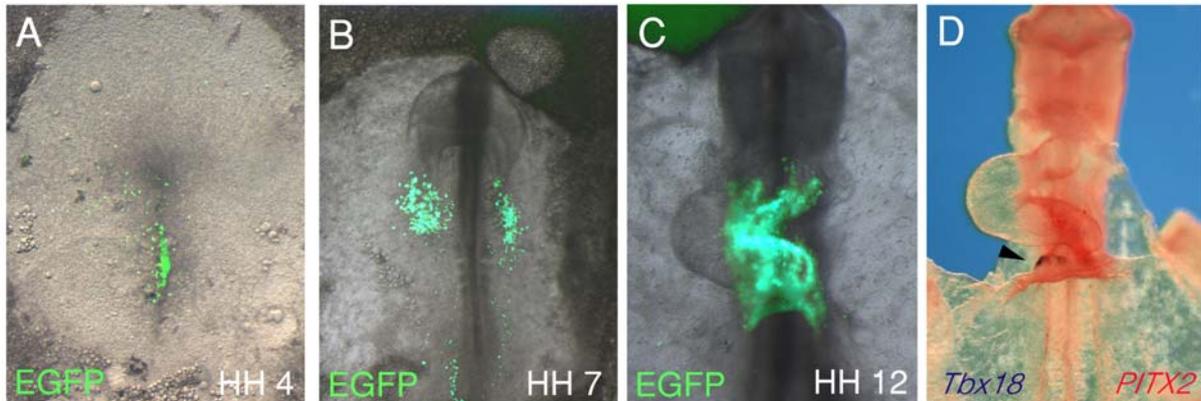
**Abb. 21: Die Induktion bilateraler *NODAL*-Expressionsdomänen**

Im Stadium HH 9 wird *NODAL* asymmetrisch im linken LPM exprimiert (B). Die linke Seite ist frei von *NODAL*-Expression (B, rote Pfeile). Durch Implantation von *NODAL*-Protein in das rechte LPM im Stadium HH 6/7 (A) kommt es zur Induktion bilateraler *NODAL* Expressionsdomänen (C, schwarze Pfeile). Die rechtsseitige *TBX18* Expression im Sinus bleibt davon unverändert (D, blauer Pfeil), doch es entwickeln sich aberrante Herzkrümmungen.

### **3.3.6 Der links/rechts-Mediator PITX2 determiniert nicht die Lateralität proepikardialer *TBX18*-Expression**

Die ektopische Expression von *SHH* und *NODAL* auf der rechten Seite in den vorangegangenen Experimenten zeigte keinen Effekt auf die *TBX18* Expression, gleichwohl wurden bilaterale *NODAL*- und *PITX2*-Expressionsdomänen erzeugt. Es sollte nun der Zweifel ausgeräumt werden, dass die Induktion von *PITX2* bisher nicht die Expressionsstärke erreicht hatte, welche in der Lage wäre, die Expression von *TBX18* zu modulieren beziehungsweise die Lateralität proepikardialer Progenitoren grundsätzlich zu determinieren. Um dies zu klären, wurde eine Koelektroporation eines eGFP-Konstruktes unter der Kontrolle eines  $\beta$ -Aktin Promotors und eines *PITX2a*-RCAS-Konstruktes in Zellen des Primitivstreifens durchgeführt. Hierbei sollten insbesondere Zellen transfiziert werden, welche in der späteren Entwicklung in der venösen Region des Herzens anzutreffen sind. Es zeigte sich, dass es möglich ist, Zellen im Primitivstreifen zu transfizieren, welche kurz darauf auswandern und sich posterior in beiden Herzfeldern aufhalten (Abb. 22, A, B). Diese Zellen haben nach der Fusion des primitiven Herzschlauches einen wesentlichen Anteil an der Bildung des *Sinus venosus* und der gesamten sinuatrialen Region (Abb. 22, C). Da durch diese Art der frühen Elektroporation ein beträchtlicher Teil an kardialen Vorläuferzellen transfiziert wird, sind eGFP-positive Zellen auch in ventrikulären Strukturen sichtbar (Abb. 22, C). Durch den Expressionsnachweis von *PITX2* und dem Vergleich mit dem eGFP-Muster wird deutlich, dass zum Stadium HH 12 die gesamte caudale Herzregion der behandelten Embryonen ektopisch *PITX2* exprimiert ( $n = 14$ ) (Abb. 22, C, D). Die Expressionsanalyse von *TBX18* in dieser Region zeigt, dass *PITX2* selbst in hoher Expressionsstärke die asymmetrische Verteilung der *TBX18*-positiven proepikardialen Vorläufer nicht determiniert.

### 3. Ergebnisse



#### **Abb. 22: Die Elektroporation von sinoatrialen Progenitoren mit eGFP/ PITX2-RCAS**

Die Transfektion von kardialen und proepikardialen Vorläuferzellen mit einem eGFP Konstrukt ermöglicht die Verfolgung dieser Zellen während der Entwicklung. Bereits im Primitivstreifen können Zellen elektroporiert werden, welche nach Verlassen des Primitivstreifens in der caudalen Region der Herzfelder detektiert werden (A, B). Diese Zellen nehmen an der Entstehung des venösen Pols des Herzens teil und gelangen sogar bis in den Ventrikel, (C). Die Koelektroporation von eGFP und PITX2-RCAS ermöglicht eine gezielte Überexpression im *Sinus venosus* und in der sinoatrialen Region. Der Nachweis der Expression von *TBX18* und *PITX2* zeigt die Unabhängigkeit der *TBX18*-Expression von *PITX2* (D). Schwarzer Pfeil: proepikardiale *TBX18*-Expressionsdomäne.

#### **3.3.7 Die Lateralität der proepikardialen Entwicklung wird durch einen frühen asymmetrischen Ionenflux vermittelt**

Der Hühnerembryo ist bereits vor der asymmetrischen Expression von *SHH* im Hensenschen Knoten lateralisiert. Diese frühe Etablierung der links/rechts Achse wird durch Kommunikation der beiden Blastodermhälften vermittelt und verläuft über Zell-Zellkontakt, welcher die *gap junctions* involviert (Levin und Mercola, 1999). Die *gap junction*-Kommunikation ermöglicht den Transport von niedrigmolekularen Determinaten entlang eines elektrochemischen Gradienten. Dieser Gradient wird von asymmetrisch im Primitivstreifen exprimierten ATPasen erzeugt. Wird die Etablierung dieses asymmetrischen Membranpotentials im Primitivstreifen durch Inhibition des Ionenfluxes gestört, führt dies zu Randomisierung der embryonalen links/rechts Achse (Levin et al., 2002).

Da die ektopische Überexpression linksseitiger Marker, wie *SHH*, *NODAL* und *PITX2* auf der rechten Seite keinen Einfluss auf die Lateralität der *TBX18*-Expression zeigte, wurde durch die Manipulation der frühen asymmetrischen ATPase-Aktivität versucht, einen Einblick in die

### 3. Ergebnisse

Lateralisierung der PE-Anlage zu erhalten. Hierzu wurden Hühnerembryonen im Stadium HH 3 mit dem Protonenpumpeninhibitor Omeprazol behandelt. Dieser Inhibitor wurde in einer

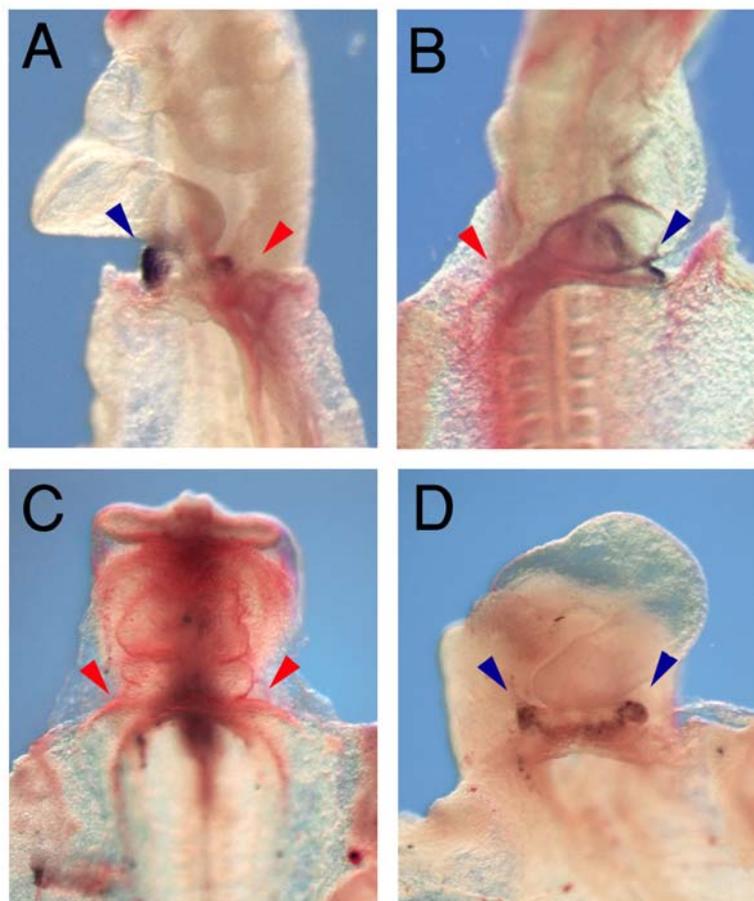
		<b>Lateralität der Genexpression</b>			
		<b>Häufigkeit (%)</b>			
<b>Omeprazol</b>	<b>n</b>	<b>rechts</b>	<b>bilateral</b>	<b>fehlt</b>	<b>links</b>
<i>TBX18</i>	64	38 (59,4)	10 (15,6)	9 (14)	7 (10,9)
<i>PITX2</i>	64	7 (10,9)	9 (14)	10 (15,6)	38 (59,4)
<b>Kontrolle</b>					
<i>TBX18</i>	19	19	-	-	-
<i>PITX2</i>	19	-	-	-	19
<b>Z-VAD-FMK</b>	<b>n</b>	<b>rechts</b>	<b>bilateral</b>	<b>fehlt</b>	<b>links</b>
<i>TBX18</i>	22	13 (59,1)	9 (40,9)	-	-
<b>Kontrolle</b>					
<i>TBX18</i>	10	10	-	-	-

**Tabelle 2: Häufigkeit von Embryonen mit randomisierter Expression von *TBX18* und *PITX2* nach Behandlung mit Omeprazol und Z-VAD-FMK**

Konzentration von 50µM auf die Embryonen appliziert. Dieser Eingriff führte bei einem Teil der Embryonen zu verändertem Herzlooping (40,6%, n = 26/64). Die Analyse der Expression von *PITX2* zeigt das Auftreten verschiedener links/rechts-Konfigurationen im Vergleich zur Kontrolle (n = 19) (Abb. 23, A). In den behandelten Embryonen ist *PITX2* völlig randomisiert und es kommt zu rechtsseitiger Expression (n = 7/64) (Tab.2; Abb. 23, B), bilateraler Expression (n = 9/64) (Abb. 23, C), und Verlust der Expression (n = 10/64) (Tab. 2; Abb. 23, D). Die Expressionsanalyse von *TBX18* in diesen Embryonen zeigt im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten erstmals eine Korrelation von *TBX18* mit der von *PITX2* markierten Lateralität. Tatsächlich zeigen Embryonen mit bilateraler Expression von *PITX2* keine asymmetrische *TBX18*-Expression im *Sinus venosus* (n = 9/64) (Abb.23, C). Der Verlust von *PITX2* wiederum geht mit der Ausprägung bilateraler *TBX18*-Expressionsdomänen einher (n = 10/64) (Abb.23, D).

### 3. Ergebnisse

Hieraus wird ersichtlich, dass die frühe Inhibition des asymmetrischen Ionenfluxes die Lateralität des gesamten Embryos beeinflusst. Dies beinhaltet auch die Lateralität der proepikardialen *TBX18* Expression, welche offensichtlich Teil einer rechtseitig determinierten Musterbildung ist, da der Verlust, des durch *PITX2* repräsentierten linksseitigen Signalweges, zur Ausprägung bilateraler PE-Anlagen führt. Hierbei muss festgehalten werden, dass dieses Experiment die embryonale Lateralität bereits vor der Etablierung der asymmetrischen Expression von *SHH* und *NODAL* randomisiert.



#### **Abb. 23: Die Behandlung mit dem Protonenpumpeninhibitor Omeprazol**

Die Inhibition der ATPase Aktivität im Primitivstreifen führt zu völliger Randomisierung der embryonalen Lateralität. Dies wird durch den Nachweis der *PITX2*-Expression (rot) deutlich. Die Herzkrümmung ist ebenfalls betroffen und es entstehen ungekrümmte (C) als auch linksgekrümmte Herzen (B, D) im Gegensatz zur Kontrolle (A). Der gleichzeitige Nachweis von *TBX18* zeigt die Korrelation von *TBX18* und *PITX2*. Entwickelt der Embryo zwei *PITX2*-negative rechte Seiten, kommt es zur Ausprägung bilateraler *TBX18*-Expressionsdomänen (D) und umgekehrt (C).

### **3.3.8 Die Inhibition der Apoptose im Primitivstreifen führt zu einer Randomisierung der links/rechts-Achse und der PE-Anlage**

Die Aufteilung in linke und rechte Seite wird in der frühen scheibenförmigen Blastula des Huhns durch die Induktion des Primitivstreifens erkennbar. Dieser entspringt auf der posterioren Seite der Keimscheibe und wächst daraufhin in die Länge, bis er eine antero-posteriore Ausdehnung erreicht, welche zwei Dritteln des gesamten Embryos entspricht (Hamburger und Hamilton, 1951). Der Primitivstreifen entsteht durch die konvergente Ingressionsbewegung der linken und rechten Epiblastenhälfte während der Gastrulation. Schicksalsanalysen von Zellen im Primitivstreifen zeigen, dass die Mehrheit durch diesen Bereich hindurchwandert und ihren bekannten Migrationsweg einhält (Lawson und Schoenwolf, 2001). Ein Teil der markierten Zellen verbleibt jedoch im Primitivstreifen und es scheint, als ob diese Zellen für die Identität der Mittellinie eine wesentliche Rolle spielen. Offenbar unterliegen diese Zellen, welche nicht an der Ingression teilnehmen, der Apoptose (Kelly et al, 2002). Der Verlust dieser Apoptose durch Behandlung mit einem spezifischen Apoptoseinhibitor führt zu aberranter links/rechts-Musterbildung. Dies steht durchaus im Einklang mit der Vorstellung einer frühen Determinierung der links/rechts-Achse durch die asymmetrische Aktivität von ATPasen im Primitivstreifen und gleichzeitiger Etablierung eines Gradienten niedrigmolekularer Faktoren durch die *gap junction*-Kommunikation. Den apoptotischen Zellen im Primitivstreifen kommt in diesem Modell die Rolle einer Mittellinienbarriere zu, welche die unkontrollierte Kommunikation beider Embryohälften verhindert.

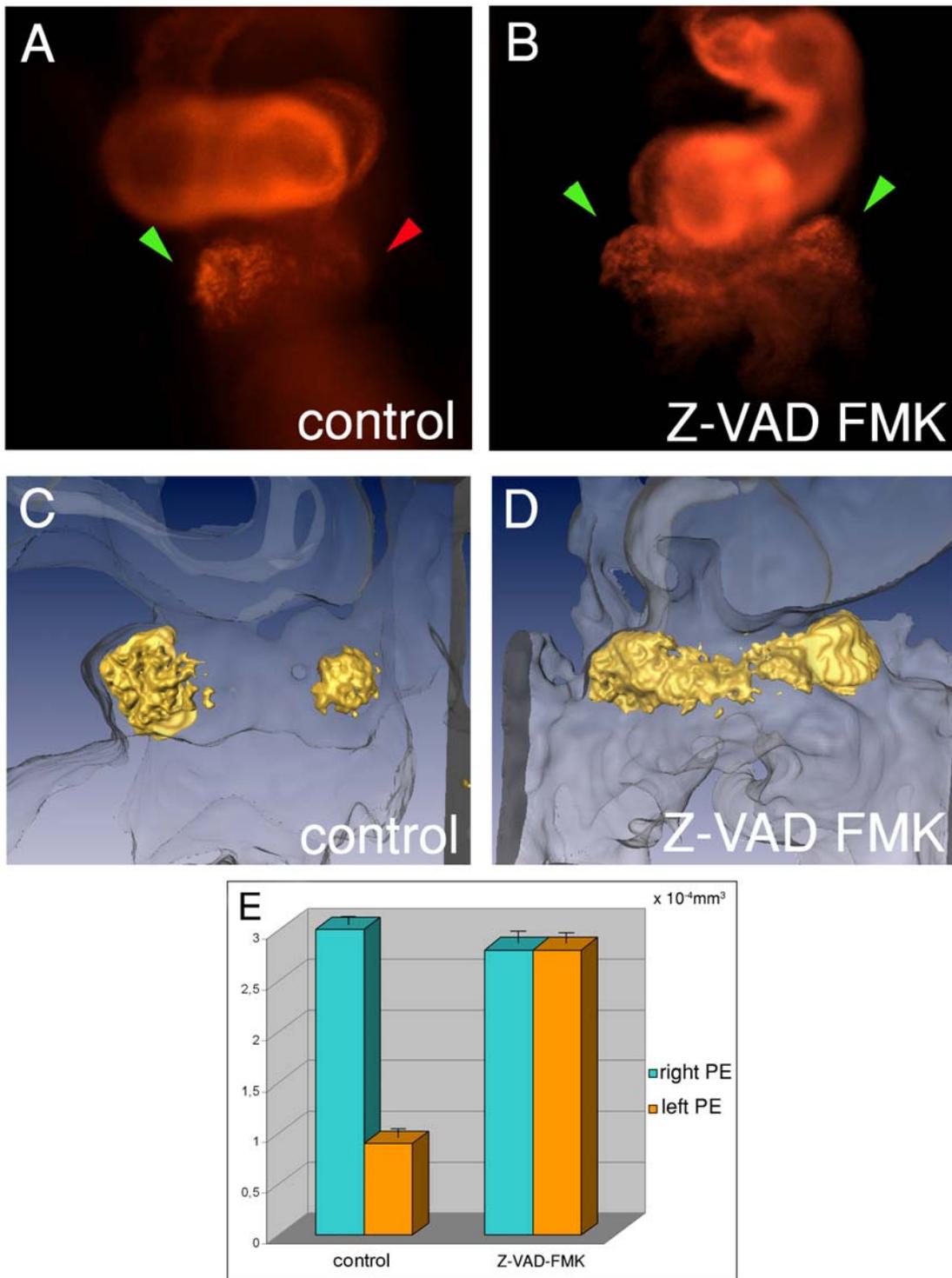
Da die Inhibition des Ionenfluxes im Primitivstreifen bereits die rechtseitige Expressionsdomäne von *TBX18* mobilisieren konnte (4.3.7), wurden Embryonen im Stadium HH3- mit dem Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK in einer Konzentration von 10 $\mu$ M behandelt, um die Rolle der apoptotischen Zellen in der Lateralisierung der proepikardialen Vorläufer zu untersuchen. Der Inhibitor Z-VAD-FMK blockiert die Aktivität von Proteasen der Caspase-Familie irreversibel und liegt in Form eines Methylesters vor, um die Zellpermeabilität zu gewährleisten.

Diese Behandlung führt zu aberranter Herzkrümmung und zur Bildung bilateraler *TBX18*-Expressionsdomänen (40,9 %, n = 9/22). (Abb. 24, B). Die Kontrollen entwickeln dagegen die normale Rechtskrümmung des Herzschlauches (n = 10) und zeigen ein großes *TBX18*-

### 3. Ergebnisse

positives Proepikard auf der rechten Seite und eine wesentlich kleinere *TBX18*-Expressionsdomäne auf der linken Seite (Abb.24, A). Um ein tieferes Verständnis für die Morphologie und die Veränderung der Expressionsdomänen zu entwickeln wurde eine 3D-Rekonstruktion der Sinusregion und der Expression von *TBX18* in Embryonen der Stadien HH 14/15 durchgeführt (Abb.24, C, D). Hierdurch wird deutlich, dass der Verlust der Apoptose im Primitivstreifen die Lateralität derart randomisiert, dass symmetrische *TBX18*-Expressionsdomänen auf den Sinushörnern induziert werden. Diese bilateralen proepikardialen Anlagen sind mit jeweils  $2,8 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$  von gleicher Grösse, dagegen ist in der Kontrolle die rechte Expressionsdomäne mit  $3 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$  im Gegensatz zur linken mit  $9 \times 10^{-5} \text{ mm}^3$  wesentlich größer ( $n = 3$ ) (Abb.24, C, D).

### 3. Ergebnisse



#### Abb. 24: Die Inhibition der Apoptose im Primitivstreifen

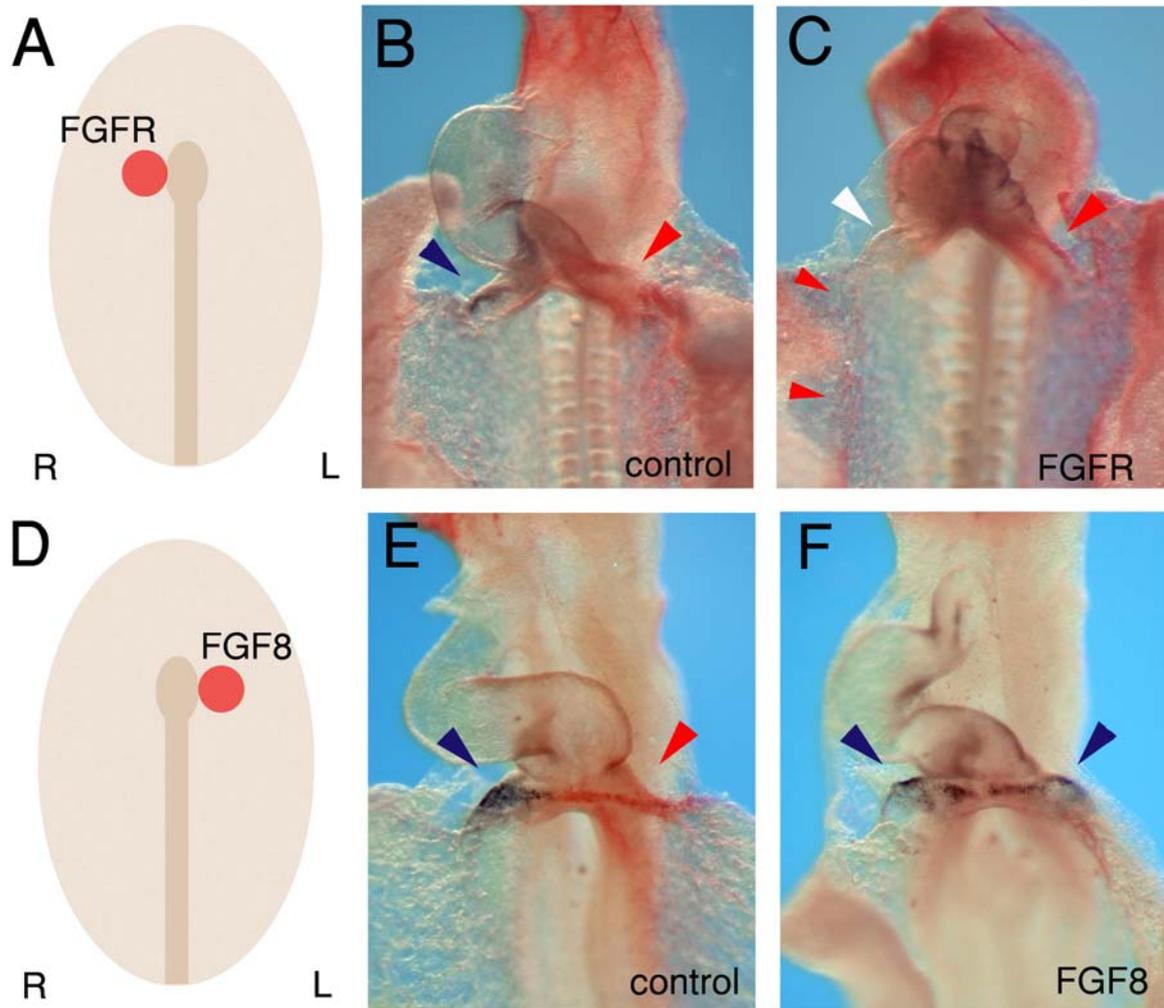
Die Inhibition der Apoptose im Primitivstreifen hat direkte Auswirkungen auf die Lateralität der Embryonen. Es entstehen neben linksgekrümmten Herzen auch bilaterale *TBX18*-positive PE-Anlagen (B). Diese ähneln in ihrer Ausprägung denen der Omeprazol-behandelten Embryonen. Die 3D Rekonstruktion der *TBX18*-Expressionsdomänen zeigt deutlich symmetrische PE Anlagen (D) im Gegensatz zur Kontrolle, welche auf der rechten Seite eine wesentlich größere Expressionsdomäne aufweist (C). grüner Pfeil: große, rechtseitige PE Anlage, roter Pfeil: linkseitige, retardierte PE Anlage.

### 3.3.9 FGF-Signale im Hensenschen Knoten sind induktiv für die asymmetrische proepikardiale *TBX18*-Expression

Im Hühnerembryo induziert die linkseitige *SHH*-Expression im Hensenschen Knoten die Expression von *NODAL* auf der linken Seite. Dies führt zur Selbstinduktion von *NODAL* in der lateralen Platte, welche *PITX2* auf der linken Seite induziert. Um die linke Seite auszuprägen, wird der *NODAL*-*PITX2*-Signalweg auf der rechten Seite unterdrückt. Hierbei spielt die Expression von *BMP4* auf der rechten Seite des Knotens eine wesentliche Rolle. Diese führt zur Induktion einer rechtseitigen *FGF8* Expressionsdomäne, welche über *FGF18* den transkriptionellen Repressor *SNAI1* induziert, welcher schliesslich *PITX2* reprimiert (Patel et al., 1999). Demnach wird die rechte Seite sozusagen über eine aktive Verhinderung der linksseitigen Identität definiert.

Die ektopische Induktion linksseitiger Marker auf der rechten Seite zeigte keinen Einfluss auf die Lateralität der *TBX18*-Expression im *Sinus venosus*. Die frühe Manipulation des Ionenfluxes und des Primitivstreifens waren allerdings in der Lage die Expression von *TBX18* zu randomisieren. Hieraus ergab sich die Vorstellung, dass die asymmetrische Induktion des proepikardialen Markers *TBX18* möglicherweise Teil eines rechtsseitig determinierten Musterbildungsprozesses ist. Daher wurde untersucht, ob die rechtseitige FGF-Aktivität im Knoten in diesem Kontext von Bedeutung ist. Zu diesem Zweck wurden Zellimplantate, welche diffusible FGF-Ligandenbindungsdomänen exprimieren, im Stadium HH 4 auf die rechte Seite des Knotens implantiert, um *FGF8/18* zu reprimieren. Dieser Eingriff führte interessanterweise zu einem Verlust der *TBX18*-Expression im rechten Sinus (58 %, n = 11/19) (Tab. 3; Abb. 25, B). Gleichzeitig kommt es zu einer rechtseitigen Induktion von *PITX2*. Um zu prüfen, ob FGF nicht nur notwendig sondern auch hinreichend für die Induktion der proepikardialen *TBX18*-Expression ist, wurde *FGF8*-Protein in einer Konzentration von 0,5µg/ml auf die linke Seite des Knotens im Stadium HH 4/5 implantiert. Dies führte zu einer Induktion gleichförmiger bilateraler Expressionsdomänen von *TBX18* und dem Verlust von *PITX2* (Tab. 3; Abb. 25, F) (n = 10/16). Offenbar ist die rechtseitige FGF-Expressionsdomäne im Knoten zum Stadium HH 5 induktiv für die asymmetrische Induktion von *TBX18* im *Sinus venosus*. Dies bestätigt die Annahme einer rechtsseitigen Festlegung der proepikardialen Identität und stellt darüber hinaus FGF im Hensenschen Knoten als rechtseitige Determinante heraus.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 25: Gain and loss of function der FGF-Aktivität am Hensenschen Knoten.**

Der Verlust von FGF auf der rechten Seite des Knotens führt zum Verlust der rechtsseitigen *TBX18*-Expression im Sinus und der Induktion von *PITX2* auf der rechten Seite (C). Durch Implantation von FGF8 auf der linken Seite werden bilaterale *TBX18*-Expressionsdomänen ausgebildet und *PITX2* wird im lateralen Plattenmesoderm nicht exprimiert (F). Blaue Pfeile: *TBX18*-Expression, Weisse Pfeile: fehlende *TBX18* Expression, rote Pfeile: *PITX2* Expression.

### 3. Ergebnisse

Implantation/ Behandlung	Marker- gene	Lateralität der Genexpression Häufigkeit (%)				
		n	rechts	bilateral	fehlt	links
<b>FGFR</b>	<i>TBX18</i>	19	8 (42,1)	-	11 (57,8)	-
	<i>PITX2</i>	19	-	11 (57,8)	-	8 (42,1)
<b>Kontrolle</b>	<i>TBX18</i>	9	9	-	-	-
	<i>PITX2</i>	9	-	-	-	9
<b>FGF8</b>	<i>TBX18</i>	16	6 (37,5)	10 (62,5)	-	-
	<i>PITX2</i>	16	-	-	10 (62,5)	6 (37,5)
<b>Kontrolle</b>	<i>TBX18</i>	10	10	-	-	-
	<i>PITX2</i>	10	-	-	-	10

**Tabelle 3: Häufigkeit von Embryonen mit aberranter Expression von *TBX18* und *PITX2* nach Implantation von FGFR und FGF8**

## 4. Diskussion

### 4.1 Die proepikardiale Expression von *TBX18*, *WT1* und *CFC*

In dieser Arbeit wurde die Expression der Markergene *TBX18*, *WT1* und *CFC* im Zeitraum von der Induktion des Proepikards bis zur Bildung des Epikards analysiert. Mitglieder der Familie der T-Box –Transkriptionsfaktoren sind von großer Bedeutung in der Regulation kardialer Reifungsprozesse. Dabei kooperieren sie mit anderen Transkriptionsfaktoren wie *Nkx2.5* und *Gata4*. Im Gegensatz zum primitiven Herzschauch weist der venöse Pol des Herzens zum Teil eine kardiale Differenzierung auf, welche sich unabhängig von *Nkx2.5* vollzieht. Offenbar ist der T-Box-Faktor *Tbx18* in diesen Prozess involviert und reguliert die Morphogenese der Einflussbahn (Christoffels et al., 2006). Auch in der Epikardentwicklung scheint *Tbx18* eine Rolle zu spielen. Der Ursprung des Epikards ist am venösen Pol zu finden, welcher proepikardiale Zellen hervorbringt, die das Herz kolonisieren und später in das koronare Blutgefäßsystems differenzieren. *Tbx18* zeigt in der Maus eine Expression im Proepikard als auch im Epikard (Haenig und Kispert, 2004) wobei die Funktion dieses Faktors in diesem Kontext bislang noch ungeklärt ist. Im Huhn wird *TBX18* ebenfalls im Proepikard exprimiert. Allerdings ist die Expression wie auch in der Maus zunächst besonders stark im Myokard zu detektieren. Doch sobald der looping Prozess des Herzschauches begonnen hat, beschränkt sich die Expression auf den rechten Sinus. Auch im Frosch konnte eine asymmetrische *tbx18*-Expression nachgewiesen werden. In der Maus ist diese venöse Expression dagegen bilateral (Schulte et al., 2007). Im Huhn wird *TBX18* in den nachfolgenden Stadien auf der rechten Seite in den ersten erkennbaren proepikardialen Bläschen exprimiert. Daraufhin wird auch auf dem linken Sinus eine weitaus kleinere Expressionsdomäne sichtbar, welche nie die Größe der rechten Domäne erreicht. Offensichtlich markiert *TBX18* spezifisch proepikardiale Zellen bereits zu einem Zeitpunkt, da noch keine morphologische Evidenz für eine Proepikardanlage vorliegt und persistiert dann bis zur Bildung des Epikards. Demnach kann für diesen Transkriptionsfaktor unter anderem eine potentielle Rolle bei der Induktion des Proepikards postuliert werden. Die kleinere Expressionsdomäne auf der linken Seite spricht also auch hier für die Induktion eines proepikardialen Genprogramms. Da die Mausmutante keinen epikardialen Phänotyp aufweist

#### 4. Diskussion

(Kraus et al., 2001), ist die Funktion von *Tbx18* bislang zwar noch unklar, dennoch ist es der früheste proepikardiale Marker. Die Tatsache, dass *TBX18* in der Maus, im Huhn und im Frosch in gleicher Weise im Proepikard exprimiert ist, sollte die Annahme einer essentiellen Funktion für die Entwicklung des Proepikards untermauern. Da auch andere T-Box-Faktoren wie *TBX5* im Proepikard exprimiert werden (Hatcher et al., 2004), könnte eine eventuelle Redundanz von T-Box-Faktoren im Proepikard für das Ausbleiben eines auffälligen epikardialen Phänotyps in Frage kommen.

Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *WT1* ist ebenfalls ein prominenter proepikardialer Marker. *WT1* weist grundsätzlich ein ähnliches Expressionsmuster wie *TBX18* auf. Beide Faktoren werden im Huhn im rechten Sinus, im Proepikard, als auch im intermediären Mesoderm exprimiert. Allerdings wird *WT1* nicht zeitgleich mit *TBX18* im rechten Sinus exprimiert, sondern einige Stunden später und darüberhinaus auch niemals auf der linken Seite. Dies könnte daraufhin deuten, dass *WT1* einen fortgeschrittenen Entwicklungsschritt proepikardialer Zellen markiert, welcher von Zellen der linken Seite nicht erreicht wird. Dagegen ist die Expression beider Faktoren im intermediären Mesoderm bilateral ausgeprägt. Offenbar verfügen beide Gene über regulatorische Elemente, welche die asymmetrische Expression im *Sinus venosus* kontrollieren. Auch im Zebrafisch wurde *wt1* als proepikardialer Marker etabliert, es wird jedoch bilateral am venösen Pol exprimiert, wobei der Verlust von *wt1* zu schweren epikardialen Entwicklungsstörungen führt (Serluca, 2007).

Da *TBX18* und *WT1* in ähnlicher Weise und dennoch zeitlich etwas versetzt exprimiert werden, könnte dies für eine epistatische Beziehung sprechen, in der *WT1* von *TBX18* reguliert wird. Tatsächlich scheint es Anzeichen dafür zu geben, dass der Verlust von *Tbx18* in der Maus, den Verlust von *Wt1* nach sich zieht (Kispert, persönliche Mitteilung). Die Expression von *WT1* persistiert im Epikard und wird herunterreguliert, sobald die epikardialen Zellen anfangen sich in Zellen der koronaren Blutgefäße zu differenzieren (Perez-Pomares et al., 2003). Dies unterstützt die Annahme, dass *WT1* als Repressor der Differenzierung fungiert. Ursprünglich wurde der Verlust von *WT1* in Zusammenhang mit der Ausbildung von Nephroblastomen gebracht. Daher stammt auch der Name, *Wilms tumor suppressor*. Interessanterweise existieren Daten, welche auf einen potentiellen ursprünglichen Zusammenhang der Bildung des Epikards und der Entwicklung nephridischer Strukturen hinweisen. Im Meeresneunauge wird das Herz offenbar von einer asymmetrischen Proepikardanlage bewachsen, welche im weiteren Verlauf die pronephridischen externen

#### 4. Diskussion

Glomeruli ausbildet (Pombal et al., 2008). In der Tat ist eine räumliche Nähe der venösen Expressionsdomäne und der im intermediären Mesoderm während der frühen Entwicklung auch in höheren Vertebraten nicht von der Hand zu weisen. Noch signifikanter ist im Huhn und in der Maus allerdings eine räumliche Nähe zur Leberanlage. So wurde untersucht, ob die Leberanlage ein induktives Potential für die Proepikardanlage besitzt.

Die Implantation von Leberprimordium in das laterale Plattenmesoderm führte zu einer ektopischen Induktion der Expression von WT1 und TBX18 (Ishi et al., 2007). Da beide Gene aber im intermediären Mesoderm ebenso exprimiert werden, ist nicht völlig geklärt ob diese Expression eine proepikardiale Identität repräsentiert, oder ob es sich eher um eine laterale Ausdehnung der intermediären mesodermalen Identität handelt.

Einen weiteren proepikardialen Marker stellt der Kompetenzfaktor CFC dar. CFC gehört zur Familie der EGF-CFC-Faktoren. Diese Faktoren fungieren als Korezeptoren beziehungsweise Koliganden für TGF $\beta$  Wachstumsfaktoren wie NODAL (Schlange et al., 2001). *CFC* wird bereits früh im Epiblasten exprimiert und ist in viele verschiedene Entwicklungsprozesse involviert. So führt der *Cfc1*-Verlust in Mäusen zu einer defizienten Mesoderminduktion sowie aberranter links/rechts Musterbildung (Ding et al., 1998; Schier and Talbot, 2001; Xu et al., 1999). Im Hühnerembryo wird *CFC* zum Stadium HH 13 in der kardialen Einflussbahn exprimiert, wobei sich die Expressionsdomäne weit nach caudal hin ausdehnt. Die Expression ist auf der rechten Seite wesentlich stärker ausgeprägt. In der weiteren Entwicklung wird *CFC* insbesondere in den Epithelbläschen des Proepikards exprimiert und persistiert auch während der Bildung des Epikards. Welche Funktion CFC bei der Entwicklung des Proepikards übernimmt, ist noch ungeklärt.

Um dies zu untersuchen, könnte man proepikardiale Explantate oder eine epikardiale Zelllinie mit einem dominant-negativen CFC-delta-EGF Konstrukt transfizieren, um beispielsweise die migratorische Aktivität der proepikardialen Zellen zu analysieren (Diplomarbeit C. Brenneis, 2004). Eine andere Möglichkeit die Funktion von CFC direkt im Hühnerembryo zu untersuchen, wäre die Transfektion sinuatrialer Vorläuferzellen *in vivo* mittels Elektroporation.

## 4.2 Die Rolle von BMP in der Entwicklung des Proepikards

### 4.2.1 *BMP2/4* sind im Sinusmyokard und im Proepikard exprimiert

Während der Kardiogenese ist der Wachstumsfaktor BMP2 von entscheidender Bedeutung, da er die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren wie NKX2.5 reguliert (Schultheiss et al., 1997, Andree et al., 1998, Schlange et al., 2000). Neben der frühen Induktion myokardialer Markergene ist BMP2 auch in morphogenetische Reifungsprozesse des Herzens involviert. In der Maus ist *Bmp4* durch Regulation von *Gata4* für die Entwicklung des venösen Pols verantwortlich (Rojas et al., 2005).

Im Hühnerembryo wird *BMP2* nach der Bildung des Herzschlauches in einer anteroposterior stark begrenzten Domäne bilateral im *Sinus venosus* exprimiert. Darüberhinaus wird *BMP2* auch im Ausflusstrakt exprimiert, wobei die Expression nahezu deckungsgleich mit der von *CFC* ist. Dies ist auch bereits in früheren Stadien zu beobachten. Während der Etablierung der links/rechts Asymmetrie steht *CFC* unter der Kontrolle von BMP2 (Schlange et al., 2001). *BMP2* wird auch in der weiteren Entwicklung unverändert stark im Sinusmyokard exprimiert, wobei das Proepikard zu keinem Zeitpunkt eine Expression von *BMP2* aufweist.

Kurz nach Induktion proepikardialer Marker zum Stadium HH 13 wird *BMP4* initial im rechten Sinus exprimiert. Die Expression ist zunächst sehr schwach, verstärkt sich in den darauffolgenden Stadien und persistiert dann im Proepikard. Im Vergleich mit der myokardialen Expression von *BMP2* ist die proepikardiale Expression von *BMP4* scheinbar deutlich schwächer ausgeprägt. Mit einer quantitativen Expressionsanalyse mittels *Real time* PCR könnte dieser Befund erhärtet werden. Offenbar wird am venösen Pol die Möglichkeit genutzt, die BMP Signalgebung gezielt über die Regulation der Expressionhöhe der beiden Isoformen BMP2 und BMP4 zu kontrollieren, da ansonsten beide Faktoren über die gleiche Rezeptorkomplexe wirken. Es wäre überdies interessant zu prüfen, ob die Typ I /II BMP-Rezeptoren im Proepikard und im Sinusmyokard unterschiedlich stark exprimiert werden. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob BMP Antagonisten im Proepikard exprimiert werden. Bislang scheint klar, dass der prominente Antagonist *Noggin* nicht im *Sinus venosus* exprimiert ist. Das Expressionsmuster der beiden BMP-Isoformen führte nunmehr zu der Fragestellung, inwieweit BMPs in die Ausbildung der proepikardialen Identität involviert ist.

### 4.2.2 BMP ist eine wichtige Determinante für die Ausbildung der proepikardialen Identität

Um zu überprüfen, ob BMP-Signale eine Rolle in der Entwicklung des Proepikards spielen, wurde mit Hilfe proepikardialer Explantate ein *in vitro*-Kultursystem etabliert, mit dem die Funktion von BMP untersucht wurde. Als Endpunkt der Analysen und als Maß der proepikardialen Identität wurde die Expressionshöhe des Markergens *TBX18* untersucht. Der Antagonismus der endogenen BMP-Aktivität durch ektopisches Noggin führte zu dem Verlust der *TBX18*-Expression. Die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Noggin und BMP2 führte zu der Annahme, dass ein gewisser Schwellenwert an BMP-Aktivität für die Ausprägung der vollen *TBX18*-Expressionshöhe nicht unterschritten werden darf. Da auch ein Überangebot von BMP-Signalen mit der proepikardialen Identität nicht kompatibel ist, wurde daraus geschlossen, dass eine intermediäre BMP-Aktivität in proepikardialen Zellen vorliegt. Dieser Befund wird von der geringeren Expressionshöhe von BMP im Proepikard im Gegensatz zum Sinusmyokard reflektiert. Allerdings ist damit immer noch nicht geklärt, wie viel schwächer die BMP-Aktivität im Proepikard im Gegensatz zum Sinusmyokard sein muss, um das proepikardiale *TBX18*-Expressionsprogramm voll zu entfalten. Dazu könnte man beispielweise Luziferase Assays mit SMAD-Bindungsstellen des *TBX18*-Promotors durchführen, um die entscheidenden Regionen zunächst zu identifizieren und deren Aktivität quantifizieren zu können. Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung wäre der immunhistochemische Nachweis der BMP-Signale mittels Phospho-SMAD Antikörpern. Um zu klären, ob die intermediäre Dosis der proepikardialen BMP-Signalgebung auf einer restriktiven Expression von BMP-Rezeptoren, oder auf einem aktiven Antagonismus beruht, wären quantitative Expressionstudien mit Hilfe der *Real time* PCR sinnvoll. Mit Nutzung der Microarray Technologie und der anschließenden bioinformatischen Datenbankanalyse besteht überdies die Möglichkeit eine Vielzahl von differentiell exprimierten Genen in Proepikard und Myokard zu identifizieren.

Da die bisherigen Daten auf *in vitro*-Experimenten beruhen, wurden Manipulationen am Hühnerembryo durchgeführt. Diese hatten das Ziel, die BMP Signalgebung *in vivo* zu inhibieren. Auch *in vivo* führte ektopisches Noggin sowie BMP zu einem nahezu völligen Verlust der *TBX18*-Expression. Damit wurde deutlich gezeigt, dass die BMP-Aktivität im rechten Sinus nicht nur für die Aufrechterhaltung des proepikardialen Genprogramms von

## 4. Diskussion

Bedeutung ist. Offensichtlich kann durch eine Veränderung der endogenen BMP-Signalgebung keine Induktion der proepikardialen *TBX18*-Expression stattfinden. Es bedarf allerdings noch der Analysen der anderen bekannten Markergene, um den Einfluss von BMP-Signalen zu erfassen. Darüberhinaus wäre es sinnvoll zu untersuchen, ob sich ohne BMP überhaupt ein Proepikard bilden kann und wenn ja, wie weit es sich entwickeln würde. Möglicherweise steht BMP4 im rechten Sinus direkt am Anfang der Induktion proepikardialer Marker, welche auch in ihrer weiteren Expression von einer fein regulierten BMP-Dosis abhängen.

### 4.2.3 Das epikardiale Schicksal und das Differenzierungspotential proepikardialer Zellen

Die epikardialen Zellen stellen multipotente Vorläuferzellen dar. Nach einer Epithel-mesenchymalen Transition dringen die Zellen in den subepikardialen Raum und in das Myokard ein. Dort beginnen sie das koronare Blutgefäßsystem zu bilden, indem sie Fibroblasten bilden und in Endothel- und Glattmuskelzellen differenzieren (Perez-Pomares et al., 2002). Dieser Prozess ist mit dem Verlust proepikardialer Marker wie *TBX18* und *WT1* verknüpft, dessen Expression bis zu diesem Zeitpunkt in epikardialen Zellen persistiert. Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass proepikardiale Zellen neben der Bildung der Herzkranzgefäße auch einen Beitrag zum Aufbau des Myokards leisten. Dieser scheint über die Stimulation des myokardialen Dickenwachstums hinauszugehen. In der Maus konnte gezeigt werden, dass *Tbx18*-positive proepikardiale Zellen nicht nur in Fibroblasten und koronare Glattmuskelzellen differenzieren, sondern auch Myozyten der Atrien und des Ventrikels bilden können (Cai et al., 2008). Dies stellt eine zusätzliche Dimension des Differenzierungspotentials proepikardialer Zellen *in vivo* dar.

Die Behandlung proepikardialer Explantate mit BMP2 zog nicht nur den bereits beschriebenen Verlust der *TBX18*-Expression nach sich, sondern auch die Induktion des myokardialen Markers *VMHC*. Offenbar führt der Verlust des proepikardialen Genprogramms durch die Modifikation der BMP Signalgebung zu einer Induktion von Myokard. Dies wurde zusätzlich mit einer immunhistochemischen Analyse der Expression von *WT1* und *VMHC* in den behandelten Explantaten untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass ein Teil der kultivierten Zellen in Myozyten differenziert war. Unter dem Einfluss von BMP2 bildeten

#### 4. Diskussion

sich kontraktile zusammenhängende Zellhaufen, die sich hauptsächlich in der Mitte des konzentrisch ausgewachsenen Explantats befanden. Es konnten jedoch auch innerhalb der peripheren Epithelschicht vereinzelte Myozyten gefunden werden. Da diese Zellen noch WT1 im Kern exprimierten, kann angenommen werden, dass sie tatsächlich proepikardialen Ursprungs sind und keine myokardialen Kontaminationen.

Die Tatsache, dass nur ein Teil der proepikardialen Zellen ein myozytäres Schicksal angenommen hat, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist es wahrscheinlich, dass das Proepikard nicht eine homogene Zellpopulation ist, sondern dass diese Struktur aus Zellen mit verschiedenen Schicksalen besteht. Das Proepikard besteht aus epithelialen Bläschen, welche mit extrazellulärer Matrix und mesenchymalen Zellen angefüllt sind (Nahirney et al, 2003). Dies kann auch durch das Expressionsmuster der PE-Marker bestätigt werden, welche insbesondere in den Epithelbläschen und deutlich schwächer im mesenchymalen Kern der Anlage exprimiert werden. Die Frage nach der potentiellen Diversität proepikardialer Zellen ist eng mit deren Herkunft verknüpft. Bislang ist noch nicht hinreichend geklärt, ob diese Zellen aus dem Sinusmyokard hervorgehen oder aus einer Region des frühen Herzfeldes stammen, aus der sich posteriore Strukturen des Herzens entwickeln. Es wäre auch vorstellbar, dass das Proepikard während seiner Entwicklung weitere Zellen rekrutiert, welche über besonderes Differenzierungspotential verfügen. Um den Ursprung dieser Zellen aufzuklären, wären Schicksalsstudien, möglicherweise mit Hilfe der bewährten Wachtelhuhn Chimären (Männer, 1993) oder auch fluoreszierende DiI-Markierungen vorstellbar. Die Elektroporation sinuatrialer Vorläuferzellen im Primitivstreifen deutet bereits an, dass sich proepikardiale Vorläufer offenbar im caudalen Bereich der Herzfelder markieren lassen. Allerdings war diese Methode darauf ausgelegt, so viele Zellen wie möglich in diesem Bereich zu transfizieren. Für eine Schicksalsanalyse muss versucht werden, nur wenige Zellen zu markieren.

Ein anderer Grund für die begrenzte myozytäre Differenzierung der Explantate ist möglicherweise in der Kulturmethode zu suchen. Eine andere Forschergruppe, welche sich parallel mit diesem Problem auseinandersetzte, war in der Lage durch die Kultivierung in einem Kollagenkissen unter Serumzugabe die Dauer der Kultur auf bis zu 6 Tage auszudehnen. Dieses führte zu der spontanen Bildung kontraktiler Myozyten, welche sich durch Zugabe von BMP2 zusätzlich induzieren liessen (Kruithof et al., 2006). Da in der vorliegenden Arbeit niemals eine spontane Differenzierung in Myozyten beobachtet wurde,

#### 4. Diskussion

könnte die Beobachtung der Arbeitsgruppe um van den Hoff unter anderem auf die Behandlung mit Serum zurückgeführt werden.

Die Tatsache, dass hohe Konzentrationen von BMP2 im venösen Pol die Differenzierung in Myokard fördern und gleichzeitig eine niedrige BMP-Dosis entscheidend für die Ausbildung der proepikardialen Identität ist, geht durchaus konform mit der Funktion, die für BMP bei der mediolateralen Musterbildung des Embryos angenommen wird. Im Gegensatz zum lateralen Plattenmesoderm (LPM), ist das paraxiale Mesoderm in der Mitte des Embryos nahezu frei von BMP-Signalen. Das intermediäre Mesoderm (IM) weist eine etwas höheres BMP-Signal auf, so dass ein BMP-Gradient vorliegt, der von der Mitte bis zum LPM ansteigt. Im paraxialen Mesoderm (PM) ist FOXC in Abwesenheit von BMP in der Lage die somitenspezifischen Gene *PAX7* und *PARAXIS* zu induzieren (James und Schultheiss, 2005). Gleichzeitig wird die Expression von IM-spezifischen Genen wie *PAX2* und *LIMI* inhibiert. Die etwas höhere BMP-Konzentration im IM führt dagegen durch Inhibition von FOXC zu einer Expression von *PAX2* und *LIMI*. Die hohe BMP-Aktivität im LPM inhibiert schliesslich die Expression IM- und PM-spezifischer Gene und induziert LPM-spezifische Gene. Es wäre interessant zu untersuchen, ob eine ähnliche FOXC-medierte Regulation in Abhängigkeit von BMP auch im *Sinus venosus* und im Proepikard wirksam ist. Tatsächlich wurde in der Maus bereits ein epikardialer Phänotyp nach Verlust von FoxC gezeigt (Seo und Kume, 2006). Scheinbar ist die Epithel-mesenchymale Transition epikardialer Zellen in diesen Mutanten beschleunigt, was zu einer verfrühten Differenzierung in Endothel- und Glattmuskelzellen führt.

Der Ursprung proepikardialer Zellen ist bislang unklar. Dennoch konnten durch Schicksalsanalysen mit Hilfe von Cre-Rekombinase Techniken in der Maus erarbeitet werden, dass proepikardiale Zellen ebenso wie myokardiale und endokardiale Zellen *Mesp1* exprimieren (Saga et al., 2000). Da sie sich zudem auf dem Sinus entwickeln, besteht die Möglichkeit, dass proepikardiale Vorläufer aus ähnlichen Regionen wie der *Sinus venosus* hervorgehen und dementsprechend in Randbereichen des lateralen Plattenmesoderms anzutreffen sind (Moorman et al., 2007; Redkar et al., 2002). Proepikardiale Zellen können also, wie myokardiale Zellen auch, als Derivate des lateralen Plattenmesoderms angesehen werden. Dabei wird deutlich, dass Zellen des Proepikards nicht nur in ihrer Entwicklung zu koronaren Vorläuferzellen ein breites Differenzierungspotential besitzen. Darüberhinaus ist es offenbar möglich, zumindest einem Teil der Zellen durch ektopisches BMP ein myokardiales

#### 4. Diskussion

Schicksal zu geben. Gleichzeitig ist eine intermediäre BMP-Konzentration für die Ausprägung der proepikardialen Identität essentiell. Werden die Daten aus der Maus beachtet, so scheint die Fähigkeit, *in vivo* in Myokard zu differenzieren, Teil der epikardialen Zelllinie zu sein. Es sollte allerdings geklärt werden, ob diese Fähigkeit für alle proepikardialen Zellen gilt, oder ob sie nur einer spezifischen Subpopulation vorbehalten ist.

## 4.3 Die asymmetrische Proepikardentwicklung

### 4.3.1 Die unilaterale Induktion des Proepikards

Im Hühnerembryo entwickelt sich das Proepikard durch starke Proliferation auf dem rechten Sinushorn. Dieser Entwicklung geht die asymmetrische Induktion proepikardialer Markergene voraus. Das asymmetrische Wachstum ist bereits ab Stadium HH 14 mittels BrdU-Inkorporation zu detektieren und äussert sich in der Entstehung der ersten mesothelialen Bläschen auf der rechten Seite. Gleichzeitig ist die Expression proepikardialer Marker ab diesem Stadium nicht mehr im gesamten rechten Sinus nachzuweisen, sondern beschränkt sich auf die dem Herzen zugewandten frühen Epithelzotten. Die schwächere Proliferation des linken Sinus führt auch hier zur Bildung epithelialer Bläschen, allerdings sind diese erst ab Stadium HH 16 auf dem linken Sinushorn erkennbar (Schulte et al., 2007). Zu diesem Zeitpunkt ist das rechte Proepikard bereits stark ausgewachsen. Die Epithelbläschen auf der linken Seite könnte man durchaus als linke Proepikardanlage bezeichnen, denn sie exprimieren ebenfalls *TBX18*, wenn auch zeitlich um einige Stadien verzögert. Darüberhinaus erreicht diese Expressionsdomäne zu keinem Zeitpunkt auch nur annähernd die Grösse der rechten Domäne. Dies ist auf die Induzierung von Apoptose im linken Sinus zurückzuführen, welche ab dem Stadium HH 15 einsetzt. Zum Stadium 17 liegt also auf dem rechten Sinus ein voll ausgewachsenes Proepikard vor und auf dem linken Sinus eine retardierte Proepikardanlage, welche offenbar an der Epikardialisierung des Herzens keinen substantiellen Anteil hat. Dies wurde unter anderem durch die Induktion des *cardia bifida* Phänotyps im Hühnerembryo deutlich (Schulte et al., 2007). Dieser Phänotyp kann durch Dissektion der Darmpforte zum Stadium HH 7 erzeugt werden. Dabei wird die Fusion der Herzfelder verhindert und es kommt zur Ausbildung bilateraler Herzscläuche. In diesen Embryonen kommt es dennoch nicht zur Induktion bilateraler Proepikardanlagen und dementsprechend verläuft auch hier die Epikardentwicklung asymmetrisch. Dies führt zu einem Epikardbewuchs des rechten Herzens, während das linke Herz keine Epikardschicht aufzuweisen scheint. Offenbar ist die linke Proepikardanlage nicht in der Lage das Herz zu kolonisieren. Darüberhinaus wird hier bereits deutlich, dass die rechtsseitige Induktion des Proepikards nicht von der Bildung des primitiven Herzscllauches abhängt, sondern wesentlich früher determiniert ist.

#### 4. Diskussion

Die asymmetrische Proepikardentwicklung ist innerhalb der Vertebraten jedoch keine Ausnahme. Auch im Frosch entwickelt sich das Proepikard auf dem rechten Sinus und ist dabei ebenfalls von *TBX18*-Expression gekennzeichnet. Nach 41 Stunden beginnt die Kontaktaufnahme des Proepikards mit dem Herzen. Zwischen der asymmetrischen Bildung des Proepikards und der Epikardialisierung vergehen im Frosch nur ungefähr 10 Stunden. Ob die Proepikardentwicklung im Frosch nur auf der rechten Seite verläuft, oder ob sich wie im Huhn verspätet noch eine retardierte linkseitige PE-Anlage ausbildet, wurde noch nicht untersucht. Interessanterweise scheint der Mechanismus der Besiedlung des Herzens in Organismen mit asymmetrischer Proepikardentwicklung ähnlich zu verlaufen. Im Huhn als auch im Frosch nehmen die proepikardialen Zellen über eine kontinuierliche Gewebebrücke Kontakt mit dem Ventrikel auf, welche über einige Stadien hinweg erhalten bleibt (Männer, 1993; Männer, persönliche Mitteilung). Mit dem Meerneunauge (*Petromyzon marinus*) kommt ein weiterer Organismus hinzu, der eine asymmetrische Proepikardentwicklung aufweist. Das Meeresneunauge gehört zu den Kieferlosen (*Agnatha*) und zeigt zwar zunächst bilaterale Anlagen, allerdings nimmt nur die rechte PE-Anlage Kontakt zum Herzen auf (Pombal et al. 2008). Da das Neunauge zu den primitivsten Vertebraten gehört, ist bislang unklar, ob der Ablauf seiner Proepikardentwicklung den Grundzustand oder eher eine weitere Alternative der Epikardentwicklung darstellt. Dies liegt unter anderem daran, dass sich die proepikardialen Anlagen im Neunauge aus migratorischen Zellen am Dach des Coeloms zwischen Pronephros und Darm entwickeln und im weiteren Verlauf an der Entwicklung der Niere teilnehmen. Es wurde vorgeschlagen, dass der anteriore Teil der pronephridischen externen Glomeruli in höheren Vertebraten erhalten wurde und sich aus diesem das eigentliche Proepikard entwickelte (Pombal et al. 2008).

In der Maus liegen dagegen bilaterale Proepikardanlagen vor und auch der Mechanismus der Besiedlung ist ein anderer. Anstelle einer kontinuierlichen Gewebebrücke werden proepikardiale Vesikel abgesetzt, welche die perikardiale Höhle frei passieren und schliesslich auf dem Herzen landen (Schulte et al., 2007). Im Katzenhai entwickeln sich ebenfalls bilaterale Anlagen, wobei die rechte Seite mit dem Herzen über eine Brücke in Kontakt tritt, die linke Seite aller Ansicht nach Vesikel absetzt (Munoz-Chapuli et al., 1994, Pombal et al., 2008). Obwohl das Proepikard bereits in den wichtigsten Vertebratenmodellorganismen studiert wurde, ist es schwierig, eine evolutionäre Entwicklung des Proepikards nachzuzeichnen um den Ursprung dieser Vorläuferpopulation zu erfassen.

## 4. Diskussion

Darüberhinaus liegen eine Bandbreite an verschiedenen Besiedlungsmechanismen sowie gravierende Unterschiede in der Lateralität der Proepikardanlage innerhalb der Vertebraten vor. Man kann jedoch festhalten, dass die unilaterale Entwicklung mit der Ausbildung einer sekundären Gewebebrücke korreliert, welche einen gerichteten Bewuchs des Herzens ermöglicht. Darüberhinaus scheint die Kontaktaufnahme der rechten Anlage mit dem Herzen über eine kontinuierliche Brücke ein basaler und präferentieller Mechanismus der Epikardbildung zu sein, der von den Kieferlosen, über die Knorpelfische und Amphibien bis hin zu den Vögeln genutzt wird.

### **4.3.2 Der linksseitige NODAL-PITX2-Signalweg ist nicht für die asymmetrische Induktion des Proepikards verantwortlich**

Da die Proepikardentwicklung im Hühnerembryo entlang der links/rechts-Achse asymmetrisch verläuft, wurde untersucht, inwieweit der NODAL-PITX2-Signalweg diese Entwicklung reguliert. Der Transkriptionsfaktor PITX2 steht am Ende einer Signalkaskade, welche am Hensenschen Knoten durch die asymmetrische Expression von *SHH* auf der linken Seite induziert wird. Eine zentrale Rolle hierbei kommt dem TGF $\beta$ -Faktor NODAL zu. Er wird durch SHH im Knoten induziert und kann sich schliesslich mit Hilfe von CFC im lateralen Plattenmesoderm selbst induzieren (Schlange et al., 2002). Hier breitet sich NODAL in antero-posteriorer Richtung aus und induziert die Expression von *PITX2* und *BAPX1* (Schneider et al., 1999). Die Expression von *NODAL* ist zeitlich auf wenige Stadien begrenzt. *PITX2* dagegen persistiert über einen längeren Zeitraum. Die linke Seite des Embryos ist durch die Expression von *PITX2* gekennzeichnet, während die rechte Seite frei von *PITX2* bleibt. Dies wird durch eine aktive Repression von *PITX2* durch *SNAI1* realisiert (Patel et al., 1999). *SNAI1* wird wiederum durch die rechtsseitige Aktivität von FGF8 im Hensenschen Knoten induziert (Isaac et al., 1997). Die rechte Seite wird also durch die Repression von *PITX2* definiert. Daraus folgend wurde eine erste Arbeitshypothese aufgestellt, welche von einer Repression der Proepikardentwicklung auf der linken Seite durch den NODAL-PITX2-Signalweg ausgeht. Diese Hypothese wurde durch das Expressionsmuster von *PITX2* im linken Sinus unterstützt und den Umstand, das *TBX18* im dorsalen Mesenterium offenbar von PITX2 reprimiert wird (Tabin, persönliche Mitteilung). Um dies zu überprüfen, wurden Manipulationen durchgeführt, welche die ektopische

#### 4. Diskussion

Expression linksseitiger Marker auf der rechten Seite zum Ziel hatten. Durch Implantation von SHH-produzierenden Zellen sowie NODAL-beladenen Depotperlen konnten bilaterale Expressionsdomänen von *NODAL* beziehungsweise *PITX2* erzeugt werden. Auch die Behandlung mit CFC-Antisense Oligonukleotiden führte zu bilateraler *PITX2*-Expression. Dennoch wurde die Expression von *TBX18* im rechten Sinus nicht beeinflusst. Um sicherzustellen, dass die Dosis von *PITX2* in den ektopisch erzeugten Expressionsdomänen nicht zu gering war, wurden sinuatriale Vorläuferzellen mit *PITX2* überexprimiert. Auf diese Weise konnte *PITX2* im gesamten sinuatrialen Bereich des Herzens exprimiert werden. Jedoch zeigte auch dieser Eingriff keinen repressiven Effekt auf die Expression von *TBX18*. Es muss daher angenommen werden, dass weder *PITX2* noch *NODAL* oder *SHH* einen repressiven Effekt auf die Expression von *TBX18* im *Sinus venosus* haben. Die aufgestellte Arbeitshypothese konnte somit nicht verifiziert werden. Dies ist umso erstaunlicher, da bereits gezeigt wurde, dass nicht nur die Einflussbahn des Herzens der Musterbildung von *Pitx2* unterliegt, sondern auch die Asymmetrie des Atriums und des Sinusknotens von *Pitx2* reguliert werden (Campione et al, 2001; Mommersteg et al., 2007). Dies ist ein Hinweis darauf, dass proepikardiale Zellen bereits früh ein eigenes Schicksal besitzen, dass sie von sinuatrialem Myokard unterscheidet. Obwohl der NODAL-PITX2-Signalweg offenbar nicht in die Induktion des Proepikards involviert ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass er für die Induktion der linksseitigen Apoptose proepikardialer Zellen von Bedeutung ist. Dies ist bislang nicht untersucht worden und könnte beispielsweise mit Hilfe von Sinusexplantatkulturen *in vitro* erarbeitet werden.

#### **4.3.3 Der frühe Bruch der Symmetrie durch asymmetrischen Ionenflux und Apoptose im Primitivstreifen beeinflusst die proepikardiale Lateralität**

Die asymmetrische Expression von *SHH* im Hensenschen Knoten ist zwar für die Induktion des NODAL-Signalweges essentiell, allerdings markiert sie nicht den initialen Bruch der embryonalen links/rechts Symmetrie. Bereits im Stadium HH 3 weist der Primitivstreifen des Hühnerembryos ein asymmetrisches Membranpotential auf (Levin et al., 1997). Dieses wird durch  $H^+/K^+$ -ATPasen sowie  $H^+/V$ -ATPasen generiert, welche asymmetrisch im Primitivstreifen exprimiert werden. Die Aktivität dieser ATPasen ist hochkonserviert und

#### 4. Diskussion

wurde neben dem Huhn und dem Frosch (Levin et al., 2002; Adams et al., 2006) auch im Zebrafisch, *Ciona* (Shimeld und Levin, 2006) und im Seeigel beobachtet (Duboc et al., 2005; Hibino et al., 2006). Bereits im Stadium HH2 konnte die Bedeutung der Kommunikation der beiden Blastodermhälften für die Etablierung der links/rechts-Asymmetrie nachgewiesen werden, welche über die *gap junctions* vermittelt wird. Daher wird sie als *gap junction*-Kommunikation bezeichnet und ist direkt von der Expression von Connexin 43 abhängig (Levin und Mercola, 1999). Im Huhn und im Frosch führte die Inhibition von Serotoninrezeptoren zu Heterotaxie (Fukumoto et al., 2005). Daher wird angenommen, dass die Akkumulation niedrigmolekularer Faktoren wie Serotonin über die *gap junctions* entlang des generierten asymmetrischen Membranpotentials verläuft und eine wesentliche Rolle für die frühe Festlegung der links/rechts Achse spielt (Levin et al., 2002).

Da die rechtseitige *TBX18*-Expression offenbar unabhängig von Faktoren wie NODAL und PITX2 ist, wurde eine zweite Arbeitshypothese formuliert, welche von einer frühen Determinierung der Lateralität proepikardialer Zellen ausging. Um dies zu überprüfen, wurden Hühnerembryonen mit dem Protonenpumpeninhibitor Omeprazol behandelt. Dies führte zu einer Randomisierung der links/rechts Achse, wie man anhand der Analyse des linksseitigen Markers *PITX2* nachweisen konnte. Dabei wiesen Embryonen ohne *PITX2* Expression bilaterale *TBX18*-Expressionsdomänen auf. Darüberhinaus zeigten diese Domänen nicht nur die typische Form früher Proepikardanlagen, sondern fusionierten auch ventral auf dem *Sinus venosus*. Wie bereits beschrieben vermochte der Einfluss des ab Stadium HH 4/5 induzierten SHH-NODAL-PITX2-Signalweges die rechtsseitige *TBX18*-Expression nicht zu beeinflussen. Dagegen führte der Verlust der rechten Identität durch Inhibition der im Stadium HH 3 asymmetrisch aktiven ATPasen zu einem Verlust der asymmetrischen *TBX18*-Expression. Fasst man dies zusammen, so kann man sagen, dass *TBX18* im Sinus nicht auf der linken Seite reprimiert wird, sondern vielmehr Teil einer rechtseitig induzierten Musterbildung sein muss.

Das asymmetrische Membranpotential wird durch eine Barriere aus apoptotischen Zellen im Primitivstreifen aufrechterhalten. Wird diese Apoptose blockiert, führt dies zu aberranter links/rechts Musterbildung (Mikawa et al., 2002). Interessanterweise hat die spezifische Inhibition der Apoptose durch das Reagenz Z-FAD-VMK die Ausprägung bilateraler *TBX18* - Expressionsdomänen zur Folge. Dieser Befund zeigt die Relevanz einer intakten apoptotischen Mittellinie für die Ausprägung einer rechten *TBX18*-Expressionsdomäne auf

## 4. Diskussion

und untermauert die Vorstellung einer frühen Determinierung der PE-Lateralität. Ein interessantes weiterführendes Experiment wäre, zu überprüfen, ob die bilateralen *TBX18*-positiven Anlagen auch tatsächlich in der Lage sind, das Herz zu besiedeln.

Bislang ist unklar, wie der asymmetrische Transport niedrigmolekularer Faktoren in den Symmetriebruch des Hensenschens Knotens mündet. Es gibt zwar im Kaninchen einige Hinweise auf eine Wechselwirkung von *gap junction* Kommunikation und FGF8-Aktivität bei der rechtseitigen Repression von NODAL, jedoch bieten auch sie bislang keine tiefere mechanistische Einsicht (Feistel und Blum, 2008).

### **4.3.4 Die rechtsseitige FGF-Signalgebung im Hensschen Knoten determiniert die asymmetrische Induktion des Proepikards**

Da die bisherigen Experimente die rechtsseitige *TBX18*-Expression im Sinus als Teil einer rechtsseitigen Identität herausstellten und nicht als Überrest einer linkseitig reprimierten Anlage, wurde der Henssche Knoten erneut manipuliert. Es war unbefriedigend anzunehmen, dass das Proepikard ausschliesslich von einem Mechanismus lateralisiert wird, welcher bereits im Stadium HH3 wirksam ist. Daher rückten nunmehr rechtsseitig im Knoten exprimierte Gene in den Vordergrund. FGF8 ist einer der Faktoren mit einer prominenten rechtsseitigen Expression und wird dabei von BMP4 und Aktivin kontrolliert (Boettger et al., 1999). Seinerseits reguliert FGF8 die Expression von SNAI1 auf der rechten Seite, dessen Rolle eine aktive Repression von PITX2 ist (Patel et al., 1999).

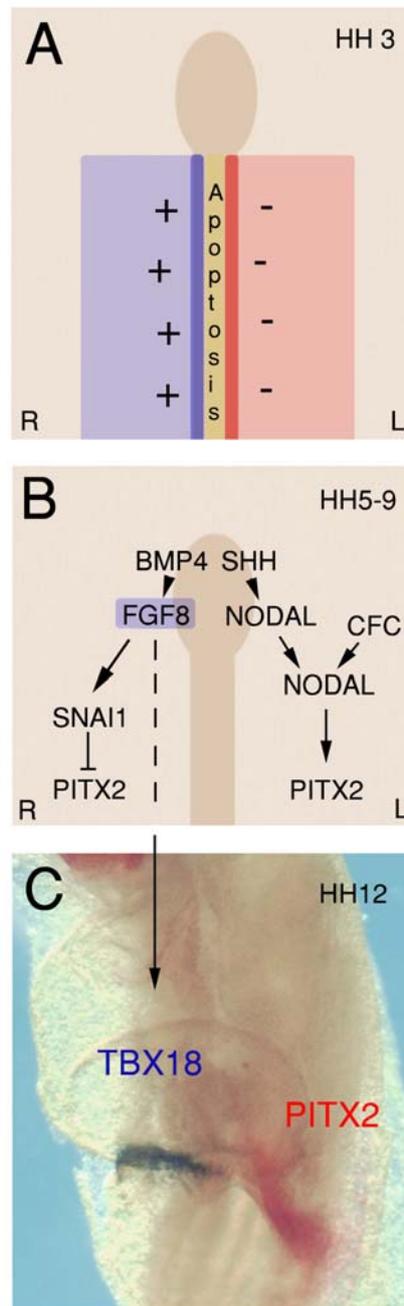
Zunächst wurden Experimente durchgeführt, die den Verlust der FGF-Aktivität im Knoten zum Ziel hatten. Dazu wurden Zellen implantiert, welche diffusible Ligandenbindungsdomänen verschiedener FGF Rezeptoren (FGFR1/2/4) sezernierten, da die Affinität von FGF8 zu FGFR3/4 am stärksten ist (Zhang et al., 2006). Durch diesen Eingriff war es möglich, die Induktion der *TBX18*-Expression im rechten Sinus zu verhindern. FGF8 ist notwendig für die Induktion der Proepikards. Ob FGF8 ausreichend für die Induktion von *TBX18* ist, wurde durch die Implantation von FGF8-Protein auf die linke Seite des Knotens untersucht. Tatsächlich erzeugte diese Manipulation eine bilaterale *TBX18*-Expression in beiden Sinushörnern. Ein Merkmal symmetrischer Expressionsdomänen scheint die ventrale Fusion zu sein, welche möglicherweise mit den fehlenden Apoptose-induzierenden Signalen auf der linken Seite zusammenhängt. Embryonen mit linksseitiger

#### 4. Diskussion

FGF8 Implantation zeigen keine Expression von *PITX2*, woraus zu schliessen ist, daß sich keine linksseitige Identität ausbildet. FGF8 ist nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die Induktion der proepikardialen *TBX18*-Expression. Damit konnte ein Schlüsselfaktor der proepikardialen Entwicklung identifiziert werden, der ein idealer Ansatzpunkt für weitere Analysen ist, da bereits weitere Gene bekannt sind, die ober – und unterhalb von FGF8 agieren. Dabei kommt beispielsweise *SNAI1* als transkriptioneller Repressor von *PITX2* in Frage, welcher der Kontrolle von FGF8 unterliegt. Um die Rolle von *SNAI1* in der Induktion des Proepikard zu klären, könnte man Embryonen mit Antisense-Oligonukleotiden behandeln. Es muss angenommen werden, dass FGF8 im Knoten im Stadium HH 5 über die Regulation weiterer Faktoren bis zum Stadium HH 11 die rechtsseitige Proepikardanlage induziert. Ein derartiger induktiver Signalweg auf der rechten Seite stellt ein Novum in der Etablierung asymmetrischer Organanlagen dar. Die bisherige Vorstellung war von der Induktion einer linken Identität geleitet, welche durch die Expression von *PITX2* gekennzeichnet ist. Daraus ergibt sich die Identität einer rechten Seite, auf der FGF8 die Repression von *PITX2* kontrolliert. Offenbar ist diese Vorstellung jedoch unzureichend. Die hier vorgestellten Daten weisen klar auf das induktive Potential der rechtsseitigen FGF8 Signalgebung hin und präsentieren das Proepikard als eine Anlage, dessen asymmetrische Entwicklung direkt von diesem Signalzentrum abhängt (Abb. 26, B, C). Da auch auf dem linken Sinus eine zeitlich verzögerte und schwächere Expression von *TBX18* zu beobachten ist, könnte die induktive Funktion von FGF8 in der rechtsseitigen Verstärkung einer basalen bilateralen *TBX18*-Expression liegen. Dies wäre ein Erklärungsansatz für das Auftreten linksseitiger *TBX18*-Expression, die nicht unter dem Einfluss von FGF8 steht.

Darüberhinaus ergibt sich nunmehr die Möglichkeit, auch die frühen Mechanismen wie beispielsweise die *gap junction* Kommunikation in den Kontext einer rechtsseitigen Signalgebung zu bringen. Da die diskoidale Konfiguration der Kaninchengastrula der des Huhns ähnlich ist, bestehen möglicherweise Übereinstimmungen, was den mechanistischen Zusammenhang der FGF8-Signalgebung und der Kommunikation beider Blastodermhälften über die *gap junctions* angeht. Hier wäre es nun denkbar, über die bereits beschriebene repressive Funktion von FGF8 hinaus, (Boettger et al., 1999; Feistel und Blum, 2008) die Proepikardentwicklung als Endpunkt für eine induktive Signalkaskade zu setzen. Dies könnte den Grundstein für ein erweitertes Verständnis der embryonalen Lateralisierung legen.

#### 4. Diskussion



#### Abb. 26: Die Induktion der rechtsseitigen *TBX18*-Expression im *Sinus venosus*

Bereits im Stadium HH 3 wird die Lateralität von Organanlagen wie dem Proepikard durch ein asymmetrisches Membranpotential im Primitivstreifen festgelegt. Dieses wird durch apoptotische Zellen in der Mittellinie aufrechterhalten (A). Ab dem Stadium HH 4 wird im Hensenschen Knoten eine asymmetrische Genexpression induziert, die in den nächsten Stadien zur Etablierung des NODAL-PITX2-Signalweges auf der linken Seite führt. Auf der rechten Seite wird die Expression von *PITX2* aktiv von *SNAI1* reprimiert, welches von *FGF8* kontrolliert wird (B). Darüberhinaus ist die Aktivität von *FGF8* induktiv für die Expression von *TBX18* im rechten Sinus ab Stadium HH 11. Es bleibt bislang unklar, ob weitere Faktoren ausgehend von der FGF Signalgebung im Knoten für die Induktion von *TBX18* verantwortlich sind (C).

#### **4.4 Das Proepikard – Ein Zusammenspiel regulatorischer Netzwerke etabliert die Progenitoren des koronaren Blutgefäßsystems**

Das Proepikard ist eine multipotente Vorläuferpopulation mit breitem Differenzierungspotential. Nachdem die proepikardialen Zellen das Herz kolonisiert haben, bilden sie die Grundlage des koronaren Blutgefäßsystems. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass PE-Zellen *in vitro* unter bestimmten Bedingungen ein myozytäres Schicksal annehmen können. Eine wesentliche Rolle für den Erhalt einer proepikardialen Identität muss hierbei dem Wachstumsfaktor BMP zugemessen werden. Die proepikardiale Identität äußert sich in einer Spezifizierung durch eine charakteristische Markergenexpression. Es wurde gezeigt, dass eine intermediäre Dosis von BMP-Signalen essentiell für den Erhalt proepikardialer Genexpression ist. Werden die Zellen einer höheren BMP-Dosis ausgesetzt so wird die Expressionshöhe dieser Marker sukzessive herabreguliert und die Zellen beginnen in Myozyten zu differenzieren. Insbesondere *BMP4* wird bereits im Stadium 13 asymmetrisch im Sinus exprimiert und persistiert dann mit einer schwachen Expression im Proepikard. BMP ist also nicht nur für die frühe Kardiogenese von entscheidender Bedeutung sondern auch für spätere kardiale Musterbildungen, vor allem an den Polen des Herzens.

Bislang ist noch nicht ausreichend geklärt, welche Funktionen Marker wie *TBX18*, *WT1*, *CFC*, *Epikardin* und andere bei der Entwicklung des Proepikards übernehmen. T-Box Faktoren wie *TBX5* sind beispielsweise bei der Migration auf den Ventrikel von grosser Bedeutung (Hatcher et al., 2004) und *Wt1* hält epikardiale Zellen wahrscheinlich solange undifferenziert, bis sie ihre Destination in der myokardialen Kompaktschicht erreicht haben (Wagner et al., 2002). Dennoch bleibt unklar, inwieweit die Induktion proepikardialer Markergene diesen Zellen bestimmte Fähigkeiten verleiht, die sie von dem umgebenden Gewebe des *Sinus venosus* unterscheidet, wie beispielsweise erhöhte Proliferationsraten. Dies könnte durch den gezielten Einsatz von siRNA-Konstrukten gegen einzelne oder multiple Markergene im Hühnerembryo analysiert werden. In der Maus ist der Einsatz der *knock out*-Strategie von entscheidender Bedeutung, um die Beziehungen der proepikardialen Marker untereinander zu untersuchen. Es existieren bereits erste Datensätze, die beispielsweise die Regulation von *Wt1* durch *Tbx18* nachweisen (Kispert, persönliche Mitteilung). Wenn dem jedoch so ist, bleibt es widersprüchlich, dass der Verlust von *Tbx18* in der Maus nicht zu

#### 4. Diskussion

einem ähnlich schweren epikardialen Phänotyp führt wie der Verlust von *Wt1* (Wagner et al., 2003). Es wäre in diesem Zusammenhang interessant, transgenes murines Gewebe, beispielsweise Herzfeldexplantate der *Tbx18*- oder *Wt1*-Mausmutante, in den Hühnerembryo zu transplantieren. Diese Xenotransplantationen könnten zu dem Verständnis beitragen, welche Funktion *TBX18* und *WT1* in der Proepikardentwicklung erfüllen.

Die Expression proepikardialer Marker in Geweben, wie dem Epikard, dem Myokard und dem Perikard lassen die Vorstellung eines Kontinuums zu. Dies würde es theoretisch ermöglichen, die verschiedenen Derivate des lateralen Plattenmesoderms ineinander zu konvertieren. Im Hinblick auf das Differenzierungspotential proepikardialer Zellen scheint das durchaus denkbar. Natürlich wäre die Kontrolle über das Schicksal kardialer Zellen von großem therapeutischem Nutzen, da das Herz höherer Vertebraten nicht in der Lage ist, sich selbst zu regenerieren. Eine Ausnahme stellt hier der Fisch dar, der auf eine Verletzung des Myokards mit einer Aktivierung des gesamten Epikards in Form verstärkter Expression von *tbx18* und *raldh2* antwortet. Dies ist gefolgt von einer FGF-abhängigen erhöhten Migration und Proliferation epikardialer Zellen, welche durch Bildung neuer Blutgefäße den myokardialen Heilungsprozess unterstützen (Lepilina et al., 2006). Es existieren Datensätze, welche die Fähigkeit epikardialer Zellen zur Neovaskularisierung auch in der Maus zeigen (Smart et al., 2007). Das Potential proepikardialer Zellen bietet also eine weite Projektionsfläche für mögliche Applikationen, welche vielleicht keinen kurativen aber dennoch zumindest einen palliativen Effekt für infarzierte Herzen menschlicher Patienten in Aussicht stellen könnte. Inwieweit ein substantieller Beitrag zum Wiederaufbau des Arbeitsmyokards von epikardialen Zellen erbracht werden kann, bedarf jedoch weiterer eingehender Studien.

Durch die Analyse der rechtsseitigen Proepikardentwicklung im Huhn konnte ein neuartiger Aspekt der Etablierung asymmetrischer Organanlagen erarbeitet werden. Die erste charakteristische Fähigkeit proepikardialer Zellen nach der Induktion spezifischer Markergene ist die asymmetrische Proliferation. Die Zellen wachsen auf der rechten Seite wesentlich früher und effizienter. Darüberhinaus wird in den Zellen der linken Seite Apoptose induziert. Dies führt zu einem rechtsseitigen Proepikard, welches nach drei Tagen Kontakt mit dem Herzen aufnimmt und einer retardierten Proepikardanlage auf der linken Seite, die offenbar keinen Beitrag zur Bildung des Epikards leistet.

#### 4. Diskussion

Das die Entwicklung eines rechtsseitigen Proepikards im Huhn keine Ausnahme darstellt, konnte mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (Männer, persönliche Mitteilung) sowie molekularer Analysen von Froschembryonen nachgewiesen werden (diese Arbeit). Auch der Frosch entwickelt ein rechtes Proepikard, welches über eine Gewebebrücke mit dem Herzen in Kontakt tritt. Dennoch wurde sich in der vorliegenden Arbeit auf die Proepikardentwicklung des Hühnerembryos fokussiert. Ob die erhaltenen molekularen Mechanismen auch auf den Frosch zu übertragen sind, muss das Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Es wurde zunächst angenommen, daß der linke Sinus von einem repressiven Signal auf der linken Seite an der Entwicklung proepikardialer Zellen gehindert wird. Die rechte Seite wäre von diesem Signal nicht betroffen ist und würde somit ungehindert auswachsen. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, es stellte sich heraus, dass die asymmetrische Proepikardanlage offenbar das Resultat eines rechtsseitigen induktiven Signalweges ist, welcher nicht durch den linksseitigen NODAL-PITX2-Signalweg beeinflusst werden kann. Als ein wesentlicher Bestandteil dieses Signalweges konnte FGF8 identifiziert werden, welches im Hensschen Knoten auf der rechten Seite exprimiert wird. Darüberhinaus konnte die Lateralität der Proepikardanlage durch Inhibition des asymmetrischen Membranpotentials sowie der Apoptose im Primitivstreifen randomisiert werden. Wie allerdings diese frühen Mechanismen auf das rechtsseitige Signalzentrum im Knoten einwirken, muss noch aufgeklärt werden. Offensichtlich bietet sich die Proepikardanlage als ein Endpunkt an, mit dessen Hilfe die Analyse einer bisher unbekanntem induktiven Signalkaskade auf der rechten Seite ermöglicht wird. FGF-Signale scheinen jedoch nicht nur in die Induktion der asymmetrischen PE-Anlage involviert zu sein. In der späteren Entwicklung ist FGF wahrscheinlich für das Überleben und das Wachstum proepikardialer Zellen verantwortlich (Torlopp, persönliche Mitteilung). Einige der verschiedenen Faktoren, welche zur Entstehung des Proepikards führen, konnten bereits identifiziert werden. Nun gilt es, die wichtigen Schlüsselstellen von der frühen Festlegung der links/rechts-Achse über die Induktion proepikardialer Marker bis zur Besiedlung epikardialer Zellen molekular miteinander zu vernetzen. Dadurch würde ein grundlegender Beitrag zu dem Verständnis der multiplen Funktionen von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren während der Entwicklung von Organanlagen geleistet werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abu Issa R, Kirby ML. (2007). Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 45-68.
- Adams DS, Robinson KR, Fukumoto T, Yuan S, Albertson RC, Yelick P, Kuo L, McSweeney M, Levin M. (2006). Early, H<sup>+</sup>-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. *Development* **133**, 1657-71.
- Adamson, E. D., Minchiotti, G., and Salomon, D. S. (2002). Cripto: a tumor growth factor and more. *J Cell Physiol* **190**, 267-78.
- Alsan, B.H. and Schultheiss, T.M. (2002). Regulation of avian cardiogenesis by FGF8 signaling. *Development* **129**, 1935-1943.
- Amack JD, Yost HJ. (2004). The T box transcription factor no tail in ciliated cells controls zebrafish left-right asymmetry. *Curr Biol* **14**, 685-90.
- Andrée, B. Duprez, D., Vorbusch, B., Arnold, H.H., Brand, T. (1998) BMP2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos. *Mech Dev* **70**, 119-31.
- Bamford, R. N., Roessler, E., Burdine, R. D., Saplakoglu, U., dela Cruz, J., Splitt, M., Goodship, J. A., Towbin, J., Bowers, P., Ferrero, G. B., Marino, B., Schier, A. F., Shen, M. M., Muenke, M., and Casey, B. (2000). Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. *Nat Genet* **26**, 365-9.
- Barron, M., Gao, M. and Lough, J. (2000). Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specified, transient and cooperative. *Dev Dyn* **218**, 383-393.
- Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J, Renault B, Kucherlapati R, Seidman JG, Seidman CE. (1997). Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet.* **15**, 30-5. Erratum in: *Nat Genet* **4**, 411.
- Begemann, G., Gibert, Y., Meyer, A., and Ingham, P. (2002). Cloning of zebrafish T-box genes *tbx15* and *tbx18* and their expression during embryonic development. *Mech Dev* **114**, 137.
- Biben C, Harvey RP. (1997). Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene *eHand* during murine heart development. *Genes Dev* **11**, 1357-69.
- Bisgrove BW, Snarr BS, Emrazian A, Yost HJ. (2005). Polaris and Polycystin-2 in dorsal forerunner cells and Kupffer's vesicle are required for specification of the zebrafish left-right axis. *Dev Biol* **287**, 274-88.
- Black, B., Olson, EN. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **14**, 167-96. Review.
- Boettger T, Wittler L, Kessel M. (1999). FGF8 functions in the specification of the right body side of the chick. *Curr Biol* **9**, 277-80.
- Bour BA, O'Brien MA, Lockwood WL, Goldstein ES, Bodmer R, Taghert PH, Abmayr SM, Nguyen HT. (1995.) *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev* **9**, 730-41.

## 5. Literaturverzeichnis

- Brand, T., Andree, B., Schneider, A., Buchberger, A., Arnold, H.H. (1997). Chicken Nkx2.8, a novel homeobox gene expressed during early heart and foregut development. *Mech Dev* **64**, 53-59.
- Brand, T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* **258**, 1-19.
- Breckenridge RA, Mohun TJ, Amaya E. (2001). A role for BMP signalling in heart looping morphogenesis in *Xenopus*. *Dev Biol* **232**, 191-203.
- Brown NA, Wolpert L. (1990). The development of handedness in left/right asymmetry. *Development* **109**, 1-9. Review.
- Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. (2001b). A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* **106**, 709-21.
- Buchberger A, Pabst O, Brand T, Seidl K, Arnold HH. (1996) Chick NKx-2.3 represents a novel family member of vertebrate homologues to the *Drosophila* homeobox gene tinman: differential expression of cNKx-2.3 and cNKx-2.5 during heart and gut development. *Mech Dev* **56**, 151-63.
- Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* **5**, 877-89.
- Camarata T, Bimber B, Kulisz A, Chew TL, Yeung J, Simon HG. (2007) LMP4 regulates Tbx5 protein subcellular localization and activity. *J Cell Biol* **174**, 339-48.
- Campione M, Steinbeisser H, Schweickert A, Deissler K, van Bebber F, Lowe LA, Nowotschin S, Viebahn C, Haffter P, Kuehn MR, Blum M. (1999). The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* **126**, 1225-34.
- Campione M, Ros MA, Icardo JM, Piedra E, Christoffels VM, Schweickert A, Blum M, Franco D, Moorman AF. (2001). Pitx2 expression defines a left cardiac lineage of cells: evidence for atrial and ventricular molecular isomerism in the iv/iv mice. *Dev Biol* **231**, 252-64.
- Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Perez-Pomares, J. M., and Munoz-Chapuli, R. (2001). Localization of the Wilm's tumour protein WT1 in avian embryos. *Cell Tissue Res* **303**, 173-86.
- Chen JN, Fishman MC. (1996) Zebrafish tinman homolog demarcates the heart field and initiates myocardial differentiation. *Development* **122**, 3809-16.
- Chen JN, van Eeden FJ, Warren KS, Chin A, Nüsslein-Volhard C, Haffter P, Fishman MC. (1997). Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish. *Development* **124**, 4373-82.
- Chen, J., Kubalak, S. W., and Chien, K. R. (1998). Ventricular muscle-restricted targeting of the RXRalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis. *Development* **125**, 1943-1949.
- Chen, Y., Schier, A.F. (2001). The zebrafish Nodal signal Squint functions as a morphogen. *Nature* **411**, 607-10.
- Cheng, S. K., Olale, F., Bennett, J. T., Brivanlou, A. H., and Schier, A. F. (2003). EGF-CFC proteins are essential coreceptors for the TGF-beta signals Vg1 and GDF1. *Genes Dev* **17**, 31-6.

## 5. Literaturverzeichnis

- Christoffels VM, Mommersteeg MT, Trowe MO, Prall OW, de Gier-de Vries C, Soufan AT, Bussen M, Schuster-Gossler K, Harvey RP, Moorman AF, Kispert A. (2006). Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circ Res* **98**, 1555-63.
- Dathe V, Gamel A, Männer J, Brand-Saberi B, Christ B. (2002). Morphological left-right asymmetry of Hensen's node precedes the asymmetric expression of Shh and Fgf8 in the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* **205**, 343-54.
- Dettman, R. W., Denetclaw, W., Jr., Ordahl, C. P., and Bristow, J. (1998). Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* **193**, 169-81.
- Dersch H, Zile MH. (1993) Induction of normal cardiovascular development in the vitamin A-deprived quail embryo by natural retinoids. *Dev Biol* **160**, 424-33.
- Ding, J., Yang, L., Yan, Y. T., Chen, A., Desai, N., Wynshaw-Boris, A., and Shen, M. M. (1998). Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo. *Nature* **395**, 702-707.
- Dokic D, Dettman RW. (2007). VCAM-1 inhibits TGFbeta stimulated epithelial-mesenchymal transformation by modulating Rho activity and stabilizing intercellular adhesion in epicardial mesothelial cells. *Dev Biol* **299**, 489-504.
- Duboc V, Röttinger E, Lapraz F, Besnardeau L, Lepage T. (2005). Left-right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by nodal signaling on the right side. *Dev Cell* **1**, 147-58.
- Dyson, E., Sucov, H.M., Kubalak, S.W., Schmid-Schönheim, G.W., DeLano, F., Evans, R.M., Ross, J., Jr. and Chien, K. (1995). Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid X receptor alpha-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7386-7390.
- Edmondson DG, Lyons GE, Martin JF, Olson EN. (1994) Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* **120** 1251-63.
- Eisenberg CA, Eisenberg LM.(1999) WNT11 promotes cardiac tissue formation of early mesoderm. *Dev Dyn* **216**, 45-58.
- Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB, Yost HJ. (2005). Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* **132**, 1247-60.
- Feistel K., Blum m., (2008). Gap junctions relay FGF8-mediated right-sided repression of *Nodal* in rabbit, *Dev Dyn* (in press).
- Fischer A, Viebahn C, Blum M. (2002). FGF8 acts as a right determinant during establishment of the left-right axis in the rabbit. *Curr Biol* **12**, 1807-16.
- Foley AC, Mercola M. (2005). Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex. *Genes Dev* **19**, 387-96.
- Frasch, M (1995) Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **374**, 464-7.
- Frasch, M (1999). Intersecting signaling and transcriptional pathways in *Drosophila* heart specification. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 61-71.
- Fujiwara T, Dehart DB, Sulik KK, Hogan BL. (2002) Distinct requirements for extra-embryonic and embryonic bone morphogenetic protein 4 in the formation of the node and primitive streak and coordination of left-right asymmetry in the mouse. *Development* **129**, 4685-96.

## 5. Literaturverzeichnis

- Fukumoto T, Blakely R, Levin M. (2005). Serotonin transporter function is an early step in left-right patterning in chick and frog embryos. *Dev Neurosci* **27**, 349-63.
- Gajewski K, Fossett N, Molkentin JD, Schulz RA. (1999) The zinc finger proteins Pannier and GATA4 function as cardiogenic factors in Drosophila. *Development* **126**, 5679-88.
- Garcia-Martinez, V., and Schoenwolf, G. C. (1993). Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol* **159**, 706-719.
- Granata A, Quaderi NA. (2003). The Opitz syndrome gene MID1 is essential for establishing asymmetric gene expression in Hensen's node. *Dev Biol* **258**, 397-405.
- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W. S., and Schier, A. F. (1999). The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* **97**, 121-32.
- Gruber, P.J., Kubalak, S.W., Pexieder, T., Sucov, H.M., Evans, R.M. and Chien, K.R. (1996). RXR alpha deficiency confers genetic susceptibility for aortic sac, conotruncal, atrioventricular cushion and ventricular muscle defects in mice. *J. Clin. Invest* **98**, 1332-1243.
- Haber, D. A., Buckler, A.J., Glaser, T., Call, K.M., Pelletier, J., Sohn, R.L., Douglass, E.C. and Housman, D.E. (1990). An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* **61**, 1257-1269.
- Haenig B, Kispert A. (2004). Analysis of TBX18 expression in chick embryos. *Dev Genes Evol* **214**, 407-11.
- Hatcher CJ, Diman NY, Kim MS, Pennisi D, Song Y, Goldstein MM, Mikawa T, Basson CT. (2004). A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. *Physiol Genomics* **18**, 129-40.
- Hamburger, V., and Hamilton, H. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph* **88**, 49-92.
- Hashimoto H, Rebagliati M, Ahmad N, Muraoka O, Kurokawa T, Hibi M, Suzuki T. (2004). The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish. *Development* **131**, 1741-53.
- Hay, E.D., and Zuk, A. (1995). Transformations between epithelium and mesenchyme: Normal, pathological and experimentally induced. *Am. J. Kidney Dis* **26**, 678-690.
- Hibino T, Ishii Y, Levin M, Nishino A. (2006). Ion flow regulates left-right asymmetry in sea urchin development. *Dev Genes Evol* **216**, 265-76.
- Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. (2001). Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* **28**, 276-80.
- Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S. (2006). Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* **125**, 33-45. Review.
- Hirose T, Karasawa M, Sugitani Y, Fujisawa M, Akimoto K, Ohno S, Noda T. (PAR3 is essential for cyst-mediated epicardial development by establishing apical cortical domains. *Development* **133**, 1389-98.
- Ho, E. and Shimada, Y. (1978). Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol* **66**, 579-85.
- Holtzinger, A., Evans, T. (2007) Gata5 and Gata6 are functionally redundant in zebrafish for specification of cardiomyocytes. *Dev Biol* **312**, 613-22.
- Hogan BL. (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 432-8. Review.

## 5. Literaturverzeichnis

- Hoogaars WM, Barnett P, Moorman AF, Christoffels VM. (2007). T-box factors determine cardiac design. *Cell Mol Life Sci* **64**, 646-60. Review.
- Hozumi S, Maeda R, Taniguchi K, Matsuno K. (2006). Mechanisms to establish left-right asymmetry in invertebrates. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. **52**, 227-35. Review.
- Hutter H, Schnabel R. (1995). Establishment of left-right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a multistep process involving a series of inductive events. *Development* **121**, 3417-24.
- Isaac A, Sargent MG, Cooke J. (1997). Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene. *Science* **275**, 1301-4.
- Ishii Y, Langberg JD, Hurtado R, Lee S, Mikawa T. (2007). Induction of proepicardial marker gene expression by the liver bud. *Development* **134**, 3627-37.
- James RG, Schultheiss TM. (2005). Bmp signaling promotes intermediate mesoderm gene expression in a dose-dependent, cell-autonomous and translation-dependent manner. *Dev Biol* **288**, 113-25.
- Kastner, P., Messadeq, N., Mark, M., Wendling, O., Grondona, J.M., Ward, S., Ghyselink, M. and Chambon, P. (1997). Vitamin A deficiency and mutations of RXR alpha, RXR beta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. *Development* **124**, 4749-4758.
- Kelly KA, Wei Y, Mikawa T. (2002). Cell death along the embryo midline regulates left-right sidedness. *Dev Dyn* **224**, 238-44.
- Kelly, R. G., and Buckingham, M. E. (2002). The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart. *Trends Genet* **18**, 210-216.
- Kinoshita, N., Minshull, J., and Kirschner, M. W. (1995). The identification of two novel ligands of the FGF receptor by a yeast screening method and their activity in *Xenopus* development. *Cell* **83**, 621-30.
- Kishimoto Y, Lee KH, Zon L, Hammerschmidt M, Schulte-Merker S. (1997) The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. *Development* **124**, 4457-66.
- Kirby ML, Waldo KL. (1995). Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* **77**, 211-5. Review.
- Kitamura K, Miura H, Miyagawa-Tomita S, Yanazawa M, Katoh-Fukui Y, Suzuki R, Ohuchi H, Suehiro A, Motegi Y, Nakahara Y, Kondo S, Yokoyama M. (1999). Mouse *Pitx2* deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development* **126**, 5749-58.
- Komiyama M, Ito K, Shimada Y. (1987). Origin and development of the epicardium in the mouse embryo. *Anat Embryol (Berl)* **1**, 183-9.
- Kostetskii I, Jiang Y, Kostetskaia E, Yuan S, Evans T, Zile M. (1999). Retinoid signaling required for normal heart development regulates GATA-4 in a pathway distinct from cardiomyocyte differentiation. *Dev Biol* **206**, 206-18.
- Kramer-Zucker AG, Olale F, Haycraft CJ, Yoder BK, Schier AF, Drummond IA. (2005). Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development*. **132**, 1907-21.
- Kraus, F., Haenig, B., and Kispert, A. (2001a). Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *Tbx18*. *Mech Dev* **100**, 83-6.
- Kraus, F., Haenig, B., and Kispert, A. (2001b). Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *Tbx18*. *Mech Dev* **100**, 83-6.

## 5. Literaturverzeichnis

- Kruithof BP, van Wijk B, Somi S, Kruithof-de Julio M, Pérez Pomares JM, Weesie F, Wessels A, Moorman AF, van den Hoff MJ. (2006). BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev Biol* **295**, 507-22.
- Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. (2000). The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* **16**, 279-83. Review.
- Ladd AN, Yatskievych TA, Antin PB. (1998). Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGFbeta and bone morphogenetic proteins. *Dev Biol* **204**, 407-19.
- Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M., and Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell.* **82**, 803-814.
- Levin M. (1997). Left-right asymmetry in vertebrate embryogenesis. *Bioessays* **9**, 287-96. Review.
- Levin M, Mercola M. (1999). Gap junction-mediated transfer of left-right patterning signals in the early chick blastoderm is upstream of Shh asymmetry in the node. *Cell* **111**. 77-89.
- Levin M, Thorlin T, Robinson KR, Nogi T, Mercola M. (2002). Asymmetries in H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Development* **133**, 1657-71.
- Lie-Venema, H., Gittenberger-de Groot, A. C., van Empel, L. J., Boot, M. J., Kerkdijk, H., de Kant, E., and DeRuiter, M. C. (2003). Ets-1 and Ets-2 transcription factors are essential for normal coronary and myocardial development in chicken embryos. *Circ Res* **92**, 749-56.
- Lilly B, Zhao B, Ranganayakulu G, Paterson BM, Schulz RA, Olson EN. (1995). Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* **267**, 688-93.
- Lin MH, Bour BA, Abmayr SM, Storti RV. (1997) The expression of MEF2 genes is implicated in CNS neuronal differentiation. *Dev Biol* **182**, 240-55.
- Linask KK, Han MD, Linask KL, Schlange T, Brand T. (2002). Effects of antisense misexpression of CFC on downstream flectin protein expression during heart looping. *Dev Dyn* **228**, 217-30.
- Liu C, Liu W, Lu MF, Brown NA, Martin JF. (2001). Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development* **128**, 2039-48.
- Logan M, Pagán-Westphal SM, Smith DM, Paganessi L, Tabin CJ. (1998). The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* **94**, 307-17.
- Lough J, Barron M, Brogley M, Sugi Y, Bolender DL, Zhu X. (1996) Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm. *Dev Biol* **178**, 198-202.
- Lough. J. and Rudy Reil, D. (2004). Avian precardiac endoderm/mesoderm induces cardiac myocyte differentiation in murine embryonic stem cells. *Circ. Res* **94**, 107-116
- Lowe LA, Yamada S, Kuehn MR. (2001). Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development* **128**, 1831-43.
- Lyons, I., Parsons, L.M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J.E., Robb, L., Harvey, R.P. (1995). Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the home box gene Nkx2.5. *Genes Dev* **9**, 1654-66.
- Marvin, M.J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S.M., Lassar, A. B. (2001) Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* **15**, 316-327.

## 5. Literaturverzeichnis

- Männer, J. (1992). The development of pericardial villi in the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* **186**, 379-85.
- Männer, J. (1993). Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos. *Anat Embryol* **187**, 281-289.
- Männer, J. (1999). Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. *Anat Rec* **255**, 212-226.
- Männer, J., Perez-Pomares, J. M., Macias, D., and Munoz-Chapuli, R. (2001). The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells Tissues Organs* **169**, 89-103.
- Männer J. (2004). On rotation, torsion, lateralization, and handedness of the embryonic heart loop: new insights from a simulation model for the heart loop of chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **278**, 481-92.
- Massagué J, Chen YG. (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* **15**, 627-44.
- McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, Schneider MD, Srivastava D, Olson EN. (2005). The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development* **132**, 189-201.
- McGrath J, Brueckner M. (2003). Cilia are at the heart of vertebrate left-right asymmetry. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 385-92. Review.
- Meyers EN, Martin GR. (1999). Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH. *Science* **285**, 403-6.
- Mikawa, T., and Gourdie, R. G. (1996). Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* **174**, 221-32.
- Mjaatvedt, C. H., Nakaoka, T., Moreno-Rodriguez, R., Norris, R. A., Kern, M. J., Eisenberg, C. A., Turner, D., and Markwald, R. R. (2001). The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol* **238**, 97-109.
- Molkentin, J.D., Tymitz, K.M., Richardson, J.A., Olson, E.N. (2000b). Abnormalities of the genitourinary tract in female mice lacking GATA5. *Mol Cell Biol* **20**, 5256-60
- Mommersteeg MT, Brown NA, Prall OW, de Gier-de Vries C, Harvey RP, Moorman AF, Christoffels VM. Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circ Res* **101**, 902-9.
- Monsoro-Burq, A., and Le Douarin, N. M. (2001). BMP4 plays a key role in left-right patterning in chick embryos by maintaining Sonic Hedgehog asymmetry. *Mol Cell* **7**, 789-799.
- Moore, A.W., Mcines, L., Kreidberg, J., Hastie, N.D. and Schell, A. (1999). Yac complementation shows a requirement for Wt1 in the development of the epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* **126**, 1845-1857.
- Moorman AF, Soufan AT, Hagoort J, de Boer PA, Christoffels VM. (2004). Development of the building plan of the heart. *Ann NY Acad Sci* **1015**, 171-81. Review.
- Moorman AF, Christoffels VM, Anderson RH, van den Hoff MJ. (2007). The heart-forming fields: one or multiple? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**, 1257-65.
- Morabito, C. J., Dettman, R. W., Kattan, J., Collier, J. M., and Bristow, J. (2001). Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transformation during avian heart development. *Dev Biol* **234**, 204-15.
- Moreno-Rodriguez RA, Krug EL, Reyes L, Villavicencio L, Mjaatvedt CH, Markwald RR. (2006). Bidirectional fusion of the heart-forming fields in the developing chick embryo. *Dev Dyn* **235**, 191-202.

## 5. Literaturverzeichnis

- Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, Parmacek MS. (1997). GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *J Biol Chem* **272**, 8515-24.
- Munoz-Chapuli, R., Macias, D., Gonzalez-Iriarte, M., Carmona, R., Atencia, G., and Perez-Pomares, J. M. (2002). [The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development.]. *Rev Esp Cardiol* **55**, 1070-82.
- Muñoz-Chápuli R, Macías D, Ramos C, de Andrés V, Gallego A, Navarro P. (1994). Cardiac development in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*): a model for the study of vertebrate cardiogenesis. *Cardioscience* **5**, 245-53.
- Nahirney, P. C., Mikawa, T., and Fischman, D. A. (2003). Evidence for an extracellular matrix bridge guiding proepicardial cell migration to the myocardium of chick embryos. *Dev Dyn* **227**, 511-23.
- Naiche LA, Harrelson Z, Kelly RG, Papaioannou VE. (2005). T-box genes in vertebrate development. *Annu Rev Genet* **39**, 219-39. Review
- Nakamura T, Mine N, Nakaguchi E, Mochizuki A, Yamamoto M, Yashiro K, Meno C, Hamada H. (2006). Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self-enhancement and lateral-inhibition system. *Dev Cell* **11**, 495-504.
- Nesbitt WS, Mangin P, Salem HH, Jackson SP. (2006). The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis. *J Mol Med* **84**, 989-95. Review.
- Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbaur B, Chambon P, Dollé P. (2001). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* **128**, 1019-31.
- Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M, Hirokawa N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*. **95**, 829-37.
- Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H. (2002) Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Development* **130**, 1725-34.
- Ohuchi H, Kimura S, Watamoto M, Itoh N. (2000). Involvement of fibroblast growth factor (FGF)18-FGF8 signaling in specification of left-right asymmetry and brain and limb development of the chick embryo. *Mech Dev* **95**, 55-66.
- Ornatsky OI, Andreucci JJ, McDermott JC. (1997). A dominant-negative form of transcription factor MEF2 inhibits myogenesis. *J Biol Chem* **272**, 33271-8.
- Pagán-Westphal SM, Tabin CJ. (1998). The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* **93**, 25-35.
- Palmer AR. (2004). Symmetry breaking and the evolution of development. *Science* **306**, 828-33. Review.
- Pandur P, Läsche M, Eisenberg LM, Kühl M. (2002) Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* **418**, 636-41.
- Patek, C. E., Little, M. H., Fleming, S., Miles, C., Charlieu, J. P., Clarke, A. R., Miyagawa, K., Christie, S., Doig, J., Harrison, D. J., Porteous, D. J., Brookes, A. J., Hooper, M. L., and Hastie, N. D. (1999). A zinc finger truncation of murine WT1 results in the characteristic urogenital abnormalities of Denys-Drash syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2931-6.
- Patel K, Isaac A, Cooke J. (1999). Nodal signalling and the roles of the transcription factors SnR and Pitx2 in vertebrate left-right asymmetry. *Curr Biol* **9**, 609-12.

## 5. Literaturverzeichnis

- Peirson, S.N., Butler, J.N. and Foster R.G.(2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleid Acid Research* **31**, No.13 .
- Pennekamp P, Karcher C, Fischer A, Schweickert A, Skryabin B, Horst J, Blum M, Dworniczak B. (2002). The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol* **12**, 938-43.
- Perez-Pomares, J. M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Atencia, G., Wessels, A., and Munoz-Chapuli, R. (2002). Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol* **46**, 1005-13.
- Perez-Pomarez. J.M., Phelps, A., Sedmerove, M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Munoz-Chapuli, R. and Wessels. A. (2002). Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). *Dev. Biol* **247**, 307-326.
- Pérez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, Wessels A. (2003). Epicardial-like cells on the distal arterial end of the cardiac outflow tract do not derive from the proepicardium but are derivatives of the cephalic pericardium. *Dev Dyn* **227**, 56-68.
- Piedra ME, Ros MA. (1998). BMP signaling positively regulates Nodal expression during left right specification in the chick embryo. *Development* **129**, 3431-40.
- Poelmann RE, Lie-Venema H, Gittenberger-de Groot AC. (2002). The role of the epicardium and neural crest as extracardiac contributors to coronary vascular development. *Tex Heart Inst J* **29**, 255-61.
- Pombal MA, Carmona R, Megías M, Ruiz A, Pérez-Pomares JM, Muñoz-Chápuli R. (2008). Epicardial development in lamprey supports an evolutionary origin of the vertebrate epicardium from an ancestral pronephric external glomerulus. *Evol Dev.* **2**, 210-6.
- Qiu D, Cheng SM, Wozniak L, McSweeney M, Perrone E, Levin M. (2005). Localization and loss-of-function implicates ciliary proteins in early, cytoplasmic roles in left-right asymmetry. *Dev Dyn* **234**, 176-89.
- Ramsdell AF. (2005). Left-right asymmetry and congenital cardiac defects: getting to the heart of the matter in vertebrate left-right axis determination. *Dev Biol* **288** 1-20.
- Raya A, Izpisua Belmonte JC. (2004). Unveiling the establishment of left-right asymmetry in the chick embryo. *Mech Dev* **121**, 1043-54. Review.
- Raya A, Belmonte JC. (2006). Left-right asymmetry in the vertebrate embryo: from early information to higher-level integration. *Nat Rev Genet* **4**, 283-93. Review.
- Reese, D. E., Zavaljevski, M., Streiff, N. L., and Bader, D. (1999). *bves*: A novel gene expressed during coronary blood vessel development. *Dev Biol* **209**, 159-71.
- Redkar A, Montgomery M, Litvin J. (2001) Fate map of early avian cardiac progenitor cells. *Development* **128**, 2269-79.
- Reifers F, Walsh EC, Léger S, Stainier DY, Brand M. (2000). Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (*fgf8/acerebellar*). *Development* **127**, 225-35.
- Reiter JF, Alexander J, Rodaway A, Yelon D, Patient R, Holder N, Stainier DY. (1999) *Gata5* is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev* **13**, 2983-95.
- Robb, L., Mifsud, L., Hartley, L., Biben, C., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., and Harvey, R. P. (1998). *epicardin*: A novel basic helix-loop-helix transcription factor gene expressed in epicardium, branchial arch myoblasts, and mesenchyme of developing lung, gut, kidney, and gonads. *Dev Dyn* **213**, 105-13.

## 5. Literaturverzeichnis

- Rodríguez Esteban C, Capdevila J, Economides AN, Pascual J, Ortiz A, Izpisúa Belmonte JC. (1999). The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature* **401**, 243-51.
- Rojas A, De Val S, Heidt AB, Xu SM, Bristow J, Black BL. (2005). Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead and GATA transcription factors through a distal enhancer element. *Development* **132**, 3405-17.
- Rodgers LS, Lalani S, Runyan RB, Camenisch TD. (2008). Differential growth and multicellular villi direct proepicardial translocation to the developing mouse heart. *Dev Dyn* **237**, 145-52.
- Ryan AK, Blumberg B, Rodriguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Tamura K, Tsukui T, de la Peña J, Sabbagh W, Greenwald J, Choe S, Norris DP, Robertson EJ, Evans RM, Rosenfeld MG, Izpisúa Belmonte JC. (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**, 545-51.
- Saga Y, Kitajima S, Miyagawa-Tomita S. Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med* **10**, 345-52. Review.
- Sarmah B, Latimer AJ, Appel B, Wenthe SR. (2005). Inositol polyphosphates regulate zebrafish left-right asymmetry. *Dev Cell* **1**, 133-45.
- Satou, Y., Kaoru, I. and Satoh, N. (2004) The ascidian Mesp gene specifies heart precursor cells. *Development*. **131**, 2533-2541.
- Scharnhorst, V., van der Eb, A. J., and Jochemsen, A. G. (2001). WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* **273**, 141-61.
- Schier AF, Shen MM. (2000). Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* **403**, 385-9. Review.
- Schier, A. F., and Talbot, W. S. (2001). Nodal signaling and the zebrafish organizer. *Int J Dev Biol* **45**, 289-97.
- Schlange, T., Andree, B., Arnold, H. H., and Brand, T. (2000). BMP2 is required for early heart development during a distinct time period. *Mech Dev* **91**, 259-270.
- Schlange, T., Schnipkoweit, I., Andree, B., Ebert, A., Zile, M. H., Arnold, H. H., and Brand, T. (2001). Chick CFC controls Lefty1 expression in the embryonic midline and nodal expression in the lateral plate. *Dev Biol* **234**, 376-389.
- Schlange T, Arnold HH, Brand T. (2002). BMP2 is a positive regulator of Nodal signaling during left-right axis formation in the chicken embryo. *Development* **129**, 3421-9.
- Schlueter J, Männer J, Brand T. (2006). BMP is an important regulator of proepicardial identity in the chick embryo. *Dev Biol* **295**, 546-58.
- Schlueter J, Brand T. Left-right axis development: examples of similar and divergent strategies to generate asymmetric morphogenesis in chick and mouse embryos. *Cytogenet Genome Res* **117**, 256-67. Review.
- Schneider, A., Mijalski, T., Schlange, T., Dai, W., Overbeek, P., Arnold, H.H., Brand, T. (1999). The homeobox gene Nkx3.2 is a target of left right signaling and is expressed on opposite sides in chick and mouse embryos. *Curr. Biol* **9**, 911-4.
- Schott, J.J., Benson, D.W., Basson, C.T., Pease, W., Silberbach, G.M., Moak, J.P., Maron, B.J., Seidman, C.E., Seidman, J.G. (1998). Congenital heart disease caused by mutations in the transcriptionfactor Nkx2.5. *Science* **281**, 108-11.
- Schulte I, Schlueter J, Abu-Issa R, Brand T, Männer J. (2007). Morphological and molecular left-right asymmetries in the development of the proepicardium: a comparative analysis on mouse and chick embryos. *Dev Dyn* **236**, 684-95.

## 5. Literaturverzeichnis

- Schultheiss, T.M., Burch, J.B., Lassar, A. B. (1997). A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* **11**, 451-62.
- Schultheiss, T.M., Xydas, S., Lassar, A.B. (1995). Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development* **121**, 4203-14.
- Schweickert A, Weber T, Beyer T, Vick P, Bogusch S, Feistel K, Blum M. (2007). Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*. *Curr Biol* **17**, 60-6.
- Seidl, W, Steding, G., Kluth, D. and Schulze, M (1980). Entstehung und Entwicklung des paracardialen Coelom. *Verh. Anat. Ges* **74**, 377-383.
- Seo S, Kume T. (2006). Forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Dev Biol* **296**, 421-36.
- Serluca FC. (2008). Development of the proepicardial organ in the zebrafish. *Dev Biol* **315**, 18-27.
- Shen, M., and Schier, A. (2000). The *EGF-CFC* gene family in vertebrate development. *Trends Genet* **16**, 303-309.
- Shen, M. M. (2003). Decrypting the role of Cripto in tumorigenesis. *J Clin Invest* **112**, 500-2.
- Shen, M. M., Wang, H., and Leder, P. (1997). A differential display strategy identifies Cryptic, a novel EGF-related gene expressed in the axial and lateral mesoderm during mouse gastrulation. *Development* **124**, 429-442.
- Shibazaki Y, Shimizu M, Kuroda R. (2004). Body handedness is directed by genetically determined cytoskeletal dynamics in the early embryo. *Curr Biol* **14**, 1462-7.
- Shimeld SM, Levin M. (2006). Evidence for the regulation of left-right asymmetry in *Ciona intestinalis* by ion flux. *Dev Dyn* **235**, 1543-53.
- Shiratori H, Hamada H. (2006). The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development* **133**, 2095-104.
- Smart N, Rossdeutsch A, Riley PR. (2007). Thymosin beta4 and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential. *Angiogenesis* **10**, 229-41. Review.
- Splitt MP, Burn J, Goodship J. (1996). Defects in the determination of left-right asymmetry. *J Med Genet* **33**, 498-503. Review.
- Sodhi CP, Li J, Duncan SA. (2006) Generation of mice harbouring a conditional loss-of-function allele of Gata6. *BMC Dev Biol* **6**, 19.
- Spéder P, Adám G, Noselli S. (2006). Type ID unconventional myosin controls left-right asymmetry in *Drosophila*. *Nature* **440**, 803-7.
- Srivastava D, Cserjesi P, Olson EN. (1995). A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* **270**, 1995-9.
- St Amand TR, Ra J, Zhang Y, Hu Y, Baber SI, Qiu M, Chen Y. (1998). Cloning and expression pattern of chicken Pitx2: a new component in the SHH signaling pathway controlling embryonic heart looping. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 100-5.
- Sucov, H. M., Dyson, E., Gumeringer, C. L., Price, J., Chien, K. R., and Evans, R. M. (1994). RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* **8**, 1007-18.
- Sugi Y, Lough J. (1995). Activin-A and FGF-2 mimic the inductive effects of anterior endoderm on terminal cardiac myogenesis in vitro. *Dev Biol* **168**, 567-74.
- Sun Y, Liang X, Najafi N, Cass M, Lin L, Cai CL, Chen J, Evans SM. (2007). Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev Biol* **304**, 286-96.
- Supp DM, Witte DP, Potter SS, Brueckner M. (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in *inversus viscerum* mice. *Nature* **389**, 963-6.

## 5. Literaturverzeichnis

- Supp DM, Brueckner M, Kuehn MR, Witte DP, Lowe LA, McGrath J, Corrales J, Potter SS. (1999). Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *Development* **126**, 5495-504.
- Tabin C. (2005). Do we know anything about how left-right asymmetry is first established in the vertebrate embryo? *J Mol Histol* **36**, 317-23.
- Tanaka M, Yamasaki N, Izumo S. (2000) Phenotypic characterization of the murine Nkx2.6 homeobox gene by gene targeting. *Mol Cell Biol* **20**, 2874-9.
- Tanaka Y, Okada Y, Hirokawa N. (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* **435**, 172-7.
- Tavares AT, Andrade S, Silva AC, Belo JA. (2007). Cerberus is a feedback inhibitor of Nodal asymmetric signaling in the chick embryo. *Development* **134**, 2051-60.
- Tsuda T, Philp N, Zile MH, Linask KK. (1996). Left-right asymmetric localization of flectin in the extracellular matrix during heart looping. *Dev Biol* **173**, 39-50.
- Tsuda T, Majumder K, Linask KK. (1998). Differential expression of flectin in the extracellular matrix and left-right asymmetry in mouse embryonic heart during looping stages. *Dev Genet* **23**, 203-14.
- Tsukui T, Capdevila J, Tamura K, Ruiz-Lozano P, Rodriguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Magallón J, Chandraratna RA, Chien K, Blumberg B, Evans RM, Belmonte JC. (1999). Multiple left-right asymmetry defects in Shh(-/-) mutant mice unveil a convergence of the shh and retinoic acid pathways in the control of Lefty-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11376-81.
- Van den Hoff, M.J.B., Kriethof, B.P.T., Moormann, A.F.M., Markwald, R.R. and Wessels, A. (2001). Formation of myocardium after the initial development of the linear heart tube. *Anat.Rec* **242**, 96-102.
- Virágh S, Challice CE. (1981). The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec* **201**, 157-68.
- Wada AM, Smith TK, Osler ME, Reese DE, Bader DM. (2003). Epicardial/Mesothelial cell line retains vasculogenic potential of embryonic epicardium. *Circ Res* **92**, 525-31.
- Wagner, K. D., Wagner, N., Bondke, A., Nafz, B., Flemming, B., Theres, H., and Scholz, H. (2002). The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *Faseb J* **16**, 1117-9.
- Wagner, K.D., Wagner, N. and Schedl, A. (2003). The complex life of WT1. *Journal of Cell Science* **116**, 1653-58.
- Weninger WJ, Lopes Floro K, Bennett MB, Withington SL, Preis JI, Barbera JP, Mohun TJ, Dunwoodie SL. (2005). Cited2 is required both for heart morphogenesis and establishment of the left-right axis in mouse development. *Development*. **132**, 37-48.
- Winter EM, Grauss RW, Hogers B, van Tuyn J, van der Geest R, Lie-Venema H, Steijn RV, Maas S, DeRuiter MC, deVries AA, Steendijk P, Doevendans PA, van der Laarse A, Poelmann RE, Schalij MJ, Atsma DE, Gittenberger-de Groot AC. (2007). Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart. *Circulation* **116**, 917-27.
- Xavier-Neto J, Rosenthal N, Silva FA, Matos TG, Hochgreb T, Linhares VL. (2001). Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. *Genesis* **3**, 97-104.
- Xu, C., Liguori, G., Persico, M. G., and Adamson, E. D. (1999). Abrogation of the Cripto gene in mouse leads to failure of postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiomyocytes. *Development* **126**, 483-494.

## 5. Literaturverzeichnis

- Yamashita, A., Yonemitsu, Y., Okano, S., Nakagawa, K., Nakashima, Y., Irida, T., Iwamoto, Y., Nagai, Y., Hasegawa, M., and Sueishi, K. (2002). Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J Immuno.* **168**, 450-7.
- Yan, Y. T., Liu, J. J., Luo, Y., E, C., Haltiwanger, R. S., Abate-Shen, C., and Shen, M. M. (2002). Dual roles of Cripto as a ligand and coreceptor in the nodal signaling pathway. *Mol Cell Biol* **22**, 4439-49.
- Yashiro K, Shiratori H, Hamada H. (2007). Haemodynamics determined by a genetic programme govern asymmetric development of the aortic arch. *Nature* **450**, 285-8.
- Yatskievich TA, Ladd AN, Antin PB. (1997) Induction of cardiac myogenesis in avian pregastrula epiblast: the role of the hypoblast and activin. *Development* **124**, 2561-70.
- Yelon D, Ticho B, Halpern ME, Ruvinsky I, Ho RK, Silver LM, Stainier DY. (2000). The bHLH transcription factor *hand2* plays parallel roles in zebrafish heart and pectoral fin development. *Development* **127**, 2573-82.
- Yokouchi Y, Vogon KJ, Pearse RV 2nd, Tabin CJ. (1999). Antagonistic signaling by *Caronte*, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell* **98**, 573-83.
- Yoshioka H, Meno C, Koshida K, Sugihara M, Itoh H, Ishimaru Y, Inoue T, Ohuchi H, Semina EV, Murray JC, Hamada H, Noji S. (1998). *Pitx2*, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* **94**, 299-305.
- Yu X, St Amand TR, Wang S, Li G, Zhang Y, Hu YP, Nguyen L, Qiu MS, Chen YP. (2001). Differential expression and functional analysis of *Pitx2* isoforms in regulation of heart looping in the chick. *Development* **128**, 1005-13.
- Zhang H, Bradley A. (1996) Mice deficient for *BMP2* are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* **122**, 2977-86.
- Zhang, J., Talbot, W. S., and Schier, A. F. (1998). Positional cloning identifies zebrafish one-eyed-pinhead as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation. *Cell* **92**, 241-251.
- Zhang XM, Ramalho-Santos M, McMahon AP. (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for *Shh* and *Ihh* signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell* **106**, 781-92.
- Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* **281**, 15694-700.
- Zhao R, Watt AJ, Battle MA, Li J, Bondow BJ, Duncan SA. (2008). Loss of both *GATA4* and *GATA6* blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Dev Biol* **317**, 614-9.

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungen

ActRII	Activin Type II receptor
AK	Antikörper
ALK	Activin Like Kinase
bHLH	basic Helix –Loop-Helix
bidest.	bidestilliert
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BrDU	Bromodesoxy-Uridine
BSA	Bovine Serum Albumine
cDNA	copy Desoxyribonucleic Acid
Cer1	Cerberus1
CFC	Cripto, FRL-1, Cryptic
Cx43	Connexin43
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpp	decapentaplegic
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRL-1	FGF Related Ligand-1
FCS	Fetal Calf Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
h	hour/ Stunde
HAND	Heart, autonomic nervous system, neural crest-derived
HH	Hamburger und Hamilton
HRP	Horseradish Peroxidase
iv	inversus viscerum

## 6. Anhang

LPM	Laterales Plattenmesoderm
MEF	Myocyte Enhancer Factor
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonucleic acid
ms	Millisekunden
NKX	Nirenberg Kim Homeobox
Oep	one-eyed pinhead
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Proepikard
Pen	Penicillin
PFA	para-Formaldehyd
PITX	Pituary Homeobox
POD	Peroxidase
RALDH	Retinaldehyd Dehydrogenase
RCAS	Replikation Competent Avian Sarcoma
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RXR $\alpha$	Retinoid Receptor $\alpha$
SHH	Sonic Hedgehog
Strep	Streptomycin
TBX	T-Box
TGF $\beta$	Tranforming Growth Factor $\beta$
VAD	Vitamin A-defizient
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
vMHC	ventricular Myosin Heavy Chain
V	Volt
WT1	Wilms Tumor Gen 1
Z-VAD-FMK	Z-VAD-Fluoromethylketone

## 6.2 Lebenslauf

Name: Jan Schlüter  
Geburtsdatum: 24.06.1978  
Geburtsort: Wolfenbüttel  
Nationalität: Deutsch

### Schulbildung:

September 1990 bis Juli 1997      Gymnasium Raabeschule, Braunschweig, Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

### Wehrdienst:

September 1997 bis Juni 1998      Grundwehrdienst im Heeresfliegerregiment 16 in Celle

### Hochschulausbildung:

Oktober 1998      Immatrikulation an der TU Braunschweig im Studiengang Biologie

September 2004      Abschluss der Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Biotechnologie der TU Braunschweig, Thema der Arbeit: Molekulare Charakterisierung der differentiellen Genexpression im Proepikard und Perikard

### Promotion:

Oktober 2004 bis April 2005      wissenschaftlicher Angestellter an der TU Braunschweig, Beginn der Promotion unter Prof. Dr. Thomas Brand, Exmatrikulation an der TU Braunschweig

Mai 2005 bis Juli 2008      wissenschaftlicher Angestellter an der Julius-Maximilians Universität Würzburg, Fortführung der Promotion unter Prof. Dr. Brand im Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie, Thema der Arbeit: Molekulare Charakterisierung der Proepikardentwicklung

Oktober 2005 bis März 2007      immatrikuliert als Promotionsstudent an der Universität Würzburg

### 6.3 Eigene Publikationen

**Schlueter J., Brand T.** FGF8 controls asymmetric development of the proepicardium in the chick embryo. (eingereicht)

**Froese A., Breher S.S., Schlueter J., Waldeyer C., Kirchmaier B., Khutz J., Torlopp A., Vauti F., Arnold H.-H., Müller T., Winkler C., Schwerte T., Kirchhof P., Fabritz L., Brand T.** The popeye domain containing 2 gene is essential for sinus node function. (eingereicht)

**Schulte I., Schlueter J., Abu-Issa R., Brand T., Männer J. (2007).** Morphological and molecular left-right asymmetries in the development of the proepicardium: a comparative analysis on mouse and chick embryos. *Dev Dyn* 236, 684-95.

**Schlueter J., Brand T. (2007).** Left-right axis development: examples of similar and divergent strategies to generate asymmetric morphogenesis in chick and mouse embryos. *Cytogenet Genome Res* 117, 256-67.

**Schlueter J., Männer J., Brand T. (2006).** BMP is an important regulator of proepicardial identity in the chick embryo. *Dev Biol* 295, 546-58.

**Torlopp A., Breher S.S., Schlüter J., Brand T. (2006).** Comparative analysis of mRNA and protein expression of Popdc1 (Bves) during early development in the chick embryo. *Dev Dyn* 235, 691-700.

**Männer J., Schlueter J., Brand T. (2005).** Experimental analyses of the function of the proepicardium using a new microsurgical procedure to induce loss-of-proepicardial-function in chick embryos. *Dev Dyn* 233, 1454-63.

## 6.4 Teilnahme an wissenschaftlichen Tagungen

September 2004	5. GfE School in Günzburg, „Molecular control of organ development“, Posterpräsentation, “Molecular characterization of lateral plate mesoderm differentiation into pericardium and proepicardial serosa in the chick embryo”
Dezember 2004	“Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs” in Hannover, Posterpräsentation, “Molecular characterization of lateral plate mesoderm differentiation into pericardium and proepicardial serosa in the chick embryo”
April 2005	16th. Scientific Meeting of the “Gesellschaft für Entwicklungsbiologie” in Münster, Posterpräsentation, „BMP is an important regulator of proepicardial identity“
Januar 2006	EU FP6 Symposium on “Heart Repair” in Amsterdam
Mai 2006	“Workshop on Chicken Genomics and Development” in Cold Spring Harbor, New York, Posterpräsentation, „BMP is an important regulator of proepicardial identity“
Mai 2007	17th. Scientific Meeting of the “Gesellschaft für Entwicklungsbiologie” in Marburg, Posterpräsentation, „Molecular characterization of asymmetrical PE development“
April 2007	Symposium on „Heart Repair“ in Newcastle, Posterpräsentation, „Molecular characterization of asymmetrical PE development“
April 2008	Symposium on “Heart Repair” in Madrid, Posterpräsentation, „Molecular characterization of asymmetrical PE development“

## **6.5 Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ich habe außer den mit dem Zulassungsbescheid urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, im Juli 2008

Jan Schlüter

## **6.6 Danksagung**

Ich möchte Prof. Dr. Thomas Brand für die Bereitstellung dieses herausfordernden und interessanten Themas sowie die Betreuung meiner Arbeit danken. Er hat meine Arbeit stets mit hoher fachlicher Kompetenz und Geduld gefördert, darüber hinaus danke ich ihm für die respektvolle Zusammenarbeit und die Möglichkeiten, die mir eröffnet wurden.

Ich danke PD. Dr. Jörg Männer für die vielen außergewöhnlichen Einblicke und wichtigen Denkanstöße sowie für seine Bereitschaft, das Koreferat für diese Arbeit zu übernehmen.

Ein großer Dank gebührt meinen langjährigen Arbeitskollegen im Labor Angela Torlopp, Dr. Alexander Froese, Eleftheria Mavridou, Stephe Breher, Bettina Kirchmaier, Reinhild Fischer, Anneliese Striwe-Conz und nicht zuletzt Fabienne Lüttge für ihre tatkräftige Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Darüberhinaus danke ich auch Dr. Thomas Schlange sowie Dr. Christian Brenneis für die geleisteten Vorarbeiten auf diesem Themengebiet. In besonderer Weise möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie für ihre Großzügigkeit und ihren Rückhalt bedanken.