

# **Die Rolle von FGF in der frühen Kardiogenese und Proepikardiogenese im Hühnerembryo**

**Dissertation**

zur Erlangung des

naturwissenschaftlichen Doktorgrades der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Angela Torlopp**

aus

Rostock

Würzburg 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Brand

Gutachter: Prof. Dr. Albrecht Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für meine Großeltern.

## 0 Inhaltsverzeichnis

<b>0</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Summary/Zusammenfassung.....</b>	<b>7</b>
1.1	Summary .....	7
1.2	Zusammenfassung.....	8
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Die frühe Kardiogenese .....</b>	<b>10</b>
2.1.1	Die Komplexität der embryonalen Herzfelder .....	13
<b>2.2</b>	<b>Molekulare Grundlagen der Kardiogenese.....</b>	<b>16</b>
2.2.1	Die Induktion kardialer Vorläuferzellen .....	16
2.2.2	Die Rolle kardialer Transkriptionsfaktoren in der Spezifizierung kardialen Mesoderms .....	19
2.2.3	Kardiale Reifungsprozesse und die transkriptionelle Regulation der Kammerentwicklung.....	21
2.2.4	Die Lateralisierung der Herzanlage und des venösen Pols .....	23
2.2.4.1	Apoptose - Regulator der unilateralen Proepikardentwicklung am venösen Pol.....	27
2.2.5	Die Bedeutung der Hyaluronansynthase 2 (Has2) für die Herzentwicklung .....	29
<b>2.3</b>	<b>Die Epikardentwicklung .....</b>	<b>30</b>
2.3.1	Das Proepikard als Ursprung des Epikards .....	30
2.3.2	Die Epikardialisierung des Myokards .....	32
2.3.3	Die Koronargefäßentwicklung.....	34
2.3.4	Proepikardiale Markergene.....	36
2.3.5	In die Proepikardentwicklung implizierte Signalmoleküle .....	38
2.3.5.1	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren.....	38
2.3.5.2	Wnt-Signalfaktoren .....	41

---

2.4	Ziele der Arbeit .....	42
<b>3</b>	<b>Material.....</b>	<b>43</b>
3.1	Geräte.....	43
3.2	Verbrauchsmaterial.....	44
3.3	Chemikalien .....	45
3.4	Pharmakologische Reagenzien .....	48
3.5	Rekombinante Proteine .....	48
3.6	Antikörper.....	48
3.7	Enzyme .....	48
3.8	DNA-Marker .....	49
3.9	Protein-Marker .....	49
3.10	Bakterienstämme und Vektoren.....	49
3.11	Zelllinien und Zellkulturmedien.....	49
3.12	Hühnerembryonen .....	50
3.13	Primer.....	50
3.14	Proben für die „whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung .....	51
3.15	Kits .....	52
3.16	Computerprogramme .....	53
<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>53</b>
4.1	Molekularbiologische Methoden .....	53
4.1.1	Bakterienkulturen.....	53

---

4.1.2	Mini-Präparation .....	54
4.1.3	Midi-Präparation .....	54
4.1.4	RNA-Isolierung .....	55
4.1.5	cDNA-Synthese .....	56
4.1.6	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	57
4.1.7	Sequenzierung.....	57
4.1.8	Primerentwurf .....	58
4.1.9	Endpunkt-PCR.....	58
4.1.10	Echtzeit-PCR ( <i>Real time PCR</i> ).....	59
4.1.11	Agarose-Gelelektrophorese .....	60
4.1.12	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen .....	61
4.1.13	Klonierungstechniken.....	62
4.1.13.1	Ligation von DNA-Fragmenten .....	62
4.1.13.2	Herstellung von kompetenten Bakterien.....	62
4.1.13.3	Transformation in <i>E.coli</i> .....	63
4.1.14	Restriktionsverdau von DNA.....	63
4.1.15	„Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung .....	64
4.1.15.1	Präparation der Hühnerembryonen.....	64
4.1.15.2	RNA-Probensynthese .....	64
4.1.15.3	Vorbehandlung der Embryonen .....	65
4.1.15.4	Hybridisierung.....	66
4.1.15.5	Post-Hybridisierung-Waschschritte.....	66
4.1.15.6	Antikörperadsorption.....	67
4.1.15.7	Abwaschen des nicht gebundenen Antikörpers und Färbung .....	67
4.1.15.8	Histologische Untersuchungen.....	67
4.1.16	Schnitthybridisierung .....	68
4.1.17	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....	68
4.1.18	3D-Rekonstruktion konfokaler Bilderstapel.....	69
4.1.19	Dokumentation.....	69
4.1.20	Statistische Analyse.....	69
<b>4.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>70</b>
4.2.1	Proepikardiale Explantatkultur .....	70
4.2.1.1	BrdU-Inkorporation.....	70

---

4.2.1.2	TUNEL-Methode .....	71
4.2.2	Kultivierung von DF-1-Zellen .....	72
4.2.3	Infektion von DF-1-Zellen mit RCAS-Konstrukten .....	72
4.2.4	Aggregation von Zellen für die Implantation .....	72
<b>4.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>73</b>
4.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	73
4.3.2	Western Blot .....	74
4.3.2.1	Antikörpernachweis auf der Nitrocellulosemembran.....	74
4.3.2.2	Entwicklung von Filmen.....	75
4.3.3	Immunfluoreszenz.....	75
4.3.3.1	Gewebevorbehandlung zur Anfertigung von Kryoschnitten .....	75
4.3.3.2	Färbeprotokolle .....	76
4.3.3.3	Dokumentation.....	77
<b>4.4</b>	<b>Manipulation von Hühnerembryonen.....</b>	<b>77</b>
4.4.1	Präparation des Proepikards und des <i>Sinus venosus</i> .....	77
4.4.2	Kultivierung von Embryonen .....	78
4.4.2.1	Herstellung von Kulturplatten.....	78
4.4.2.2	Embryokultur .....	78
4.4.3	Implantation von Zellaggregaten .....	79
4.4.4	Implantation von Protein- oder Inhibitor-beladenen Trägerperlen.....	80
4.4.5	EdU-Markierung von Zellen in manipulierten Embryonen .....	80
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>82</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Rolle von FGF in der Proepikardentwicklung .....</b>	<b>82</b>
5.1.1	FGF-Liganden und FGF-Rezeptoren werden im Proepikard exprimiert .....	82
5.1.2	Das Wachstum proepikardialer Zellen <i>in vitro</i> ist abhängig von FGF-Signalen.....	83
5.1.3	Der Verlust von FGF-Signalen führt zur reduzierten Proliferation und Induktion von Apoptose in proepikardialen Zellen <i>in vitro</i> .....	86
5.1.4	Die Expression proepikardialer Marker wird nicht durch FGF reguliert .....	88
5.1.5	FGF-Signale modulieren den PE-Phänotyp <i>in vivo</i> .....	90
5.1.6	Die Inhibition von FGF führt zur Apoptose und dem Verlust der Proliferation von PE-Zellen <i>in vivo</i> .....	94

---

<b>5.2</b>	<b>Die Expression von Wnt im Proepikard .....</b>	<b>97</b>
<b>5.3</b>	<b>Die asymmetrische Proepikardentwicklung .....</b>	<b>98</b>
5.3.1	Der <i>Sinus venosus</i> weist eine asymmetrische Expression von Apoptosegenen auf .....	98
5.3.2	Die asymmetrische Expression von Caspase 2 während der Proepikardentwicklung wird durch FGF8 moduliert .....	103
<b>5.4</b>	<b>Die Rolle von FGF in der Herzfeldregion .....</b>	<b>105</b>
5.4.1	Die ektopische Expression von FGF moduliert die Expression kardialer Marker der Herzfeldregion.....	105
5.4.2	Die distinkte Inhibition von FGF-Signalen in der Herzfeldregion führt zum Verlust kardialer Markergene.....	107
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>109</b>
<b>6.1</b>	<b>Die Rolle von FGF in der Entwicklung des Proepikards.....</b>	<b>109</b>
6.1.1	Die proepikardiale Expression von FGF-Liganden und FGF-Rezeptoren.....	109
6.1.2	FGF ist eine wichtige Determinante für das Wachstum des Proepikards .....	111
6.1.3	Der Verlust von FGF beeinflusst nicht die proepikardiale Identität.....	113
<b>6.2</b>	<b>Die proepikardiale Expression von Wnt .....</b>	<b>116</b>
<b>6.3</b>	<b>Die asymmetrische Proepikardentwicklung .....</b>	<b>118</b>
6.3.1	Die unilaterale Expression von Apoptose-Faktoren vor und während der Proepikardentwicklung .....	118
6.3.2	Die unilaterale Expression von Caspase 2 im <i>Sinus venosus</i> unterliegt einem L/R-Signalweg.....	120
<b>6.4</b>	<b>Die Expression kardialer Marker in der Herzfeldregion wird durch FGF moduliert.....</b>	<b>121</b>
<b>6.5</b>	<b>Die frühe Kardiogenese und Proepikardiogenese - regulatorische Netzwerke der Herzentwicklung.....</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>128</b>



---

<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>156</b>
<b>8.1</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>156</b>
<b>8.2</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>159</b>
<b>8.3</b>	<b>Eigene Publikationen .....</b>	<b>160</b>
<b>8.4</b>	<b>Teilnahme an wissenschaftlichen Tagungen .....</b>	<b>161</b>
<b>8.5</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>162</b>
<b>8.6</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>163</b>

# 1 Summary/Zusammenfassung

## 1.1 Summary

The aim of this study was the functional analysis of FGF signaling during early heart field formation and proepicardial development in the chick embryo. Fibroblast growth factors (FGF) belong to a large group of signaling molecules and play crucial roles in many different developmental processes. The proepicardium (PE) develops asymmetrically on the right sinus horn of the cardiac inflow tract and is the source of the coronary vasculature of the heart.

FGF ligands (*FGF2*, *FGF10*, and *FGF12*) are specifically expressed in epithelial cells of the proepicardium as well as in the underlying inflow tract myocardium. FGF receptors (*FGFR1*, *FGFR2*, and *FGFR4*) display similar expression patterns in the proepicardium and their inhibition by specific antagonists was the entry point into the functional analysis of FGF signaling in proepicardial cells. The inhibition of FGF signaling *in vitro* leads to retarded outgrowth as well as increased apoptosis in proepicardial explants, which were cultured under serum free conditions. It was shown that both Ras/MAPK and PI3 kinase signaling as integral parts of FGF signaling transduction are responsible for growth and survival of proepicardial cells in this context. However, FGF signaling is not involved in the establishment of proepicardial identity as shown by the maintenance of expression of well-established proepicardial marker genes such as *TBX18*, *WT1* and *TBX5* after FGF inhibition. These findings were verified by *in vivo* experiments, showing that inhibition of FGF leads to retarded outgrowth of the proepicardium. Furthermore it was shown that asymmetric apoptosis in a transiently established left-sided PE-anlage is based on an early differential expression of apoptosis-inducing genes like Caspase 2. This asymmetric expression is regulated by FGF8 probably as part of an early right-sided signaling pathway, which prevents apoptosis in the right sinus horn of the cardiac inflow tract. In a second topic of this thesis the expression of the hyaluronan synthase 2 (*HAS2*) in the control of FGF signaling during early heart field formation was analyzed. Hyaluronan synthases are involved in the production of hyaluronic acid, which is an essential component of the extracellular matrix. The role of FGF signaling was tested *in vivo* and it is shown here, that the expression of *HAS2* in the primary heart field is dependent on FGF as well as other cardiac marker genes such as the transcription factor *NKX2.5*.

This thesis demonstrates that FGF has multiple roles during early heart development and formation of the proepicardium.

## 1.2 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Funktion von FGF-Signalen im Herzfeld und in der Entwicklung des Proepikards im Hühnerembryo untersucht werden. Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) sind eine große Gruppe von Signalmolekülen und in eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen involviert. Das Proepikard (PE), welches sich asymmetrisch auf dem rechten Sinushorn des *Sinus venosus* entwickelt, bildet die Grundlage des Koronargefäßsystems des Herzens.

FGF-Liganden (*FGF2*, *FGF10*, *FGF12*) werden insbesondere in den epithelialen Zellen des Proepikards exprimiert, sowie an der sinomyokardialen Basis dieser embryonalen Progenitorpopulation. Die FGF-Rezeptoren (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR4*) weisen ein ähnliches Expressionsmuster auf und deren Inhibition, durch spezifische Antagonisten, war der Ausgangspunkt für die funktionelle Analyse der proepikardialen FGF-Signalaktivität. Die Inhibition von FGF-Signalen *in vitro* führt zu einem verringerten Wachstum sowie einer erhöhten Apoptoserate in proepikardialen Explantaten, die unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Ras/MAPK- als auch der PI3-Kinase-Signalweg, beides Bestandteile der FGF-Signaltransduktion, für das Wachstum und Überleben proepikardialer Zellen verantwortlich sind. Dagegen sind FGF-Signale nicht in die Etablierung proepikardialer Identität involviert, wie die Analyse der Expression etablierter proepikardialer Markergene wie *TBX18*, *WT1* und *TBX5* nach FGF-Inhibition zeigte. Dies konnte gleichfalls durch *in vivo*-Experimente gezeigt werden, in denen die rechtsseitige Inhibition von FGF zu einem retardierten Proepikardwachstum führte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die asymmetrische Apoptose in der sich transient entwickelnden linksseitigen Proepikardanlage auf eine frühe differentielle Expression von Apoptosegenen wie Caspase 2 zurückgeht. Diese asymmetrische Expression wird von FGF8 reguliert, wahrscheinlich als Teil eines frühen rechtsseitigen Signalweges, der Apoptose im rechten Sinushorn des kardialen Einflusstraktes verhindert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Expression der Hyaluronansynthase 2 (*HAS2*) in Abhängigkeit von FGF in der Herzfeldregion analysiert. Hyaluronansynthasen produzieren Hyaluronsäure, welches eine essentielle Komponente der extrazellulären Matrix ist. Es wurde *in vivo* gezeigt, dass die Expression von *HAS2* im primären Herzfeld in gleicher Weise von FGF reguliert wird wie die des kardialen Transkriptionsfaktors *NKX2.5*.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass FGF während der frühen Entwicklung des Herzens und der Entstehung des Proepikards diverse Funktionen besitzt.

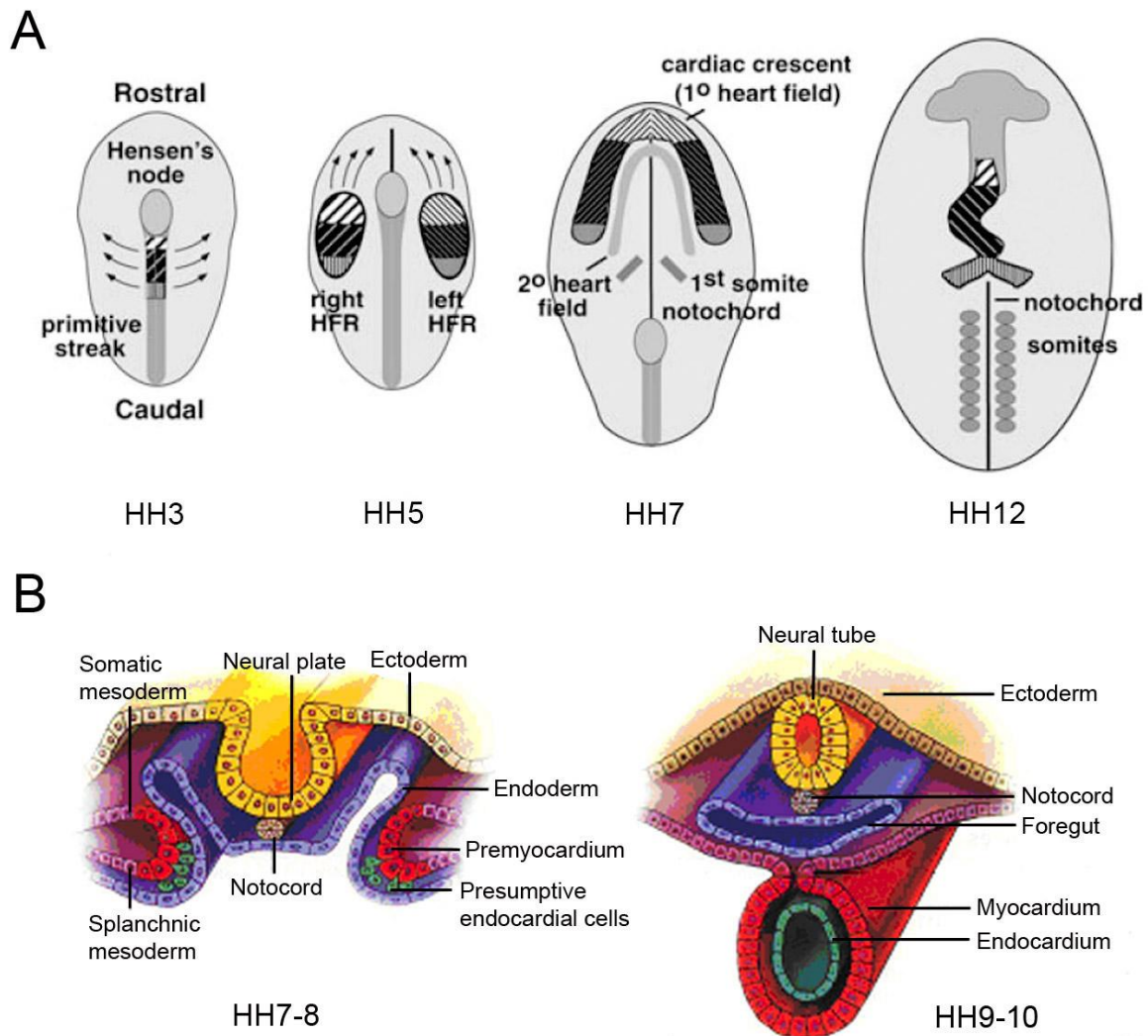
## 2 Einleitung

Das menschliche Herz ist nur faustgroß und dennoch der am stärksten beanspruchte Muskel im menschlichen Organismus. Es schlägt durchschnittlich 50-80 Mal pro Minute und pumpt dabei stetig Blut durch den Lungen- und Körperkreislauf. Die Funktion dieses außergewöhnlichen Organs ist jedoch durch verschiedenste Faktoren gefährdet. Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sind weltweit die häufigste Todesursache (WHO, 2007). Im Jahr 2005 starben schätzungsweise 17,5 Millionen Menschen an einer koronaren Herzerkrankung oder einem Schlaganfall. Zudem ist weiterhin mit einer drastischen Zunahme einschlägiger Erkrankungen zu rechnen (WHO, 2007). Neben dem individuellen Lebenswandel der heutigen Industriegesellschaft und der Unterversorgung in Ländern niedriger und mittlerer Einkommen, sind auch genetische Prädispositionen Risikofaktoren. Nicht nur präventive Maßnahmen wie Ernährungs- und Gesundheitsberatung, sondern vor allem die medikamentöse Behandlung und chirurgische Eingriffe spielen in der Therapie eine wichtige Rolle. Aber auch der Einsatz adulter und embryonaler Stammzellen zur Regeneration von Kardiomyozyten und Herzkranzgefäßen wird zunehmend diskutiert (Li et al., 2009; Pal, 2009). Hierfür ist die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Herzentwicklung unerlässlich. Klinisch gesehen spielt aber auch das Verständnis angeborener Herzdefekte eine bedeutende Rolle. Etwa 1% der Lebendgeburten beim Menschen weisen Missbildungen des Herzens auf (Bruneau, 2008) und circa 5-10% der Totgeburten gehen auf eine kardiale Fehlbildungen zurück (Hoffman, 1995b). Wichtige Prozesse während der embryonalen Herzentwicklung sind die Bildung des primitiven Herzschauches und dessen Epikardialisierung. So gehen aus dem Epikard nicht nur Endothel- und Glattmuskelzellen der Koronargefäße oder Zellen der atrioventrikulären Klappen hervor (Männer et al., 2001; Perez-Pomares et al., 2002), es ist auch für die Myokardentwicklung essentiell (u.a. Sucov et al., 2009). Die epikardialen Zellen wiederum stammen aus einer transienten Akkumulation mesothelialer Vorläuferzellen am venösen Pol des Herzens, dem Proepikard (Männer, 1999). Durch Expressionsstudien und manipulative Eingriffe am Hühnerembryo können molekulare Prozesse, die zur Entstehung des primitiven Herzschauches und des Proepikards führen, verstanden werden. Allgemein könnte das Verständnis basaler Funktionszusammenhänge der Herzentwicklung helfen die Diagnostik und Therapie angeborener Herzfehler zu verbessern. Darüber hinaus könnte das Verständnis molekularer Grundlagen der Proepikardentwicklung für den zukünftigen Einsatz regenerativer Therapien entscheidend sein.

## 2.1 Die frühe Kardiogenese

Um das Wachstum des sich schnell entwickelnden Wirbeltierembryos unterstützen zu können, muss das Herz frühzeitig seine Funktion aufnehmen. Im Hühnerembryo fängt das Herz bereits ab HH Stadium 10 (HH10; Hamburger und Hamilton, 1951), im Mausembryo ab Stadium E8 und im Menschen circa 3 Wochen nach Gestation an zu schlagen (Sissman, 1970). Während es ausgehend von einem primitiven Herzschlauch zu dem komplexen vierkammerigen Organ umgebaut wird, erhält es seine physiologische Pumpfunktion stetig aufrecht. Das Wirbeltierherz besteht hauptsächlich aus mesodermalen Geweben, die aus Vorläufern myokardialer Zellen entstehen. Diese Zellen befinden sich vor der Gastrulation des Embryos in der posterioren Hälfte des Epiblasten. Mit Initiation der Gastrulation (HH3-4 im Huhn; E6.5 in der Maus) und der damit verbundenen konvergenten Ingression von Epiblastenzellen entsteht der Primitivstreifen (Tam und Beddington, 1987, 1992), in welchem die myokardialen Vorläuferzellen eine antero-posteriore Anordnung einnehmen, die bereits der des tubulären Herzens entspricht (Abb.1A; Garcia-Martinez und Schoenwolf, 1993). Weiterhin wandern diese Zellen als dichte Masse mesodermalen Mesenchyms aus dem Primitivstreifen in antero-lateraler Richtung aus, um zwei bilateral zur Mittellinie angelegte Herzfelder zu bilden (HH4-5; Abb.1A). Es wurde gezeigt, dass die Positionen der Herzvorläuferzellen nach Migration aus dem Primitivstreifen nicht zwingend der zukünftigen antero-posterioren Anordnung im embryonalen Herzen entsprechen (Redkar et al., 2001), die gebildeten Herzfelder jedoch eine medio laterale Polarität aufweisen, die mit der craniocaudalen Polarität des primitiven Herzschlauches übereinstimmt (Kelly et al., 2001; Abu-Issa und Kirby, 2007). Die Herzvorläuferzellen der bilateralen Herzfelder liegen zum HH Stadium 5-6 im Huhn (Yang et al., 2002) und E7.5 in der Maus (Tam et al., 1997) im entstandenen lateralen Plattenmesoderm (LPM) und werden nun kardiogenes Mesoderm oder Mesoderm genannt, welches das Potential hat myokardiale Zellen zu formen. Das LPM ist durch Bildung des intraembryonalen Coeloms separiert in splanchnisches und somatisches Blatt, wobei die myokardialen Vorläuferzellen ausschließlich dem splanchnischen Mesoderm angehören (Abb.1B). Unter der Schließung des endodermalen Vorderdarms, die einhergeht mit der jeweils ventralen beziehungsweise medialen Faltung des splanchnischen und somatischen Blattes, dehnen sich die bilateralen Herzfelder nun nach anterior aus. Das präkardiale Mesoderm wird zu diesem Zeitpunkt oft auch als kardialer Halbmond beschrieben (HH7-8; Abb.1A), wobei aktuelle Studien anmerken, dass diese Bezeichnung tatsächlich nur für den Mensch- und Mausembryo zutrifft, wogegen im Vogelembryo bis HH Stadium 9 als

auch in Amphibien zwei getrennte Herzfelder (linkes und rechtes) vorliegen (Colas et al., 2000; Collop et al., 2006; Abu-Issa und Kirby, 2007). Der Herzschlauch wird schließlich aus dem splanchnischen Blatt gebildet, welches durch das Coelom von der Körperwand (somatisches Blatt) getrennt ist (HH9-10, Abb.1B; Stalsberg und DeHaan, 1969). Dabei entsteht eine transiente Schmetterlingskonfiguration des prätubulären Herzens, die ventral zur Bildung des linearen Herzschlauches führt (Brand, 2003; Moreno-Rodriguez et al., 2006). Zellschicksalsanalysen des kardialen Mesoderms im Hühnerembryo deuten darauf hin, dass hierbei der Orientierungswechsel der medio lateralen Polarität der Herzfelder zur craniocaudal Polarität der Zellen im primitiven Herzschlauch, durch das Invertieren des kardialen Mesoderms um 120-130° unter der Schließung des Vorderdarms erreicht wird (Abu-Issa und Kirby, 2008). Die primitive Herzröhre ist kurz nach der initialen Fusion dorsal noch nicht geschlossen (de la Cruz und Sanchez-Gomez, 1998). Erst mit der Schließung der dorsalen Myokardwand entsteht das tubuläre Herz, welches jedoch noch über das dorsale Mesokard mit dem Vorderdarm verbunden ist (Abb.1B), während das ventrale Mesokard zurückgebildet wird. Zu diesem Zeitpunkt besteht der lineare Herzschlauch bereits aus zwei unterschiedlichen Komponenten. Zum einem aus Myokard, das die Herzaußenwand bildet, und zudem aus Endokard, das die Innenwand des Herzschlauches auskleidet. Letzteres ist unter anderem in die Bildung des Klappengewebes involviert (Markwald et al., 1977; Fitzharris, 1981) und für Struktur und Zusammensetzung der *cardiac jelly*, einer extrazellulären Matrix zwischen Myokard und Endokard, verantwortlich (Fitzharris, 1981b). Das Endokard wird von einer kleinen Gruppe von Zellen gebildet, die bereits frühzeitig aus Zellen des splanchnischen Blattes differenzieren (HH5-8, Abb.1B; Sugi und Markwald, 1996). Im weiteren Verlauf der frühen Kardiogenese wird das dorsale Mesokard zurückgebildet, wodurch der Herzschlauch nicht mehr in Verbindung mit dem Pharynxvorderdarm steht (HH13; Linask et al., 2005). Folglich können dem linearen Herzschlauch keine weiteren Zellen mehr hinzugefügt werden. Die im splanchnischen Mesoderm verbleibenden Herzvorläuferzellen werden deshalb nachfolgend am Einfluss- und Ausflusstrakt des Herzschlauches addiert. Dies geschieht über einen längeren Zeitraum, solange die Herzpole weiterhin in Verbindung mit dem dorsalen Mesokard stehen (HH14-18). Parallel zu diesen Vorgängen setzt die graduelle Krümmung (*looping*) des linearen Herzschlauches ein (ab HH11; Abb.1A), wodurch der kardiale Reifungsprozess eingeleitet wird.



**Abb.1 - Die frühe Kardiogenese im Hühnerembryo**

(A) Historische Abbildung: Die Herzvorläuferzellen sind zum HH Stadium 3-4 unterhalb des Hensenschen Knotens im anterioren Teil des Primitivstreifens in einer antero-posterioren Anordnung vorzufinden, die der zukünftigen Position im Herzschlauch gleicht. Nach der antero-lateralen Migration der kardialen Vorläuferzellen und Bildung des rechten und linken Herzfeldes zum HH Stadium 4-5, erfolgt zum HH Stadium 7 anterior die Fusion der bilateralen Herzfelder. (B) Durch die innere Fusion des Vorderdarmendoderms (blau) und Auffaltung des splanchnischen Blattes (violett/rot) im HH Stadium 7-8, entsteht durch eine bidirektionale Bewegung der Strukturen im HH Stadium 9-10 der lineare Herzschlauch. Dieser besteht aus einer myokardialen Außenwand (rot), die von Endokardzellen (grün) ausgekleidet wird und durchläuft ab HH Stadium 11 eine Krümmungsbewegung (*looping*; siehe A, HH12). HFR=Herzfeld (entnommen und modifiziert aus Brand, 2003; Wagner und Siddiqui, 2007; Harvey und Rosenthal, 1999).

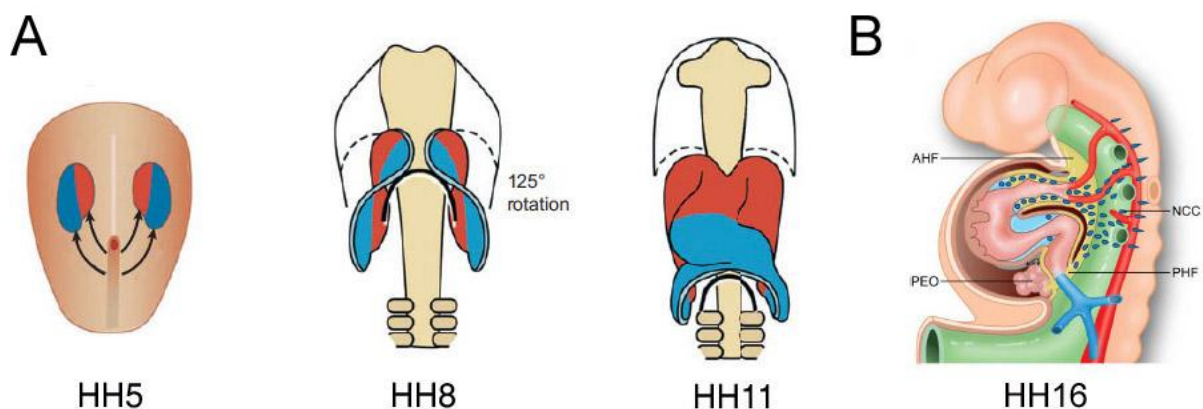
### 2.1.1 Die Komplexität der embryonalen Herzfelder

Lange Zeit dachte man, dass der lineare Herzschlauch bereits alle Komponenten des adulten Herzens enthält, die sich später zu distinkten Elementen des maturierten Organs entwickeln (Davis, 1927). Aber in den letzten Jahren haben sich die Ansichten dahingehend gewandelt, dass es heute allgemein akzeptiert ist, dass der lineare Herzschlauch nur den zukünftigen linken Ventrikel als auch Teile der atrioventrikulären (AV) und atrialen Region bildet. Nach Anlage des primitiven Herzschlauches werden dann zur Vervollständigung des kardialen Bauplans sowohl am anterioren Pol (arterial) als auch posterioren Pol (venös) des Herzens neue myokardiale Zellen addiert. Experimentelle Beweise hierfür existieren bereits seit Jahrzehnten (Stalsberg und DeHaan, 1969; de la Cruz und Sanchez-Gomez, 1999), wurden jedoch lange nicht berücksichtigt. Erst in den letzten Jahren wurde die Annahme akzeptiert, dass einige kardiale Komponenten, wie der rechte Ventrikel und Ausflusstrakt, aus einer alternativen Quelle von Herzvorläufern stammen. Diese wurde hauptsächlich von drei Laboren untersucht (Waldo et al., 2001; Mjaatvedt et al., 2001; Kelly et al., 2001). Zellschicksalsanalysen im Huhn zeigten hiernach, dass Zellen des splanchnischen Mesoderms, welches an pharyngales Endoderm angrenzt, in Richtung und durch den primitiven Aortenkanal migrieren, um distinkte Kompartimente des Ausflusstraktes und rechten Ventrikels zu bilden (Mjaatvedt et al., 2001; Waldo et al., 2001). In der Maus wurden molekulare Unterschiede innerhalb der herzbildenden Region durch die Insertion eines *lacZ*-Reportergens in den *Fgf10*-Promotor und einen *Fgf8-lacZ* knock-in demonstriert. So wird *lacZ* unter der Kontrolle von *Fgf10* und *Fgf8* (*Fgf*, *fibroblast growth factor*) nur im Ausflusstrakt und rechten Ventrikel exprimiert, jedoch nicht im linken Ventrikel und in den Atrien (Kelly et al., 2001; Ilagan et al., 2006). Zum Embryonaltag (E)7.5 wird das Transgen im kardialen Halbmond exprimiert, jedoch in splanchnischem Mesoderm detektiert, das medial der klassischen Herzfelder liegt. Mit voranschreitender Entwicklung finden sich  $\beta$ -Galaktosidase-positive Zellen weiterhin in pharyngalem Mesoderm und Mesoderm der Branchialbögen, das schließlich im Ausflusstrakt und rechten Ventrikel mündet. Diese Daten zeigen, dass der Ausflusstrakt und rechte Ventrikel im Ganzen oder zu Teilen aus Vorläuferzellen gebildet werden, die dem früh fusionierenden Myokardium hinzugefügt und nicht den klassischen Herzfeldern zuzuordnen sind (Kelly und Buckingham, 2002). So wurden die klassischen Herzfelder, welche früh differenzieren in „primäres Herzfeld“ umbenannt (Abb.2A, blau). Da die exakte Lokalisierung der später differenzierenden Herzvorläuferzellen zu verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung kontrovers



diskutiert wurde, wurde diese Zellpopulation als „sekundäres“, „anteriores Herzfeld“ als auch „zweites Herzfeld“ betitelt (Abb.2A, rot; Kelly et al., 2001; Mjaatvedt et al., 2001; Waldo et al., 2001, 2005; Abu-Issa und Kirby, 2007; Kirby, 2007). Unstimmigkeiten im Gebrauch der Terminologie führten zu weiteren Kontroversen, die wohl nicht zuletzt aus dem Gebrauch unterschiedlicher Modellorganismen und Markierungstechniken herrühren (Kirby, 2007). Konsens besteht nun seit kurzem hierüber, dass „anteriores“ und „sekundäres Herzfeld“ Subpopulationen des „zweiten Herzfeldes“ sind (Buckingham et al., 2005; Abu-Issa und Kirby, 2007). Die frühe Zellpopulation von Herzvorläufern, die also als „primäres/erstes Herzfeld“ bezeichnet wird, stammt also aus anteriorem splanchnischem Mesoderm, das den kardialen Halbmond, späteren linearen Herzschlauch und ultimativ den linken Ventrikel und Teile der Atrien bildet. Als zweite kardiogene Region ist das „anteriore/zweite Herzfeld“ Sitz von Zellen, die aus pharyngalem Mesoderm medial zum kardialen Halbmond stammen, zum linearen Herzschlauch addiert werden und sowohl den Ausflusstrakt, rechten Ventrikel als auch Teile atrialen Gewebes bilden. Das „zweite Herzfeld“ wird durch die molekulare Expression des LIM Homeodomain Transkriptionsfaktors *Islet 1* (*Isl1*) charakterisiert, als auch durch spatio-temporale Kriterien, die auf klonalen Analysen basieren (Meilhac et al., 2004). *Isl1* wird im Ausflusstrakt, rechten Ventrikel und Teilen der Atrien exprimiert, jedoch nicht im linken Ventrikel. Außerdem zeigt die *Isl1*-Mausmutante schwere Defekte in der Ausbildung selbiger Strukturen (Cai et al., 2003). Da *Isl1*-Expression jedoch auch in Teilen des primären Herzfeldes gefunden wurde (Yuan und Schoenwolf, 2000; Prall et al., 2007; Brade et al., 2007) beziehungsweise Zellen, die einmal *Isl1* exprimiert haben, sich im gesamten Herzen wiederfinden lassen (Sun et al., 2007), ist es fraglich, ob *Isl1* als spezifischer Marker des „zweiten Herzfeldes“ anzusehen ist. Denn auch einige andere Gene wie *Tbx1*, *Tbx5*, *Tbx20*, *eHand/Hand1* und *dHand/Hand2* definieren Subdomänen der herzbildenden Region und spezifischer Herzkammern. Die Expression eines oder mehrerer Gene ist jedoch wahrscheinlich nicht ausreichend, um distinkte Areale der herzbildenden Region zu definieren, die basale Muster der Herzbildung reflektieren. Interessanterweise ist der posteriore Teil des „zweiten Herzfeldes“ vor allem Sitz von Zellen, die den Einflussbereich des Herzens modellieren. Da diese Zellen jedoch nicht mehr *Nkx2.5* exprimieren, wurde dazu übergegangen von einem weiteren dritten Herzfeld, nämlich dem „posterioren Herzfeld“ zu sprechen (Gittenberger de-Groot et al., 2007). Dieses bildet den Einflussbereich des Herzens, an dem der *Sinus venosus* in die Perikardhöhle eintritt und Kardiomyozyten des zentralen Teils des Reizleitungssystems als auch proepikardiale Zellen

hervorbringt (Abb.2B). Die Existenz eines möglichen „posterioren Herzfeldes“ wurde auch in *Ciona* beschrieben, wonach die Extension des Herzschlauches durch FGF-Signale reguliert wird (Davidson et al., 2006). Weiterhin wird der Einfluss einer „pronephrischen Domäne“ auf die posterior gelegenen Herzvorläuferzellen des „zweiten Herzfeldes“ postuliert (Perez-Pomares et al., 2009). Es bleibt jedoch weiter strittig, ob zwei strikt voneinander getrennte Herzvorläuferpopulationen, oder ein einziges bilaterales Herzfeld zur Bildung des Herzens führen (Laugwitz et al., 2008; Abu-Issa und Kirby, 2008). So wäre es ebenfalls vorstellbar, dass die Herzvorläufer der herzbildenden Region das Potential besitzen, je nach Position, verschiedene Herzkompartimente zu bilden. Dies würde implizieren, dass unterschiedliche Stimuli in Abhängigkeit von Raum und Zeit notwendig sind, um eine zelluläre Diversität zu generieren, die zur Restriktion des einst homogenen Entwicklungspotentials führt.



**Abb.2 - Das primäre, anteriore und posteriore Herzfeld im Hühnerembryo**

(A) Schematische Darstellung der Lokalisation des primären Herzfeldes (blau) und anterioren Herzfeldes (rot) und deren Beteiligung an kardialen Strukturen während der frühen Kardiogenese im Hühnerembryo. (B) In der schematischen Darstellung eines Hühnerembryos, ist das denkbare Kontinuum von primärem (braun und blau) und sekundärem Herzfeld (gelb) dargestellt. Das sekundäre Herzfeld kann hierbei in anteriores Herzfeld (AHF, am Ausflusstraktregion des Herzens) und posteriores Herzfeld (PHF, am Einflussbereich des Herzens) unterteilt werden. Das Proepikard (PEO) entsteht als Teil des posterioren Herzfeldes auf dem *Sinus venosus* (entnommen aus Abu-Issa und Kirby, 2007; Lie-Venema et al., 2007).

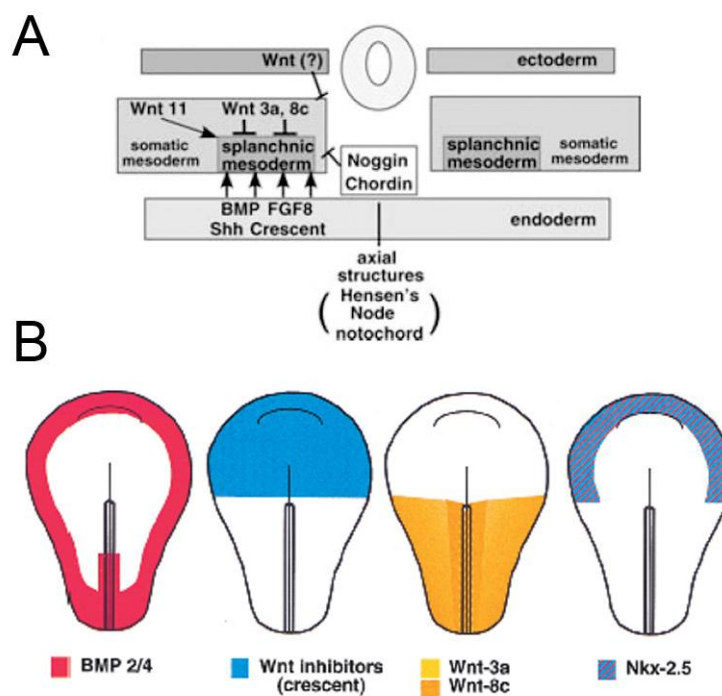
## 2.2 Molekulare Grundlagen der Kardiogenese

### 2.2.1 Die Induktion kardialer Vorläuferzellen

Im Vogelembryo wird die frühe kardiale Spezifizierung durch zwei distinkte Signalzentren reguliert, nämlich dem prägastrulären Hypoblasten (Yatskievych et al., 1997) und dem anterioren lateralen Endoderm (Orts-Llorca, 1963; Schultheiss et al., 1995; Yatskievych et al., 1997). So konnte gezeigt werden, dass hypoblastisches Aktivin, ein Wachstumsfaktor der TGF $\beta$ -Familie, Epiblastzellen zu kardialem Mesoderm induziert (Yatskievych et al., 1997). Die Spezifizierung der Herzvorläuferzellen beginnt bereits während die Zellen noch im Primitivstreifen des frühen Embryos liegen und verläuft weiter während sie aus diesem auswandern, um die bilateralen Herzfelder zu formen (Gonzalez-Sanchez und Bader, 1990; Montgomery et al., 1994; Gannon und Bader, 1995). Für die Migration der myokardialen Vorläuferzellen sind die basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren *Mesp1* und *Mesp2* von Bedeutung (Kitajima et al., 2000). Diese als auch FGF8, ein Mitglied der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Familie, werden während der Gastrulation im Mesoderm exprimiert (Saga et al., 1999; Crossley und Martin, 1995; Reifers et al., 2000) und resultieren bei reduzierter Expression in einer anormalen Herzentwicklung. *Knock out*-Studien zeigen, dass beide Gene für die Migration von Mesoderm während der Gastrulation benötigt werden (Saga et al., 2000; Ilagan et al., 2006) und somit eine Schlüsselrolle in der frühen Spezifizierung myokardialer Vorläuferzellen spielen. Aber auch FGF4 und *Fgfr1* (FGF-Rezeptor1) sind in die Mesodermmigration involviert (Ciruna und Rossant, 2001). Diese FGF-Funktion scheint zudem konserviert, da der FGF-Rezeptor *heartless* in *Drosophila* ebenfalls für die Migration kardialen Mesoderms verantwortlich ist (Beiman et al., 1996). Nach Bildung der Herzfelder ist der Embryo eine ovoide Scheibe, bestehend aus Endoderm, Ektoderm und Mesoderm. Letzteres liegt zwischen Endoderm und Ektoderm und ist Ursprung der Kardiomyozyten. In Säugetieren ist das Mesoderm, wie bereits angesprochen, in das dorsale somatische Mesoderm und das ventrale splanchnische Mesoderm unterteilt. In unmittelbarer Nähe des splanchnischen Blattes, Habitat der Herzvorläuferzellen, liegen das anteriore Endoderm, das Neuroektoderm und der Hensensche Knoten/Notochord (Abb.3A). Diese Strukturen emittieren positive oder negative Signale zur Induktion kardialen Mesoderms. Positive Signale kommen dabei prominent aus dem Endoderm. Hierbei spielen vor allem BMP2 (*Bmp*, *bone morphogenetic protein*), ein TGF $\beta$ -Ligand, als auch FGF8 eine wichtige Rolle (Abb.3A; Yamada et al., 2000; Alsan und Schultheiss, 2002). BMP2 ist

essentiell für die Kardiogenese (Schultheiss et al., 1997; Andree et al., 1998; Schlange et al., 2000) und diese Funktion hochkonserviert, da sein *Drosophila*-Homolog Dpp (*Decapentaplegic*) das *tinman*-Gen induziert, ohne welches die Herzentwicklung in der Fliege stagniert (Frasch, 1999). BMP wird im Hühnerembryo bilateral im lateralen Plattenmesoderm, darunterliegenden Endoderm, sowie im kaudalen Drittel des Primitivstreifens exprimiert (Abb.3B; Andree et al., 1998), reicht jedoch für die Spezifizierung der herzbildenden Region allein nicht aus. Denn durch die Expression von BMP2 im posterioren lateralen Plattenmesoderm kommt es nicht zur Determination myokardialer Vorläufer (Andree et al., 1998). Nur in Kombination mit Wachstumsfaktoren der FGF-Familie (siehe 2.3.5.1) können BMPs auch im eigentlich nicht-kardialen posterioren Mesoderm kardiales Mesoderm induzieren (Lough et al., 1996; Alsan und Schultheiss, 2002). Für die kardiogene Spezifizierung ist demnach nicht nur eine kontinuierliche BMP-Aktivität, sondern auch eine kurze jedoch frühe FGF-Aktivität notwendig (Barron et al., 2000). Weiterhin wird die Bedeutung von FGF-Signalen für die Spezifizierung von Kardiomyozyten durch „embryoid bodies“ aus Fgfr1 (FGF-Rezeptor1)-defizienten ES-Zellen unterstrichen, welche zwar noch in Endothelzellen aber nicht mehr zu Myokard differenzieren können (Dell’Era et al., 2003). Eine entscheidende Rolle für die Spezifizierung kardialen Mesoderms spielen aber auch Wnt-Antagonisten, denn erst durch die Inhibition kanonischer Wnt-Signale (siehe 2.3.5.2) wird im Endoderm die Aktivität von BMP2 ermöglicht. Kanonische Wnt-Liganden wie WNT3A und WNT8C, die myokardiale Differenzierung reprimieren, werden in der posterioren Hälfte des Hühnerembryos exprimiert (Abb.3B; Marvin et al., 2001; Schneider und Mercola, 2001). Wnt-Antagonisten dagegen, die Wnt-Liganden kompetitiv binden und somit ihre Bindung an den Frizzled-Rezeptor inhibieren, werden in der anterioren Hälfte des Hühnerembryos exprimiert (Abb.3B). So findet die anteriore Induktion kardialer Vorläuferzellen durch Crescent und Dickkopf 1 (DKK-1) statt (Marvin et al., 2001). Dies erklärt ebenfalls, warum die ektopische Expression von BMP2 im paraxialen Mesoderm nur im anterioren Drittel des Embryos zur Induktion kardialer Markergene führt (Schultheiss et al., 1997; Schlange et al., 2000). Nicht kanonische Wnt-Liganden (siehe 2.3.5.2) begünstigen dagegen die myokardiale Differenzierung (Soloway und Harvey, 2003). So besitzt das im posterioren Mesoderm exprimierte WNT11 ebenfalls eine herzinduzierende Funktion (Eisenberg und Eisenberg, 1999). Als negative Regulatoren agieren können weiterhin Noggin (Schlange et al., 2000; Ladd et al., 1998; Schultheiss et al., 1997) und Chordin (Matsui et al., 2005). Diese TGF $\beta$ -Antagonisten werden im Notochord exprimiert (Abb.3A) und begrenzen

den Einfluss von BMP zur Mittellinie hin. Somit beschränken inhibitorische Signale allgemein die kardiale Induktion auf eine spezifische Population von Mesodermzellen. Wnt-Signale als auch Noggin können jedoch in Abhängigkeit vom Reifegrad der Zelle auch als Induktoren fungieren. Schlussfolgernd führt also das Zusammenspiel induzierender und inhibierender Faktoren mesodermale Zellen in die kardiale Linie. Dies geschieht durch die Induktion kardialer Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel *Nkx2.5* (zusammengefasst u.a in Brand, 2003). Fehlen beispielsweise *Bmp*-Signale, kommt es in *Drosophila* (Frasch et al., 1995), im Zebrafisch (Kishimoto et al., 1997) und höheren Vertebraten zum Verlust kardialer Markergenexpression wie *tinman* oder *Nkx2.5*. Im Huhn konnte gezeigt werden, dass die BMP2-Abhängigkeit kardialer Markergenexpression bis zum HH Stadium 8 besteht (Schlange et al., 2000). Weiterhin führt auch das Fehlen von FGF8-Signalen, wie in der *ace* (*acerebellar*)-Mutante im Zebrafisch, zum Verlust kardialer Markergenexpression und kardialen Defekten (Reifers et al., 2000).



**Abb.3 - Die Induktion kardialen Mesoderms im Hühnerembryo**

(A) In der schematischen Darstellung sind die Signalwege vermerkt, die zur Induktion des kardialen Mesoderms führen. Positive Signale aus Endoderm (BMP, FGF8, Crescent) und Mesoderm (WNT11) induzieren kardiales Schicksal in Zellen des splanchnischen Blattes. Inhibitorische Signale aus Ektoderm, Hensenschen Knoten/Notochord (Noggin, Chordin) als auch mesodermale WNT-Signale, grenzen die Induktion kardialen Mesoderms ein. (B) *BMP2/4* werden im posterioren Teil des Primitivstreifens und in den lateralen Regionen des Hühnerembryos exprimiert. Die kardiale Induktion erfolgt jedoch nur in Regionen, in denen kanonische WNT-Signale (gelb) von WNT-Antagonisten (blau) inhibiert werden. Dort kommt es zur Expression kardialer Markergene wie *NKX2.5* (blau-rot gestreift), (entnommen und modifiziert aus Brand, 2003; Wagner und Siddiqui, 2007; Marvin et al., 2001).

### 2.2.2 Die Rolle kardialer Transkriptionsfaktoren in der Spezifizierung kardialen Mesoderms

Während der Embryonalentwicklung werden Zellen des splanchnischen Mesoderms durch die komplexe Interaktion zahlreicher Transkriptionsfaktoren zu kardialem Schicksal determiniert. Somit kann die herzbildende Region durch die frühe Expression kardialer Markergene charakterisiert werden. Im Mittelpunkt steht hierbei der Homöobox-Transkriptionsfaktor *Nkx2.5*, der ursprünglich in *Drosophila* entdeckt (Azpiazu und Frasch, 1993) und daraufhin in Vertebraten identifiziert wurde (Lints et al., 1993). In *Drosophila* ist das *Nkx2.5*-Homolog *tinman* essentiell für die Herzentwicklung (Bodmer, 1993). *Nkx2.5*-Mausmutanten sterben frühzeitig aufgrund der Fehlentwicklung von Ein- und Ausflusstrakt des primitiven Herzensschlauches (Lyons et al., 1995). Die Differenzierung von Kardiomyozyten findet im Gegensatz zu *tinman*-Mutanten jedoch statt, da andere Mitglieder der NK-Familie von Homöobox-Transkriptionsfaktoren den Verlust von *Nkx2.5* kompensieren können. Im Huhn ist neben der *Nkx2.5*-Expression im antero-lateralen Mesoderm zum HH Stadium 5 und späteren ventrikulären Expression des Gens außerdem die Expression von *Nkx2.3* und *Nkx2.8* vorzufinden (Buchberger et al., 1996; Brand et al., 1997). In der Maus wird weiterhin *Nkx2.6* exprimiert (Tanaka et al., 2000). *Nkx2.5* spielt eine wichtige Rolle für die transkriptionelle Regulation verschiedener kardialer Gene (Bruneau et al., 2000). Seine eigene transkriptionelle Aktivität wird durch die physische Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Gata4, SRF, Tbx2, Tbx5, Tbx20, dHand/Hand2 als auch Foxh1 moduliert (Akazawa und Komuro, 2005). Besonders die Gata-Genfamilie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren ist für die Herzentwicklung von hoher Bedeutung. In *Drosophila* ist ein einziges Gata-Gen *pannier* für die Kardiogenese essentiell (Gajewski et al., 1999). Die *pannier*-Expression wird hierbei von *tinman* reguliert, wobei das *pannier*-Protein wiederum mit *tinman* interagiert, um die Expression kardialer Gene zu aktivieren (Gajewski et al., 2001). Gata4, Gata5 und Gata6 werden in der Maus im viszeralen Endoderm und präkardialen Mesoderm aber auch im Herzen exprimiert (Molkentin, 2000). *Gata4*-Mausmutanten zeigen einen *cardia bifida*-Phänotyp, hierbei kommt es zur Ausbildung von bilateralen Herzsclhäuchen (Kuo et al., 1997; Molkentin et al., 1997). Derselbe Phänotyp wird auch in *Gata5*-Zebrafischmutanten hervorgerufen (Reiter et al., 1999). Die *Gata5*-Mutation ist in der Maus nicht letal (Molkentin et al., 2000b), wohingegen *Gata6*-Mutanten bereits nach der Implantation sterben (Morrisey et al., 1998). Ein weiterer Faktor, der für die Transkription herzspezifischer Gene von

Bedeutung ist, ist SRF (*serum response factor*). SRF gehört zur MADS-Box-Familie und wird im Hühnerembryo HH Stadium 8 mit *NKX2.5* und *GATA4* in der herzbildenden Region ko-exprimiert (Sepulveda et al., 2002). *SRF*-Nullmutanten weisen starke Gastrulationsdefekte auf und bilden kein Mesoderm aus (Arsenian et al., 1998; Weinhold et al., 2000). Zusammen mit dem Ko-Faktor Myocardin bildet SRF einen Komplex zur Aktivierung kardialer Promotoren (Wang et al., 2001). Myocardin ist ein Transkriptionsfaktor der SAP-Domänen-Familie und beispielsweise in *Xenopus* in die myokardiale Zelldifferenzierung involviert. Interessanterweise geht die *Myocardin*-Expression im Vogelembryo der *NKX2.5*-Expression voraus und wird im Gegensatz zu dieser nicht von Bmp-Signalen reguliert (Warkman et al., 2008). Ebenfalls zur MADS-Box-Familie gehören die Mef2 (*myocyte enhancer factor 2*)-Transkriptionsfaktoren, die für die Spezifizierung myogener Zellen von Bedeutung sind. In *Drosophila* existiert ein *Mef2*-Gen, wogegen in Vertebraten vier Gene (*Mef2a-c*) bekannt sind (Black und Olson, 1998). Alle Mef2-Gene werden transient im Herzen exprimiert (Edmondson et al., 1994; Lin et al., 1997). Bei Verlust der Mef2-Funktion kommt es in *Drosophila* zur defekten Differenzierung von Glatt-, Skelett-, und Herzmuskelzellen (Bour et al., 1995; Lilly et al., 1995). *Mef2c*-defiziente Mäuse dagegen weisen keinen rechten Ventrikel auf (Lin et al., 1997). Dieser Befund weist darauf hin, dass *Mef2c* eine Rolle in der Entwicklung des zweiten Herzfeldes spielt. *Mef2c* wird im sekundären Herzfeld exprimiert und ist ein direktes transkriptionelles Ziel von Isl1 und Gata-Faktoren (Dodou et al., 2004). So zeigen *Mef2c*-Mausmutanten den gleichen kardialen Phänotyp wie *Isl1*-defiziente Mäuse (Lin et al., 1997; Cai et al., 2003). Da die Transkription von *Mef2c* in Abhängigkeit von Gata-Faktoren und *Nkx2.5* reguliert wird (Dodou et al., 2004), scheinen die erste und zweite Herzvorläuferpopulation also zum Teil von gleichen genetischen Programmen gelenkt zu werden.

### 2.2.3 Kardiale Reifungsprozesse und die transkriptionelle Regulation der Kammerentwicklung

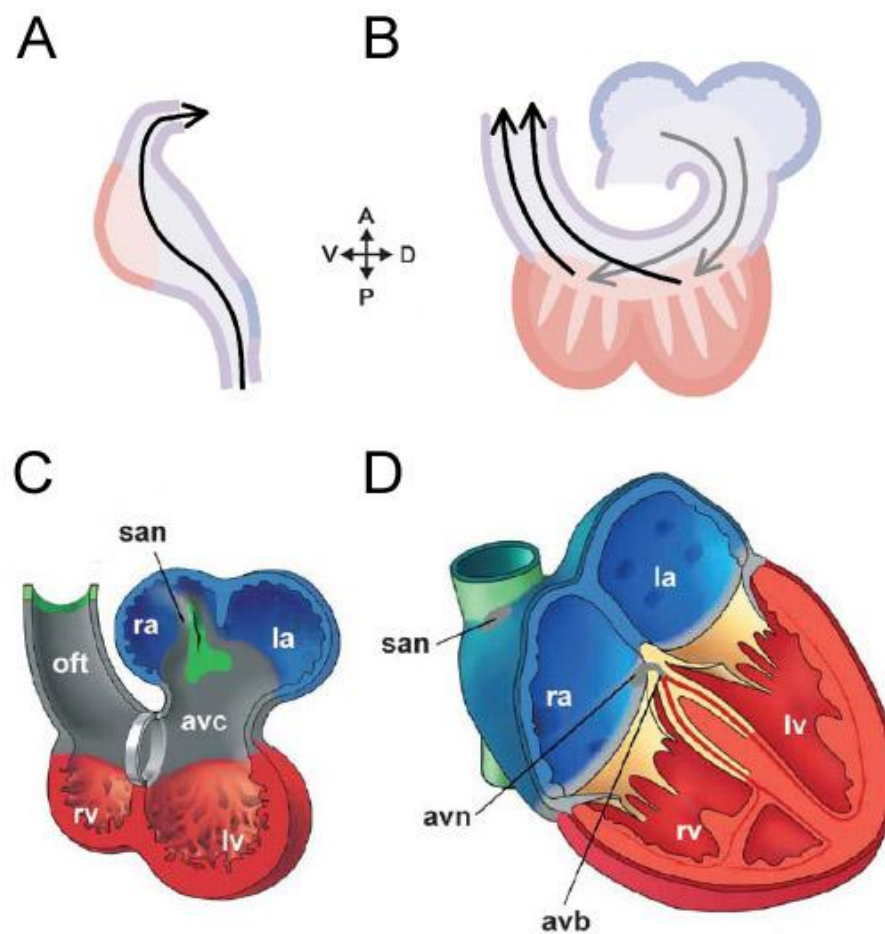
Nach der Spezifizierung und Determinierung kardialen Mesoderms, beginnt mit Bildung des linearen Herzschlauches die Differenzierung der Kardiomyozyten, worauf das Herz zu kontrahieren beginnt. Kardiales Troponin-I und sarkomerisches Myosin (MF20), molekulare Marker der Kardiomyozytendifferenzierung, werden im Hühnerembryo ab HH Stadium 8-9 zunächst nur im Zentrum der herzbildenden Region und anschließend ausschließlich in der Herzhöhle exprimiert (Moreno-Rodriguez et al., 2006). Das kontrahierende Herz durchläuft im Folgenden mehrere Reifungsprozesse, die zur Bildung des maturierten Organs führen (Abb.4C). Während der Addition sekundären Myokards am anterioren und posterioren Herzpol ist die weitere Morphogenese des Herzens zunächst durch das gerichtete *looping* geprägt. Die Konvertierung des linearen Herzschlauches in die links-rechts (L-R) Orientierung geht der Bildung der Herzkammern durch das *ballooning* voran (Abb.4A). Hierdurch entsteht ein primitives Herz mit zwei atrialen und ventrikulären Kammern (Abb.4B). Mit der Reifung bereits angelegter kardialer Segmente, bilden sich zur Verstärkung der Ventrikel im Lumen aus Myokardzellen Trabekel. Weiterhin erfolgt die Septierung von Ventrikeln, Atrien und Ausflusstrakt als auch die Bildung der Herzklappen, wobei diese Zellen aus endokardialen Kissen stammen, die endokardialen Ursprungs sind und mit der extrazellulären Matrix der *cardiac jelly* interagieren.

Die Bildung der Herzkammern wird durch ein komplexes transkriptionelles Netzwerk realisiert. So ist die Expression vieler Gene, die anfänglich im tubulären Myokard detektiert wird, daraufhin auf mutmaßliche atriale oder ventrikuläre Kompartimente begrenzt. Maßgeblich involviert in die Entwicklung der Herzkammern ist die Familie der T-Box-Transkriptionsfaktoren. Hiernach wird die Tbx1- (*Tbx1*, *Tbx18*, *Tbx20*) und Tbx2-Subfamilie (*Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx5*) im Herzen exprimiert (Naiche et al., 2005). Die Differenzierung von Kammermyokard ist gekennzeichnet durch die Expression von *Nppa* (*natriuretic precursor peptide*) beziehungsweise ANF (*atrial natriuretic factor*) (Christoffels et al., 2004), und unterliegt der Kooperation von Tbx5 und Nkx2.5 (Hiroi et al., 2001), in Abhängigkeit von Tbx2 und Tbx3, die *Nppa* im AV-Kanal reprimieren (Christoffels et al., 2004). Durch den Verlust von *Tbx5* kommt es zu kardialen Septierungsdefekten und Ausbildung des Holt-Oram-Syndroms (Basson et al., 1997). *Tbx3* beeinflusst weiterhin die Entwicklung spezifischer Teile des Reizleitungssystems, wie beispielsweise des Sinusknotens (Hoogaars et al., 2007b). Die verschiedenen Komponenten des Reizleitungssystems des Herzens



(Sinusknoten, Atrioventrikularknoten, His-Bündel, Purkinje-Fasern) leiten elektrische Impulse weiter, die die Kontraktion des Myokards kontrollieren (Abb.4A, B). Sie entstehen aus atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten (Gourdie et al., 1995). Weitere Transkriptionsfaktoren die eine Rolle in der Formation der Herzkammern spielen sind unter anderem *Hand1/2*, *Irx4* und *Hey1/2*. Die basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren *Hand1* und *Hand2* sind in die Entwicklung der ventrikulären Kammern involviert. *Hand1* wird in der Maus vorwiegend im linken, *Hand2* dagegen im rechten Ventrikel exprimiert (Srivastava et al., 1995; Thomas et al., 1998). Die *Hand2*-Mausmutante zeigt einen hypoplastischen rechten Ventrikel (Srivastava et al., 1997). Beim Verlust von *dHAND* im Zebrafisch kommt es ebenfalls zur Fehlbildung des Ventrikels (Yelon et al., 2000). Auch das Homeobox-Protein *Irx4* (*iroquois-related4*) wird ausschließlich im zukünftigen Ventrikel exprimiert (Bruneau et al., 2000). Der Verlust dieses Gens hat keine direkten Auswirkungen auf die Herzmorphogenese, könnte aber durch die myokardiale Expression weiterer *Irx*-Homeoboxgene kompensiert werden (Christoffels et al., 2000b). *Hey1* und *Hey2* schließlich werden sowohl in ventrikulären als auch atrialen Vorläuferzellen exprimiert (Leimeister et al., 1999). *Hey2*-Nullmutanten der Maus zeigen komplexe kardiale Phänotypen, wie unter anderem kardiale Hypertrophie und Septierungsdefekte des Ventrikels (Gessler et al., 2002; Donovan et al., 2002). Funktionelle Zusammenhänge zuvor erwähnter Gene in Bezug auf die verschiedenen Aspekte der Herzkammerformation sind noch nicht vollständig geklärt.

Neben der Bildung der Herzkammern spielt aber auch die Besiedlung des Herzens durch extrakardiale Zellpopulationen eine wichtige Rolle im kardialen Reifungsprozess. Hiernach sind Neuralleistenzellen, die dem Neuralrohr entstammen, nach Migration ins primitive Herz an der Entwicklung des Ausflusstraktes, der Reorganisation der pharyngalen Arterien und der Septierung des *conotruncus* beteiligt (Kirby und Waldo, 1995). Weiterhin stammt auch das Epikard, welches die verschiedenen Zellen der Koronargefäße, kardiale Fibroblasten sowie Zellen der atrioventrikulären Klappen hervorbringt, aus einer extrakardialen Struktur, die am venösen Pol des Herzens gebildet und als Proepikard bezeichnet wird (Männer et al., 2001).



**Abb.4 - Die Bildung des vier-kammerigen Herzens**

(A) Im linearen Herzschlauch sind ventrikuläres (rot) und atriales Myokard (blau) bereits determiniert. (B) Durch *looping* und *ballooning* kommt es zur Bildung der Herzkammern. (C) In der Abbildung ist ein Herz zu sehen, ähnlich wie das in B. Hier ist neben den atrialen (blau) und ventrikulären Kammern (rot), die Entwicklung des Sinusknoten (grün) und der Trabekel sichtbar. (D) Durch die Septierung und weitere Reifung der Kammern entsteht das vier-kammerige Herz. ra-rechtes Atrium; la-linkes Atrium; rv-rechter Ventrikel; lv-linker Ventrikel; oft-Ausflusstrakt; san-Sinusknoten (entnommen aus Christoffels et al., 2000; Moormann et al., 2004).

### 2.2.4 Die Lateralisierung der Herzanlage und des venösen Pols

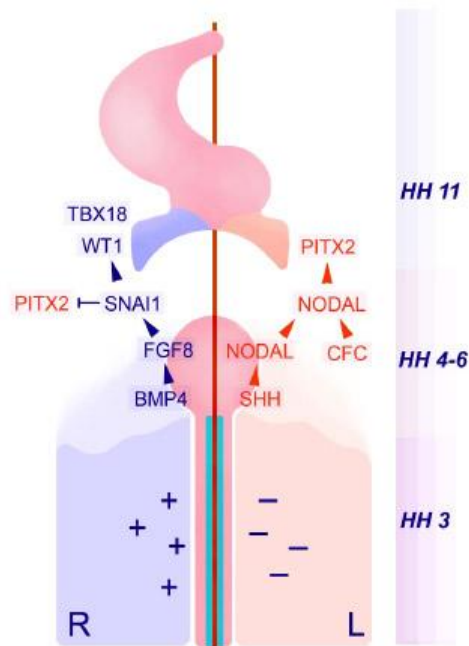
Im kardialen Reifungsprozess ist das *looping* des Herzens der erste morphologisch sichtbare Bruch mit der bilateralen Symmetrie des Embryos. Die Transformation der gradlinigen Herzhöhle in eine Konfiguration, die man als *Dextroloop* bezeichnet, wird durch die ventrale Beugung des primitiven Ventrikels und seine zeitgleiche Drehung nach rechts bewirkt (Männer, 2004). Dieser Vorgang ist für die normale Herzkammerentwicklung unabdingbar und setzt eine molekulare Asymmetrie in der Herzhöhle voraus, der die morphologische Asymmetrie nachfolgt. Die molekulare Asymmetrie des Herzens geht aus der Etablierung der

links-rechts (L/R)-Achse des Embryos hervor, welche in Relation zu der zuvor determinierten dorso-ventral und antero-posterior-Achse entsteht. Demnach beinhalten die Signalkaskaden, die zur Festlegung der L/R-Achse führen, die ersten Schritte auf dem Weg zum kardialen *looping*-Prozess und der L/R-Herzkammerdeterminierung. Der unterliegende molekulare Prozess kann in folgende Schritte unterteilt werden: den initialen Bruch der bilateralen Symmetrie im oder in Nähe des Organisators/Knotens; die Signaltransduktion der initiierten molekularen Asymmetrie in das LPM; die L/R-asymmetrische Expression von Signalmolekülen im LPM; und die Induktion asymmetrischer Organmorphogenese durch asymmetrisch exprimierte Signalmoleküle. In Abhängigkeit vom studierten Modellorganismus wird der erste Symmetriebruch am Organisator durch physikalische oder genetische Initiatoren erreicht. So wird angenommen, dass in der Maus die Verlagerung linksseitiger Determinanten im Organisator durch einen gerichteten Fluss am Boden des Knotens stattfindet (*Nodal flow*), welcher unter der Rotation von Monozilien epithelialer Zellen linksseitige Determinanten auf die linke Seite des Embryos befördert (Brown und Wolpert, 1990; Nonaka et al., 1998; Schlueter und Brand, 2007). Ein weiteres *Nodal flow*-Modell postuliert die mechanische Reizung perinodaler Zilien, wodurch es über den Calciumkanal Polycystein2 (Pdk2) zur Aktivierung asymmetrischen Genexpression kommt (McGrath et al., 2003; Schlueter und Brand, 2007). Auch im Zebrafisch und *Xenopus* wurde das Vorhandensein eines *Nodal flow* nachgewiesen (Essner et al., 2005; Schweikert et al., 2007), wogegen im Huhn hierfür bislang kein eindeutiger Beweis erbracht werden konnte. Eine weitere Modellvorstellung geht von einem asymmetrischen Membranpotential im Primitivstreifen bereits vor Etablierung der Knotenasymmetrie aus, welches durch die Aktivität von ATPasen aufrechterhalten wird. Durch das Membranpotential kommt es über eine interzelluläre *gap junction*-Kommunikation zur Ausbildung eines Gradienten von L/R-Determinanten mit niedrigem Molekulargewicht (Schlueter und Brand, 2007). Es ist noch nicht verstanden, wie diese frühe Asymmetrie im Primitivstreifen auf den Knoten übertragen wird. Basierend auf Studien im Hühnerembryo wird als weitere Variante zur Initiierung von Asymmetrie die Etablierung einer perinodalen asymmetrischen L/R-Expressionsdomäne angesehen, die die Lateralitätsinformation in den Knoten überträgt. Das eigentliche Ziel des Symmetriebruchs ist letztlich die Aktivierung des NODAL-PITX2-Signalwegs, der für die Determination der L/R-Asymmetrie verantwortlich ist und nachfolgend übersichtsartig für den Hühnerembryo beschrieben werden soll (Abb.5).

Im Hühnerembryo ist der erste molekulare Hinweis auf L/R-Asymmetrie, die asymmetrische Expression des Signalmoleküls Aktivin $\beta$ B im Hensenschen Knoten (Levin et al., 1997). Aktivin $\beta$ B induziert Zellen auf der rechten Seite des Knoten *BMP4* zu exprimieren (Boettger et al., 1999; Monsoro-Burq et al., 2001). *BMP4* antagonisiert Sonic Hedgehog (SHH), wodurch die SHH-Aktivität auf die linke Seite des Knotens beschränkt wird. Weiterhin induziert *BMP4* die Expression von *FGF8* in benachbarten Zellen auf der rechten Seite des Embryos, wodurch wiederum der transkriptionelle Repressor *SNAI1* im rechten LPM induziert wird (Isaac et al., 1997). *SNAI1* reprimiert nachfolgend die Expression von *PITX2*, wodurch die linksseitige Identität unterbunden wird. Nach der linksseitigen Etablierung von SHH kommt es im linken LPM direkt neben dem Hensenschen Knoten zur Induktion des TGF $\beta$ -Signalmoleküls *NODAL* (Levin et al., 1995). Mit voranschreitender Entwicklung ist eine zunehmend starke Expressionsdomäne im linken LPM festzustellen, was auf einen positiven *feedback loop* zurückzuführen ist, wonach *NODAL* an seinen Rezeptor bindet und dadurch seine eigene Expression stimuliert. Für die Aufrechterhaltung des aktiven *NODAL*-Rezeptorkomplexes wird der Kompetenzfaktor CFC benötigt, dessen Aktivität auf der von *BMP2* beruht (Schlange et al., 2002). Da *BMP2* bilateral im LPM exprimiert wird und zum einen *NODAL* induzieren kann (Schlange et al., 2002) und andererseits SHH antagonisiert, muss die *NODAL*-Expression im rechten LPM verhindert und im linken LPM ermöglicht werden. Um die *NODAL*-Induktion durch SHH auf der linken Seite zu ermöglichen, wird *BMP* sehr wahrscheinlich durch *CER1* antagonisiert. *CER1* gehört zur Cerberus/Dan-Familie, wird unter der Kontrolle von SHH exprimiert und ist zudem ein negativer Regulator von *NODAL* (Tavares et al., 2007). Dies könnte dem Molekül eine weitere Rolle in der Prävention der Ausbreitung der *NODAL*-Expression zuordnen. *NODAL* selbst induziert weiterhin die Expression von *LEFTY1*, einem TGF $\beta$ -Faktor, der in der Mittellinie als negativer Regulator von *NODAL* agiert und somit den Übergang der *NODAL*-Expression auf die rechte Seite verhindert (Cheng et al., 2003). In den Regionen des LPM, in denen wenig oder kein *LEFTY1* exprimiert wird, kann *NODAL*, durch die Induktion von *PITX2*, ungehindert die linksseitige Identität etablieren. Denn der Transkriptionsfaktor *PITX2* ist ein links-rechts Mediator, der Zellen 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). Durch genetische Studien ist eindeutig belegt, dass die Herzentwicklung in zweierlei Hinsicht von der L/R-Lateralität des frühen Embryos abhängig ist. Die Seitigkeit des Herzens innerhalb des Embryos als auch die L/R-Ausrichtung der Herzkammern basieren auf dieser.

Beispielsweise kommt es in Embryonen durch den Verlust oder die bilaterale Expression von *Nodal* als auch durch den Verlust von *SnR* in frühen Entwicklungsstadien zur Randomisierung des Herzloopings (Levin et al., 1995; Ramsdell, 2005; Breckenridge et al., 2001). So führt auch der Verlust von *SNAI1* im Huhn bei normaler linksseitiger *PITX2*-Expression zur Randomisierung des Herzloopings (Patel et al., 1999). *Iv* (*inverses viscerum*)-Mäuse, die Mutationen des links-rechts Dyneins (*Lrd*) aufweisen, welches für die Motilität der Monozilien im Organisator essentiell ist, zeigen eine gestörte *Nodal*-Expression und ebenfalls Randomisierungen der L/R-Asymmetrie (Lowe et al., 1996; Supp et al., 1997). Die Überexpression als auch der Verlust von *PITX2* im Huhn und Frosch dagegen zeigen zwar einen Zusammenhang zwischen *PITX2*-Expression und Herzlooping (Campione et al., 1999; Linask et al., 2002), die *Pitx2*-Mausmutante weist jedoch kein randomisiertes Herzlooping sondern lediglich eine Rechtsisomerie der Atrien auf (Kitamura et al., 1999; Liu et al., 2001). Somit scheint die Kopplung von embryonaler Lateralität und Herzlooping durch *Nodal* definiert zu werden und offenbar nicht direkt von *Pitx2* abhängig zu sein. Vielmehr scheint die asymmetrische Morphogenese von Organen wie Darm und Lunge von der Dosis der *Pitx2*-Expression abhängig zu sein. Ein Hinweis darauf, dass Links-Determinanten auch eine Rolle in der ventrikulären Musterbildung spielen, zeigt die *Lefty*-Mausmutante, in der *Pitx2* bilateral im LPM exprimiert wird, was zur Linksisomerie der Atrien und Fehlbildung des rechten Ventrikels führt (Meno et al., 1998).

Ein wichtiger Befund zeigte kürzlich, dass die Lateralität des auf dem venösen Pol im Huhn rechts-asymmetrisch ausgebildeten Proepikards (2.3.1, Abb.6) nicht vom NODAL-PITX2-Signalweg abhängig ist (Schlueter und Brand, 2009). Manipulationen linksseitiger Determinanten wie SHH, NODAL und CFC als auch die Überexpression von *PITX2* haben keinen Effekt auf die Seitigkeit der Proepikardentwicklung. Im Gegensatz dazu beeinflusst die Inhibition früher Regulatoren der L/R-Asymmetrie wie beispielsweise die der H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase die Seitigkeit der Vorläuferpopulation. Ist die Funktion der rechtsseitigen Determinanten FGF8 und SNAI1 gestört, wird kein Proepikard ausgebildet, wogegen die ektopische Expression von FGF8 und SNAI1 auf der linken Seite zur bilateralen Proepikardentwicklung führt. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die rechte Seite, wie die linke, einen instruktiven Signalweg beherbergt, der in die Kontrolle der Proepikardentwicklung involviert ist (Abb.5). Dieser rechtsseitige Signalweg könnte für die Lateralisierung des venösen Herzpols von allgemeiner Bedeutung sein.



**Abb.5 - Signalwege zur Etablierung der L/R-Asymmetrie im Huhn**

Im gastrulierenden Hühnerembryo kommt es durch frühe Regulatoren der L/R-Asymmetrie zur Bildung einer funktionellen Mittellinie (rot), die rechte (+) und linke (-) Embryoseite voneinander trennt. Darauf folgend führt im HH Stadium 4-6 die asymmetrische Expression von Genen im Hensenschen Knoten zur Induktion des NODAL-PITX2-Signalwegs auf der linken Seite und zur Induktion von SNAI1 durch FGF8 auf der rechten Seite. Der NODAL-PITX2-Signalweg hat im Folgenden keinen Einfluss auf die Expression proepikardialer Markergene, wogegen SNAI1 für die Expression von *TBX18* und *WT1* notwendig ist (entnommen aus Schlueter und Brand, 2009).

#### 2.2.4.1 Apoptose - Regulator der unilateralen Proepikardentwicklung am venösen Pol

Ein Prozess der während der gesamten Embryogenese essentiell ist für die Morphogenese von embryonalen Strukturen ist der programmierte Zelltod, Apoptose genannt (Jacobson et al., 1997; Vaux und Korsmeyer, 1999). Auch für die Herzentwicklung ist die Apoptose von Zellen essentiell (Pexieder, 1975; Fisher et al., 2000; Poelmann et al., 2000). Interessanterweise scheint die Regulation von Wachstum durch programmierten Zelltod ebenfalls in der asymmetrischen Proepikardentwicklung (2.3.1, Abb.6) eine wichtige Rolle zu spielen, da im Huhn auf der rechten Seite der Herzeinflussbahn eine stark proliferierende Proepikardstruktur entsteht, wogegen ein linksseitiges Proepikard in seiner Entwicklung retardiert und durch Apoptose verloren geht (Schlüter, Dissertation 2008, Universität Würzburg). Da Apoptose als Regulator der unilateralen Proepikardentwicklung am venösen Pol des Hühnerembryos teils Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, soll der Entwicklungsprozess nachfolgend kurz erläutert werden.

Der Apoptoseprozess involviert diverse molekulare Determinanten und man unterscheidet generell zwei apoptotische Signalkaskaden, die entweder über sogenannte Todesrezeptoren

(extrinsischer Signalweg), oder die Mitochondrien (intrinsischer Signalweg) initiiert werden. In beiden Signalwegen werden Cysteinproteasen (Caspasen) aktiviert, die Zellsubstrate degradieren und dadurch biochemische und morphologische Veränderungen hervorrufen, die charakteristisch sind für apoptotische Zellen. Hierzu gehören unter anderem die Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung, Auflösung der Kernlamina und die Bildung apoptotischer Vesikel, die durch Phagozytose aufgenommen werden (Thornberry und Lezbebnik, 1998). Die proteolytische Zelldegradation erfolgt durch Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6, 7), die zuvor selbst durch Initiator-Caspasen (Caspase 2, 8, 9 und möglicherweise 10) gespalten und dadurch aktiviert werden (Renatus et al., 2001; Boatright et al., 2003; Baliga et al., 2004). Im Gegensatz zu den Effektor-Caspasen sind die inaktiven Pro-Formen der Initiator-Caspasen Monomere und bedürfen somit zur Aktivierung keiner proteolytischen Spaltung (Stennicke et al., 1999; Renatus et al., 2001; Boatright et al., 2003). Stattdessen wird die Aktivierung allgemein durch die Bindung von Adaptermolekülen an Protein-Interaktionsregionen der langen Pro-Domänen vermittelt, um die Dimerisierung und somit Etablierung der Proteaseaktivität zu induzieren (Boatright und Salvesen, 2003). Dies erlaubt einer aktivierten Initiator-Caspase sich selbst zu spalten, wodurch die aktive Form möglicherweise stabilisiert wird (Boatright et al., 2003; Chang et al., 2003; Baliga et al., 2004). Initiator-Caspasen sind ebenfalls im Gegensatz zu den Effektor-Caspasen Signalweg-spezifisch. Wird der extrinsische Signalweg über die TNF (*tumor necrosis factor*)-Rezeptoren initiiert, kommt es spezifisch zur Aktivierung von Caspase 8/10 beziehungsweise Caspase 2 (Boatright et al., 2004; Duan und Dixit, 1997). Der Initiation des intrinsischen Signalwegs durch die Störung des mitochondrialen Membranpotentials dagegen folgt die Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol, welches daraufhin die Bildung eines multimeren Proteinkomplexes, dem Apoptosom, bewirkt und zur Aktivierung von Caspase 9 führt (Igney und Kramer, 2002). Die Aktivierung von Caspasen als auch bereits aktivierte Caspasen können durch spezifische Proteine (IAPs, *inhibitor of apoptosis proteins*) inhibiert werden. Die Inhibitoren wiederum können von den regulatorischen Proteinen Smac (*second mitochondrion-derived activator of caspase*; Du et al., 2000) / DIABLO (*direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI*; Verhagen et al., 2000), oder Omi/HtrA2 inaktiviert werden, welche von den Mitochondrien freigesetzt werden. Extrinsischer und intrinsischer Signalweg schließen sich gegenseitig nicht aus und so kommt es in vielen Zellpopulationen zur Interaktion beider Apoptoseprogramme.

### 2.2.5 Die Bedeutung der Hyaluronansynthase 2 (Has2) für die Herzentwicklung

Wie bereits angedeutet, involviert der komplexe Prozess der Herzentwicklung viele verschiedene Zelltypen und molekulare Komponenten. Letztere beinhalten vor allem Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und nicht zuletzt auch extrazelluläre Matrixmoleküle. Während der Embryogenese ist die extra- und perizelluläre Matrix, die migrierende und proliferierende Zellen umgibt, reich an Hyaluronan (HA). HA gehört zu den Glykosaminoglykanen und ist essentiell für die embryonale Entwicklung und Morphogenese (Toole, 1990; Spicer und Tien, 2004). Folglich führt der Verlust von HA oder seine inhibierte Bindung an assoziierten Proteine zu diversen morphogenetischen Anomalitäten (Hay, 1981; Delpech et al., 1989; Haddon und Lewis, 1991; Knudson et al., 1995; Camenisch et al., 2000). HA scheint die Embryonalentwicklung durch Schaffung einer hydrierten geringfügig zähen Matrix zu regulieren. Hiernach begünstigen physiologische HA-Konzentrationen Zellaggregation, Differenzierung und Migration (Collis et al., 1998). Das lineare HA-Polysaccharid wird an der Plasmamembran von spezifischen Glykosyltransferasen, den Hyaluronansynthasen (Has), produziert (DeAngelis, 1999). Drei hochkonservierte *Has*-Gene wurden in Mensch, Maus, Frosch und Zebrafisch identifiziert. Expressionsanalysen zeigen, dass *Has1* und *Has3* im adulten Mensch und in der Maus stärker und in mehr Geweben exprimiert sind als *Has2*. Im Embryo dagegen weisen *Has1/3* begrenzte Expressionsdomänen auf, wobei *Has2* weitreichend stark exprimiert ist (Spicer und McDonald, 1998). *Has2* ist demnach die wichtigste HA-Synthase während der Embryogenese. Die nicht-überlappenden *Has*-Expressionsmuster in *Xenopus* deuten ebenfalls darauf hin, dass spezifische HA-Synthasen distinkte Funktionen in der Entwicklung bestimmter Strukturen übernehmen. So wird *XHas1* in ektodermalen Derivaten, *XHas3* im sich entwickelnden Ohr und *XHas2* vor allem in mesodermalen Strukturen detektiert (Nardini et al., 2004). Ähnliche Expressionsdomänen liegen im Mausembryo vor, wobei *Has2* in verschiedenen Geweben exprimiert ist, einschließlich kraniofazialer und kardialer Strukturen (Tien und Spicer, 2005; Klewer et al., 2006). Im Hühnerembryo ist *Has2*-Expression unter anderem im primären Herzfeld, tubulären Herz und den endokardialen Kissen zu finden (Klewer et al., 2006). Die Unabkömmlichkeit von *Has2* für die Kardiogenese zeigt zudem die Mausmutante, in der es zum Verlust der *cardiac jelly* und endokardialen Kissen, als auch einer unvollständigen Vaskulogenese kommt, was zur embryonalen Letalität führt (Camenisch et al., 2000). Die *Has2*-abhängige Produktion von HA ist also essentiell für die Morphogenese des Kardiovaskularsystems und damit gleichzeitig für die Reifung des vier-kammerigen Herzens.



## 2.3 Die Epikardentwicklung

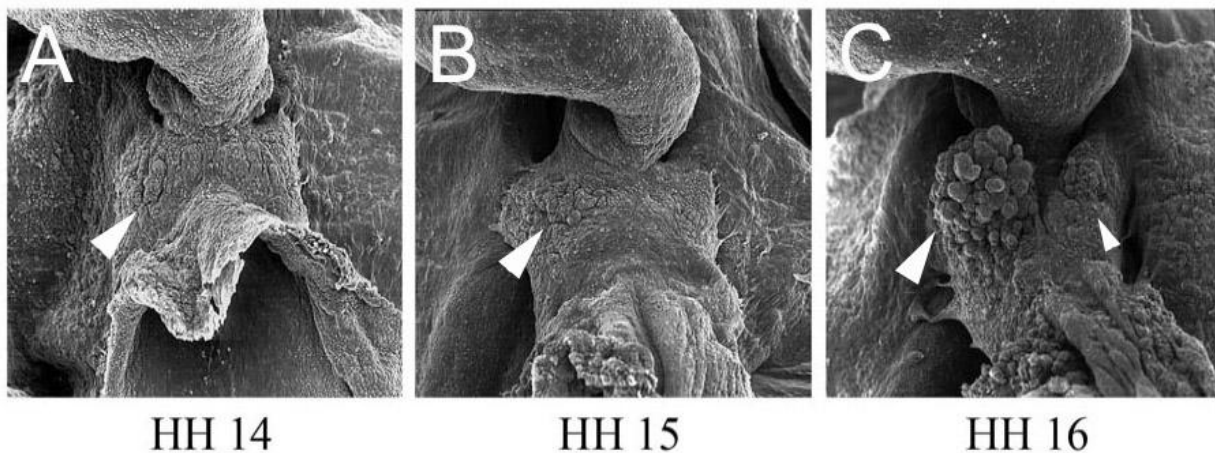
### 2.3.1 Das Proepikard als Ursprung des Epikards

Eine Besonderheit in der Herzentwicklung von Vertebraten ist das extrakardial entstehende Epikard. Auch auf Herzen von Invertebraten ist vereinzelt ein coelomisches Epithel zu finden, der ontogenetische Ursprung des Vertebratenepikards macht dieses jedoch einzigartig. Als äußere Schicht des Herzens ist das Epikard Ursprung des Koronargefäßsystems, das zusammen mit seinem umgebenden Bindegewebe die ausreichende Durchblutung und Festigkeit des Myokards sicherstellt. Es liegt nahe, dass die Notwendigkeit einer effizienten Versorgung aus der komplexeren und leistungsfähigeren Struktur des Vertebratenherzens herrührt, die zur erhöhten Pumpleistung führte. Denn für die Versorgung des vierkammerigen Herzens mit einer wesentlich dickeren Myokardwand, reichte der durch das kardiale Lumen zirkulierende venöse Blutfluss allein nicht aus.

Zunächst nahm man an, dass das Epikard aus Zellen des embryonalen Herzschlauches entsteht (Mollier, 1906; DeHaan, 1965). Durch experimentelle Techniken und elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte jedoch gezeigt werden, dass das Epikard aus der extrakardialen Struktur des Proepikards hervorgeht (Männer, 1993; Ho und Shimada, 1978). Das Proepikard ist eine transiente Vorläuferzellpopulation, die sich aus perikardialem Mesothel am venösen Pol des embryonalen Herzens bildet (Viragh und Challice, 1981; Männer, 1992; Viragh et al., 1993). Die Entstehung der Struktur ist durch starke Proliferation und Rekrutierung von Mesenchym aus der perikardialen Wand und dem *Sinus venosus* gekennzeichnet, so dass der Kern des Proepikards aus undifferenzierten Mesenchymzellen besteht und von Epithelzellen umgeben ist (Männer et al., 2001; Ratajska et al., 2008). Dies führt zur Bildung einer charakteristischen Morphologie mit villöser Oberfläche.

Im Hühnerembryo sind erstmals im HH Stadium 14 unilateral auf dem rechten Sinushorn der Herzeinflussbahn vereinzelt bläschenartige Auswüchse proepikardialer Zellen zu beobachten (Abb.6A). Die rechtsseitige Proepikardanlage wächst bis zum HH Stadium 16 zu einer blumenkohlformigen Struktur aus Mesothelzotten (Abb.6B, 6C) und besiedelt ab HH17/18 durch Bildung des Epikards den primitiven Herzschlauch (Männer et al., 2001). Eine verspätet gebildete linksseitige Proepikardanlage dagegen ist in seiner Entwicklung retardiert und leistet anscheinend keinen Anteil an der Epikardentwicklung (Abb.6C; Männer et al., 2001; Schlueter et al., 2006). Auch im Frosch ist nur auf der rechten Seite des Einflusstraktes ein vollständig entwickeltes Proepikard zu beobachten (Jahr et al., 2008). In anderen höheren

bis primitiven Vertebraten wie der Maus, den Fischen oder *Agnatha* (Kieferlose), kommt es dagegen zur Bildung bilateraler Proepikardanlagen (Schulte et al., 2007; Serluca, 2008; Pombal et al., 2008). Interessanterweise wird im Katzenhai eine bilaterale Proepikardanlage ausgebildet, wovon jedoch nur die rechte Anlage das Herz besiedelt (Munoz-Chapuli et al., 1994). Eine solche asymmetrische Epikardialisierung wurde auch in einem der primitivsten Vertebraten, dem kieferlosen Meeresneunauge, beschrieben. In diesem Organismus entstehen nach der Bildung des Epikards aus den bilateralen PE-Anlagen die rechten und linken pronephridischen externen Glomeruli, was mit dem hohen vaskulogenen Potential proepikardialer Zellen in Verbindung gebracht wird (Pombal et al., 2008; Perez-Pomares et al., 2006, 2009). Über die Mechanismen, die zur Induktion der Proepikardentwicklung und Spezifizierung proepikardialer Zellen führen, ist noch nicht viel bekannt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Regulationsmechanismen zur Genexpression während der Proepikardinduktion denen der frühen Herzfeldbildung gleichen (Brand et al., 2003).



**Abb.6 - Die Proepikardentwicklung im Huhn**

SEM-Aufnahmen der Proepikardentwicklung im Hühnerembryo. (A) Im HH Stadium 14 werden erste proepikardiale Zellen auf dem rechten Sinushorn sichtbar. (B, C) Durch Proliferation wächst die villöse Struktur unilateral, bis sie im HH Stadium 16 vollständig ausgebildet ist. Auf dem linken Sinushorn bildet sich verzögert eine im Wachstum retardierte PE-Anlage. Pfeilköpfe zeigen auf Proepikardanlagen. (entnommen und modifiziert aus Schulte et al., 2007).

### 2.3.2 Die Epikardialisierung des Myokards

Die Kolonisierung des Myokards durch epikardiale Zellen zur Bildung des Epikards wird in Spezies mit uni- und bilateraler Proepikardentwicklung auf unterschiedliche Art und Weise realisiert. In Vogelembryonen migrieren die proepikardialen Zellen prädominant über eine extrazelluläre Matrixbrücke auf das Herz (Männer, 1992). Ist die Bildung dieser Brücke gestört, kommt es zu schweren Epikardialisierungsdefekten (Nahirney et al., 2003). In Embryonen von Säugetieren und Fischen werden proepikardiale Zellen nicht über eine sekundäre Gewebebrücke auf das primitive Herz transferiert. Hier lösen sich proepikardiale Vesikel aus den Zotten des Proepikards und flottieren frei in der Perikardhöhle bevor sie passiv auf das Myokard treffen und adhären (Komiya et al., 1987; Kuhn und Liebherr, 1988; Munoz-Chapuli et al., 1994; Männer et al., 2001). In Amphibien erfolgt die Epikardialisierung wie in Vogelembryonen vorwiegend über eine extrazelluläre Gewebebrücke. Anscheinend findet aber auch ein vesikulärer Transport proepikardialer Zellen statt (Fransen und Lemanski, 1990). Ein weiterer Hinweis darauf, dass die speziesspezifischen Mechanismen zur Epikardialisierung des Myokards nicht so strikt zu trennen sind wie anfänglich angenommen, zeigen Studien in der Ratte, in der ebenfalls eine direkte Besiedlung proepikardialer Zellen über Gewebebrücken, ähnlich wie im Vogel, vorzufinden ist (Nesbitt et al., 2006; Rodgers et al., 2008).

In Hühner- und Wachtelembryonen nehmen die proepikardialen Zellen nach dem Transfer über die extrazelluläre Matrixbrücke im HH Stadium 17/18 Kontakt mit dem Herzen auf (Abb. 7A, B; Männer et al., 2001; Viragh et al., 1993). Zunächst wird die dorsale Seite des Ventrikels besiedelt, indem sich die Proepikardzotten öffnen und mesenchymale Zellen in den subepikardialen Raum freigeben. Die epikardialen Zellen migrieren anschließend lateral und bedecken die atrioventrikuläre Region, innere Kurvatur als auch dorsale Seite des Ausflusstrakts, bis das gesamte Herz, außer das linke Atrium und der distale Teil des Ausflusstraktes, zum HH Stadium 24 mit Epikard überwachsen ist (Abb.7C). Das Epikard, das den arteriellen Pol umgibt, entsteht demnach anscheinend nicht aus Zellen des Proepikards, sondern aus perikardialem Mesothel, das aus der perikardialen Wand stammt, die in direkter Verbindung mit dem Ausflusstrakt steht (Männer, 1999; Perez-Pomares et al., 2003). In Säugetierembryonen zeigen die Proepikardzellen ein ähnliches Verteilungsmuster zur Besiedlung des Herzens und Wachstum des Epikards (Van den Eijnde et al., 1995). Nachdem die proepikardialen Vesikel auf der Myokardoberfläche aufgetroffen sind, flachen sie ab und wachsen zu einem Epikard zusammen. Die Vesikelbildung erfolgt durch die

Polarisierung epithelialer PE-Zellen, vermittelt durch das Zellpolaritätprotein Par3 (Hirose et al., 2006). Faktoren die für die Migration und Adhäsion des Proepikards und Epikards auf dem unterliegenden Myokard eine wichtige Rolle spielen sind unter anderem das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1,  $\alpha$ 4-Integrin und Tbx5 (Kwee et al., 1995; Sengbusch et al., 2002; Dettman et al., 2003; Hatcher et al., 2004).

Die Epikardialisierung des Herzens ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung des Myokards. So zeigen Embryonen, in denen die Proepikardentwicklung inhibiert wurde diverse kardiale Defekte (Männer et al., 2005). Weiterhin weisen *Wt1*-Mausmutanten, die kein Epikard ausbilden, eine hypoplastische myokardiale Kompaktschicht auf, was zur embryonalen Letalität führt (Wagner et al., 2003). Das Wilms' Tumor Suppressor-Gen *Wt1* wird im Proepikard und Epikard exprimiert und ist für deren Entwicklung essentiell. Ein ähnliches Expressionsmuster wie *Wt1* im Epikard zeigt *RALDH2*, ein Schlüsselenzym in der Retinsäuresynthese. Kommt es zum Verlust des Retinsäurerezeptors *RXRalpha*, entwickelt sich das Epikard verzögert, was massive Epikardmalformierungen zur Folge hat (Jenkins et al., 2005). Dies wiederum führt auch in *RXRalpha*-defizienten Mäusen zu einem dünnwandigen unterentwickelten Myokard (Gruber et al., 1996). Demnach wurden zwei autokrine Signalkaskaden identifiziert, die Retinsäure und Erythropoietin involvieren und das Epikard veranlassen, bis dato unidentifizierte Mitogene zu sezernieren, die die Proliferation der myokardialen Kompaktschicht stimulieren (Chen et al., 2002; Stuckmann et al., 2003). Somit sind die Koronargefäße nicht nur für die Nährstoffversorgung des Myokards wichtig, sondern sie sezernieren auch morphogenetische Faktoren, die Einfluss auf seine Leistungsfähigkeit nehmen (Wada et al., 2003).



**Abb.7 - Die Epikardentwicklung im Huhn**

SEM-Aufnahmen der Epikardentwicklung im Hühnerembryo. (A, B) Im HH Stadium 17/18 nehmen proepikardiale Zellen über eine Gewebebrücke (\*) Kontakt mit der dorsalen Seite des Ventrikels auf, wonach das gebildete Epikard (gepunktete Linie) diesen überwächst. (C) Bis zum HH Stadium 24 ist das gesamte Herz bis auf den distalen Teil des Ausflusstraktes mit Epikard bedeckt. V-Ventrikel; A-Atrium; O-Ausflusstrakt; LI-Leberanlage; Maßstab=200 $\mu$ m (entnommen aus Männer et al., 2001).

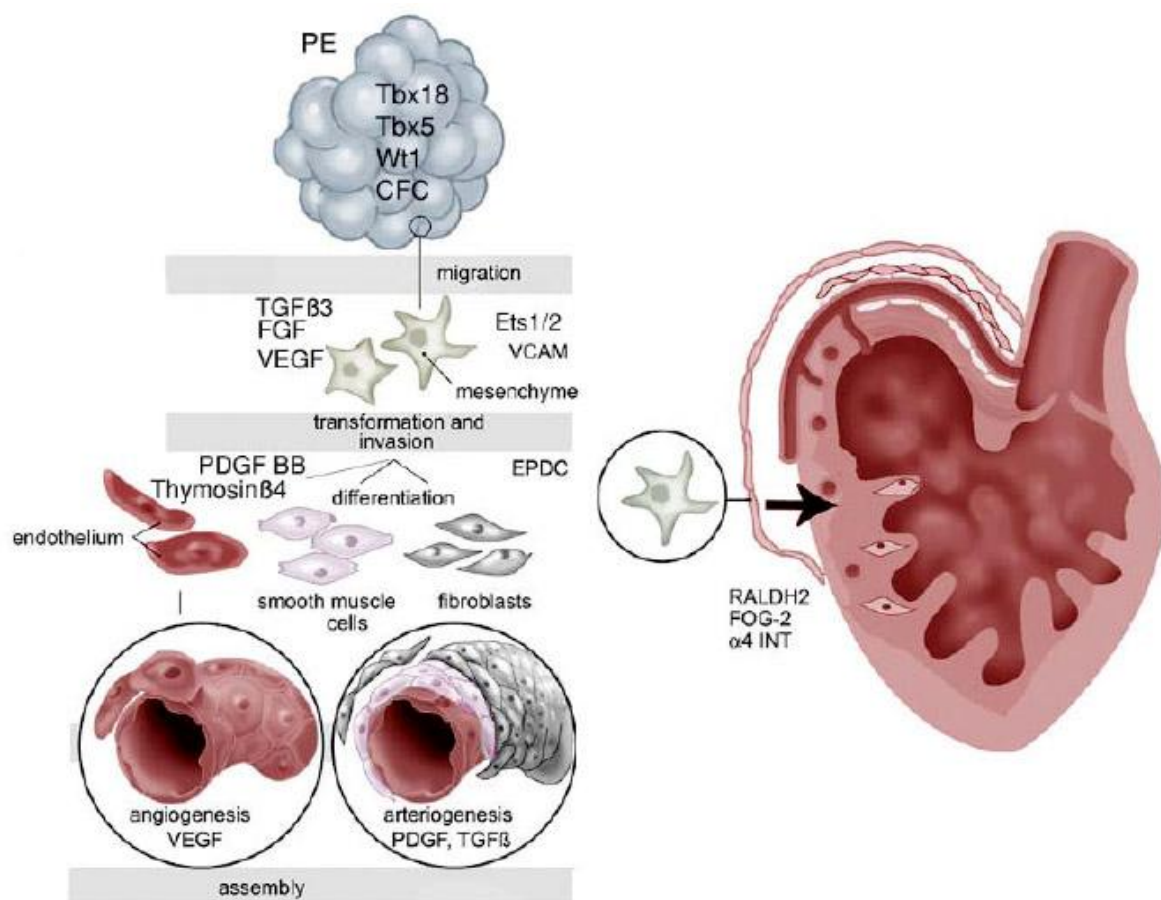
### 2.3.3 Die Koronargefäßentwicklung

Die Bildung des Koronargefäßsystems ist gekennzeichnet durch die Zusammenlagerung von Gefäßvorläuferzellen (Vaskulogenese) und der gerichteten Proliferation der terminalen Gefäßenden (Angiogenese). Die unterschiedlichen Zelltypen der Koronargefäße werden zum größten Teil aus einer Subpopulation von Epikardzellen gebildet, die durch epithel-mesenchymale Transition (EMT) zu Mesenchymzellen differenzieren und im subepikardialen Raum zu liegen kommen, der außerdem aus extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin, Kollagenen und Proteoglykanen besteht (Perez-Pomares et al., 1998; Munoz-Chapuli et al., 2002; Nahirney et al., 2003). Die epikardiale EMT wird durch diverse Faktoren reguliert. Für die Initiation des Prozesses sind unter anderem die Transkriptionsfaktoren Ets-1/2 erforderlich, die den proteolytischen Abbau der Basallamina des epithelialen Zellverbands kontrollieren (Abb.8). Durch den Funktionsverlust der Ets-Faktoren wird kein epikardiales Mesenchym gebildet, wodurch die Koronargefäßbildung gestört ist (Lie-Venema et al., 2003). Weiterhin begünstigt die Repression von E-Cadherin durch den Transkriptionsfaktor Snail die EMT (Cano et al., 2000). Im Epikard exprimiert werden ebenfalls die Wachstumsfaktoren Tgfb1-3, welche die EMT positiv stimulieren (Molin et al., 2003; Olivey et al., 2006). Dies wird offenbar durch VCAM-1 inhibiert, indem die interzelluläre Adhäsion epikardialer Zellen mittels Modulierung der Rho-Aktivität stabilisiert wird (Dokic und Dettman, 2007). Im Zusammenspiel mit den Tgfb-Faktoren scheinen außerdem Fgf1, 2 und 7 eine Rolle in der Regulierung der epikardialen EMT zu spielen (Abb.8; Morabito et al., 2001).

Nach der EMT können EPDCs (*epicardium derived cells*) zu verschiedenen Zelltypen differenzieren. Unter dem Einfluss des vom Myokard sezernierten Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) differenzieren Mesenchymzellen zu Endothelzellen (Morabito et al., 2001). Ein weiterer Wachstumsfaktor, nämlich PDGF, (*platelet derived growth factor*) lässt Gefäßvorläuferzellen zu Glattmuskelzellen differenzieren (Abb.8; van den Akker et al., 2005). Da EPDCs Rezeptoren für beide Wachstumsfaktoren besitzen, lässt sich daraus ableiten, dass Koronargefäßzellen einen gemeinsamen Vorläufer besitzen.

Einige mesenchymale Zellen verbleiben jedoch nicht im subepikardialen Raum, sondern migrieren in das Myokard und die endokardialen Kissen. Hier differenzieren sie ebenfalls zu Glattmuskel- und Endothelzellen der Koronargefäße, beziehungsweise Zellen der atrioventrikulären Klappen (Perez-Pomares et al., 2002; Männer et al., 2001). Die Migration der EPDCs wird unter anderem von Faktoren wie Tbx5, PDGF-B / PDGFR $\beta$  und Ets-Faktoren reguliert (Hatcher et al., 2004; van den Akker et al., 2005; Lie-Venema et al., 2007).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Koronargefäßentwicklung ist in diesem Zusammenhang Thymosin $\beta$ 4. Das Protein ist für die Umstrukturierung von Komponenten des Zytoskeletts verantwortlich und somit bedeutend für die Migration von Zellen. Es ist in der Lage Epikardexplantate im Wachstum zu stimulieren und adulte Epikardzellen zu Glattmuskel- und Endothelzellen als auch Fibroblasten differenzieren zu lassen (Smart et al., 2007). Die terminale Differenzierung der Mesenchymzellen vor Erreichen des endgültigen Bestimmungsortes wird sehr wahrscheinlich durch Raldh2 verhindert (Kastner et al., 1997).



### Abb.8 - Die Entwicklung der Koronargefäße

Nach der Migration von proepikardialen Zellen auf das embryonale Herz, werden diese durch verschiedene Faktoren (Ets1/2, TGF $\beta$ , FGF) stimuliert zu Mesenchymzellen zu transformieren. Das Mesenchym differenziert dann unter dem Einfluss von weiteren Faktoren wie Thymosin $\beta$ 4, PDGF und VEGF zu Endothel-, und Glattmuskelzellen als auch kardialen Fibroblasten, aus denen während der Angiogenese Koronargefäße entstehen. Ein Teil der Mesenchymzellen migriert zudem in das Myokard, was beispielsweise von Faktoren wie RALDH2, das die Zellen vor einer terminalen Differenzierung bewahrt, ermöglicht wird (entnommen und modifiziert aus Poelmann et al., 2002).

### 2.3.4 Proepikardiale Markergene

Es ist wenig bekannt über die Faktoren, die in die Proepikardentwicklung involviert sind. Durch Expressionsstudien und funktionelle Analysen konnten jedoch einige PE-spezifische Gene identifiziert werden.

Eines der bereits bekannten proepikardialen Markergene ist *Wt1*. Das Wilm's Tumor Suppressor Gen kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und ist im Proepikard, Epikard als auch epikardialen Derivaten exprimiert (Perez-Pomares et al., 2002). Im Huhn ist zu Beginn der Proepikardbildung im HH Stadium 13-14 eine asymmetrische *WT1*-Expression im rechten Sinushorn zu beobachten, die sich in darauffolgenden Stadien auf das Proepikard zurückzieht und dort insbesondere in den Mesothelzotten der Struktur persistiert (Schlueter et al., 2006). Während der Proepikardentwicklung ist weiterhin im intermediären Mesoderm eine bilaterale Expression von *WT1* sichtbar. In späteren Entwicklungsstadien des Hühnerembryos sind das nephridische Coelomesothel und endodermale Vorläuferstrukturen von Darm, Leber und Lunge signifikante Expressionsdomänen (Carmona et al., 2001). So wird in *Wt1*-Mausmutanten eine anormale Entwicklung von Niere, Milz und Gonaden erkennbar. Der Verlust von *Wt1* in der Maus zeigt jedoch auch einen schweren kardialen Phänotyp, in dem Epikard und ventrikuläres Myokard stark unterentwickelt sind und zur embryonalen Letalität führen (Wagner et al., 2003). Ein wichtiger Befund in der Ratte zeigte zudem, dass die Expression von *Wt1* in Koronargefäßzellen reaktiviert wird, wenn es zum myokardialen Infarkt kommt (Wagner et al., 2002). Dies unterstreicht noch einmal die Bedeutung von *Wt1* als epikardialen Marker. Da *WT1* im Huhn in der Leberanlage exprimiert wird, welche sich in enger räumlicher Nähe zur Einflussbahn des embryonalen Herzens befindet, wird vermutet, dass die Leber als Induktor proepikardialer Identität fungieren könnte. Tatsächlich führte die Implantation von Leberprimordium in das laterale Plattenmesoderm zu einer ektopischen Expression von *WT1* und *TBX18* (Ishii et al., 2007). Ein ähnliches Expressionsmuster wie *Wt1* zeigt der bHLH-Transkriptionsfaktor *Epicardin*, der in Proepikard, Epikard als auch Urogenitalsystem und Gonaden exprimiert wird (Robb et al., 1998).

Als proepikardiale Marker bezeichnet werden können ebenfalls die Transkriptionsfaktoren *Tbx18* und *Tbx5*, die beide signifikant im Proepikard und Epikard exprimiert sind (Haenig und Kispert, 2004; Hatcher et al., 2004). Im Huhn ist *TBX18* zunächst stark im intermediären Mesoderm und tubulären Herzen exprimiert. Ab dem HH Stadium 11 wird die Expression im

Herzen schwächer und zieht sich in darauffolgenden Stadien auf den venösen Pol zurück und persistiert asymmetrisch im rechten Sinushorn, der PE-Anlage und dem Epikard (Schlueter et al., 2006). *Tbx18* spielt außerdem eine Rolle in der Somiten- und Extremitätenentwicklung und wird in diesen Strukturen exprimiert (Haenig und Kispert, 2004). *Tbx5* dagegen ist für die Epikardialisierung des Herzens von wichtiger Bedeutung, denn durch die Überexpression von *TBX5* im Huhn kommt es zum Verlust epikardialer Strukturen (Hatcher et al., 2004). Die transkriptionelle Aktivität von *TBX5* wird von dem PDZ-LIM-Protein *LMP4* reguliert, welches *TBX5* binden und ins Zytoplasma translokalisieren kann (Camarata et al., 2007).

Auch der Kompetenzfaktor *CFC* ist ein proepikardialer Marker im Huhn, dessen Rolle in der Proepikardentwicklung jedoch noch nicht geklärt ist (Schlueter et al., 2006). *CFC*-Faktoren gehören zur EGF-*CFC*-Familie und agieren unter anderem als Ko-Rezeptoren zur Bindung von Tgfb-Faktoren an ihre respektiven Rezeptorkomplexe (Cheng et al., 2003). So kann *CFC* über einen GPI-Linker an die Plasmamembran binden und somit anscheinend die Rezeptor-Bindung von *NODAL* vermitteln (Schlange et al., 2001). Im Hühnerembryo wird *CFC* vor der Proepikardentwicklung im HH Stadium 11 bilateral im lateralen Plattenmesoderm und im gesamten tubulären Herzschlauch detektiert. Die Expression von *CFC* im LPM ist jedoch auf der rechten Seite etwas stärker ausgeprägt. Diese Asymmetrie verstärkt sich bis zum HH Stadium 13, so dass eine starke *CFC*-Expression im rechten Sinus und LPM zu beobachten ist, die sich in den darauffolgenden Stadien auf den venösen Pol zurückzieht und daraufhin deutlich in der PE-Anlage zu erkennen ist (Schlueter et al., 2006). In der Maus führt der Verlust von *Cfc1* zur Inhibition der Mesoderminduktion und embryonaler Letalität. In heterozygoten *Cfc1*-Mausmutanten sind Störungen der L/R-Asymmetrie zu beobachten, wie beispielsweise randomisiertes Herzlooping (Ding et al., 1998; Xu et al., 1999). Der Funktionsverlust von *Cfc2* dagegen führt zum vollständigen Verlust axialer Strukturen.

Es bedarf noch weitreichender Forschungsarbeit, um weitere Faktoren der Proepikardentwicklung und Kontrollmechanismen der PE-spezifischen Genexpression zu identifizieren. Es ist jedoch bereits bekannt, dass die Expression proepikardialer Markergene im Huhn von einer distinkten BMP-Konzentration abhängig ist (Schlueter et al., 2006). *BMP2*, das während der Proepikardentwicklung im *Sinus venosus* exprimiert ist, als auch *BMP4*, das in proepikardialen Mesenchymzellen detektiert wird, könnten somit zur Rekrutierung von Zellen des lateralen Plattenmesoderms in die proepikardiale Linie beitragen (Schlueter et al., 2006). Dieser Befund stimmt damit überein, dass in der Maus die transiente Expression von *Gata4* im Proepikard von *BMP4* kontrolliert wird (Rojas et al., 2005).



### 2.3.5 In die Proepikardentwicklung implizierte Signalmoleküle

Obwohl noch eingehende Studien zur Identifizierung neuer proepikardialer Marker notwendig sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass in der Proepikardentwicklung ein ähnliches Reportiere an Signalmolekülen miteinander interagiert, wie während der frühen Herzentwicklung (Brand, 2003). Daher wurde für Fibroblasten-Wachstumsfaktoren als auch Wnt-Signalen eine Rolle in der Proepikardentwicklung angenommen und diese in der vorliegenden Arbeit untersucht. In diesem Kapitel soll deshalb auf FGF- und Wnt-Signale im Allgemeinen näher eingegangen werden.

#### 2.3.5.1 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren

Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF, *fibroblast growth factors*) gehören zu einer großen Familie von Signalmolekülen, die evolutionär konserviert in Invertebraten bis höheren Vertebraten zu finden sind (Itoh und Ornitz, 2004). Diese Proteine wurden erstmals identifiziert als gezeigt wurde, dass FGF1 und FGF2 die Proliferation von Fibroblasten stimulieren. FGFs besitzen jedoch diverse biologische Funktionen und sind unter anderem in die Migration, Proliferation, Apoptose und Differenzierung von Zellen involviert (Goldfarb, 1996; Powers et al., 2000; Böttcher und Niehrs, 2005). Während der Embryonalentwicklung spielen sie beispielsweise eine bedeutende Rolle in der Induktion neuraler Strukturen, Gehirnentwicklung, Induktion/Morphogenese von Gliedmaßen, Knochenentwicklung und nicht zuletzt auch in der Herzentwicklung (Thisse und Thisse, 2005; Brand, 2003).

In Invertebraten wurden nur wenige FGF-Gene gefunden. So existieren in *C.elegans* nur zwei (*egl-17*, *let-756*), beziehungsweise in *Drosophila* drei (*branchless*, *pyramus*, *thisbe*). Im Gegensatz dazu wurde in Vertebraten eine große Anzahl von FGF-Genen identifiziert. Im Frosch sind 6 (FGF2-4, 8-10), im Zebrafisch 10 (FGF2-4, 6, 8, 10, 17a, 17b, 18, 24), im Huhn 13 (FGF1-4, 8-10, 12, 13, 16, 18-20) und in der Maus (FGF1-18, 20-23) und dem Menschen (FGF1-14, 16-23) 22 FGFs bekannt (Ornitz und Itoh, 2001). Ein charakteristisches Merkmal von FGFs ist ihre hohe Affinität zu Heparin, welches die Bindung an FGF-Rezeptoren ermöglicht (Ornitz, 2000; Ori et al., 2008). Weiterhin besitzen alle eine evolutionär konservierte Kerndomäne von 120 Aminosäuren, die ebenfalls die Bindung an FGF-Rezeptoren vermittelt. Die FGF-Familie in Säugetieren wird in 7 Subfamilien unterteilt, basierend auf Vorhandensein eines Signalpeptides in der N-terminalen Region des Proteins und Sezernierung des jeweiligen FGFs (Itoh und Ornitz, 2004; Zhang et al., 2006). Die meisten FGFs (FGF 3-8, 10, 17-19, 21, 23) besitzen ein N-terminale Signalsequenz und

werden von Zellen sezerniert. FGF 9, 16 und 20 dagegen besitzen kein Signalpeptid, werden jedoch von Zellen sezerniert (Miyamoto et al., 1993; Miyake et al., 1998; Ohmachi et al., 2000). FGF1 und 2 weisen ebenfalls kein Signalpeptid auf, unterscheiden sich aber von den zuvor genannten FGF-Liganden dadurch, dass sie nicht sezerniert werden. Trotzdem sind sie auf der Zelloberfläche oder in der extrazellulären Matrix zu finden, wahrscheinlich durch Freisetzung aus geschädigten Zellen. Eine dritte Gruppe von FGFs (FGF11=FHF3, FGF12=FHF1, FGF13=FHF2, FGF14=FHF4) weist ebenfalls keine Signalsequenzen auf und verbleiben intrazellulär, weshalb sie der sogenannten iFGF-Subfamilie zugeordnet werden (Itoh und Ornitz, 2008). Im Unterschied zu den zuvor genannten FGF-Liganden binden diese Faktoren nicht an FGF-Rezeptoren und man bezeichnet sie deshalb auch als Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Homologe (FHF, *fibroblast growth factor homologous factors*). FHFs sind zwar in Sequenz und Struktur den anderen FGFs sehr ähnlich, unterscheiden sich aber in biochemischer und funktioneller Hinsicht stark von ihnen (Goldfarb, 2005).

FGFs agieren durch die Bindung und Aktivierung von FGF-Rezeptoren (FGFR), welche Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) sind, die drei Immunoglobulin-ähnliche Domänen und eine Heparin-Bindungssequenz enthalten (Lee et al., 1989; Johnson et al., 1990). In Säugetieren existieren fünf FGFR-Gene, deren Produkte durch alternatives mRNA-*splicing* zu diversen Strukturvarianten prozessiert werden. Nur vier der prozessierten FGF-Rezeptoren (FGFR1-4) besitzen jedoch eine Tyrosinkinase-Domäne, die für die Rezeptor-Aktivierung notwendig ist. FGFR5 dagegen unterscheidet sich von den anderen FGF-Rezeptoren hinsichtlich des Fehlens der Tyrosinkinase-Domäne (Sleeman et al., 2001). Es derzeit noch unklar welche Bedeutung dieser Rezeptor für die Signaltransduktion besitzt. Das alternative *splicing* der FGF-Rezeptoren erfolgt gewebespezifisch und spezifiziert die Sequenz der carboxy-terminalen Hälfte der Ig-Domäne III, wodurch IIIb- und IIIc-Isoformen entstehen (Miki et al., 1992). Das *splicing* hat einen Einfluss auf die Spezifität und Affinität der einzelnen Rezeptoren für verschiedene FGF-Liganden (Zhang et al., 2006). Die Bindung von FGF-Liganden führt zur Dimerisierung der FGF-Rezeptoren und Autophosphorylierung der Tyrosinreste in der intrazellulären Domäne. Dies wiederum führt zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. FGF-Signale können demnach über den Ras/MAPK-Signalweg, der hauptsächlich Proliferation und Differenzierung initiiert, den PI3 (Phosphatidylinositol 3)-Kinase/Akt-Signalweg, der das Überleben von Zellen reguliert, und den PLC (Phospholipase C)- $\gamma$ /Ca<sup>+2</sup>-Signalweg, der die Organisation des Zytoskeletts und Zellmigration beeinflusst, übertragen werden (Eswarakumar et al., 2005). Am häufigsten erfolgt die Signaltransduktion über den

Ras/MAPK-Signalweg, der nachfolgend kurz beschrieben werden soll. Die Aktivierung dieses Signalweges erfolgt wenn aktivierte FGF-Rezeptoren an das Membranankerprotein FRS2 $\alpha$  (*FGFR substrate 2 alpha*) binden und dieses dadurch phosphorylieren. Die Phosphorylierung von FRS2 $\alpha$  bewirkt die Bindung von Grb2, einem Adaptermolekül, das mit dem Nukleotidaustauschfaktor Sos in Verbindung steht. Sos aktiviert anschließend Ras, wodurch es zu einer Phosphorylierungskaskade und Aktivierung von Raf, MEK und den MAP-Kinasen ERK1 und 2 kommt. Die ERKs gelangen letztlich in den Zellkern, wo sie spezifische Transkriptionsfaktoren zur Transkription FGF-responsiver Gene aktivieren.

Da FGFs diverse biologische Funktionen haben und verschiedene Signalwege aktivieren, ist eine strikte Kontrolle der FGF-Signale notwendig. Somit ist es nicht verwunderlich, dass diverse inter- und intrazelluläre Kontrollinstanzen zur positiven oder negativen Regulierung von FGF-Faktoren existieren. Die ersten negativen Regulatoren die identifiziert wurden sind die Sprouty (Spry)-Proteine. Diese Faktoren sind evolutionär stark konserviert, wobei in Säugetieren vier Proteine (Spry1, 2, 3, 4) bekannt sind (Dikic und Giordano, 2003). Durch *gain*- und *loss-of-function* Experimente in Maus, Zebrafisch und Frosch konnte gezeigt werden, dass Sprys durch FGF-Signale induziert werden und diese antagonisieren (Mailleux et al., 2001; Fürthauer et al., 2001; Nutt et al., 2001). Die genaue Funktionsweise der Sprys wird kontrovers diskutiert, da Sprys zunächst als negative Regulatoren der MAP-Kinase ERK identifiziert wurden, jedoch später auch eine Spry-Inhibition oberhalb von Ras beziehungsweise von Raf beobachtet wurde (Hanafusa et al., 2002; Yusoff et al., 2002; Sasaki et al., 2003). Sehr wahrscheinlich existieren also mehrere Instanzen zur Inhibition von FGF-Signalen durch Sprys. Zwei weitere Antagonisten sind das putative Transmembranprotein Sef und die MKP3 (MAP-Kinase-Phosphatase 3). Studien mit humanem Sef (hSef) zeigten, dass dieses an aktiviertes MEK bindet, die Dissoziation des MEK-ERK-Komplexes blockiert und somit die Translokation von aktiviertem ERK in den Zellkern verhindert (Torii et al., 2004). Die intrazelluläre Sef-Domäne scheint aber auch in der Interaktion mit FGF-Rezeptoren eine inhibierende Funktion auszuüben (Kovalenko et al., 2003). MKP3 dagegen reguliert die MAP-Kinase-Kaskade negativ, indem es aktivierte MAPK-Proteine dephosphoryliert (Zhao und Zhang, 2001). Als positiver Regulator von FGF-Signalen agiert das Transmembranprotein FLRT3. In *Xenopus* wurde gezeigt, dass XFLRT3 die Phosphorylierung von ERK bewirkt, also anscheinend die Wirkungsweise von FGF kopiert (Böttcher et al., 2004).

### 2.3.5.2 Wnt-Signalfaktoren

Wnts sind sezernierte Glykoproteine, die in diversen Entwicklungsprozessen wie der Etablierung von Zellpolarität, Determinierung des Zellschicksals, Differenzierung, Proliferation und Migration von Zellen eine Rolle spielen. Die große Familie der Wnt-Proteine umfasst in Mensch und Maus 19 Mitglieder (Miller, 2002). Basierend auf ihrer biologischen Aktivität wurden die Wnts der Vertebraten in zwei funktionelle Gruppen unterteilt. Während Wnt1, 3a, 8 und 8b induzierende beziehungsweise transformierende Eigenschaften haben (Du et al., 1995; Wong et al., 1994), sind Wnt4, 5a und 11 für die Zellmigration und -adhäsion von Bedeutung (Moon et al., 1993; Torres et al., 1996). Werden Wnts aus einer Zelle sezerniert, assoziieren sie mit Glykosaminoglykanen in der extrazellulären Matrix und werden eng an die Zelloberfläche ihrer Wirtszelle gebunden (Reichsman et al., 1996). Trotz dieser Bindung können Wnts als Morphogene über größere Distanzen agieren (Zecca et al., 1996). Wnt-Signale werden durch Frizzled (Fzd)-Rezeptoren und ihren LRP (*lipoprotein receptor-related protein*) Ko-Rezeptoren übertragen und aktivieren verschiedene Signalwege. Zu diesen gehören der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, nicht-kanonische Wnt/ $\text{Ca}^{+2}$ -Signalweg und Wnt/PCP (*planar cell polarity*)-Signalweg (Kühl et al., 2000; Tada et al., 2000; Veeman et al., 2003; Gordon und Nusse, 2006). Nachfolgend soll übersichtsartig der kanonische Wnt-Signalweg beschrieben werden. Durch die Bindung von Wnt1, 3a, 8, 8b oder 8c an einen Fzd-Rezeptor wird über Dishevelled (Dsh) die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma ermöglicht, welches anschließend in den Zellkern gelangt, um dort Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie und dadurch Zielgene zu aktivieren. In der Abwesenheit von Wnt-Signalen dagegen wird  $\beta$ -Catenin ubiquitinyliert und durch das Proteasom degradiert, wodurch es sich nicht im Zytoplasma anreichern kann. Die Aktivierung des Wnt/ $\text{Ca}^{+2}$ -Signalwegs erfolgt durch Wnt4, 5a und 11. Als Ligand für den Wnt/PCP-Signalweg wird unter anderem Wnt11 impliziert (Barrow, 2006). Die Aktivierung der Wnt-Signalwege kann durch sezernierte Modulatoren inhibiert werden. Zu diesen gehören Dickkopf (Dkk-1) und Crescent (Kawano und Kypta, 2003). Dkk-1 blockiert die Aktivierung der Wnt-Signale durch die Interaktion mit der extrazellulären Domäne der LRP-Ko-Rezeptoren, wogegen Crescent, ein Mitglied der sFRP (*secreted frizzled-related protein*)-Familie, Wnt direkt bindet.

## 2.4 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Analyse der multiplen Rollen von FGF-Signalen während der Proepikardiogenese und der frühen Kardiogenese im Huhn. Hierzu wurde zunächst eine umfassende Expressionsstudie verschiedener FGF-Liganden und -Rezeptoren im Proepikard durchgeführt. Daraus folgend wurden Proepikardexplantatkulturen unter serumfreien Bedingungen angelegt, um die Funktion von FGF *in vitro* während der Proepikardentwicklung zu analysieren. Dazu wurden die Explantate mit spezifischen Inhibitoren konditioniert, um den Effekt auf das Flächenwachstum der Explantate und die Expression von proepikardialen Markern zu analysieren. Darüberhinaus sollte die Rolle von FGF durch entsprechende *in vivo*-Experimente im Embryo untersucht werden. Es zeigte sich, dass die Inhibition von FGF-Signalen in Proepikardexplantaten zu einem verringerten Flächenwachstum bei gleichbleibender Markergenexpression von TBX18, WT1 und TBX5 führte. Dies war ebenfalls durch die Blockade der FGF-Aktivität im *Sinus venosus* von Hühnerembryonen zu beobachten. *In vitro* und *in vivo* führte der Verlust von FGF-Signalen zu einer Reduktion von Proliferation sowie Induktion von Apoptose. Demnach ist FGF für das Wachstum und Überleben der Proepikardzellen und nicht für deren proepikardiale Identität verantwortlich.

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Identifizierung neuer Signalmoleküle, die in die Entwicklung des Proepikards involviert sind. Hierbei sollten durch den Einsatz degenerierter *Primer* Mitglieder der WNT-Familie aus Proepikard- sowie Sinus-Total-RNA amplifiziert und subkloniert werden. Es konnte WNT5A als potentieller proepikardialer Marker identifiziert und schließlich dessen Expression im Proepikard verifiziert werden.

Weiterhin wurde durch eine Transkriptomanalyse die frühe differentielle Expression von Apoptosemarkern in der Sinusregion, bereits vor deren morphologisch sichtbaren Effekt auf die asymmetrische Proepikardentwicklung, festgestellt. Die Regulation dieser asymmetrischen Apoptose im *Sinus venosus* sollte durch Manipulation des L/R-Signalweges untersucht werden. Hierbei wurde festgestellt, dass die Apoptose im linken Sinushorn durch Induktion des rechtsseitigen FGF8/SNAI1-Signalweges reprimiert wird.

Der zweite Teil der Arbeit umfasste die Analyse der Regulation der Hyaluronansynthase 2 (HAS2) durch FGF-Signale im Herzfeld. Dazu wurden *gain*- und *loss-of-function*-Experimente im frühen Herzfeld des Hühnerembryos durchgeführt. Die Analyse ergab eine Koregulation von HAS2 und des kardialen Transkriptionsfaktors NKX2.5 durch FGF-Signale.

## 3 Material

### 3.1 Geräte

Analysewaage	Kern PLB 2000-2
Autoklav	Tecnomara
Bakterieninkubator	Kirsch
Binokular	Leica MZ FLIII
Blotapparatur	Owl
Brutschrank	Heraeus
Clean Bench	The Baker Company Inc.
Digitalkamera	Polaroid
Eppendorfgefäßschüttler	lab4you TS-100
Feinwaage	Scaltec SBA 31
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss AxioPhot
Gelapparatur	PeqLab
Heizblock	Techne DRI DB-Block 24
Kühlzentrifuge, Rotor	Heraeus
Konfokales Laserscanningmikroskop	Leica DMIRE2
Kryotom	Leica Jung Frigocut 2800 E
Magnetrührer	GLW M35
Mikrowelle	Severin 700
PCR-Maschine	PeqLab Primus 25 advanced
Photoapparat	Leica Wild MPS 48
pH-Meter	WTW pH523
Photometer	Eppendorf <i>Bio</i> Photometer
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Pipettierhilfe	Brand accu-jet <sup>®</sup> <i>pro</i>
Real time PCR-Maschine	Biorad, Biozym
Schüttler	Edmund Bühler KL2
Sequenziermaschine	Perkin Elmer
Spannungsquellen	DESAGA Netzgerät 500/500
Tischzentrifugen	Hettich MIKRO 200

UV-Tisch	Bachofer Vilber Lourmat 302nm
Vortexer	GLW L46
Wärmewasserbad	Memmert WB22
Wippe	lab4you Mini-Rocker MR-1
Zellinkubator	Heraeus BB16

### 3.2 Verbrauchsmaterial

Aluminiumfolie	Roth
Deckgläser (24x60)	Marienfeld Laboratory Glassware
ECL-Detektionskit	Amersham Bioscience
Einmal-Injektions-Kanülen	B. Braun Sterican®
Einmal-Spritzen (5ml)	ASIK Denmark PRIMO
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Noras
Falconröhrchen (15, 50ml)	Sarstedt
Faltenfilter	Hartenstein
Fibronektin-beschichtete Kammerobjektträger	Becton Dickinson Labware
Greiner-Röhrchen	Greiner bio-one
Küvetten	Eppendorf UVette
Nitrocellulosemembran	Pall Life Sciences
Objektträger (Superfrost, Polysine)	Menzel-Gläser
Parafilm "M"	American National Can
Pasteurpipetten	Roth
Pipettenspitzen	Star Lab
Petrischalen	Sarstedt
Plastikpipetten (5, 10, 25 ml)	Corning Incorporated
QIAGEN Plasmidaufreinigungskit	Qiagen
QIAGEN Real time-PCR kit	Qiagen
Röntgenfilme	AGFA CRONEX 5
Skalpellklingen	Bruno Bayha
Sterilfilter (0.20, 0.45 µm)	Schleicher & Schüll
Untersuchungshandschuhe, latex	Asid Bonz
Untersuchungshandschuhe, nitril	Roth
4-well Zellkulturplatten	Nunclon

8-well Zellkulturplatten	Nunc
24-well Zellkulturplatten	Corning Incorporated
96-well Zellkulturplatten	Corning Incorporated
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll
Zellkulturschalen	Corning Incorporated
Zellkultur-Wasserbad	Köttermann
Zellsiebe, 100µm Nylon	BD Bioscience

### 3.3 Chemikalien

Aceton	AppliChem
Acrylamid-Lösung	Roth Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1)
Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
Ampuwa-Wasser	Fresenius Kabi
APS	Roth
Bacto-Agar	BD Bioscience
BCIP	Boehringer
Big Dye	PE Applied Biosystems
Bromphenolblau	AppliChem
BSA	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Chicken Serum	GIBCO®
Chloroform	J.T. Baker
DAB	Sigma
DAPI	Appllichem
Dextran-Blau	Fluka
Digoxygenin-11-UTP	Boehringer
DiI	Molecular Probes
DMSO	Roth
DTT	Roth
ECL-Reagenzien	Thermo Scientific
EDTA	AppliChem



---

Entellan	Sigma
Entwickler	Kodak LX 24
Eserserum (normal)	Invitrogen
Essigsäure	AppliChem
Ethanol, p.A.	AppliChem
Ethidiumbromid	AppliChem
Fibronektin	Roche
Fixierer	Kodak AL4
Formamid	Merck
FCS	PAA
Gelatine	Sigma
Glukose	Roth
Glutamin	PAA
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	AppliChem
Glycin	Roth
Guanidinium Isothiocyanat	Fluka
Hämatoxilin	Sigma
Hefe-tRNA	Roche
Heparin	Sigma
HEPES	Roth
IPTG	Roth
Isopentan	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem
Lipofectamine	Invitrogen
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid-Dihydrat	Merck
Magnesiumsulfat	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth
Methanol, p.A.	AppliChem
Mowiol 4-88	Calbiochem

---

NBT	Boehringer
Natriumacetat	AppliChem
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumdesoxycholat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Nonidet (Ipegal, NP40)	Sigma
Nuclear Fast Red	Vector Laboratories
OCT-Gefriermedium	Polysciences
Orange G	Sigma
Paraformaldehyd	AppliChem
PEG-6000 (Polyethylenglykol)	AppliChem
Penicillin	PAA
Pferdeserum (normal)	Invitrogen
Phenol	Roth
PMSF	AppliChem
Ribonukleotide	Boehringer
Saccharose	Roth
Salzsäure	AppliChem
SDS	AppliChem
SSC	Roth
Streptomycin	PAA
TEMED	Serva
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma
Trockenmilch	Roth
Trypton	Becton Dickinson
Tween-20	AppliChem
Wasserstoffperoxid, 30%, p.A.	AppliChem
Yeast Extract	Difco
X-Gal	AppliChem
Xylol	Roth
Ziegenserum (normal)	Invitrogen

### 3.4 Pharmakologische Reagenzien

SU5402, FGF-Rezeptor1-Inhibitor	Calbiochem
U0126, MEK1-Inhibitor	Calbiochem
LY294002, PI3-Kinase-Inhibitor	Cell Signaling Technology

### 3.5 Rekombinante Proteine

Maus FGF basic	R+D System
Maus FGF-8b	R+D System
Human FGFR1 $\beta$ (IIIc)/Fc Chimera	R+D System
Human FGFR2 $\beta$ (IIIb)/Fc Chimera	R+D System

### 3.6 Antikörper

anti-DIG-AP	Boehringer
anti-DIG-POD	Roche
Ziege anti-Human-HRP	Vector Laboratories
Pferd anti-Maus-HRP	Vector Laboratories
Maus anti-BrdU	Roche
Kaninchen anti-WT1	Santa Cruz
Kaninchen anti-Tbx5	Freundliche Gabe von Dr. H.-G. Simon
Kaninchen anti-Active Caspase-3	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
Esel anti-Maus-Alexa 555	Molecular Probes
Esel anti-Maus-Fab-FITC	Dianova
Ziege anti-Kaninchen-Alexa 488	Molecular Probes

### 3.7 Enzyme

AMV-Reverse Transkriptase	Promega
RQ1 DNase	Promega
Hot Star Taq-Polymerase	Biozym
Proteinase K	Roth
Restriktionsendonukleasen	New England's Biolabs
RNase A	AppliChem
RNasin RNase-Inhibitor	Promega

Takara Taq-Polymerase	Lonza
T3/T7/SP6-RNA-Polymerase	Promega
T4-DNA-Ligase	Promega
Trypsin	Becton Dickinson

### 3.8 DNA-Marker

100 bp DNA Leiter	Roth
O'GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas

### 3.9 Protein-Marker

Magic Mark XP Western Protein Standard	Invitrogen
Roti®-Mark PRESTAINED	Roth

### 3.10 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 (Heidelberg)
pGEM®-T Easy-Vektor	Promega, A1360
ChEST-Klone (Chicken EST-Klone)	MRC geneservice, RZPD
RCAS/ FGFR1, 2	Freundliche Gabe von Dr. Annette Neubüser (Mandler et al., 2004)
RCAS-BP(A)/ FGFR4	Freundliche Gabe von Dr. Marianne Bronner Fraser (Marics et al., 2002)
RCAS-BP(A)/ Alkalische Phosphatase	Freundliche Gabe von Dr. Constance Cepko (Fekete und Cepko, 1993)

### 3.11 Zelllinien und Zellkulturmedien

DF-1-Zelllinie	ATCC, CRL-12203
DMEM	GIBCO®, 61965-026
M199	GIBCO®, 41150-020

### 3.12 Hühnerembryonen

Befruchtete Bruteier (White Leghorn, *Gallus gallus*) wurden von der Firma Lohmann (Cuxhaven) bezogen.

### 3.13 Primer

Folgende Oligonukleotidpaare für die Endpunkt-PCR und *Real time* PCR zur Detektion der Genexpression, wurden von der Firma Thermo Scientific bezogen (Tabelle 1):

**Tabelle 1 Primer für RT/Real-time-PCR**

Gen	Primerpaarsequenz	Fragmentgröße	Anlagerungs- temperatur	Zyklenzahl
<i>Fgf2</i>	fwd 5'-GCACTTCAAGGACCCCAAGC-3' rev 5'-AGCAATCTGCCATCCTCCTT-3'	200 bp	55°C	38
<i>Fgf10</i>	fwd 5'-CCCCGGAGGCCACCAACT-3' rev 5'-CCCCTTCCATTTCAGAGCAACAAAC-3'	436 bp	57°C	38
<i>Fgf12</i>	fwd 5'-AGAAGCGGCAGGCGAGGGA GTC-3' rev 5'-TGCCGGTACAGCGTGGAAGAATAA-3'	464 bp	60°C	38
<i>Fgfr1</i>	fwd 5'-TGACGTGCAGAGCATCAAC-3' rev 5'-GCAGCTTCTTCTCCATCTT-3'	317 bp	55°C	38
<i>Fgfr2</i>	fwd 5'-TGAACTCCAACACGCCTC-3' rev 5'-GGGACCCTGTTAATATCA-3'	500 bp	55°C	38
<i>Fgfr4</i>	fwd 5'-AGCCCGTCTACGTGCACA-3' rev 5'-GTAGTTGCCGCGGTCGGA-3'	400 bp	55°C	38
<i>Tbx5</i>	fwd 5'-CCGTCTACAGCAGTTGCAC-3' rev 5'-GCCGTGGGAATAGAGGAACT-3'	273 bp	55°C	38
<i>TBX18</i>	fwd 5'-CATATGTGCAGACACT-3' rev 5'-TGCATAGTCCCTGT-3'	227 bp	48°C	40
<i>Wt1</i>	fwd 5'-AGCCAGCAAGCCATTCGCAACC-3' rev 5'-TTCTCATTTTCATATCCTGTCC-3'	355 bp	58°C	45
<i>Pitx2</i>	fwd 5'-GAGGAGATCGCCGTCTGGA-3' rev 5'-TGCATCAGGCCATTGAACTG-3'	149 bp	60°C	45
<i>AMHC1</i>	fwd 5'-GCGGGTCCAGCTTCTCCACTCC-3' rev 5'-CCTTGACACGCCGCTCTGACTT-3'	412 bp	59°C	38
<i>VMHC1</i>	fwd 5'-GCTACAAACACCAAGCAG-3' rev 5'-TCTTATATCTGGGAGCCAGG-3'	211 bp	60°C	40
<i>GAPDH</i>	fwd 5'-ACGCCATCACTATCTTCCAG-3' rev 5'-CAGGCCTTCACTACCCTCTTG-3'	578 bp	52°C	25
<i>Bnip3</i>	fwd 5'-TCATTTGCTTGCCATTGGACT-3'	68 bp	60°C	45

	rev 5'-AACTGCTCGAAGCTGTGGTTG-3'			
<i>Casp2</i>	fwd 5'-CGAGGCACTGACCACTGTGTT-3' rev 5'-TGCAGCGGTGGAATTCTGTG-3'	128	60°C	45
<i>Htatip2</i>	fwd 5'-CAGTCCTCCCAGCATGCAA-3' rev 5'-GGTCAAAGCCCACAGCCTC-3'	94	60°C	45
<i>Siva1</i>	fwd 5'-CTGCTGATGTGAAGGAAGCGT-3' rev 5'-AGCCATTGCAGAGAACTTGCTC-3'	150	60°C	45
<i>Diablo</i>	fwd 5'-TTCAGAGATGGCAGCAGAAGC-3' rev 5'-TCTCTGCCTTCTGGGACAGC-3'	128	60°C	45

Degenerierte *Primer* zur Amplifikation von Wnt-Fragmenten durch nested-PCR (ca. 350 bp; Kusserow et al., 2005):

fwd            5`-TGG(GC)A(AGCT)TGGGG(AGCT)GG(AGCT)TG-3`  
 outer rev    5`-T(CT)(AGCT)CC(AG)TG(AG)CA(CT)TT(AG)CA-3`  
 inner rev    5`-CC(AGCT)GC(AGCT)(CT)(GCT)(AG)TT(AG)TT(AG)TG-3`

Zur Sequenzierung wurden folgende Standardoligonukleotide eingesetzt:

T7            5`-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3`  
 T3            5`-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3`

### 3.14 Proben für die „whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Für die Synthese von *antisense* RNA-Proben wurden folgende cDNA-Konstrukte eingesetzt (Tabelle 2):

**Tabelle 2** Proben für die „whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Gen	Probe	Linearisierung	RNA-Polymerase
<i>Bnip3</i>	EST cDNA-Klon, ChEST27c24 (Boardman et al., 2002)	NotI	T3
<i>Casp2</i>	EST cDNA-Klon, ChEST50o8 (Boardman et al., 2002)	NotI	T3
<i>Diablo</i>	EST cDNA-Klon, ChEST88d10 (Boardman et al., 2002)	NotI	T3
<i>Siva</i>	EST cDNA-Klon, ChEST97e21 (Boardman et al., 2002)	NotI	T3
<i>Fgf2</i>	288 bp Insert erkennt alle Formen von Fgf2 (Karabagli et al., 2002)	HindIII	T3
<i>FGF3</i>	400bp, partiale cDNA (Karabagli et al., 2002)	BamHI	T7

<i>FGF4</i>	600 bp, partiale cDNA (Karabagli et al., 2002)	EcoRI	T7
<i>Fgf8</i>	800 bp, cDNA (Crossly et al., 1996)	EcoRI	T7
<i>FGF10</i>	684 bp, cDNA (Karabagli et al., 2002)	NcoI	SP6
<i>Fgf12</i>	1B-Isoform, erkennt alle Formen von Fgf12 (Karabagli et al., 2002)	EcoRI	T7
<i>Fgf13</i>	cDNA, enthält 5 Exons (Karabagli et al., 2002)	BamHI	T3
<i>Fgf14</i>	1B-Isoform (Karabagli et al., 2002)	EcoRI	T7
<i>Fgf18</i>	370 bp, RT-PCR Fragment (Bachler und Neubüser, 2001)	NotI	SP6
<i>Fgf19</i>	3'UTR (Wright et al., 2004)	NotI	T7
<i>Fgfr1</i>	3kb, freundliche Gabe von Dr. Kate Storey (Lunn et al., 2006)	XhoI	T3
<i>Fgfr2</i>	1460 bp, freundliche Gabe von Dr. Kate Storey (Lunn et al., 2006)	HindIII	T3
<i>Fgfr3</i>	826 bp, freundliche Gabe von Dr. Kate Storey (Lunn et al., 2006)	BamHI	T7
<i>Fgfr4</i>	1625 bp, freundliche Gabe von Dr. Kate Storey (Lunn et al., 2006)	SmaI	SP6
<i>Has2</i>	Klon 113H11, freundliche Gabe von Dr. Annette Neubüser	NotI	T7
<i>Nkx2.5</i>	250 bp, Homöobox, NK2 Domäne (Buchberger et al., 1996)	EcoRI	T7
<i>TBX18</i>	1kb EST cDNA-Klon, ChEST861E19 (Boardman et al., 2002)	NotI	T3
<i>Wnt4</i>	350 bp, RT-PCR Fragment in pGEM-T Easy	NcoI	SP6
<i>Wnt5a</i>	350 bp, RT-PCR Fragment in pGEM-T Easy	NcoI	SP6
<i>Wnt11</i>	350 bp, RT-PCR Fragment in pGEM-T Easy	NcoI	SP6

### 3.15 Kits

QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen
QIAGEN <sup>®</sup> Plasmid Midi Kit (25)	Qiagen
QIAEX <sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (150)	Qiagen
Click-iT <sup>™</sup> EdU Imaging Kit	Molecular Probes
<i>In situ</i> Cell Death Detection Kit, AP	Roche
Platinum <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen
Tyramid Signal Amplifikation Kit	PerkinElmer <sup>™</sup>
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector System	Promega

### 3.16 Computerprogramme

Amira 3.0

DNA Star / Primer Select

Editseq

MetaMorph

Photoshop CS

Sequencher

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Bakterienkulturen

LB-Medium: 10 g NaCl; 10 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Yeast-Extract;  
mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 Liter auffüllen; (Amp)

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; (Amp)

SOB-Medium: 10 g Bacto-Trypton; 5 g Bact-Yeast-Extract; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 Liter auffüllen

#### Übernachtskultur

Es wurde entweder eine einzelne Bakterienkolonien von einer Agarplatte gepickt oder etwas Material aus einem Glycerin-Stock entnommen und über Nacht bei 37°C in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum geschüttelt.

#### Herstellung von Glycerin-Stocks

650 µl Bakterienkultur wurden mit 350 µl sterilen Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.



### 4.1.2 Mini-Präparation

Puffer 1: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

Puffer 2: 0,2 M NaOH; 1% SDS (w/v)

Puffer N3: 3 M Kaliumacetat (pH 5,5)

Die Mini-Präparation erfolgte nach dem „QIAprep® Miniprep Handbook“ (Qiagen). Dafür wurden 3 ml Antibiotika enthaltendes LB-Medium mit einem Glycerin-Bakterienstock angeimpft und 12-20 Stunden im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden nacheinander 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt, die Bakterien durch kurze Zentrifugation bei einer geringen Geschwindigkeit (600 rpm) pelletiert und der Überstand abgesaugt. Das Bakterienpellet wurde nun in 250 µl Puffer 1 resuspendiert. Weiterhin wurden zur Lyse der Zellen 250 µl Puffer 2 hinzugegeben und das Eppendorfgefäß vorsichtig 4-6x invertiert. Darauf folgte die Zugabe von 350 µl Puffer N3, wonach abermals durch sofortiges 4-6x iges Invertieren vorsichtig gemischt wurde, wodurch es zur Fällung der Proteine und der genomischen DNA kommt. Anschließend wurde für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert, so dass sich ein kompaktes weißes Pellet bildete. Den Überstand dekantierte man aus dem Eppendorfgefäß in eine Säule des QIAprep Spin Kits und zentrifugierte für 30-60 Sekunden. Da die Plasmid-DNA dabei an die Säulenmatrix bindet wurde die durchgeflossene Lösung verworfen. Auf die Säule wurden nun 750 µl Puffer PE pipettiert und wiederum für 30-60 Sekunden zentrifugiert. Durch abermaliges einminütiges Zentrifugieren, nachdem der durchgeflossene Überstand entfernt wurde, stellt man sicher, dass kein Ethanol aus dem PE-Puffer zurückbleibt. Dieses könnte nachfolgende Enzymreaktionen inhibieren. Die Säule wurde schließlich in ein neues Eppendorfgefäß platziert und die Plasmid-DNA eluiert, indem 50 µl H<sub>2</sub>O dazugegeben wurden. Es wurde 1 Minute inkubiert und letztlich 1 Minute zentrifugiert. Bis zum Gebrauch wurde die Plasmid-DNA bei -20°C aufbewahrt. Die DNA-Konzentration wurde durch UV-Spektroskopie bestimmt.

### 4.1.3 Midi-Präparation

Puffer 1: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

Puffer 2: 0,2 M NaOH; 1% SDS (w/v)

Puffer P3: 3 M Kaliumacetat (pH 5,5)

Puffer QBT: 750 mM NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% Isopropanol (v/v);  
0,15% Triton<sup>®</sup>X-100 (v/v)

Puffer QC: 1,0 M NaCl; 50 mM MOPS (pH7,0); 15% Isopropanol (v/v)

Puffer QF: 1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl (pH 8,5); 15% Isopropanol (v/v)

Die Midi-Präparation erfolgte nach dem „QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Purification Handbook“ (Qiagen). Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 100ml Antibiotikum enthaltendes LB-Medium mit 5 ml Startkultur eines zu vermehrenden Glycerin-Bakterienstocks angeimpft und 12-20 Stunden im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde bei einer geringen Geschwindigkeit (600 rpm) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Bakterienpellet in 4 ml Puffer 1 vollständig resuspendiert. Weiterhin wurden zur Lyse der Zellen 4 ml Puffer 2 hinzugegeben das Eppendorfgefäß 4-6x invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 4 ml Puffer P3, wonach abermals durch sofortiges 4-6x iges Invertieren gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Nachdem der Ansatz für 30 Minuten bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert wurde, bildete sich ein kompaktes weißes Pellet. Der Überstand wurde auf eine, mit 4 ml Puffer QBT, äquilibrierte Säule des QIAprep Spin Kits aufgetragen. Nachdem das Lysat durchgeflossen war, wurde die Säule zweimal mit 10 ml Puffer QF gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert, mit 0,7 Vol Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C (14.000 rpm) pelletiert. Nachdem das Pellet einmal mit 70% Ethanol gewaschen wurde, wurde es 5-10 Minuten getrocknet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **4.1.4 RNA-Isolierung**

Lösung D: 4 M Guanidinium Isothiocyanat

25 mM Natriumcitrat (pH 7,2)

0,5% Sacrosyl

Total-RNA aus jungen Hühnerembryonen wurde gemäß der Guanidinium-Isothiocyanat Methode isoliert (Chomczynski und Sacchi, 1987). Hierbei handelt es sich um ein Protokoll, das für die RNA-Isolierung aus geringen Gewebemengen ausgelegt ist. Alle Arbeitsschritte erfolgten zum Schutz der RNA vor Abbau durch RNAsen auf Eis oder bei 4°C.

Die in sterilem 1x PBS präparierten Embryonen/Gewebe wurden bis zur Isolierung der Total-RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zu Beginn der RNA-Isolierung wurden zu den Geweben 200  $\mu\text{l}$  Lösung D und 2  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol gegeben und diese durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren solubilisiert. Darauf wurden 20  $\mu\text{l}$  2 M Na Acetat (pH 4), 200  $\mu\text{l}$  Phenol und 40  $\mu\text{l}$  Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) hinzugegeben. Nach jeder Zugabe wurde der Ansatz 10 Sekunden gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde nun 15 Minuten lang auf Eis inkubiert und danach für 10 Minuten mit 14.000 rpm bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, wonach zwei Phasen erkennbar waren. Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde vorsichtig, ohne die Interphase mit Proteinen und DNA zu berühren, in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Hinzugabe von 1  $\mu\text{l}$  Glykogen (35 mg/ml, RNase frei) und 500  $\mu\text{l}$  Ethanol (100%) wurde die RNA 1 Stunde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  präzipitiert. Nach zwanzigminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde das Pellet 2x mit Ethanol (80%) gewaschen, nochmals 10 Minuten zentrifugiert, kurz luftgetrocknet und schließlich in 40  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Verunreinigungen durch genomische DNA wurden vollständig entfernt, durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  5x Transkriptionspuffer, 2  $\mu\text{l}$  RQ1 DNase und 1  $\mu\text{l}$  RNasin für 1 Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Dies hatte eine neuerliche Extraktion mit 1 Volumen Chloroform zur Folge, wobei die Fällung der RNA aus dem wässrigen Überstand mit 10  $\mu\text{l}$  2 M Na Acetat (pH 4,5) und 150  $\mu\text{l}$  Ethanol (100%) über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  erfolgte. Nach zwanzigminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm sollte ein Pellet sichtbar werden, welches wiederum 2x mit Ethanol (80%) gewaschen, für 10 Minuten zentrifugiert, kurz luftgetrocknet und letztlich in 10  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen wurde. Bis zur Verwendung wurde die RNA-Lösung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.1.5 cDNA-Synthese

##### **Anlagerung des Oligo-dT-Primers**

9  $\mu\text{l}$  der Total-RNA-Präparation  
1  $\mu\text{l}$  Oligo(dT)15-Primer (100 pmol)  
3  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

Der Ansatz wurde gut gemischt, für 3 Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$  erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Für die cDNA-Synthese wurde ein „Mastermix“ für alle Ansätze inklusive Kontrolle pipettiert und der Anlagerungsansatz zu dem vorgelegten Mix gegeben.

**cDNA-Synthese Reaktionsansatz**

13 µl Anlagerungsansatz +  
5 µl 5x AMV-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 µl DTT (100 mM)  
2,5 µl dNTPs (10 mM)  
0,7 µl RNAsin (40 U/µl)  
0,7 µl H<sub>2</sub>O  
0,7 µl AMV-RT (23 U/µl)

Dieser Reaktionsansatz wurde 1 Stunde bei 42°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch eine zweiminütige Inkubation bei 100°C gestoppt. Bis zum Gebrauch wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

**4.1.6 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung wurde die Extinktion bei 260 nm mit dem „Bio Photometer“ (Eppendorf) bestimmt. Dazu wurde in einer „UVette“ (Eppendorf) eine 1:50 Verdünnung der Nukleinsäurelösung gemessen. Bei gereinigter DNA, beziehungsweise RNA, sollten die Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> und OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> jeweils größer als zwei sein.

**4.1.7 Sequenzierung**

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem „ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer“ (Perkin Elmer) durchgeführt. Für die PCR wurde Mini-Präparation-DNA verwendet, die zuvor 15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde, um enthaltene Salze zu präzipitieren.

**PCR-Ansatz**

2 µl Premix (Big Dye)  
1 µl Plasmid-DNA (500 ng)  
1 µl Oligonukleotid (T3/T7, siehe 3.13; 10 pmol/µl)  
6 µl H<sub>2</sub>O

**PCR-Programm**

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

**Ethanol-Fällung**

Das PCR-Produkt wurde mit 90 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 250 µl Ethanol (100%) gefällt und der Ansatz anschließend 20 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Damit das entstehende Pellet besser zu beobachten ist, wurde zuvor 1 µl Dextran-Blau (20 mg/ml) zugegeben. Nach der Zentrifugation wurde das Ethanol entfernt, das Pellet 3x mit Ethanol (70%) gewaschen, anschließend getrocknet und mit 12,5 µl TSR-Puffer (Template Suppression Reagent) versetzt. Schließlich denaturierte man die DNA für 2 Minuten bei 90°C, wonach der Ansatz auf Eis in ein Sequenziergefäß pipettiert und darin bis zur Sequenzierung bei 4°C aufbewahrt wurde.

**4.1.8 Primerentwurf**

Für die Amplifikation verschiedener Markergene durch Endpunkt- beziehungsweise Echtzeit-PCR, wurden entsprechende Primerpaare entworfen. Dafür 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/)) ermittelt und mit Hilfe der Software „Primer Select“ geeignete Primer designt.

**4.1.9 Endpunkt-PCR**

Für eine PCR-Reaktion wurde ein „Mastermix“ für alle Ansätze inklusive Kontrolle pipettiert und die cDNA zu dem vorgelegten Mix gegeben.

**PCR-Ansatz**

x µl cDNA +  
2 µl 10x Puffer  
1,5 µl dNTPs

25 pmol Oligonukleotid forward  
 25 pmol Oligonukleotid reverse  
 0,3 µl rTaq-Polymerase  
 add. 20 µl mit bidest. H<sub>2</sub>O

### PCR-Programm

95 °C	5 Minuten	
95 °C	1 Minute	}
Annealing-Temperatur	1 Minute	} Anzahl der Zyklen
72 °C	1 Minute pro kb des Fragments	}
72 °C	5 Minuten	
4 °C	Pause	

Die Annealing-Temperatur variiert je nach Schmelztemperatur der synthetischen Oligonukleotide (siehe Tabelle 1).

Die PCR-Ansätze wurden nach der Reaktion, zur Analyse der amplifizierten Produkte, zusammen mit einem Größenmarker in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend photographiert.

#### 4.1.10 Echtzeit-PCR (*Real time PCR*)

Mit Hilfe der Echtzeit-PCR konnte die Expression von Markergenen, im Gegensatz zur Endpunkt-PCR, relativ quantifiziert werden. Hierzu wurden der „iCycler“ (Biorad) und das „SYBR<sup>®</sup> Green *Realtime* PCR Kit“ (Invitrogen) verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff „SYBR<sup>®</sup> Green“ diente zur Detektion des Amplifikats, da er sich in doppelsträngige DNA einlagert. Weiterhin wurde für die PCR-Reaktion die „Hot Star Taq-Polymerase“ (Biozym) verwendet, die ohne einen 15 Minuten langen Erhitzungsschritt nicht startet, wodurch die Reaktion sehr spezifisch ist.

Voraussetzung für die Auswertung jedes PCR-Laufes war die Erstellung einer Standardreihe, wodurch die Effizienz der jeweiligen Reaktion ermittelt wurde. Zur Berechnung der Ratio der relativen Expressionshöhe wurde folgende Formel angewendet:

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

Durch das ubiquitär exprimierte Haushaltsgen *GAPDH* wurde der Lauf normalisiert und die relative Quantifizierung gewährleistet, da so jeder gemessene Wert seinen entsprechenden Abgleich erfuhr. Die CT-Werte berücksichtigen nur die Zyklenzahlen, bei denen das gemessene Fluoreszenzsignal höher ist als das Hintergrundsignal. Es wurden mindestens 3-6 Messungen je cDNA durchgeführt, um die Daten zu verifizieren. Stark abweichende Werte wurden dabei nicht berücksichtigt. Ebenso wurden Reaktionsansätze mit mehr als einem Schmelzpunkt, also mehr als einem spezifischen Amplifikat, ausgeschlossen.

### Reaktionsansatz

1 µl cDNA +  
 25 µl SYBR Green Mastermix  
 0,3 µM Oligonukleotid forward  
 0,3 µM Oligonukleotid reverse  
 23 µl H<sub>2</sub>O

### PCR-Programm

95°C	15 Minuten	> Aktivierung der HotStar Taq-Polymerase
94°C	15 Sekunden	}
Annealing-Temperatur	30 Sekunden	} 35-45x
72°C	30 Sekunden	]

#### 4.1.11 Agarose-Gelelektrophorese

10x TAE: 40 mM Tris, 20mM Essigsäure; 10 mM EDTA; pH 8,0

6x Probenpuffer - orange: 50% Ficoll Type 400; 0,5% Orange G in H<sub>2</sub>O

6x Probenpuffer - blau: 50% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol in H<sub>2</sub>O

1% Ethidiumbromid

Zu analytischen Zwecken wurden DNA-Fragmente auf Agarose-Gelen ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach zu analysierender Fragmentgröße wurden 1-2%ige Agarose-Gele verwendet. Für die Gele wurden die benötigten Mengen an Agarose in 1x TAE eingewogen und unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. 50 ml Agarose für ein „Mini- Gel“ und 100 ml für ein „Midi-Gel“ wurden nach Abkühlung auf circa 60°C mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die entsprechende Gießvorrichtung mit Probenkamm gegossen. In der Elektrophoresekammer wurde das fertige Gel mit 1x TAE überschichtet und die, mit Probenpuffer versetzten, DNA-Proben und ein Größenmarker aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120V. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht dokumentiert. Für die Qualitätskontrolle von RNA-Sonden wurde gleichermaßen verfahren. Nur musste bei Agarose-Gelen ohne Formaldehyd darauf geachtet werden, dass die RNA-Probe nicht zu lange und unter zu großer Spannung das Gel durchläuft, damit die RNA nicht degradiert.

#### **4.1.12 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen**

Puffer QX1: NaClO<sub>4</sub>-haltiger Solubilisierungspuffer mit pH-Indikator

Puffer PE: EtOH-haltiger Waschpuffer

QIAEX II

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das „QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit“ (Qiagen) verwendet. Dazu wurden die zu isolierenden DNA-Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend deren Gewicht bestimmt. Folglich wurden in jeder Probe zu einem Volumen Gel drei Volumen Puffer QX1 gegeben und nach Vortexen für 30 Sekunden weiterhin 10 µl QIAEX II Silikalperlensuspension zugegeben. Um die Agarose aufzulösen und somit die DNA an die Perlen zu binden, wurden die Proben daraufhin für 10 Minuten bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde für 30 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert, das Pellet einmal mit 500 µl Puffer QX1 und zweimal mit 500 µl Puffer PE gewaschen und für 10-15 Minuten luftgetrocknet. Die DNA-Elution erfolgte durch Zugabe von 20 µl H<sub>2</sub>O, Resuspendieren der Perlen und erneute Zentrifugation. Der Überstand, der nun die isolierten DNA-Fragmente enthält, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.



### 4.1.13 Klonierungstechniken

#### 4.1.13.1 Ligation von DNA-Fragmenten

Zu klonierende PCR-Produkte wurden in den „pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor“ ligiert. Dazu wurde das „pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System“ (Promega) verwendet. Die 3′-terminalen Thymidin-Überhänge an den beiden entsprechenden Strangenden des „pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektors“ ermöglichen eine direkte und effiziente Ligation von amplifizierten DNA-Fragmenten, die durch diverse thermostabile DNA-Polymerasen ein einzelnes Deoxyadenosin an den 3′-Enden tragen. Zudem wird die Selbstligation des Vektors verhindert.

##### Standardreaktion

- 5 µl 2x Rapid Ligationspuffer für T4-DNA-Ligase (gut durchgemischt!)
- 1 µl pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor (50ng)
- x µl PCR-Produkt (Verhältnis PCR-Produkt:Vektor; 1:1; 2:1; 3:1)
- 1 µl T4-DNA-Ligase (3U/µl)

Ebenfalls wurden eine Positiv- und Hintergrundkontrolle mitgeführt. Alle Ansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Identifizierung rekombinanter Klone erfolgte durch ein Farbscreening auf IPTG/X-Gal beschichteten LB-Platten. Da die multiple Klonierungsstelle des „pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektors“ innerhalb der Kodierungsregion von *lacZ* (β-Galaktosidase-Gen) liegt, kommt es bei erfolgreicher Ligation zur Insertionsinaktivierung, wodurch positive Klone X-Gal nicht hydrolysieren, sich deshalb nicht blau verfärben und weiß erscheinen (Blau-Weiß-Selektion).

#### 4.1.13.2 Herstellung von kompetenten Bakterien

Puffer 1: 10 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM CaCl<sub>2</sub>

Puffer 2: 100 mM CaCl<sub>2</sub>, Glycerin (1:3)

100 mM MgCl<sub>2</sub>

Um die Bakterienmembran für die Aufnahme von Fremd-DNA durchlässig und somit „kompetent“ zu machen, wurden Bakterienzellen mit CaCl<sub>2</sub> inkubiert (Dagert und Ehrlich, 1979). Alle Lösungen wurden frisch angesetzt und sterilfiltriert.

*E. coli xll blue* wurden aus einem Glycerin-Stock auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde gepickt und in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C angeschüttelt. Aus der Übernachtskultur wurden 2 ml entnommen, in 200 ml SOB-Medium pipettiert und bis zu einer  $OD_{600} = 0,35-0,45$  bei 37°C geschüttelt. Nachfolgend wurde die Bakterienkultur zunächst auf Eis gekühlt und anschließend für 10 Minuten bei 0°C mit 4000 rpm pelletiert. Das Bakterienpellet wurde nun in 100 ml 100 mM  $MgCl_2$  resuspendiert und der Ansatz 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 0°C (3500 rpm im GSA) wurden die Bakterien in 50 ml Puffer 1 aufgenommen und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Letztlich wurde 7 Minuten bei 0°C (3500 rpm im GSA) zentrifugiert, das Pellet in 4 ml Puffer 2 gelöst und daraus Aliquots á 200 µl pipettiert, welche in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt wurden.

#### 4.1.13.3 Transformation in *E.coli*

Zur Transformation zirkulärer dsDNA in kompetente *E. coli xll blue*-Bakterien wurden 5 µl Ligationsansatz mit 100 µl *E.coli*-Zellen vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis aufbewahrt. Da ein kurzer Hitzeschock die Transformationsrate wesentlich erhöht, wurden die Zellen danach für 1 Minute bei 42°C inkubiert, direkt danach für 2 Minuten auf Eis überführt und anschließend in 150 µl LB-Medium für 1 Stunde bei 37°C schonend geschüttelt. Kleine Volumina von 10 µl und 100 µl der Kultur wurden auf LB-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um die Aufnahme der Plasmid-DNA zu überprüfen, wurden einzelne Klone gepickt, angeschüttelt und die Plasmide aus der Bakterien-Kultur mittels Mini-Präparation isoliert. Diese wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, um das klonierte DNA-Fragment nachzuweisen.

#### 4.1.14 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktion von Plasmid-DNA wurden pro µg zu verdauender DNA 1-2 Units Enzym eingesetzt und der für das Enzym notwendige Puffer verwendet.

##### Restriktionsansatz

x µl DNA (aus Mini/Midi-Präparation) +  
5 µl 10x BSA (wenn für das verwendete Enzym notwendig)  
5 µl 10x Puffer  
x µl Enzym    add. x µl bidest.  $H_2O$

Der Reaktionsansatz wurde für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert und die DNA nachfolgend entweder direkt auf einem Agarose-Gel aufgetrennt oder zur weiteren Verwendung ausgefällt und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Bis zur Verwendung wurde linearisierte Plasmid-DNA bei -20°C aufbewahrt.

#### **4.1.15 „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung**

##### **4.1.15.1 Präparation der Hühnerembryonen**

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>; mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 Liter auffüllen

1x PBS: 100 ml 1x PBS; 900 ml bidest. H<sub>2</sub>O

4 % PFA: 4 g Paraformaldehyd in 50 ml sterilem H<sub>2</sub>O unter Erwärmen lösen;

2 Tropfen 2 M NaOH; 10 ml 10x PBS; mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen

Befruchtete Bruteier wurden bei 38°C und 75% relativer Luftfeuchtigkeit bis zum gewünschten Entwicklungsstadium im Inkubator bebrütet und das Entwicklungsstadium nach Hamburger und Hamilton (1951) bestimmt. Die Präparation der Embryonen erfolgte aus dem geöffneten Ei, wonach der Embryo direkt an seinen extraembryonalen Membranen ausgeschnitten und in eine, mit 1x PBS gefüllte, Petrischale transferiert wurde. Nachfolgend wurden mit sterilem Präparierbesteck sämtliche, den Embryo umgebende, Häute entfernt. Ebenfalls wurden kultivierte manipulierte Embryonen (4.4.3) von extraembryonalen Geweben befreit. Für die *in situ* Hybridisierung wurden die Embryonen anschließend für 2 Stunden oder über Nacht in 4% Paraformaldehyd in 1x PBS bei 4°C fixiert. Darauffolgend wurden sie zweimal mit PBT gewaschen und in einer aufsteigenden Methanolreihe (1x 25%, 50%, 75% Methanol/PBT, 2x 100% Methanol) dehydriert. Bis zur Verwendung wurden die Embryonen in 100% Methanol bei -20°C gelagert.

Die im Folgenden beschriebene Methode basiert auf D.G. Wilkinson (1992).

##### **4.1.15.2 RNA-Probensynthese**

Dig -Mix : 250 nM Digoxigenin UTP; 200 nM UTP; je 450 nM CTP; ATP und GTP

1x TE-Puffer : 10 mM Tris (pH 8,0); 1 mM EDTA

Für die Synthese einer *antisense* RNA-Probe wurde linearisierte Plasmid-DNA eingesetzt, die zuvor durch Mini/Midi-Präparation isoliert und das entsprechende Restriktionsenzym geschnitten wurde. Eine Übersicht der für die RNA-Probensynthese verwendeten Restriktionsenzyme und RNA-Polymerasen befindet sich in Tabelle 2.

#### **Reaktionsansatz**

4 µl 5x Transkriptionspuffer  
2 µl 0,1 M DTT (in 10 mM Natriumacetat; 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-RNA-Polymerase  
add. 10 µl bidest. H<sub>2</sub>O

Die Reaktion wurde für 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde zu dem Ansatz 2 µl DNase (1 U/µl) gegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Plasmid-DNA zu verdauen. Zur Fällung der synthetisierten RNA erfolgte die Inkubation mit 100 µl 1x TE, 10 µl LiCl und 300 µl Ethanol (100%) für 45 Minuten bei -20°C. Der Ansatz wurde dann 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, das Pellet mit Ethanol (70%) gewaschen, kurz luftgetrocknet und in 80 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Kontrolle der RNA-Synthese und ihrer Qualität wurden vor dem DNase-Verdau 1 µl und nach der Fällung 5 µl des Reaktionsgemisches abgenommen und in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Bis zur Verwendung wurde die RNA in TE-Puffer bei -20°C aufbewahrt.

#### **4.1.15.3 Vorbehandlung der Embryonen**

PBT: 1x PBS; 0,1% Tween-20  
30% Wasserstoffperoxid  
25% Glutaraldehyd

Falls nicht anders angegeben, erfolgten alle Waschschrte für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

Vor der Hybridisierung wurden die Embryonen durch eine absteigende Methanolreihe (2x 100% Methanol, 1x 75%, 50%, 25% Methanol/PBT) und einen zweifachen Waschschrte in

PBT rehydriert. Um die Embryonen zu bleichen wurden sie daraufhin mit 6% Wasserstoffperoxid in PBT 30 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurde die Wasserstoffperoxid-Lösung durch drei Waschschrte in PBT entfernt. Danach erfolgte eine kurze Inkubation mit 10 µg/ml Proteinase K in PBT, um das embryonale Gewebe für die RNA-Probe durchlässig zu machen. Da die Inkubationszeit an das Alter der Embryonen angepasst sein muss, wurden HH Stadien 4-12 für 1 Minute und HH Stadien 13-18 für 3 Minuten in der Proteinase K-Lösung inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Embryonen 20 Minuten lang in frisch zubereitetem 2 mg/ml Glycin in PBT gewaschen. Darauf wurde wiederum dreimal mit PBT gewaschen und für 20 Minuten in 0,2% Glutaraldehyd / 4% Paraformaldehyd in PBT inkubiert, um die Embryonen zu refixieren. Die Fixierlösung wurde durch drei Waschschrte in PBT entfernt und währenddessen mit einer feinen Insektennadel kleine Löcher in die geschlossenen Hohlräume der Embryonen eingebracht, um später das Auswaschen nicht-gebundener RNA-Probe zu erleichtern.

#### **4.1.15.4 Hybridisierung**

Hybridisierung-Mix: 50% Formamid; 5x SSC (pH 4,5); 1% SDS; 50 µg/ml tRNA;  
50 µg/ml Heparin

Zur Prähybridisierung wurden die Embryonen 2-3 Stunden bei 70°C im Hybridisierungs-Mix ohne RNA-Probe schüttelnd inkubiert. Für die Hybridisierung wurden danach 75 µl RNA-Probe aufgetaut, in 4 ml Hybridisierungs-Mix gegeben und die Embryonen darin über Nacht bei 70°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die RNA-Sonde entfernt und bis zur erneuten Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

#### **4.1.15.5 Post-Hybridisierung-Waschschrte**

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 TBS: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 25 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5);

mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen

1x TBS-T: 100 ml 10x TBS; 900 ml bidest. H<sub>2</sub>O; 1% Tween-20

Um nach der Hybridisierung möglichst alles an ungebundener RNA abzuwaschen, wurden die Embryonen zweimal für 30 Minuten mit Lösung 1 und 10 Minuten in einem 1:1-Gemisch aus

Lösung 1 und Lösung 2 bei 70°C gewaschen. Nach zwei Waschschritten in Lösung 2 bei Raumtemperatur erfolgte dann eine kurze Inkubation (bis zu 1 Minute) in 100 µg/ml RNase A in Lösung 2, um alle einzelsträngigen/nicht-gebundenen RNAs abzubauen. Die RNase A-Lösung wurde folglich durch einen Waschschriff mit Lösung 2 und Lösung 3 entfernt, worauf zweimal für 30 Minuten mit Lösung 3 bei 60°C und dreimal für 5 Minuten mit 1x TBS-T gewaschen wurde.

#### **4.1.15.6 Antikörperadsorption**

Um unspezifisches Binden des anti-DIG-Antikörpers zu verhindern, wurden die Embryonen vor der Antikörper-Inkubation für 1-2 Stunden mit 10% hitzeinaktiviertem (30 Minuten bei 70°C) Schafserum in 1x TBS-T geblockt. Weiterhin kann durch Präadsorption des anti-DIG-Antikörpers dessen Reaktivität verringert werden. Dazu wurden x mg Embryopuder mit x ml TBS-T für 30 Minuten bei 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nachdem x µl hitzeinaktiviertes Schafserum und x µl Anti-DiG-Antikörper hinzugegeben wurden, wurde der Ansatz für mindestens 1 Stunde bei 4°C geschüttelt. Das Embryopuder wurde danach durch zehnmünütige Zentrifugation bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit pelletiert und der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Dieser wurde mit x µl Schafserum versetzt und mit 1x TBS-T auf 5 ml aufgefüllt. Die Embryonen wurden schließlich in dem präadsorbierten anti-DIG-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert.

#### **4.1.15.7 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

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

Nach der Antikörper-Inkubation wurden die Embryonen dreimal kurz mit 1x TBS-T, viermal 1 Stunde mit 1x TBS-T und einmal mit NTMT über Nacht gewaschen. Zur Färbung wurden sie in der Färbelösung im Dunkeln bis zur gewünschten Farbintensität geschüttelt. Gefärbte Embryonen wurden kurz in 1x PBS gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd in 1x PBS über Nacht bei 4°C fixiert und bis zur Dokumentation bei 4°C in 1x PBS aufbewahrt.

#### **4.1.15.8 Histologische Untersuchungen**

Gefärbte „Whole mount“-Embryonen wurden für die Anfertigung von Kryoschnitten entweder in OCT-Gefriermedium oder 7,5% Gelatine/15% Saccharose in 1x PBS eingebettet.

Das Einfrieren von Embryonen in OCT wurde wie in 4.3.3.1 beschrieben durchgeführt. Jedoch wurden „Whole mount“-Embryonen bevorzugt in Gelatine/Saccharose eingefroren, da hierdurch zumeist eine bessere Histologie zu erzielen war. Dafür wurden die Embryonen über Nacht bei 50°C in der Gelatine/Saccharose inkubiert, anschließend in dieser Lösung in Kunststoffformen überführt und ausgerichtet. Nach Verfestigung des Mediums wurden die Gelatine/Saccharose-Blöcke mit einem Skalpell ausgeschnitten, in Trockeneis-gekühltem Isopentan eingefroren und bei -20°C gelagert. Von den gefrorenen Blöcken wurden am Kryotom 15 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf beschichtete Objektträger transferiert wurden. Nach einer alternativen Gegenfärbung mit „Nuclear Fast Red“ erfolgte die Eindeckelung mit Entellan, nachdem die Schnitte eine aufsteigende Ethanolreihe durchlaufen hatten.

### **Nuclear Fast Red-Färbung**

Falls nicht anders angegeben, wurden Kryoschnitte in den Lösungen für 5 Minuten inkubiert.

- > 2x in PBS waschen
- > 20-40 Sekunden filtrierte Nuclear Fast Red-Lösung
- > 2x in PBS waschen
- > 1x 30% Ethanol
- > 1x 50% Ethanol
- > 1x 80% Ethanol
- > 1x 100% Ethanol
- > 2x Xylol
- > Eindeckelung in Entellan

### **4.1.16 Schnitthybridisierung**

Die Detektion von RNA auf Gewebeschnitten erfolgte auf gleiche Weise wie in der „whole mount“ *in situ* Hybridisierung (4.1.15).

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

Das Protokoll der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde adaptiert von Marcos Simeos Costa (persönliche Korrespondenz) und entspricht in seinen Grundzügen der „Whole mount“

*in situ* Hybridisierung. Jedoch wird für die Detektion der DIG-markierten RNA-Probe kein Alkalische Phosphatase-gekoppelter anti-DIG-Antikörper verwendet, sondern ein Peroxidase-gekoppelter anti-DIG-Antikörper. Dieser bindet Cy3- oder Cy5-gekoppelte Tyramide sehr effizient, wodurch ein starkes rotes oder grünes Fluoreszenzsignal erzeugt wird. Dadurch kann eine Signalverstärkung und höhere zelluläre Auflösung erreicht werden. Für die Gegenfärbung wurde DAPI eingesetzt. Die Auswertung der Fluoreszenzfärbung erfolgte unter dem Stereomikroskop mit UV-Lampe und dem konfokalen Laserscanningmikroskop.

#### **4.1.18 3D-Rekonstruktion konfokaler Bilderstapel**

Mit Hilfe des konfokalen Laserscanningmikroskops wurden von FISH-gefärbten Embryonen Stapel Fluoreszenz-gefärbter Serienschritte aufgenommen, aus denen mit der Amira-Software eine 3D-Rekonstruktion erstellt wurde. Dazu wurden die Stapelaufnahmen in das Programm eingeladen und die Auflösung reduziert (Resampling). Darauf erfolgte die Ausrichtung der verschiedenen Sektionen (Alignment) und die Erstellung eines Markierungsfeldes (Label field), wobei auf jedem einzelnen Schnitt die gefärbten Areale markiert wurden. Auf der Grundlage der markierten Areale wurde nun eine aus Polygonen bestehende Oberfläche generiert (Surface module), welche modifiziert und als Film animiert werden kann. Weiterhin konnte durch die 3D-Rekonstruktion eine sehr genaue Volumenberechnung des spezifisch gefärbten Gewebes ermittelt werden.

#### **4.1.19 Dokumentation**

Embryonen wurden zur Dokumentation auf einer Agaroseplatte mit Insektennadeln fixiert und unter dem Binokular (Leica MZFL III) mit einer Digitalkamera (Polaroid DMC) fotografiert. Kryoschnitte wurden ebenfalls unter dem Binokular als auch für Detailaufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss AxioPhot) aufgenommen. Alle Fotos wurden mit „Adobe Photoshop“ digital bearbeitet.

#### **4.1.20 Statistische Analyse**

Wenn angezeigt, wurden erhaltene quantitative Daten mittels „unpaired Student's *t* test“ analysiert. Die statistische Signifikanz wurde bei  $P < 0,05$  angesetzt.

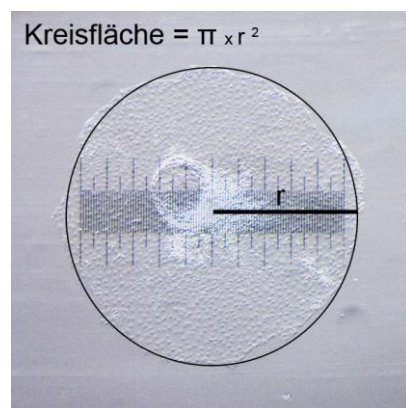


## 4.2 Zellbiologische Methoden

### 4.2.1 Proepikardiale Explantatkultur

Medium 199: (1x) (+) Earle (+) GlutaMAX™-I

Die Proepikardien wurden wie unter 4.4.1 beschrieben explantiert und in unbeschichteten 4-well Zellkulturplatten oder Fibronectin-beschichteten Kammerobjektträgern in serumfreiem Medium M199 bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 16 Stunden Kultur wurden Explantate, die nicht adhärent waren oder schlagende Myokardareale aufwiesen, verworfen. Adhärenente und unkontaminierte Proepikardexplantate wurden dokumentiert und das Kulturmedium mit finalen Konzentrationen von 10 µM oder 100 µM Fgf-Rezeptor-Inhibitor SU5402, 30 µg/ml Fgfr1-Protein, 10 µM PI3-Kinase-Inhibitor LY29400, 5 µM MEK1/2-Inhibitor U0126 oder 2 µg/ml Fgf2-Protein versehen. Zu den Kontrollen wurden gleichwertige Volumina DMSO (1% (v/v)) oder BSA/PBS (0,2% (w/v)) gegeben. Nach einer Gesamtkulturzeit von 64 Stunden wurden die Explantate abermals dokumentiert und anschließend für RNA-Isolierung (4.1.4), TUNEL assay (4.2.1.2) oder Immunfluoreszenz (4.3.3) verwendet. Zur Bestimmung des Flächenwachstums von Proepikardexplantaten wurden digitale Aufnahmen der Explantate und eines Objektmikrometers (1mm) der gleichen Vergrößerung verwendet (Abb.9).



**Abb.9 - Methode zur Ermittlung des Flächenwachstums von PE-Explantaten**

Durch eine digitale Aufnahme eines PE-Explantates und Objektmikrometers, konnte der Radius (r) des Explantates bestimmt werden, der für die Berechnung des Flächenwachstums benötigt wird.

#### 4.2.1.1 BrdU-Inkorporation

1 mg/ml BrdU/PBS

Um die DNA-Synthese in proliferativ-aktiven Zellen konditionierter Proepikardexplantate detektieren zu können, wurde das Zellkulturmedium während der letzten 24 Stunden Kultur mit einer finalen Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  des Thymidin-Analogons 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) versetzt. Das inkorporierte BrdU wurde nach der Fixierung und Permeabilisierung der proepikardialen Zellen auf den Kammerobjektträgern durch eine Antikörperfärbung nachgewiesen (siehe 4.3.3.2). Um die Gesamtzellzahl eines Proepikardexplantates ermitteln zu können, wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt. Die Quantifizierung der Zellkerne als auch die quantitative Analyse der BrdU-positiven Zellen erfolgte durch cLSM-Aufnahmen mit der Adobe Photoshop-Software.

#### 4.2.1.2 TUNEL-Methode

1x PBS: 100 ml 1x PBS; 900 ml bidest. H<sub>2</sub>O

Fixierlösung: 4 g Paraformaldehyd in 50 ml sterilem H<sub>2</sub>O unter Erwärmen lösen;

2 Tropfen 2 M NaOH; 10 ml 10x PBS; mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen

(pH 7,4)

Permeabilisierungslösung: 0,1% Triton X-100 / 0,1% NaCl/PBS

Markierungslösung (1x): Nukleotid-Mix in Reaktionspuffer

Enzymlösung (10x): Terminale Desoxynukleotid-Transferase (TdT) in Puffer

Zur Detektion apoptotischer Zellen in konditionierten Proepikardexplantaten wurde das *In situ* Cell Death Detection Kit, AP (Roche) verwendet. Die damit durchgeführte TUNEL-Reaktion (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) macht DNA-Strangbrüche apoptotischer Zellen sichtbar, indem das Enzym TdT (Terminale Desoxynukleotid-Transferase) an den DNA-Bruchenden freiwerdende Hydroxylgruppen (3'-OH-Enden) mit Fluoreszenz-modifizierten Nukleotiden markiert. Hierzu wurden auf Kammerobjektträgern kultivierte Explantate nach 64 Stunden Kulturzeit für 1 Stunde bei Raumtemperatur fixiert, mit 1x PBS gewaschen und 2 Minuten auf Eis permeabilisiert. Anschließend wurde nach Angaben des Herstellers aus Markierungslösung und Enzymlösung der TUNEL-Reaktionsmix angesetzt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und auf jedes Explantat ein Volumen von 50  $\mu\text{l}$  TUNEL-Reaktionsmix aufgebracht. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei 37°C im Dunkeln. Nach der Reaktion wurden die Explantate 3x mit 1x PBS gespült, mit DAPI/PBS (1:1000) inkubiert und in Mowiol eingedeckelt. Durch die DAPI-Gegenfärbung konnte jeweils die Gesamtzellzahl der

Proepikardexplantate ermittelt werden. Die Quantifizierung der Zellkerne als auch die quantitative Analyse der TUNEL-positiven Zellen erfolgte durch cLSM-Aufnahmen mit der Adobe Photoshop-Software.

#### **4.2.2 Kultivierung von DF-1-Zellen**

DMEM: (1x) (+) 4.5 g/L Glukose (+) GlutaMAX<sup>TM</sup>-I (-) Pyruvat

Einfriermedium: DMEM, 10% FCS, 10% DMSO

Die immortalisierte Hühnerfibroblasten-Zelllinie DF-1 wurde in Zellkulturmedium der folgenden Zusammensetzung kultiviert: DMEM, 10% FCS, 1x Pen/Strep, 20 mM Glutamin. Gelagerte Zellen wurden im Wasserbad aufgetaut und nach Entfernen des Einfriermediums bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> in Zellkulturmedium inkubiert. Um die Zelllinie über einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff lagern zu können, wurde eine konfluente Zellkulturschale (Ø 10 cm) mit sterilem 1x PBS gewaschen, abtrypsinisiert, die Zellen bei 1000 rpm zentrifugiert in Einfriermedium aufgenommen und anschließend in Kryoröhrchen aliquotiert.

#### **4.2.3 Infektion von DF-1-Zellen mit RCAS-Konstrukten**

Zur Vermehrung von Viren wurden DF-1-Zellen auf kleine Zellkulturschalen (Ø 3,5 cm) ausplattiert und nach Angaben des Herstellers mit 10 µl Lipofectamine (Invitrogen) und 2 µg der entsprechenden RCAS-Konstrukte transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf größere Zellkulturschalen (Ø 10 cm) transferiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und der sich anschließenden Infektion eines Großteils der ausplattierten Zellen wurde RCAS-BP(A) verwendet und durch eine Färbung (4.1.15.7) nachgewiesen.

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

Für die Implantation proteinproduzierender Zellen wurden kugelförmige Zellaggregate verwendet. Für die Aggregation transfizierter DF-1-Zellen wurde eine konfluente Zellkulturschale (Ø 10 cm) trypsinisiert und auf eine mit Agarose beschichtete Kulturschale ausplattiert. Hierdurch bildeten sich lose Aggregate der sonst adhären Zellen, die direkt für die Implantation verwendet wurden (4.4.3).

### 4.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

5x Laufpuffer: 15 g Tris; 72 g Glycin; 5 g SDS; mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 Liter auffüllen

1x Laufpuffer: 200 ml 5x Laufpuffer; 800 ml bidest. H<sub>2</sub>O

Probenpuffer: 3,8 ml bidest. H<sub>2</sub>O; 1 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,8 ml Glycerin; 1,6 ml 10% SDS; 0,4 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,4 ml 1% Bromphenolblau

Durch die SDS-PAGE können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Komponenten Trenngel und Sammelgel sind folgendermaßen zusammengesetzt:

##### **Trenngel (10%, 10 ml für 2 Gele)**

H <sub>2</sub> O	4,0 ml
30% Acrylamid-Mix	3,3 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 $\mu$ l
10% APS	100 $\mu$ l
TEMED	4 $\mu$ l

##### **Sammelgel (5%, 3 ml für 2 Gele)**

H <sub>2</sub> O	2,1 ml
30% Acrylamid-Mix	500 $\mu$ l
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	380 $\mu$ l
10% SDS	30 $\mu$ l
10% APS	30 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l

Das Trenngel wurde in einer Gießapparatur, in der die mit Ethanol (70%) gereinigten Glasplatten der Elektrophoreseapparatur durch Spacern getrennt fixiert wurden, gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Das auspolymerisierte Trenngel wurde nach Entfernen des Alkohols mit dem frisch angesetztem Sammelgel überschichtet und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das fertige Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, 1x Laufpuffer eingefüllt, der Kamm gezogen und

Luftblasen zwischen den Platten entfernt. Anschließend wurden die Proteinproben mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 96°C denaturiert und zusammen mit einem Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte spannungskonstant bei 200V.

### 4.3.2 Western Blot

Blot-Puffer: 20 mM Tris (pH 8,0); 150 mM Glycin; 20% Methanol

In der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden durch einen Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür wurde das Trenngel der SDS-PAGE nach erfolgter Elektrophorese in Blot-Puffer überführt und 15 Minuten darin geschüttelt. Auch auf Gelgröße zurechtgeschnittenes Whatman-Papier und die Nitrocellulosemembran wurden kurz in Blot-Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte der Aufbau der Blot-Apparatur wie folgt:

#### **Kathodenplatte**

3 x Whatman Papier

Gel

Nitrocellulosemembran

3 x Whatman Papier

#### **Anodenplatte**

Beim Anlegen einer Spannung wandern die Proteine im alkalischen Milieu in Richtung Anode und werden auf der dazwischenliegenden Nitrocellulosemembran immobilisiert. Der Transfer der Proteine erfolgte stromkonstant mit  $1,2 \text{ mA/cm}^2$  für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach dem Transfer wurde die Membran entnommen, mit 1x TBS gespült und sofort für den Antikörpernachweis weiterverwendet.

#### 4.3.2.1 Antikörpernachweis auf der Nitrocellulosemembran

Blockingpuffer: 5% Trockenmilch, 1x TBS; 0,1% Tween-20

10x TBS: 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4)

1x TBS: 100 ml 10x TBS; 900 ml bidest. H<sub>2</sub>O

1x TBS-T: 1x TBS; 0,1% Tween-20

Ziege anti-Human-HRP IgG (H+L); 1:1000

Pferd anti-Maus-HRP IgG (H+L); 1:1000

Um vor der Immundetektion unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran abzusättigen, wurde diese zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockingpuffer inkubiert und danach dreimal kurz und zweimal für 15 Minuten mit 1x TBS-T gewaschen. Da auf der Membran Rezeptor-Proteine immobilisiert wurden, die direkt durch einen HRP-gekoppelten Antikörper nachgewiesen werden können, wurde die Nitrocellulosemembran mit dem entsprechenden Antikörper in Folie eingeschweißt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten in 1x TBS wurde zur Detektion des gebundenen HRP-Antikörpers daraufhin ECL-Lösung 1 und 2 gemischt (1:1) und die Membran mit dem Mix 1 Minute lang inkubiert. Letztlich wurde die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt und auf einem Film, je nach erwünschter Bandenintensität, unterschiedlich lang exponiert.

#### **4.3.2.2 Entwicklung von Filmen**

Der belichtete Film wurde für einige Sekunden bis Minuten in der Entwicklerlösung inkubiert, danach in H<sub>2</sub>O gespült und fixiert. Durch darauffolgendes Spülen in H<sub>2</sub>O wurde die Fixiererlösung wiederum entfernt.

#### **4.3.3 Immunfluoreszenz**

##### **4.3.3.1 Gewebepreparation zur Anfertigung von Kryoschnitten**

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>; mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 Liter auffüllen

1x PBS: 100 ml 1x PBS; 900 ml bidest. H<sub>2</sub>O

4 % PFA: 4 g Paraformaldehyd in 50 ml sterilem H<sub>2</sub>O unter Erwärmen lösen;

2 Tropfen 2 M NaOH; 10 ml 10x PBS; mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen

10%, 20%, 30% Saccharose / PBS

Alle folgenden Behandlungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Embryonen wurden wie unter 4.1.15.1 beschrieben präpariert, für 2 Stunden in 4% PFA/PBS fixiert und zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen durch Saccharoselösungen steigender Konzentration (10%, 20%, 30%) prozessiert bis diese in der 30%igen Saccharoselösung zu Boden gesunken waren. Das Durchdringen der viskosen Lösung soll die Zerstörung der Gewebestrukturen durch Eiskristallbildung verhindern. Vor dem Einbetten in OCT-Gefriermedium wurden die Gewebe in OCT/PBS (1:1) und OCT für je 10 Minuten inkubiert. Schließlich wurden die Embryonen in eine Einbettform gefüllt mit OCT transferiert, auf Trockeneis eingefroren und die Blöcke bei -80°C gelagert oder zur Anfertigung von Kryoschnitten (15 µm) verwendet. Geschnittenes Material wurde mit beschichteten Objektträgern aufgenommen, getrocknet und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

#### **4.3.3.2 Färbeprotokolle**

Fixierlösung: Methanol (100%) / Aceton (100%); (1:1)

Blockinglösung: 5% Serum (Esel/Ziegenerum) / PBS

Primärantikörper: Maus anti-BrdU (1:100)

Kaninchen anti-Active Caspase-3 (1:500)

Kaninchen anti-Tbx5 (1:1000)

Kaninchen anti-WT1 (1:50)

Sekundärantikörper: Esel anti-Maus-Alexa 555 (1:200)

Esel anti-Maus-Fab-FITC (1:50)

Ziege anti-Kaninchen-Alexa 488 (1:200)

Für die Immunhistochemie wurden kultivierte Proepikardexplantate auf Kammerobjektträgern (4.2.1; 4.2.1.1) beziehungsweise Kryoschnitte manipulierter Embryonen (4.3.3.1) verwendet. Die Gewebe wurden jeweils in vorgekühltem Methanol/Aceton für 10 Minuten bei -20°C fixiert, dreimal mit 1x PBS gespült, mit einem Pap Pen umrandet und daraufhin 1 Stunde mit Blockinglösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nach drei Waschschritten in 1x PBS, wurde daraufhin mit dem Sekundärantikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Gewebe wurden wiederum dreimal mit 1x PBS gewaschen, im letzten Schritt mit DAPI/PBS (1:1000) und in Mowiol eingedeckelt. Die behandelten Objektträger wurden im Dunkeln und bei 4°C aufbewahrt.

Soll eine Doppelfärbung mit Primärantikörpern durchgeführt werden, die aus demselben Organismus stammen, erfolgte die Antikörperinkubation in folgender Reihenfolge:

1. Primärantikörper, 1 Stunde bei Raumtemperatur
1. Sekundärantikörper, 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln
2. Primärantikörper, 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln
2. Sekundärantikörper, 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln

Ansonsten wurde wie zuvor beschrieben verfahren.

#### **4.3.3.3 Dokumentation**

Die Dokumentation der Fluoreszenz-gefärbten Gewebe erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) als auch am konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica). Die digitalen Aufnahmen wurden mit der Adobe Photoshop-Software bearbeitet.

## **4.4 Manipulation von Hühnerembryonen**

### **4.4.1 Präparation des Proepikards und des *Sinus venosus***

10x PBS, steril: 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  
mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 Liter auffüllen

1x PBS, steril: 100 ml 1x PBS; 900 ml bidest.  $\text{H}_2\text{O}$

Befruchtete Bruteier wurden bei 38°C und 75% relativer Luftfeuchtigkeit bis zum gewünschten Entwicklungsstadium im Inkubator bebrütet und das Entwicklungsstadium nach Hamburger und Hamilton (1951) bestimmt. Embryonen des HH Stadiums 17 wurden für die Präparation des Proepikards, Embryonen der HH Stadien 13-17 für die Präparation des rechten und linken Sinushorns verwendet. Die Präparation der Embryonen erfolgte aus dem geöffneten Ei, wonach der Embryo direkt an seinen extraembryonalen Membranen ausgeschnitten und in eine, mit sterilem 1x PBS gefüllte, Petrischale transferiert wurde. Nachfolgend wurden mit sterilem Präparierbesteck sämtliche, den Embryo umgebende, Häute, sowie Kopf, Schwanz und Herz entfernt. Hiernach wurden das Proepikard beziehungsweise die Sinushörner mit einem Mikroskalpell explantiert. Dabei war jegliche



Kontamination durch Sinusmyokard beziehungsweise Endoderm zu vermeiden. Fünf bis acht explantierte Proepikardien wurden anschließend entweder zur RNA-Isolation vereinigt (4.1.4) oder in Kultur genommen (4.2.1). Zur Isolation von Sinus-RNA für die *Microarray*-Analyse (Kollaboration mit H.P. Buermans und P.A. 't Hoen, Universität Leiden) wurden jeweils 100 rechte und linke Sinushörner des HH Stadium 13-14 präpariert und gepoolt.

#### 4.4.2 Kultivierung von Embryonen

##### 4.4.2.1 Herstellung von Kulturplatten

Saline: 7,19 g NaCl / 1 Liter bidest. H<sub>2</sub>O

100 U/ml Penicillin / 100 mg/ml Streptomycin

Die Herstellung von Kulturplatten für die *ex ovo*-Kultur von Embryonen basiert auf dem Protokoll von D.K. Darnell und G.C. Schoenwolf (Darnell und Schoenwolf, 2000). Hiernach wurden Albumin, Bacto-Agar und eine physiologische Salzlösung (Saline) zur Herstellung der Platten verwendet. Jedoch wurden für die Manipulation der Hühnerembryonen harte und für die Kultivierung weiche Albumin-Agar-Platten verwendet.

<u>30 Albumin-Agar-Platten:</u>	HART	WEICH
Bacto-Agar	0,27 g	0,09 g
Saline	45 ml	45 ml
Albumin	45 ml	45 ml

Dünnflüssiges Albumin wurde aus Hühnereiern mittels Kanüle und Spritze in 50 ml Falcons überführt und im Wasserbad bei 49°C inkubiert. Der Bacto-Agar wurde zusammen mit der Saline in der Mikrowelle aufgeköcht und im Wasserbad bei 49°C äquilibriert. Anschließend wurden Albumin und Bacto-Agar-Lösung vereinigt, mit Pen/Strep (1:100) versetzt und in Kulturschalen (Ø 3,5 cm) pipettiert. Nachdem sich das Nährsubstrat verfestigt hatte, wurden die Platten für die Embryokultur verwendet.

##### 4.4.2.2 Embryokultur

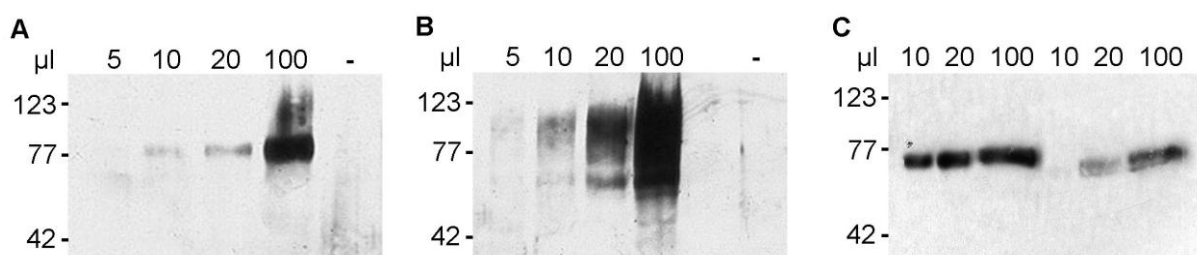
Die im Folgenden beschriebene Methode wurde adaptiert nach dem Protokoll von S.C. Chapman (Chapman et al., 2001). Hierbei wurde ein Filterpapierring auf einen Embryo aufgelegt, der daraufhin aus der Vitellinmembran geschnitten werden kann. Anschließend

wurde der Embryo dorsal oder ventral auf eine Albumin-Agar-Platte aufgebracht, die nun das Nährsubstrat des Embryos darstellte. Die Embryonen verschiedener Alter wurden für die Implantation von Zellaggregaten beziehungsweise Protein- oder Inhibitor- beladenen Trägerperlen zunächst dorsal auf eine harte Albumin-Agar-Platte gelegt. Nach erfolgter Manipulation wurden die Embryonen mit der ventralen Seite auf eine weiche Albumin-Agar-Platte aufgebracht, um die natürlichen Wachstumsbedingungen besser nachahmen zu können und damit die Überlebensdauer der Embryonen zu verlängern.

#### 4.4.3 Implantation von Zellaggregaten

Embryonen des gewünschten HH Stadiums wurden wie zuvor beschrieben in Kultur genommen. Für die Implantation von proteinproduzierenden Zellaggregaten medial, lateral oder direkt in das Herzfeld von Hühnerembryonen des HH Stadium 4, wurde an entsprechender Position das Endoderm und Mesoderm des Embryos mit einer Wolframnadel eingeritzt. Zur Implantation von Zellaggregaten in das rechte Sinushorn von Embryonen der HH Stadien 12, wurde mit Hilfe der Wolframnadel der Ansatz des Sinushorns eröffnet. Mit Hilfe einer Mikroliterpipette und einer Präpariernadel wurde daraufhin ein Zellaggregat in die jeweilige Öffnung eingebracht. Der überschüssige Flüssigkeitsfilm wurde mittels Mikroliterpipette vorsichtig entfernt und der Embryo anschließend für den gewünschten Zeitraum bei 38°C und 75% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Implantation wurden mit RCAS-BP(A)-Konstrukten transfizierte Zellen verwendet, die Wachtel Fgfr1-Fc, Wachtel Fgfr4-Fc, Maus Fgfr1-Fc oder Maus Fgfr2-Fc sezernieren. Als Kontrollimplantate dienten Alkalische Phosphatase-produzierende Zellaggregate.

Die Expression der FGF-Ligandenbindungsdomänen in den transfizierten Zellen wurde mittels Western Blot (4.3.2) direkt über den Fc-Terminus der chimärischen Proteine nachgewiesen (Abb.10).



**Abb.10 - Nachweis der exprimierten RCAS-Konstrukte**

(A) Wachtel Fgfr1-Fc, (B) Wachtel Fgfr4-Fc, (C) Maus Fgfr1-Fc und Maus Fgfr2-Fc werden in DF1-Zellen exprimiert.

#### 4.4.4 Implantation von Protein- oder Inhibitor-beladenen Trägerperlen

Die Implantation von beladenen Depotperlen erfolgte wie in 4.4.3 beschrieben. Als Trägermaterial für wasserlösliche Proteine wie FGF basic und FGF8-b wurden Heparinperlen (Sigma) verwendet. Vor ihrem Gebrauch wurden diese zweimal mit 1x PBS gewaschen und darauf für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit der entsprechenden Proteinlösung inkubiert (FGF basic und FGF8-b; 100 ng/ $\mu$ l). Für den FGF-Rezeptor1-Inhibitor SU5402 fanden Ionenaustauscherperlen (AG 1-X2, Bio-Rad) Verwendung. Nach zweimaligem Waschen in DMSO wurden diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer 2 mM SU5402-Lösung inkubiert und danach einmal in 1x PBS gewaschen. Als Kontrollen dienten Heparinperlen, die in 0,2%igen BSA/PBS inkubiert wurden, beziehungsweise mit DMSO behandelte Ionenaustauscherperlen.

#### 4.4.5 EdU-Markierung von Zellen in manipulierten Embryonen

10x PBS: 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ;

2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 Liter auffüllen

1x PBS: 100 ml 1x PBS; 900 ml bidest.  $\text{H}_2\text{O}$

4 % PFA: 4 g Paraformaldehyd in 50 ml sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  unter Erwärmen lösen;

2 Tropfen 2 M NaOH; 10 ml 10x PBS; mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml auffüllen

10 mM EdU/PBS (5mg/ 2ml)

10% BSA/PBS

1% Triton/PBS

Zur Detektion proliferierender Zellen in manipulierten Embryonen wurde das Click-iT™ EdU Imaging Kit (Invitrogen) verwendet. EdU (5-ethynyl-2'-desoxyuridin) ist chemikalisch eng verwandt mit dem Thymidin-Analogon BrdU (4.2.1.1) und dessen Detektion erfolgt über eine Kupfer-katalysierte Reaktion mit einem kleinen Fluoreszenz-gekoppelten Azid. Auf manipulierte Embryonen wurden dazu 6 Stunden vor Kulturende 400  $\mu$ l einer wässrigen 1 mM EdU-Lösung aufgebracht. Nach Beendigung der Kultur durch Präparation der Embryonen, wurden selbige über Nacht in 4% PFA/PBS fixiert und anschließend für die Anfertigung von Kryoschnitten (4.3.3.1) in OCT-Gefriermedium eingebettet. Die Schnitte wurden zunächst nochmals für 15 Minuten in 4% PFA/PBS fixiert und anschließend zur Permeabilisierung der Gewebe 2x 3 Minuten in 3% BSA/PBS, 1x 20 Minuten in 0,5% Triton

X-100/PBS und wiederum 2x 3 Minuten in 3% BSA/PBS gewaschen. In jedem dieser Waschschrirte wurden 300  $\mu$ l L6sung pro Objekttr6ger verwendet und wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Hybridisierung der Gewebe mit dem Click-iT<sup>TM</sup>-Reaktionsgemisch (Puffer, CuSO<sub>4</sub>, Alexa Fluor 488, Puffer-Additive; siehe Protokoll des Herstellers) erfolgte f6ur 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Hiernach wurden die Schnitte 3 Minuten in 3% BSA/PBS, 3 Minuten in 1x PBS und 1 Minute in DAPI/PBS (1:1000) gewaschen und in Mowiol eingedeckelt. Die behandelten Objekttr6ger wurden bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop im Dunkeln und bei 4°C aufbewahrt.

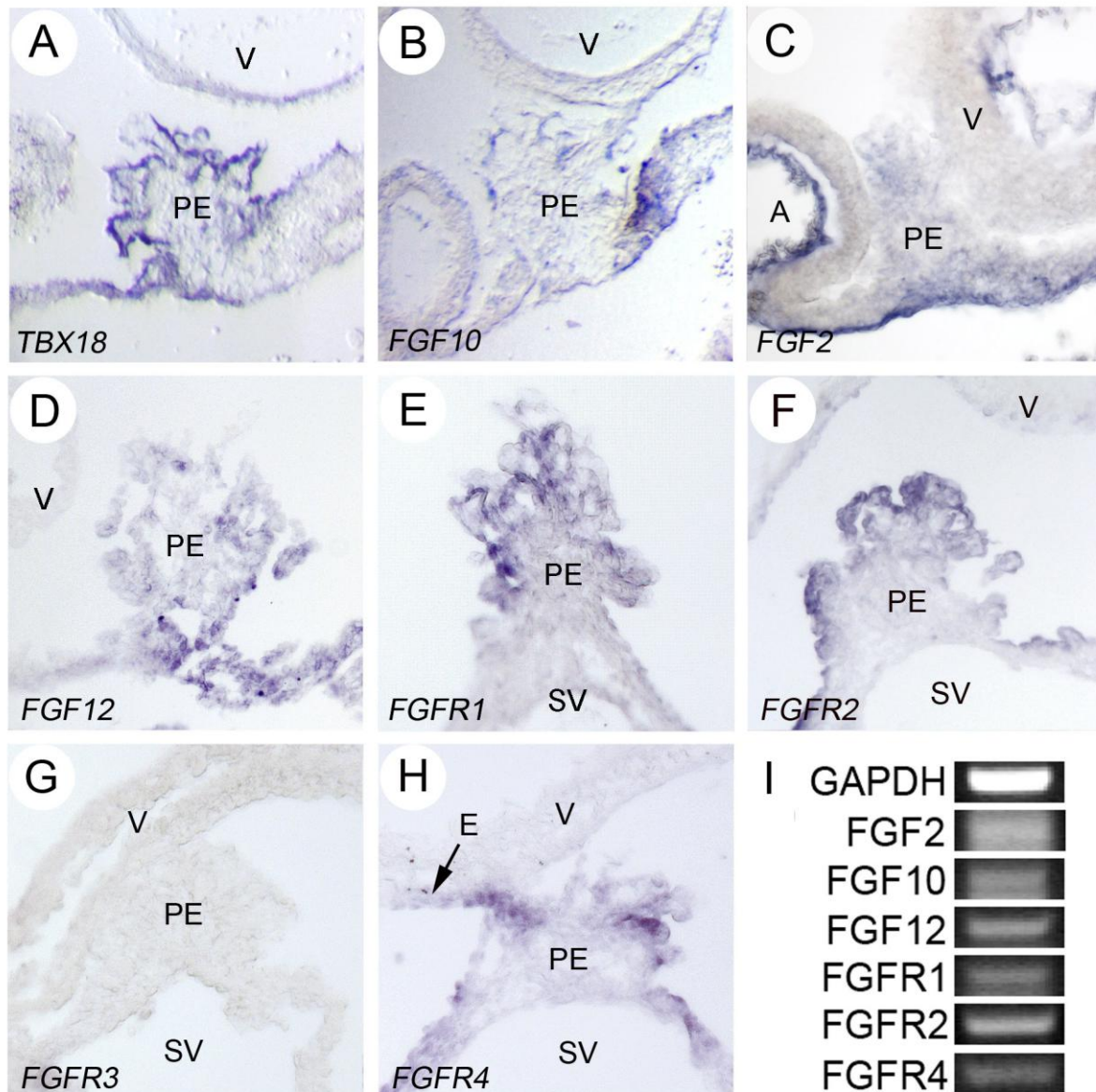
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Die Rolle von FGF in der Proepikardentwicklung

#### 5.1.1 FGF-Liganden und FGF-Rezeptoren werden im Proepikard exprimiert

FGF-Signale spielen eine bedeutende Rolle in der frühen Kardiogenese, da sie unter anderem in die Induktion kardialen Mesoderms involviert sind und die Expression kardialer Marker wie *Nkx2.5* kontrollieren (Lough et al., 1996; Barron et al., 2000; Alsan und Schultheiss, 2002). Jedoch auch für die spätere Herzmorphogenese sind diese Wachstumsfaktoren essentiell. Um die Bedeutung von FGF-Signalen für das Proepikard zu analysieren, wurde die Expression verschiedener FGF-Liganden (*FGF2*, 3, 4, 8, 10, 12, 13, 16, 18, 19) und FGF-Rezeptoren (*FGFR1*, 2, 3, 4) während der Proepikardentwicklung untersucht. Unter Verwendung der „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung und der Hybridisierung auf histologischen Schnittpräparaten wurde die Expression von *FGF2*, *FGF10* und *FGF12*, einem FHF und Mitglied der iFGF-Subfamilie, im Proepikard detektiert (Abb.11B-D). Die *FGF*-Expression ist am stärksten in den epithelialen Zellen des Proepikards zu finden und ähnelt somit dem Expressionsmuster des etablierten Proepikardmarkers *TBX18* (Abb.11A). Zudem ist eine Expression der FGF-Liganden an der Basis der PE-Anlage und im Myokard des Sinushorns zu beobachten (Abb.11B-D). Im distalen Teil des Einflusstraktmyokards wurde außerdem die Expression von *FGF8* beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die FGF-Rezeptoren *FGFR1*, *FGFR2* und *FGFR4* werden im Proepikard exprimiert (Abb.11E, F, H), wogegen in den untersuchten Geweben keine Expression von *FGFR3* detektiert werden konnte (Abb.11G). Ähnlich zu den FGF-Liganden sind auch die FGF-Rezeptoren überwiegend in den Epithelzellen des Proepikards exprimiert, wonach die Expression im Epikard persistiert (Abb.11H). Eine zu *TBX18* vergleichbare Expression der FGF-Liganden und -Rezeptoren im venösen Pol zum Zeitpunkt der Proepikardinduktion im HH Stadium 13-14 (Schlueter et al., 2006) konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In einer von uns durchgeführten Transkriptomanalyse (5.3.1) konnte in Übereinstimmung mit diesen Daten nur eine schwache differentielle Expression von *FGFR1* im rechten Sinushorn des HH Stadium 13-14 detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Verifizierung der *in situ*-Daten, wurde die mRNA von PE-Explantaten isoliert und die Expression der FGF-Liganden und Rezeptoren durch RT-PCR analysiert (Abb.11I).



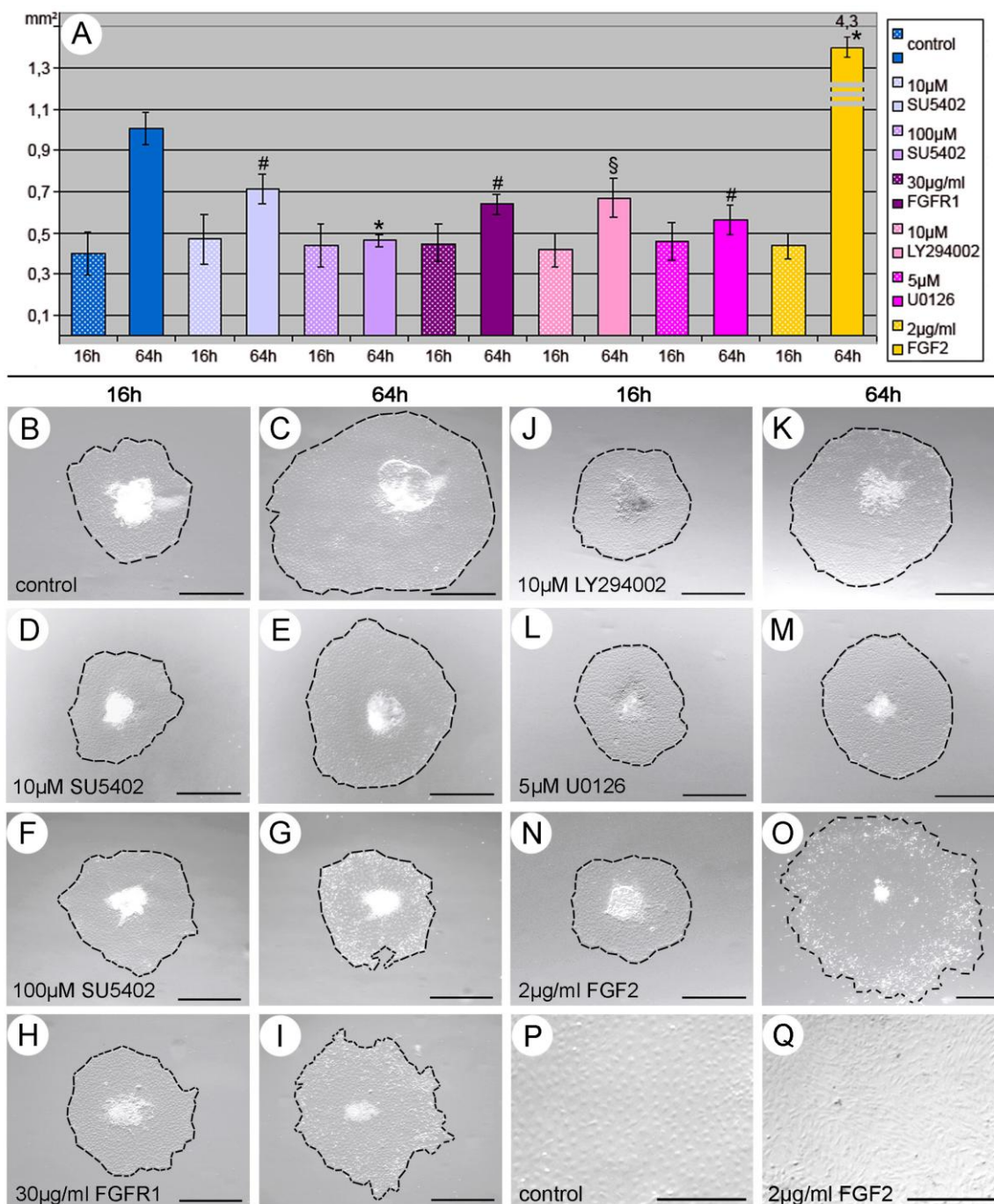
**Abb.11 - Die Expression von FGF-Liganden und -Rezeptoren im Proepikard**

Nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung (A-D) sagittaler oder (E-H) transversaler Schnitte der Einflusstraktregion von Hühnerembryonen des HH Stadiums 17/18. (B) *FGF10*, (C) *FGF2* und (D) *FGF12* werden wie (A) *TBX18* vornehmlich in epithelialen Zellen des Proepikards exprimiert. (E) *FGFR1*, (F) *FGFR2* und (H) *FGFR4* werden im Gegensatz zu (G) *FGFR3* in den proepikardialen Zellen detektiert. (I) RT-PCR-Analyse von mRNA aus PE-Explantaten. Nachweis der Gene *FGF2*, *FGF10*, *FGF12*, *FGFR1*, *FGFR2* und *FGFR4* und als Kontrolle *GAPDH*. A-Atrium; V-Ventrikel; PE-Proepikard; SV-Sinus venosus; E-Epikard

### 5.1.2 Das Wachstum proepikardialer Zellen *in vitro* ist abhängig von FGF-Signalen

Um die potentielle Rolle von FGF während der Proepikardentwicklung zu studieren, wurde mit Hilfe eines *in vitro*-Primärkultursystem der Effekt der Inhibition oder Stimulation auf das

Wachstum proepikardialer Zellen untersucht. Hierfür wurden Proepikardien aus Hühnerembryonen des HH Stadium 17 explantiert und in serumfreiem Medium kultiviert. Nach 16 Stunden wurden Explantate, die auf der Kulturschale angewachsen waren, mit FGF-Inhibitoren oder Wachstumsfaktoren konditioniert und photographisch dokumentiert. Nach 64 Stunden Kultur wurden die Explantate nochmals photographiert und beide Bilddatensätze anschließend zur Bestimmung des Flächenwachstums verwendet. Während der Kulturdauer von insgesamt 48 Stunden vergrößert sich der Durchmesser der PE-Explantate unter Kontrollbedingungen um durchschnittlich 250% (Abb.12A-C). Die Zugabe verschiedener Konzentrationen des FGFR-Inhibitors SU5402 zum Kulturmedium resultierte in einer konzentrationsabhängigen Inhibition des Flächenwachstums (Abb.12A, D-G). Bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M SU5402 war das Wachstum der proepikardialen Explantate komplett blockiert. Ein ähnlicher Effekt wurde in PE-Explantaten beobachtet, die mit der Liganden-Bindungsdomäne des FGFR1-Proteins behandelt wurden (Abb.12A, H, I). Zwei gut verstandene Signalwege, die nach FGF-Rezeptoraktivierung angeschaltet werden, sind der Ras/MAPK- und PI-3-Kinase-Signalweg (Eswarakumar et al., 2005). Um zu überprüfen, ob einer der beiden Signalwege das zelluläre Wachstum der kultivierten PE-Explantate kontrolliert, wurden die spezifischen Inhibitoren von MEK1/2 (U0126) und PI3-Kinase (LY294002) verwendet. Beide Inhibitoren inhibieren das Größenwachstum der PE-Explantate, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Während U0126 das Wachstum der Explantate stark beeinträchtigt und sein Effekt mit dem von 100  $\mu$ M SU5402 zu vergleichen ist (Abb.12A, L, M), gleicht der wachstumsinhibierende Effekt von LY294002 eher dem von 10  $\mu$ M SU5402 (Abb.12A, J, K). Somit werden sehr wahrscheinlich beide Signalwege aktiviert, das Wachstum scheint aber vorrangig vom Ras/MAPK-Signalweg kontrolliert zu werden. In Kultur wurde außerdem der Effekt von FGF2 auf PE-Zellen analysiert. Im Vergleich zu den serumfreien Kulturbedingungen hat die Zugabe von FGF2 eine dramatische Zunahme des Flächenwachstums der Explantate zur Folge. Im Durchschnitt sind die FGF-behandelten Explantate 10x größer als in serumfreiem Medium kultivierte Explantate (Abb.12A, N, O). Überdies induziert FGF2 eine EMT in proepikardialen Zellen (Abb.12Q). Dieser Effekt wurde bereits in Epikardexplantaten nach Behandlung mit Serum oder PDGF beobachtet (Lu et al., 2001). Zusammenfassend kann man also feststellen, dass die Modulierung von FGF-Signalen in proepikardialen Explantatkulturen die bedeutende Rolle von FGF als Regulator des Proepikardwachstums demonstriert.



**Abb.12 - Die Modulation von FGF-Signalen in PE-Explantaten zeigt die bedeutende Rolle dieser für das Wachstum proepikardialer Zellen *in vitro***

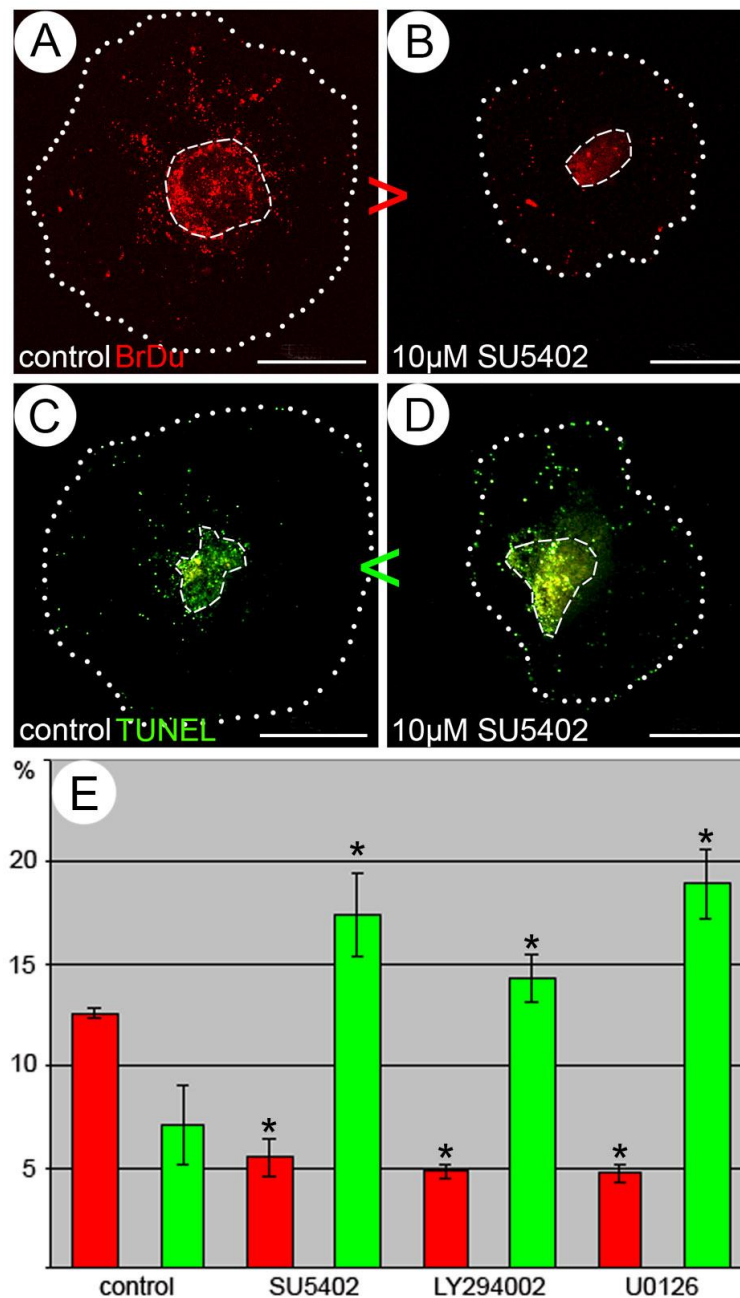
(A) Quantifizierung des Flächenwachstums von PE-Explantaten nach 16 und 64 Stunden Kultur mit DMSO (blau), 10 µM SU5402 (helllila), 100 µM SU5402 (dunkellila), 30 µg/ml FGFR1-Protein (fuchsia), 10 µM LY294002 (hellrosa), 5 µM U0126 (dunkelrosa) oder 2 µg/ml FGF2-Protein (gelb). Durch die Inhibition von FGF-Signalen nimmt das Flächenwachstum der Explantate bis zu 50% ab. (B-O) Bereits vor Quantifizierung der Wuchsfäche sind optisch Größenunterschiede zwischen Kontrollen und mit FGF-Inhibitoren bzw. FGF konditionierten Explantaten zu erkennen. Die gestrichelten Linien zeigen die Explantatgrenzen an. (P) In Medium ohne Serum hat die ausgewachsene Zellschicht von PE-Explantaten einen epithelialen Charakter, (Q) im Gegensatz zur Kultur mit FGF, wodurch PE-Zellen zu Mesenchym transformieren. \* $P \leq 0.0001$ ; # $P \leq 0.001$ ;  $\xi \leq 0.05$ ; Größenmaßstab in (B-O) 500µm, in (P-Q) 250 µm



### **5.1.3 Der Verlust von FGF-Signalen führt zur reduzierten Proliferation und Induktion von Apoptose in proepikardialen Zellen *in vitro***

Die Reduktion des Wachstums von PE-Explantaten nach FGF-Inhibition könnte einerseits durch den Verlust von Proliferation oder durch die Induktion von Apoptose in den proepikardialen Zellen induziert werden. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Explantate in serumfreiem Medium mit DMSO (Kontrolle), 10  $\mu$ M SU5402, 10  $\mu$ M LY294002 oder 5  $\mu$ M U0126 64 Stunden lang kultiviert und danach inkorporiertes BrdU beziehungsweise apoptotische Zellen durch die TUNEL-Methode nachgewiesen. Die Ermittlung relativer Prozentzahlen zur Quantifizierung BrdU- und TUNEL-positiver Zellen erfolgte nach Bestimmung der Gesamtzellzahlen in den analysierten Explantaten (Abb.13E; Tabelle 3).

Während unter Kontrollbedingungen in einer großen Anzahl von Zellen BrdU-Inkorporation zu detektieren ist (n=5; Abb.13A, E), ist die Zahl proliferativer Zellen in PE-Explantaten unter dem Einfluss von SU5402 deutlich reduziert (n=5; Abb.13B, E). Weiterhin ist, im Vergleich zu den Kontrollen, in SU5402 behandelten Explantaten ein drastischer Anstieg apoptotischer Zellen zu verzeichnen (n=5; Abb.13C-E). Demnach wird die Reduktion des Wachstums von PE-Explantaten nach FGF-Inhibition wahrscheinlich zu einem großen Teil durch den Verlust von Zellproliferation und einer erhöhten Apoptoserate verursacht. Dieser Umstand wird auch aus der Abnahme der Gesamtzellzahl in den Explantaten ersichtlich (Tabelle 3). In diesem Zusammenhang wurden auch die Effekte von U0126 und LY294002 quantifiziert. Beide Inhibitoren beeinflussen die Proliferation von proepikardialen Zellen negativ und führen darüberhinaus zu einer erhöhten Apoptoserate, woraus geschlossen werden kann, dass sowohl der Ras/MAPK- als auch der PI3-Kinase-Signalweg in die Kontrolle von Proliferation und der Vermittlung von Überlebenssignalen involviert ist (Abb.13E). Die erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in den Kontrollexplantaten nach 3 Tagen Kultur ist auf die limitierte Kulturzeit in serumfreiem Medium und die Adaption der PE-Zellen an die zweidimensionalen Kulturbedingungen zurückzuführen. Dennoch ist die Anzahl TUNEL-positiver Zellen in diesen Explantaten deutlich geringer als in Explantaten nach FGF-Inhibition.



**Abb. 13 - Reduktion der Zellproliferation und Induktion von Apoptose in PE-Explantaten nach der Inhibition von FGF-Signalen**

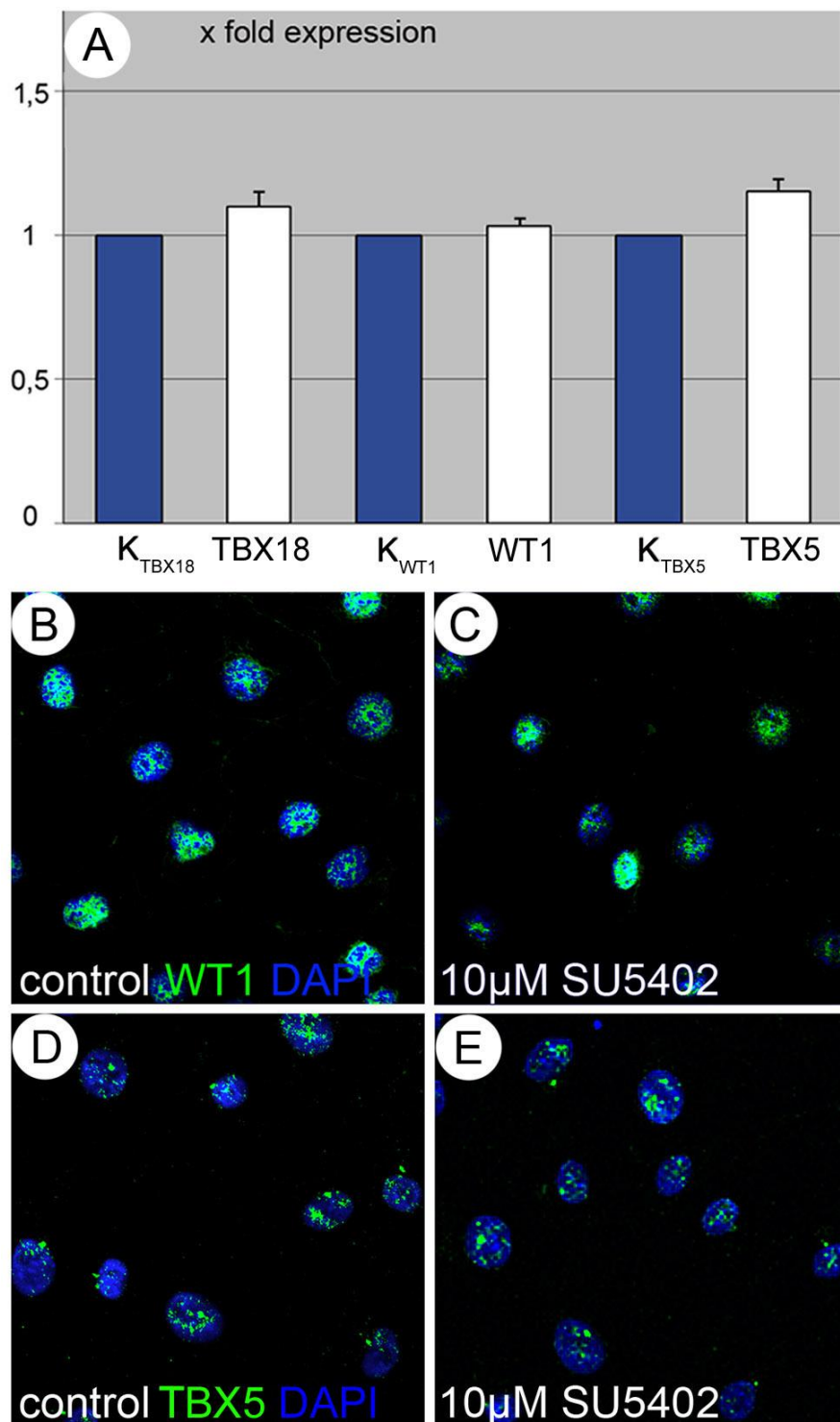
(A, B) Die Immunfluoreszenz BrdU-positiver Zellen zeigt eine Abnahme proliferierender Zellen in Explantaten unter dem Einfluss von SU5402. (C, D) Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen dagegen nimmt zu. Gepunktete Linien in (A-D) markieren die Explantatgrenze und gestrichelte Linien die mesenchymale Kernregion des Explantats, die aufgrund der hohen Zelldichte nicht in die Quantifizierung von Gesamtzellzahl, BrdU-inkorporierter Zellen und Apoptose einbezogen wurde. (E) Quantifizierung der BrdU-inkorporierten Zellen (rote Säulen) und TUNEL-markierten Zellen (grüne Säulen) in Kontrollen und SU5402, LY294002, U0126 behandelten PE-Explantaten. Die Daten sind in Prozenten der markierten Zellen relativ zur Gesamtzellzahl (Tabelle 3) angegeben. \* $P=0.0001$  im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle; Größenmaßstab in (A-D) 500  $\mu\text{m}$

Ø	Kontrolle	SU5402	LY294002	U0126
Gesamtzellzahl	1393	938 (67%)	1130 (81%)	830 (60%)
BrdU pos.	175	51 (29%)	54 (31%)	39 (22%)
TUNEL pos.	98	164 (167%)	162 (165%)	149 (152%)

**Tabelle 3 - Zellzahlen in PE-Explantaten nach 3 Tagen Kultur mit oder ohne Inhibitoren**

#### **5.1.4 Die Expression proepikardialer Marker wird nicht durch FGF reguliert**

FGF-Signale könnten in der Kontrolle proepikardialer Genexpression involviert sein. Um dieser Frage nachzugehen, wurde in konditionierten PE-Explantaten die Expression der drei Markergene *TBX18*, *WT1* und *TBX5* analysiert, die in der Entstehung und Wachstumskontrolle des Proepikards eine Rolle spielen (Hatcher et al., 2004; Schlueter et al., 2006). Die unter Kontrollbedingungen oder unter dem Einfluss von SU5402 kultivierten Explantate wurden nach 64 Stunden geerntet und die mRNA durch quantitative *real time* PCR analysiert oder für die Immunofluoreszenz verwendet. Die PCR-Daten zeigen, dass im Vergleich zur Kontrolle in mit SU5402 behandelten Proepikardien die Expression der Markergene unverändert ist (Abb.14A). Auch die Expressionsstärke oder nukleäre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren *TBX18* und *WT1* ist im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Abb.14B-E). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass im Gegensatz zu BMP (Hatcher et al., 2004; Schlueter et al., 2006) FGF nicht für die PE-spezifische Genexpression notwendig ist.

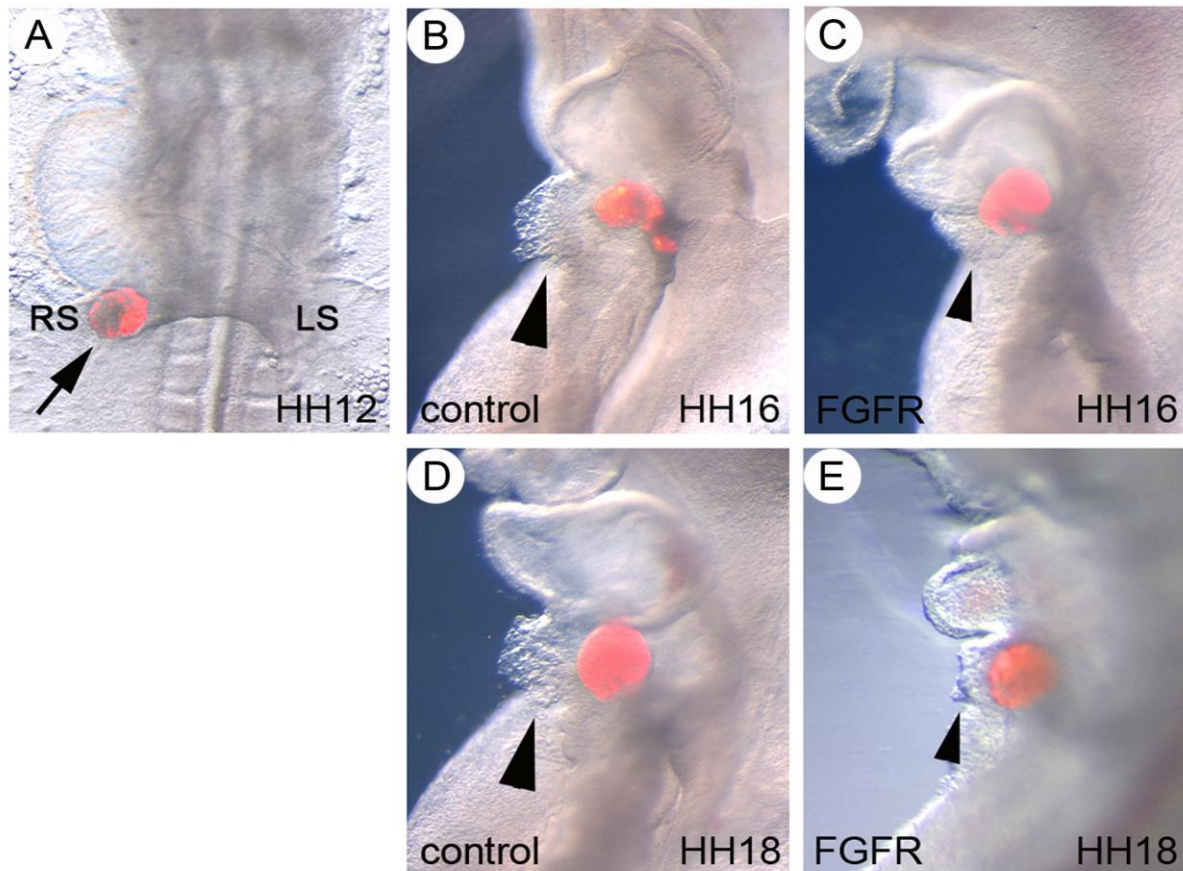


**Abb.14 - FGF-Signale haben keinen Einfluss auf die PE-Marker-Expression in Explantatkulturen**

(A) Die qPCR-Expression von *TBX18*, *WT1* und *TBX5* in PE-Zellen, kultiviert unter dem Einfluss von 10  $\mu$ M SU5402 (weiße Säulen) zeigt keine Veränderungen im Vergleich zur Expression in den jeweiligen Kontrollen (blaue Säulen). (B-E) Die nukleäre Proteinexpression von WT1 und TBX5 ist ebenfalls unverändert.

### 5.1.5 FGF-Signale modulieren den PE-Phänotyp *in vivo*

Der *in vitro*-Effekt der Inhibition von FGF-Signalen auf das Wachstum proepikardialer Zellen sollte ebenfalls im Embryo analysiert werden. Dazu wurden DF1-Zellen mit RCAS-Viren kointransfiziert, die Ligandenbindungsdomänen von FGFR1, FGFR2 und FGFR4 (FGFR-Zellen) oder zu Kontrollzwecken alkalische Phosphatase (AP) exprimieren. Aggregate dieser Zellen wurden in das rechte Sinushorn von Hühnerembryonen des HH Stadium 12 implantiert (Abb.15A) und die Embryonen bis zum HH Stadium 16 (Abb.15B, C) oder 18 (Abb.15D, E) kultiviert. Es wurden dadurch alle FGF-Rezeptoren kompetiert, die im präkardialen Mesoderm der Sinusregion exprimiert werden (Lunn et al., 2006). Um zu demonstrieren, dass die Zellaggregate am Ort der Implantation verbleiben, um dort gezielt die FGF-Ligandenbindungsdomänen zu sezernieren, wurden die Zellaggregate in diesem Versuch mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI markiert. Während die Mehrheit der Kontrollen eine normale Proepikardentwicklung zeigte (Abb.15B, D; HH16, 9/11; HH18, 9/10), wurde die Ausbildung der blumenkohlförmigen Struktur des Proepikards durch die Inhibition der FGF-Signale unterbunden (Abb.15C, E; HH16, 7/9; HH18, 7/10). Darüber hinaus wurden FGF2-Trägerperlen in das linke Sinushorn implantiert, um einen stimulierenden Effekt auf die linksseitige Proepikardanlage zu erzielen. Es konnte hierdurch jedoch keine Vergrößerung der Proepikardstruktur auf der linken Seite induziert werden (Daten nicht gezeigt).



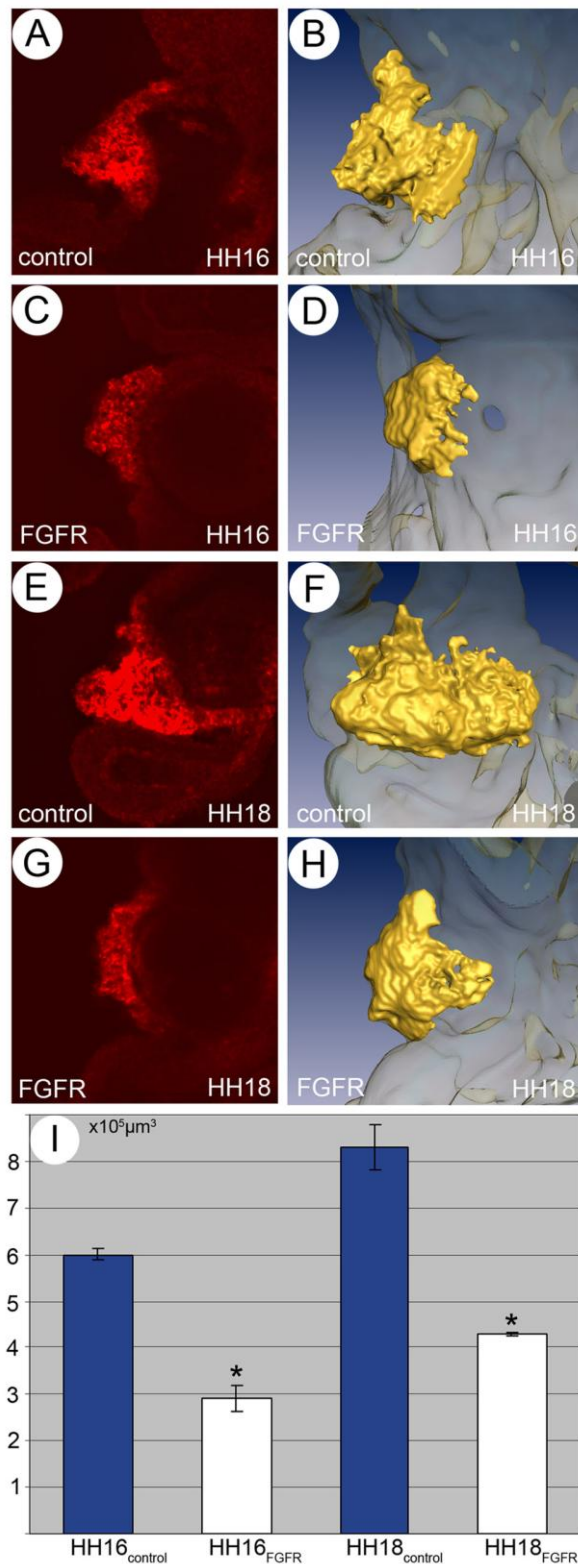
**Abb.14 - Die Implantation von FGFR-Zellen führt zum Verlust der villösen Proepikardstruktur**

(A) Ventrale Ansicht der Herzregion eines Embryos im HH Stadium 12 mit implantierten Zellaggregat im rechten Sinushorn (Pfeil). (B, D) Normale Entwicklung des Proepikards in Kontrollembryonen. (C, E) Retardierte Entwicklung des Proepikards in FGFR-implantierten Embryonen. Pfeilköpfe zeigen auf das Proepikard. DiI-Fluoreszenz (rot) zur Visualisierung des Zellimplantates im Embryo. RS-rechtes Sinushorn; LS-linkes Sinushorn

Um neben der strukturellen Veränderung auch das reduzierte Volumen der Proepikardien in FGFR-implantierten Embryonen darzustellen, wurden die implantierten Embryonen einer Fluoreszenz „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung zur Detektion der proepikardialen *TBX18*-Expression unterzogen. Die Färbung wurde anschließend mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop visualisiert und 3D rekonstruiert. Mit Hilfe dieser 3D-Struktur konnte das Volumen der Proepikardien bestimmt werden.

In den untersuchten Kontroll-Embryonen des HH Stadium 16 entspricht die proepikardiale *TBX18*-Expressionsdomäne durchschnittlich einem Volumen von  $6 \times 10^5 \mu\text{m}^3$  (n=3; Abb.16A, B, I). Dieses wächst bis zum HH Stadium 18 auf circa  $8.3 \times 10^5 \mu\text{m}^3$  an (n=3; Abb.16E, F, I). Die Implantation von FGFR-Zellen dagegen hat eine starke Retardierung des PE-Wachstums

zur Folge. Im HH Stadium 16 ist das Volumen der Proepikardien hier mit durchschnittlich  $2.9 \times 10^5 \mu\text{m}^3$  um circa 50% kleiner als in einem Kontroll-implantierten Embryo (n=3; Abb.16C, D, E). Bis zum HH Stadium 18 gewinnt die Proepikardstruktur in FGFR-implantierten Embryonen auch etwas an Volumen, ist jedoch mit durchschnittlich  $4.2 \times 10^5 \mu\text{m}^3$  immer noch circa 50% kleiner als in Kontrollembryonen im vergleichbaren Alter (n=3; Abb.16G, H, I). Weiterhin ist in den 3D-Rekonstruktionen deutlich die abgeflachte PE-Struktur der FGFR-implantierten Embryonen im Vergleich zum zottenartigen Phänotyp in den Kontrollen zu erkennen. Signifikant ist überdies, dass trotz des starken Volumen- und Strukturverlustes, die verbleibenden Proepikardzellen immer noch *TBX18*-Expression zeigen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die proepikardiale Zellidentität nicht durch FGF-Signale kontrolliert wird.



**Abb.16 - Die Inhibition von FGF-Signalen reduziert das Proepikardwachstum**

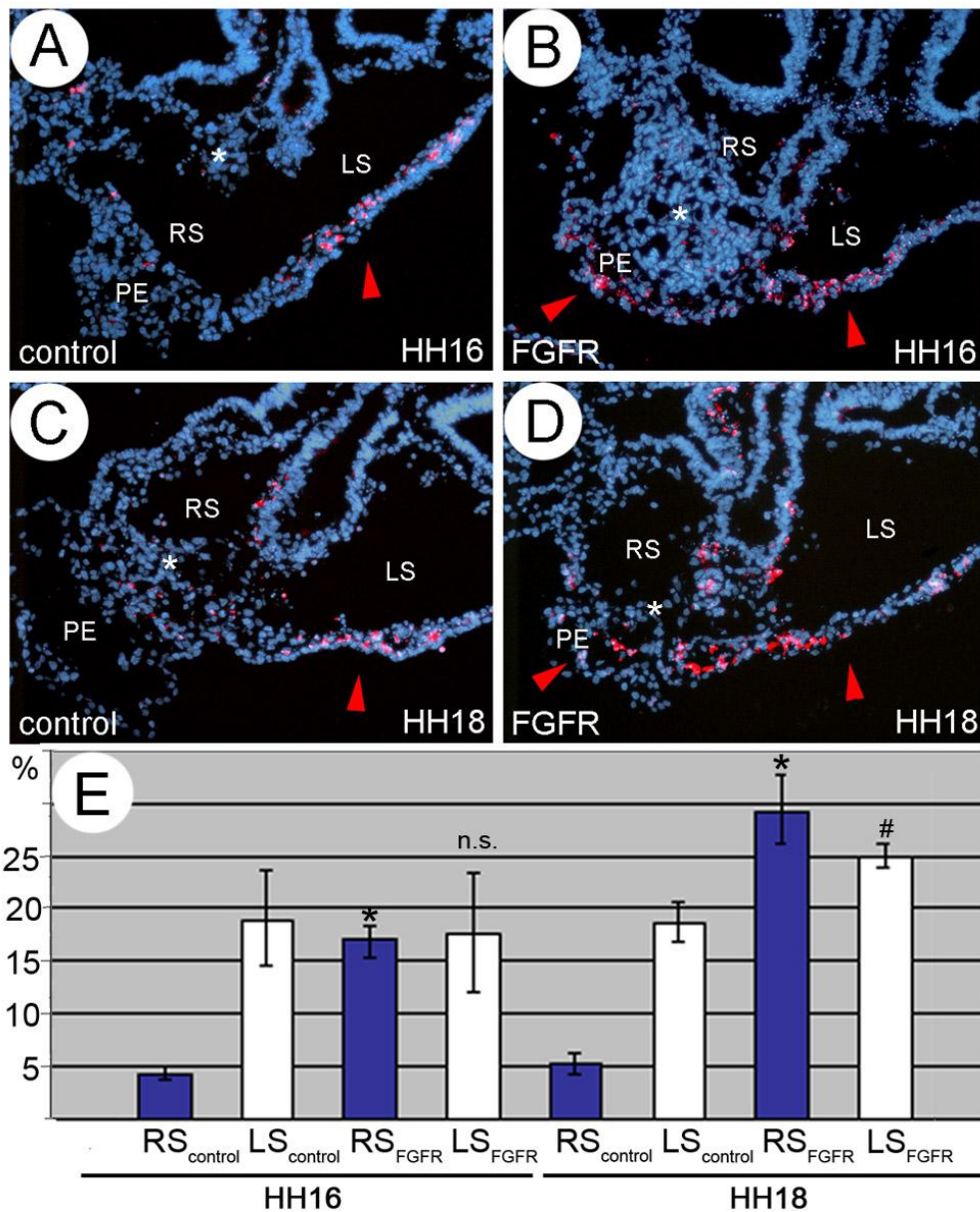
(A, C, E, G) Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung der *TBX18*-Expression auf sagittalen Schnitten durch das Proepikard zeigt wie (B, D, F, H) die 3D-Rekonstruktion der *TBX18*-Domäne auf der rechten Seite der Einflussbahn das reduzierte Wachstum des Proepikards in FGFR-implantierten Embryonen im Gegensatz zu den Kontrollen. (I) Volumina der 3D-rekonstruierten Proepikardien der Kontrollen (weiße Säulen) im Vergleich zu FGFR-implantierter Embryonen (blaue Säulen). \*P=0.0001 in Bezug auf die Kontrolle



### **5.1.6 Die Inhibition von FGF führt zur Apoptose und dem Verlust der Proliferation von PE-Zellen *in vivo***

Die beobachteten Veränderungen von Struktur und Volumen des Proepikards in FGFR-implantierten Embryonen als auch die *in vitro*-Befunde ließen vermuten, dass die Inhibition von FGF-Signalen *in vivo* zum Verlust proepikardialer Zellen durch die Induktion von Apoptose führt. Um dies zu analysieren, wurde auf histologischen Schnitten von manipulierten Embryonen durch einen Antikörpernachweis aktive Caspase 3 detektiert.

Wie zu erwarten war, weisen das rechte Sinushorn und Proepikard in den Kontroll-Embryonen im HH Stadium 16 und 18 nur wenige apoptotische Zellen auf (n=3; Abb.17A, C, E). Im Gegensatz dazu sind im linken Sinushorn viele apoptotische Zellen zu beobachten (n=3; Abb.17A, C, E). In den FGFR-implantierten Embryonen sind im HH Stadium 16 und 18 nicht nur im linken Sinushorn viele Zellen Caspase 3-positiv und somit apoptotisch, sondern auch eine signifikante Anzahl von Zellen im rechten Sinushorn und im Proepikard selbst (n=3; Abb.17, B, D, E). Im HH Stadium 18 ist in FGFR-implantierten Embryonen zudem im linken Sinushorn eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nachzuweisen.

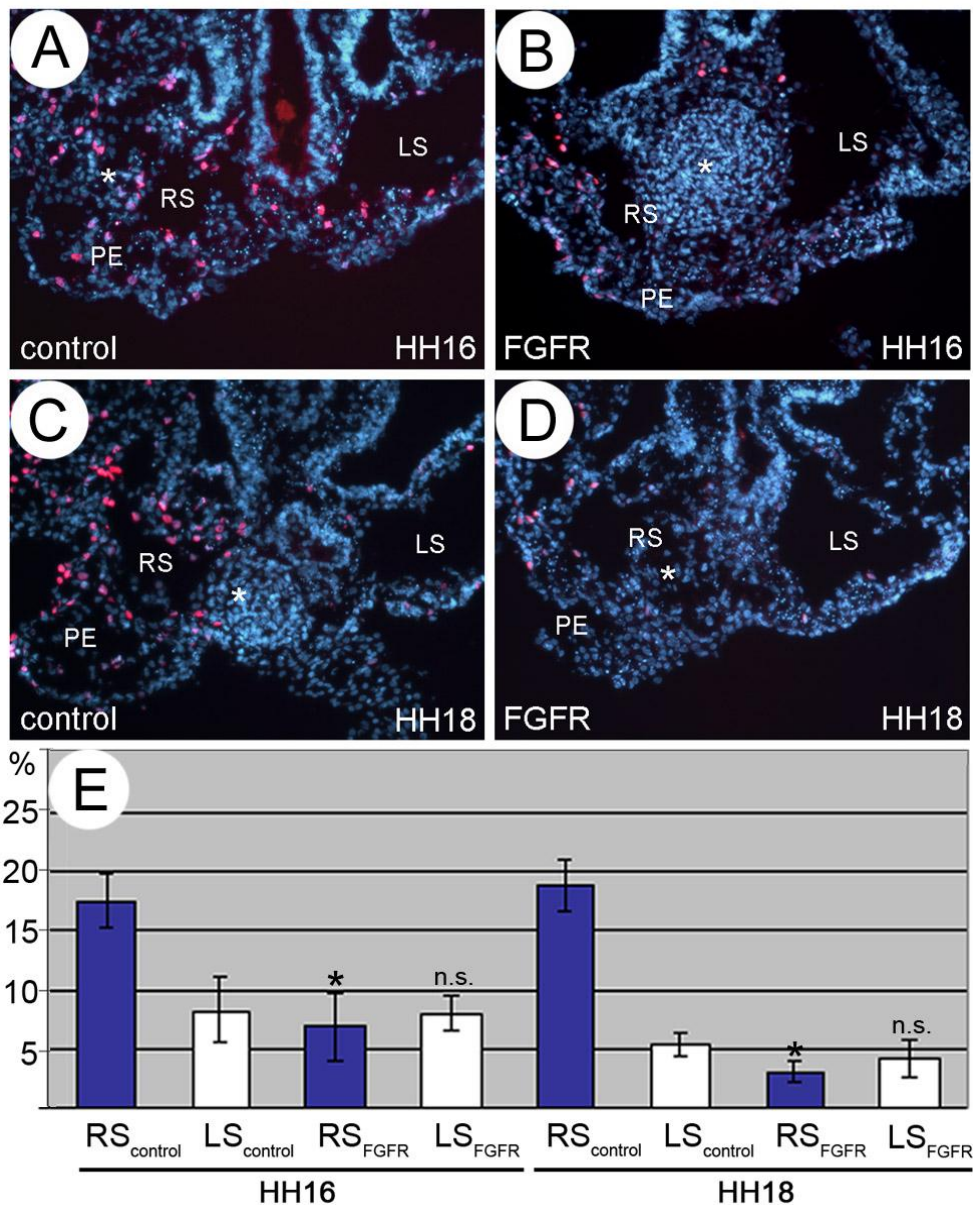


**Abb.17 - Die Inhibition von FGF-Signalen *in vivo* resultiert in einer erhöhten Apoptoserate von proepikardialen Zellen**

(A-D) Immunfluoreszenz aktiver Caspase 3 auf transversalen Schnitten durch die Region des Einflusstraktes. Die roten Pfeile weisen auf apoptotische Areale hin und zeigen hierdurch, dass im Gegensatz zu den Kontrollen in den FGFR-implantierten Embryonen auch im rechten Sinushorn und Proepikard apoptotische Zellen vorliegen. \* implantiertes Zellaggregat. (E) Quantifizierung aCaspase3-positiver Zellen im rechten Sinushorn (blaue Säulen) vs. linken Sinushorn (weiße Säulen). \* $P=0.0001$  im Vergleich zur Kontrolle des RS; # $P<0.05$  im Vergleich zur Kontrolle des LS; n.s.-kein signifikanter Unterschied. RS-rechtes Sinushorn; LS-linkes Sinushorn; PE-Proepikard

Neben der Apoptose wurde auch die Proliferation von Zellen in manipulierten Embryonen untersucht. Zu diesem Zweck wurden implantierte Embryonen mit EdU inkubiert (alternatives Nachweisverfahren zu BrdU, das kürzlich kommerziell verfügbar wurde und für diesen Versuch eingesetzt wurde) und die Inkorporation auf histologischen Schnitten

detektiert. In den Kontrollen zeigten das rechte Sinushorn und Proepikard im HH Stadium 16 und 18 signifikant mehr EdU-Inkorporation als das linke Sinushorn (n=3; Abb.18A, C, E). Auf Schnitten von FGFR-implantierter Embryo dagegen war die Anzahl proliferativer Zellen dramatisch reduziert (n=3; Abb.18B, D, E).

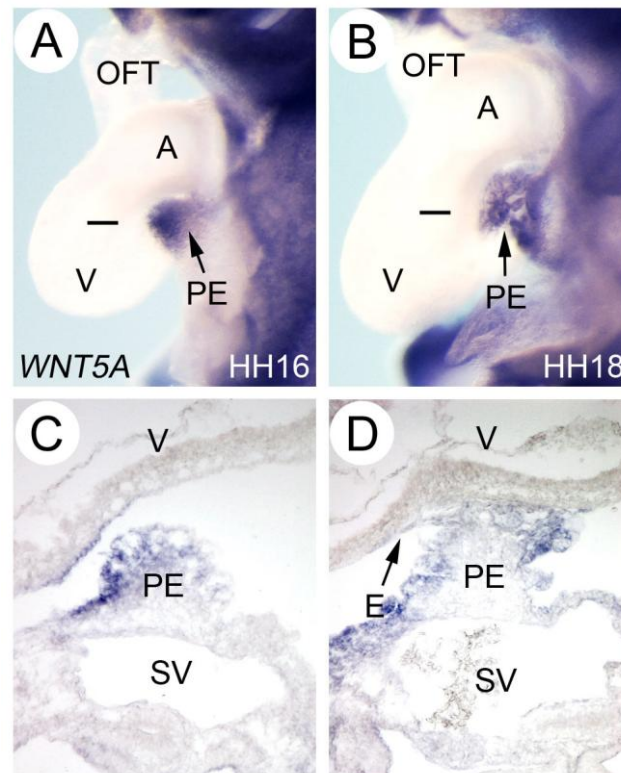


**Abb.18 - Die Inhibition von FGF-Signalen *in vivo* resultiert in der Reduktion proepikardialer Zellproliferation**

(A-D) Die Immunfluoreszenz zur Detektion von EdU auf transversalen Schnitten durch die Region des Einflusstraktes, zeigt in den Kontrollen eine größere Anzahl proliferativer Zellen im rechten Sinushorn und Proepikard als in FGFR-implantierten Embryonen. \* implantiertes Zellaggregat. (E) Quantifizierung EdU-positiver Zellen im rechten Sinushorn (blaue Säulen) vs. linken Sinushorn (weiße Säulen). \*P=0.0001 im Vergleich zur Kontrolle des RS; n.s.-kein signifikanter Unterschied. RS-rechtes Sinushorn; LS-linkes Sinushorn; PE-Proepikard

## 5.2 Die Expression von Wnt im Proepikard

Wnt-Signale spielen zusammen mit FGF und BMP eine bedeutende Rolle in der frühen Kardiogenese zur Spezifizierung kardialen Mesoderms (Eisenberg und Eisenberg, 1999; Soloway und Harvey, 2003). Da sowohl BMP als auch FGF in der Proepikardentwicklung involviert sind, liegt es nahe zu vermuten, dass frühe Regulationsnetzwerke zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung erneut verwendet werden. Um zu überprüfen, ob Wnt-Liganden während der Proepikardentwicklung exprimiert werden, wurde ein *Screen* mit degenerierten *Primern* durchgeführt. Diese *Primer* beinhalten konservierte Sequenzen, die in allen Wnt mRNAs vorkommen und wurden von einer anderen Gruppe eingesetzt, um Wnt-Faktoren in *N. vectensis* (Seeanemone) nachzuweisen (Kusserow et al., 2005). Die degenerierten Wnt-*Primer* wurden in der vorliegenden Arbeit zur Amplifikation von Wnt-Fragmenten aus Sinus-beziehungsweise Proepikardgewebe verwendet. Es wurden insgesamt 30 resultierende Klone subkloniert und sequenziert und es gelang PCR-Fragmente von WNT4, WNT5A und WNT11 subzuklonieren und zur Transkription von *antisense* RNA für die *in situ* Hybridisierung zu verwenden. Durch Verwendung dieser RNA-Sonden wurden bereits bekannte Expressionsdomänen von WNT4, WNT5A und WNT11 im Primitivstreifen und im kardialen Mesoderm (Chapman et al., 2004) in Hühnerembryonen des HH Stadium 4-5 spezifisch nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Eine asymmetrische Expression im rechten *Sinus venosus* in Embryonen des HH Stadium 13-14 war nicht zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Im Proepikard selbst wurde WNT5A im HH Stadium 16 und 18 exprimiert, wobei interessanterweise die Expression im gebildeten Epikard zu persistieren scheint (Abb.19). Diese Daten weisen auf eine Bedeutung von WNT5A während der Epithelialisierungsphase der Proepikardbildung hin. Allerdings muss diese Funktion in weiteren Versuchen untermauert werden. Da es nicht gelungen ist eine Expression von Wnt-Faktoren während der Induktionsphase nachzuweisen, spricht dies dafür, dass Wnt-Faktoren keine wichtige Funktion bei der Induktion des Proepikards übernehmen.



**Abb.19 - Die Expression von WNT5A im Proepikard**

(A) *WNT5A* wird im Hühnerembryo des HH Stadium 16 und (B) HH Stadium 18 im Proepikard exprimiert. (C, D) Die Expression ist prädominant in den Epithelzellen der PE-Anlage zu beobachten. A-Atrium; V-Ventrikel; PE-Proepikard; OFT-Ausflusstrakt; E-Epikard; SV-Sinus venosus

### 5.3 Die asymmetrische Proepikardentwicklung

#### 5.3.1 Der Sinus venosus weist eine asymmetrische Expression von Apoptosegenen auf

Zur Identifizierung neuer Proepikardmarker, die in der Induktion proepikardialer Zellen eine Rolle spielen könnten, wurde eine *Microarray*-Analyse mit cDNAs durchgeführt, die aus RNA des rechten und linken Sinus des Entwicklungsstadiums HH 13-14 gewonnen wurden (Kollaboration mit H.P. Buermans und P.A. 't Hoen der Universität Leiden). Die Expressionsdaten des *Arrays* wurden danach durch die Anni2-Software ausgewertet und in einer Konzeptanalyse zusammengefasst (Jelier et al., 2007). Jedoch konnten keine neuen aufschlussreichen Kandidaten ermittelt werden, die in das Konzept bereits bekannter Faktoren zur Proepikardentwicklung passen würden. Dennoch wurde in der Konzeptanalyse deutlich die linksseitige Induktion von Apoptose, durch die differentielle Expression der Apoptose-Faktoren *CASP2*, *DIABLO*, *BNIP3*, *SIVA1* und *HTATIP2*, detektiert (Tabelle 4). Die Entwicklung des *Sinus venosus* und damit auch die Etablierung der PE-Anlagen ist durch eine

asymmetrische Proliferation proepikardialer Zellen auf der rechten Seite und gleichzeitig einer Induktion von Apoptose auf der linken Seite gekennzeichnet (Schlüter, Dissertation, Universität Würzburg 2008). Interessant war hierbei die Feststellung, dass eine Reihe von Markergenen des Apoptoseprozesses differentiell exprimiert werden und zwar viel früher (HH Stadium 14), als Apoptose im linken Sinushorn nachweisbar ist (HH Stadium 17). Die Expression dieser Gene wurde deshalb durch *in situ* Hybridisierung (Abb.20) und quantitative *real time* PCR (Abb.21) vor und während der Proepikardentwicklung untersucht.

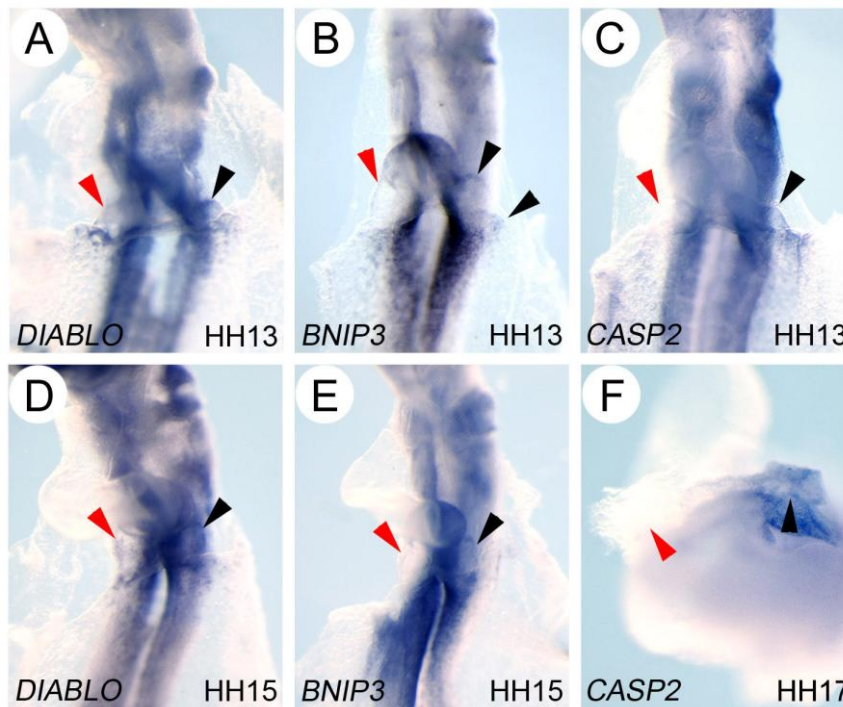
Alle identifizierten Faktoren spielen eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von Apoptose. Während die Initiator-Caspase 2 (Casp2) nach Initiierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs die Aktivierung von Effektor-Caspasen vermittelt, trägt das proapoptotische Protein Diablo zur Stimulierung der Apoptose bei, indem es Apoptose-Inhibitoren (IAPs) direkt antagonisiert (Verhagen et al., 2000, Du et al., 2000). Bnip3 dagegen gehört zu den BH3-only-Proteinen, die Apoptose-Signale zur Mitochondrienmembran transduzieren und dadurch die Freisetzung weiterer Apoptose-Faktoren induzieren (Chen et al., 1997; Kim et al., 2006; Adams et al., 2007). Htatip2, auch CC3 oder Tip30 genannt, ist eine Dehydrogenase/Reduktase, die als putativer Metastasensuppressor Angiogenese inhibiert, Apoptose stimuliert und unter anderem die Expression von Siva induziert (NicAmhlaobh et al., 2001; Whitman et al., 2000; Xiao et al., 2000). Siva1 ist ebenfalls ein proapoptotisches Protein, bindet an CD27, einem Mitglied der TNFR-Familie, und induziert bei Überexpression Apoptose in diversen Zelllinien (Prasad et al., 1997).

C164		f <sub>0</sub> Σ =							
1	A	B	C	D	E	F	G	H	I
2		From Limma analysis: FDR<=5%							
3		Probes regulated: 577							
4		EG recognised by Anni2: 303							
5	Cluster	Concept	Concept-ID	EntrezGene	Annotation [contribution > 1.0%]	Concept	Concept-ID	Contribution	
151									
152									
153	10	CASP2	3007254	835	HTATIP2		3004676	31.21	
154		DIABLO	3010532	56616	caspase		10656	8.47	
155		BNIP3	3002990	664	DIABLO		3010532	7.26	
156		SIVA	3004692	10572	CASP9		3031024	5.32	
157		HTATIP2	3004676	10553	BNIP3		3002990	4.82	
158					CASP3		3037912	4.33	
159					CASP2		3007254	3.13	
160					Caspase Activation		1159825	2.86	
161					Apoptosis		162638	2.73	
162					SIVA		3004692	2.7	
163					BAX		3007242	2.55	
164					BCL2		3000527	1.76	
165					CASP8		3007657	1.44	
166					cytochrome c"		653778	1.3	
167					Cytochromes c'		10754	1.24	
168					cytochrome c		10749	1.16	
169					BNIP3L		3003195	1.09	
170					TNFSF10		3002824	1.06	
171					PDCD8		3003100	1.01	
172									

**Tabelle 4 - Konzeptanalyse differentiell exprimierter Apoptosegene**

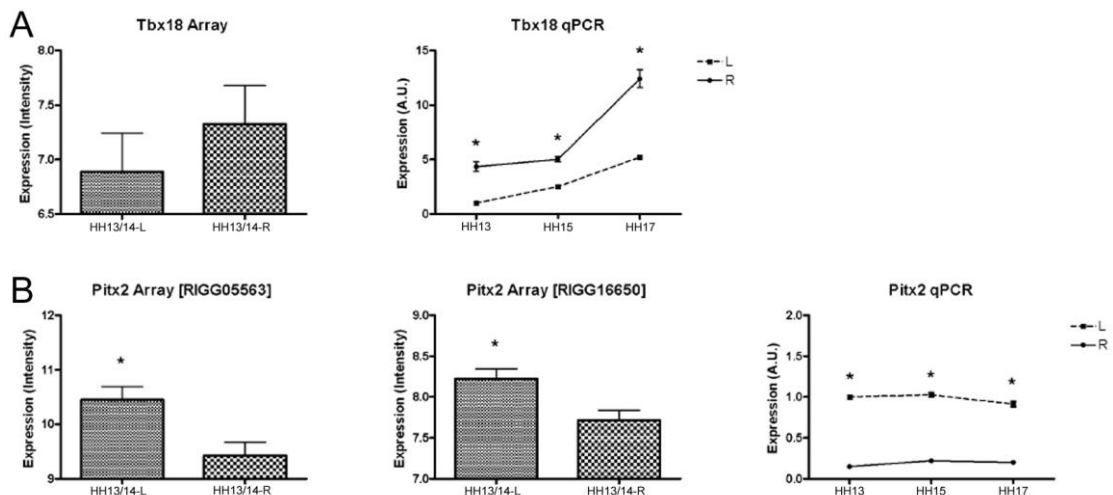
Die Auswertung der *Array*-Daten erfolgte mittels der Anni2-Software durch H.P. Buermans.

Um zunächst die Ergebnisse des *Microarrays* zu verifizieren, wurde eine *in situ* Hybridisierung zur Detektion von *HTATIP2*, *SIVA1*, *DIABLO*, *BNIP3* und *CASP2* im Hühnerembryo des HH Stadium 13 durchgeführt. Während eine asymmetrische Expression von *HTATIP2* und *SIVA1* in der Einflussbahn des embryonalen Herzens nicht eindeutig bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt), zeigen *DIABLO*, *BNIP3* als auch *CASP2* eine asymmetrische Expression im linken jedoch nicht im rechten Sinushorn (Abb.20A-C). Danach wurde die Expression der Apoptose-Gene in älteren Entwicklungsstadien untersucht, wobei die differentielle Expression verstärkt wahrzunehmen war (Abb.20D-F). Dabei fällt vor allem die starke Expression von *CASP2* in der retardieren linken PE-Anlage auf (Abb.20F). Da durch die *in situ* Hybridisierung eine verstärkte Expression der Apoptosegene während der Proepikardentwicklung erkennbar war, wurde hiernach die Expression der Apoptose-Faktoren mittels *real time* PCR vor und während der Proepikardentwicklung untersucht (HH Stadium 13, 15 und 17). Als Kontrollen dienten der Proepikardmarker *TBX18* und der Linksmarker *PITX2*, wobei *TBX18* deutlich eine ansteigende Expressionshöhe im rechten Sinus aufzeigt (Abb.21A), wogegen *PITX2* gleichbleibend differentiell im linken Sinus zu detektieren ist (Abb.21B). Die qPCR-Daten in den Abbildungen 21 und 22 sind jeweils im Vergleich zu der differentiellen Expressionshöhe der *Microarray*-Proben angeführt. Hierdurch wird erkennbar, dass vor allem die Expression von *CASP2* und *HTATIP2* während der Proepikardentwicklung auf der linken Seite zunimmt (Abb.22A, B). Die Expression von *BNIP3*, *DIABLO* und *SIVA1* bleibt zumindest über die Zeit konstant und ist überwiegend stärker im linken als im rechten Sinus zu detektieren (Abb.22C-E). Dies ist ein Anzeichen dafür, dass der Apoptoseprozess gleichzeitig mit der Induktion der linksseitigen Proepikardanlage verstärkt wird.



**Abb.20 - Das Expressionsmuster von Apoptose-Genen vor und während der Proepikardentwicklung**

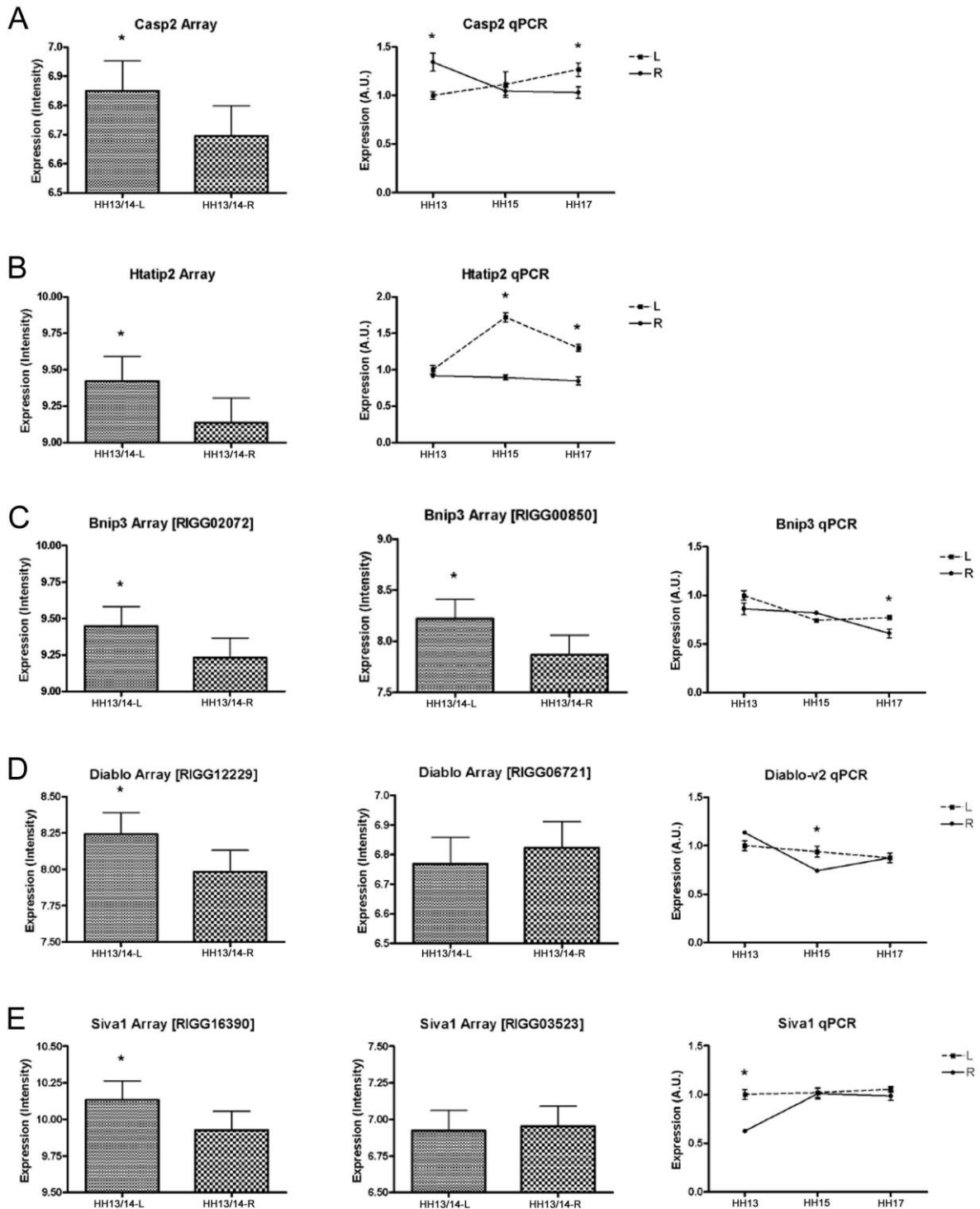
(A) *DIABLO*, (B) *BNIP3* und (C) *CASP2* werden bereits frühzeitig differentiell im linken Sinushorn exprimiert. (D-F) Während der Entwicklung des Proepikards verstärkt sich die asymmetrische Expression von *DIABLO*, *BNIP3* und *CASP2* optisch auf der linken Seite des Einflusstraktes, wo es zur Bildung einer unterentwickelten PE-Struktur kommt. Schwarze Pfeile-Expression der Apoptosegene im linken Sinushorn; Rote Pfeile-keine Expression von Apoptosegenen im rechten Sinushorn



**Abb.21 - Array- und qPCR-Daten zur differentiellen Expression von *TBX18* und *PITX2* während der Proepikardentwicklung**

(A) *TBX18* wird als proepikardiales Markergen differentiell rechtsseitig exprimiert. Die *TBX18*-Expressionshöhe steigt mit Bildung der rechten Proepikardanlage rapide an, wogegen die Bildung der retardierten linksseitigen Proepikardanlage durch eine schwächere Expression auf der linken Seite zum Ausdruck kommt. (B) *PITX2* wird als Induktor linksseitiger Identität während der Proepikardentwicklung gleichbleibend stark auf der linken Seite exprimiert. Die Expressionsdaten aller Array-Proben eines Transkripts sind angegeben. \* Signifikanter Unterschied der Expressionshöhe links (L) und rechts (R).





**Abb.22 - Array- und qPCR-Daten zur differentiellen Expression von Apoptose-Faktoren während der Proepikardentwicklung**

(A) *CASP2*, (B) *HTATIP2*, (C) *BNIP3*, (D) *DIABLO* und (E) *SIVA1* wurden in der *Microarray*-Analyse als links differentiell exprimierte Apoptose-Gene identifiziert (Diagramme, links). Die Expressionshöhe der Gene steigt während der Proepikardentwicklung auf der linken Seite an, beziehungsweise bleibt konstant hoch, wie die Expressionsdaten der qPCR zeigen (Diagramme, rechts). Die Expressionsdaten aller *Array*-Proben eines Transkripts sind angegeben. \* Signifikanter Unterschied der Expressionshöhe links (L) und rechts (R).

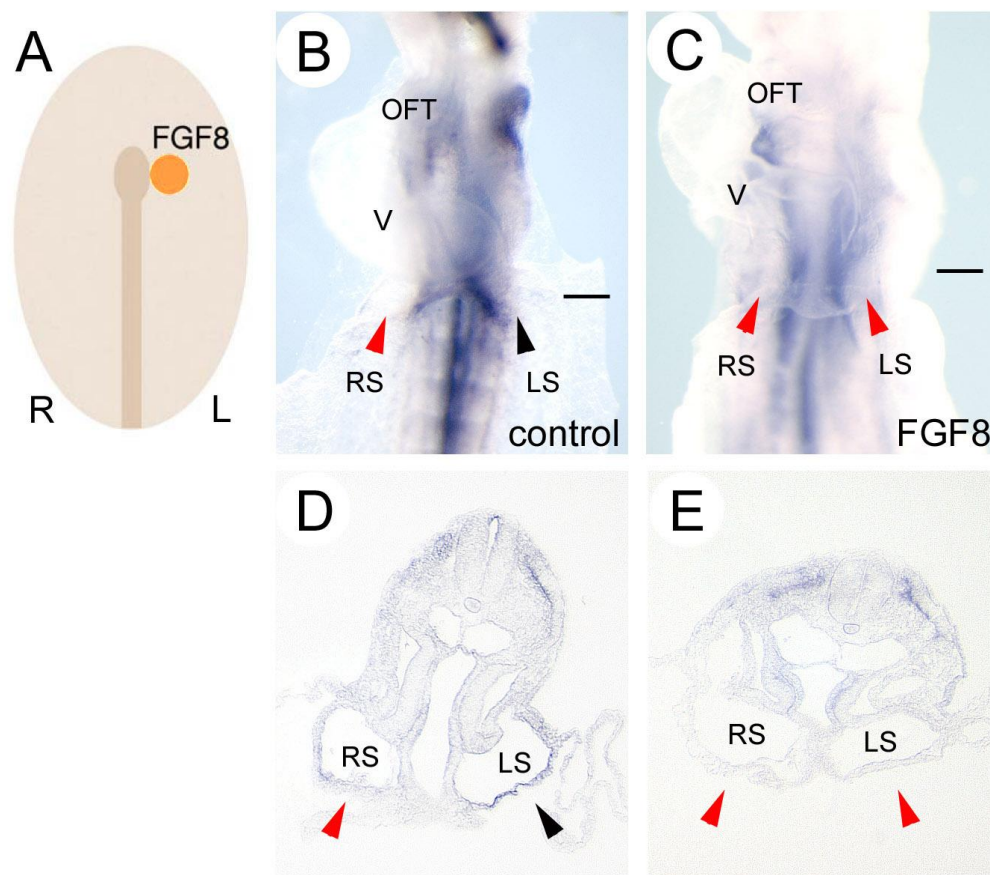
### 5.3.2 Die asymmetrische Expression von Caspase 2 während der Proepikardentwicklung wird durch FGF8 moduliert

Um zu analysieren, ob die asymmetrische Expression von Apoptose-Genen Teil eines linksseitigen Mechanismus ist, der die Ausbildung bilateraler PE-Anlagen nachhaltig unterdrückt, wurden erste Versuche zur Störung des linksseitigen NODAL/PITX2-Signalwegs unternommen. Im frühen Hühnerembryo induziert auf der linken Seite des Hensenschen Knotens SHH die Expression von *NODAL*, was wiederum zur Selbstinduktion von *NODAL* in der lateralen Platte führt. *NODAL* induziert nachfolgend *PITX2*, welches auf der linken Seite persistiert. Auf der rechten Seite wird der NODAL/PITX2-Signalweg unterdrückt. Hierbei spielt vor allem BMP4 auf der rechten Seite des Hensenschen Knoten eine tragende Rolle, da durch den Faktor eine rechtsseitige *FGF8*-Expressionsdomäne induziert wird, über welche es zur Aktivierung von *SNAI1* kommt. *SNAI1* reprimiert nachfolgend rechts *PITX2* (Patel et al., 1999). Die rechtsseitige Identität wird also über die Inhibition linksseitiger Faktoren etabliert. Die Proepikardbildung auf der rechten Seite wird durch *FGF8* und *SNAI1* induziert, während für die Induktion proepikardialer Markergene *PITX2* keine Rolle zu spielen scheint (Schlueter et al. 2009). Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse zu untersuchen, ob die linksseitige Expression von Apoptosemarkergenen durch eine rechtsseitige Inhibition ihre Unilateralität erlangt, oder ob Apoptose durch *NODAL/PITX2* auf der linken Seite induziert wird.

Durch die Implantation von *FGF8*-Protein auf die linke Seite des Hensenschen Knotens im HH Stadium 4 (Abb.23A), sollte die linksseitige Identität gestört und dessen Auswirkung auf die Expression des Apoptosemarkers *CASP2* untersucht werden. Embryonen, in denen zu Kontrollzwecken Trägerperlen ohne *FGF8*-Protein implantiert wurden, zeigen im HH Stadium 14-15 keine Veränderung der *CASP2*-Expression (Abb.23B, D; n=7/8). Die Implantation von *FGF8* dagegen führt zum Verlust der *CASP2*-Expression im linken Sinushorn (Abb.23C, E; n=6/6). Daraus ist zu schlussfolgern, dass *FGF8* in der Lage ist die Expression des Apoptosemarkers *CASP2* auf der linken Seite zu modulieren. Durch dieses Experiment kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob *PITX2* direkt in die Regulierung der Apoptoseinduktion auf der linken Seite involviert ist.

Um die hinreichende Aktivität von *PITX2* auf der rechten Seite zu überprüfen, wurde außerdem eGFP/*PITX2*-RCAS in prospektive Proepikardzellen des rechten Sinushorns im HH Stadium 10 elektroporiert (durchgeführt von Jan Schlüter). Daraufhin konnte keine Induktion von Apoptose in GFP-markierten Zellen des Proepikards detektiert werden (Daten

nicht gezeigt). Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass die Expression von *CASP2* auf der linken Seite möglicherweise nicht durch PITX2 induziert wird. Beide Versuche: (1) FGF8-Implantation links und (2) ektopische Expression von PITX2 rechts hatten keine Induktion von *CASP2* beziehungsweise von Apoptose zur Folge. Es könnte deshalb sein, dass auf der rechten Seite durch den FGF8/SNAI1-Signalweg die Induktion von Apoptose reprimiert wird, das heißt die asymmetrische Expression von Proepikardmarkern (rechts) und die Induktion von Apoptose (links) werden möglicherweise durch den gleichen Signalweg gesteuert. Allerdings fehlen hier noch weitere Experimente, um diese Interpretation der Ergebnisse weiter zu untermauern.



**Abb.23 - Die Inhibition der asymmetrischen *CASP2*-Expression im *Sinus venosus***

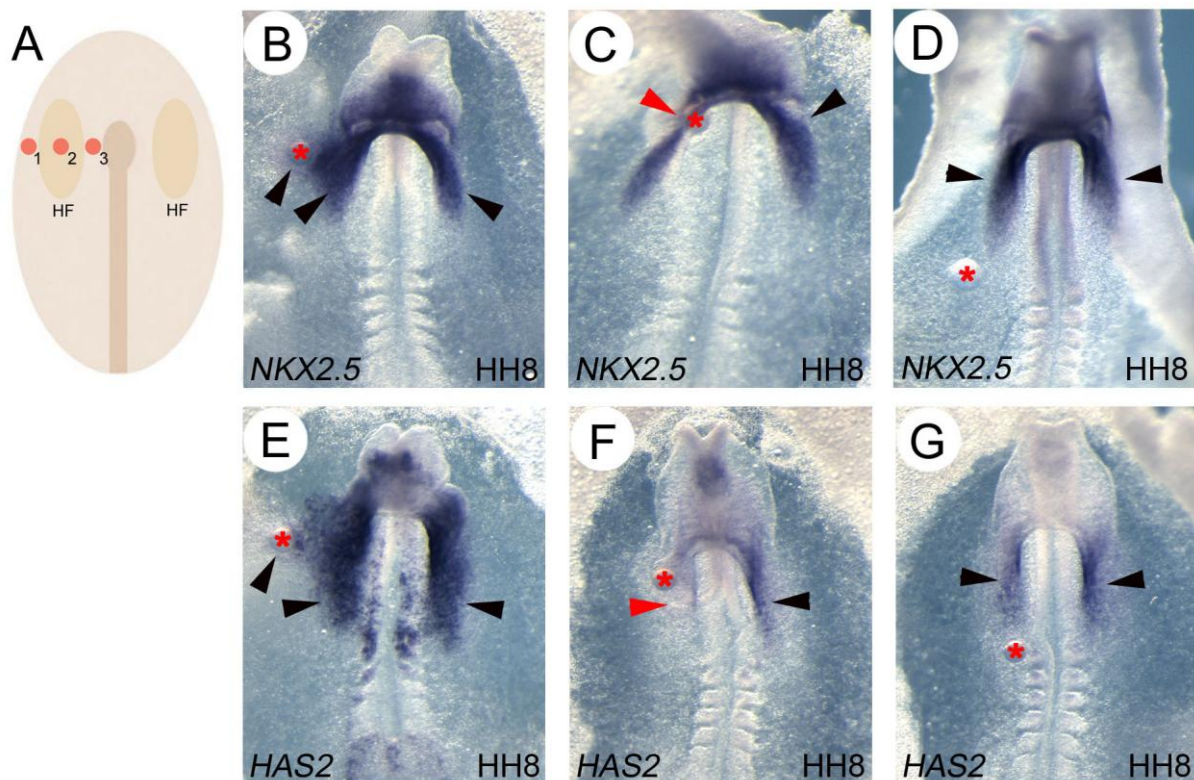
(A) Lage der FGF8-Trägerperle nach Implantation in einen Hühnerembryo im HH Stadium 4. (B) In den Kontrollen wird *CASP2* asymmetrisch im linken Sinushorn exprimiert, (D) wie auch im Schnitt des Embryos zu erkennen ist. (C, E) Nach FGF8-Implantation ist keine Expression von *CASP2* im linken Sinushorn zu beobachten. RS-rechtes Sinushorn; LS-linkes Sinushorn; V-Ventrikel; OFT-Ausflustrakt; Schwarze Pfeile-*CASP2*-Expression; Rote Pfeile-keine *CASP2*-Expression

## 5.4 Die Rolle von FGF in der Herzfeldregion

### 5.4.1 Die ektopische Expression von FGF moduliert die Expression kardialer Marker der Herzfeldregion

Der Transkriptionsfaktor *Nkx2.5* ist ein früher kardialer Marker und wird in der herzbildenden Region exprimiert (Lints et al., 1993; Schultheiss et al., 1995; Brand, 2003). Auch *Has2* wird im primären Herzfeld exprimiert (Klewer et al., 2006) und kodiert für ein Enzym, das Hyaluronsäure produziert, welches für die Embryonalentwicklung essentiell ist (Hay, 1980; Delpech et al., 1989; Haddon und Lewis, 1991; Knudson et al., 1995; Camenisch et al., 2000). Da in einer *Microarray*-Analyse beobachtet wurde, dass die *HAS2*-Expression im Gesichtsmuskel des Huhns von FGF moduliert wird (Kollaboration mit A. Neubüser, Universität Freiburg) und bekannt ist, dass FGF die kardiale Expression von *NKX2.5* kontrolliert (Alsan und Schultheiss, 2002), sollte der Einfluss von FGF auf die *HAS2*-Expression in der herzbildenden Region untersucht werden. Dazu wurden in Hühnerembryonen des HH Stadium 4, mit FGF-Protein beladene Trägerperlen direkt in die herzbildende Region, oder lateral beziehungsweise medial zur herzbildenden Region implantiert (Abb.24A). Die implantierten Embryonen wurden bis zum HH Stadium 8 kultiviert und anschließend einer *in situ* Hybridisierung zur Detektion von *NKX2.5* und *HAS2* unterzogen (Abb.24B-G).

Wie bereits beobachtet (Alsan und Schultheiss, 2002), führt die Implantation von FGF8 lateral zum Herzfeld zu einer ektopischen Induktion von *NKX2.5* (Abb.24B; Tabelle 5), wogegen die Implantation medial zum Herzfeld keinen Effekt zeigt (Abb.24C; Tabelle 5). Darüber hinaus inhibiert eine hohe Konzentration von FGF8 direkt im Herzfeld die Expression von *NKX2.5* (Abb.24B; Tabelle 5). Interessanterweise verhält sich *HAS2* im Bezug auf die FGF-Implantation genauso wie *NKX2.5* (Abb.24E-G; Tabelle 5). Die Implantationsexperimente wurden ebenfalls mit FGF2-Protein durchgeführt und FGF2 zeigte denselben Effekt wie FGF8 (Daten nicht gezeigt; Tabelle 5). Demnach scheint die Expression beider Markergene durch FGF moduliert zu werden.



**Abb.24 - Gain-of-function der FGF8-Aktivität in der herzbildenden Region**

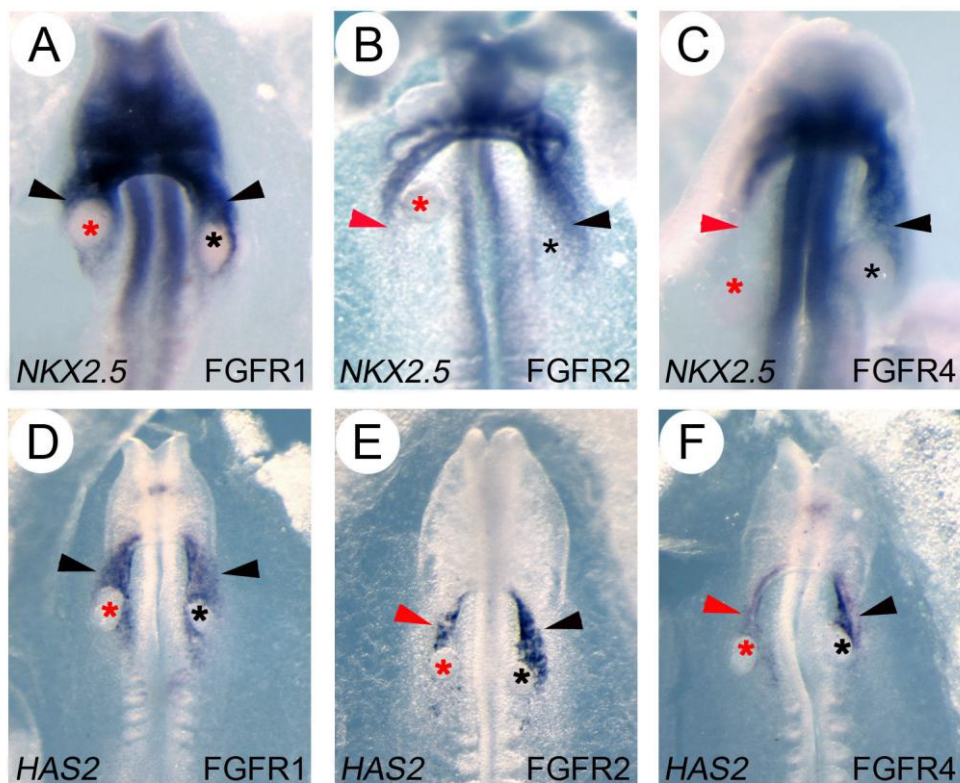
(A) Die mit FGF8-Protein beladenen Trägerperlen wurden im HH Stadium 4 lateral (1), in das Herzfeld (2), oder medial vom Herzfeld (3) implantiert. Im HH Stadium 8 ist durch (1) eine Induktion von (B) *NKX2.5* oder (E) *HAS2* zu beobachten. Durch (2) wird die Expression von (C) *NKX2.5* und (F) *HAS2* inhibiert, wobei (3) keinen Einfluss auf die (D) *NKX2.5*- bzw. (G) *HAS2*-Expression nimmt. HF=Herzfeld; Schwarze Pfeile zeigen auf normale bzw. induzierte Expression; Rote Pfeile zeigen auf fehlende Expression.

Implantation	<i>NKX2.5</i>	<i>HAS2</i>
<b>FGF8</b>		
lateral zum Herzfeld - Induktion	n=10/11 (90,9%)	n=9/10 (90%)
in das Herzfeld - Inhibition	n=5/6 (83,3%)	n=5/7 (71,4%)
medial zum Herzfeld - keine Induktion	n=7/7 (100%)	n=8/8 (100%)
<b>FGF2</b>		
lateral zum Herzfeld - Induktion	n=8/8 (100%)	n=7/8 (87,5%)
in das Herzfeld - Inhibition	n=6/7 (85,7%)	n=7/8 (87,5%)
medial zum Herzfeld - keine Induktion	n=11/11 (100%)	n=10/11 (90,9%)

**Tabelle 5 - Häufigkeit von Embryonen mit veränderter bzw. unveränderter Expression von *NKX2.5* und *HAS2* nach Implantation von FGF8 bzw. FGF2**

#### **5.4.2 Die distinkte Inhibition von FGF-Signalen in der Herzfeldregion führt zum Verlust kardialer Markergene**

Um zu überprüfen, ob FGF für die kardiale *NKX2.5*- und *HAS2*-Expression nicht nur hinreichend sondern auch notwendig ist, wurden FGF-Liganden-Bindungsdomänen sezernierende Zellaggregate im HH Stadium 4 direkt in die herzbildende Region implantiert, um FGF zu reprimieren. Zu Kontrollzwecken wurden im Embryo auf der kontralateralen Seite AP-sezernierende Zellen implantiert. Während die Implantation von Zellaggregaten, die FGFR1-Bindungsdomänen sezernieren, keinen Einfluss auf die Expression von *NKX2.5* und *HAS2* haben (Abb.25A, D; Tabelle 6), führen die Implantation von Zellaggregaten, die FGFR2- oder FGFR4-Bindungsdomänen exprimieren zum Verlust der *NKX2.5*- und *HAS2*-Expression (Abb.25B, C, E, F; Tabelle 6). Offenbar sind FGF-Signale also für die Induktion von *NKX2.5* als auch *HAS2* essentiell. Die Beobachtung der selektiven Inhibition bestätigt demnach die Rezeptor-Spezifität von FGF-Liganden. In die Induktion der kardialen Markergene *NKX2.5* beziehungsweise *HAS2* sind nur FGF-Liganden involviert, die präferentiell an die FGF-Rezeptoren FGFR2 beziehungsweise -4 binden. Diese Rezeptorspezifität wurde unter anderem für FGF8 beschrieben (Zhang et al., 2006).



**Abb.25 - Loss of function der FGF-Aktivität im Herzfeld**

Die selektive Inhibition von FGF-Signalen beeinflusst (A) die *NKX2.5*- beziehungsweise (D) *HAS2*-Expression nicht oder führt zum Verlust der (B, C) *NKX2.5*- oder (E, F) *HAS2*-Expression. Rote Sternchen-FGFR-Zellimplantat; Schwarze Sternchen-Kontrollimplantat; Schwarze Pfeile zeigen auf normale Expression; Rote Pfeile zeigen auf fehlende Expression.

Implantation	<i>NKX2.5</i>	<i>HAS2</i>
<b>FGFR1</b>		
in das Herzfeld - kein Effekt	n=9/9 (100%)	n=10/11 (90,9%)
<b>FGFR2</b>		
in das Herzfeld - Inhibition	n=5/5 (100%)	n=5/5 (100%)
<b>FGFR4</b>		
in das Herzfeld - Inhibition	n=6/8 (75%)	n=7/8 (87,5%)

**Tabelle 6 - Häufigkeit von Embryonen mit veränderter bzw. unveränderter Expression von *NKX2.5* und *HAS2* nach Implantation von FGFR-sezernierenden Zellaggregaten**

## 6 Diskussion

### 6.1 Die Rolle von FGF in der Entwicklung des Proepikards

#### 6.1.1 Die proepikardiale Expression von FGF-Liganden und FGF-Rezeptoren

FGF-Signale sind in viele wichtige Prozesse während der Embryonalentwicklung involviert, wie beispielsweise der Achsenbildung und der Organogenese (Mariani et al., 2008; Wahl et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von FGF während der Entwicklung des Proepikards untersucht. Es wurde vermutet, dass für die Etablierung proepikardialer Zellen ein ähnliches Netzwerk an Signalmolekülen und Wachstumsfaktoren aktiv ist, wie während der frühen Herzentwicklung (Brand, 2003). Während bereits Fortschritte zur Definierung der Rolle von FGF-Signalen während der frühen kardialen Spezifizierung gemacht wurden (Alsan und Schultheiss, 2002; Samuel and Latinkić, 2009; Keren-Politansky et al., 2009; Lopez-Sanchez et al., 2002), ist die Rolle von FGF in der Entwicklung des Proepikards weitgehend unverstanden. In dieser Arbeit wurde im Hühnerembryo die Expression verschiedener FGF-Liganden und -Rezeptoren im Proepikard beobachtet. *FGF2*, *FGF10* und *FGF12* sind hierbei im HH Stadium 17-18 vorwiegend in den epithelialen Zellen des Proepikards zu detektieren, was mit den Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt (Kruithof et al., 2006). *FGF2* wird unter anderem auch im Herzen exprimiert (Zhu und Lough, 1996). Dieser FGF-Ligand besitzt keine N-terminale Signalsequenz und wird deshalb nicht von der Zelle sezerniert (Itoh und Ornitz, 2004). Man vermutet, dass *FGF2* aus geschädigten Zellen freigesetzt wird oder aber durch Exozytose (Ornitz und Itoh, 2001), wodurch es extrazellulär zu finden ist. *FGF10* dagegen besitzt ein Signalpeptid und wird normal von Zellen sezerniert. Es ist wie *FGF2* in mesodermalen Strukturen zu detektieren, die kardiale Expression ist jedoch auf Zellen des sekundären Herzfeldes und späteren Ausflusstraktes des Herzens beschränkt (Karabagli et al., 2002; Ohuchi et al., 1997; Kelly et al., 2001). Es ist nicht bekannt, ob *FGF2* und *FGF10* sich biologisch unterscheiden und unterschiedliche Signalwege aktivieren. Gewiss ist jedoch, dass FGF-Liganden eine distinkte Spezifität zur Bindung und Aktivierung von FGF-Rezeptoren besitzen (Ornitz und Itoh, 2001; Itoh und Ornitz, 2004; Itoh und Ornitz, 2008). So bindet *in vitro* *FGF2* präferentiell an FGFR1c und *FGF10* an FGFR2b (Zhang et al. 2006). Abgesehen davon, dass diese Spezifität *in vivo* anders ausgeprägt sein kann, da *in vivo* viele Ko-Faktoren die Affinität der FGF-Liganden zu ihren Rezeptoren modulieren, sind im Proepikard drei der insgesamt vier FGF-Rezeptortyrosinkinasen



exprimiert. *FGFR1*, *FGFR2* und *FGFR4* werden wie die FGF-Liganden präferentiell im Epithel des Proepikards detektiert. Dieses Expressionsmuster passt gut zu der Vorstellung der Rolle von FGF als autokriner oder parakriner Regulator des epithelialen Wachstums während der Proepikardentwicklung. Beide Rezeptoren, die eine hohe Affinität für FGF2 beziehungsweise FGF10 aufweisen, werden also im Proepikard exprimiert.

FGF12 zeigt eine ähnliche Expression wie FGF2 und FGF10 im Proepikard. Dieses FGF ist jedoch ein FGF homologer Faktor (FHF) und kann FGF-Rezeptoren nicht stimulieren (Goldfarb, 2005). FHF's sind offenbar intrazelluläre Komponenten, die strukturelle aber keine funktionelle Ähnlichkeiten mit den anderen FGFs aufweisen. FHF's haben genauso wie andere Mitglieder der Fgf-Familie eine hohe Affinität zu Heparin und besitzen eine konservierte Heparin-Bindungsdomäne, zeigen jedoch keine mitogene Aktivität (Olsen et al., 2003). Diese Faktoren werden überwiegend im embryonalen und maturierten Nervensystem exprimiert, wo sie wichtige neurophysiologische Funktionen besitzen (Hartung et al., 1997; Wang et al., 2000; Van Swieten et al., 2003; Wang et al., 2002). Interessanterweise binden FHF's, darunter auch FGF12 (FHF1), an intrazelluläre Domänen spannungsabhängiger Natriumkanäle (Liu et al., 2001; Liu et al., 2003; Goldfarb, 2005), die in erregbaren Zellen exprimiert werden. Zu den nicht-neuronalen Expressionsdomänen von Fgf12 gehören deshalb adulte atriale Kardiomyozyten (Hartung et al., 1997). Darüberhinaus wird *Fgf12*-Expression in der Maus auch im sich entwickelnden Bindegewebe des Skeletts detektiert. Ob die Funktion von Fgf12 in diesen Geweben mit der im Proepikard korreliert ist fraglich, da sich aus proepikardialen Zellen weder kontraktile Myozyten noch skelettäre Strukturen bilden. In Bezug auf das Expressionsmuster scheint FGF12 aber gerade in mesothelialen Zellen exprimiert zu sein, die in die proepikardiale Linie rekrutiert werden. Einzig ein Zusammenhang mit dem losen Bindegewebe des proepikardialen Stromas wäre denkbar. Um alternative Funktionen dieses FGF homologen Faktors zu identifizieren, könnte man durch Interaktionsstudien (beispielsweise Zwei-Hybridanalysen) bekannte oder neue Interaktionspartner von FGF12, die im Proepikard exprimiert werden, identifizieren. Auch die subzelluläre Lokalisation von FGF12 in proepikardialen Zellen würde hinsichtlich der FGF12-Funktion in diesen Zellen informativ sein. Ohne diese Informationen bleibt die Rolle von FGF12 in der Proepikardentwicklung vorerst unbekannt.

### 6.1.2 FGF ist eine wichtige Determinante für das Wachstum des Proepikards

Um zu analysieren, ob FGF-Signale für die Proepikardentwicklung von Bedeutung sind, wurde die Funktion von FGF in proepikardialen Explantatkulturen untersucht. Als Endpunkt der Untersuchungen wurde das Flächenwachstum der Proepikardexplantate analysiert. Der Antagonismus der endogenen FGF-Aktivität durch verschiedene Inhibitoren führte in jedem Fall zu einem reduzierten Wachstum der Explantate. Die wachstumsfördernde Rolle von FGF für proepikardiale Zellen scheint hierbei konzentrationsabhängig zu sein, da im Gegensatz zu einer intermediären Konzentration des FGFR-Inhibitors SU5402 eine hohe Konzentration zur vollständigen Inhibition des Explantatwachstums führt und die Zellen einen blasigen Phänotyp aufweisen, was auf Apoptose hindeutet. In Explantaten in denen FGF-Signale inhibiert wurden, wurde eine Abnahme der Zahl proliferativer und eine Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen beobachtet. Demnach ist das reduzierte Wachstum in Explantaten, die unter FGF-Inhibition kultiviert wurden, also durch Proliferationshemmung und eine zunehmende Induktion von Apoptose zu erklären. Es ist jedoch unklar, ob die beobachtete Reduktion des Flächenwachstums epithelialer Proepikardzellen zusätzlich auch durch eine Inhibition der Migration entsteht. Um dieser Frage nachzugehen, könnten zum Beispiel Proepikardien mit GFP-Reporterkonstrukten elektroporiert und nach Explantation die Fluoreszenz-markierten Proepikardzellen durch *Life Imaging* verfolgt werden.

Da die Verwendung spezifischer Inhibitoren des Ras/MAPK- als auch des PI3-Kinase-Signalweges eine Reduktion des Explantatwachstums zeigte und jeweils zu einer Proliferationshemmung und einem signifikanten Verlust von Zellen führte, scheinen beide Signalwege für die Entwicklung des Proepikards von Bedeutung zu sein. Kürzlich zeigten Untersuchungen, dass FGF-Signale auch über sogenannte nicht-kanonische, nicht-Tyrosinkinase-rezeptor-vermittelte Transduktionswege übertragen werden können (Murakami et al., 2008). Da keiner dieser Signalwege durch den in der vorliegenden Arbeit verwendeten experimentellen Ansatz spezifisch beeinflusst wurde, bleibt es offen inwieweit nicht-kanonische FGF-Signalwege eine Rolle bei der Proepikardentwicklung spielen.

Um diese *in vitro*-Daten durch funktionelle *in vivo*-Daten zu untermauern, wurden ebenfalls Manipulationen am Hühnerembryo durchgeführt. Auch *in vivo* führte die Inhibierung der FGF-Aktivität zu einem reduzierten Proepikardwachstum und zum Verlust von Proliferation und einer Induktion von Apoptose in proepikardialen Zellen. Besonders auffällig war hierbei die stumpfähnliche Morphologie, der wachstumsretardierten Proepikardien. In Übereinstimmung mit den Expressionsdomänen, der im Proepikard detektierten FGF-

Liganden und -Rezeptoren, scheint FGF für die Wachstumskontrolle der Mesothelzotten verantwortlich zu sein. Für das Auswachsen des Proepikards kann demnach ein autokriner FGF-Mechanismus impliziert werden. Um einen parakrinen Mechanismus ausschließen zu können, müsste jedoch die Ko-Expression von FGF-Liganden und -Rezeptoren in den Proepikardzellen nachgewiesen werden. Da das Proepikardwachstum *in vivo* durch die Inhibition von FGF-Signalen auf der rechten Seite des Einflusstraktes reduziert wird, lag es nahe zu vermuten, dass die Implantation von FGF-Trägerperlen in das linke Sinushorn das Wachstum der linksseitig retardierten Proepikardanlage stimulieren kann. Obwohl eine solche Beobachtung nicht gemacht werden konnte, schließt dies den Einfluss von FGF auf das Wachstum proepikardialer Zellen nicht aus, da das Ausbleiben einer signifikanten Vergrößerung der linksseitigen Proepikardanlage technisch bedingt sein könnte. Denn zur Inhibition der FGF-Signale auf der rechten Seite wurden Zellaggregate implantiert, die einwachsen und kontinuierlich FGFR-Ligandenbindungsdomänen sezernieren. Für die Applikation von FGF-Protein dagegen wurden Heparinperlen verwendet, deren Speicherkapazität limitiert ist und die freigesetzte Menge der FGF-Liganden durch den Blutfluss im Einflusstrakt des Herzens beeinflusst wird. Deshalb könnte die experimentell induzierte linksseitige Konzentration von FGF2-Protein möglicherweise limitierend sein, oder aber die Proepikardbildung wird durch eine Kombination verschiedener Faktoren induziert und die alleinige Applikation von FGF2 ist nicht ausreichend für eine Wachstumsstimulation auf der linken Seite. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass BMP4 (Schlueter et al., 2006) und WNT5A (Abb.19, S.98) differentiell in der rechten Proepikardanlage exprimiert werden. Diese mögen neben FGF entscheidend sein für die Entstehung eines Proepikards auf der rechten Seite.

Da FGF-Liganden ebenfalls im embryonalen Myokard produziert werden (Karabagli et al., 2002) und in dem etablierten *in vitro*-Kultursystem proepikardiale Zellen stark auf exogenes FGF reagieren, könnten FGF-Liganden neben der Wachstumskontrolle proepikardialer Zellen auch für die Induktion der extrazellulären Gewebebrücke zur Besiedlung des embryonalen Herzens durch Proepikardzellen verantwortlich sein (Nahirney et al., 2003). Fibroblasten-Wachstumsfaktoren sind überdies oft Zielgene von Tbx-Faktoren, die deren Expression zur Wachstumskontrolle regulieren. Dies ist zum Beispiel während der Gliedmaßenentwicklung der Fall, wobei *Tbx4* und *Tbx5* die Expression von *Fgf10* kontrollieren (Takeuchi et al., 2003). Im Ausflusstrakt des Herzens beispielsweise, ist *Fgf8* Zielgen von *Tbx1* (Hu et al., 2004). Es ist deshalb möglich, dass eine solche epistatische Beziehung zwischen Fgf und

Tbx-Faktoren auch während der Proepikardentwicklung von Bedeutung ist. Denn es ist bekannt, dass Tbx-Gene im Proepikard und Epikard exprimiert werden, dazu gehören *Tbx5*, *Tbx18* und *Tbx20* (Haenig und Kispert, 2004; Hatcher et al., 2004; Schlueter et al., 2006; Schulte et al., 2007; Shelton und Yutzey, 2007). Aus diesem Grund wäre es interessant zu analysieren, ob proepikardiale Tbx-Faktoren über Fgf-Gene wie *FGF2* und *FGF10* proepikardiales Wachstum, Zellmigration und die Bildung der sekundären Gewebebrücke kontrollieren. So blockiert der Funktionsverlust von *Tbx5* in Proepikardzellen deren Zellmigration, hat jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen (Hatcher et al., 2004). Für die Rolle von *Tbx18* und *Tbx20* während der Proepikardentwicklung existieren derzeit noch keine funktionellen Daten.

### 6.1.3 Der Verlust von FGF beeinflusst nicht die proepikardiale Identität

Nachdem durch die Inhibition von FGF-Signalen ein gestörtes Wachstum des Proepikards beobachtet wurde, sollte die Rolle von FGF für die proepikardiale Identität untersucht werden. Dazu wurde die Expression der proepikardialen Markergene *TBX18*, *WT1* und *TBX5* in mit FGFR-Inhibitor behandelten Proepikardexplantaten mittels *Real time* PCR analysiert. Interessanterweise wurde durch die Inhibition von FGF-Signalen keine Veränderung in der Expression von Proepikardmarkern beobachtet. Da ebenfalls die Proteinexpression und -lokalisation von WT1 und TBX5 in den mit Inhibitor behandelten Explantatzellen keinerlei Veränderungen zeigte, ist daraus zu schlussfolgern, dass *in vitro* der Verlust von FGF die proepikardiale Identität nicht beeinflusst. Diese Feststellung trifft auch auf die Situation *in vivo* zu, da die Inhibition von FGF-Signalen durch Implantation von FGFR-sezernierenden Zellaggregaten im rechten Sinushorn zwar das Wachstum, nicht jedoch dessen Bildung inhibiert. Die Expression von *TBX18* in den retardierten Proepikardstrukturen entspricht in der Intensität der von normalen Proepikardien. Das heißt die Markergenexpression bleibt in den FGF-inhibierten Proepikardien erhalten, wenngleich morphologisch die Proepikardstruktur stark verändert ist. Überdies konnte keine signifikante differentielle Expression der FGF-Liganden und -Rezeptoren im *Sinus venosus* zur Zeit der Proepikardinduktion festgestellt werden, sondern es wurde eine solide Expression dieser Gene erst in den sich bereits im Wachstum befindenden Proepikardien detektiert. Und obgleich FGFR1, 2 und 4 in der Sinusregion exprimiert werden (Lunn et al., 2006), verhindert die Inhibition dieser Rezeptoren *in vivo*, wie zuvor beschrieben, die Bildung des Proepikards

nicht. Eine tragende Rolle von FGF-Signalen in der Induktion des Proepikards ist folglich auszuschließen.

Eine andere Forschergruppe, die sich ebenfalls mit der Differenzierung perikardialen Mesothels am venösen Pol des embryonalen Herzens auseinandersetzt, schlägt hingegen vor, dass FGF zusammen mit BMP eine determinierende Rolle besitzt (Kruithof et al., 2006; van Wijk et al., 2009). In ihrem Modell ist BMP in die Rekrutierung von mesothelialen Zellen in die myokardiale Linie involviert, ein Prozess der durch FGF8 inhibiert wird, welches direkt an der Grenze zwischen Myokard und Proepikard exprimiert wird. Weiterhin wird in diesem Modell die proepikardiale Identität durch BMP in Gegenwart von FGF2 und FGF10 definiert. Das Modell basiert vorwiegend auf der Beobachtung, dass die myokardiale Differenzierung von Proepikardzellen mittels BMP von MEK-transduzierten FGF-Signalen inhibiert wird. Es wird also der myokardinhibierende Einfluss von FGF direkt mit der Induktion der PE-Anlage in Verbindung gebracht. Mehrere Aspekte sprechen aber gegen dieses Modell. Denn wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, sehen auch van Wijk und Kollegen durch den Verlust von FGF-Signalen *in vitro* eine signifikante Reduktion der Zellzahl in Proepikardexplantaten, was durch Zugabe von FGF2 verhindert werden kann, und im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die Expression des Proepikardmarkers *TBX18* hat. Dieser Aspekt wird aber in der Arbeit nicht weiter diskutiert.

Die in den Arbeiten von Kruithof und van Wijk verwendete Kulturmethode mit serumhaltigem Medium (Kruithof et al., 2006; van Wijk et al., 2009), führt zur EMT der proepikardialen Zellen und damit einhergehend zu einer verstärkten Proliferation und Migration dieser. Derselbe Effekt ist ebenfalls nach Zugabe von rekombinantem FGF zu beobachten (Abb.12.Q, S.85). Diese Kulturbedingungen erschweren somit einen direkten Vergleich mit den nativen Zellen des embryonalen Proepikards. In der, in dieser Arbeit verwendeten, serumfreien Kultur verbleiben die PE-Zellen dagegen epithelial und weisen nur eine zentrale mesenchymale Region auf. Die Problematik um die Verwendung von Serum in der Proepikardkultur wurde auch bereits im Zusammenhang mit der myozytären Differenzierung proepikardialer Zellen diskutiert (Schlüter, Dissertation, Universität Würzburg 2008). Denn die Kultivierung von Proepikardexplantaten unter Serumzugabe führt zur spontanen Bildung kontraktile Myozyten (Kruithof et al., 2006), wohingegen in der Kultur ohne Serum niemals eine solche spontane Differenzierung beobachtet wurde (Schlüter et al., 2006).

Ein weiterer Aspekt der Arbeit von van Wijk et al. der ebenfalls darauf hinweisen würde, dass der Verlust von FGF nicht die proepikardiale Identität beeinflusst, ist die Tatsache, dass trotz der globalen Inhibition von Mek-transduzierten FGF-Signalen zusammen mit BMP2 (U0126+BMP2) *in vivo* ein *TBX18*-positives Proepikard entsteht. Darüberhinaus führt die Inhibition Mek-transduzierter FGF-Signale *in vivo* jedoch nicht zur Reduktion des proepikardialen Wachstums. Dies steht im Gegensatz zu den in dieser Arbeit vorgestellten Daten. Die Beschreibung eines reduzierten Proepikards nach Behandlung mit U0126+BMP2 von van Wijk et al. kann nicht überzeugen, da die gezeigten Proepikardien nur marginale Unterschiede zu den Kontrollen und einen typisch villösen Phänotyp aufweisen. Obendrein sind die Volumina der behandelten Proepikardien nicht quantifiziert worden. Demnach ist die Schlussfolgerung von Wijks et al. nicht nachzuvollziehen, nach der FGF für die proepikardiale Identität verantwortlich ist, da nach FGF-Inhibition *in vivo* dennoch ein villöses Proepikard entsteht, welches weiterhin *TBX18* exprimiert. Dies alles zusammengenommen lässt den Schluss zu, dass die von van Wijk et al. durchgeführte globale Injektion von Wachstumsfaktoren in Kombination mit inhibitorischen Reagenzien keinen Einfluss auf die proepikardiale Identität hat. Vielmehr wird offenbar die Epikardialisierung des Herzens durch Inhibition des Proepikardwachstums gehemmt, eine Konklusion, welche im Einklang mit den hier vorgestellten Daten stehen würde.

In die Entwicklung des Proepikards sind folglich BMP und FGF involviert, jedoch haben beide Signale unterschiedliche Funktionen. Während eine definierte BMP-Konzentration für die Expression proepikardialer Marker verantwortlich ist (Schlueter et al., 2006), gibt es keinen Hinweis darauf, dass FGF eine induzierende Rolle, beziehungsweise eine Rolle in der Rekrutierung von Zellen für die Proepikardentwicklung spielt. Vielmehr sind FGF-Signale für das Wachstum und Überleben der spezifizierten proepikardialen Zellpopulation wichtig. Es besteht demnach eine Kooperation zwischen BMP-Signalen, die für die Spezifizierung von Proepikardzellen notwendig sind, und FGF-Signalen, die für die Expansion der spezifizierten Zellen benötigt werden.

## 6.2 Die proepikardiale Expression von Wnt

Die Familie der Wnt-Signalfaktoren hat zusammen mit BMP und FGF eine essentielle Funktion für die Induktion des kardialen Mesoderms (Klaus und Birchmeier, 2009; Pandur et al., 2002; Sheldahl et al., 2003). Da gezeigt werden konnte, dass neben Bmp-Signalen auch FGF eine wichtige Funktion in der proepikardialen Entwicklung hat, ist eine Rolle von Wnt-Faktoren für die Entwicklung der Vorläuferzellpopulation am venösen Pol sehr wahrscheinlich. Wnt-Signalfaktoren sind sezernierte Glykoproteine, die in einer Reihe von Entwicklungsprozessen wie Differenzierung, Proliferation, Migration und Zellpolarität impliziert werden (Cadigan und Nusse, 1997). Die diversen Wnt-Aktivitäten werden durch verschiedene Signalwege vermittelt: (1) dem kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg und den nicht-kanonischen (2) Wnt/ $\text{Ca}^{+2}$ - und (3) Wnt/PCP-Signalwegen (Miller et al., 1999; Kühl et al., 2000; Tada et al., 2000; Veeman et al., 2003; Gordon und Nusse, 2006). Um Wnt-Faktoren zu identifizieren, die während der Proepikardentwicklung exprimiert werden, wurden degenerierte *Primer* eingesetzt, die alle bekannten Wnt-Gene amplifizieren (Kusserow et al., 2005). Mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes wurden *WNT4*, *WNT5A* und *WNT11* kloniert und deren Expression zum Zeitpunkt der Induktion und weiteren Entwicklung des Proepikards untersucht. Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung konnte nur für *WNT5A* eine Expression im Proepikard nachgewiesen werden. Allerdings keine differentielle Expression im *Sinus venosus* zum HH Stadium 14. Das bedeutet, dass *WNT5A* also nicht in den gerade spezifizierten proepikardialen Zellen exprimiert wird. *WNT5A* unterscheidet sich somit von anderen proepikardialen Markergenen (*TBX18*, *CFC*, *WT1*, *Epicardin*), die bereits kurz nach der Induktion im Proepikard exprimiert werden. Das heißt, *WNT5A* wird erst zu einem Stadium exprimiert, in welchem diese Zellen einen höheren Reifegrad (Epithelialisierungsprozess) erreicht haben. Interessanterweise gehört *WNT5A* zur Gruppe der nicht-kanonischen Wnt-Liganden und wird im gastrulierenden Hühnerembryo in die Regulation von Zellmigration impliziert (Hardy et al., 2008). Zudem zeigt die Zebrafischmutante *ppt* (*pipetail*) eine Funktion von Wnt5 in der posterioren Elongation und Konvergenz-Extensionsbewegungen des Embryos (Kilian et al., 2003; Rauch et al., 1997). Allgemein spielen nicht-kanonische Wnt-Signale eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle oder Regulation von Migration und Zellpolarität. Die Zellpolarität und asymmetrische Zellteilung sind fundamentale Merkmale aller lebenden Zellen und in der embryonalen Entwicklung essentiell für die Etablierung epithelialer Zellmorphologie. Die Polarität von Epithelzellen wird vor allem durch PAR (*partitioning-defective*)-Proteine vermittelt (Martin-

Belmonte und Mostov, 2008). Da das Proepikard unter anderem auch aus einer äußeren Lage von Epithelzellen besteht und *WNT5A* in diesen Zellen und auch im bereits ausgebildeten Epikard exprimiert wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass *WNT5A* in die Aufrechterhaltung epithelialer Polarität in diesen Zellen involviert ist, beziehungsweise in dessen Migrationsverhalten. *Wnt11* ist in Frosch, Zebrafisch und Huhn ebenfalls für die normale Zellmigration während der Gastrulation unabdingbar. Im *Xenopus* führt der Verlust von *Wnt11*, wie zum Beispiel in der Zebrafischmutante *slb* (*silberblick*), zu defekten Konvergenz-Extensionsbewegungen (Tada und Smith, 2000; Heisenberg et al., 2000). Vor kurzem konnte außerdem gezeigt werden, dass *WNT11* im Huhn während der Gastrulation für die Migration von Zellen während der Mesodermbildung wichtig ist und später im Herzen exprimiert wird (Hardy et al., 2008). Auch die Aktivierung eines nicht-kanonischen Wnt-Signalweges durch *Wnt11* ist im *Xenopus* für die Herzinduktion notwendig (Pandur et al., 2002). Da die kardiale *WNT11*-Expression im Huhn jedoch nur im primitiven Herzschlauch zu detektieren ist, also in Zellen des primären Herzfeldes, die nicht den Einflusstrakt des Herzens bilden, der proepikardiale Zellen beinhaltet, wäre dadurch eventuell zu erklären, warum *WNT11* nicht im Proepikard zu detektieren ist. Der Umstand, dass *WNT11* aus Gewebe des *Sinus venosus* kloniert wurde, dort aber mittels *in situ* Hybridisierung nicht detektiert werden konnte, ist am einfachsten durch Kontamination der Präparation durch Myokard zu erklären. Es ist jedoch auch möglich, dass die Expression unterhalb der Schwelle liegt, die durch *in situ* Hybridisierung detektierbar ist. Aber auch nicht-kanonische Wnt-Signale können in der Migration kardialen Mesoderms eine Rolle spielen. So ist *WNT3A*-Expression im Primitivstreifen für die Migration kardialer Progenitoren durch einen neuen RhoA-abhängigen (PCP/Wnt-Signalweg) Mechanismus verantwortlich, der die laterale Spezifizierung der Herzvorläuferzellen nicht beeinflusst (Münsterberg und Yue, 2008). Die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges durch kanonische Wnt-Signale scheint jedoch für Proepikardzellen nicht von Bedeutung zu sein. Denn in der Maus führt der Verlust von  $\beta$ -Catenin in proepikardialen Zellen zwar zu einem gravierenden Epikarddefekt und dadurch zu embryonaler Letalität, jedoch wird die Proepikardbildung selbst und die Migration der PE-Zellen auf das embryonale Herz nicht beeinflusst (Zamora et al., 2007). Da *Wnt4* wie *Wnt3a* den kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktiviert und myogene Proliferation und Differenzierung stimuliert (Takata et al., 2007; Ikey und Takada, 1998), könnte man vermuten, dass dieser Ligand im *Sinus venosus* zusammen mit BMP die Rekrutierung mesothelialer Zellen in die myokardiale Linie beeinflusst. Jedoch ist *Wnt4* beispielsweise



auch in die epitheliale Transformation metanephridischen Mesenchyms in den sich entwickelnden Nieren involviert (Kispert et al., 1998). Die Expression und Funktion von Wnt4 in der Einflussbahn des Herzens muss demzufolge noch genauer analysiert werden.

Um den Einfluss von Wnt-Signalen auf die Proepikardentwicklung weiter aufzuklären, wäre die Bestimmung der Expression von Frz-Rezeptoren aufschlussreich. Überdies könnte die Funktion von Wnt-Signalen in Proepikardexplantaten, wie bereits für BMP (Schlueter et al., 2006) und FGF (diese Arbeit) analysiert, *in vitro* durch die Verwendung von Inhibitoren manipuliert und deren Bedeutung für proepikardiale Zellen im Zusammen mit BMP und FGF bestimmt werden. Durch die Verwendung eines dominant negativen *Dsh*-Konstruktes könnte die Wnt-Funktion während der Proepikardentwicklung *in vivo* analysiert werden (Hardy et al., 2008). Es wäre überdies interessant zu prüfen, ob die Expression von PAR-Proteinen durch die Manipulation von Wnt-Signalen in epithelialen Proepikardzellen beeinflusst wird.

### 6.3 Die asymmetrische Proepikardentwicklung

#### 6.3.1 Die unilaterale Expression von Apoptose-Faktoren vor und während der Proepikardentwicklung

Die Proepikardentwicklung im Huhn verläuft asymmetrisch, wobei auf dem rechten Sinushorn des venösen Herzpols eine stark proliferierende zottentragende Struktur entsteht, während sich auf dem linken Sinushorn zeitlich verzögert eine Proepikardanlage bildet, die aber nicht an der Epikardbildung beteiligt ist (Männer et al., 2001; Schulte et al., 2007). Diese unilaterale Entstehung des Proepikards ist auch durch die differentielle Expression von Proepikardmarkern gekennzeichnet, für die eine Rolle in der Etablierung des Proepikards postuliert wird. So wird im Hühnerembryo *TBX18*, als frühester proepikardialer Marker, im HH Stadium 11-12 im rechten Sinushorn exprimiert, bereits vor der morphologischen Evidenz der ersten proepikardialen Bläschen, die erst im HH Stadium 14 sichtbar werden (Schlueter et al., 2006; Männer et al., 2001). Verzögert, zu einem Zeitpunkt an dem die rechtsseitige PE-Anlage bereits ausgewachsen ist und eine starke *TBX18*-Expression aufweist, wird auch auf dem linken Sinus eine weitaus kleinere *TBX18*-Expressionsdomäne sichtbar, welche jedoch nie die Größe der rechten Domäne erreicht (Schlueter et al., 2006). Da die Entstehung einer linksseitigen Proepikardanlage induziert wird, diese aber verkümmert, wurde in den Untergang proepikardialer Zellen auf dem linken Sinushorn der Apoptoseprozess impliziert. Mittels BrdU-Inkorporation und der Detektion aktiver Caspase 3-

Aktivität konnte das asymmetrische Wachstum der Proepikardanlagen detektiert und ab dem HH Stadium 15 die Induktion von Apoptose im linken Sinushorn nachgewiesen werden (Schlüter, Dissertation 2008, Universität Würzburg). In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine Transkriptomanalyse die Induktion von Genen, die in die Apoptoseregulation involviert sind, auf der linken Seite des Einflusstraktes bestätigt. Interessanterweise konnte hierbei die asymmetrische Expression von *CASP2*, *BNIP3*, *DIABLO*, *HTATIP2* und *SIVA1* im linken Sinushorn bereits im HH Stadium 13-14 detektiert werden. Für einige dieser Faktoren konnte diese frühe differentielle Expression mittels *in situ* Hybridisierung verifiziert werden. Dies zeigt eine gewisse Parallele zu der Expression von Proepikardmarkern. Denn wie diese, werden auch die Apoptose-Faktoren bereits vor ihrem morphologisch sichtbaren Effekt exprimiert, was deren Bedeutung für die unilaterale Proepikardentwicklung im Huhn unterstreicht. Ein weiterer Aspekt, der zunächst in der *in situ* Hybridisierung älterer Entwicklungsstadien (HH15, HH18) offensichtlich wurde und teils durch *Real time* PCR belegt werden konnte, ist, dass die Expression der Apoptosemarker offenbar während der Proepikardentwicklung hochreguliert wird. Vor allem die Expression von *CASP2* und *HTATIP2* nimmt mit Einsetzen der verzögerten Bildung der linksseitigen PE-Anlage im linken Sinushorn zu. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass der Apoptoseprozess parallel zur Induktion der linksseitigen PE-Anlage verstärkt wird, beziehungsweise, in Bezug auf die Expression von *BNIP3*, *DIABLO* und *SIVA1*, die Expression aller Apoptose-Faktoren im linken Sinus während der Proepikardentwicklung erhalten bleibt, was zur Reduktion des proepikardialen Wachstums auf der linken Seite führt. Da nicht nur im Huhn, sondern auch im Frosch, eine unilaterale Proepikardentwicklung beobachtet wird (Jahr et al., 2008), wäre es interessant zu analysieren, ob auch in diesem Organismus auf der linken Seite des Einflusstraktes Apoptose induziert wird. Zwischen der asymmetrischen Proepikardbildung und der Epikardialisierung des Herzens vergehen im Frosch jedoch nur circa 10 Stunden und so konnte noch nicht geklärt werden, ob überhaupt eine retardierte linksseitige Proepikardanlage ausgebildet wird, die eventuell durch Apoptose reduziert werden muss. In anderen Vertebraten wie der Maus, den Fischen oder dem kieferlosen Meeresneunauge kommt es dagegen zur Bildung bilateraler Proepikardanlagen (Schulte et al., 2007; Serluca, 2008; Munoz-Chapuli et al., 1994; Pombal et al., 2008), so dass die Induktion von Apoptose während der Proepikardentwicklung in diesen Organismen vermutlich keine Rolle spielt.

### 6.3.2 Die unilaterale Expression von Caspase 2 im *Sinus venosus* unterliegt einem L/R-Signalweg

Die unilaterale Proepikardentwicklung in Huhn und Frosch lässt vermuten, dass proepikardiale Zellen zu einem gewissen Zeitpunkt einem Signalweg zur Etablierung der L/R-Asymmetrie unterliegen. Während der frühen Embryonalentwicklung des Huhns wird die linke Seite des Embryos durch den NODAL/PITX2-Signalweg festgelegt, der auf der rechten Seite reprimiert wird. Die linksseitige Signalkaskade wird am Hensenschen Knoten durch die asymmetrische Expression von *SHH* auf der linken Seite initiiert. Dadurch wird am Knoten die Expression des TGF $\beta$ -Faktors *NODAL* induziert, welcher sich mit der Hilfe des Kompetenzfaktors CFC in der lateralen Platte selbst induzieren kann (Schlange et al., 2002). Das NODAL-Signal breitet sich anschließend in antero-posteriorer Richtung aus und induziert die Expression von *PITX2* und *BAPX1* (Schneider et al., 1999). Demzufolge ist die linke Seite des Embryos durch *PITX2*-Expression gekennzeichnet, wogegen die rechte Seite keine Expression von *PITX2* aufweist. Dies wird durch die aktive Repression des linksseitigen Programms mittels *SNAI1* auf der rechten Seite erreicht (Patel et al., 1999). *SNAI1* wiederum wird durch die Aktivität von FGF8 auf der rechten Seite des Hensenschen Knotens induziert (Isaac et al., 1997). Für die proepikardiale Asymmetrie im Hühnerembryo konnte gezeigt werden, dass diese von einem rechtsseitigen Signalweg kontrolliert wird, der FGF8 und *SNAI1* involviert, während der NODAL/PITX2-Signalweg die Lateralität des Proepikards nicht beeinflusst (Schlueter und Brand, 2009). Obwohl der linksseitige NODAL/PITX2-Signalweg offensichtlich keine Bedeutung für die Induktion des Proepikards hat, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dieser in der Induktion der linksseitigen Apoptose eine Rolle spielt. Um zu untersuchen, wie die linksseitige asymmetrische Expression von Apoptose-Faktoren während der Proepikardentwicklung etabliert wird, wurde deshalb versucht während der frühen Embryonalentwicklung links- beziehungsweise rechtsseitige Determinanten zu stören und daraufhin die Expression von Apoptosegenen zu analysieren. Als Marker wurde hierfür *CASP2* verwendet, das eine stabile Expression zu frühen und späten Entwicklungsstadien während der Proepikardentwicklung zeigt. Durch die Implantation von FGF8 auf die linke Seite des Knotens konnte ein Verlust der *CASP2*-Expression im linken Sinus beobachtet werden. Embryonen mit linksseitiger FGF8-Implantation zeigen zudem keine Expression von *PITX2*, woraus zu schließen ist, dass sich keine linksseitige Identität ausbildet (Schlueter und Brand, 2009). Diese Befunde würden zunächst darauf hindeuten, dass die Induktion von Apoptose auf der linken Seite dem

NODAL/PITX2-Signalweg unterliegt. Da jedoch die Überexpression von *PITX2* in prospektiven Proepikardzellen im HH Stadium 10 keine Apoptose in Proepikardzellen induziert, können die Daten unterschiedlich interpretiert werden: Zum einen wäre es denkbar, dass die Überexpression von *PITX2* auf der rechten Seite zum hier gewählten Zeitpunkt (HH Stadium 10) keinen Einfluss mehr auf das rechtsseitige Programm hat, das die Induktion von Apoptose auf der rechten Seite nicht beinhaltet. Um dies weiter zu untersuchen, wäre es wichtig, *PITX2* auf der linken Seite zu inhibieren, um die Funktion von *PITX2* für die linksseitige Apoptoseinduktion genauer zu bestimmen. Weiterhin könnte durch Implantation von FGFR-Zellen auf der rechten Seite des Knotens FGF8 direkt inhibiert werden und dadurch früher eine Manipulation des rechtsseitigen Signalweges erreicht werden. Andererseits wäre es ebenfalls möglich, dass durch die FGF8-Implantation auf der linken Seite ein anderer noch unbekannter Faktor inhibiert wird, der unabhängig von NODAL/PITX2 die linksseitige Expression von *CASP2* kontrolliert. Die in dieser Arbeit gezeigten Befunde sind somit wegweisend, können jedoch noch nicht eindeutig klären welcher der L/R-Signalwege für die unilaterale Expression der Apoptosemarker während der Proepikardentwicklung zuständig ist.

#### **6.4 Die Expression kardialer Marker in der Herzfeldregion wird durch FGF moduliert**

FGF-Signale haben während der Embryonalentwicklung diverse Funktionen und multiple Expressionsdomänen und sind neben der Etablierung der L/R-Asymmetrie im Hühnerembryo unter anderem auch für die Migration, Induktion und Differenzierung kardialen Mesoderms verantwortlich (Crossley und Martin, 1995; Barron et al., 2000; Alsan und Schultheiss, 2002). Nach der Bildung und Spezifizierung der bilateralen Herzfelder ist die Herzfeldregion durch die Expression kardialer Markergene wie *NKX2.5* gekennzeichnet (Brand, 2003). Kürzlich wurde in der herzbildenden Region des Hühnerembryos auch die Expression von *HAS2*, einem Enzym zur Produktion des extrazellulären Hyaluronan, nachgewiesen (Klewer et al., 2006). Hyaluronsäure ist in der Embryonalentwicklung für die positive Stimulierung von Zellmigration und Organogenese essentiell und auch in der Herzentwicklung von Bedeutung (Brown und Papaioannou, 1993; Fenderson et al., 1993; Camenisch et al., 2000). Da in einer Transkriptomanalyse beobachtet wurde, dass die *HAS2*-Expression im Gesichtsmuskel des Huhns von FGF moduliert wird, wurde im Rahmen einer Kollaboration mit Prof. Dr. A.

Neubüser (Universität Freiburg) untersucht, inwieweit FGF die *HAS2*-Expression in der Herzfeldregion kontrolliert. Um zunächst die hinreichende Funktion von FGF auf die kardiale Markergenexpression zu überprüfen, wurden FGF8- beziehungsweise FGF2-Trägerperlen lateral, medial oder direkt in das Herzfeld von gastrulierenden Hühnerembryonen implantiert und daraufhin die *HAS2*-Expression und zu Kontrollzwecken die Expression von *NKX2.5* analysiert. Wie zuvor von Alsan und Schultheiss gezeigt, wird durch ektopisches FGF8 lateral der Herzfeldregion die Expression von *NKX2.5* induziert und medial nicht beeinflusst. Die Kardiogenese findet also nur in Regionen statt, in denen BMP und FGF ko-exprimiert werden (Alsan und Schultheiss, 2002). Da BMP2/4-Expression in der lateralen Region des Embryos vorliegt, jedoch nicht medial des Herzfeldes (Andree et al., 1998), kann lateral der eigentlichen FGF8-Expressionsdomäne *NKX2.5* induziert werden medial davon jedoch nicht. Die beobachtete Inhibition von *NKX2.5* durch FGF8 könnte durch die Überschreitung des Schwellenwertes zur kardialen Induktion erklärt werden. Eine andere Forschergruppe sah jedoch nach dem Einbringen von FGF8 in das Herzfeld keine Inhibition der *NKX2.5*-Expression, sondern nur die des kardialen Markergens *GATA4* (Wittler, Dissertation, Göttingen 2002). Dies allerdings steht wiederum im Gegensatz zu dem Befund, dass *GATA4* offensichtlich von BMP- jedoch nicht von FGF-Signalen reguliert wird (Alsan und Schultheiss, 2002). Durch die Implantation von FGF2-Protein war in jedem Fall derselbe Effekt zu beobachten wie durch FGF8, was für die redundante Wirkung der Wachstumsfaktoren spricht. Interessanterweise zeigte nun die *HAS2*-Expression denselben Effekt auf ektopisches FGF wie *NKX2.5*, was daraufhin weist, dass die Expression von *HAS2* in der herzbildenden Region wie die von *NKX2.5* durch FGF-Signale kontrolliert wird.

Nachfolgend wurden Experimente durchgeführt, die den distinkten Verlust von FGF-Aktivität in der Herzfeldregion zum Ziel hatten. Dazu wurden Zellaggregate implantiert, die Ligandenbindungsdomänen des FGFR1, FGFR2 oder FGFR4 sezernieren. Nur die Inhibition von FGF-Signalen durch FGFR2- beziehungsweise FGFR4-sezernierende Zellen konnte die Induktion der *NKX2.5*- und *HAS2*-Expression in der herzbildenden Region verhindern. Die Konkurrenz des FGFR1 dagegen hatte keinen Einfluss auf die Expression der kardialen Markergene. Ein wichtiger Befund hierfür ist die Beobachtung, dass zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung in präkardialen Mesoderm und darunterliegendem Endoderm des Hühnerembryos nur FGFR2 und FGFR4 exprimiert werden (Lunn et al., 2006). Demzufolge scheinen FGF-Signale in der herzbildenden Region nicht über den FGFR1 vermittelt zu werden. Hierdurch könnte auch erklärt werden, warum Alsan und Schultheiss durch die

Verwendung des FGFR1-Inhibitors SU5402 die Kardiogenese *in vivo* nicht inhibieren konnten (Alsan und Schultheiss, 2002). Dass die Expression kardialer Marker darüber hinaus nicht mit der Applikation eines FGF8-Antikörpers noch der Implantation von FGFR4-sezernierenden Zellen verhindert wurde, wäre mit der redundanten Wirkung von FGF-Signalen beziehungsweise einer nicht effizienten Expression der FGF-Ligandenbindungsdomänen zu erklären. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Produktion der FGFR-Ligandenbindungsdomänen im Zellüberstand der transfizierten Zellen nachgewiesen (Abb. 10, S.79).

Durch die Inhibition der *NKX2.5*-Expression, nach dem Verlust von FGF-Signalen in der herzbildenden Region, konnte noch einmal die Bedeutung von FGF für die Induktion der Kardiogenese bestätigt werden. Diese Studien zeigen überdies, dass *HAS2*-Expression wie die von *NKX2.5* durch FGF-Signale moduliert wird. Da die Expression von *NKX2.5* nicht nur von FGF sondern auch von BMP abhängig ist, wäre es denkbar, dass dies auch für die Expression von *HAS2* zutrifft. Jedoch wurde gezeigt, dass *HAS2*-Expression durch die Inhibition von BMP offenbar nicht beeinflusst wird (Klewer et al., 2006). Dies ist im Zusammenhang mit *NKX2.5* verwunderlich, jedoch kein Novum, da nicht alle Aspekte der frühen Herzentwicklung BMP-abhängig sind und einige kardiale Gene wie *Tbx5* und *cTNT* ebenfalls BMP-unabhängig agieren (Antin et al., 2002; Yamada et al., 2000). Die Modellvorstellung, dass FGF von BMP reguliert wird (Alsan und Schultheiss, 2002), steht jedoch im Widerspruch zu dem Befund, dass die Expression von *HAS2* nicht von BMP abhängig ist. Es wäre denkbar, dass die Positionierung und Dauer der Zellaggregatimplantation in der Arbeit von Klewer et al. der Grund für die Diskrepanz dieser Datensätze verantwortlich ist. Durch die unterschiedliche Positionierung von Implantaten entlang der mediolateralen Achse des embryonalen Herzfeldes sind durchaus verschiedene Effekte auf die Expression von kardialen Markergenen zu beobachten, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wird.

## 6.5 Die frühe Kardiogenese und Proepikardiogenese - regulatorische Netzwerke der Herzentwicklung

Obwohl in der vorliegenden Arbeit verschiedene Aspekte der Proepikard- und frühen Herzentwicklung betrachtet wurden, stehen diese dennoch miteinander in Verbindung. In Bezug auf bereits veröffentlichte Daten kann ein Arbeitsmodell zur Proepikardentwicklung im Hühnerembryo entworfen werden, dem die frühe Herzentwicklung zu Grunde liegt (Abb.26).

Das Proepikard entsteht als multipotente Vorläuferzellpopulation am venösen Pol des embryonalen Herzens. Proepikardiale Zellen bilden nach der Epikardialisierung des Myokards unter anderem das koronare Blutgefäßsystem. Ein Charakteristikum der Proepikardentwicklung im Huhn ist die unilaterale Entstehung der Proepikardanlage. Nach der differentiellen Induktion proepikardialer Markergene wird auf der rechten Seite des Einflusstraktes eine stark proliferierende villöse Proepikardstruktur gebildet, wogegen die Bildung einer Proepikardanlage auf der linken Seite temporär retardiert ist und schließlich durch Apoptose entfernt wird. Eine wesentliche Rolle für den Erhalt der Proliferationsaktivität und das Überleben proepikardialer Zellen auf der rechten Seite spielen FGF-Liganden. Es wurde gezeigt, dass verschiedene FGF-Liganden (*FGF2*, *FGF10*) und FGF-Rezeptoren im Proepikard exprimiert werden und es durch den experimentell-induzierten Verlust von FGF-Signalen zu einer Wachstumsblockade des Proepikards durch Reduktion der Proliferation und gleichzeitig einer Induktion von Apoptose kommt, wobei die proepikardspezifische Expression von Markergenen nicht beeinflusst wird. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass FGF-Liganden während der Proepikardentwicklung als autokrine oder parakrine Wachstumsfaktoren agieren, um das Überleben zu sichern, die Proliferation aufrechtzuerhalten und das villöse Wachstum des Proepikards zu stimulieren, jedoch nicht für die Induktion oder Aufrechterhaltung proepikardspezifischer Markergenexpression verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu sind BMP-Signale, die im Sinusmyokard (*BMP2*) und dem Proepikard (*BMP4*) exprimiert werden, für die proepikardiale Identität essentiell (Schlueter et al., 2006). Der exakte Mechanismus zur Proepikardinduktion am venösen Pol bleibt jedoch vorerst ungeklärt. Da sich das Proepikard aus mesothelialen Zellen entwickelt, die sich in räumlicher Nähe zu der Leberanlage und dem sinoatrialen Myokard befinden, könnten beide Strukturen in der Induktion proepikardialer Identität eine Rolle spielen (Männer, 2006). Wird beispielsweise die Leberanlage eines Wachtelembrs explantiert und in die posterior-laterale Region eines Hühnerembryos implantiert, kommt es zu der Induktion

einiger Proepikardmarker in räumlich benachbarten Mesodermzellen (Ishii et al., 2007). Die Identifizierung von Molekülen zur Vermittlung einer Proepikard-induzierenden Aktivität des Leberprimordiums steht jedoch noch aus. Nach Induktion und Wachstum proepikardialer Zellen, vermittelt durch BMP und FGF, scheinen auch Wnt-Signale für die Proepikardentwicklung von Bedeutung zu sein. So konnte in dieser Arbeit erstmals in den Proepikardzellen die Expression des Wnt-Liganden *WNT5A* identifiziert werden. Die Aktivierung nicht-kanonischer Wnt-Signalwege könnte die Polarität proepikardialer Epithelzellen und deren Migrationsverhalten kontrollieren.

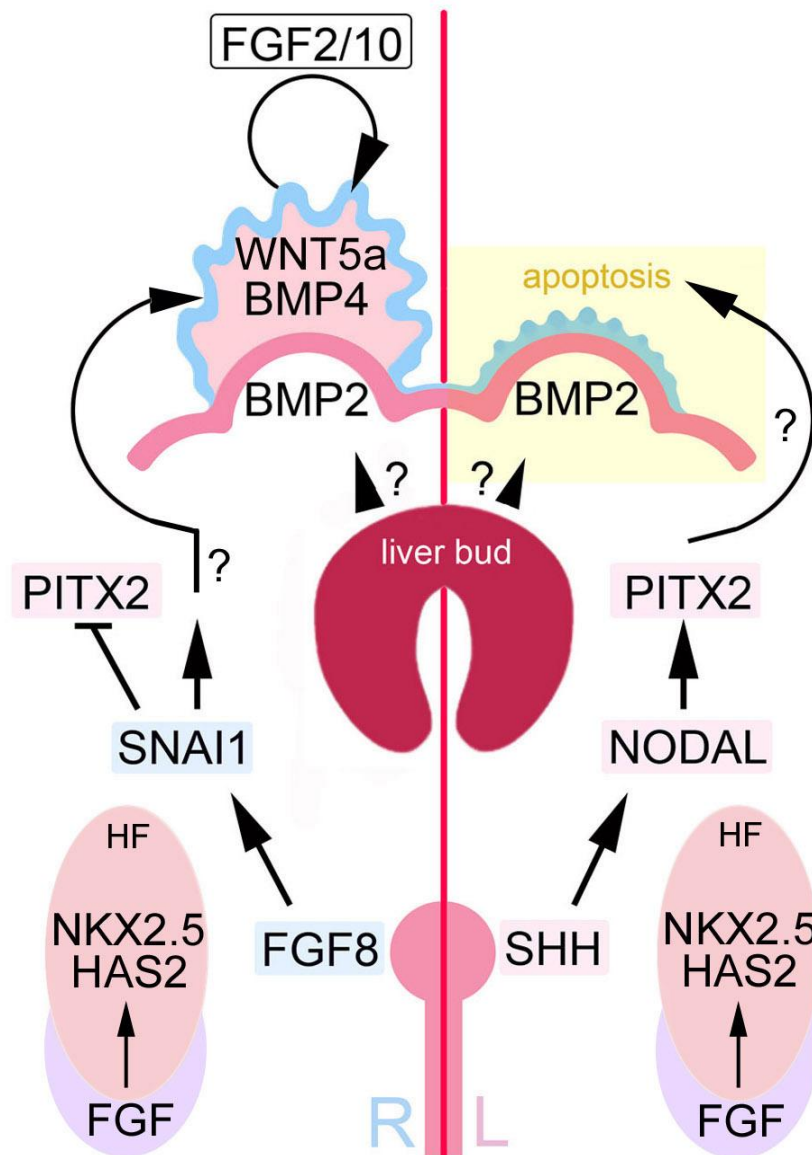
FGF-Signale spielen überdies nicht nur für das Wachstum und Überleben proepikardialer Zellen eine Rolle, sondern sind auch in die Induktion der asymmetrischen Proepikardanlage involviert. Demnach ist die rechtsseitige Expression von *FGF8* am Hensenschen Knoten und die darauf folgende Induktion von *SNAIL* im rechten lateralen Plattenmesoderm für die asymmetrische Entwicklung des Proepikards auf der rechten Seite im Huhn verantwortlich (Schlueter und Brand, 2009). Der linksseitige NODAL/PITX2-Signalweg dagegen ist hierin nicht involviert. Trotzdem könnte PITX2 für die Apoptoseinduktion auf der linken Seite bedeutend sein. Es wurde gezeigt, dass durch ektopische Gabe von FGF8 auf der linken Seite des Knotens die unilaterale Expression von Apoptosemarkern im linken Sinushorn verloren geht. Da jedoch nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob PITX2 auf der linken Seite notwendig und auf der rechten Seite hinreichend ist, um Apoptose zu induzieren, bleibt noch zu analysieren, welcher L/R-Signalweg nun genau für die asymmetrische Expression von Apoptosemarkern verantwortlich ist. Durch die detaillierte Analyse der linksseitig induzierten Apoptose konnte zudem festgestellt werden, dass die Expression von Apoptosemarkern auf der linken Seite bereits einige Stadien vor der eigentlichen Detektion von apoptotischen Zellen nachzuweisen ist und somit der Expression von Proepikardmarkern auf der rechten Seite gleicht.

Proepikardiale Zellen entwickeln sich auf dem *Sinus venosus* und es besteht demnach die Möglichkeit, dass proepikardiale Vorläufer aus ähnlichen Regionen wie Sinusmyokardzellen stammen und dementsprechend in den Randbereichen des lateralen Plattenmesoderms anzutreffen sind (Moorman et al., 2007; Redkar et al., 2001). Proepikardzellen können also wie Myokardzellen als Derivate des lateralen Plattenmesoderms angesehen werden, wonach die Bildung der bilateralen Herzfeldregion als Grundlage der Proepikardentwicklung anzusehen ist. In der Induktion kardialen Mesoderms spielt ein ähnliches Set von Signalmolekülen eine Rolle wie bei der Proepikardentwicklung. Hiernach ist die Expression



kardialer Markergene wie *NKX2.5* unter anderem von FGF, BMP und Wnt-Signalen abhängig (Schultheiss et al., 1995; Klaus und Birchmeier, 2009). Durch den hier beobachteten Verlust von *NKX2.5*-Expression nach Inhibition von FGF konnte nochmals die Wichtigkeit von endodermalen FGF-Signalen für die Induktion des kardialen Mesoderms bestätigt werden. Zudem könnte angenommen werden, dass die Expression kardialer Marker von der Produktion extrazellulärer Matrix abhängig ist, da durch den Verlust von FGF-Signalen ebenfalls die Expression von *HAS2* beeinflusst wird, einem Enzym das Hyaluronsäure produziert. Es bleibt jedoch zu klären wie BMP-Signale in diesen Prozess integriert sind, da die Expression von *HAS2* BMP-unabhängig zu sein scheint, umgekehrt jedoch die *BMP*-Expression von *HAS2* abhängen könnte (Klewer et al., 2006; Walsh und Stainier, 2001) und BMP-Signale wiederum FGF regulieren (Alsan und Schultheiss, 2002). Da die Rolle von BMP in der vorliegenden Arbeit nicht adressiert wurde, kann dieser Widerspruch nur durch weitere Studien aufgeklärt werden.

Es wird erkenntlich, dass FGF-Signale zusammen mit BMP- und WNT-Signalen während der gesamten Herz- und Proepikardentwicklung eine essentielle Rolle spielen. Nun gilt es die bereits identifizierten Faktoren von der frühen Determinierung der Herzvorläuferzellen bis zur Entwicklung des Proepikards und Epikards miteinander zu vernetzen. Dadurch könnte ein grundlegender Beitrag zum Verständnis der kontinuierlichen Entwicklung von Organanlagen geleistet werden. Mit Blick auf das Differenzierungspotential proepikardialer Zellen, ist das Verständnis der Proepikardentwicklung auch von therapeutischem Nutzen, da das Herz höherer Vertebraten nicht in der Lage ist, sich selbst zu regenerieren. Eine Ausnahme ist der myokardiale Heilungsprozess in Fischen, wobei nach der Verletzung des Myokards eine FGF-abhängige Proliferations- und Migrationsaktivität epikardialer Zellen zur Bildung neuer Blutgefäße beiträgt (Lepilina et al., 2006). Die Fähigkeit epikardialer Zellen zur Neovaskulierung wurde ebenfalls in der Maus beobachtet (Smart et al., 2007). Überdies konnte jedoch weder durch Zellschicksalsanalysen noch in Wachtel-Huhn-Chimären der Beitrag proepikardialer Zellen zum Arbeitsmyokard beobachtet werden (Mikawa und Gourdie, 1996; Männer, 1999). Kürzlich veröffentlichte Datensätze in der Maus weisen einen Beitrag proepikardialer Zellen zur Myozytenlinie nach (Cai et al., 2008), was jedoch für *Tbx18* kürzlich als Artefakt identifiziert wurde (Christoffels et al., 2009). Aufgrund bislang verfügbarer Daten haben proepikardiale beziehungsweise epikardiale Zellen offenbar das Potential, für therapeutische Applikationen zur Verfügung zu stehen. Um diesem Ziel näher zu kommen, bedarf es allerdings noch weiterer intensiver Forschung auf diesem Gebiet.



**Abb.26 - Funktionen von FGF während der frühen Herzentwicklung im Hühnerembryo**

Während der frühen Entwicklung der Herzfelder spielt im unterliegenden Endoderm exprimiertes FGF eine wichtige Rolle bei der Spezifizierung des kardialen Mesoderms (Alsan und Schultheiss, 2002). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist FGF für die Expression von *NKX2.5* und *HAS2* in den Herzfeldern notwendig. Die Proepikardbildung im Hühnerembryo ist bilateral asymmetrisch und führt zur Bildung eines Proepikards auf der rechten Seite (Männer et al., 2001). Auf der linken Seite bildet sich eine stark reduzierte Proepikardstruktur. Die rechtsseitige Proepikardbildung steht unter anderem unter der Kontrolle von *FGF8*, das asymmetrisch rechtsseitig am Knoten exprimiert wird (Schlueter et al. 2009). Die Induktion proepikardialer Identität involviert BMP (BMP2/4) (Schlueter et al. 2006) und eventuell weitere bislang unbekannte sezernierte Moleküle der Leberanlage (Ishii et al. 2007). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte sind FGF-Signale (FGF2/FGF10) für das Wachstum und Überleben proepikardialer Zellen essentiell. Darüberhinaus wird WNT5a im Proepikard exprimiert und ist möglicherweise für die Polarität proepikardialer Epithelzellen verantwortlich. HF=Herzfeld; R=rechts; L=links

## 7 Literaturverzeichnis

**Abu Issa, R., Kirby, M. L.** (2007). Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 45-68.

**Abu-Issa, R., Kirby, M. L.** (2008). Patterning of the heart field in the chick. *Dev Biol.* **319**, 223-33.

**Adams, D. S., Robinson, K. R., Fukumoto, T., Yuan, S., Albertson, R. C., Yelick, P., Kuo, L., McSweeney, M., Levin, M.** (2007). Early, H<sup>+</sup>-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. *Development* **133**, 1657-71.

**Akazawa, H., Komuro, I.** (2005). Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol Ther.* **107**, 252-68.

**Alsan, B. H., Schultheiss, T. M.** (2002). Regulation of avian cardiogenesis by FGF8 signaling. *Development* **129**, 1935-1943.

**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.

**Antin, P. B., Bales, M. A., Zhang, W., Garriock, R. J., Yatskievych, T. A., Bates, M. A.** (2002). Precocious expression of cardiac troponin T in early chick embryos is independent of bone morphogenetic protein signaling. *Dev Dyn.* **225**, 135-41.

**Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschläger, M., Rütger, U., Nordheim, A.** (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J.* **17**, 6289-99.

**Azpiazu, N., Frasch, M.** (1993). tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of Drosophila. *Genes Dev.* **7**, 1325-40.

**Bachler, M., Neubüser, A.** (2001). Expression of members of the Fgf family and their receptors during midfacial development. *Mech Dev.* **100**, 313-6.

**Baliga, B. C., Read, S. H., Kumar, S.** (2004). The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death Differ.* **11**, 1234-41.

**Barron, M., Gao, M., 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.

- Barrow, J. R.** (2006). Wnt/PCP signaling: a veritable polar star in establishing patterns of polarity in embryonic tissues. *Semin Cell Dev Biol.* **17**, 185-93.
- Basson, C. T., Bachinsky, D. R., Lin, R. C., Levi, T., Elkins, J. A., Soultz, J., Grayzel, D., Kroumpouzou, E., Traill, T. A., Leblanc-Straceski, J., Renault, B., Kucherlapati, R., Seidman, J. G., Seidman, C. E.** (1997). Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet.* **15**, 30-5.
- Beiman, M., Shilo, B. Z., Volk, T.** (1996). Heartless, a Drosophila FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev.* **10**, 2993-3002.
- Black, B., Olson, E. N.** (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **14**, 167-96.
- Boardman, P. E., Sanz-Ezquerro, J., Overton, I. M., Burt, D. W., Bosch, E., Fong, W. T., Tickle, C., Brown, W. R., Wilson, S. A., Hubbard, S. J.** (2002). A comprehensive collection of chicken cDNAs. *Curr Biol.* **12**, 1965-9.
- Boatright, K. M., Ratus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., Salvesen, G. S.** (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell.* **11**, 529-41.
- Boatright, K. M., Salvesen, G. S.** (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* **15**, 725-31.
- Bodmer, R.** (1993). The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila. *Development* **118**, 719-29.
- Böttcher, R. T., Pollet, N., Delius, H., Niehrs, C.** (2004). The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signalling. *Nat Cell Biol.* **6**, 38-44.
- Böttcher, R. T., Niehrs, C.** (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev.* **26**, 63-77.
- 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, B. A., O'Brien, M. A., Lockwood, W. L., Goldstein, E. S., Bodmer, R., Taghert, P. H., Abmayr, S. M., Nguyen, H. T.** (1995.) Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev* **9**, 730-41.
- Brade, T., Gessert, S., Kühl, M., Pandur, P.** (2007). The amphibian second heart field: Xenopus islet-1 is required for cardiovascular development. *Dev Biol.* **311**, 297-310.

- 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, R. A., Mohun, T. J., Amaya, E.** (2001). A role for BMP signalling in heart looping morphogenesis in *Xenopus*. *Dev Biol* **232**, 191-203.
- Brown, N. A., Wolpert, L.** (1990). The development of handedness in left/right asymmetry. *Development* **109**, 1-9.
- Brown, J. J., Papaioannou, V. E.** (1993). Ontogeny of hyaluronan secretion during early mouse development. *Development*. **117**, 483-92.
- Bruneau, B. G., Bao, Z. Z., Tanaka, M., Schott, J. J., Izumo, S., Cepko, C. L., Seidman, J. G., Seidman, C. E.** (2000). Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. *Dev Biol*. **217**, 266-77.
- Bruneau, B. G.** (2008). The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* **451**, 943-8.
- Buchberger, A., Pabst, O., Brand, T., Seidl, K., Arnold, H. H.** (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.
- Buckingham, M., Meilhac, S., Zaffran, S.** (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet*. **6**, 826-35.
- Cadigan, K. M., Nusse, R.** (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*. **11**, 3286-305.
- Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., 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.
- Cai, C. L., Martin, J. C., Sun, Y., Cui, L., Wang, L., Ouyang, K., Yang, L., Bu, L., Liang, X., Zhang, X., Stalcup, W. B., Denton, C. P., McCulloch, A., Chen, J., Evans, S M.** (2008). A myocardial lineage derives from *Tbx18* epicardial cells. *Nature*. **454**, 104-8.
- Camarata, T., Bimber, B., Kulisz, A., Chew, T. L., Yeung, J., Simon, H. G.** (2007) LMP4 regulates *Tbx5* protein subcellular localization and activity. *J Cell Biol* **174**, 339-48.
- Camenisch, T.D., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. L., Calabro, A. Jr., Kubalak, S., Klewer, S. E., McDonald, J.A.** (2000). Disruption of

hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest.* **106**, 349-60.

**Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L. A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M. R., Blum, M.** (1999). The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* **126**, 1225-34.

**Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., Nieto, M. A.** (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* **2**, 76-83.

**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.

**Chang, D. W., Ditsworth, D., Liu, H., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Yang, X.** (2003). Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and inflammatory procaspases. *J Biol Chem.* **278**, 16466-9.

**Chapman, S. C., Collignon, J., Schoenwolf, G. C., Lumsden, A.** (2001). Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dyn.* **220**, 284-9.

**Chapman, S. C., Brown, R., Lees, L., Schoenwolf, G. C., Lumsden, A.** (2004). Expression analysis of chick Wnt and frizzled genes and selected inhibitors in early chick patterning. *Dev Dyn.* **229**, 668-76.

**Chen, J. N., van Eeden, F. J., Warren, K. S., Chin, A., Nüsslein-Volhard, C., Haffter, P., Fishman, M. C.** (1997). Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish. *Development* **124**, 4373-82.

**Chen, T. H., Chang, T. C., Kang, J. O., Choudhary, B., Makita, T., Tran, C. M., Burch, J. B., Eid, H., Sucov, H. M.** (2002). Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor. *Dev Biol.* **250**, 198-207.

**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.

**Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**, 156-9.

**Christoffels, V. M., Habets, P. E., Franco, D., Campione, M., de Jong, F., Lamers, W. H., Bao, Z. Z., Palmer, S., Biben, C., Harvey, R. P., Moorman, A. F.** (2000). Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* **223**, 266-78.

**Christoffels, V. M., Keijser, A. G., Houweling, A. C., Clout, D. E., Moorman, A. F.** (2000b). Patterning the embryonic heart: identification of five mouse Iroquois homeobox genes in the developing heart. *Dev Biol.* **224**, 263-74.

**Christoffels, V. M., Hoogaars, W. M., Tessari, A., Clout, D. E., Moorman, A. F., Campione, M.** (2004). T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. *Dev Dyn.* **229**, 763-70.

**Christoffels, V. M., Grieskamp, T., Norden, J., Mommersteeg, M. T., Rudat, C., Kispert, A.** (2009). Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature* **458**, E8-9.

**Ciruna, B., Rossant, J.** (2001). FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell.* **1**, 37-49.

**Colas, J. F., Lawson, A., Schoenwolf, G. C.** (2000). Evidence that translation of smooth muscle alpha-actin mRNA is delayed in the chick promyocardium until fusion of the bilateral heart-forming regions. *Dev Dyn.* **218**, 316-30.

**Collis, L., Hall, C., Lange, L., Ziebell, M., Prestwich, R., Turley, E. A.** (1998). Rapid hyaluronan uptake is associated with enhanced motility: implications for an intracellular mode of action. *FEBS Lett.* **440**, 444-9.

**Collop, A. H., Broomfield, J. A., Chandraratna, R. A., Yong, Z., Deimling, S. J., Kolker, S. J., Weeks, D. L., Drysdale, T. A.** (2006). Retinoic acid signaling is essential for formation of the heart tube in *Xenopus*. *Dev Biol.* **291**, 96-109.

**Crossley, P. H., Martin, G. R.** (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development.* **121**, 439-51.

**Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A., Martin, G. R.** (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell.* **84**, 127-36.

**Dagert, M., Ehrlich, S. D.** (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* **6**, 23-8.

**Darnell, D. K., Schoenwolf, G. C.** (2000). Culture of avian embryos. *Methods Mol Biol.* **135**, 31-8.

**Davidson, B., Shi, W., Beh, J., Christiaen, L., Levine, M.** (2006). FGF signaling delineates the cardiac progenitor field in the simple chordate, *Ciona intestinalis*. *Genes Dev.* **20**, 2728-38.

**Davis, C. L.** (1927). Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. Carnegie Institution of Washington Publication 380. *Contribution to Embryology*, 19, pp 245-283.

**DeAngelis P. L.** (1999). Molecular directionality of polysaccharide polymerization by the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase. *J Biol Chem.* **274**, 26557-62.

**De Haan, R. L.** (1965). Morphogenesis of the vertebrate heart; in De Haan, R. L., Ursprung, H. (eds): *Organogenesis*. New York, Holt, Reinhardt & Winston, pp 377-419.

**de la Cruz, M. V., Sanchez-Gomez, C.** (1998). Straight tube heart. Primitive cardiac cavities vs. primitive cardiac segments; in de la Cruz, M. V., Markwald, R. R. (eds): *Living Morphogenesis of the Heart*. Boston, Birkhäuser, pp 85-98.

**Dell'Era, P., Ronca, R., Coco, L., Nicoli, S., Metra, M., Presta, M.** (2003). Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development. *Circ Res.* **93**, 414-20.

**Delpech, B., Delpech, A., Brückner, G., Girard, N., Maingonnat, C.** (1989). Hyaluronan and hyaluronectin in the nervous system. *Ciba Found Symp.* **143**, 208-20; discussion 221-32, 281-5.

**Dettman, R. W., Pae, S. H., Morabito, C., Bristow, J.** (2003). Inhibition of alpha4-integrin stimulates epicardial-mesenchymal transformation and alters migration and cell fate of epicardially derived mesenchyme. *Dev Biol.* **257**, 315-28.

**Dikic, I., Giordano, S.** (2003). Negative receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol.* **15**, 128-35.

**Ding, J., Yang, L., Yan, Y. T., Chen, A., Desai, N., Wynshaw-Boris, A., Shen, M. M.** (1998). Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo. *Nature.* **395**, 702-7.

**Dodou, E., Verzi, M. P., Anderson, J. P., Xu, S. M., Black, B. L.** (2004). Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development.* **131**, 3931-42.

**Dokic, D., Dettman, R. W.** (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.

**Donovan, J., Kordylewska, A., Jan, Y. N., Utset, M. F.** (2002). Tetralogy of fallot and other congenital heart defects in Hey2 mutant mice. *Curr Biol.* **12**, 1605-10.



- Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L., Moon, R. T.** (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol.* **15**, 2625-34.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X.** (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* **102**, 33-42.
- Duan, H., Dixit, V. M.** (1997). RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature.* **385**, 86-9.
- Edmondson, D. G., Lyons, G. E., Martin, J. F., Olson, E. N.** (1994) Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* **120**, 1251-63.
- Eisenberg, C. A., Eisenberg, L. M.** (1999) WNT11 promotes cardiac tissue formation of early mesoderm. *Dev Dyn* **216**, 45-58.
- Essner, J. J., Amack, J. D., Nyholm, M. K., Harris, E. B., Yost, H. J.** (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.
- Eswarakumar, V. P., Lax, I., Schlessinger, J.** (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 139-49.
- Fenderson, B. A., Stamenkovic, I., Aruffo, A.** (1993). Localization of hyaluronan in mouse embryos during implantation, gastrulation and organogenesis. *Differentiation.* **54**, 85-98.
- 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.
- Fisher, S. A., Langille, B. L., Srivastava, D.** (2000). Apoptosis during cardiovascular development. *Circ Res.* **87**, 856-64.
- Fitzharris, T. P.** (1981). Origin and migration of cushion tissue in the developing heart. *Scan Electron Microsc.* **254**, 255-60.
- Fransen, M. E., Lemanski, L. F.** (1990). Epicardial development in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Anat Rec.* **226**, 228-36.
- 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.

- Fürthauer, M., Reifers, F., Brand, M., Thisse, B., Thisse, C.** (2001). *sproeuty4* acts in vivo as a feedback-induced antagonist of FGF signaling in zebrafish. *Development*. **128**, 2175-86.
- Gajewski, K., Fossett, N., Molkenin, J. D., Schulz, R. A.** (1999). The zinc finger proteins Pannier and GATA4 function as cardiogenic factors in *Drosophila*. *Development* **126**, 5679-88.
- Gajewski, K., Zhang, Q., Choi, C. Y., Fossett, N., Dang, A., Kim, Y. H., Kim, Y., Schulz, R. A.** (2001). Pannier is a transcriptional target and partner of Tinman during *Drosophila* cardiogenesis. *Dev Biol*. **233**, 425-36.
- Gannon, M., Bader, D.** (1995). Initiation of cardiac differentiation occurs in the absence of anterior endoderm. *Development*. **121**, 2439-50.
- Garcia-Martinez, V., Schoenwolf, G. C.** (1993). Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol* **159**, 706-719.
- Gessler, M., Knobloch, K. P., Helisch, A., Amann, K., Schumacher, N., Rohde, E., Fischer, A., Leimeister, C.** (2002). Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in *Hey2* <sup>-/-</sup> mice. *Curr Biol*. **12**, 1601-4.
- Gittenberger-de Groot, A. C., Mahtab, E. A., Hahurij, N. D., Wisse, L. J., Deruiter, M. C., Wijffels, M. C., Poelmann, R. E.** (2007). Nkx2.5-negative myocardium of the posterior heart field and its correlation with podoplanin expression in cells from the developing cardiac pacemaking and conduction system. *Anat Rec (Hoboken)*. **290**, 115-22.
- Goldfarb, M.** (1996). Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev*. **7**, 311-25.
- Goldfarb, M.** (2005). Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. *Cytokine Growth Factor Rev*. **16**, 215-20.
- Gonzalez-Sanchez, A., Bader, D.** (1990). In vitro analysis of cardiac progenitor cell differentiation. *Dev Biol*. **139**, 197-209.
- Gordon, M. D., Nusse, R.** (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol Chem*. **281**, 22429-33.
- Gourdie, R. G., Mima, T., Thompson, R. P., Mikawa, T.** (1995). Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system. *Development*. **121**, 1423-31.
- 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.
- Haddon, C. M., Lewis, J. H.** (1991). Hyaluronan as a propellant for epithelial movement: the development of semicircular canals in the inner ear of *Xenopus*. *Development*. **112**, 541-50.

- Haenig, B., Kispert, A.** (2004). Analysis of TBX18 expression in chick embryos. *Dev Genes Evol* **214**, 407-11.
- Hamburger, V., Hamilton, H.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph* **88**, 49-92.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., Nishida, E.** (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol.* **4**, 850-8.
- Hardy, K. M., Garriock, R. J., Yatskievych, T. A., D'Agostino, S. L., Antin, P. B., Krieg, P. A.** (2008). Non-canonical Wnt signaling through Wnt5a/b and novel Wnt11 gene, Wnt11b, regulates cell migration during avian gastrulation. *Dev Biol.* **320**, 391-401.
- Harvey, R. P., Rosenthal, N.** (1999). Heart Development. Academic Press, Boston.
- Hatcher, C. J., Diman, N. Y., Kim, M. S., Pennisi, D., Song, Y., Goldstein, M. M., Mikawa, T., Basson, C. T.** (2004). A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. *Physiol Genomics* **18**, 129-40.
- Hartung, H., Feldman, B., Lovec, H., Coulier, F., Birnbaum, D., Goldfarb, M.** (1997). Murine FGF-12 and FGF-13: expression in embryonic nervous system, connective tissue and heart. *Mech Dev.* **64**, 31-9.
- Hay, E. D.** (1981). Extracellular matrix. *J Cell Biol.* **91**, 205s-223s.
- Heisenberg, C. P., Tada, M., Rauch, G. J., Sáude, L., Concha, M. L., Geisler, R., Stemple, D. L., Smith, J. C., Wilson, S. W.** (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature.* **405**, 76-81.
- 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.
- Hirose, T., Karasawa, M., Sugitani, Y., Fujisawa, M., Akimoto, K., Ohno, S., Noda, T.** (2006). PAR3 is essential for cyst-mediated epicardial development by establishing apical cortical domains. *Development* **133**, 1389-98.
- Ho, E., Shimada, Y.** (1978). Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol* **66**, 579-85.
- Hoffman, J. I.** (1995). Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence. *Pediatr Cardiol.* **16**, 155-65. Review.
- Hoogaars, W. M., Barnett, P., Moorman, A. F., Christoffels, V. M.** (2007). T-box factors determine cardiac design. *Cell Mol Life Sci* **64**, 646-60.

- Hu, T., Yamagishi, H., Maeda, J., McAnally, J., Yamagishi, C., Srivastava, D.** (2004). Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. *Development*. **131**, 5491-502.
- Igney, F. H., Krammer, P. H.** (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. **2**, 277-88.
- Ikeya, M., Takada, S.** (1998). Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. *Development*. **125**, 4969-76.
- Ilgan, R., Abu-Issa, R., Brown, D., Yang, Y. P., Jiao, K., Schwartz, R. J., Klingensmith, J., Meyers, E. N.** (2006). Fgf8 is required for anterior heart field development. *Development*. **133**, 2435-45.
- Isaac, A., Sargent, M. G., Cooke, J.** (1997). Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene. *Science* **275**, 1301-4.
- Ishii, Y., Langberg, J. D., Hurtado, R., Lee, S., Mikawa, T.** (2007). Induction of proepicardial marker gene expression by the liver bud. *Development* **134**, 3627-37.
- Itoh, N., Ornitz, D. M.** (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet*. **20**, 563-9.
- Itoh, N., Ornitz, D. M.** (2008). Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev Dyn*. **237**, 18-27.
- Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M. C.** (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*. **88**, 347-54.
- Jahr, M., Schlueter, J., Brand, T., Männer, J.** (2008). Development of the proepicardium in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn*. **237**, 3088-96.
- Jelier, R., Jenster, G., Dorssers, L. C., Wouters, B. J., Hendriksen, P. J., Mons, B., Delwel, R., Kors, J. A.** (2007). Text-derived concept profiles support assessment of DNA microarray data for acute myeloid leukemia and for androgen receptor stimulation. *BMC Bioinformatics*. **8**,14.
- Jenkins, S. J., Hutson, D. R. Kubalak, S. W.** (2005). Analysis of the proepicardium-epicardium transition during the malformation of the RXRalpha<sup>-/-</sup> epicardium. *Dev Dyn*. **232**, 1091-101.
- Johnson, D. E., Lee, P. L., Lu, J., Williams, L. T.** (1990). Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol*. **10**, 4728-36.
- Karabagli, H., Karabagli, P., Ladher, R. K., Schoenwolf, G. C.** (2002). Survey of fibroblast growth factor expression during chick organogenesis. *Anat Rec*. **268**, 1-6.
- Kastner, P., Messadeq, N., Mark, M., Wendling, O., Grondona, J. M., Ward, S., Ghyselink, M., 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.

**Kawano, Y., Kypta, R.** Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* **116**, 2627-34.

**Kelly, R. G., Brown, N. A., Buckingham, M. E.** (2001). The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell.* **1**, 435-40.

**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.

**Keren-Politansky, A., Keren, A., Bengal, E.** (2009). Neural ectoderm-secreted FGF initiates the expression of Nkx2.5 in cardiac progenitors via a p38 MAPK/CREB pathway. *Dev Biol.* **335**, 374-84.

**Kilian, B., Mansukoski, H., Barbosa, F. C., Ulrich, F., Tada, M., Heisenberg, C. P.** (2003). The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech Dev.* **120**, 467-76.

**Kim, J. Y., Cho, J. J., Ha, J., Park, J. H.** (2002). The carboxy terminal C-tail of BNip3 is crucial in induction of mitochondrial permeability transition in isolated mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* **398**, 147-52.

**Kirby, M. L., Waldo, K. L.** (1995). Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* **77**, 211-5.

**Kirby, M. L.** (2007). Cardiac development. Oxford University Press, New York. Pp. 21-33.

**Kishimoto, Y., Lee, K. H., 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.

**Kispert, A., Vainio, S., McMahon, A. P.** (1998). Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development.* **125**, 4225-34.

**Kitajima, S., Takagi, A., Inoue, T., Saga, Y.** (2000). MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development.* **127**, 3215-26.

**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.

**Klaus, A., Birchmeier, W.** (2009). Developmental signaling in myocardial progenitor cells: a comprehensive view of Bmp- and Wnt/beta-catenin signaling. *Pediatr Cardiol.* **30**, 609-16.

- Klewer, S. E., Yatskievych, T., Pogreba, K., Stevens, M. V., Antin, P. B., Camenisch, T. D.** (2006). Has2 expression in heart forming regions is independent of BMP signaling. *Gene Expr Patterns*. **6**, 462-70.
- Knudson, C. B., Munaim, S. I., Toole, B. P.** (1995). Ectodermal stimulation of the production of hyaluronan-dependent pericellular matrix by embryonic limb mesodermal cells. *Dev Dyn*. **204**, 186-91.
- Komiyama, M., Ito, K., Shimada, Y.** (1987). Origin and development of the epicardium in the mouse embryo. *Anat Embryol (Berl)* **1**, 183-9.
- Kovalenko, D., Yang, X., Nadeau, R. J., Harkins, L. K., Friesel, R.** (2003). Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem*. **278**, 14087-91.
- Kruithof, B. P., van Wijk, B., Somi, S., Kruithof-de Julio, M., Pérez Pomares, J. M., Weesie, F., Wessels, A., Moorman, A. F., van den Hoff, M. J.** (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, L. C., Park, M., Miller, J. R., Moon, R. T.** (2000). The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet*. **16**, 279-83.
- Kuhn, H. J., Liebherr, G.** (1988). The early development of the epicardium in *Tupaia belangeri*. *Anat Embryol (Berl)*. **177**, 225-34.
- Kuo, C. T., Morrisey, E. E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M. M., Parmacek, M. S., Soudais, C., Leiden, J. M.** (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*. **11**, 1048-60.
- Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hroudá, M., Lentfer, J., Schmidt, H. A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M. Q., Holstein, T. W.** (2005). Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature*. **433**, 156-60.
- Kwee, L., Burns, D. K., Rumberger, J. M., Norton, C., Wolitzky, B., Terry, R., Lombard-Gillooly, K. M., Shuster, D. J., Kontgen, F., Stewart, C.** (1995). Creation and characterization of E-selectin- and VCAM-1-deficient mice. *Ciba Found Symp*. **189**, 17-28; discussion 28-34, 77-8.
- Ladd, A. N., Yatskievych, T. A., Antin, P. B.** (1998). Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGFβ and bone morphogenetic proteins. *Dev Biol* **204**, 407-19.
- Laugwitz, K. L., Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Chien, K. R.** (2008). Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development*. **135**, 193-205.

- Lee, P. L., Johnson, D. E., Cousens, L. S., Fried, V. A., Williams, L. T.** (1989). Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science*. **245**, 57-60.
- Leimeister, C., Externbrink, A., Klamt, B., Gessler, M.** (1999). Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mech Dev*. **85**, 173-7.
- Lepilina, A., Coon, A. N., Kikuchi, K., Holdway, J. E., Roberts, R. W., Burns, C. G., Poss, K. D.** (2006). A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*. **127**, 607-19.
- Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M., 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.
- Li, S. C., Wang, L., Jiang, H., Acevedo, J., Chang, A. C., Loudon, W. G.** (2009). Stem cell engineering for treatment of heart diseases: potentials and challenges. *Cell Biol Int*. **33**, 255-67.
- Lie-Venema, H., Gittenberger-de Groot, A. C., van Empel, L. J., Boot, M. J., Kerkdijk, H., de Kant, E., 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.
- Lie-Venema, H., van den Akker, N. M., Bax, N. A., Winter, E. M., Maas, S., Kekarainen, T., Hoeben, R. C., deRuiter, M. C., Poelmann, R. E., Gittenberger-de Groot, A. C.** (2007). Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. *ScientificWorldJournal*. **7**, 1777-98.
- Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B. M., Schulz, R. A., Olson, E. N.** (1995). Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* **267**, 688-93.
- Lin, M. H., Bour, B. A., Abmayr, S. M., Storti, R. V.** (1997). The expression of MEF2 genes is implicated in CNS neuronal differentiation. *Dev Biol* **182**, 240-55.
- Linask, K. K., Han, M. D., Linask, K. L., Schlange, T., Brand, T.** (2002). Effects of antisense misexpression of CFC on downstream flectin protein expression during heart looping. *Dev Dyn* **228**, 217-30.
- Linask, K. K., Han, M., Cai, D. H., Brauer, P. R., Maisastry, S. M.** (2005). Cardiac morphogenesis: matrix metalloproteinase coordination of cellular mechanisms underlying heart tube formation and directionality of looping. *Dev Dyn*. **233**, 739-53.
- Lints, T. J., Parsons, L. M., Hartley, L., Lyons, I., Harvey, R. P.** (1993). Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*. **119**, 419-31.

- Liu, C., Liu, W., Lu, M. F., Brown, N. A., Martin, J. F.** (2001). Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development* **128**, 2039-48.
- Liu, C. J., Dib-Hajj, S. D., Renganathan, M., Cummins, T. R., Waxman, S.G.** (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J Biol Chem.* **278**, 1029-36.
- Logan, M., Pagán-Westphal, S. M., Smith, D. M., Paganessi, L., Tabin, C. J.** (1998). The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell.* **94**, 307-17.
- Lopez-Sanchez, C., Climent, V., Schoenwolf, G. C., Alvarez, I. S., Garcia-Martinez, V.** (2002). Induction of cardiogenesis by Hensen's node and fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res.* **309**, 237-49.
- Lough, J., Barron, M., Brogley, M., Sugi, Y., Bolender, D. L., 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.
- Lowe, L. A., Supp, D. M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C. V., Potter, S. S., Overbeek, P., Kuehn, M. R.** (1996). Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature.* **381**, 158-61.
- Lu, H., Enosawa, S., Ohmi, K., Suzuki, S.** (2001). The proliferative response of p53 knock-out mouse-derived vascular smooth muscle cell line, P53LMAC01, to PDGF, when compared with human aortic smooth muscle cells. *Transpl Immunol.* **8**, 253-7.
- Lunn, J. S., Fishwick, K. J., Halley, P. A., Storey, K. G.** (2007). A spatial and temporal map of FGF/Erk1/2 activity and response repertoires in the early chick embryo. *Dev Biol.* **302**, 536-52.
- 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 homeo box gene Nkx2.5. *Genes Dev* **9**, 1654-66.
- Mailleux, A. A., Tefft, D., Ndiaye, D., Itoh, N., Thiery, J. P., Warburton, D., Bellusci, S.** (2001). Evidence that SPROUTY2 functions as an inhibitor of mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Mech Dev.* **102**, 81-94.
- 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.
- 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.
- Männer J.** (2006). Extracardiac tissues and the epigenetic control of myocardial development in vertebrate embryos. *Ann Anat.* **188**, 199-212.
- Mariani, F. V., Ahn, C. P., Martin, G. R.** (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature.* **453**, 401-5.
- Markwald, R. R., Fitzharris, T. P., Manasek, F. J.** (1977). Structural development of endocardial cushions. *Am J Anat.* **148**, 85-119.
- Martin-Belmonte, F., Mostov, K.** (2008). Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* **20**, 227-34.
- 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.
- Matsui, H., Ikeda, K., Nakatani, K., Sakabe, M., Yamagishi, T., Nakanishi, T., Nakajima, Y.** (2005). Induction of initial cardiomyocyte alpha-actin--smooth muscle alpha-actin--in cultured avian pregastrula epiblast: a role for nodal and BMP antagonist. *Dev Dyn.* **233**, 1419-29.
- McGrath, J., Brueckner, M.** (2003). Cilia are at the heart of vertebrate left-right asymmetry. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 385-92.
- McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X., Brueckner, M.** (2003). Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell.* **114**, 61-73.
- Meilhac, S. M., Esner, M., Kelly, R. G., Nicolas, J. F., Buckingham, M. E.** (2004). The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev Cell.* **6**, 685-98.
- Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H., Hamada, H.** (1998). *lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and nodal. *Cell.* **94**, 287-97.

- Mikawa, T., 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.
- Miki, T., Bottaro, D. P., Fleming, T. P., Smith, C. L., Burgess, W. H., Chan, A. M., Aaronson, S. A.** (1992). Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 246-50.
- Miller, J. R.** (2002). The Wnts. *Genome Biol.* **3**, REVIEWS3001.
- Miyake, A., Konishi, M., Martin, F. H., Hernday, N. A., Ozaki, K., Yamamoto, S., Mikami, T., Arakawa, T., Itoh, N. (1998). Structure and expression of a novel member, FGF-16, on the fibroblast growth factor family. *Biochem Biophys Res Commun.* **243**, 148-52.
- Miyamoto, M., Naruo, K., Seko, C., Matsumoto, S., Kondo, T., Kurokawa, T.** (1993). Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. *Mol Cell Biol.* **13**, 4251-9.
- Mjaatvedt, C. H., Nakaoka, T., Moreno-Rodriguez, R., Norris, R. A., Kern, M. J., Eisenberg, C. A., Turner, D., Markwald, R. R.** (2001). The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol* **238**, 97-109.
- Molin, D. G., Bartram, U., Van der Heiden, K., Van Iperen, L., Speer, C. P., Hierck, B. P., Poelmann, R. E., Gittenberger-de-Groot, A. C.** (2003). Expression patterns of Tgfbeta1-3 associate with myocardialisation of the outflow tract and the development of the epicardium and the fibrous heart skeleton. *Dev Dyn.* **227**, 431-44.
- Molkentin, J. D., Lin, Q., Duncan, S. A., Olson, E. N.** (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* **11**, 1061-72.
- Molkentin, J. D.** (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem.* **275**, 38949-52.
- 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.
- Mollier, S.** (1906). Die erste Anlage des Herzens bei den Wirbeltieren; in Hertwig, O. (ed): Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere. Jena, Gustav Fischer, vol 1, sect 1, pp 1026-1051.
- Monsoro-Burq, A., 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.
- Montgomery, M. O., Litvin, J., Gonzalez-Sanchez, A., Bader, D.** (1994). Staging of commitment and differentiation of avian cardiac myocytes. *Dev Biol.* **164**, 63-7

- Moon, R. T., Campbell, R. M., Christian, J. L., McGrew, L. L., Shih, J., Fraser, S.** (1993). Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development*. **119**, 97-111.
- Moorman, A. F., Soufan, A. T., Hagoort, J., de Boer, P. A., Christoffels, V. M.** (2004). Development of the building plan of the heart. *Ann N Y Acad Sci*. **1015**, 171-81.
- Moorman, A. F., Christoffels, V. M., Anderson, R. H., van den Hoff, M. J.** (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, R. A., Krug, E. L., Reyes, L., Villavicencio, L., Mjaatvedt, C. H., Markwald, R. R.** (2006). Bidirectional fusion of the heart-forming fields in the developing chick embryo. *Dev Dyn* **235**, 191-202.
- Morrisey, E. E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M. M., Jiang, F., Ip, H. S., Parmacek, M. S.** (1998). GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev*. **12**, 3579-90.
- 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.
- 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.
- Münsterberg, A., Yue, Q.** (2008). Cardiac progenitor migration and specification: The dual function of Wnts. *Cell Adh Migr*. **2**, 74-6.
- Murakami, M., Elfenbein, A., Simons, M.** (2008). Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis. *Cardiovasc Res*. **78**, 223-31.
- Nahirney, P. C., Mikawa, T., 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, L. A., Harrelson, Z., Kelly, R. G., Papaioannou, V. E.** (2005). T-box genes in vertebrate development. *Annu Rev Genet* **39**, 219-39.
- Nardini, M., Ori, M., Vigetti, D., Gornati, R., Nardi, I., Perris, R.** (2004). Regulated gene expression of hyaluronan synthases during *Xenopus laevis* development. *Gene Expr Patterns*. **4**, 303-8.

**Nesbitt, W. S., Mangin, P., Salem, H. H., Jackson, S. P.** (2006). The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis. *J Mol Med* **84**, 989-95.

**NicAmhlaioibh, R., Shtivelman, E.** (2001). Metastasis suppressor CC3 inhibits angiogenic properties of tumor cells in vitro. *Oncogene*. **20**, 270-5.

**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.

**Nutt, S. L., Dingwell, K. S., Holt, C. E., Amaya, E.** (2001). Xenopus Sprouty2 inhibits FGF-mediated gastrulation movements but does not affect mesoderm induction and patterning. *Genes Dev*. **15**, 1152-66.

**Ohmachi, S., Watanabe, Y., Mikami, T., Kusu, N., Ibi, T., Akaike, A., Itoh, N.** (2000). FGF-20, a novel neurotrophic factor, preferentially expressed in the substantia nigra pars compacta of rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. **277**, 355-60.

**Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N., Noji, S.** (1997). The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*. **124**, 2235-44.

**Olivey, H. E., Mundell, N. A., Austin, A. F., Barnett, J. V.** (2006). Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev Dyn*. **235**, 50-9.

**Olsen, S. K., Garbi, M., Zampieri, N., Eliseenkova, A. V., Ornitz, D. M., Goldfarb, M., Mohammadi, M.** (2003). Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. *J Biol Chem*. **278**, 34226-36.

**Ori, A., Wilkinson, M. C., Fernig, D. G.** (2008). The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Front Biosci*. **13**, 4309-38.

**Ornitz, D. M.** (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays*. **22**, 108-12.

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

**Orts Llorca, F.** (1963). Influence of the endoblast in the morphogenesis and late differentiation of the chick heart. *Acta Anat (Basel)*. **52**, 202-14.

**Pal, R.** (2009). Embryonic stem (ES) cell-derived cardiomyocytes: a good candidate for cell therapy applications. *Cell Biol Int*. **33**, 325-36.

- Pandur, P., Läsche, M., Eisenberg, L. M., 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.
- Pérez-Pomares, J. M., Macías, D., García-Garrido, L., Muñoz-Chápuli, R.** (1998). The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo: an immunohistochemical and quail-chick chimera study. *Dev Biol.* **200**, 57-68.
- Perez-Pomares, J. M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Atencia, G., Wessels, A., 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., 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, J. M., 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.
- Pérez-Pomares, J. M., Mironov, V., Guadix, J. A., Macías, D., Markwald, R. R., Muñoz-Chápuli, R.** (2006). In vitro self-assembly of proepicardial cell aggregates: an embryonic vasculogenic model for vascular tissue engineering. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* **288**, 700-13.
- Pérez-Pomares, J. M., González-Rosa, J. M., Muñoz-Chápuli, R.** (2009). Building the vertebrate heart - an evolutionary approach to cardiac development. *Int J Dev Biol.* **53**, 1427-43.
- Pexieder, T.** (1975). Cell death in the morphogenesis and teratogenesis of the heart. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* **51**, 3-99.
- Piedra, M. E., Ros, M. A.** (1998). BMP signaling positively regulates Nodal expression during left right specification in the chick embryo. *Development* **129**, 3431-40.
- Poelmann, R. E., Molin, D., Wisse, L. J., Gittenberger-de Groot, A. C.** (2000). Apoptosis in cardiac development. *Cell Tissue Res.* **301**, 43-52.

**Poelmann, R. E., Lie-Venema, H., Gittenberger-de Groot, A. C.** (2002). The role of the epicardium and neural crest as extracardiac contributors to coronary vascular development. *Tex Heart Inst J* **29**, 255-61.

**Pombal, M. A., Carmona, R., Megías, M., Ruiz, A., Pérez-Pomares, J. M., 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.

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

**Prall, O. W., Menon, M. K., Solloway, M. J., Watanabe, Y., Zaffran, S., Bajolle, F., Biben, C., McBride, J. J., Robertson, B. R., Chaulet, H., Stennard, F. A., Wise, N., Schaft, D., Wolstein, O., Furtado, M. B., Shiratori, H., Chien, K. R., Hamada, H., Black, B. L., Saga, Y., Robertson, E. J., Buckingham, M. E., Harvey, R. P.** (2007). An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell.* **128**, 947-59.

**Prasad, K. V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M. X., Rizk, M., Jacquot, S., Schlossman, S. F.** (1997). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 6346-51.

**Ramsdell, A. F.** (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.

**Rauch, G. J., Hammerschmidt, M., Blader, P., Schauerte, H. E., Strähle, U., Ingham, P. W., McMahon, A. P., Haffter, P.** (1997). Wnt5 is required for tail formation in the zebrafish embryo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **62**, 227-34.

**Ratajska, A., Czarnowska, E., Ciszek, B.** (2008). Embryonic development of the proepicardium and coronary vessels. *Int J Dev Biol.* **52**, 229-36.

**Redkar, A., Montgomery, M., Litvin, J.** (2001). Fate map of early avian cardiac progenitor cells. *Development* **128**, 2269-79.

**Reichsman, F., Smith, L., Cumberledge, S.** (1996). Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol.* **135**, 819-27.

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

**Reiter, J. F., Alexander, J., Rodaway, A., Yelon, D., Patient, R., Holder, N., Stainier, D. Y.** (1999). *Gata5* is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev* **13**, 2983-95.

**Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C., Salvesen, G.S.** (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 14250-5.

**Robb, L., Mifsud, L., Hartley, L., Biben, C., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., 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.

**Rodgers, L. S., Lalani, S., Runyan, R. B., Camenisch, T. D.** (2008). Differential growth and multicellular villi direct proepicardial translocation to the developing mouse heart. *Dev Dyn* **237**, 145-52.

**Rojas, A., De Val, S., Heidt, A. B., Xu, S. M., Bristow, J., Black, B. L.** (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.

**Ryan, A. K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Peña, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., Norris, D. P., Robertson, E. J., Evans, R. M., Rosenfeld, M. G., Izpisua Belmonte, J. C.** (1998). *Pitx2* determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**, 545-51.

**Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J., Inoue, T.** (1999). *MesP1* is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development*. **126**, 3437-47.

**Saga, Y., Kitajima, S., Miyagawa-Tomita, S.** (2000). *Mesp1* expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med* **10**, 345-52.

**Samuel, L. J., Latinkić, B. V.** (2009). Early activation of FGF and nodal pathways mediates cardiac specification independently of Wnt/beta-catenin signaling. *PLoS One*. **4**, e7650.

**Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., Yoshimura, A.** (2003). Mammalian *Sprouty4* suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat Cell Biol*. **5**, 427-32.

**Schlange, T., Andree, B., Arnold, H. H., 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., 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, H. H., 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.** (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., Brand, T.** (2009). A right-sided pathway involving FGF8/Snai1 controls asymmetric development of the proepicardium in the chick embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**, 7485-90.

**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.

**Schneider, V. A., Mercola, M.** (2001). Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev*. **15**, 304-15.

**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.

**Schultheiss, T. M., Xydas, S., Lassar, A. B.** (1995). Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development* **121**, 4203-14.

**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.

**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.

**Sengbusch, J. K., He, W., Pinco, K. A., Yang, J. T.** (2002). Dual functions of  $\alpha 4 \beta 1$  integrin in epicardial development: initial migration and long-term attachment. *J Cell Biol.* **157**, 873-82.

**Sepulveda, J. L., Vlahopoulos, S., Iyer, D., Belaguli, N., Schwartz, R. J.** (2002). Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *J Biol Chem.* **277**, 25775-82.

**Serluca, F. C.** (2008). Development of the proepicardial organ in the zebrafish. *Dev Biol* **315**, 18-27.



- Sheldahl, L. C., Slusarski, D. C., Pandur, P., Miller, J. R., Kühl, M., Moon, R. T.** (2003). Dishevelled activates Ca<sup>2+</sup> flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol.* **161**, 769-77.
- Shelton, E. L., Yutzey, K. E.** (2007). Tbx20 regulation of endocardial cushion cell proliferation and extracellular matrix gene expression. *Dev Biol.* **302**, 376-88.
- Sissman, N.J.** (1970). Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: comparative chronology. *Am J Cardiol.* **25**, 141-8.
- Sleeman, M., Fraser, J., McDonald, M., Yuan, S., White, D., Grandison, P., Kumble, K., Watson, J. D., Murison, J. G.** (2001). Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene.* **271**, 171-82.
- Smart, N., Risebro, C. A., Melville, A. A., Moses, K., Schwartz, R. J., Chien, K. R., Riley, P. R.** (2007). Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature.* **445**, 177-82.
- Smart, N., Rossdeutsch, A., Riley, P. R.** (2007). Thymosin beta4 and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential. *Angiogenesis* **10**, 229-41.
- Solloway, M. J., Harvey, R. P.** (2003). Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovasc Res.* **58**, 264-77.
- Spicer, A. P., McDonald, J. A.** (1998). Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem.* **273**, 1923-32.
- Spicer, A. P., Tien, J. Y.** (2004). Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today.* **72**, 89-108.
- Srivastava, D., Cserjesi, P., Olson, E. N.** (1995). A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* **270**, 1995-9.
- Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., Salvesen, G. S.** (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem.* **274**, 8359-62.
- Stalsberg, H., DeHaan, R. L.** (1969). The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev Biol.* **19**, 128-59.
- St Amand, T. R., Ra, J., Zhang, Y., Hu, Y., Baber, S. I., 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.
- Stuckmann, I., Evans, S., Lassar, A. B.** (2003). Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol.* **255**, 334-49.

- Sucov, H. M., Gu, Y., Thomas, S., Li, P., Pashmforoush, M.** (2009). Epicardial control of myocardial proliferation and morphogenesis. *Pediatr Cardiol.* **30**, 617-25.
- Sugi, Y., Markwald, R. R.** (1996). Formation and early morphogenesis of endocardial endothelial precursor cells and the role of endoderm. *Dev Biol.* **175**, 66-83.
- Sun, Y., Liang, X., Najafi, N., Cass, M., Lin, L., Cai, C. L., Chen, J., Evans, S. M.** (2007). Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev Biol* **304**, 286-96.
- Supp, D. M., Witte, D. P., Potter, S. S., Brueckner, M.** (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. *Nature* **389**, 963-6.
- Tada, M., Smith, J. C.** (2000). Xwnt11 is a target of Xenopus Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development.* **127**, 2227-38.
- Takata, H., Terada, K., Oka, H., Sunada, Y., Moriguchi, T., Nohno, T.** (2007). Involvement of Wnt4 signaling during myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle. *Dev Dyn.* **236**, 2800-7.
- Takeuchi, J. K., Koshiba-Takeuchi, K., Suzuki, T., Kamimura, M., Ogura, K., Ogura, T.** (2003). Tbx5 and Tbx4 trigger limb initiation through activation of the Wnt/Fgf signaling cascade. *Development.* **130**, 2729-39.
- Tam, P. P., Beddington, R. S.** (1987). The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis. *Development.* **99**, 109-26.
- Tam, P. P., Beddington, R. S.** (1992). Establishment and organization of germ layers in the gastrulating mouse embryo. *Ciba Found Symp.* **165**, 27-41; discussion 42-9.
- Tam, P. P., Parameswaran, M., Kinder, S. J., Weinberger, R. P.** (1997). The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development.* **124**, 1631-42.
- 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.
- Tavares, A. T., Andrade, S., Silva, A. C., Belo, J. A.** (2007). Cerberus is a feedback inhibitor of Nodal asymmetric signaling in the chick embryo. *Development* **134**, 2051-60.
- Thisse, B., Thisse, C.** (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol.* **287**, 390-402.
- Thomas, T., Yamagishi, H., Overbeek, P. A., Olson, E. N., Srivastava, D.** (1998). The bHLH factors, dHAND and eHAND, specify pulmonary and systemic cardiac ventricles independent of left-right sidedness. *Dev Biol.* **196**, 228-36.
- Thornberry, N. A., Lazebnik, Y.** (1998). Caspases: enemies within. *Science.* **281**, 1312-6.

**Tien, J. Y., Spicer, A. P.** (2005). Three vertebrate hyaluronan synthases are expressed during mouse development in distinct spatial and temporal patterns. *Dev Dyn.* **233**, 130-41.

**Toole BP.** (1990). Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Opin Cell Biol.* **2**, 839-44.

**Torres, M. A., Yang-Snyder, J. A., Purcell, S. M., DeMarais, A. A., McGrew, L. L., Moon, R. T.** (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol.* **133**, 1123-37.

**Torii, S., Kusakabe, M., Yamamoto, T., Maekawa, M., Nishida, E.** (2004). Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell.* **7**, 33-44.

**Virágh, S., Challice, C. E.** (1981). The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec* **201**, 157-68.

**Van Den Akker, N. M., Lie-Venema, H., Maas, S., Eralp, I., DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E., Gittenberger-De Groot, A. C.** (2005). Platelet-derived growth factors in the developing avian heart and maturing coronary vasculature. *Dev Dyn.* **233**, 1579-88.

**Van den Eijnde, S. M., Wenink, A. C., Vermeij-Keers, C.** (1995). Origin of subepicardial cells in rat embryos. *Anat Rec.* **242**, 96-102.

**van Swieten, J. C., Brusse, E., de Graaf, B. M., Krieger, E., van de Graaf, R., de Koning, I., Maat-Kievit, A., Leegwater, P., Dooijes, D., Oostra, B. A., Heutink, P.** (2003). A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet.* **72**, 191-9.

**van Wijk, B., van den Berg, G., Abu-Issa, R., Barnett, P., van der Velden, S., Schmidt, M., Ruijter, J. M., Kirby, M. L., Moorman, A. F., van den Hoff, M. J.** (2009). Epicardium and myocardium separate from a common precursor pool by crosstalk between bone morphogenetic protein- and fibroblast growth factor-signaling pathways. *Circ Res.* **105**, 431-41.

**Vaux, D. L., Korsmeyer, S. J.** (1999). Cell death in development. *Cell.* **96**, 245-54.

**Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Vaux, D. L.** (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* **102**, 43-53.

**Virágh, S., Gittenberger-de Groot, A. C., Poelmann, R. E., Kálmán, F.** (1993). Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat Embryol (Berl).* **188**, 381-93.

- Veeman, M. T., Axelrod, J. D., Moon, R. T.** (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. **5**, 367-77.
- Wada, A. M., Smith, T. K., Osler, M. E., Reese, D. E., Bader, D. M.** (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., 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.
- Wagner, M., Siddiqui, M. A.** (2007). Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and heart tube formation. *Exp Biol Med (Maywood)*. **232**, 852-65.
- Wahl, M. B., Deng, C., Lewandoski, M., Pourquié, O.** (2007). FGF signaling acts upstream of the NOTCH and WNT signaling pathways to control segmentation clock oscillations in mouse somitogenesis. *Development*. **134**, 4033-41.
- Waldo, K. L., Kumiski, D. H., Wallis, K. T., Stadt, H. A., Hutson, M. R., Platt, D. H., Kirby, M. L.** (2001). Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*. **128**, 3179-88.
- Walsh, E. C., Stainier, D.Y.** (2001). UDP-glucose dehydrogenase required for cardiac valve formation in zebrafish. *Science*. **293**, 1670-3.
- Wang, Q., McEwen, D. G., Ornitz, D. M.** (2000). Subcellular and developmental expression of alternatively spliced forms of fibroblast growth factor 14. *Mech Dev*. **90**, 283-7.
- Wang, D., Chang, P. S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J. A., Small, E., Krieg, P. A., Olson, E. N.** (2001). Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*. **105**, 851-62.
- Wang, Q., Bardgett, M. E., Wong, M., Wozniak, D. F., Lou, J., McNeil, B. D., Chen, C., Nardi, A., Reid, D. C., Yamada, K., Ornitz, D. M.** (2002). Ataxia and paroxysmal dyskinesia in mice lacking axonally transported FGF14. *Neuron*. **35**, 25-38.
- Warkman, A. S., Yatskievych, T. A., Hardy, K. M., Krieg, P. A., Antin, P. B.** (2008). Myocardin expression during avian embryonic heart development requires the endoderm but is independent of BMP signaling. *Dev Dyn*. **237**, 216-21.

**Weinhold, B., Schratt, G., Arsenian, S., Berger, J., Kamino, K., Schwarz, H., Rütger, U., Nordheim, A.** (2000). Srf(-/-) ES cells display non-cell-autonomous impairment in mesodermal differentiation. *EMBO J.* **19**, 5835-44.

**Whitman, S., Wang, X., Shalaby, R., Shtivelman, E.** (2000). Alternatively spliced products CC3 and TC3 have opposing effects on apoptosis. *Mol Cell Biol.* **20**, 583-93.

**Wong, G. T., Gavin, B. J., McMahon, A. P.** (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol.* **14**, 6278-86.

**Wright, T. J., Ladher, R., McWhirter, J., Murre, C., Schoenwolf, G. C., Mansour, S. L.** (2004). Mouse FGF15 is the ortholog of human and chick FGF19, but is not uniquely required for otic induction. *Dev Biol.* **269**, 264-75.

**Xiao, H., Palhan, V., Yang, Y., Roeder, R. G.** (2000). TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes. *EMBO J.* **19**, 956-63.

**Xu, C., Liguori, G., Persico, M. G., 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.

**Yamada, M., Revelli, J. P., Eichele, G., Barron, M., Schwartz, R. J.** (2000). Expression of chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 genes during early heart development: evidence for BMP2 induction of Tbx2. *Dev Biol.* **228**, 95-105.

**Yang, X., Dormann, D., Münsterberg, A. E., Weijer, C. J.** (2002). Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8. *Dev Cell.* **3**, 425-37.

**Yatskievich, T. A., Ladd, A. N., Antin, P. B.** (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, M. E., Ruvinsky, I., Ho, R. K., Silver, L. M., Stainier, D. Y.** (2000). The bHLH transcription factor hand2 plays parallel roles in zebrafish heart and pectoral fin development. *Development* **127**, 2573-82.

**Yoshioka, H., Meno, C., Koshiba, K., Sugihara, M., Itoh, H., Ishimaru, Y., Inoue, T., Ohuchi, H., Semina, E. V., Murray, J. C., 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.

**Yuan, S., Schoenwolf, G. C.** (2000). Islet-1 marks the early heart rudiments and is asymmetrically expressed during early rotation of the foregut in the chick embryo. *Anat Rec.* **260**, 204-7.

**Yusoff, P., Lao, D. H., Ong, S. H., Wong, E. S., Lim, J., Lo, T. L., Leong, H. F., Fong, C. W., Guy, G. R.** (2002). Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *J Biol Chem.* **277**, 3195-201.

**Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M., Ornitz, D. M.** (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* **281**, 15694-700.

**Zamora, M., Männer, J., Ruiz-Lozano, P.** (2007). Epicardium-derived progenitor cells require beta-catenin for coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 18109-14.

**Zecca, M., Basler, K., Struhl, G.** (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell.* **87**, 833-44.

**Zhu, X., Lough, J.** (1996). Expression of alternatively spliced and canonical basic fibroblast growth factor mRNAs in the early embryo and developing heart. *Dev Dyn.* **206**, 139-45.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMV-RT	Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bidest.	bidestilliert
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre DNA
CFC	Cripto, FRL-1; Cryptic
ChEST-Klon	Chicken EST-Klon
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Dig-Mix	Digoxygenin-Mix
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DNAse	Deoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
Dpp	Decapentaplegic
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-ethynyl-2'-desoxyuridin
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblast Growth Factor

---

FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FRL-1	FGF Related Ligand-1
GAPDH	Glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
HAND	Heart, autonomic nervous system, neural crest-derived
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HH	Hamburger und Hamilton
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
Iv	<i>Inversus viscerum</i>
Kit	Box mit Komponenten für einen Versuch
LB	Luria Broth
LPM	Laterales Plattenmesoderm
LSM	Laserscanningmikroskop
mRNA	messenger Ribonucleic acid
NBT	Nitroblautetrazolium
NKX	Nirenberg Kim Homeobox
NTMT	NaCl, Tris, MgCl <sub>2</sub> , Tween-20
Oligo-dT	Oligodeoxythymidin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PBT	Phosphat-gepufferte Saline + Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Proepikard
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PITX	Pituary Homeobox
POD	Peroxidase
RALDH	Retinaldehyd Dehydrogenase
RNA	Ribonucleinsäure
RCAS	Replikation Competent Avian Sarcoma
RNase	Ribonuclease
RNasin	RNase-Inhibitor



---

rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RXR $\alpha$	Retinoid Receptor alpha
SDS	Sodium dodecyl sulphate, Natriumdodecylsulfat
SHH	Sonic Hedgehog
Strep	Streptomycin
SV	<i>Sinus venosus</i>
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TBS	Tris-gepufferte Saline (tris buffered saline)
TBS-T	Tris-gepufferte Saline + Tween-20
TBX	T-Box
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-ethylendiamin
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VMHC	Ventricular Myosin Heavy Chain
WT1	Wilms Tumor Gen 1

### 8.3 Eigene Publikationen

**Torlopp A., Schlueter J., Brand T.:** The role of fibroblast growth factor signaling during proepicardium formation 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.:** Popdc2 is a novel cAMP-binding protein with a stress- related role in cardiac pacemaking. (eingereicht)

**Torlopp A., Breher S.S., Schlüter J., Brand T.:** Comparative analysis of mRNA and protein expression of Popdc1 (Bves) during early development in the chick embryo. Dev Dyn.; 235(3):691-700. (2006)

## 8.4 Teilnahme an wissenschaftlichen Tagungen

- September 2006                      **6. GfE School - Cell Polarity in Development and Disease,**  
Günzburg - Germany  
Posterpräsentation: "Identification of signaling molecules that are involved in proepicardial development in the chick"
- März 2007                              **17. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für**  
**Entwicklungsbiologie,** Marburg - Germany  
Posterpräsentation: "Identification of signaling molecules that are involved in proepicardial development in the chick"
- Oktober 2007                         **3<sup>rd</sup> International Student Symposium - Drilling Into Life's**  
**Depths,** Würzburg - Germany  
Vortrag: "The development of the proepicardium in the chick embryo"
- März 2008                              **Bi-annual meeting of the working group on developmental**  
**anatomy and pathology,** Alberobello - Italy  
Vortrag: "FGF is an important regulator of cell survival and cell proliferation in the chick proepicardium"
- März 2009                              **4<sup>th</sup> International Student Symposium - Revolution Research,**  
Würzburg - Germany  
Posterpräsentation: "FGF controls proepicardial growth but not gene expression in the chick embryo"

## **8.5 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.

London, im Januar 2010

Angela Torlopp

## 8.6 Danksagung

Ich möchte zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Brand für die Betreuung der herausfordernden Arbeit danken, die er stets mit Geduld und hilfreichen Ratschlägen begleitet hat. Überdies danke ich ihm für sein Engagement und die konstruktiven Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Albrecht Müller danke ich für die Übernahme des Koreferats und die Betreuung meiner Arbeit im Graduiertenkolleg 1048 der Universität Würzburg. In gleicher Weise danke ich Prof. Dr. Manfred Gessler für die Betreuung meiner Arbeit im GRK 1048. Dem GRK 1048 sowie Prof. Dr. Manfred Scharl gebührt ebenso Dank für die Gewährung finanzieller Unterstützung meiner Studien, wie auch Gabi Heilmann für Ihre stete Hilfsbereitschaft in organisatorischen Angelegenheiten.

Weiterhin danke ich meinen langjährigen Arbeitskollegen im Labor Dr. Stephe Breher, Dr. Alexander Froese, Bettina Kirchmaier, Franziska Günthner und Reinhild Fischer. Gebührender Dank gilt hierbei insbesondere Dr. Jan Schlüter und Anneliese Striwe-Conz, die mir jederzeit beratend zur Seite standen und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ein herzliches Dankeschön auch an Silvia, den guten Geist der Waschküche.

Großen Dank möchte ich meinen langjährigen Freunden Jule, Stella, Walid, Holger, Silvi und Olli aussprechen- danke für alles.

Gewidmet ist diese Arbeit meinen lieben Großeltern und meiner lieben Mama.