

Untersuchungen zur Bedeutung von *Xenopus Islet-1* während der kardiovaskulären Entwicklung von *Xenopus laevis*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer.nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von

Thomas Ulrich Brade

aus Ulm

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Knöchel

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

Der Tag gehört dem Irrtum und dem Fehler,
die Zeitreihe dem Erfolg und dem Gelingen.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS IV
1 EINLEITUNG 7
1.1 ALLGEMEINE FRAGESTELLUNGEN UND MODELLSYSTEME IN DER ENTWICKLUNGSBIOLOGIE 7
1.1.1 Allgemeine Fragestellungen der Entwicklungsbiologie 7
1.1.2 Die verschiedenen Modellsysteme der Entwicklungsbiologie 7
1.2 MESODERMINDUKTION IN XENOPUS LAEVIS 9
1.3 HERZENTWICKLUNG IN XENOPUS LAEVIS 11
1.3.1 Morphologische Aspekte der Herzentwicklung in Xenopus 11
1.3.2 Molekulare Grundlagen der Herzentwicklung der Vertebraten 14
Induktion kardialer Vorläuferzellen im anterioren Mesoderm 14
Homeodomänen Transkriptionsfaktoren der Nk-Klasse 15
GATA-Faktoren 16
T-Box-Faktoren 16
HAND Faktoren 17
Der Transkriptionsfaktor Islet-1 und das anteriore oder sekundäre Herzfeld 18
1.4 DIE ENTWICKLUNG DES GEFÄßSYSTEMS 23
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 26
3 MATERIAL 27
3.1 ORGANISMEN 27
3.1.1 Versuchstiere 27
3.1.2 Bakterienstämme 27
3.2 NUKLEINSÄUREN 27
3.2.1 Vektoren 27
3.2.2 cDNA-Klone 27
3.2.3 Oligonukleotide und Morpholino-Oligonukleotide 28
3.3 NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE 30
3.4 LÖSUNGEN UND PUFFER 30
3.5 GERÄTE 35
3.6 SONSTIGES 36
3.7 CHEMIKALIEN 37
3.8 RADIOCHEMIKALIEN 38
3.9 ENZYME 38
3.10 ANTIKÖRPER 39
3.11 KITS 39
4. METHODEN 40
4.1 ARBEITEN MIT XENOPUS LAEVIS 40
4.1.1 Haltung der Versuchstiere 40
4.1.2 Stimulation der Eiablage 40
4.1.3 In vitro Befruchtung von Xenopus Oozyten 40
4.1.4 Entfernung der Gallerthülle von befruchteten Xenopus laevis Oozyten 41
4.1.5 Mikroinjektion von Xenopus Embryonen 41
4.1.5.1 Herstellen von Injektionsnadeln 41

4.1.5.2 Injektion 41
4.1.6 Präparation und Behandlung von dorsalen und ventralen Marginalzonen Explantaten 42
4.1.7 Präparation von animalen Kappen Explantaten 43
4.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE UND HISTOLOGISCHE METHODEN 45
4.2.1 Fixieren von Embryonen 45
4.2.2 Whole mount in situ Hybridisierung (WMISH) 45
4.2.3 WMISH-Doppelfärbung 47
4.2.4 Bleichen von Embryonen 48
4.2.5 Herstellung markierter antisense RNA Sonden 48
4.2.5.1 Restriktionsverdau des Expressionsplasmids 48
4.2.5.2 In vitro Transkription der antisense RNA Sonde 49
4.2.6 Vibratomschnitte 49
4.2.7 BrdU Markierung von Xenopus laevis Embryonen 50
4.2.8 Anfärben von Zellkernen durch DAPI-Lösung 52
4.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 52
4.3.1 Agarosegelelektrophorese 52
4.3.2 Restriktionsspaltung von DNA 53
4.3.3 Ligation von DNA Fragmenten 54
4.3.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten 55
4.3.5 Ligation von PCR-Fragmenten in den pCR2.1-TOPO Vektor 55
4.3.6 Chemotransformation kompetenter Bakterien 55
4.3.7 Anlegen von Gefrierkulturen transformierter Bakterien 56
4.3.8 Plasmidisolation mit Promega Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System 56
4.3.9 Plasmidisolation mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit 57
4.3.10 Aufreinigung von DNA mittels QIAGEN Gel Extraction Kit 57
4.3.11 Gewinnung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen mittels des QIAGEN Gel Extraction Kit 57
4.3.12 Sequenzierung 57
4.3.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 58
4.3.14 in vitro Transkription von mRNA für die Mikroinjektion 58
4.3.15 Aufreinigung von mRNA für die Mikroinjektion mittels QIAGEN RNeasy Kit 59
4.3.16 RNA Isolierung aus embryonalem Gewebe 59
4.3.17 cDNA-Synthese 60
4.3.18 PCR 61
4.3.19 Semiquantitative RT-PCR 62
4.3.20 Kolonie-PCR 63
4.3.21 Herstellen eines Deletionskonstrukts mittels des STRATAGENE Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit 63
4.3.22 Gekoppelte in vitro Transkriptions und Translation Reaktion zur Spezifitätsanalyse von Morpholinos 64
4.3.23 SDS-PAGE 64

5 ERGEBNISSE 66

5.1 SEQUENZIERUNG DES XISLET-1 CDNA KONSTRUKTS 66
5.2 BIOINFORMATISCHE ANALYSE DER XISLET-1 CDNA UND PROTEIN SEQUENZ 66
5.3 DAS ZEITLICHE EXPRESSIONSMUSTER VON XISL-1 WÄHREND DER ENTWICKLUNG VON XENOPUS LAEVIS 68
5.4. DAS RÄUMLICHE EXPRESSIONSMUSTER VON XISLET-1 WÄHREND DER FRÜHEN EMBRYONALENTWICKLUNG 69

5.4.1 Kardiale Expression von Xisl-1 ... *69*
5.4.2 Neurale Expression von Xisl-1 ... *72*
5.5 VERLUST DER XISL-1 FUNKTION FÜHRT ZU MORPHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN DES HERZENS ... 74
5.6 XISL-1 WIRD FÜR DIE EXPRESSION KARDIALER MARKERGENE BENÖTIGT ... 79
5.7 UNTERSUCHUNG DER PROLIFERATIONSRATE IN DER HERZREGION NACH DEM VERLUST DER XISL-1 FUNKTION ... 86
5.8 UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBEREXPRESSION VON XISL-1 MRNA ... 89
5.8.1 Überexpression von Xisl-1 in Aktivin behandelten animalen Kappen ... *89*
5.8.2 Xisl-1 mRNA ist nicht ausreichend für die Induktion kontraktilen Gewebes in VMZ Explantaten ... *91*
5.8.3 Die Bildung des Herzschlauchs ist durch die Xisl-1 Überexpression gestört ... *92*
5.9 XISL-1 WIRD FÜR DIE NORMALE ENTWICKLUNG DES GEFÄßSYSTEMS BENÖTIGT ... 95
5.10 DIE REGULATION DER XISL-1 EXPRESSION DURCH WACHSTUMSFAKTOREN DER WNT FAMILIE ... 99
6. DISKUSSION ... 101
7 ZUSAMMENFASSUNG ... 115
8 SUMMARY ... 116
9 LITERATUR ... 117
10 ANHANG ... 127
10.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ... 127
10.2 VEKTORKARTEN ... 129
10.2.1 pCS2+ Vektorkarte ... *129*
10.2.2 pCR2.1 TOPO® Vektorkarte (Invitrogen®) ... *130*
10.3 XISL-1 SEQUENZEN ... 131
10.3.1 Xisl-1 cDNA Sequenz ... *131*
10.3.2 Xisl-1 Protein Sequenz ... *132*
Xisl-1 Proteinsequenz ... 132
Sequenz der Proteindomänen von Xisl-1 ... 132
10.4 HARDWARE UND SOFTWARE ... 133
LEBENSLAUF ... 134

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Fragestellungen und Modellsysteme in der Entwicklungsbiologie

1.1.1 Allgemeine Fragestellungen der Entwicklungsbiologie

Die Entwicklungsbiologie ist bestrebt, Erkenntnisse in zwei großen Themengebieten zu erlangen: 1. Wie entwickelt sich aus einer Zygote ein adulter Organismus und 2. wie kann sich dieser adulte Organismus fortpflanzen. Es werden also die einzelnen Schritte der Embryogenese untersucht. Die Komplexität dieser Prozesse erfordert es, sich auf einen oder mehrere Teilaspekte zu konzentrieren. Ein sehr wichtiger Schritt der embryonalen Entwicklung ist die Entstehung der drei Keimblätter: Endoderm, Mesoderm und Ektoderm sowie der Keimzellen. Die Zellen der drei Keimblätter werden dann zu Vorläuferzellen der einzelnen Organe spezifiziert und differenzieren schließlich zu spezialisierten Zelltypen. Die Morphogenese der Organe und Gewebe erfordert zudem die korrekte Lokalisation der Vorläuferzellen im Embryo. In diesem Zusammenhang sind Mechanismen wie z.B. Zellteilung, Apoptose und Zellwanderung von Interesse. Zudem werden die Einflüsse von Umweltfaktoren auf die Prozesse der Embryogenese sowie die evolutionäre Veränderung der einzelnen Mechanismen untersucht (Gilbert et al., 2006).

1.1.2 Die verschiedenen Modellsysteme der Entwicklungsbiologie

Die oben angesprochenen allgemeinen Fragestellungen der Entwicklungsbiologie werden an verschiedenen Modellorganismen untersucht. Die wichtigsten dieser Modellorganismen sind die Invertebraten *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) und *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) und die Vertebraten *Danio rerio* (Zebrafisch), *Xenopus laevis* (südafrikanischer Krallenfrosch), *Gallus gallus* (Haushuhn) und *Mus musculus* (Hausmaus). Die Entwicklung eines Embryos setzt die räumlich und zeitlich koordinierte Verarbeitung einer Vielzahl physikalischer (u.a. elektrische, mechanische und gravitationsabhängige) und molekularer Signale voraus. Durch die Signalverarbeitung erhalten die Zellen eines Embryos Informationen über die Zellposition, und die Zellproliferation. Außerdem wird die Zellwanderung, die Differenzierung und die Morphologie der Zelle durch Signale reguliert (Kessel und Gruss, 1991; Chenn und Walsh, 2002; Nieto et al., 1994; Briscoe et al., 2000; Akiyama und Kawasaki, 2006; Wendler und Rivkees, 2006). Jeder der zuvor beschriebenen

Modellorganismen birgt Vorteile für die Beantwortung bestimmter entwicklungsbiologischer Fragestellungen.

Die Fruchtfliege stellt durch ihre kurze Generationszeit ein sehr gutes System für genetische Untersuchungen dar. An *C. elegans* ist die Determination einzelner Zellen sehr gut zu untersuchen, da der Fadenwurm aus 959 (adulter Hermaphrodit) bzw. 1031 (adultes Männchen) Zellen besteht, und das Entwicklungsschicksal jeder somatischen Zelle zu jedem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung bekannt ist (Yochem und Herman, 2003). Die Hausmaus (*Mus musculus*) besitzt den großen Vorteil, dass die in diesem Organismus gewonnenen Erkenntnisse aufgrund der relativ geringen evolutionären Distanz sehr gut auf den Menschen übertragbar sind. Der große Nachteil besteht in der intrauterinen Entwicklung und der langen Generationszeit dieses Säugetiers. Es ist technisch schwierig und zeitaufwendig, Manipulationen am Embryo vorzunehmen und die Entwicklung des Embryos zu verfolgen (Abuin et al., 2007). Das Haushuhn stellt ein sehr gut zugängliches und leicht manipulierbares System dar, allerdings ist die Inhibition einzelner Gene technisch aufwendig (Sato, 2004; Stern, 2005). Der Zebrafisch *Danio rerio* eignet sich sehr gut für die Erzeugung von Mutanten und somit für genetische Studien. Außerdem ist der Fischembryo transparent und entwickelt sich außerhalb des Mutterleibs, wodurch er sich für Ganzkeimfärbungen und Zellschicksalsanalysen verwenden lässt (Key und Devine, 2003).

Beim südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* findet die Embryogenese komplett extrakorporal statt und kann daher mithilfe eines Binokulars verfolgt werden. Die Entwicklung der befruchteten Oozyte bis zur Kaulquappe ist im Vergleich zur Maus sehr schnell, wodurch in wenigen Tagen verlässliche Daten aus *in vivo* Analysen erhalten werden können. Bei *Xenopus* ist es zudem möglich während der ersten Furchungsteilungen aufgrund der relativen Größe der einzelnen Blastomeren diese gezielt zu manipulieren. Dies ermöglicht es, aufgrund der vorhandenen Zellschicksalskarten (Moody et al., 1987) die Entwicklung einzelner Organe spezifisch zu manipulieren. Es ist also technisch sehr einfach, durch Mikroinjektion von DNA oder mRNA ein oder mehrere Gene von Interesse ektopisch zu exprimieren. Funktionsverluststudien eines oder mehrerer Regulatoren der embryonalen Entwicklung können durch die Injektion von antisense Morpholino Oligonukleotiden bzw. durch die Expression von dominant negativen mRNA Konstrukten durchgeführt werden. Die Präparation von Explantaten der dorsalen oder ventralen Marginalzone ermöglicht es, nur dorso-anteriores bzw. ventro-posteriores Gewebe zu untersuchen. Das Ektoderm entsteht aus den Zellen des animalen Pols. Im Blastula Stadium bilden diese Zellen eine multipotente Vorläuferzellpopulation. Explantate des animalen Pols werden als animale Kappen

bezeichnet. Unbehandelt bilden diese Explantate ektodermales Gewebe, die sogenannte atypische Epidermis. Die Induktion eines ektodermalen, mesodermalen oder endodermalen Zellschicksals kann durch die Injektion bzw. die Behandlung mit z.B. Wachstumsfaktoren erreicht werden. Dies ist ein wichtiges Instrument für die Untersuchung der Regulation der Expression von Markergenen (Sive et al., 2000).

1.2 Mesoderminduktion in Xenopus laevis

Während der Gastrulation des Froschembryos kommt es zur Spezifizierung der drei Keimblätter: Ektoderm, Endoderm und Mesoderm (Abb.1A). Aus letzterem entsteht eine große Anzahl verschiedener Organe und Gewebe wie z.B. das Herz, das Gefäßsystem, das Blut, die Muskulatur, die Nieren, die Knochen und ein Großteil der Knorpel. Das Mesoderm wird in der äquatorialen Region des Embryos in der sogenannten Marginalzone induziert. Aus den Zellen des animalen Pols geht das Ektoderm und aus den Zellen des vegetalen Pols das Endoderm hervor (Abb. 1A; Gilbert, 2006; Kimelman, 2006).

Die Induktion und die Musterung des Mesoderms erfordert vier Gruppen von Signalen. Das erste Signal aus dem vegetalen Pol des Embryos induziert ein allgemeines mesodermales Zellschicksal. Ein zweites Signal induziert dorsales Mesoderm bzw. den Spemann Organisator. Das dritte Signal geht von der ventralen Region des Embryos aus, das vierte Signal vom Spemann Organisator. Das dritte und das vierte Signal mustern das Keimblatt entlang der dorso-ventralen Körperachse.

Nachdem das vier Signalmodell der Mesoderminduktion in einer allgemeinen, vereinfachten Darstellung beschrieben wurde, sollen im Folgenden einige molekularen Grundlagen des Modells erläutert werden. In der *Xenopus* Blastula entsteht durch die Akkumulation von β-Catenin im dorsalen Endoderm das sogenannte Nieuwkoop-Zentrum. Die Zellen des Nieuwkoop-Zentrums induzieren über β-Catenin u.a. die Expression von goosecoid. Dieser Faktor ist essentiell für die Spezifizierung des dorsalen Mesoderms. Die maternalen Faktoren Vg1 (TGFβ Familie) und VegT (T-Box Faktor) induzieren ein mesodermales Zellschicksal, indem sie im Endoderm die Expression der *Xenopus nodal-related (Xnr)* Faktoren induzieren. Die zur TGFβ Familie gehörenden Xnr Faktoren sind essentiell für die Mesoderminduktion im Frosch. Durch einen Konzentrationsgradienten dieser Faktoren kommt es zur Musterung des Mesoderms entlang der dorso-ventralen Körperachse. Der Gradient entsteht durch die synergistische Aktivierung des Xnr Promotors durch β-Catenin und Vg1/VegT. Die

Modulation des Gradienten erfolgt hauptsächlich über die β-Catenin Konzentration. Diese ist, wie oben erwähnt, auf der dorsalen Körperseite am höchsten, was auch zu einer hohen Konzentration an Xnr Faktoren führt. Hohe Konzentrationen an Xnr Faktoren induzieren den Spemann Organisator, etwas geringere Konzentrationen führen zur Spezifizierung von lateralem Mesoderm und sehr niedrige Konzentrationen induzieren ventrales Mesoderm. Die Xnr Proteine induzieren ein mesodermales Zellschicksal durch die Induktion der Expression des panmesodermalen Markergens Brachyury (Xbra). Das ventrale und das laterale Mesoderm werden durch die Faktoren BMP-4 und Xwnt-8 gemustert. Die vom Spemann Organisator sezernierten Faktoren Chordin, Noggin und Frzb inhibieren den BMP Signalweg und induzieren somit dorsales Mesoderm (Abb.1B; Gilbert, 2006; Wolpert et al., 1999).

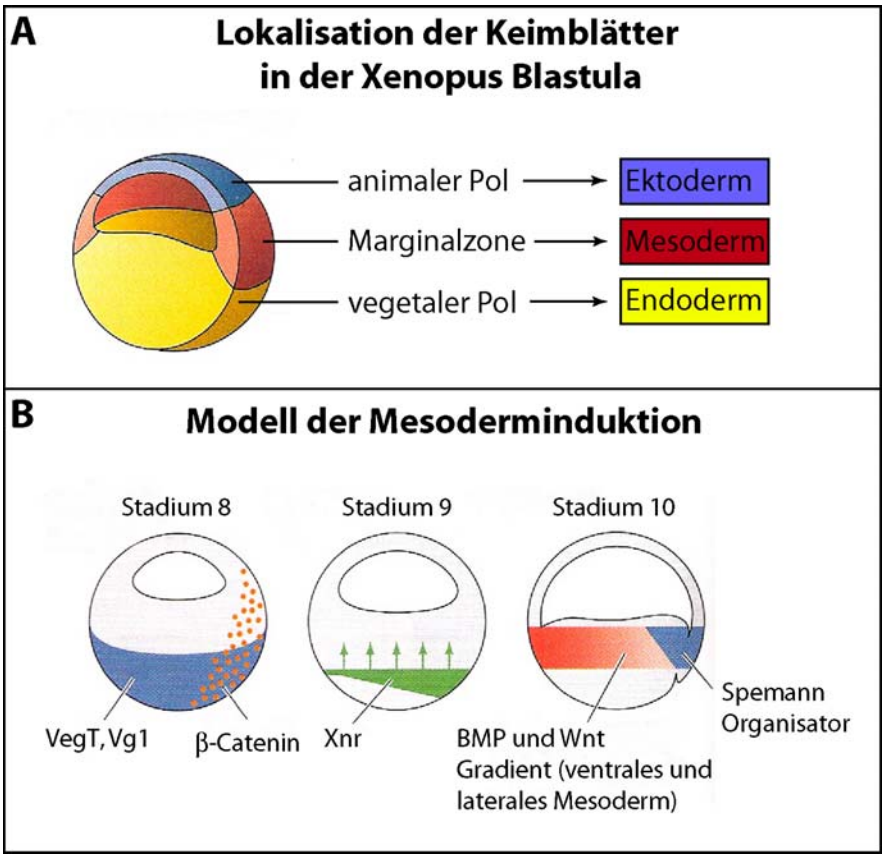


Abb. 1 Lokalisation der Keimblätter und Induktion des Mesoderms. A) Darstellung der einzelnen Regionen der *Xenopus* Blastula und die daraus entstehenden Keimblätter. **B)** Ein Modell der Mesoderminduktion und Musterung entlang der dorso-ventralen Achse. Details siehe Text. (Verändert nach Gilbert, 2006)

1.3 Herzentwicklung in Xenopus laevis

1.3.1 Morphologische Aspekte der Herzentwicklung in *Xenopus*

Das Herz ist das erste Organ des Embryos das seine Funktion aufnimmt. Es ist die Grundlage für das weitere Wachstum des Embryos, weil es die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff und die Entsorgung von Stoffwechselendprodukten sicherstellt (Harvey, 2002).
Durch Zellschicksalsanalysen konnte gezeigt werden, dass kardiale Progenietorzellen aus der dorsalen Marginalzone des frühen *Xenopus* Embryos hervorgehen (Moody, 1987). Die kardialen Vorläuferzellen werden während der Gastrulation im dorso-anterioren Mesoderm durch die Interaktion mit dem darrunterliegenden dorso-anterioren Endoderm und durch Signale aus dem Spemann Organisator spezifiziert. Die Herzvorläuferzellen befinden sich zu Beginn der Gastrulation ca. 15° beidseits des Spemann Organisators (Sater und Jacobson 1989; Sater und Jacobson, 1990; Harvey et al. 1999) (Abb. 2A). Zu Beginn der Neurulation (Stadium (St.) 13-14) sind die primären Herzfelder im anterioren Mesoderm, an den Rändern der Neuralplatte lokalisiert. Während der Neurulation wandern die beiden Herzprimordien in Richtung der ventralen Mittellinie. Die Fusion der beiden primären Herzfelder an der ventralen Mittellinie beginnt im St. 16 und ist ungefähr im St. 19, wenn die Neurulation abgeschlossen ist, beendet (Abb. 2B) (Kolker et al., 2000; Mohun et al., 2003). Das präkardiale Mesoderm dehnt sich nun sichelförmig über die ventrale Mittellinie aus und bildet einen schmalen Streifen posterior der Haftdrüse. In dieser Region findet die weitere Differenzierung und die Bildung des Herzens statt. Die Herzanlage vergrößert sich entlang der anterior-posterioren Körperachse durch Zellbewegungen bzw. durch die Proliferation der Herzvorläuferzellen (Mohun et al., 2003). Die terminale Differenzierung der Kardiomyozyten beginnt im St. 27 mit der Expression von entsprechenden Markergenen wie z. B. *Troponin Ic* (*TnIc)* und *cardiac-α-Actin* (*cA).* Im St. 28/29 beginnt die Bildung des linearen Herzschlauchs. Dabei bildet das Myokardium eine Art Trog und umschließt das Endokardium. Diese beiden Gewebe werden durch eine Schicht extrazellulärer Matrix separiert, das sogenannte *„cardiac jelly“*. Die Bildung des linearen oder auch primären Herzschlauchs ist im St. 32/33 abgeschlossen (Abb. 2C) (Mohun et al., 2000; Warkman and Krieg, 2007). Der lineare Herzschlauch beginnt sich nun nach rechts zu einer Schleife aufzufalten. Die Bildung der Herzschleifen (*Cor sigmoideum*) ist ein sehr komplexer und störungsanfälliger Prozess. Es wird zunächst eine C-förmige Herzschleife gebildet. Dies kommt durch ein verstärktes Wachstum des äußeren Bereichs des Myokardiums gegenüber dem des inneren Bereichs zustande. Durch den Einfluss der bereits ausgebildeten

embryonalen Rechts-/Links-Achse kommt das *Cor sigmoideum* auf der rechten Körperhälfte zu liegen. In einer zweiten Phase der Herzschleifenbildung entsteht ein S-förmiger Herzschlauch. Es folgt der finale Schritt der Bildung der Herzschleife, indem der *Truncus arteriosus* und der *Bulbus cordis* in Richtung des rechten Atriums verschoben wird (Ramsdell, 2005). Die noch nicht getrennten zukünftigen Atrien kommen nun relativ dorsal zum zukünftigen Ventrikel zu liegen. Die Bildung der Herzschleife beginnt in *Xenopus* Embryonen ungefähr im St. 33 und ist im St. 36 abgeschlossen (Warkman und Krieg, 2007). Die Bildung der Herzschleifen erfordert eine Zunahme der Zellzahl des lineare Herzschlauchs. Für das Myokardium im zentralen, sich auffaltenden Teil, des Herzschlauches konnte eine Verdopplung der Zellzahl verzeichnet werden. In der myokardialen Zellschicht an den anterioren und posterioren Enden des Herzschlauchs ist eine geringere Zunahme der Zellzahl zu beobachten. Das dorsale Perikarddach und das dorsale Mesokardium verändern ihre Zellzahl während der Bildung des *Cor sigmoideum* kaum (Mohun et al., 2000). Der primäre Herzschlauch beginnt ungefähr im St. 35 mit rhythmischen Kontraktionen. Nachdem das *Cor sigmoideum* gebildet ist, beginnt die Kammerbildung. In diesem Abschnitt der Herzentwicklung wird das Myokardium des Ventrikels dicker und es werden die Trabekel gebildet. Außerdem beginnt die Bildung der Herzklappen. Einer der letzten Prozesse ist die Septierung der Atrien. Im St. 46 ist die Organogenese des Herzens abgeschlossen. Das Herz von *Xenopus laevis* besteht aus zwei septierten Atrien und einem nicht vollständig septierten Ventrikel. Das Myokardium des Ventrikels ist wesentlich dicker als das der Atrien, die mit dem Gefäßsystem der Kaulquappe verbunden sind.

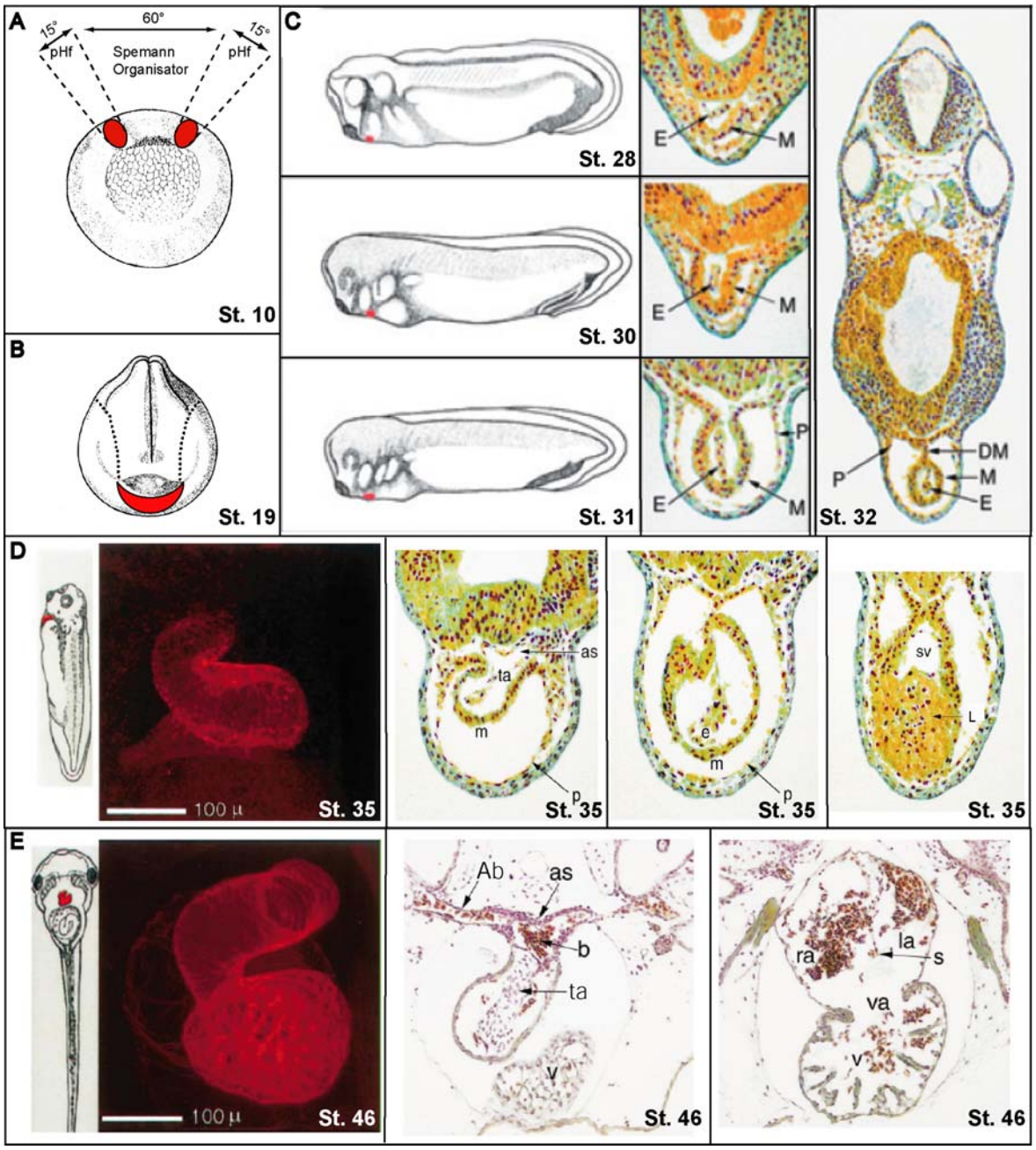


Abb. 2 Die morphologische Entwicklung des Herzens in *Xenopus laevis*. A) Induktion der Herzvorläuferzellen in zwei Populationen (rote Keise) links und rechts des Spemann Organisators im St.10. **B)** Migration und Fusion der Herzprimordien (rote Markierung) an der ventralen Mittellinie im St. 19. **C)** Bildung des linearen Herzschlauchs im St. 28-32. Die Herzregion ist in den St. 28-31 rot markiert. **D)** Bildung der Herzschleife (St. 35). **E)** Reifung, Kammerbildung und Septierung des Herzens (St. 46). Details siehe Text. (Zusammengestellt nach Mohun et al., 2000; Kolker et al., 2000; Mohun et al., 2003) pHf = primäres Herzfeld; E, e = Endokardium; M, m = Myokardium; P, p = Perikardium; DM = dorsales Mesokardium; ta = *Truncus arteriosus*; as = Aortenbeutel („aortic sac"); sv = *Sinus venosus*; L = Leber; Ab = Aortenbögen; b = Blut; ra = rechtes Atrium; la = linkes Atrium; va = *atrioventrikulare Apertur*; s = Septum; v = Ventrikel

1.3.2 Molekulare Grundlagen der Herzentwicklung der Vertebraten

Eine Fülle von Signalwegen reguliert in einem dynamischen, zeitlich und räumlich fein abgestimmten Netzwerk von Interaktionen die normale Herzentwicklung der Vertebraten. Im letzten Jahrzehnt konnten viele dieser Faktoren identifiziert werden, von denen die wichtigsten in diesem Kapitel vorgestellt werden. Da eine detaillierte Beschreibung des Netzwerks an kardialen Faktoren den Rahmen dieser Einleitung überschreiten würde, wird der interessierte Leser für Details an einige, sehr gute Übersichtsartikel verwiesen (Harvey et al., 2002; Brand et al., 2003; Buckingham et al., 2005; Brade et al., 2006; Srivastava, 2006).

Induktion kardialer Vorläuferzellen im anterioren Mesoderm

Die Interaktion des dorso-anterioren Mesoderms mit dem darunterliegenden anterioren Endoderm ist essentiell für die Induktion von Herzvorläuferzellen zu Beginn der Gastrulation (Nascone und Mercola, 1995; Schultheiss et al., 1995). Für die Induktion von Herzvorläuferzellen sind Wachstumsfaktoren der FGF, BMP und Wnt Familien wichtig. Die Signaltransduktion des Wnt Signalwegs verläuft über unterschiedliche intrazelluläre Modulatoren. Durch den kanonische Wnt Signalweg, wird über die Stabilisierung von β-Catenin die Expression von Zielgenen reguliert. Zum andern sind die nicht-kanonischen Wnt/JNK bzw. Wnt/Ca^{2+} Signalwege beschrieben worden. Embryologische Daten zeigen, dass der kanonische Wnt/β-Catenin Signalweg für die Induktion eines kardialen Zellschicksals inhibiert werden muss (Schneider und Mercola, 2001). In embryonalen Stammzellen der Maus bzw. in einer Zellpopulation eines Teratokarzinoms der Maus (P19) konnte dagegen gezeigt werden, dass der kanonische Wnt Signalweg für die Kardiogenese notwendig ist (Nakamura et al., 2003; Naito et al., 2006). Der Verlust der β-Catenin Funktion in Mausembryonen führt allerdings zu multiplen Herzen (Lickert et al., 2002). Die Rolle des kanonischen Wnt Signalwegs während der Induktion von kardialen Vorläuferzellen ist noch Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion. Der Spemann Organisator im anterioren Mesoderm und das Endoderm bilden die Antagonisten des Wnt/β-Catenin Signalwegs Dkk-1, Cerberus und Crescent. Die Funktion dieser Antagonisten und die Aktivierung des Wnt/JNK Signalwegs führen in Xenopus zu einer Spezifizierung von Herzvorläuferzellen (Pandur et al., 2002; Brand, 2003; Brade et al., 2006; Foley et al., 2006). Die Rolle der Wachstumsfaktoren der FGF-Familie (FGF-2, -4, -8) ist bisher vornehmlich in Hühnerembryonen untersucht worden. FGF-4 kann im Huhn ektopisch kontraktiles Gewebe

induzieren. Für BMP-2 und –4 wurde eine Funktion während der frühen Herzentwicklung gezeigt. BMP Faktoren scheinen hauptsächlich an der Aufrechterhaltung der spezifizierten kardialen Vorläuferpopulation beteiligt zu sein (Shi et al., 2000; Walters et al., 2001). BMP Faktoren alleine sind im Huhn und in *Xenopus* nicht ausreichend um ektopisch differenzierte Kardiomyozyten zu induzieren. Allerdings konnte für Hühnerembryonen gezeigt werden, dass in Gegenwart von FGF-2 oder –4 ein kardiales Zellschicksal durch BMP-2 und –4 induziert werden kann. BMP und FGF Faktoren spezifizieren somit synergistisch Herzvorläuferzellen im dorsalen Mesoderm des Hühnerembryos. Die spezifizierten Herzvorläuferzellen exprimieren mehrere wichtige Markergene. Zu diesen gehören u.a. *Nkx2.5, Tbx20, GATA-4,-5,-6* und *Isl-1*.

Es wird schon in diesem ersten Schritt der Herzentwicklung deutlich, wie komplex die genetischen Grundlage der Induktion eines kardialen Zellschicksals ist. Die Interaktion der einzelnen Wachstumsfaktoren muss sowohl zeitlich als auch räumlich wohl kontrolliert sein, um ein kardiales Zellschicksal zu induzieren.

Homeodomänen Transkriptionsfaktoren der Nk-Klasse

Der Homeobox Transkriptionsfaktor *tinman* ist essentiell für die Herzentwicklung in *Drosophila* (Bodmer, 1993). *Nkx2.5*, das homologe Gen des Transkriptionsfaktors in Vertebraten, ist einer der ersten nachweisbaren Marker für spezifizierte Herzvorläuferzellen. In *Xenopus* kann der Beginn der Expression von *Nkx2.5* während der Gastrulation detektiert werden. Die Expression in kardialem Gewebe bleibt während der gesamten Embryogenese und im adulten Froschherz erhalten. *Nkx2.5* wird zudem im anterioren Endoderm und in den Pharynxbögen exprimiert. Die Überexpression von *Nkx2.5* in der dorsalen Marginalzone von *Xenopus* Embryonen führt zu vergrößerten Herzen. Eine ektopische Überexpression auf der ventralen Seite des Embryos ist allerdings nicht ausreichend, um die Expression von Herzmarkergenen zu induzieren (Tonissen et al., 1994; Cleaver et al., 1996). Die Inhibition der Nkx2.5 Funktion führt zu einem kompletten Verlust bzw. einer starken Reduktion an kardialem Gewebe in *Xenopus* Embryonen. Dieser Phänotyp wurde auf eine gestörte Spezifizierung von Herzvorläuferzellen zurückgeführt (Grow und Krieg, 1998). In der *Nkx2.5* Knockout-Maus wird zwar ein kontrahierender Herzschlauch gebildet, die Herzschleifenbildung ist allerdings empfindlich gestört. Das Myokardium des Herzschlauchs ist sehr dünn und nicht normal differenziert. Die Embryonen sterben nach etwa 10 Tagen an diesem Herzdefekt (Lyons et al., 1995). Die Expression von *Nkx2.5* wird durch GATA-4

reguliert. (Jiang et al., 1999). Der Wachstumsfaktor BMP-4 ist wichtig für die Aufrechterhaltung der *Nkx2.5* Expression (Walters et al., 2001). Zielgene von Nkx2.5 sind u.a. der *Atrial Naturetic Factor* (*ANF)* und *cardiac-α-actin (cA)*. Nkx2.5 interagiert physikalisch mit GATA-4 und beide Faktoren aktivieren synergistisch den Promotor des *ANF* Gens (Harvey et al., 1999). Viele Untersuchungen in unterschiedlichen Organismen zeigen, dass Nkx2.5 ein zentraler Faktor des komplexen Netzwerks an Faktoren ist, das eine normalen Herzentwicklung gewährleistet.

GATA-Faktoren

Die Zinkfinger Transkriptionsfaktoren der GATA Familie wurden in vielen Vertebraten als wichtige Regulatoren der Herzentwicklung beschrieben. Die Expression von GATA-4, -5 und –6 kann in *Xenopus* mit dem Beginn der Gastrulation (St. 10) detektiert werden. Die GATA-Faktoren werden in Herzvorläuferzellen im anterioren Mesoderm sowie im anterioren Endoderm exprimiert (Jiang et al., 1996; Peterkin et al., 2005). Der Verlust der GATA-4 Funktion führt in Vertebraten nicht zu einer gestörten Spezifizierung kardialer Vorläuferzellen sondern zu einem *Cardia bifida* Phänotyp (Peterkin et al., 2005). Die Entwicklung der Atrien und des *Sinus venosus* ist ebenfalls von GATA-4 abhängig. Die GATA-6 Funktion ist notwendig für die Aufrechterhaltung der *BMP-4* und der *Nkx2.5* Expression. GATA-6 verhindert außerdem die terminale Differenzierung. GATA-6 ist somit für die Aufrechterhaltung der kardialen Vorläuferzellpopulation essentiell (Gove et al., 1997; Peterkin et al., 2003). Es konnte sowohl für kardiale Spezifizierungsmarkergene wie *Isl-1* und *Nkx2.5* sowie für terminale Differenzierungsmarker wie z.B. *TnIc* und *cA* eine Regulation durch einen oder mehrere GATA Faktoren in Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (Peterkin et al., 2005; Charron et al., 1999).

T-Box-Faktoren

Die T-Box Transkriptionsfaktoren *Tbx5* und *Tbx20* werden ebenfalls von kardialen Progenietorzellen exprimiert (Stennard und Harvey, 2005). In *Xenopus* können *Tbx5* und *Tbx20* während der Neurulation (St. 16/17) in Herzvorläuferzellen detektiert werden. Zusammen mit den *GATA* Faktoren, *Nkx2.5* und *Isl-1* sind diese Faktoren die ersten nachweisbaren Markergene für spezifizierte Herzvorläuferzellen. Die Expression bleibt bis

mindestens in späte Schwanzknospenstadien (St.35) in kardialem Gewebe erhalten (Brown et al., 2003).

Die Verlust der Funktion eines oder beider T-Box Faktoren führt in Vertebraten zu einem Verlust an kardialem Gewebe, einer Inhibition der Herzschleifenbildung und einem perikardialen Ödem. Studien belegen, dass die Spezifizierung und Migration der kardialen Progenietoren nicht beeinträchtigt ist. Die Proliferationsrate kardialer Vorläuferzellen ist allerdings deutlich vermindert, was den beobachteten Phänotyp erklärt (Szeto et al., 2002; Brown et al., 2005; Cai et al., 2005; Goetz et al., 2006). In *Xenopus* konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Tbx5 Funktion zur Arretierung des Zellzyklus in der G1 oder der frühen S-Phase führt und Tbx5 somit direkt die Zellproliferation reguliert (Goetz et al., 2006). In der Maus reguliert Tbx20 die Zellteilung durch die Repression von Tbx2 was zur Inhibition der Zellproliferation führt (Cai et al., 2005).

Im Zellkultursystem konnte gezeigt werden, dass Tbx20 die Expression von *Nkx2.5* und *Myocyte enhancer factor 2c (Mef2c)* induziert und die Transkription von *Isl-1* inhibiert (Takeuchi et al., 2005; Cai et al., 2005). Tbx20 kann also sowohl als Aktivator oder als Repressor der Transkription von Markergenen wirken (Singh et al., 2005; Cai et al., 2005). Die T-Box Faktoren sind wichtige morphogenetische Regulatoren der Herzentwicklung der Vertebraten. Sie kontrollieren den Zellzyklus und damit die normale Zellzahl des kardialen Gewebes.

HAND Faktoren

Die basischen Helix-Schleife-Helix Proteine eHAND (Hand1) und dHAND (Hand2) spielen während der Herzentwicklung der Vertebraten eine wichtige Rolle (Firulli, 2003). In *Xenopus* konnte die Expression von *eHAND* in der Herzanlage und in Vorläuferzellen des Gefäßsystems detektiert werden. In frühen Schwanzknospenstadien wird *eHAND* im Seitenplattenmesoderm mal auf der linken Körperhälfte, mal auf der rechten Körperhälfte exprimiert. Diese Rechts-Links Asymmetrie ist in diesen Stadien zufällig. Vor der Herzschleifenbildung ist *eHAND* im Perikarddach und im Myokardium auf der linken Seite exprimiert. Nachdem die Herzschleife ausgebildet wurde, kann die mRNA des Transkriptionsfaktors wieder symmetrisch im Myokardium detektiert werden. Eine Regulation dieses Gens durch BMP-4 konnte nachgewiesen werden (Sparrow et al., 1998). *dHAND* ist in *Xenopus* Embryonen nur in den Branchialbögen und in Vorläuferzellen des Gefäßsystems exprimiert, nicht aber in der Herzanlage (Smith et al., 2000). Im Säuger sind

die HAND Gene wichtige Regulatoren der Herzkammerbildung. In der Maus konnte die Expression von *dHAND* im rechten Ventrikel, die Transkription von *eHAND* im linken Ventrikel nachgewiesen werden (Thomas et al., 1998). In den jeweiligen Knockout-Mausembryonen war die morphologische Ausbildung des rechten bzw. linken Ventrikels gestört (Srivastava et al., 1997; Firulli et al., 1998). Der konditionale eHAND/dHAND Doppel-Knockout ermöglichte es zu zeigen, dass HAND Gene die Morphogenese des Herzens und die spezifische Genexpression in den Ventrikeln dosisabhängig regulieren (McFadden et al., 2005). Die HAND Faktoren sind wichtige Regulatoren der Entwicklung des Herzkreislauf-systems. Während der Reifung der Herzkammern sind diese Transkriptionsfaktoren essentiell für die Identität des jeweiligen Ventrikels durch die Regulation spezifischer Markergene.

Der Transkriptionsfaktor Islet-1 und das anteriore oder sekundäre Herzfeld

Die bisher beschriebenen kardialen Transkriptionsfaktoren sind gut charakterisiert und ihre Rolle während der Herzentwicklung wurde in etlichen Studien demonstriert. Der LIM-Homeodomänen Transkriptionsfaktor Islet-1 (Isl-1) wurde erst vor wenigen Jahren als ein Markergen für kardiale Progenietoren des sekundären bzw. anterioren Herzfelds in Amnioten beschrieben (Cai et al., 2003; Kelly et al., 2001; Waldo et al., 2001; Mjaatvedt et al., 2001; Yuan und Schoenwolf, 2000) (Abb. 3). Immunhistochemische Analysen von Isl-1 in der Maus zeigten allerdings, dass das Protein des Transkriptionsfaktors, im Gegensatz zur mRNA, auch in Zellen des primären Herzfeldes nachgewiesen werden kann. Isl-1 wird aufgrund dieses neuen Befundes auch als pankardiales Markergen bezeichnet (Prall et al., 2007).

Der Transkriptionsfaktor wurde ursprünglich in den endokrinen Zellen des Pankreas der Ratte (*Rattus norvegicus*) identifiziert (Karlsson et al., 1990) und wenig später wurde das Nervensystem als eine weitere Expressionsdomäne von *Isl-1* beschrieben (Pfaff et al., 1996). Inzwischen sind *Isl-1* Homologe in Maus, Huhn, *Xenopus*, Zebrafisch und *Drosophila* identifiziert worden (Kelly und Melton, 2000; Thor und Thomas, 1997; Pfaff et al., 1996; Korzh et al., 1993; Ericson et al., 1992; Bang und Goulding, 1996).

Die *Isl-1* Knockout-Mausembryonen sterben am Tag E10.5-11.5 *in utero* an einem kardiovaskulären Defekt. Der Herzphänotyp manifestiert sich in einer gestörten Herzschleifenbildung und der Ausbildung eines Herzens das hauptsächlich aus einem linken Ventrikel besteht. Ferner wurde gezeigt, dass Isl-1 eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation von kardialen Progenietoren spielt und die Apoptose unterbindet. Außerdem

reguliert Isl-1 die Migration von spezifizierten Herzvorläuferzellen in den primären Herzschlauch (Cai et al., 2003).

Die Untersuchung der *Isl-1* Expression im präkardialen Mesoderm der Maus zeigte, dass die *Isl-1* mRNA in spezifizierten Herzvorläuferzellen dorsal-medial der *Nkx2.5*$^{+}$ kardialen Progenietoren detektiert werden kann (Abb. 3B E7.5). Während der Bildung des linearen Herzschlauchs, können *Isl-1* Transkripte im Mesokardium visualisiert werden. *Isl-1* ist zudem im splanchnischen Mesoderm wie auch im anterioren Endoderm exprimiert. Interessanterweise wird *Isl-1* nicht im Myokardium transkribiert. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Isl-1* in Kardiomyozyten zum Zeitpunkt der terminalen Differenzierung unterbunden wird. *Isl-1* markiert somit undifferenzierte kardiale Progenietoren. *Isl-1*$^{+}$ Vorläuferzellen bilden zu einem späteren Zeitpunkt den *Truncus arteriosus,* den *Bulbus cordis* und den rechten Ventrikel sowie den Großteil beider Atrien. Im linken Ventrikel konnten weniger als 20% aller Zellen auf die vormals *Isl-1*$^{+}$ Zellpopulation zurückgeführt werden. Außerdem können diese Zellen in den kardialen Ganglien, im Erregungsleitungssystem (AV-Knoten) und den Herzklappen nachgewiesen werden (Sun et al., 2007). Zudem wurde eine *Isl-1*$^{+}$, undifferenzierte Zellpopulation im postnatalen Herz der Maus nachgewiesen (Laugwitz et al., 2005). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche Rolle diese Zellen im adulten Herzen spielen und ob es möglich ist, diese Zellen *in vitro* zu kultivieren. Dies wäre ein bedeutender Schritt im Hinblick auf eine mögliche Therapie von Herzerkrankungen.

Die oben beschriebene Expressionsdomäne von *Isl-1* im anterioren, splanchnischen Mesoderm der Maus, stimmt mit der Lokalisation des sogenannten anterioren oder sekundären Herzfelds überein, welches für die Maus (Kelly et al., 2001) und das Huhn (Waldo et al., 2001; Mjaatvedt et al., 2001) beschrieben wurde (Abb. 3).

Die klassische Theorie der Herzentwicklung ging davon aus, dass die spezifizierten kardialen Vorläuferzellen des primären Herzfeldes alle Kompartimente des Herzens bilden (Stalsberg und DeHaan, 1969). Bereits in den 70er Jahren wurde erkannt, dass sowohl in Vögeln als auch in Säugetieren während der Herzschleifenbildung zusätzlich Zellen am arteriellen und venösen Pol des linearen Herzschlauchs einwandern (de la Cruz et al., 1977; Viragh und Challice, 1973). Für eine normale Ausbildung des *Cor sigmoideum* ist das Wachstum des linearen Herzschlauchs durch die beschriebene Addition von Zellen essentiell. Für *Xenopus* und Zebrafisch wurde ein vergleichbarer Prozess bisher nicht beschrieben. Allerdings konnte eine Verdopplung der Zellzahl im zentralen sich auffaltenden Teil des Herzschlauchs des Froschs nachgewiesen werden (Mohun et al., 2000). Durch die oben erwähnten Studien

(Mjaatvedt et al., 2001; Waldo et al., 2001 und Kelly et al., 2001) und die Identifizierung von *Isl-1* als Markergen für diese migrierende Zellpopulation konnte die anatomische Lokalisation dieser in den Herzschlauch einwandernden Zellen erstmals bestimmt werden. Die genauen Grenzen dieser kardialen Vorläuferzellpopulation sind allerdings noch Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Durch die Anwendung unterschiedlicher Techniken der Zellmarkierung wurden verschiedene, sich aber zum Teil überlappende Regionen beschrieben, was zu einer inhomogenen Terminologie führte. Das anteriore Herzfeld (AHF), welches von Mjaatvedt et al. (2001) beschrieben wurde, ist im anterioren, splanchnischen Mesoderm, das den *Truncus arteriosus* umgibt, lokalisiert. Zudem erstreckt sich dieses AHF auch in die Pharynxbögen. Diese Zellen bilden vornehmlich den *Truncus arteriosus* und den *Bulbus cordis* (Abb. 3). Waldo et al. (2001) beschrieben ein sogenanntes sekundäres Herzfeld (SHF). Dieses umfasst Zellpopulationen im posterior zum *Truncus arteriosus* gelegenen splanchnischen Mesoderm. Weitere Untersuchungen ergaben, dass dieses SHF eine Subpopulation des AHF darstellt (Abb. 3A) (Kelly, 2005). Kelly et al. (2001) beschrieben, dass der rechte Ventrikel und der *Truncus arteriosus* sowie der *Bulbus cordis* des Mausembryos von Zellen gebildet wird, die außerhalb des primären Herzfeldes zu finden sind. Kelly und Kollegen konnten zeigen, dass diese Kompartimente des Herzens von Zellen des splanchnischen Mesoderms und der Pharynxbögen gebildet werden. Diese anatomische Lokalisation deckt sich mit dem von Mjaatvedt und Kollegen (2001) im Huhn beschrieben AHF (Abb. 3A, B). Meilhac et al. (2004) zeigten durch eine retrospektive Klonanalyse, dass das Myokardium aus zwei mesodermalen Zellpopulationen hervorgeht, die aber einen gemeinsamen Progenietor besitzen. Die erste Zellpopulation bildet hauptsächlich den linken Ventrikel, die Atrien und den *Sinus venosus*. Die Herkunft dieser Kompartimente wurde bisher vornehmlich dem primären Herzfeld zugeschrieben. Die zweite Zellpopulation bildet hauptsächlich den rechten Ventrikel, den *Truncus arteriosus* und den *Bulbus cordis*, allerdings konnten Klone dieser Zellpopulation auch in den Atrien und im *Sinus venosus* beschrieben werden. Das AHF/SHF wäre also eine Subpopulation der zweiten Vorläuferzellpopulation mit Isl-1 als molekularem Marker (Kelly, 2005) (Abb. 3 C, D).

Neue Untersuchungen zeigen nun, dass in der Maus bzw. in embryonalen Stammzellen des Säugers eine mesodermale *Isl-1*$^{+}$*/Nkx2.5*$^{+}$*/Flk-1*$^{+}$ Zellpopulation nachgewiesen werden kann. Aus dieser Zellpopulation können die drei häufigsten Zelltypen des Herzens (Kardiomyozyten, Endothelzellen, Muskelzellen) gebildet werden, (Moretti et al., 2006; Wu et al., 2006; Kattman et al., 2006; Sun et al., 2007). Diese multipotenten kardialen Progenietorzellen scheinen die von Meilhac und Kollegen (2004) definierte zweite kardiale

Zellpopulation zu repräsentieren. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass eine *Isl-1*$^{+}$*/Nkx2.5*$^{+}$ Zellpopulation, die zu einem etwas späteren Zeitpunkt während der Embryonalentwicklung detektiert werden kann hauptsächlich Herzmuskelzellen bildet, nicht aber Endothelzellen. Diese wiederum differenzieren aus einer Zellpopulation, die durch die molekularen Marker *Isl-1* und *Flk-1* charakterisiert sind (Moretti et al., 2006). Beide beschriebenen Zellpopulationen differenzieren auch zu glatten Muskelzellen.

Isl-1 ist ein Markergen, das zusammen mit anderen Faktoren eine mesodermale, multipotente, kardiovaskuläre Vorläuferzellpopulation kennzeichnet. Diese Zellen können zu fast allen Zelltypen des kardiovaskulären Systems differenzieren. In frühen Entwicklungsstadien der Maus markiert Isl-1 kardiale Progenietoren des primären und des sekundären Herzfeldes. Der Transkriptionsfaktor ist u.a. für die Aufrechterhaltung des Progenietorstatus notwendig und wird nicht in terminal differenzierten Zellen exprimiert. Die Isl-1 Funktion ist für eine normale Ausbildung des Herzkreislaufsystems essentiell. Außerdem kann auch noch im adulten Herzen der Maus eine Isl-1^{+} Vorläuferzellpopulation identifiziert werden, deren Rolle bis dato noch ungeklärt ist.

Die besprochen kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5, Tbx5, Tbx20, die GATA Faktoren und Isl-1 sind sehr wichtige Regulatoren der Herzentwicklung und zählen zu den ersten nachweisbaren Markergenen spezifizierter Herzvorläuferzellen. Die HAND Faktoren sind Markergene des kardiovaskulären Systems und regulieren u.a. die Kammerreifung. Die koordinierte räumliche und zeitliche Expression dieser und einer Fülle weiterer Faktoren ermöglichen die normale Morphogenese des Herzens.

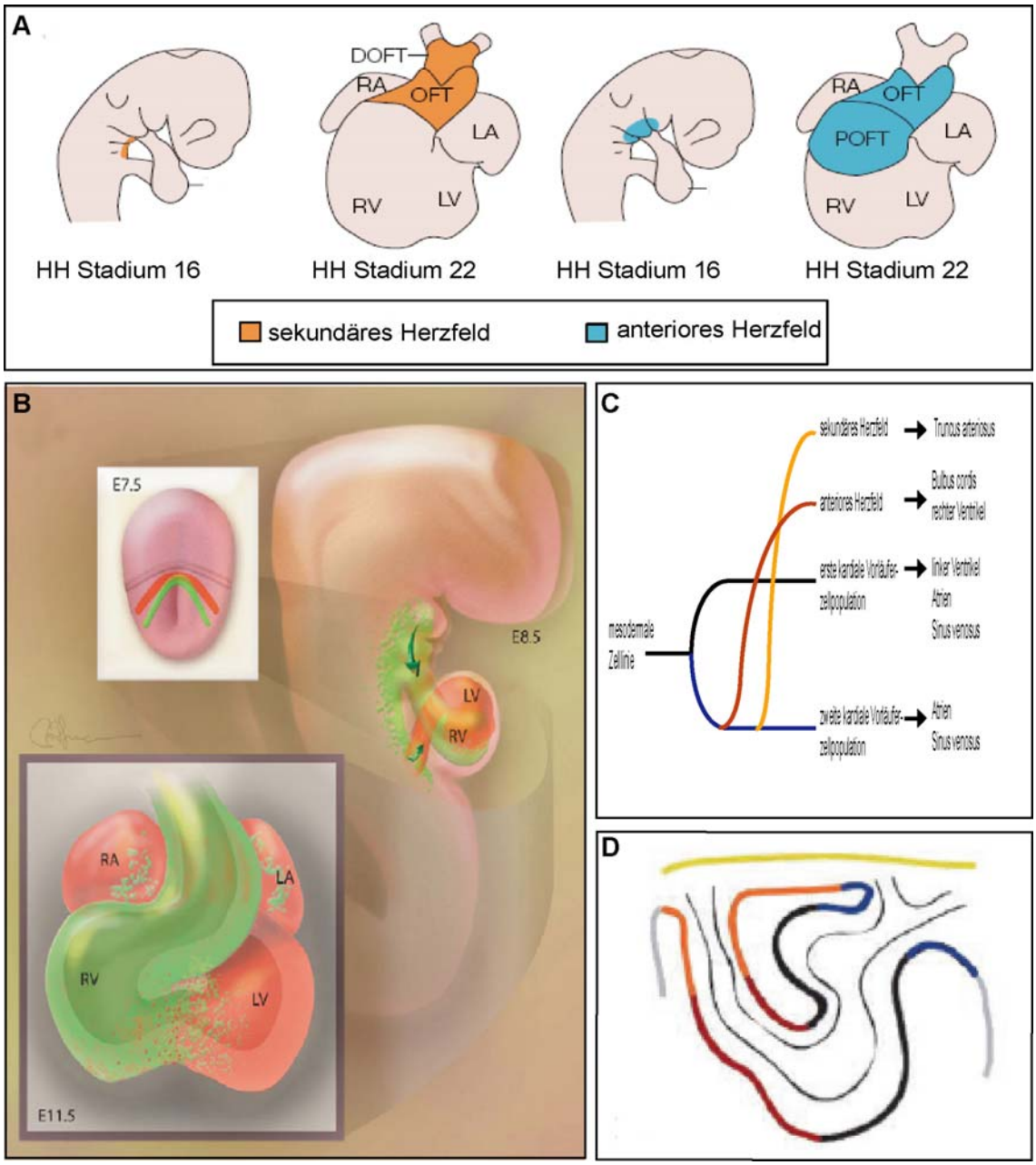


Abb. 3 Das anteriore oder sekundäre Herzfeld. A) Das anteriore Herzfeld (AHF) (Mjaatvedt et al., 2001) bzw. das sekundäre Herzfeld (SHF) (Waldo et al., 2001) im Huhn. Dargestellt ist die anatomische Lokalisation der Herzfelder und die Kompartimente zu denen die kardialen Vorläuferzellen beitragen. HH= Hamburger und Hamilton Stadium. **B)** Das AHF der Maus. Es ist die anatomische Lokalisation des anterioren und des primären Herzfelds sowie der Beitrag der Herzfelder zu den verschiedenen Kompartimenten in drei Entwicklungsstadien (*„embryonic day“* (E) 7.5, E8.5 und E11.5) dargestellt. Die grüne Farbe markiert Zellen des AHF, rot zeigt den Beitrag der Zellen des primären Herzfeldes. **C)** Das Konzept der ersten und zweiten kardialen Zellpopulation (Meilhac et al., 2004). Das Diagramm verdeutlicht den Ursprung zweier unterschiedlicher kardialer Zellpopulationen aus einer Population an mesodermalen Herzvorläuferzellen und deren Beitrag zu den einzelnen Kompartimenten. Den verschiedenen Zellpopulationen sind unterschiedliche Farben zugeordnet (schwarz = erste kardiale Zellpopulation, blau = zweite kardiale Zellpopulation, rot = anteriores Herzfeld, orange = sekundäres Herzfeld. **D)** Die Schemazeichnung zeigt im gleichen Farbcode wie in C den Beitrag der ersten bzw. zweiten Zellpopulation zu den verschiedenen Kompartimenten des Herzens. RV= rechter Ventrikel, LV linker Ventrikel, RA= rechtes Atrium, LA= linkes Atrium; DOFT= dorsal outflow tract (*Truncus arteriosus*), POFT= proximal outflow tract (*Bulbus cordis*). (Zusammengestellt und verändert nach Buckingham et al., 2005; Stennard und Harvey, 2005; Kelly, 2005).

1.4 Die Entwicklung des Gefäßsystems

Das kardiovaskuläre System ist, wie bereits erwähnt, das erste Organsystem, das seine Funktion im Embryo aufnimmt. Dies ist notwendig, damit der wachsende Embryo ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden kann. Die Vaskulogenese und die Angiogenese sind die beiden grundlegenden Mechanismen der Gefäßentwicklung. Unter Vaskulogenese versteht man die *de novo* Induktion mesodermaler Zellen zu endothelialen Vorläuferzellen, den sogenannten Angioblasten. Die Angiogenese zeichnet sich durch die Verzweigung der bereits gebildeten Gefäße, bzw. durch das Auswachsen neuer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen aus (Harvey et al., 1999; Roman und Weinstein, 2000).

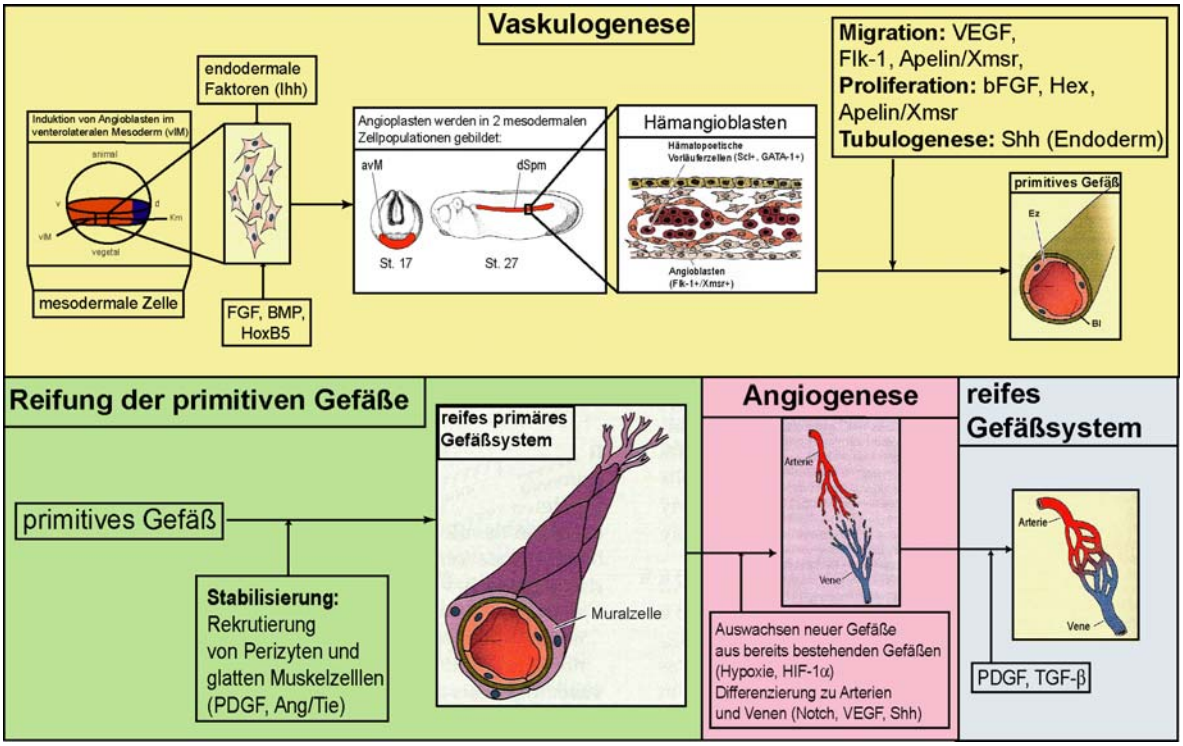


Abb. 4 Vereinfachte Darstellung der Entwicklung des Gefäßsystems der Vertebraten. Die Vaskulogenese bezeichnet den Prozess der *de novo* Induktion von endothelialen Vorläuferzellen im Mesoderm. Durch Migration, Proliferation und Tubulogenese entstehen primitive Gefäße. Die primitiven Gefäße reifen durch die Rekrutierung von Periendothelzellen, wodurch sie stabilisiert werden. Die reifen primären Gefäße bilden durch Angiogenese neue Gefäße und differenzieren anschließend zu Arterien und Venen, die dann das reife Gefäßsystem bilden. Wichtige Regulatoren dieser Prozesse bzw. Markergene für Vorläuferzellpopulationen sind angegeben (verändert nach Gilbert et al., 2006). vlM= ventro-laterales Mesoderm, v = ventral, d = dorsal, avM = anterio-ventrales Mesoderm, dSpm = dorsales Seitenplattenmesoderm, Ez = Endothelzellen, Bl = Basallamina

Die ersten differenzierten Zelltypen, die im Vertebratenembryo kurz nach der Induktion des Mesoderms nachgewiesen werden können sind Blut und Endothelzellen (Baron, 2001). Studien zeigten, dass alle Bereiche des Mesoderms migrierende Angioblasten

enthalten, mit Ausnahme der prechordalen Platte (Kopfmesoderm) (Noden, 1989; Harvey et al., 1999). Die Spezifizierung der endothelialen Vorläuferzellen findet ausschließlich in diesem Keimblatt, in sogenannten Hämangioblasten, statt (Abb. 4). Aus den Hämangioblasten entstehen sowohl hämatopoetische als auch vaskuläre Vorläuferzellen (Roman und Weinstein, 2000). Dieser Befund legt nahe, dass beide Zellpopulationen auf eine gemeinsame Vorläuferzellpopulation zurückgehen. In embryonalen Stammzellen, Mausembryonen und im Zebrafisch konnten diese Progenietoren isoliert werden (Choi et al., 1998; Huber et al., 2004; Vogeli et al., 2006).

In *Xenopus* konnte ein sehr ähnliches Expressionsmuster des Markergens für Blutzellen *Scl* und des Gefäßmarkergens *Xfli* im dorsalen Seitenplattenmesoderm gezeigt werden. Die Progenietoren für Blut- und Endothelzellen sind also auch in Amphibien anatomisch eng assoziiert. Der formale Nachweis einer multipotenten Vorläuferzellpopulation, die sowohl zu Gefäß- als auch Blutzellen differnzieren kann, ist in Amphibien allerdings noch nicht gelungen. Für den Krallenfrosch sind Angioblastenpopulationen in zwei anatomisch distikten Regionen beschrieben worden. Eine Population ist während der Neurulastadien direkt posterior von der Haftdrüse lokalisiert. Aus diesen Zellen entstehen die Vitellinvenen sowie das Endokardium. Die zweite Population konnte im dorsalen Seitenplattenmesoderm gezeigt werden. Aus dieser undifferenzierten Zellpopulation entseht u.a. die *Aorta dorsalis* und die *Vena cardinalis posteriores* (Walmsley et al., 2002) (Abb.4).

Endotheliale Vorläuferzellen exprimieren einige wichtige Markergene. Zu diesen gehören u.a. die Rezeptor-Tyrosinkinasen Flk-1 (VEGFR-2), Flt-1, Tie-1 und Tie-2, sowie der Transkriptionsfaktor Fli-1, (Oettgen, 2001) und in *Xenopus laevis*, der G-Protein gekoppelte Rezeptor Xmsr (Devic et al., 1996). Speziell Flk-1 und der Ligand dieses Rezeptors, VEGF, wurden als wichtige Signalmoleküle in der Entwicklung des Gefäßsystems beschrieben (Koibuchi et al., 2006; Vokes et al., 2004; Coultas et al., 2005). Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass der BMP Signalweg essentiell für die Expression von Gefäß- und Blutmarkergenen ist (Walmsley et al., 2002). Zudem wurde gezeigt, dass FGF in ventralen Marginalzonen Explantaten die Expression von Blutmarkergenen reduziert, wohingegen Markergene für endotheliale Zellen induziert werden. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Spezifizierung von mesodermalen Zellen zu Hämangioblasten von BMP-4 abhängig ist, die Differenzierung zu Blut- und Gefäßzellen ist dagegen auf zusätzlichen Faktoren wie z.B. FGF angewiesen (Iraha et al., 2002). Im Säugetiermodell konnte durch Studien belegt werden, dass Indian Hedgehog (Ihh) für die Induktion von Blut und Gefäßzellen ausreichend ist. Es

gibt Hinweise darauf, dass Ihh die Expression von *BMP-4* induziert und somit die terminale Differenzierung der Gefäß- bzw. Blutzellen eingeleitet wird (Baron, 2001) (Abb.4).

Nach der Spezifizierung endothelialer Zellen, entstehen durch Zellproliferation, Migration und schließlich Zellverschmelzungen (Tubulogenese), primitive vaskuläre Gefäße (Abb.4) (Vokes et al., 2004). In *Xenopus* Embryonen konnte gezeigt werden, dass das Hypochord, eine transiente embryonale Struktur ventral des Notochords, VEGF ausschüttet. Endothliale Vorläuferzellen migrieren entlang des entstehenden VEGF Gradient zur dorsalen Mittellinie und bilden dort die *Aorta dorsalis* (Cleaver und Krieg, 1998). Für die Tubulogenese ist, wie für die Induktion der Angioblasten, das Endoderm essentiell. Vokes und Kollegen (2004) konnten überzeugend darstellen, dass Shh welches vom Endoderm sezerniert wird, für die Bildung von Gefäßnetzwerken in Huhn- und Mausembryonen notwendig ist. Für die Stabilität der Gefäße ist es wichtig, dass glatte Muskelzellen und Perizyten (zusammen bilden sie die sogenannten Muralzellen) zum primitiven Gefäß rekrutiert werden (Coultas et al., 2005) (Abb. 4).

Die spätere Umbildung und Reifung des Gefäßsystems findet hauptsächlich durch die Angiogenese statt. Dieser Prozess schließt die Reorganisation des primitiven Gefäßsystems und das Auswachsen von Gefäßen aus bereits bestehenden mit ein. Ein Stimulus für diesen Prozess ist Hypoxie in Geweben und der hämodynamische Fluss. Einer der ersten Prozesse der Reifung des primitiven Gefäßsystems ist die Differenzierung in Arterien und Venen (Coultas et al., 2005).

Die wichtigsten Gefäße des vaskulären Systems sind die *Vena cardinalis posteriores* und *anteriores*, das Vitellinvenen Netzwerk, und die *Aorta dorsalis*. Außerdem sind die Aortenbögen, die intersomitischen Arterien und Venen und die *Vena cardinalis communis* bedeutende Strukturen des Gefäßsystems (Levine et al., 2003).

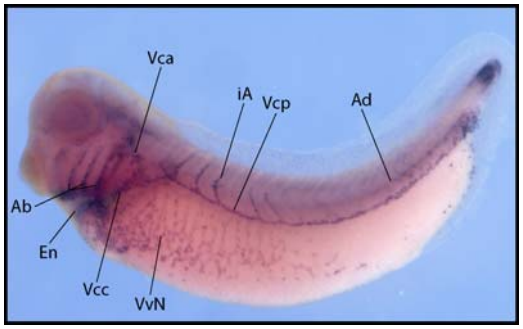


Abb. 5 Die wichtigsten Strukturen des Gefäßsystems von *Xenopus laevis* Embryonen. **Ab**= Aortenbögen, **En**= Endokardium, **Vcc**= *Vena cardinalis communis*, **VvN**= Vitellinvenen Netzwerk, **Vca**= *Vena cardinalis anterior*, **iA**= intersomitische Arterien, **Vcp**= *Vena cardinalis posterior*, **Ad**= *Aorta dorsalis* (eigene WMISH für Xmsr St. 34, Bezeichnung nach Levine et al.,2003)

2 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Rolle von Xisl-1 während der Entwicklung des kardiovaskulären Systems von *Xenopus laevis* untersucht werden. Hierzu sollte zunächst das zeitliche und das räumliche Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors während verschiedener Stadien der Embryonalentwicklung analysiert werden. Es sollte die anatomische Lokalisation von *Xisl-1*$^{+}$ Herzvorläuferzellen aufgeklärt werden. Zudem sollten Erkenntnisse über ein mögliches anteriores Herzfeld in Amphibien erlangt werden. Des Weiteren sollte durch Funktionsverluststudien und durch die Überexpression der *Xisl-1* mRNA die Funktion von Xisl-1 während der Organogenese untersucht werden. Hierzu sollten molekularbiologische und histologische Methoden verwendet werden.

3 Material

3.1 Organismen

3.1.1 Versuchstiere

Die verwendeten *Xenopus laevis* Frösche wurden bei der Firma Nasco, Wisconsin, USA bzw. bei der Firma Xenopus Express Le Bourgh, Frankreich bezogen.

3.1.2 Bakterienstämme

Stamm:

Escherichia coli One Shot TOP10 (Invitrogen)

Genotyp:

F$^-$*mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) PHI80*lacZ* ΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G

3.2 Nukleinsäuren

3.2.1 Vektoren

pCS2+	(Rupp et al., 1994)
pCR 2.1- TOPO	(Invitrogen)

3.2.2 cDNA-Klone

Klon	Vektor	Bezug	Linearisierung für Sonde bzw. mRNA/ Polymerase
Cardiac-α Actin	pCS2+	Dr. P. Krieg, Tucson, AZ, USA	PvuI/Sp6 (Sonde)
Tbx20	pGEM T-Easy	Dr. F. Conlon, Chapel Hill, NC, USA	NcoI/Sp6 (Sonde)
Xislet-1	pBSKII	Dr. D. Melton, Cambridge, MA, USA	XhoI/T3 (Sonde)
Xmsr	pBSKII	Dr. M. Asashima, Tokyo, Japan	BamHI/T7 (Sonde)
TnIc	pBSKII	Dr. P. Krieg, Tucson, AZ, USA	NotI/T7 (Sonde)

Nkx2.5	pGEM3Z	Dr. P. Krieg, Tucson, AZ, USA	HindIII/T7 (Sonde)
Ami	pBSKII	Dr. M. Asashima, Tokio, Japan	EcoRI/T7 (Sonde)
Wnt-11	pT7TS	Dr. R. Moon, Seattle, WA USA	BamHI/T7 (mRNA)
Wnt3a	pSP64T	Dr. R. Moon, Seattle, WA USA	EcoRI/Sp6 (mRNA)
dnWnt-11	pSP64T	Dr. R. Moon, Seattle, WA, USA	BamHI/Sp6 (mRNA)
Flk-1	pBSKII+	Dr. P. Krieg, Tucson, AZ, USA	NotI/T7 (Sonde)
GFP	pCS2+	Dr. Dr. W. Knöchel, Ulm, Deutschland	NotI/T7 (mRNA)
Δ5'UTR Xisl-1	pCS2+	T. Brade, Ulm, Deutschland	EcoRI/T/ (mRNA)
Xisl-1	pCS2+	T. Brade, Ulm, Deutschland	EcoRI/T7 (Sonde) NotI/Sp6 (mRNA)

3.2.3 Oligonukleotide und Morpholino-Oligonukleotide

Oligonukleotide werden von MWG Biotech bezogen.

RT-PCR-Primer :

GATA-4_F: 5'-GTG CCA CCT ATG CAA GCC C-3'
GATA-4_R : 5'-TAG ACC CAC CCG GCG AGA C-3'

GATA-5_F: 5'-TCA GAG CTG CGA CAC TGC CC-3'
GATA-5_R: 5'-GAA CTC CAG GCT GGA TCT CC-3'

GATA6_F: 5'-CCG CTC AGC CTC TCC-3'
GATA6_R: 5'-CTG AAG TTG CCT GGG-3'

Nkx 2.5_F: 5'-GAG CTA CAG TTG GGT GTG TGT GGT-3'
Nkx 2.5_R: 5'-GTG AAG CGA CTA GGT ATG TGT TCA-3'

CA_F: 5'-TCC CTG TAC GCT TCT GGT CGT A-3'
CA_R: 5'-TCT CAA AGT CCA AAG CCA CAT A-3'

H4_F: 5'-CGG GAT AAC ATT CAG GGT ATC ACT-3'
H4_R: 5'-ATC CAT GGC GGT AAC TGT CTT CCT-3'

Sox17β_F: 5'-TAT CAG TCC CAG AAG ACG GTC-3'
Sox17β_R: 5'-CAT GTC ACA TCC ACA AGA GTG-3'

Xbra_F: 5'-GGA TCG TTA TCA CCT CTG-3'
Xbra_R: 5'-GTG TAG TCT GTA GCA GCA-3'

Xwnt11_F: 5'-CCG GGT GGC CTG GAA TGA GAG C-3'

Xwnt11_R: 5'-CAC AGG CAC GCG CAA TGG TAT GG-3'

Hex-F: 5'-AAC AGC GCA TCT AAT GGG AC-3'
Hex_R: 5'-CCT TTC CGC TTG TGC AGA GG-3'

BMP4_F: 5'-GCA TGT ACG GAT AAG TCG ATC-3'
BMP4_R: 5'-GAT CTC AGA CTC AAC GGC AC-3'

Tbx20_F: 5'-TTC GCT CCC TAC TTG TTG CT-3'
Tbx20_R: 5'-TTT GTC CCA TAG CTC CTT GG-3'

Xwnt11R_F: 5'-TGC CAA TCC AGG ATC TTT TC-3'
Xwnt11R_R: 5'-CCA GGC CTT CTA GTT GCT TG-3'

eHAND_F: 5'-ACA TGA TGC CTG ATC CCT TC-3'
eHAND_R: 5'-CCA GGC TCA CTG TCC TTA GC-3'

FoxP1_F: 5’-CCC ACA AGA GGA ATG ACA AAC-3’
FoxP1_R: 5’-TTA CTC CAT GTC GTC ATT TAC-3’

Xfli_F: 5’TAT TAG GGT GAC CTG GCA CA-3’
Xfli_R: 5’-AATGACCGACCCAGATGAAG-3’

Sequenzierprimer:

SP6-pCS2+: 5’-CCC-AAG-CTT-GAT-TTA-GGT-GAC-3’

T7-pCS2+: 5’-CTA-CGT-AAT-ACG-ACT-CAC-TAT-AG-3’

Xisl-1_seq: 5’-CAG-ACC-ACG-ACG-TGG-TGG-3’

Xisl-1_seq_2: 5’-GAC-CTG-TTT-CTC-ACA-GGT-3’

Xisl-1_seq_3: 5’-GAG-CTG-CGA-TCG-ATC-TGT-AG-3’

Xisl-1_seq_4: 5’-GGA-GTT-GCC-ATG-TAG-TGT-TTC-ACC-3’

Mutageneseprimer:

Xisl-1_Δ5’UTR_R: 5’-ATG-GGA-GAC-CCA-CCA-AAA-3’

Xisl-1_Δ5’UTR_F: 5’-TAG-AGG-GTG-TAA-TGT-CCA-3’

Morpholino-Antisense-Oligonukleotid

Das Xisl-1 Antisense Morpholino Oligonukleotid (Morpholino) wurde lyophilisiert von der Firma Gene Tools, LLC, Philomath, OR, USA bezogen. Die Aufnahme des Lyophilisats erfolgt in 300 µl autoklaviertem H_2O (c= 8,4ng/nl). Direkt nach der Aufnahme in H_2O wird das Morpholino aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor der Mikroinjektion wurde das Morpholino für diese Arbeit mit H_2O auf eine Konzentration von 10ng /10nl verdünnt.

Morpholino	**Sequenz**
Xislet-1 MO	5’-GGT-CTC-CCA-TAT-CTC-CCA-TAG-CTG-T-3’
Control MO	5’-CCT-CCT-ACC-TCA-GTT-ACA-ATT-TAT-A-3’

3.3 Nährmedien und Zusätze

LB-Medium	20	g/l	LB-Broth
(LURIA-BERTANI Broth; SAMBROOK et al., 1989)			
für Festmedien:	32	g/l	LB-Agar
			(jeweils auf 1 Liter auffüllen)

Antibiotika:	Endkonzentration	Stammlösung (1000x)
Ampicillin (Amp)	50 mg/l	50 mg/ml H_2O

Sterilfiltrieren und bei -20°C lagern.

3.4 Lösungen und Puffer

Alle wässrigen Lösungen werden, soweit nicht anders angegeben, mit Millipore-Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert (30 min, 2 bar, 121°C).

AP-Puffer (WMISH)	1	ml	1M Tris pH 9,5
	500	µl	1 M $MgCl_2$
	200	µl	5 M NaCl
	100	µl	10% Tween 20
			auf 10 ml mit DEPC-H_2O auffüllen
Auftragspuffer (für DNA-Gele)	0,25	%	Bromphenolblau
	25	%	Glycerin
	5	mM	Tris/HCl pH 8,0
	25	mM	EDTA pH 8,0

10% BMB in 5xMAB	5	g	Boehringer Blocking Agent mit 5xMAB auf 50 ml auffüllen, autoklav. 5 ml Aliquots bei -20 °C lagern
Blocking-Solution (WMISH)	1	ml	10% BMB in 5xMAB
	25	µl	10% Tween 20
	600	µl	Horse Serum
			auf 5 ml mit DEPC-H_2O auffüllen
10% Chaps	1	g	Chaps in 10ml DEPC-H_2O 1 ml Aliquots bei -20 °C
DNase I-Puffer	100	mM	Natriumacetat
	5	mM	$MgSO_4$
			pH 5,0
100x Denhardts (500 ml)	10	g	Ficoll 400
	10	g	Polyvinylpyrrolidon
	10	g	BSA
			sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern
DEPC-H_2O	0,1	%	Diethylpyrocarbonat [DEPC] in Wasser lösen, bis die DEPC-Tröpfchen gelöst sind
0,5M EDTA (pH 8,0)	186,1	g	EDTA ·Na_2
	800	ml	H_2O
	20	g	NaOH-Plätzchen
			pH 8,0 einstellen, auf 1000 ml auffüllen
3% Ficoll/1xMBSH	15	g	Ficoll 400
	500	ml	1xMBSH
			steril filtrieren, bei 4°C lagern
Deionisiertes Formamid			Formamid mit Ionenaustauscher 1h rühren, abfiltrieren, in 50 ml Aliquots bei -20 °C lagern
Gelatinelösung	2,2	g	Gelatine in
	450	ml	PBS unter Rühren und Erwärmen lösen
	135	g	BSA zugeben
	90	g	Saccharose zugeben, bei -20°C lagern

Heparin (100 mg/ml)			in DEPC-H_2O lösen, in 100 µl Aliquots bei -20 °C lagern
Horse Serum			30 min bei 60 °C inaktivieren, Aliquots bei -20 °C lagern
Hybridisierpuffer (WMISH)	25	ml	deionisiertes Formamid
	12,5	ml	20xSSC
	1	ml	Torula RNA (50 mg/ml)
	1	ml	50x Denhardts
	50	µl	Heparin (100 mg/ml)
	500	µl	10% Tween 20
	500	µl	10% Chaps
	500	µl	0,5M EDTA pH 8,0
			auf 50 ml mit DEPC-H_2O auffüllen, lagern bei -20 °C
Lösung A (Roth)	38	%	Acrylamid
	2	%	Bisacrylamid
1xMBSH	10	mM	HEPES pH 7,4
(10 l)	88	mM	NaCl
	1	mM	KCl
	0,33	mM	$Ca(NO_3)_2$
	0,41	mM	$CaCl_2$
	0,82	mM	$MgSO_4$
			auf 10 l auffüllen und vollständig lösen, erst dann Zugabe von
	2,4	mM	$NaHCO_3$
0,1xMBSH			1xMBSH 1:10 verdünnen
1 M $MgCl_2$ (WMISH)	20,3	g	$MgCl_2$
			mit DEPC-H_2O auf 100 ml auffüllen
5xMEM	52,3	g	MOPS (0,5M)
	1,90	g	EGTA (10mM)
	0,62	g	$MgSO_4$x7 H_2O (5 mM)
			auf 480 ml mit H_2O auffüllen, pH 7,4 einstellen, ad 500 ml
MEMFA	10	ml	5xMEM
	5	ml	37% Formaldehyd
			auf 50 ml mit H_2O auffüllen
10x MOPS	200	mM	MOPS
	50	mM	NaAcetat
	10	mM	EDTA

3M Natriumacetat pH 5,2 (100ml)	24,6	g	Natriumacetatanhydrat
	90	ml	H_2O
	10	ml	100% Essigsäure
5 M NaCl (WMISH)	21,3	g	NaCl mit DEPC-H_2O auf 100 ml auffüllen
2xNTP/CAP (Ambion) (SP6 Kit)	10	mM	ATP
	10	mM	CTP
	10	mM	UTP
	2	mM	GTP
	8	mM	Cap Analogon
20x PBS	2,6	M	NaCl
	140	mM	Na_2HPO_4
	60	mM	NaH_2PO_4
			==>pH 7,0 steril filtrieren
SDS-Elektrophoresepuffer (5x)	125	mM	Tris
	960	mM	Glycin
SDS-Elektrophoresepuffer	200	ml	5x SDS-Elektrophoresepuffer
	10	ml	10% SDS auf 1l auffüllen
SDS-Probenpuffer	0,5	M	Tris-HCl pH 6,8
	0,025	%	Bromphenolblau
	10	%	SDS
	20	% (v/v)	Glycerin
	25	%	β-Mercaptoethanol
20x SSC	3	M	NaCl
	0,3	M	Natriumcitrat
2xSSC			20xSSC 1:10 mit DEPC-H_2O verdünnen

Spaltungspuffer (New England Biolabs):

10x NEBuffer 1	10	mM	BisTrisPropan/HCl
	10	mM	$MgCl_2$
	1	mM	Dithiothreitol(DTT)
			pH 7.0
10x NEBuffer 2	10	mM	Tris/HCl
	10	mM	$MgCl_2$
	50	mM	NaCl
	1	mM	Dithiothreitol(DTT)
			pH 7.9
10x NEBuffer 3	50	mM	Tris/HCl
	10	mM	$MgCl_2$
	100	mM	NaCl
	1	mM	Dithiothreitol(DTT)
			pH 7.9
10x NEBuffer 4	20	mM	Trisacetat
	50	mM	Kaliumacetat
	10	mM	Magnesiumacetat
	1	mM	Dithiothreitol(DTT)
			pH 7.9
PCR-Puffer 10x	100	mM	Tris-HCl (pH 8,3)
	500	mM	KCl
T4-DNA-Ligase-5x Puffer	250	mM	Tris/HCl (pH 7.6)
	50	mM	$MgCl_2$
	5	mM	DTT
	5	mM	ATP
	25	% (w/v)	Polyethylenglycol-8000
10x TBE	890	mM	Tris
	890	mM	Borsäure
	20	mM	EDTA (pH 8,0)
10x TBS	80	g	NaCl
	2	g	KCl
	30	g	Tris
	800	ml	DEPC-H_2O
			mit HCl_{konz} pH 7,4 einstellen
			auf 1l auffüllen
1xTBST	100	ml	10xTBS
	10	ml	10% Tween 20
			auf 1l mit DEPC-H_2O auffüll.

TE (pH 7,5)	10	mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	1	mM	EDTA (pH 8,0)
Torula RNA	50	mg/ml	in DEPC-H_2O lösen, in 1 ml Aliquots bei -20 °C lagern
Transcription 1st Strand Buffer 5x	200	mM	Tris/HCl (pH 7,9)
(Invitrogen)	30	mM	$MgCl_2$
	50	mM	DTT
	50	mM	NaCl
	10	mM	Spermidin
Tris/HCl (pH 8,5)	10	mM	Tris in H_2O pH mit 37% HCl einstellen (zum Messen des pH spezielle Tris-Elektrode oder pH-Papier benutzen; Tris-Puffer nicht mit DEPC-H_2O ansetzen)
Tris/HCl (pH 9,5) WMISH	1	M	Tris in H_2O pH mit 37% HCl einstellen (zum Messen des pH spezielle Tris-Elektrode oder pH-Papier benutzen; Tris-Puffer nicht mit DEPC-H_2O ansetzen)

3.5 Geräte

Gerät	**Modell**	**Hersteller**
Binokular		Saur
Brutschränke (13, 18 °C)	WB22K	Mytron
Dokumentationsanlage für Embryonen und histologische Schnitte	DP 50 (Dig.kamera) Camedia C3030 (Dig.kamera) SZX 12 (Binokular) BX 60 (Mikroskop)	Olympus
Eismaschine	AF-10	Scotman
Gefriertruhe -20 °C		Liebherr
Gefriertruhe -70 °C	VX490E	Jovan
Gelelektrophoresekammern		Werkstatt der Uni Göttingen
Geltrockner	Pherotemp40	Biotec Fischer
Heizblock	HBT130	HLC
Heizrührer	MR3000	Heidoplph
Injektionsanlage	Pneumatic Picopump	World Precisions Instr., USA
Inkubationsschrank (37°C)		Memmert
Inkubationsschrank (80°C)		Memmert
Inkubationsrotator (65°C)		Biometra

Kaltlichtquelle	EK-1	Euromex
Kapillaren	Borosilicatglas mit Filament 0,1 mm	H. Saur Laborbedarf
Kühlschränke		Liebherr
Kühlzentrifuge	Biofuge primoR	Heraeus
Mikrowelle	Micromat	AEG
N_2-Flaschen		MTI Industriegase
Netzgerät	P25	Biometra
PCR-Gerät	T3 Thermocycler	Biometra
pH-Meter	CG837	Schott
Phospho-Imager	Fujix BAS 1000	Fuji
Photometer	SmartSpec 3000	Biorad
Pipetten		Abimed
Puller (f. Injektionsnadeln)	PN-30	Narishige, Japan
Schüttler (Rotat.)	Rocky	Fröbel Labortechnik
Rollenmischer (horizontal)		IDL GmbH
Sequenziergerät	ABI PRISM 377	Perkin-Elmer Corporation
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
UV-Transilluminator 312 nm		Bachofer
Schüttler (Bakterien)	Certomat	B.Braun
Vibratom	Serie 1000	Technical Products Internat.
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific
Waage	PE360	Mettler
Feinwaage	Explorer	Ohaus
Wasserbäder		Köttermann Labortechnik
Zentrifuge, Ausschwingrotor	Universal 16 A	Hettich

3.6 Sonstiges

Produkt	**Hersteller**
Alufolie	Gut & Billig
Falcongefäße	Corning
Glasmaterialien: Flaschen, Pasteurpipetten, Erlenmeyerkolben usw.	Brand, Schott
Kanülen	Braun
Kunststoff-Einwegmaterial: Spitzen, Pipetten, Reaktionsgefäße, Petrischalen usw.	Eppendorf, Brand, Greiner, Sarstedt
Quarz-Küvetten	Hellma
24-well Platten, 6-well Platten	Greiner
Parafilm	Pechiney
PCR-Gefäße	Biozym
Dumont Pinzetten	Merck

3.7 Chemikalien

Alle Chemikalien haben p.A. Qualität.

Chemikalien	Hersteller/Lieferant
Acetanhydrid	Sigma
Acrylamid,Gel40 (38% Acrylamid/2% Bisacrylamid)	Roth
Agarose	Invitrogen
Ammoniumacetat	Merck
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Boehringer Blocking Agent	Roche
Blocking reagent	Roche
Borsäure	Applichem
Bromphenolblau-Natriumsalz	Merck
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Calciumnitrat Tetrahydrat	Merck
Calciumchlorid Tetrahydrat	Merck
Citronensäure Monohydrat	Merck
Chaps	Roth
L-Cysteinhydrochlorid Monohydrat	Fluka
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Roche
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
dNTPs	Invitrogen
Dithiotreitol (DTT)	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol absolut	Riedel-deHaen
Ethanol vergällt	Apotheke
Ethidiumbromidlösung 1 %	Roth
Ficoll 400	Amersham
Formaldehyd 37%	JT Baker
Formamid	Merck
Gelatine	Baker
Gonadotropin (chorionic)	Sigma
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Applichem
Harnstoff	Roth
Hepes	Applichem
Heparin Natriumsalz	Sigma
Horse Serum	Invitrogen
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
LB Broth	Gibco
LB Agar	Gibco

Magnesiumacetat Tetrahydrat	Merck
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
Maleinsäure	Merck
Methanol	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
MOPS	Sigma
MS 222 (3-Aminobenzoesäure-Ethylester)	Sigma
Natriumacetat Trihydrat	Merck
Natriumcitrat	Baker
NaOH	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin	Invitrogen
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Proteinase K	Sigma
RNase A	Sigma
RNase T1	Sigma
RNA Torula Typ IV	Sigma
Saccharose	Merck
Salzsäure (HCl)	Merck
Streptomycin	Invitrogen
TEMED	Sigma
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaureat)	Sigma
Triethanolamin	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	USB
UHU Sekundenkleber	UHU
Wasserstoffperoxid 30%	Merck

3.8 Radiochemikalien

[^{35}S]-Methionin (10µCi/µl) wird von Amersham (Braunschweig) bezogen.

3.9 Enzyme

Restriktionsenzyme werden von New England Biolabs bezogen. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten werden bei Invitrogen, Roche, MBI Fermentas und USB bestellt.

3.10 Antikörper

Anti-Digoxygenin Fab-Fragment (Roche)

Anti-Fluorescein Fab-Fragment (Roche)

3.11 Kits

Kit	**Hersteller/Lieferant**
Microspin G-50 Columns	Amersham
5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II	Roche
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham
mMessage machine SP6, T7, T3	Ambion
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
MasterAmp PCR Core Kit	Epicentre Technologies
Miniprep Wizard Plus SV	Promega
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Purescript RNA Isolation Kit	Gentra Systems
TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems (SP6)	Promega
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
DIG RNA Labeling Mix 10x	Roche
FLUO-RNA-Labeling-Mix 10x	Roche
Quick Change Site directed Mutagenesis Kit	Stratagene

4. Methoden

4.1 Arbeiten mit Xenopus laevis

4.1.1 Haltung der Versuchstiere

Die Tiere werden in einem auf 20°C temperierten Raum, in Glasbecken gehalten. Das Wasser wird ebenfalls auf 20°C temperiert und gefiltert bevor es in die Becken gefüllt wird. Die Frösche werden mit Fischfutter (Tetra) gefüttert.

4.1.2 Stimulation der Eiablage

Durch subkutane Injektion des Hormons Gonadotropin in die laterale Rückenregion von *Xenopus* Weibchen wird die Eiablage stimuliert. Das humane Gonadotropin (Sigma) wird in steriler 0,5% NaCl-Lösung aufgenommen. Die Konzentration beträgt 3000 U/ml. Einem Tier werden, je nach Größe, zwischen 500-900U injiziert. Am darauffolgenden Morgen kann durch vorsichtige Massage des Weibchens die Eiablage stimuliert werden. Den Tieren wird eine Ruhepause von 3 Monaten nach der Induktion der Eiablage zugestanden.

4.1.3 *In vitro* Befruchtung von Xenopus Oozyten

Der Hoden wird einem Männchen entnommen, in 1xMBSH gewaschen und anschließend in Oozyte Culture Medium (OC-Medium) bei 4°C aufbewahrt. Ein kleines Stückchen des präparierten Hodens wird in 1xMBSH mazeriert, um die Spermien frei zu setzen. In 1xMBSH sind die Spermien aufgrund des hohen Salzgehalts unbeweglich. Die Spermiensuspension wird bei der Zugabe zum Eigelege 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Durch den niedrigeren Salzgehalt der Lösung wird die Beweglichkeit der Spermien wieder hergestellt. Das Eigelege eines Weibchens wird mit mazeriertem Hoden in einer Petrischale vermischt. Etwa 30 min. nach der Befruchtung wird das Eigelege mit 0,1xMBSH aufgegossen und bei 14°C inkubiert.

4.1.4 Entfernung der Gallerthülle von befruchteten *Xenopus laevis* Oozyten

Die Embryonen von *Xenopus laevis* sind von einer dicken Gallerthülle umgeben, welche die Injektion erheblich behindert und daher entfernt werden muss. Hierzu werden die Eier ca. 1h nach der Befruchtung in 2% Cystein-HCl gelöst in H_2O (pH 8,3) für etwa 5min. inkubiert, bis sich die Gallerthülle aufgelöst hat. Anschließend werden die Eier vier mal mit Leitungswasser gewaschen und einmal mit 0,1xMBSH. Zur weiteren Entwicklung werden die Embryonen bei 14°C inkubiert.

4.1.5 Mikroinjektion von *Xenopus* Embryonen

4.1.5.1 Herstellen von Injektionsnadeln

Die Nadeln zur Mikroinjektion von befruchteten *Xenopus* Oozyten, werden mit einem *PN-30 Micropipette Puller* der Firma *Narishige* hergestellt. Hierzu werden Glaskapillaren (Außendurchmesser: 1mm) im Gerät eingespannt. Die Kapillare wird erhitzt und durch schnelles Auseinanderziehen wird eine sehr dünne Spitze an der Glasnadel produziert. Diese muss vor dem Injizieren noch abgebrochen werden, wodurch man eine sehr feine Kapillare erhält, welche den Embryonen bei der Injektion nur eine sehr geringfügige mechanische Verletzung zufügt.

4.1.5.2 Injektion

Die befruchteten *Xenopus* Oozyten sind aufgrund ihrer relativen Größe sehr leicht unter einem Binokular zu manipulieren. Die einzelnen Blastomeren sind sehr gut zu unterscheiden und aufgrund von detaillierten Schicksalskarten einzelner Blastomeren (Moody and Kline 1990) können sehr gezielte Injektionen vorgenommen werden. Es ist also möglich z.B. die Expression eines Genes in einem bestimmten Keimblatt zu manipulieren. Zur Injektion wird die Nadel mit Hilfe von *„Gelloader-Pipettips“* (Eppendorf) mit der gewünschten Flüssigkeit befüllt. Das *Pneumatic Picopump*-Injektionsgerät ermöglicht es eine reproduzierbare Flüssigkeitsmenge zu injizieren. Für diese Arbeit wurden immer 10nl pro Blastomere injiziert. Der Druckaufbau erfolgt mit Stickstoffgas. Die befüllte Glaskapillare wird in einen Mikromanipulator eingespannt, wodurch sie sehr präzise bewegt werden kann. Durch eine ruckartige Vorwärtsbewegung der Injektionsnadel wird die Membran des Embryos durchstochen und durch ein Fußpedal die Injektion der zuvor definierten Flüssigkeitsmenge

ausgelöst. Dieser Injektionsprozess findet in 3% Ficoll/1xMBSH statt. Aufgrund der hohen Viskosität und des hohen Salzgehalts der Flüssigkeit wird ein Austreten der injizierten Flüssigkeit oder des Dotters verhindert. Die Embryonen werden über Nacht bei 14°C in diesem Puffer inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Embryonen in 0,1xMBSH umgesetzt. Die Embryonen müssen vor Beginn der Gastrulation aus dem 3% Ficoll/1xMBSH Puffer in 0,1xMBSH umgesetzt werden, da es sonst zur Exogastrulation kommt.

4.1.6 Präparation und Behandlung von dorsalen und ventralen Marginalzonen Explantaten

Dorsale bzw. ventrale Marginalzonen (DMZ bzw. VMZ) Explantate können verwendet werden, um z.B. die Expression von Markergenen zu untersuchen. Hierzu bedient man sich häufig der Methode der RT-PCR oder der WMISH. Für manche Fragestellungen ist es von großem Interesse, einzelne Gewebe oder Regionen eines Embryos zu kultivieren und zu untersuchen. Es ist vor allem bei der RT-PCR wichtig, Expressionsdomänen auszuschließen, die für die Fragestellung nicht relevant sind, da es sonst schwierig werden kann, die gewünschte Aussage zu treffen. Explantate können zudem Aufschluss darüber geben, ob z.B. induktive Signale von einem Gewebe oder einer Region ausgehen.

Zunächst müssen Embryonen im 4-Zellstadium auf der dorsalen bzw. ventralen Körperhälfte in der Marginalzone injiziert werden. Die Embryonen werden dann bei 14°C über Nacht in 3% Ficoll/1xMBSH kultiviert und am nächsten Morgen nach dem Umsetzten in 0,1xMBSH bei Raumtemperatur (RT) bis St.10 inkubiert. Dieses Stadium markiert den Beginn der Gastrulation. Der Blastoporus wird sichtbar und es ist möglich, die dorsale von der ventralen Körperhälfte zu unterscheiden. Die Präparation der dorsalen oder ventralen Marginalzonen Explantate wird in 0,5xMBSH in Petrischalen (60mm) durchgeführt, welche mit 1%Agarose/1xMBSH beschichtet sind. Zur Präparation muss zunächst die äußere Vitellinmembran mit DuMont Pinzetten entfernt werden. Daraufhin werden links und rechts der gerade entstehenden dorsalen Blastoporuslippe (DMZ) (bzw. genau gegenüber bei der Präparation eines ventralen Marginalzonen Explantats) in einem Winkel von etwa 50-60° zwei Schnitte in den Embryo vorgenommen (Abb. 6A). In etwa der Mitte des Embryos wird das Endoderm durchtrennt, wodurch ein etwa trapezförmiges Gewebestück entsteht (Abb. 6A). Das dunkel pigmentierte Neuroektoderm des animalen Pols wird entlang des Embryos in der Breite der vorgenommen Einschnitte aufgeschnitten (Abb. 6B) und auf der ventralen (bzw. dorsalen) Seite etwas oberhalb der marginalen Zone mit den Pinzetten abgetrennt (Abb. 6C). Das nun erhaltene Explantat (Abb. 6D) wird dann in das dunkel pigmentierte

ektodermale Gewebe eingeschlagen (Abb. 6E). Die einzelnen Explantate werden zur weiteren Kultivierung in 0,5xMBSH/Pen/Strep in kleine mit Agarose beschichtete Petrischalen (35mm) überführt. Die Kultivierung der Explantate bis zum gewünschten Stadium erfolgt bei einer Temperatur zwischen 14°-20°C

Es werden im Allgemeinen ca. 8-10 Explantate von injizierten Embryonen, bzw. von den jeweiligen Kontrollembryonen präpariert. Um eine korrekte Bestimmung der Entwicklungsstadien zu ermöglichen, sowie die Entwicklung der verwendeten Embryonen im Allgemeinen zu überwachen, werden jeweils überzählige injizierte Embryonen bzw. unbehandelte Wildtypkontrollen in extra Schalen kokultiviert.

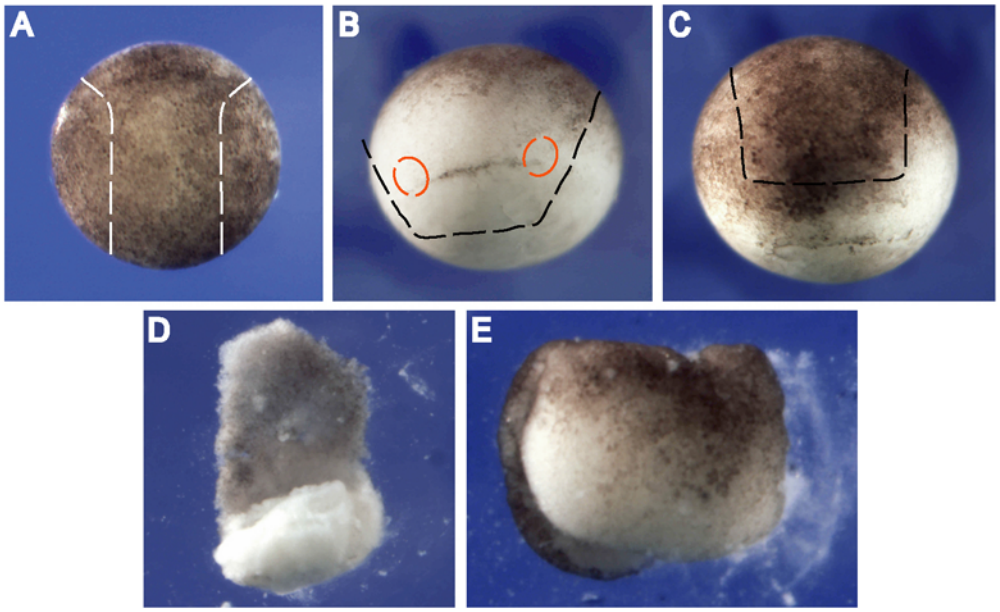


Abb. 6 Präparation von dorsalen Marginalzonen (DMZ) Explantaten. A) animale Ansicht eines Xenopus Embryos im St.10. Die weißen gestrichelten Linien markieren in etwa die durchzuführenden Schnitte für die Präparation eines DMZ Explantats. **B)** Dorso-laterale Ansicht eines Embryos im St.10. Die roten Kreise markieren die primären Herzfelder. Die schwarze gestrichelte Linie markiert die durchzuführenden Schnitte. **C)** ventro-laterale Ansicht desselben Embryos. Die schwarze gestrichelte Linie markiert die Schnittführung zur Präparation eines DMZ Explantats. **D)** DMZ Explantat, vor dem Einwickeln in das Ektoderm. **E)** DMZ Explantat, nach dem Einwickeln in das Ektoderm. Für die Präparation eines VMZ Explantats werden die in B) markierten Schnitte auf der genau gegenüberliegenden Seite durchgeführt.

4.1.7 Präparation von animalen Kappen Explantaten

Die Zellen des animalen Pols (die animale Kappe) des *Xenopus* Embryos stellen im Blastulastadium eine undifferenzierte Zellpopulation dar, die durch verschiedene Agenzien (z.B. FGF, Aktivin, Retinsäure) in neurale, mesodermale und endodermale Zellpopulationen differenziert werden können. Wird die animalen Kappe ohne Behandlung kultiviert, wird ein

wenig strukturiertes Gewebe ausgebildet, die sogenannte atypische Epidermis. Die animale Kappe stellt ein einfaches, günstiges und schnelles *ex vivo* Testverfahren dar. Besonders geeignet ist das System für die Untersuchung von Induktionsvorgängen. Ein Faktor von Interesse kann sehr schnell und effektiv durch die Analyse der Markergenexpression auf eine entsprechende Rolle hin analysiert werden. Hierzu wird häufig die semiquantitative RT-PCR oder, weniger gebräuchlich, die WMISH verwendet. Die Elongation der animalen Kappe nach der Behandlung mit z.B. Aktivin kann zum Studium von Faktoren, die an der Zellmigration und/oder der Zelladhäsion beteiligt sind, benutzt werden (Green und Smith, 1990; Green, 1999). Die RNA bzw. das spezifische Morpholino eines zu untersuchenden Faktors wird animal in beide Zellen im 2-Zellstadium injiziert. Die Embryonen werden bis zum St.8/9 kultiviert. In diesem Stadium wird dann das animale Kappen Explantat aus dem animalen Pol präpariert. Die Präparation wird in Petrischalen (60mm), die mit 1%Agarose/1xMBSH beschichtet wurden, durchgeführt. Zunächst muss mit DuMont Pinzetten die äußere Vitellinmembran entfernt werden. Danach wird aus der Mitte des animalen Pols ein kleines Gewebestück präpariert. Mit einer Glaspasteurpipette wird das Explantat in eine neue, mit Agarose beschichtete Petrischale (35mm) überführt und in 1xMBSH/Pen/Strep bei 18°/19°C bis zum gewünschten Stadium kultiviert. Es werden pro Ansatz ca. 20-25 animale Kappen präpariert. Zur Induktion eines mesenodermalen Zellschicksals müssen die animalen Kappen mit Aktivin behandelt werden. Zu diesem Zweck werden die animalen Kappen direkt nach der Präparation in einer mit 1%Agarose/1xMBSH beschichteten 24-Loch-Platte in ca. 500µl 1xMBSH/Pen/Strep+Aktivin (100ng/ml) für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die animalen Kappen einmal in 1xMBSH/Pen/Strep gewaschen und dann bis zum gewünschten Zeitpunkt bei 18°/19°C kultiviert. Zur Stadienkontrolle und zur Kontrolle der Entwicklung der verwendeten Embryonen im Allgemeinen werden unbehandelte und überzählige injizierte Embryonen getrennt kultiviert. Im gewünschten Stadium werden die animalen Kappen mit möglichst wenig Puffer in ein Reaktionsgefäß transferiert. Die Explantate können dann entweder bei –80°C eingefroren werden, oder aber direkt zur RNA Isolierung herangezogen werden (s. 4.3.16). Es folgt eine cDNA Synthese (s. 4.3.17) und eine anschließende semiquantitative RT-PCR (s. 4.3.19)

4.2 Immunhistochemische und histologische Methoden

4.2.1 Fixieren von Embryonen

Embryonen müssen für die WMISH und das Anfertigen von Gewebeschnitten fixiert werden. Hierzu wird MEMFA verwendet. Zum Fixieren werden die Embryonen in Glasröhrchen überführt. Es sollte darauf geachtet werden, dass möglichst wenig Flüssigkeit transferiert wird. Nach der Zugabe von MEMFA werden die Embryonen für 2-4h bei RT auf einem Rollenmischer oder mehrere Tage bei 4°C ohne Bewegung inkubiert. Zur längeren Lagerung werden die Embryonen nach der Fixierung in 100% Ethanol überführt und können bei –20°C gelagert werden.

4.2.2 Whole mount *in situ* Hybridisierung (WMISH)

Die WMISH dient der Visualisierung von mRNA Transkripten eines spezifischen Gens am Ort ihrer Expression im Embryo. Zum Nachweis der mRNA werden spezifische antisense RNA Sonden, welche mit Digoxygenin oder Fluorescein markiert werden, verwendet. Die Sonden besitzen eine Sequenz komplementär zu der Sequenz der mRNA. Mit einem Antikörper welcher spezifisch Digoxygenin (Anti-DIG) oder Fluorescein (Anti-FLUO) erkennt und zudem mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, erfolgt der Nachweis der gebundenen Sonde und somit indirekt auch der exprimierten mRNA. Die alkalische Phosphatase katalysiert hierbei die Umsetzung eines Farbstoffes.

Alle Inkubationen werden in 4 ml Glasröhrchen auf einem Rollenmischer durchgeführt, sofern nicht ausdrücklich etwas anderes erwähnt wird.

1. Tag

Rehydrieren der Embryonen

	Dauer (min)	Wiederholungen
100% Methanol	5	1
75% MeOH/ 25% H_2O	5	1
50% MeOH/ 50% H_2O	5	1
25% MeOH/ 75% H_2O	5	1
TBST	5	3

• Proteinase-K Behandlung (verbesserte Penetration der Sonde) (NICHT rollen)

30s (bei Stadien unter 14) bzw. 1-5min (bei älteren Stadien) Proteinase K in TBST (3,6 µl Proteinase K (Stock 14 mg/ml) in 5 ml TBST

	Dauer (min)	Wiederholungen	
0,1M Triethanolamin (750 µl Triethanolamin + 100 µl 32% HCl auf 50 ml H_2O)	5	2	(NICHT rollen)
5 ml 0,1M Triethanolamin +12,5µl Aceticanhydrid	5	1	(NICHT rollen)
Zugabe von weiteren 10 µl Aceticanhydrid	5	1	(NICHT rollen)
TBST	5	2	(NICHT rollen)
MEMFA+0,1% Tween (Fixieren)	30	1	(NICHT rollen)
TBST	5	5	

Hybridisierung:

• Überstand abnehmen, 500 µl Hybridisierungspuffer zugeben

• warten bis sich die Embryonen am Gefäßboden absetzen, Überstand abnehmen

• 500 µl Hybridisierungspuffer zugeben, 4 h bei 65°C inkubieren

• Sonde (ca. 1µg RNA) in 0,5-1,5 ml Hybridisierungspuffer 5 min bei 95°C erhitzen,

Überstand von Embryonen abnehmen, Sonde zugeben, Inkubation ü.N. bei 65°C

2. Tag

Sonde abnehmen (kann wiederverwendet werden, Lagerung -20°C)

Waschschritte	Dauer (min)	Wiederholungen	Temperatur [°C]
1 ml Hybridisierungspuffer	20	1	65
1 ml 2xSSC	20	2	65
1 ml 2xSSC+0,05% Tween +20 µg/ml RNase A + 10 U/ml RNase T1	20	2	37
1 ml 2xSSC + 0,05% Tween	20	1	65
1 ml 0,2xSSC + 0,05% Tween	20	2	65
TBST	10	2	RT

Antikörperbindung:

- Embryonen mit 1 ml Blockierlösung inkubieren, 1 h bei RT (NICHT rollen)
- parallel den Anti-DIG- oder Anti-FLUO-Antikörper blockieren (500 µl Blockierlösung+ 1:10000 verdünnter Antikörper), Inkubation 1h bei RT
- Blockierlösung abnehmen, blockierten Antikörper auf Embryonen geben, Inkubation 2,5h bei RT auf Schüttler.

Waschschritte	Dauer (min)	Wiederholungen	Temperatur [°C]
1xTBST	5	3	RT
1xTBST	ü.N.	1	4

3.Tag

Waschschritte	Dauer (min)	Wiederholungen	Temperatur [°C]
1xTBST	30	5	RT
AP-Puffer	5	2	RT

Färbung:

- 1 ml AP-Puffer + 4,5 µl NBT + 3,5 µl BCIP, vor Licht schützen, Inkubation bei RT oder 4°C, Dauer: 10min-ü.N.
- Hintergrund kann durch Inkubation der Embryonen in Methanol reduziert werden.
- Sobald die Färbung die erwünschte Intensität erreicht hat, 2x 5 min mit TBST waschen

Fixierung mit MEMFA+ 0,1% Tween 1-2 h bei RT oder mehrere Tage bei 4°C.

4.2.3 WMISH-Doppelfärbung

Die DWMISH dient der Darstellung der mRNA von zwei verschiedenen Genen. Es werden zwei Sonden gleichzeitig zu den zu untersuchenden Embryonen gegeben, wobei eine Sonde mit DIG und die andere mit FLUO markiert sein muss. Es wird zunächst das Protokoll der einfachen WMISH durchgeführt. Nach der ausreichend intensiven Färbung der ersten Sonde werden folgende Schritte durchgeführt.

	Dauer (min)	Wiederholungen	Temperatur [°C]
TBST	5	2	RT
TBST (Hitzeinaktivierung des ersten Antikörper)	60	1	65
MEMFA+ 0,1% Tween + 0,2% Glutaraldehyd	60	1	RT
TBST	5	2	RT
TBST	10 – ü.N.	1	RT oder 4°C

- Embryonen in 1 ml Blockierlösung inkubieren, 1 h bei RT (NICHT rollen)
- Nun wird der Antikörper, der die BISHER noch NICHT durch eine Färbung nachgewiesene Sonde erkennt, blockiert:

Anti-DIG- ODER Anti-FLUO- Antikörper blockieren (500 µl Blockierlösung + 1:10000 verdünnter Antikörper), Inkubation 1h bei RT

Das weitere Vorgehen folgt dem Protokoll für die einfache WMISH.

Die erste Färbung wird in der Regel mit BCIP (türkis), die zweite mit NBT/BCIP (dunkelblau/lila) durchgeführt.

4.2.4 Bleichen von Embryonen

Da die Pigmentierung von Embryonen zum Teil sehr störend sein kann und schwache WMISH-Signale dadurch überdeckt werden können, müssen Embryonen nach Bedarf gebleicht werden. Nachdem die Färbung wie oben beschrieben fixiert wurde, werden die Embryonen einmal kurz mit 1xTBST gewaschen. Anschließend gibt man 1ml H_2O_2 zu und inkubiert die Embryonen ü.N. in einem lichtgeschützten Behältnis bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag können die Embryonen mit 1xTBST gewaschen werden und stehen nun für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

4.2.5 Herstellung markierter antisense RNA Sonden

4.2.5.1 Restriktionsverdau des Expressionsplasmids

Um eine markierte antisense RNA Sonde herzustellen, ist es zunächst notwendig, den Expressionsvektor zu linearisieren. Hierzu werden ca. 5µg der Plasmid-DNA in einem Restriktionsverdau eingesetzt. Das jeweilige Restriktionsenzym ergibt sich durch den vorliegenden Expressionsvektor. Es wird folgender Ansatz in ein Reaktionsgefäß pipetiert:

5µg Plasmid-DNA
1µl Restriktionsenzym
2µl 10x Reaktionspuffer
ad 20µl bidest. H_2O

Der Ansatz wird 2h bei 37°C in einem Heizblock inkubiert und anschließend mittels des QIAGEN Gel Extraction Kits nach dem PCR-Purification Protokoll aufgereinigt (Qiagen,

QIAquick® Spin Handbook S.18, Juli 2002; www.qiagen.com). Die Elution erfolgt mit 30µl TE-Puffer pH 8,5 (im Kit enthalten). Zur Kontrolle der vollständigen Linearisierung des Expressionsplasmids wird ein 1µl Aliquot des aufgereinigten Restriktionsenzymverdaus auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

4.2.5.2 **In vitro *Transkription der antisense RNA Sonde***

Durch *in vitro* Transkription wird eine einzelsträngige antisense RNA Sonde hergestellt. Durch die Zugabe von Digoxygenin bzw. Fluorescein markierter Nukleotide (DIG-11-UTP bzw. FLUO-11-UTP) zum Reaktionsansatz erfolgt eine Markierung des antisense Transkripts an jeder 20. – 25. Position durch die RNA-Polymerasen SP6, T3 und T7. (Roche, Produktblatt). Es wird folgender Ansatz in ein Reaktionsgefäß pipetiert:

1µg linearisierte Plasmid-DNA
2µl 10x Transkriptions Puffer (Roche)
2µl 10x DIG- bzw. FLUO-labeling Mix (Roche)
2µl RNA-Polymerase (Roche)
0,5µl RNase Out (RNase Inhibitor) (Roche)
ad 20µl DEPC-H_2O

Der Ansatz wird 2h bei 37°C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend werden 2µl RNase freie DNaseI (Roche) zum Ansatz gegeben, gut gemischt und erneut ca. 15-30min bei 37°C inkubiert. Es folgt eine Abtrennung der nicht inkorporierten Nukleotide und der verdauten Plasmid-DNA durch eine G50-Sepharose Säule (Amersham). Die Säule wird nach Herstellerangaben behandelt. Bevor der Reaktionsansatz auf die Säule aufgetragen wird, wird das Volumen noch durch Zugabe von 30µl DEPC-H_2O auf 52µl erhöht. Zur Kontrolle der *in vitro* Transkription und dem vollständigen Verdau der Plasmid-DNA werden 3µl der aufgereinigten antisense RNA Sonde auf einem 1% Agarosegel untersucht.

4.2.6 Vibratomschnitte

In einer Gussform wird zunächst ein Sockel gegossen. Hierzu wird 1ml Gelatinelösung (0,5% Gelatine, 30% BSA, 20% Saccharose in 1xPBS) mit 70µl 25% Glutaraldehyd (Sigma) auf Eis in einem kleinen Wägeschälchen vermischt. Das Gemisch wird dann mit einer Pipette in die

Gussform transferiert. Gleichzeitig werden die zu schneidenden Embryonen für ca. 1h bei Raumtemperatur in Gelatinelösung inkubiert. Nachdem der Gelatineblock ausgehärtet ist können die Embryonen darauf platziert werden. Hier ist darauf zu achten, dass möglichst wenig Flüssigkeit mit transferiert wird. Wenn die Embryonen ausgerichtet sind, können sie vorsichtig mit Gelatinelösung / Glutaraldehyd Gemisch (wie zuvor beschrieben) überschichtet werden. Ist der Gelatineblock ausgehärtet, kann er aus der Gussform gelöst und getrimmt werden. Anschließend kann der Gelatineblock mit UHU Sekundenkleber auf den Metallträger geklebt werden. Es werden Schnitte zwischen 10-30µm Dicke angefertigt. Die Vibratomschnitte werden in wässrigem Eindeckelmedium (Aquatex, Merck) eingebettet.

4.2.7 BrdU Markierung von *Xenopus laevis* Embryonen

Die BrdU Markierung dient der Visualisierung von mitotischen Zellen. 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU) wird hierbei als Thymidinanalogon während der DNA-Replikation in der S-Phase der Mitose in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Nachdem das Gewebe fixiert worden ist, kann inkorporiertes BrdU durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die Anzahl von BrdU-positiven Zellen lässt eine Aussage über die Anzahl an mitotischen Zellen im untersuchten Gewebe zu.
Embryonen im 8-Zellstadium wurden bilateral in die dorsale Marginalzone mit 10ng islMO bzw. Standardkontrollmorpholino (CMO) injiziert. Die Embryonen wurden bis St.32 in 0,1xMBSH kultiviert. In diesem Entwicklungsstadium erfolgte die Injektion von 10-15nl BrdU-Lösung (Boehringer) bilateral in die Herzregion der Embryonen. Um die Embryonen ruhig zu stellen wurden sie für die Injektion in 0,1xMBSH+0,4%MS222 pH 7-8 überführt.

Es wird nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Tag 1:
Wenn nicht anders erwähnt, werden alle Reaktionen bei RT ausgeführt.

Rehydrierung:

	Zeit [min]	Wiederholungen
Methanol 100%	5	1
Methanol 75%/PBS 25%	5	1
Methanol 50%/PBS 50%	5	1
Methanol 25%/PBS 75%	5	1
PBS 100%	5	5

Proteinase-K Behandlung:

- 30s Proteinase K Verdau in PBST (3,6 µl Proteinase K (Stock 14 mg/ml) in 5 ml TBST)
- Zweimal mit PBS waschen, 5 min bei RT

HCl-Behandlung:

	Zeit [min]	Wiederholungen
2N HCl	60	1
PBST	5	5

Antikörper Inkubation:

- Embryonen 2mal in PBS+ 0,3% Triton X-100 waschen, je 30 min bei RT
- Embryonen 1 h in PBS + 3% Horse Serum blockieren
- Embryonen 15 min in 200 µl Incubationbuffer (Boehringer Kit 1299964) äquilibrieren
- Incubationbuffer durch Anti-BrdU Antikörperlösung (AK 1:10 in Incubation buffer) ersetzen, 4h bei 37 °C inkubieren.

Waschen:

	Zeit [min]	Wiederholungen
PBST	15-30	3
PBST	ü.N. (4°C)	1

Tag 2:

Inkubation mit sekundärem Antikörper:

	Zeit [min]	Wiederholungen
PBS+ 0,1% Tween-20	5	5
PBS+ 20% Horse Serum	60	1
PBS+ 20% Horse Serum +Anti-Maus-IgG-AP (1:10)	5-6 h	1
PBS+ 0,1% Tween-20	15-30	3
PBS+ 0,1% Tween-20	ü.N. 4 °C	

Tag 3:

Farbreaktion:

	Zeit [min]	Wiederholungen
PBS+ 0,1% Tween-20	5	2
Substratpuffer (Kit)	5	2
3 ml Substratpuffer +13 µl NBT+ 10 µl X-Phosphat	bis zu 20h bei 4°C	

Nach ausreichend intensiver Färbung wird die Färbelösung abgenommen. Die Embryonen werden 2 mal mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit 1xMEMFA fixiert.

4.2.8 Anfärben von Zellkernen durch DAPI-Lösung

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an A-T-reiche Sequenzen in der kleinen Furche der DNA anlagert. Das Absorptionsmaximum liegt in Verbindung mit DNA bei 358nm. Durch Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich bei 461nm. DAPI bindet auch RNA, allerdings liegt hier das Emissionsmaximum bei 400nm. Durch geeignete optische Filter, kann nur die Fluoreszenz der DAPI-DNA Verbindung sichtbar gemacht werden. DAPI kann somit DNA spezifisch anfärben (Kapuscinski, 1995).
DAPI wird in Pulverform bezogen (Roche). Es wird zunächst eine Stammlösung hergestellt werden. Hierzu wird DAPI in einer Konzentration von 1mg/ml in bidestilliertem H_2O gelöst. Diese Stammlösung kann nun lichtgeschützt bei –20°C aufbewahrt werden. Die Arbeitslösung (1µg/ml) wird durch eine 1:1000 Verdünnung der Stammlösung in 1xPBS hergestellt. Vibratomschnitte von *Xenopus* Embryonen, werden mit etwa 500µl DAPI Arbeitslösung vorsichtig überschichtet und dann für 15-30min. bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach wird die DAPI-Lösung vorsichtig abgenommen und die Schnitte in 100% Glycerin eingedeckelt.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Hierzu wird eine Gelmatrix benötigt, da DNA-Moleküle bei jeder Molekülmasse dasselbe Ladungsverhältnis aufweisen (Sambrook et al. 1989). Aufgrund der negativen Ladung des Zucker/Phosphatrückrats wandern DNA-Moleküle zur Anode. Es werden Gele mit einer Konzentration von 0,7%-2% Agarose gegossen, um ein weiteres oder engeres Netzwerk aus Zuckerketten zu erhalten, und somit größere oder kleinere DNA-Fragmente aufzutrennen. Mit einem 0,7% Agarosegel ist es möglich DNA-Moleküle von ca. 0,8kb - 12kb Größe aufzutrennen. Mit 1% - 2% Agarosegelen können auch DNA-Moleküle mit kürzerer Kettenlänge separiert werden (0,5kb-10kb, bzw. 50bp – 2000bp).
Um ein Agarosegel herzustellen, wird zunächst Agarosepulver in der gewünschten Konzentration in TBE-Puffer aufgekocht und somit gelöst. Nachdem das Agarosepulver vollständig gelöst ist, wird die Lösung unter fließendem Wasser abgekühlt, bis sie etwa

handwarm ist. Danach erfolgt die Zugabe von Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiumbromid) in einer Endkonzentration von 0,5g/ml. Ethidiumbromid interkaliert sequenzunspezifisch zwischen die Basenpaare des DNA-Doppelstranges. Der Ethidiumbromid/DNA-Komplex fluoresziert bei 254nm, somit können Bandenmuster im Agarosegel sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Die Agarosegellösung wird nun in eine mit einem Probenkamm und Gelbegrenzern versehene Gelapperatur gegossen. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert ist, werden der Kamm und die Gelbegrenzer entfernt und das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Die Proben müssen noch mit Auftragspuffer versetzt werden, bevor sie in die Geltaschen pipetiert werden können. Hierzu wird zu drei Volumina Probe ein Volumen Auftragspuffer gegeben. Der Auftragspuffer enthält Glycerin, was die Dichte der Probe erhöht. Sie kann somit leichter in die Geltasche gefüllt werden. Außerdem ist die Diffusion der Probe aus der Geltasche stark verlangsamt, was zu einem geringern Verlust an DNA führt. Zudem sind im Auftragspuffer die positiv geladenen Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol enthalten, die es ermöglichen die Lauffront der DNA-Moleküle visuell abzuschätzen. In der Regel wir eine Spannung von 50-120V bei einem Gellauf angelegt.

4.3.2 Restriktionsspaltung von DNA

Um DNA Fragmente definierter Größe aus z.B. einem Plasmid herauszutrennen oder auch Vektoren zu linearisieren, macht man sich zu Nutze, dass Restriktionsendonukleasen vom TpyII Phosphodiesterbindung doppelsträngiger DNA-Moleküle an einer spezifischen Basensequenz spalten (Sambrook et al. 1989). Es kann eine große Anzahl dieser „Restriktionsenzyme“ kommerziell erworben werden. Es gibt Restriktionsenzyme welche glatte DNA-Enden („blunt-ends“) erzeugen und Enzyme die zu 5’ und 3’ überhängenden Enden („sticky-ends“) führen. Die Enzyme sind empfindlich gegenüber Schwankungen des pH-Werts, sowie einer hohen Salzkonzentration und der Kontamination durch organische Lösungsmittel. Es ist daher darauf zu achten, dass man sehr saubere DNA für eine Restriktionsspaltung einsetzt. Bei allen kommerziell erhältlichen Restriktionsenzymen wird ein 10fach konzentrierter Reaktionspuffer mitgeliefert. Dieser Puffer gewährleistet die optimale Salzkonzentration und den optimalen pH-Wert für das spezifische Enzym. Die Enzyme werden in Puffern geliefert die 30-50% Glycerin enthalten. Da ein Glycerinanteil größer 5% die Spezifität des Enzyms verringert, sollte das Volumen des Enzyms niemals

größer als 10% des Endvolumens der Reaktion sein. Standardmäßig wird ein Reaktionsansatz von 20µl-50µl in ein Reaktionsgefäß pipetiert.
Es wird im Allgemeinen folgender Ansatz pipetiert:

0,5-5µg DNA
2-5µl 10x Reaktionspuffer
1-5µl Restriktionsenzym
ad 20-50µl H_2O

Der Ansatz wird für 2h bei der optimalen Temperatur für das gewählte Enzym (meist 37°C) in einem Heizblock inkubiert. Viele Enzyme können durch eine Inkubation für 10min bei 65°C hitzeinaktiviert werden.

4.3.3 Ligation von DNA Fragmenten

Durch T4-DNA Ligase wird die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'OH-Gruppe und 5'Phosphatgruppe katalysiert. Es ist also möglich, mithilfe dieses Enzyms bestimmte DNA-Fragmente in Vektoren einzubringen, wodurch sie dann für weitere molekularbiologische Anwendungen zur Verfügung stehen. Vektoren und das gewünschte DNA-Fragment werden mit entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt und dann in der Ligationsreaktion eingesetzt.

Es wird im Allgemeinen folgender Reaktionsansatz pipetiert:

1mol Vektor
3-5 mol DNA-Fragment
1µl 10x Ligasepuffer
ad 10µl H_2O

Diese Reaktion wird je nach verwendeter Ligase nach Herstellerangaben für 5min bei RT bis ü.N. bei 14°C inkubiert.
1-5µl des Reaktionsansatzes werden zur Transformation von chemokompetenten *E.coli* eingesetzt.

4.3.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um zu Verhindern, dass ein Vektor religiert, können die 5'Enden dephosphoryliert werden. Die *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) katalysiert diese Reaktion. Die SAP wird direkt in den Restriktionsansatz gegeben. Bei 5'-vorstehenden Enden werden 0,1 Units, bei glatten Enden 0,2 Units und bei 5'-zurückversetzten Enden 0,5 Units SAP eingesetzt (Roche Produktblatt). Die Inkubation erfolgt für 2h bei 37°C. Die Inaktivierung erfolgt für 15min bei 65°C.

4.3.5 Ligation von PCR-Fragmenten in den pCR2.1-TOPO Vektor

Bei diesem Kit der Firma *Invitrogen* wird ausgenutzt, dass bei einer PCR Reaktion durch die *Taq* Polymerase am 3'Ende des PCR-Produkts Adenosinbasen angehängt werden. Der Vektor besitzt 3' überhängende Thymidinbasen und liegt linearisiert vor. Durch die Hybridisierung von überhängenden Adenosin und Thymidinbasen wird eine höher Ligationseffizienz erreicht. Zudem ist der Vektor kovalent mit dem Enzym Topoisomerase I des *Vaccinina* Virus verknüpft, welches die Ligationsreaktion katalysiert. Nach der Reaktion wird das Enzym freigesetzt (www.invitrogen.com).

Es wird im Allgemeinen folgender Reaktionsansatz pipetiert:

0,5-4µl aufgereinigtes PCR-Produkt
1µl Salzlösung (300mM NaCl, 15 mM $MgCl_2$)
1µl TOPO-Vektor
ad 6µl Endvolumen mit H_2O

Die Reaktion wird für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. 1µl des Reaktionsansatzes wird zur Transformation chemokompetenter *E.coli* verwendet.

4.3.6 Chemotransformation kompetenter Bakterien

Durch einen kurzen Hitzeschock ist es möglich, chemokompetente Bakterien mit z.B. Plasmid DNA zu transformieren. Es werden One Shot®TOP10 Competent Cells (Invitrogen) verwendet. Ein Aliquot (50µl) der kompetenten Bakterien wird auf Eis aufgetaut. Es folgt die

Zugabe von 1-5µl eines 10µl Ligationsansatzes. Durch Schnipsen gegen das Reaktionsgefäß werden die Bakterien vorsichtig gemischt und anschließend für 20min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock für 1min bei 42°C. Es werden sofort 800µl LB-Medium zugegeben. Durch invertieren wird der Ansatz vorsichtig gemischt. Es folgt eine Inkubation für 30min bei 37°C im Heizblock. Es werden nun 100µl-200µl der Bakteriensuspension auf Selektionsagarplatten (z.B. LB/Amp) ausplattiert. Wenn eine größer Anzahl an Bakterien ausplattiert werden soll, können diese auch für 5min bei 3000rpm abzentrifugiert werden. Das Pellet kann dann in etwa 100µl LB-Medium aufgenommen werden und diese Suspension dann auf Selektionsagarplatten ausplattiert werden.

4.3.7 Anlegen von Gefrierkulturen transformierter Bakterien

Um Bakterien, die ein bestimmtes Plasmid tragen, für später Plasmidpräparationen zu lagern werden Glycerin Gefrierkulturen angelegt. Hierzu wird zu ein Volumen einer dicht gewachsenen Bakterienkultur ein Volumen 100% Glycerin gegeben. Die Glycerin-Gefrierkultur wird sehr gut gemischt, und kann dann bei –80°C gelagert werden.

4.3.8 Plasmidisolation mit Promega Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System®

Mit diesem Kit kann schnell sehr saubere Plasmid-DNA aus Bakterien isoliert werden. Der Aufschluss der Bakterien erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Der alkalische Lysepuffer enthält NaOH und SDS. Durch den hohen pH-Wert werden die chromosomale DNA, die Plasmid-DNA sowie die Proteine denaturiert. Durch Kaliumacetatpuffer wird eine Neutralisierung des Reaktionsansatzes erreicht, wodurch die Plasmid-DNA renaturiert. Die chromosomale DNA und die Proteine werden in einem Komplex mit Kalium und SDS ausgefällt. Durch Zentrifugation kann nun die gewünschte Plasmid-DNA im Überstand von den hochmolekularen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Der Promega-Kit verwendet eine DNA-Affinitätssäule, um die Plasmid-DNA aufzureinigen. Es wird nach den Herstellerangaben verfahren (www.promega.com). Im Allgemeinen werden 5ml Bakteriensuspension (ü.N., 37°C, Schüttler) verarbeitet. Die Elution der DNA erfolgt in 50µl H_2O.

4.3.9 Plasmidisolation mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit

Zur Isolation von Plasmiden aus 50ml ü.N. Kulturen (Midi-Präparation) wird der Qiagen Plasmid-Midi Kit verwendet. Es wird nach Herstellerangaben verfahren (www.qiagen.com).

4.3.10 Aufreinigung von DNA mittels QIAGEN Gel Extraction Kit

Um DNA nach einer Restriktionsspaltung aufzureinigen, wird der Qiagen Gel Extraction Kit verwendet. Die DNA wird mittels einer Affinitätssäule von störenden Verunreinigungen aufgereinigt. Das Protokoll des Herstellers wird exakt befolgt (www.qiagen.com).

4.3.11 Gewinnung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen mittels des QIAGEN Gel Extraction Kit

Zur Gewinnung von DNA aus Agarosegelen wird der QIAGEN Gel Extraction Kit verwendet. Dieser Kit basiert auf dem Prinzip der Auflösung der Agarose in einem chaotropen Salzpuffer (QG-Puffer). Das gewünschte DNA-Fragment wird unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es werden pro 100mg Agarosegel 100µl QG-Puffer eingesetzt. Die Folgende Aufreinigung der DNA erfolgt nach Herstellerangaben (www.qiagen.com). Da hierzu Affinitätssäulen verwendet werden, und deren Kapazität beschränkt ist können nur Gelstücke bis zu 400mg mit einer Affinitätssäule aufgereinigt werden.

4.3.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wird nach dem Kettenabbruch-Verfahren (Sanger-Verfahren) (Sanger et al., 1977) vorgenommen. Es wird eine PCR durchgeführt, wobei zusätzlich zu den dNTPs auch ddNTPs zum Reaktionsansatz gegeben werden. Diesen Didesoxynukleotiden fehlt die für die Kettenverlängerung durch die DNA-Polymerase essentiell wichtige, OH-Gruppe am 3’-C-Atom des Zuckers. Es entstehen also unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Da jedes ddNTP mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, kann nach vorheriger elektrophoretischer Trennung der unterschiedlich langen DNA-Fragmente die Reihenfolge der Basen in einem spezifischen DNA-Abschnitt bestimmt werden. Durch die Gelelektrophorese ist es möglich Längenunterschiede von einer Base zu detektieren. Die

Bestimmung der Nukleotidsequenzen wird auf einem *ABI PRISM-377 DNA-Sequencer* durchgeführt. Zum Reaktionsansatz werden 300-400ng DNA, 10pmol Primer und 4µl Sequenzier-Premix (DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham) gegeben. Die Reaktion findet in einem Gesamtvolumen von 10 µl statt. Das *Cycle sequencing-Programm* (15" 94°C, 30" 50°C, 1' 60°C, 25 Zyklen) wird in einem Biometra T3-Thermocycler durchgeführt. Nach der Reaktion wird der Ansatz mit Ethanol gefällt und in Formamid-Auftragspuffer aufgenommen. Die Reaktion wird dann auf das Sequenziergel aufgetragen.

4.3.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Durch eine spektroskopische Analyse von nukleinsäurehaltigen, wässrigen Lösungen bei 260nm kann die Nukleinsäurekonzentration bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260nm. Eine $O.D._{260}$ von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50µg/ml, bei einzelsträngiger DNA oder RNA einer Konzentration von 35-40µg/ml und bei einzelsträngigen Oligonukleotiden einer Konzentration von ungefähr 20µg/ml. Die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten rühren von der unterschiedlichen Stärke des durch das "stacking" der Basen verursachten hypochromen Effektes her. Zu starke Verunreinigungen durch z.B. Proteine oder Phenol verhindern die spektroskopische Analyse. Der Quotient $O.D._{260}/O.D._{280}$ gibt die Reinheit einer Nukleinsäurelösung an. Für reine DNA bzw. RNA Lösungen beträgt er 1,8-2,0 (Sambrook et al. 1989). Abweichende Werte werden durch eine Verunreinigung mit Proteinen verursacht. Proteine besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 280nm.
Um die spektroskopische Analyse einer Nukleinsäurelösung durchzuführen, wird zunächst ein Aliquot 1:100 mit H_2O verdünnt und anschließend in einer Quarzküvette gegen Wasser bei einer Wellenlänge 260nm und 280nm photometrisch untersucht.

4.3.14 in vitro Transkription von mRNA für die Mikroinjektion

Zur *in vitro* Transkription von mRNA zur Mikroinjektion wir der mMESSAGE mMACHINE Kit von Ambion verwendet. Dieser Kit ermöglicht es, mRNA mit einer 5'Cap-Region herzustellen. Diese Struktur kommt in den meisten eukaryotischen mRNAs vor und trägt erheblich zur Stabilität der mRNA bei, außerdem ist sie wichtig für die Initiation der Translation des Transkripts. Der Kit enthält (m^7G(5')ppp(5')G), welches aufgrund seiner

sterischen Eigenschaften nur am 5'-Ende in das entstehende mRNA-Molekül eingebaut werden kann. Das Plasmid pCS2+ dient als Standardvektor für die *in vitro* Transkription von mRNA. Es verfügt über ein SV40 Polyadenylierungssignal, welches sich am 3'-Ende an die spezifische Gensequenz anschließt. Ein Poly-A-Ende trägt, zusätzlich zum 5'Cap, zur Stabilisierung der mRNA bei.

Reaktionsansatz:

2xNTP/Cap-Lösung	10µl
10xReaction Buffer	2µl
lineare DNA (Matrize)	1µg
Enzym (SP6, T3 od.T7)	2µl
H_2O	ad 20µl

- Inkubation für 2 h bei 37 °C
- Zugabe von 1 µl DNaseI (RNase-frei) (Roche); Inkubation für 15 min bei 37 °C

4.3.15 Aufreinigung von mRNA für die Mikroinjektion mittels QIAGEN RNeasy Kit

Es ist zwingend erforderlich, dass *in vitro* transkribierte mRNA welche zur Injektion in Embryonen bestimmt ist frei von Verunreinigungen ist. Deswegen wird der *in vitro* Transkriptionsansatz mit dem RNeasy RNA Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

4.3.16 RNA Isolierung aus embryonalem Gewebe

Zur Isolierung von RNA aus embryonalem Gewebe wird der *RNA Isolation Kit* der Firma *Gentra* verwendet. Das verwendete Material kann entweder direkt oder nach Lagerung bei –80°C zur Isolation von RNA verwendet werden. Der Embryo oder das dorsale Marginal-zonen Explantat bzw. die animalen Kappen werden in ein Rektionsgefäß mit möglichst geringer Puffermenge überführt. Es werden 300µl *Cell Lysis Solution* zugegeben und das Material mit einem Plastikpistill homogenisiert. Der Zellaufschluss erfolgt durch alkalische Lyse. Es werden nun 100µl *Protein-DNA Precipitation Solution* zugegeben und durch fünfmaliges invertieren des Reaktionsgefäßes gut durchmischt. Der Ansatz wird nun für 5min

auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 13000rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und erneut unter obengenannten Bedingungen zentrifugiert, um transferierte Verunreinigungen abzutrennen. Das Pellet wird wie zuvor verworfen und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im folgenden Schritt wird die RNA aus der Lösung ausgefällt. Es wird 1 Volumen Isopropanol und 1µl Glycogen (Invitrogen) zugegeben. Durch 50faches invertieren wird die RNA aus der Lösung ausgefällt. Danach werden die Proben bei 4°C für 5min und 13000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das RNA-Pellet wird mit 100µl 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wird der Überstand verworfen und das getrocknete Pellet in 6µl DEPC-H_2O gelöst.
Es schließt sich eine DNaseI Behandlung an. Hierzu werden zur gelösten RNA 5µl DNase Puffer und 2µl DNaseI (RNase frei) (Roche) gegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 37°C für 30min inkubiert. Um Integrität und Menge der RNA zu überprüfen wird ein 1µl Aliquot auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

4.3.17 cDNA-Synthese

Für die cDNA Synthese werden ca. 300ng RNA eingesetzt. Es wurde folgender Reaktionsansatz pipetiert:

RNA (ca 300ng)	x µl
Random-Primers (50-250ng)	1µl
DEPC-H_2O	ad12µl (für die negativ Kontrollreaktion (–RT) ad 13µl)

Ansatz durch vortexen gut mischen, Inkubation bei 72°C für 10min (Denaturierung)

Zugabe von:
4µl 5x *First Strand Reaction Buffer* (Invitrogen)
2µl DTT (Invitrogen)
1µl 10µM dNTPs (Roche)

Ansatz durch vortexen gut mischen, Inkubation bei 42°C für 2min. Es folgt die Zugabe von 1µl (200U) Reverser Transkriptase (SuperscriptII; Invitrogen). Der Ansatz wird für 1h bei 42°C inkubiert. Danach erfolgt die Inaktivierung des Enzyms bei 72°C für 15min.
Für die RT-PCR Reaktion wird 1µl cDNA eingesetzt.

4.3.18 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf dem Prinzip, dass die DNA-Polymerase ein einzelsträngiges DNA-Molekül zu einem Doppelstrang aufpolymerisieren kann, sofern kurze doppelsträngige Bereiche als Startregionen vorgeben werden. Diese Vorbedingung wird durch die Wahl kurzer spezifischer Oligonukleotide sogenannter „Primer“ erreicht. Ein Primer muss dem codierenden Strang und einer dem kodogenen Strang entsprechen. Die Elongation erfolgt stehts in 5’→3’ Richtung. Es erfolgt also eine Verdopplung der DNA-Stränge mit jeder Runde der Polymerisation. Dies ermöglicht es, auch noch geringste Mengen an DNA nachzuweisen. Ein PCR-Zyklus besteht aus einer Denaturierungs-Phase (bei 94°C), um die doppelsträngigen DNA-Moleküle in Einzelstränge aufzutrennen. Es folgt eine Absenkung der Temperatur auf 50-60°C, bei dieser Temperatur binden die Primer an die einzelsträngigen DNA-Moleküle („Annealing“). Die Temperatur wird anschließend wieder auf 72°C erhöht, bei dieser Temperatur findet die Elongation durch die DNA-Polymerase statt. Es wird im Allgemeinen die DNA-Polymerase des termophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* verwendet, die auch bei einer Erhöhung der Temperatur auf 94°C während der Denaturierungs-Phase ihre enzymatische Aktivität beibehält.

Ein typisches PCR-Programm gliedert sich wie folgt:

1. Schritt:	5min	94°C
2.Schritt:	1min	94°C
3.Schritt:	30s	55°C
4.Schritt:	1min	72°C

Schritt 2-4 werden 30mal wiederholt.

5.Schritt:	5min	72°C
6.Schritt	∞	4°C

Die PCR wird in einem T3 Thermocycler (Biometra) mit Deckelheizung durchgeführt.

4.3.19 Semiquantitative RT-PCR

Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR wird eine vergleichende Untersuchung der Expression von Genen von Interesse möglich. Es kann also eine Aussage über die unterschiedliche quantitative Expression eines Transkripts in gleichen oder unterschiedlichen Geweben getroffen werden. Die mRNA Menge eines Gens kann somit nach dem knock down oder auch der Überexpression eines Transkripts von Interesse quantitativ analysiert werden. Es ist wichtig, das dieselben Bedingungen in allen PCR-Reaktionen herrschen. Um dies bestmöglich zu gewährleisten, wird mit einem „Mastermix“ gearbeitet. Dieser enthält alle Komponenten außer der Matrizen cDNA und den spezifischen Primern.
Ein Standard Mastermix setzt sich wie folgt zusammen:

14,875µl H_2O
2,5 µl 10xPCR-Reaction Buffer
2,0 µl Enhancer
2,0 µl dNTPs
1,5 µl $MgCl_2$
0,125µl Taq-DNA-Polymerase
$\sum$ 23µl

Der Mastermix wird also nachdem er in ein Reaktionsgefäß pipetiert wurde zunächst aufgeteilt um die spezifischen Primer (1µl pro Ansatz) zu den jeweiligen Aliquots zu pipetieren. Danach werden die Mastermix Aliquots mit den jeweiligen spezifischen Primern auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Hierbei werden in jedes PCR-Reaktionsgefäß 24µl Mastermix + Primer gegeben. Die cDNA wird im letzten Schritt in jedes Reaktionsgefäß extra zugegeben. Die komplette Reaktion sollte auf Eis pipetiert werden. Um Aussagen über eine unterschiedlich starke Expression eines bestimmten Transkripts treffen zu können, ist es notwendig das gewährleistet ist, dass dieselbe bzw. eine nicht signifikant unterschiedliche Menge an cDNA für jede Reaktion eingesetzt wurde. Hierzu wird eine PCR auf Histon 4 (H4) als Positivkontrolle durchgeführt. Wenn sich die mRNA Mengen bei manipuliertem Gewebe und Wildtyp nicht signifikant unterscheiden und die negativ Kontrolle (cDNA-Synthese Ansatz ohne die Zugabe von Reverser Transkriptase „-RT“) kein Signal liefert, können die Transkriptmengen der jeweiligen Gene von Interesse verglichen werden.

4.3.20 Kolonie-PCR

Um sehr schnell zu überprüfen, ob eine Bakterienkolonie das gewünschte Insert trägt, kann eine Kolonie-PCR durchgeführt werden. Es wird ein Standard-PCR Mix pipetiert, anstelle der DNA-Matrize wird mit einer weißen (10µl) Spitze eine Kolonie abgestreift und in den PCR-Mix überführt. Die Methode kann zur schnellen Durchmusterung einer großen Anzahl von Kolonien dienen.

4.3.21 Herstellen eines Deletionskonstrukts mittels des STRATAGENE Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit

Für bestimmte Anwendungen, z.B. für Promotorstudien, die Analyse funktioneller Domänen eines Proteins oder die Mutation der Bindungstelle eines Morpholinos, ist es notwendig, gezielt Mutationen in ein zu untersuchendes DNA- bzw. cDNA-Insert einzuführen. Hierbei kann es sich um Punktmutationen bzw. Deletionen oder Insertionen eines DNA Fragments handeln. Die Mutagenese von DNA ist sehr arbeitsreich und technisch sehr aufwendig. Um den Arbeitsaufwand dieser Methode zu minimieren wurde der STRATAGENE Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht darauf, durch eine PCR mit spezifischen Primern, die der mutierten Sequenz entsprechen, ein Ausgangsplasmid gezielt zu verändern. Das Ausgangsplasmid wird durch eine Mini- bzw. Midi-DNA-Plasmid Präparation aus Bakterien isoliert. Im Kit enthalten ist die *Pfu-Turbo DNA-Polymerase*, diese Polymerase ist sehr effizient und ermöglicht es auch lange DNA-Fragmente (also z.B. ganze Vektoren) zu amplifizieren. Aus der PCR erhält man ein Gemisch aus mutiertem Vektor und Ausgangsvektor. Da das Ausgangsplasmid zuvor aus Bakterien isoliert wurde, ist es methyliert, bzw. semimethyliert (es dürfen keine *dam*$^-$ *E.coli* Stämme verwendet werden). Die Endonuclease *DpnI* ist sensitiv gegenüber methylierter DNA und erkennt zusätzlich noch eine bestimmte Zielsequenz. Es ist also möglich selektiv die parentale, methylierte DNA zu spalten, und nur den mutierten Vektor zu erhalten. Dieser kann dann in die mitgelieferten kompetenten Bakterien transformiert und anschließend in einer Plasmid-Mini oder Midipräparation aufgereinigt werden.

Es wurde exakt nach Herstellerangaben verfahren (http://www.stratagene.com/manuals/200514.pdf). Es werden hier auch Richtlinien für das erstellen der Primer sowie das zu verwendende PCR-Programm gegeben, die ebenfalls befolgt wurden.

4.3.22 Gekoppelte in vitro Transkriptions und Translation Reaktion zur Spezifitätsanalyse von Morpholinos

Um schnell und zuverlässig die Inhibition der Translation durch ein Morpholino zu testen, kann eine gekoppelte *in vitro* Transkriptions und Translations Reaktion durchgeführt werden. Dazu wird der *SP6 TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems* Kit von Promega verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht auf einer Verbindung einer *in vitro* Transkription, ausgehend von einem Expressionsplasmid welches den SP6-Promotor enthält, mit einer *in vitro* Translation wozu Reticulocyten Lysat von Kaninchen verwendet wird. Der verwendete Kit enthält alle notwendigen Komponenten in einem Mastermix, es muss nur noch die Plasmid-DNA, das zur radioaktiven Markierung der Proteine verwendete [^{35}S]-Methionin und das zu testende Morpholino zugegeben werden. Das Protokoll des Herstellers wird exakt befolgt (http://www.promega.com/tbs/tm045/tm045.pdf).

4.3.23 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Es wird das diskontinuierliche Verfahren nach Lämmli (1970) verwendet. Die SDS-PAGE ermöglicht es, Proteine unabhängig von ihrer Ladung rein nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Durch die Bindung des Detergenz SDS an die Proteine, werden diese denaturiert und negativ geladen. Die Polyacyrylgelmatrix stellt ein Molekularsieb dar. Kleinere Proteine wandern entlang eines elektrischen Feldes schneller durch das Gel als größere. Ein SDS-PAGE Gel besteht aus zwei verschieden Gelschichten. Das „grobmaschigen“ Sammelgel und das „engmaschige“ Trenngel. Das Sammelgel dient der Bildung einer sehr dünnen Zone in der sich die zu trennenden SDS-Proteinkomplexe ansammeln. Die eigentliche Auftrennung erfolgt erst in der zweiten Gelschicht dem Trenngel. Die Proteinprobe wird im Verhältnis 5:1 (Protein : Puffer) mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 98 °C erhitzt und dann auf Eis gelagert.

Ansatz für zwei kleine Proteingele (Biorad):

Sammelgel (4,3 %):

1,1 ml	Lösung A
100 µl	10% SDS
2,5 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
6,4 ml	H_2O
50 µl	10% APS, frisch
30 µl	TEMED

Trenngel (10 %):

4 ml	Lösung A
3,7 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
150 µl	10% SDS
7,2 ml	H_2O
50 µl	10% APS, frisch
25 µl	TEMED

Die Elektrophorese wird mit SDS-Elektrophoresepuffer durchgeführt, der Einlauf (Sammelgel) erfolgt bei 60 V im Trenngel erfolgt die Auftrennung bei 100-120 V.

5 Ergebnisse

5.1 Sequenzierung des Xislet-1 cDNA Konstrukts

Ein *Xislet-1 (Xisl-1)* cDNA-Klon wurde von Dr. D. Melton (Harvard University) bezogen. Dieser Klon wurde beim Durchmustern einer Stadium (St.) 42 lamba ZAP *Xenopus* cDNA Bibliothek mit einer *Islet-1* cDNA Sonde aus der Ratte (*Rattus norvegicus*) isoliert (Kelly und Melton, 2000). Da keine Informationen über die Nukleotidsequenz vorlagen wurde der Klon zunächst sequenziert (*Xisl-1* cDNA Sequenz im Anhang; Zugangsnummer für die NCBI-Datenbank: EF197154). Das cDNA Insert ist 2123bp lang und umfasst den kompletten offenen Leserahmen des *Xisl-1* Gens (1065bp) sowie 49bp des 5'UTR und 1009bp des 3'UTR.

5.2 Bioinformatische Analyse der Xislet-1 cDNA und Protein *Sequenz*

Nach der Sequenzierung wurde die cDNA-Sequenz von *Xisl-1* mit bioinformatischen Methoden analysiert (Abb. 7). Zunächst wurde die Sequenz mit dem Programm „BLASTn" (Altschul et al., 1997) mit bestehenden Einträgen in der Nukleotidsequenzdatenbank verglichen (http://130.14.29.110/BLAST/). Diese Analyse zeigt, dass *Xisl-1* eine hohe Homologie zu *Islet-1 (Isl-1)* cDNA Sequenzen anderer Organismen aufweist. Des Weiteren wurde mit dem Programm ORFinder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/) der offene Leserahmen (ORF) der erhaltenen cDNA Sequenz bestimmt. Der Leserahmen des *Xisl-1* cDNA Klons beginnt mit dem 50. Nukleotid und ist 1065bp lang. Somit besteht das Xisl-1 Protein aus 354 Aminosäuren (AS). Die Aminosäuresequenz wurde ebenfalls durch das ORFinder Programm bestimmt. Mit dem Programm SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) wurde das Protein auf funktionelle Domänen untersucht. Diese Analyse zeigt, dass Xisl-1 wie die Isl-1 Proteine anderer Organismen 2 LIM-Domänen (AS 16-70 und AS 78-132) und eine Homeobox-Domäne (AS 181-243) besitzt (Abb. 7). Die LIM-Domänen dienen der Protein-Protein Interaktion und die Homeobox-Domäne der Bindung des Proteins an die DNA (Hobert und Westphal, 2000). Abschließend wurde noch ein Sequenzvergleich von Xisl-1 mit den Isl-1 Proteinsequenzen anderer Vertebraten- und Invertebratenspezies durchgeführt (Tabelle 1). Dieser Vergleich zeigt die hohe Konservierung des Isl-1 Proteins innerhalb verschiedener Vertebratenspezies.

Die Proteinsequenz weist 96% Homologie zu Zebrafisch (*Danio rerio*), dem Haushuhn (*Gallus gallus*) und der Hausmaus (*Mus musculus*) auf. Das humane Isl-1 Protein besitzt sogar zu 97% gleiche Aminosäuren. Zur Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) beträgt die Homologie nur 55%. Allerdings ist *Drosophila* Isl-1 mit 534 Aminosäuren wesentlich länger als Xisl-1 (354 AS) und als die Isl-1 Proteine aller untersuchten Vertebratenspezies (349 AS). Für die Funktion eines Proteins sind die funktionellen Domänen von größter Bedeutung, daher wurden die Aminosäuresequenzen der einzelnen Domänen von Xisl-1, welche durch das SMART Programm identifiziert wurden, mit den AS Sequenzen der Domänen der oben genannten Spezies verglichen (Tabelle 1). Die einzelnen Domänen der Vertebraten Isl-1 Proteine sind zwischen 95% und 100% homolog. Der hohe Grad der Konservierung des Proteins und seiner funktionellen Domänen unter den Wirbeltieren lässt auf eine, konservierte Funktionen in den verschiedenen Spezies schließen.

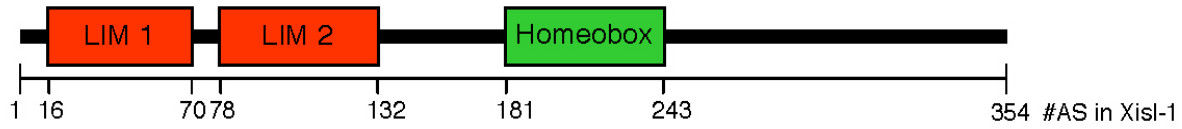


Abb. 7: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des Xisl-1 Proteins. Die bioinformatische Analyse der *Xisl-1* cDNA Sequenz zeigte, dass der Transkriptionsfaktor aus 354 AS besteht und zwei LIM Domänen zur Protein-Protein Interaktion (AS 16-70 und AS78-132) und eine Homeobox-Domäne zur DNA-Bindung (AS 181-243) besitzt. AS = Aminosäuren

Tabelle 1: Sequenzvergleich der Isl-1 Proteine verschiedener Spezies. Die Isl-1 Proteine der Vertebraten-spezies sind hoch konserviert. Alle Angaben in %.

Spezies	Gesamtprotein	LIM 1	LIM 2	Homeobox
Xenopus laevis	100	100	100	100
Xenopus tropicalis	98	98	100	100
Danio rerio	96	98	100	95
Gallus gallus	96	96	96	96
Mus musculus	97	96	98	95
Homo sapiens	97	98	98	96
Drosophila melanogaster	55	89	69	88

5.3 Das zeitliche Expressionsmuster von Xisl-1 während der Entwicklung von Xenopus laevis

Die Transkriptmenge der *Xisl-1* mRNA in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *Xenopus laevis* wurde mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt (Abb. 8). Hierzu wurde RNA aus ganzen Embryonen der angegebenen Stadien isoliert und für die cDNA Synthese verwendet. Anschließend wurde mit spezifischen Primern die Präsenz von *Xisl-1* Transkripten untersucht. Als Ladekontrolle wurde mit spezifischen Primern ein Fragment des ubiquitär exprimierten Gens *Histon 4* (H4) amplifiziert. Die Untersuchung zeigt, dass *Xisl-1* Transkripte bereits maternal in der befruchteten Oozyte (Einzellstadium) nachweisbar sind. Bis zum späten Gastrulationsstadium (St.12,5) ist keine Veränderung der Transkriptmenge erkennbar. Ab St.12,5 ist aber eine deutliche Zunahme der *Xisl-1* mRNA Menge nachweisbar. Eine weitere Zunahme der Transkriptmenge kann in keinem der analysierten Stadien beobachtet werden.

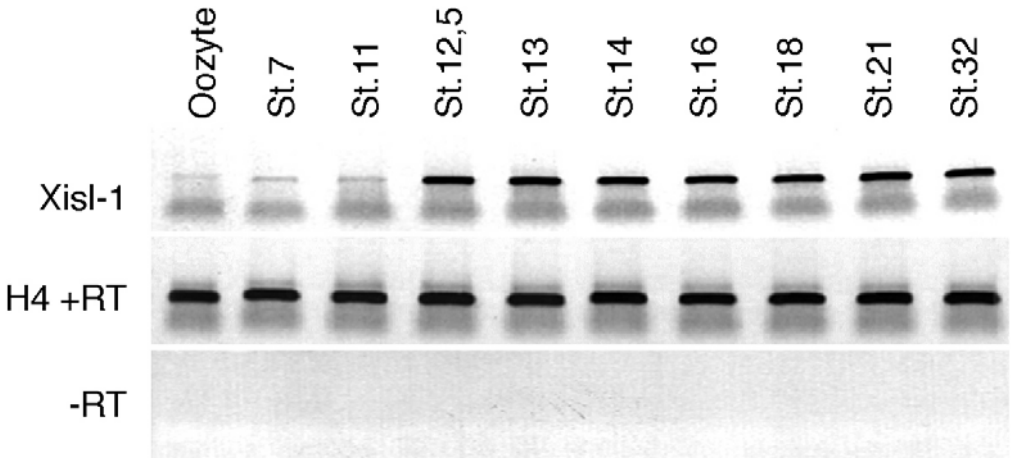


Abb. 8: Das zeitliche Expressionsmuster von *Xisl-1*. Es wurden unterschiedliche Entwicklungsstadien von der befruchteten Oozyte (Einzellstadium) bis zum St.32 mittels semiquantitative RT-PCR untersucht. Als Ladekontrolle diente eine semiquantitative RT-PCR von *Histon 4* (H4). Als negativ Kontrolle wurde ein RT-PCR Ansatz mit cDNA aus einem Synthesansatz ohne Reverse Transkriptase (-RT) verwendet. Maternale *Xisl-1* mRNA kann vor dem Beginn der zygotischen Expression detektiert werden (Einzellstadium und St.7). Im St.12,5 kann eine deutliche Zunahme der Transkriptmenge beobachtet werden. Während der weiteren untersuchten Entwicklungsstadien erhöht sich die Transkriptmenge der *Xisl-1* mRNA nicht mehr.

5.4. Das räumliche Expressionsmuster von Xislet-1 während der frühen Embryonalentwicklung

Das räumliche Expressionsmuster von *Xisl-1* wurde mittels Ganzkeimfärbung (whole mount *in situ* Hybridisierung, WMISH) vom Ende der Gastrulation (St.13) bis zu frühen Kaulquappenstadien (St.45) untersucht. Der Beginn der Analyse im St.13 basiert darauf, dass die WMISH weniger sensitiv als die semiquantitative RT-PCR ist und die geringe Transkriptmenge vor St.12/13 mit dieser Methode nicht detektiert werden kann. Es zeigte sich, dass Xisl-1 während der Entwicklung ein äußerst dynamisches Expressionsmuster aufweist. Zunächst soll die Expression des Transkriptionsfaktors in der Herzregion beschrieben werden (Abb. 9). Anschließend wird auf Expressionsdomänen in neuralen Strukturen näher eingegangen (Abb. 10).

5.4.1 Die kardiale Expression von *Xisl-1*

Im St.13 und St.14 ist *Xisl-1* mRNA anterior in der ventralen Region des *Xenopus* Embryos exprimiert. Die Expressionsdomäne schließt die zukünftige Haftdrüse sowie das primäre Herzfeld mit ein (Abb. 9A und B). Ein Hinweis auf die Expression von *Xisl-1* Transkripten in kardialen Vorläuferzellen kann aus dem Vergleich der Expressionsdomänen von *Xisl-1* (Abb. 9C) und *Nkx2.5* (Abb. 9D) geschlossen werden. *Nkx2.5* ist in verschiedenen Modellorganismen als Markergen für spezifizierte Herzvorläuferzellen beschrieben worden (Tonissen et al., 1994; Lyons et al., 1995; Schultheiss et al., 1995; Chen und Fishman, 1996). Ein parasagittaler Schnitt eines St.15 *Xenopus* Embryos zeigt, dass tatsächlich mesodermale Zellpopulationen *Xisl-1* mRNA exprimieren. Diese anterior mesodermale Expressionsdomäne entspricht der Region im Embryo, in der kardiale Progenietoren und Angioblasten spezifiziert werden. Die endothelialen Vorläuferzellen bilden später u.a. das Vitellinvenen Netzwerk (Walmsley et al., 2002). Außerdem konnte eine Expression des Transkriptionsfaktors im Endoderm und im Neuroektoderm visualisiert werden (Abb. 9E) (Hausen and Riebesell, 1991). Nach der Neurulation (St.19) können im Stomodeum *Xisl-1* Transkripte detektiert werden. Interessanterweise kann in der Haftdrüsenanlage zu Beginn der terminalen Differenzierung dieses Organs kein Xisl-1 mehr nachgewiesen werden (Abb. 9F) (Wardle and Sive, 2003) (Abb. 9F). Im primären Herzfeld können *Xisl-1* Transkripte weiterhin nachgewiesen werden, was durch eine Doppel whole mount *in situ* Hybridisierung (DWMISH) für *Xisl-1* (türkis) und *Nkx2.5* (dunkelblau) verdeutlicht wird (Abb. 9F, G). Im

frühen Schwanzknospenstadium (St.25, Abb. 9H) ist die *Xisl-1* Expression ventral und unmittelbar posterior der Haftdrüse detektierbar. Diese Region entspricht dem kardialen Mesoderm sowie dem anterioren Endoderm. *Xisl-1* mRNA konnte außerdem in kleinen Zellgruppen im anterioren, ventro-lateralen Bereich des Embryos nachgewiesen werden. Diese stellen möglicherweise Vorläuferzellen des Gefäßsystems dar (Abb. 9H). Für *dHand (Hand2)*, das vaskuläre Vorläuferzellen markiert, wurde ein sehr ähnliches Expressionsmuster beschrieben (Smith et al., 2000). *Xisl-1* ist im St.28-34 in den Aortenbögen und im anterioren Mesoderm exprimiert (Abb. 9I - N). Im St.28 konnte die mesodermale Expression durch eine Färbung für *Xisl-1* (türkis) und *Nkx2.5* (dunkelblau) Transkripte anterior des kardialen Mesoderms nachgewiesen werden. Beide Transkriptionsfaktoren scheinen im anterioren Teil der *Nkx2.5* Expressionsdomäne zu überlappen (Abb. 9J). Dies konnte mittels transversaler und parasagittaler Schnitte von *Xenopus* Embryonen, in denen sowohl *Xisl-1* Transkripte (dunkelblau) als auch *Nkx2.5* Transkripte (rot) durch eine DWMISH markiert wurden, visualisiert werden. (Abb. 9Q-T). *Xisl-1* mRNA ist im anterioren Mesoderm in zwei punktförmigen Expressionsdomänen sichtbar (Abb. 9Q). Die Expressionsdomäne dehnt sich, weiter caudal, auf den ventralsten Teil des anterioren Mesoderms aus und erscheint sichelförmig (Abb. 9R). Im anterioren Abschnitt des *Nkx2.5* positiven, kardialen Mesoderms werden beide Transkriptionsfaktoren koexprimiert (Abb. 9S). Weiter posterior kann *Xisl-1* mRNA nur noch in zwei punktförmigen, dorso-lateralen Domänen nachgewiesen werden (Abb. 9T). Die anterior-posterior veränderte Ausdehnung der *Xisl-1* Expressionsdomäne kann auch im St.30 nachvollzogen werden (Abb. 9L, O). Die beiden dorso-lateralen Expressionsdomänen von *Xisl-1* im entstehenden, linearen Herzschlauch stimmen mit den Anteilen der *Nkx2.5* Expressionsdomäne überein, welche das Perikarddach und das dorsale Mesokardium bilden (Raffin et al., 2000) (Abb. 9O). Die Zellen, die diese Strukturen bilden, exprimieren keine terminalen Differenzierungsmarker wie z.B. *TnIc*, und können somit als kardiale Vorläuferzellen betrachtet werden. Die Expression von *Xisl-1* in diesen Domänen kann auch im St.32 weiterhin detektiert werden (Abb. 9P). Es konnte in keinem der analysierten Entwicklungsstadien eine *Xisl-1* Expression im terminal differenzierten Myokardium nachgewiesen werden. Im Pharynxendoderm kann eine Färbung für *Xisl-1* Transkripte beobachtet werden (Abb. 9 L, O, P-T). Das Endokardium, das in das periphere Gefäßsystem übergeht, ist ebenfalls positiv für *Xisl-1* Transkripte (Abb. 3O-P). Neben diesem Teil des Gefäßsystems kann auch in weiteren Domänen des Organs, wie in den Aortenbögen, im *Sinus venosus* und im Seitenplattenmesoderm *Xisl-1* mRNA visualisiert werden (Abb. 9K, M, N) .

Die Analyse des räumlichen Expressionsmusters von *Xisl-1* zeigt, dass das Gen vom Ende der Gastrulation (St.13) bis in späte Schwanzknospenstadien (St. 36, nicht gezeigte Daten) im anterioren Mesoderm und Endoderm exprimiert ist. Spätere Entwicklungsstadien wurden dahingehend nicht weiter untersucht. Aus den genannten Expressionsdomänen entsteht u.a. das Herz-Kreislaufsystem von *Xenopus laevis*, was eine Rolle für *Xisl-1* bezüglich dessen Entwicklung nahe legt. Zudem wurde gezeigt, dass *Xisl-1* vorzugsweise in undifferenzierten Vorläuferzellen exprimiert ist.

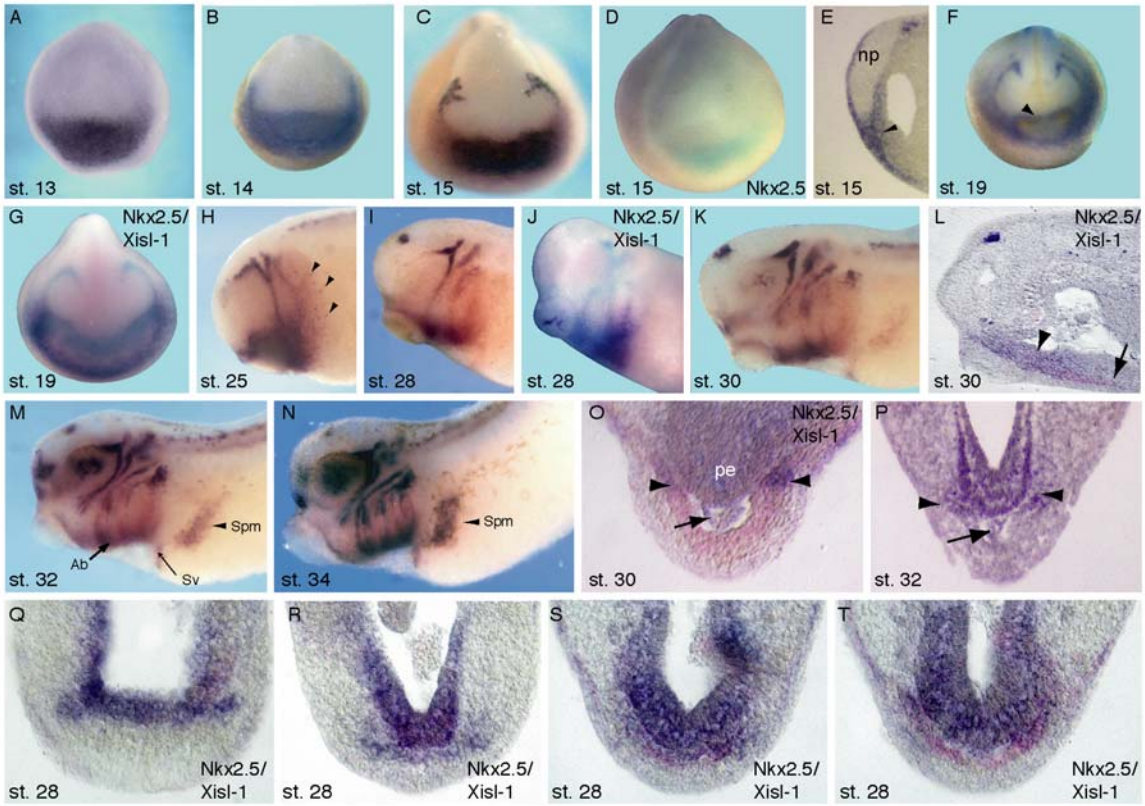


Abb. 9: Das räumliche Expressionsmuster von *Xisl-1*. *Xisl-1* kann in den angegebenen Stadien im kardialen Mesoderm detektiert werden (A-C, E-T; np = Neuralplatte; die Pfeilspitze in E markiert mesodermale Zellpopulationen; die Pfeilspitze in F markiert das Stomodeum; die Pfeilspitze in L markiert die anteriore Koexpression von *Xisl-1* und *Nkx2.5*; der Pfeil in L markiert die *Nkx2.5* Expression im posterioren kardialen Mesoderm; die Pfeilspitzen in O und P markieren dorso-laterale Expressionsdomänen von *Xisl-1* im primären Herzschlauch). Durch den Vergleich der *Xisl-1* Expressionsdomäne im St. 15 mit der des kardialen Spezifizierungsmarkers *Nkx2.5* konnten Hinweise auf eine Expression von *Xisl-1* in kardialen Vorläuferzellen erhalten werden (Vergleich C mit D). Durch eine DWMISH für diese beiden Transkriptionsfaktoren war es möglich die Koexpression im ganzen Embryo und in histologischen Schnitten zu visualisieren (G, J *Xisl-1*: türkis, *Nkx2.5*: dunkelblau; L, O, Q-T *Xisl-1:* dunkelblau, *Nkx2.5:* rot). Das anteriore Endoderm (Pharynxendoderm) konnte ebenfalls als Expressionsdomäne von *Xisl-1* bestimmt werden (O-T; pe = Pharynxendoderm). Außerdem konnten Strukturen des Gefäßsystems durch die *Xisl-1* antisense RNA markiert werden (H, die Pfeilspitzen markieren vaskuläre Vorläuferzellen; K, M-N Ab = Aortenbögen, Sv = *Sinus venosus*, Spm = Seitenplattenmesoderm; O, P der Pfeil markiert das Endokardium).

5.4.2 Neurale Expression von *Xisl-1*

Xisl-1 ist neben den bisher beschriebenen meso- und endodermalen Strukturen auch in neuroektodermalen Strukturen exprimiert. Im St. 14 kann *Xisl-1,* wie zuvor beschrieben, in der anterio-ventralen Region des Embryos visualisiert werden. Die Expression verläuft hier entlang der Grenze der Neuralplatte (Abb. 10A). In dieser Region werden die neuralen Plakoden induziert, aus denen die Ganglien der kranialen Nerven gebildet werden (Schlosser und Ahrens, 2004). Eine dorsale Ansicht desselben Embryos in Abb. 10B zeigt, dass die *Xisl-1* Expression in einem punktförmigen Muster auch in den Motorneuronen und den dorsalen Interneuronen 3 nachgewiesen werden kann (Wilson und Maden, 2005). Diese Neuronen exprimieren *Xisl-1* mindestens bis St. 30 (Abb. 10D-G). Außerdem sind *Xisl-1* Transkripte im Proktodeum detektierbar (Abb. 10B, E, F). Nach Abschluss der Neurulation im St.19 kann *Xisl-1* mRNA in der Plakode des *Nervus trigeminus* (Abb. 10C) gezeigt werden. In dieser Plakode bzw. in späteren Entwicklungsstadien, im Ganglion des *Nervus trigeminus*, ist bis St. 34 *Xisl-1* mRNA visualisierbar (Abb. 10E, H, I). Im St. 25 kann außerdem in den kranialen Nerven VII/VIII und dem *Ganglion profundum* die Expression von *Xisl-1* detektiert werden (Abb. 10E). *Xisl-1* mRNA wird in diesen neuralen Strukturen bis mindestens St. 34 transkribiert (Abb. 10H, I). Im St. 30 ist *Xisl-1* mRNA auch in der olfaktorischen Plakode nachweisbar (Abb. 10H). Zudem können *Xisl-1* Transkripte in der Epiphyse detektiert werden. Diese Expressionsdomäne ist bis mindestens St.34 (Abb. 10H, I) nachweisbar. In den St.30 und 34 (Abb. 10H, I) wird *Xisl-1* zusätzlich zu den zuvor beschriebenen Ganglien auch in den kranialen Nerven IX und X exprimiert. Außerdem kann in diesen Entwicklungsstadien eine Expression von *Xisl-1* mRNA im Auge beobachtet werden (Abb. 10H, I, J). Ein transversaler Schnitt durch das Auge im St.34 (Abb. 10J) zeigt, dass *Xisl-1* in der sogenannten inneren nukleären Schicht der Retina exprimiert ist. Im St.45 kann *Xisl-1* im Pankreas nachgewiesen werden (Abb. 10K).

Die neuroektodermale Expression von *Xisl-1* ist ebenfalls sehr dynamisch und komplex im Verlauf der Embryogenese des Krallenfroschs. In späten Schwanzknospenstadien wurde die Expression des Transkriptionsfaktors nicht untersucht. *Xisl-1* wurde bisher als Marker für verschiedene Ganglien, die Motorneuronen und den Pankreas in mehreren Spezies beschrieben (Pfaff et al., 1996; Korzh et al., 1993; Habener et al., 2005). Die Expression im Auge und im Proktodeum ist bisher in anderen Vertebraten Modellorganismen nicht beschrieben worden. Möglicherweise ist *Isl-1* in diesen Spezies nicht in diesen Strukturen exprimiert.

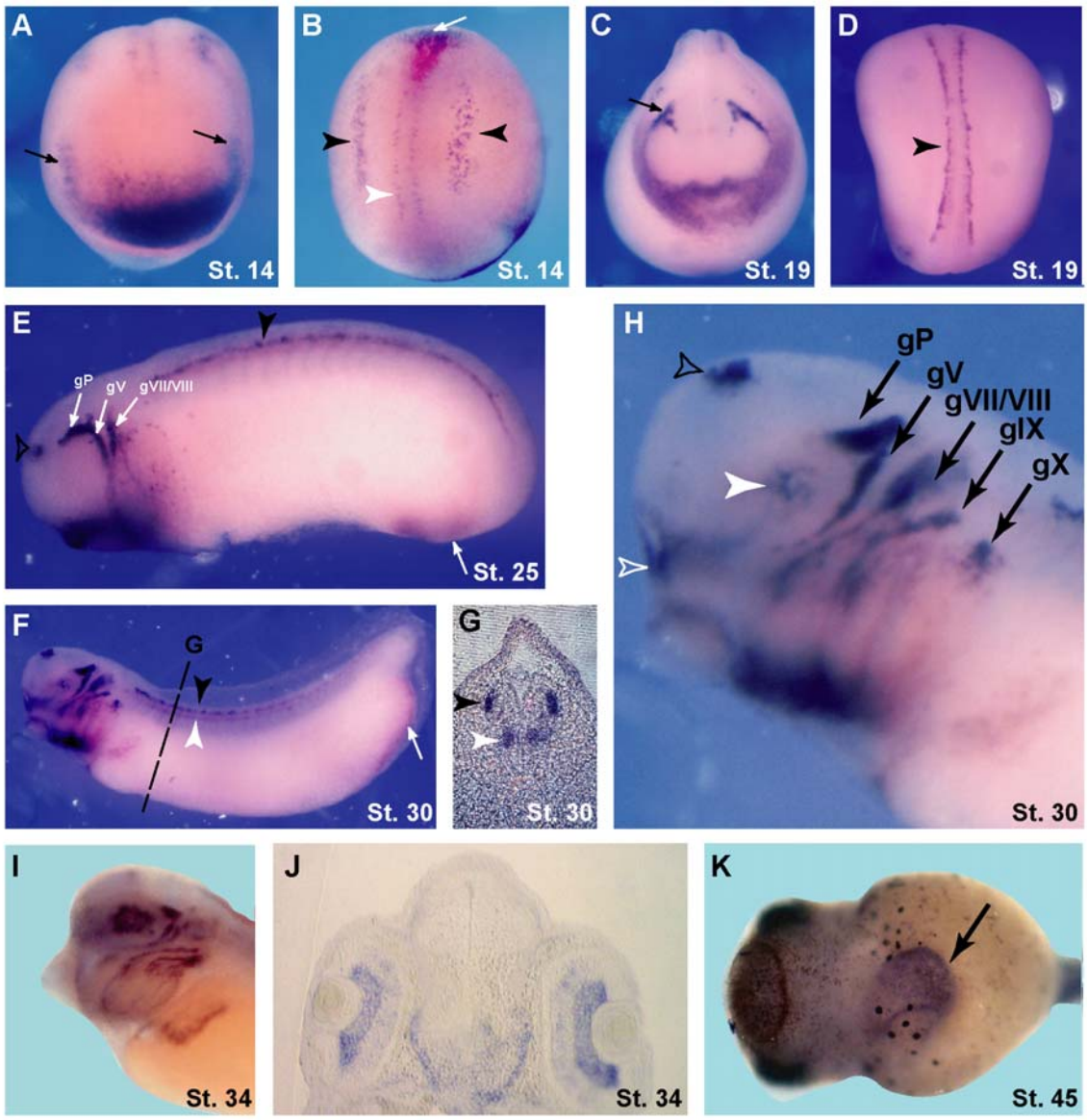


Abb. 10 Das räumlich Expressionsmuster von *Xisl-1* in neuralen Strukturen und im Pankreas. In den St.14-34 (A-J) wurde die Expression des Transkriptionsfaktors in neuroektodermalen Strukturen visualisiert. Die *Xisl-1* mRNA konnte an den Grenzen der Neuralplatte, der Region woraus die neuralen Plakoden entstehen, detektiert werden (A, Pfeile). Durch die WMISH konnte gezeigt werden, dass *Xisl-1* in verschiedenen Plakoden bzw., in späteren Entwicklungsstadien, in den entstehenden Ganglien transkribiert wird (C: Pfeil, Plakode des *Nervus trigeminus*; E: gP = *Ganglion profundum*, gV = Ganglion des *Nervus trigeminus*, gVII/VIII = Ganglien der kranialen Nerven VII/VIII; H: gP, gV, gVII/VIII gIX = Ganglion des kranialen Nervs IX, gX = Ganglion des kranialen Nervs X). Außerdem konnte in den Motorneuronen und in den dorsalen Interneuronen 3 *Xisl-1* mRNA in dorsalen und lateralen Ansichten ganzer Embryonen und in einem transversalen Schnitt markiert werden (B, D, E, F, G; weiße Pfeilspitze = Motorneuronen, schwarze Pfeilspitze = dorsale Interneuronen 3, F: die gestrichelte Linie gibt ungefähr die Schnittebene von G an). Zudem markieren *Xisl-1* Transkripte das Proktodeum (B, E, F weißer Pfeil). Im St.25-34 ist die *Xisl-1* mRNA in der Epiphyse visualisierbar (E, H, I, schwarze offene Pfeilspitze). Die olfaktorische Plakode exprimiert ebenfalls die mRNA des Transkriptionsfaktors (H weiße offene Pfeilspitze). Im St.30 und St.34 kann eine Expression von *Xisl-1* Transkripten im Auge beobachtet werden (H große weiße Pfeilspitze, I). Durch einen transversalen Schnitt konnte im St.34 die Expressionsdomäne von *Xisl-1* in der inneren nukleären Schicht der Retina beschrieben werden (J). Im St.45 sind Transkripte von *Xisl-1* im Pankreas nachweisbar (K, Pfeil).

5.5 Verlust der Xisl-1 Funktion führt zu morphologischen Veränderungen des Herzens

Um die Funktion von *Xisl-1* während der Herzentwicklung zu analysieren wurde eine „knock down“ Strategie mithilfe von antisense Morpholino Oligonukleotiden (Morpholinos, MO) gewählt. Ein Morpholino besteht aus ca. 20-25 Nukleotiden und bindet spezifisch an eine Zielsequenz innerhalb der mRNA, wodurch die Translation des Transkripts von Interesse sterisch unterbunden wird. Die Nukleotidsequenz des *Xisl-1* antisense Morpholino Oligonukleotids (islMO) umfasst einen Bereich des 5’ UTR, sowie einen Teil des offenen Leserahmens (Abb. 11).

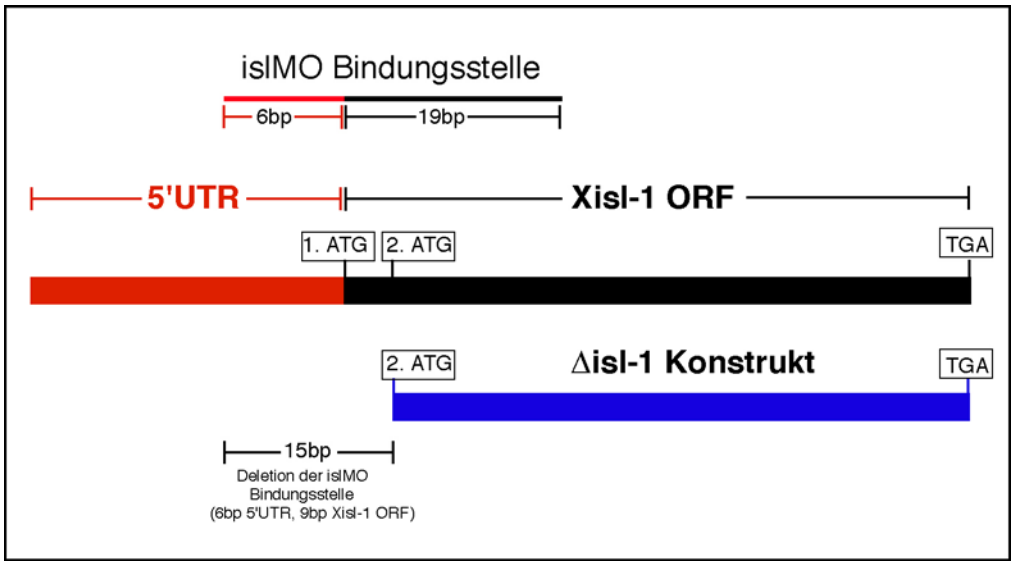


Abb. 11 Lokalisation der spezifischen islMO Bindungsstelle im *Xisl-1* cDNA Klon und Darstellung des *Δisl-1* Deletionskonstrukts. Der 5’UTR (rot) und der offene Leserahmen des *Xisl-1* cDNA Klons (Xisl-1 ORF, schwarz) sowie zwei Startcodons (1. und 2. ATG) und das Stopcodon (TGA) sind dargestellt. Zudem ist das *Δisl-1* Konstrukts (blau) dargestellt. Zur Herstellung des *Δisl-1* Konstrukts wurden 15bp der islMO Bindungsstelle deletiert.

Um die Spezifität des Morpholinos zu überprüfen, wurde eine gekoppelte *in vitro* Transkriptions- und Translationsreaktion (TNT-Kit; Promega) mit Reticulozytenlysat aus Kaninchen durchgeführt (Abb. 12). Es ist deutlich zu sehen, dass das islMO die Translation der Wildtyp *Xisl-1* mRNA inhibiert. Die Zugabe eines Standardkontrollmorpholinos (CMO) (die Bindungssequenz ist spezifisch für das Transkript des humanen β-Globin Gens) verhindert die Translation des Wildtyp *Xisl-1* Konstrukts (WT isl-1), wie erwartet, nicht. Das *Δisl-1* Konstrukt wird trotz der Zugabe des islMO weiterhin translatiert. In der Nukleotidsequenz dieses Konstrukts wurden 15bp der Bindungssequenz des islMO deletiert.

Es wurden 6bp des 5'UTR und 9bp der codierenden Sequenz entfernt (Abb. 11). Dieses Konstrukt kann durch die Koinjektion mit dem islMO die inhibierte endogene *Xisl-1* Funktion wiederherstellen und somit die Spezifität des beobachteten Phänotyps bestätigen. Diese Analyse zeigt, dass das islMO spezifisch die Translation von *Xisl-1* inhibiert.

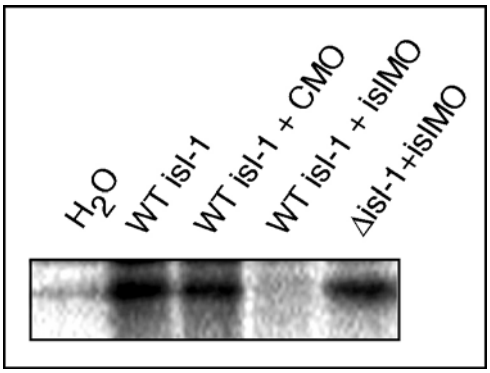


Abb. 12 Nachweis der Spezifität des islMO durch eine gekoppelte *in vitro* Transkriptions- und Translationsreaktion mit Reticulozytenlysat aus Kaninchen (TNT Kit, Promega). islMO inhibiert die Translation des Wildtyp isl-1 Konstrukts (WT isl-1). Die Zugabe eines Standardkontrollmorpholinos (CMO) führt nicht zur Inhibition der Translation des WT isl-1 Konstrukts. Die Translation des Δisl-1 Deletionskonstrukts wird nicht vom islMO inhibiert.

Zum Studium der *Xisl-1* Funktion während der Herzentwicklung wurden im 4-8 Zellstadium 10ng islMO bilateral in die dorsale Marginalzone injiziert. Die Embryonen wurden bis St.37/38 kultiviert und dann einer WMISH mit einer *TnIc* antisense RNA Sonde unterzogen (Abb. 13A). Es ist deutlich zu sehen, dass der „knock down" des *Xisl-1* Gens zu einer verminderten Expression des terminalen Differenzierungsmarkergens für Kardiomyozyten führt (Abb. 13A). In histologischen Vibratomschnitten konnte des Weiteren gezeigt werden, dass sich in nicht injizierten Wildtypkontrollen der lineare Herzschlauch bereits zu einem s-förmigen Herzschlauch umgebildet hat. Man spricht auch von der Bildung des *Cor sigmoideum* oder der Herzschleifenbildung. In islMO injizierten Embryonen kann ein massiver Verlust an kardialem Gewebe und eine inhibierte Herzschleifenbildung beobachtet werden (Abb. 13A).

Embryonen, die wie zuvor beschrieben mit islMO injiziert wurden und bis in späte Schwanzknospen-Stadien (St.40, Abb. 13B) bzw. frühe Kaulquappen Stadien (St. 43, Abb. 13B) kultiviert wurden, zeigen eine deutlich veränderte Morphologie des Herzens im Vergleich zu Wildtypembryonen (Abb. 13B und C). Dieser Phänotyp konnte in ungefähr 80% aller islMO injizierten Embryonen beobachtet werden (Abb. 13B, linkes Balkendiagramm). Ein häufig beobachteter Phänotyp ist durch einen deutlich vergrößerten Perikardbeutel und einen linearen, nicht s-förmig gewundenen Herzschlauch charakterisiert (Abb. 13B und C). In

den Embryonen, mit dem am stärksten ausgeprägten Phänotyp, ist das Herz auf ein kleines kontraktiles Gewebestück reduziert (Abb. 13B). In den unbehandelten Kontrollembryonen ist das Herz in den betrachteten Stadien (St.40 und 43) durch eine abgeschlossene s-förmige Drehung des linearen Herzschlauchs und den Beginn der Septierung der bereits gebildeten Herzkammern gekennzeichnet (Abb. 13C) (Warkman und Krieg, 2007). Eine detailliertere Analyse des Herzphänotyps im St. 43, in der die unterschiedlichen Ausprägungen des Phänotyps in vier Klassen unterteilt wurden, (Wildtyp, verkleinertes Herz, linearer Herzschlauch und kontraktiles Gewebestück) ergab, dass bei den nicht injizierten Wildtypembryonen bzw. bei den CMO injizierten Embryonen die Mehrzahl der analysierten Embryonen eine unveränderte Morphologie des Herzen aufweist (Abb. 13B WT, CMO). In den islMO injizierten Embryonen dagegen zeigen nur 15% der analysierten Embryonen eine normale Herzentwicklung. In 18,5% aller Fälle ist eine signifikante Verkleinerung des Herzens zu erkennen. 27,5% der Embryonen besitzen noch einen linearen Herzschlauch und 39% aller islMO injizierten Embryonen lassen lediglich noch ein kleines kontraktiles Gewebestück erkennen (Abb.13B islMO, rechtes Balkendiagramm). Zusätzlich zur veränderten Herzmorphologie ist auch die Entwicklung endodermalen Gewebes nach dem Verlust der *Xisl-1* Funktion massiv gestört (Abb. 13B).

Um die veränderte Herzmorphologie nach der islMO Injektion deutlicher darstellen zu können, wurden einzelne Herzen von islMO und CMO injizierten Embryonen präpariert (Abb. 13C). In den Embryonen, die mit CMO injiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die präparierten Organe vollständig ausgebildete Kompartimente aufweisen. Es kann ein Ventrikel, sowie die beiden Atrien und der *Truncus arteriosus* unterschieden werden. Nach der Injektion des islMO konnte zum einen ein stark verkleinertes, aber sonst morphologisch intaktes Herz präpariert werden. Zum anderen konnte ein linearer Herzschlauch, in dem eine gewisse Kompartimentierung noch zu erkennen war, isoliert werden. Ob in letzterem Fall die einzelnen Kompartimente auch typische terminale Differenzierungsmarker exprimieren oder ob dieser lineare Herzschlauch noch dem zuerst gebildeten primären Herzschlauch entspricht und somit neben der Bildung des *Cor sigmoideum* auch die Reifung der Herzkammern durch den Verlust der *Xisl-1* Funktion gestört ist, kann aufgrund fehlender kammerspezifischer Markergene nicht beantwortet werden.

Der signifikante Größenunterschied der Herzen von CMO injizierten Embryonen und Wildtypembryonen im Vergleich zu den verkleinerten Herzen der islMO injizierten Embryonen konnte durch das Ausmessen der präparierten Herzen mit einem Objektmikrometer verdeutlicht werden. Im Durchschnitt messen die Herzen der

Kontrollembryonen zwischen 536µm (WT) und 583µm (CMO), von den Atrien bis zum Apex des Ventrikels, die verkleinerten Herzen der islMO injizierten Embryonen dagegen nur 387,5µm (Abb. 13C). Der Größenunterschied zwischen den Herzen der Kontrollembryonen und den Herzen der islMO injizierten Embryonen ist statistisch signifikant (Students t-Test: $p < 0{,}0001$).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die *Xisl-1* Funktion für die normale Entwicklung des Herzens notwendig ist, und dass die morphologische Umbildung des Herzschlauchs während der Herzschleifenbildung durch die islMO Injektion empfindlich gestört wurde.

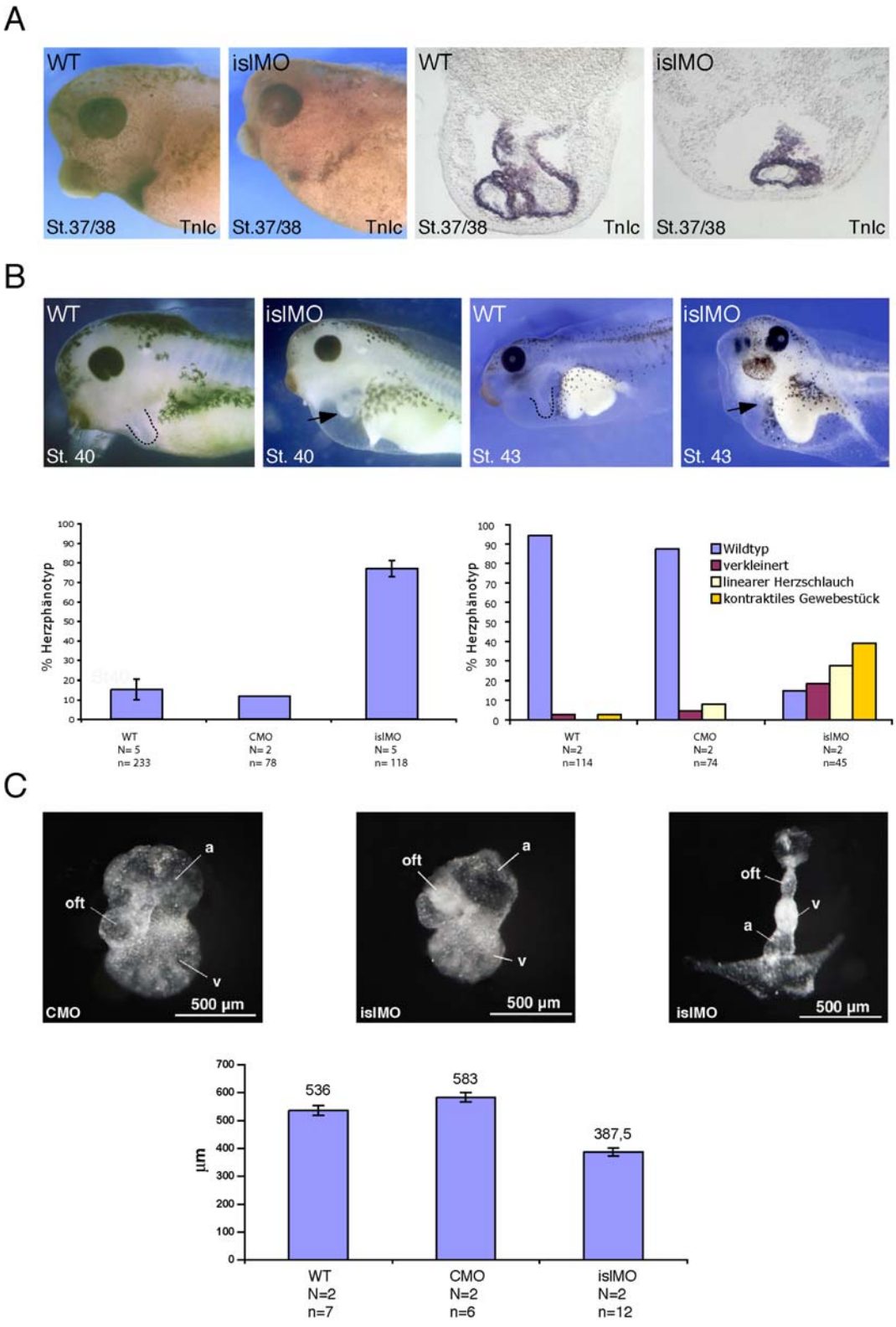


Abb. 13 Die Morphologie des Herzens ist gestört, wenn die *Xisl-1* Translation durch das islMO inhibiert wird. A) Eine Analyse der *TnIc* Expression in Embryonen im St.37/38 durch WMISH zeigt, das der Verlust der *Xisl-1* Funktion (islMO) die Expression der mRNA im Vergleich zu unbehandelten Wildtypembryonen (WT) deutlich beeinträchtigt. An transversalen Schnitten ist zu erkennen, dass es durch die islMO Injektion zu einem massiven Verlust an kardialem Gewebe kommt und dass die Herzschleifenbildung gestört ist. **B)** Bei den nicht injizierten Kontrollembryonen ist der Herzschlauch bereits s-förmig aufgefaltet und gewunden, die Kammerbildung hat begonnen (St. 40) bzw. ist abgeschlossen (St. 43) (WT, die gestrichelte Linie markiert das Herz). Durch die islMO Injektion wird die Herzschleifenbildung verhindert. Es kann ein vergrößerter

Perikardbeutel und ein linearer Herzschlauch beobachtet werden (St. 40, islMO, Pfeil). Bei den Embryonen, die den Phänotyp mit der stärksten Ausprägung zeigen, ist das Herz bis auf ein kleines kontraktiles Gewebestück reduziert (St. 43 islMO, Pfeil). Eine statistische Evaluation der Phänotypen im St. 40 und 43 (linkes Diagramm) bzw. eine Analyse der verschiedenen Ausprägungen des Phänotyp im St.43 (rechtes Diagramm) ist dargestellt. **C)** Einzelne Herzen von Embryonen, die mit Kontrollmorpholino (CMO) bzw. islMO injiziert (islMO) wurden, wurden präpariert, um die deutlichen morphologischen Veränderungen nach dem Verlust der *Xisl-1* Funktion besser dokumentieren zu können. Das Herz eines Embryos, der mit CMO injizierten wurde, weist eine abgeschlossen Kammerbildung auf, es können die einzelnen Kompartimente (die Atrien (a), der Ventrikel (v) und der *Truncus arteriosus* (oft) unterschieden werden. In der milderen Ausprägung des Phänotyps führt das islMO nur zu einer deutlichen Verkleinerung des Herzens (islMO, linkes Bild). Der Verlust der *Xisl-1* Funktion kann aber auch zu einem linearen Herzschlauch führen, in dem allerdings die einzelnen Kompartimente (wie oben beschrieben) noch unterschieden werden können. Durch Ausmessen mit einem Objektmikrometer konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Herzen der Embryonen, die mit islMO injiziert wurden deutlich kleiner sind als diejenigen der Kontrollembryonen (WT und CMO). Eine statistische Evaluation der mittleren Größe eines Herzens in Kontrollembryonen bzw. nach islMO Injektion ist in dem Diagramm dargestellt. Für alle Diagramme gilt: N= Anzahl an unabhängigen Experimenten; n= gesamte Anzahl an Embryonen. Der Standardfehler der jeweiligen Experimente ist, wenn möglich, angegeben.

5.6 Xisl-1 wird für die Expression kardialer Markergene benötigt

Die gestörte Herzentwicklung, die durch den Verlust der Xisl-1 Funktion hervorgerufen wird, kann verschiedene Ursachen haben. Der massive Verlust an kardialem Gewebe, der sich in einem verkleinerten Herzen bzw. einem kleinen kontraktilen Gewebestück manifestiert, kann z.B. durch eine verminderte Anzahl an spezifizierten Herzvorläuferzellen erklärt werden. Es ist daher von Interesse den Einfluss der Inhibition der *Xisl-1* Funktion auf die Transkriptmenge verschiedener Markergene zu untersuchen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die mRNA Menge der untersuchten Faktoren mittels WMISH und semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Für die WMISH wurden *Xenopus* Embryonen im 8-Zellstadium unilateral in die dorsale Marginalzone injiziert. Die nicht injizierte Körperhälfte diente hierbei als interne Kontrolle. Die Embryonen wurden bis zum St.28 kultiviert. In diesem Stadium sind wieder für kurze Zeit zwei getrennte Herzfelder zu beobachten (Mohun et al., 2003). Es wurden Embryonen mit islMO, CMO und islMO+*Δisl-1* mRNA injiziert. Zusätzlich wurden unbehandelte Kontrollembryonen für die WMISH verwendet, um einen möglichen Effekt der mechanischen Verletzung durch die Injektion auszuschließen. Es wurde die Expression des frühen kardialen Spezifizierungsmarkergens *Tbx20* sowie der terminalen Spezifizierungsmarkergene *cardiac-α-Actin* (*cA*) und *Troponin Ic* (*TnIc*) über die WMISH untersucht.

Die einseitige Injektion des islMO führt bei 15% aller Embryonen zum Verlust der *Tbx20* Expression in der injizierten Körperhälfte (Abb. 14, *Tbx20*). In 57% aller untersuchten Embryonen kann im Vergleich zur uninjizierten Körperhälfte eine reduzierte Expression beobachtet werden. In 28% aller Embryonen ist keine Veränderung der *Tbx20* mRNA Menge

nachweisbar. Unbehandelte Kontrollembryonen, sowie Embryonen die mit CMO injiziert wurden zeigen zu 92% bzw. 91% eine normale *Tbx20* Expression. Durch die Koinjektion der *Δisl-1* mRNA kann der Effekt des islMO nahezu aufgehoben werden. In 5% aller Embryonen kann keine und in 26% nur eine reduzierte Expression des Markergens detektiert werden. Der Phänotyp mit der stärksten Ausprägung wird am deutlichsten reduziert. Insgesamt wird der Prozentsatz der betroffene Embryonen um mehr als die Hälfte verringert, was eindeutig für einen spezifischen Effekt des islMO spricht (Abb. 14, Tbx20).

Die Analyse terminaler Differenzierungsmarkergene für Kardiomyozyten *cA* und *TnIc* ergab eine negative Regulation der Expression dieser Gene nach dem Verlust der *Xisl-1* Funktion (Abb. 14 *cA* und *TnIc*). Die *cA* Expression kann nach der islMO Injektion in 24% aller Embryonen nicht mehr detektiert werden, 37% zeigen eine einseitig reduzierte Transkriptmenge. Die Expression des Markergens in den Somiten ist durch die islMO Injektion nicht betroffen. In CMO injizierten und unbehandelten Kontrollen zeigen ca. 75% bzw. 78% der untersuchten Embryonen eine normale *cA* Expression. Durch die Koinjektion der *Δisl-1* mRNA können die beobachteten Phänotypen reduziert werden. Auch in diesem Fall wird der stärkste Phänotyp am deutlichsten reduziert (von 24% (islMO) auf 10% bei Koinjektion von islMO und *Δisl-1* mRNA), der prozentuale Anteil der Embryonen die eine einseitig reduzierte Expression aufweisen sinkt in etwa auf die Werte der Kontrollembryonen (26% bei Koinjektion, 24% bei CMO Injektion, 19% in unbehandelten Kontrollen). Die Reduktion des Phänotyps mit der stärksten Ausprägung ist etwas stärker, was wie bei *Tbx20,* auf eine Verschiebung des starken zum milden Phänotyp schließen lässt. Diese Daten verdeutlichen, dass die Transkription des *cA* Gens durch *Xisl-1* spezifisch reguliert wird (Abb. 14 cA).

Aufgrund des Verlusts der Xisl-1 Funktion ist es bei 11% aller injizierten Embryonen nicht möglich, Transkripte von *TnIc* zu detektieren. Eine einseitig reduzierte Expression des Markergens ist in 57% der Embryonen nachweisbar. Kontrollembryonen zeigen zu 74% (CMO) bzw. 87% (WT) eine normale Expression des terminalen Differenzierungsmarkers. Durch die Koinjektion der *Δisl-1* mRNA kann der stärkste Phänotyp auf das Niveau der Kontrollembryonen (2%, keine *TnIc* Expression) abgesenkt werden. 41% der Embryonen zeigen noch eine reduzierte Transkriptmenge. Auch bei diesem kardialen Markergen kann die zuvor beschriebene Verschiebung des starken zum milderen Phänotyp beobachtet werden. Es kann also für einen weiteren terminalen Differenzierungsmarker eine spezifische Regulation durch *Xisl-1* gezeigt werden (Abb. 14 TnIc).

Die Analyse der kardialen Markergenexpression mittels der WMISH hat ergeben, dass Xisl-1 für die normale Expression des frühen Spezifizierungsmarkers *Tbx20*, sowie für die Markergene für terminal differenzierte Kardiomyozyten *cA* und *TnIc* notwendig ist. Durch die Koinjektion der *Δisl-1* mRNA konnte die Expression der Markergene teilweise wiederhergestellt werden, was auf einen spezifischen Effekt des islMO schließen lässt. Die *Tbx20* Expression wird am deutlichsten durch den Verlust der Xisl-1 Funktion reprimiert. Xisl-1 könnte also eine Rolle während der Spezifizierung der Herz Vorläuferzellpopulation im anterioren Mesoderm spielen. Der Verlust der *TnIc* und *cA* Expression wäre in diesem Fall möglicherweise die Folge einer reduzierten Anzahl kardialer Progenietoren. Es ist aufgrund dieser Ergebnisse von Interesse die Rolle von Xisl-1 in der Regulation weiterer kardialer Markergene zu untersuchen.

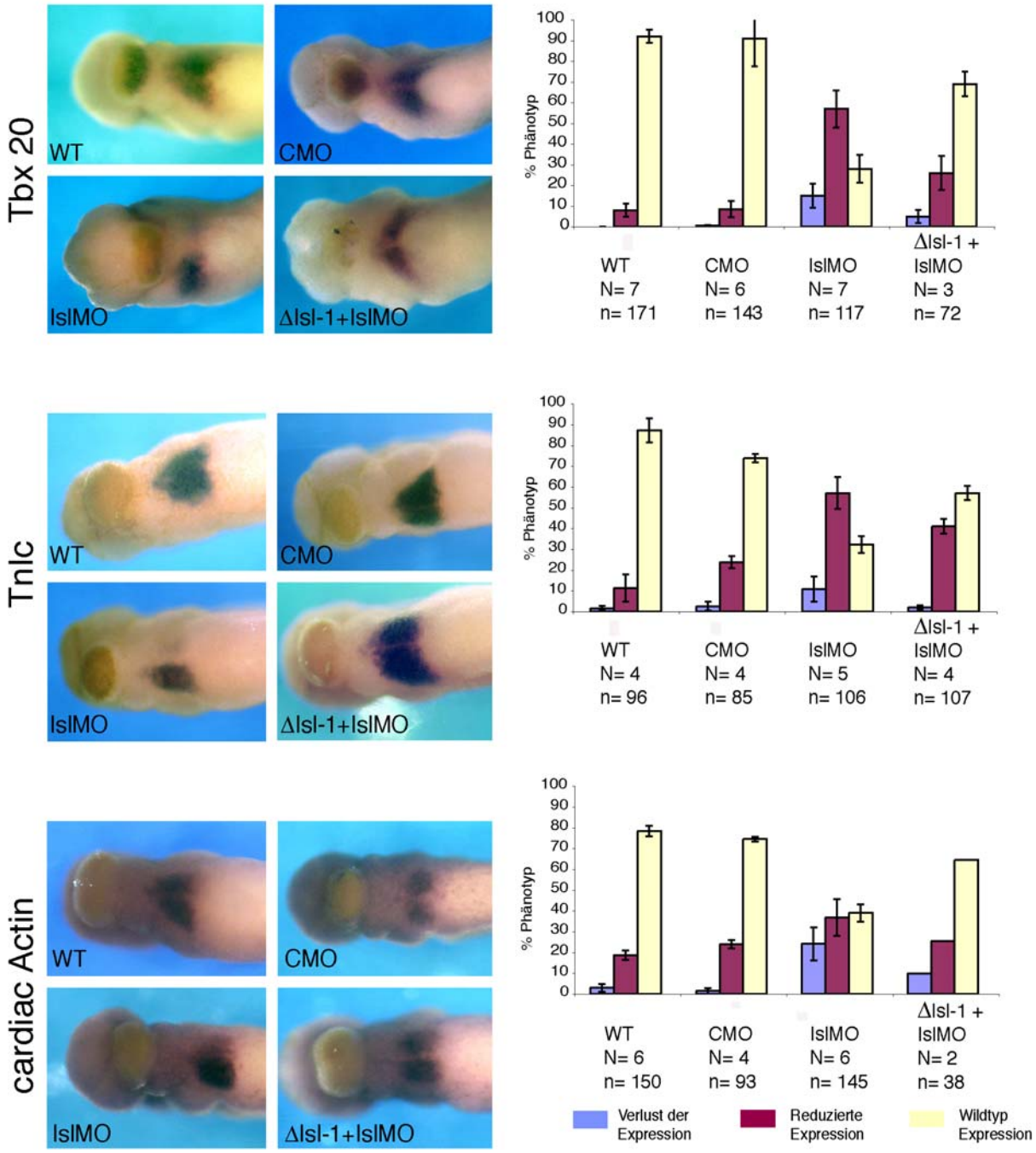


Abb. 14 *Xisl-1* ist für die Expression kardialer Markergene notwendig. Die Expression ausgewählter Marker wurde in einseitig injizierten Embryonen durch WMISH im St.28 untersucht. Es wurden Wildtypembryonen (WT), Kontrollmorpholino injizierte Embryonen (CMO), sowie islMO injizierte Embryonen (islMO) für die WMISH verwendet. Es kann bei allen betrachteten Markergenen eine deutliche Reduktion der Expression nach dem „knock down" der *Xisl-1* Funktion beobachtet werden. Um die Spezifität des beobachteten Effekts sicherzustellen, wurde islMO mit *Δisl-1* mRNA koinjiziert *(ΔIsl-1* + islMO). Dies führt zu einer teilweisen Wiederherstellung der Markergen Expression. Es sind jeweils ventrale Ansichten der anterioren Region einzelner repräsentativer Embryonen gezeigt. Bei den islMO injizierten Embryonen wurden solche ausgewählt, bei denen ein Verlust der Markergenexpression zu verzeichnen war. Statistische Analysen der Experimente können aus den Balkendiagrammen entnommen werden. Die Anzahl unabhängiger Experimente (N) und die Anzahl aller untersuchten Embryonen (n) sind angegeben. Zudem wurde der Standardfehler berechnet und im Diagramm dargestellt. Details siehe Text.

Die Expression von Herzmarkergenen und Faktoren, die bei der Herzentwicklung eine wichtige Rolle spielen, wurden durch die semiquantitative RT-PCR an dorsalen Marginalzonen (DMZ) Explantaten untersucht. Für die semiquantitative RT-PCR-Analyse wurden zunächst im 4-Zellstadium 10ng islMO bzw. CMO bilateral in die dorsale Marginalzone von *Xenopus* Embryonen injiziert. Im St.10 wurden DMZ Explantate präpariert (s. Material und Methoden) und bis St.13/14 bzw. St.30 kultiviert. Es folgte eine RNA Isolation und eine anschließende cDNA-Synthese. Diese cDNA diente als Ausgangsmaterial für die semiquantitative RT-PCR Analyse. Als Ladekontrolle wurde, wie zuvor, *Histon 4* (*H4*) gewählt.

Zunächst sollte untersucht werden, wie sich der Verlust der *Xisl-1* Funktion auf die Expression von Markergenen für spezifizierte kardiale Vorläuferzellen auswirkt. Es wurde die Transkriptmenge von *Tbx20, Nkx2.5, GATA-4* und *–6* und *eHAND (Hand1)* analysiert. Die Expression dieser Gene ist in islMO injizierten DMZ Explantaten deutlich reduziert oder nicht mehr detektierbar. Diese Daten heben erneut die wichtige Rolle von *Xisl-1* für die Spezifizierung kardialer Vorläuferzellen hervor (Abb. 15 und Tabelle 2). Die Ergebnisse der WMISH für *Tbx20* und für den terminalen Differenzierungsmarker *cA* konnten auch durch die RT-PCR bestätigt werden. Die Expression von *eHAND (Hand1),* ein Markergen für das kardiovaskuläre System in *Xenopus* Embryonen, wurde ebenfalls deutlich reduziert (Abb. 15 und Tabelle 2).

Zusätzlich wurden wichtige Wachstumsfaktoren, die für die normale Herzentwicklung in *Xenopus laevis* notwendig sind, untersucht. Der Wachstumsfaktor *BMP-4* ist für die Aufrechterhaltung der Expression von *Nkx2.5* und *GATA-4* von Bedeutung. Außerdem ist *BMP-4* essentiell für die terminale Differenzierung dieser Herzvorläuferzellen. Wenn *BMP-4* inhibiert wird, werden aufgrund dessen auch weniger Kardiomyozyten gebildet. Terminale Differenzierungsmarker wie *TnIc* und *Mlc* werden durch *BMP-4* also indirekt reguliert (Shi et al., 2000; Walters et al. 2001). Der Wachstumsfaktor ist auch für die Herzschleifenbildung und die Rechts-Links-Asymmetrie des Organs notwendig (Breckenridge et al.; 2001). Nach der *Xisl-1* Inhibition ist die Menge der *BMP-4* mRNA deutlich reduziert im Vergleich zu WT und CMO injizierten DMZ Explantaten (Abb. 15 und Tabelle 2).

Der Wachstumsfaktor *Wnt-11,* der für die Spezifizierung von kardialen Vorläuferzellen notwendig ist, wird durch den Verlust der *Xisl-1* Funktion nicht reguliert.

Um auszuschließen, dass sich der beobachtete Herzphänotyp nach *Xisl-1* Inhibition aufgrund einer gestörten Induktion des Mesoderms bzw. des Endoderms manifestiert, wurde die Expression wichtiger Markergene dieser Keimblätter durch die semiquantitative RT-PCR

untersucht. Die Anzahl der Transkripte des panmesodermalen Markergens *Xbra* wird durch islMO Injektion nicht verändert. Dies zeigt, dass die Mesoderminduktion durch den „knock down“ von *Xisl-1* nicht betroffen ist. Dies gilt auch für die Induktion des Endoderms, was durch eine unveränderte Expression der endodermalen Markergene *Sox17β* und *Xhex* in WT, sowie CMO und islMO injizierten Explantaten gezeigt werden konnte (Abb. 15 und Tabelle 2).

Die Ergebnisse der Markergenanalyse in islMO injizierten Embryonen und DMZ Explantaten zeigen eindeutig, das *Xisl-1* ein notwendiger Faktor des komplexen regulatorischen Netzwerks ist, das für die normale Herzentwicklung von *Xenopus laevis* benötigt wird. Die *Xisl-1* Funktion ist für die Expression zahlreicher Markergene spezifizierter kardialer Vorläuferzellen unabdingbar und reguliert mit *BMP-4* mindestens einen für die Kardiogenese wichtigen Wachstumsfaktor. Der Verlust des Xisl-1 Proteins führt außerdem zu einer verminderten Expression der mRNA von terminalen Differenzierungsmarkern der Kardiomyozyten. Ob die verminderte Transkription der untersuchten Markergene aufgrund einer direkten Kontrolle der jeweiligen Promotoren oder aber auf indirekte Effekte zurückgeht, kann noch nicht abschließend beantwortet werden.

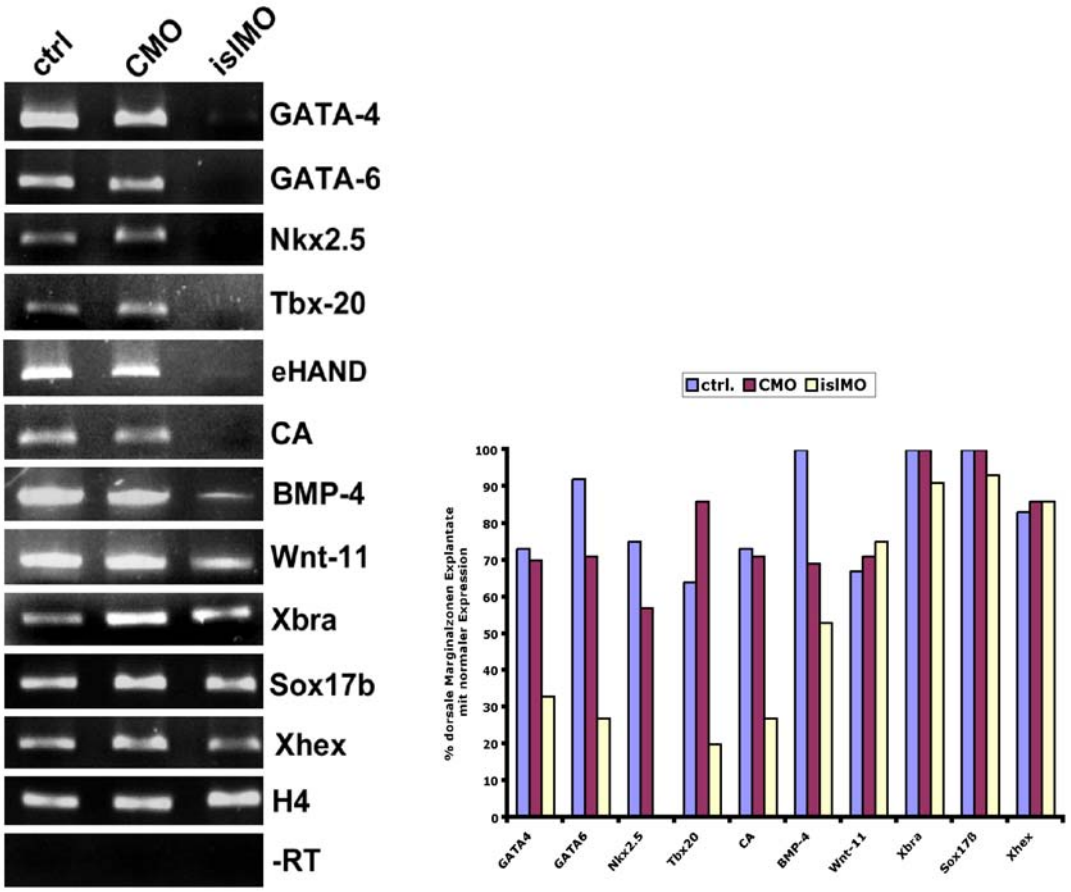


Abb. 15 Semiquantitative RT-PCR Analyse der Expression von Herzmarkergenen in DMZ Explantaten. Die Markergene für spezifizierte Herzvorläuferzellen, *GATA-4*, *-6*, *Nkx2.5* und *Tbx20* wurden in Kontrollexplantaten (ctrl), sowie Kontrollmorpholino injizierten Explantaten (CMO) und islMO injizierten Explantaten (islMO) untersucht. Aufgrund des Verlusts der *Xisl-1* Funktion werden diese Gene reduziert exprimiert. Zudem wird die mRNA Synthese des Transkriptionsfaktors *eHAND* durch islMO Injektion negativ reguliert. *cardiac-α-Actin* (*cA*), ein Markergen terminal differenzierter Kardiomyozyten ist, genauso wie der Wachstumsfaktor *BMP-4* durch die Inhibition der *Xisl-1* Translation deutlich in seiner Expression beeinträchtigt. Der Wachstumsfaktor *Wnt-11*, sowie das panmesodermale Markergen *Xbra* und die endodermalen Markergene *Sox17β* und *Xhex* zeigen aufgrund der islMO Injektion keine veränderte Expression im Vergleich zu Kontrollexplantaten (CMO und ctrl). *Histon 4* (*H4*) dient als Ladekontrolle. Die prozentuale Anzahl der DMZ Explantate die Wildtypexpression zeigen sind in einem Balkendiagramm dargestellt (s. auch Tabelle 2).

Tabelle 2: Semiquantitative RT-PCR Analyse der Expression kardialer Markergene in DMZ Explantaten. Für diese Analyse wurden als Kontrollen unbehandelte Wildtyp Explantate (WT) bzw. Kontrollmorpholino injizierte Explantate (CMO) verwendet und die erhaltene Transkriptmenge mit dem von islMO injizierten Explantaten (islMO) verglichen. Die Anzahl der unabhängigen Experimente (N), die Anzahl der einzelnen Explantate (n) und die prozentuale Anzahl der DMZ Explantate, die Wildtyp Expression (% Anzahl der DMZ Explantate mit WT-Expr.), sind in der Tabelle angegeben.

	WT			CMO			islMO		
Marker	N	n	% Anzahl der DMZ Explantate mit WT-Expr.	N	n	% Anzahl der DMZ Explantate mit WT-Expr.	N	n	% Anzahl der DMZ Explantate mit WT-Expr.
GATA-4	3	15	73	3	10	70	3	18	33
GATA-6	2	12	92	1	7	71	2	15	27
Nkx2.5	2	12	75	1	7	57	2	15	0
Tbx20	2	11	64	1	7	86	2	15	20
eHAND	5	20	100	4	16	54	1	3	29
cA	2	11	73	1	7	71	2	15	27
BMP-4	5	15	100	6	14	69	6	17	53
Wnt-11	1	6	67	1	7	71	1	8	75
Xbra	1	7	100	1	7	100	1	7	91
Sox17ß	2	12	100	1	7	100	2	15	93
Xhex	2	12	83	1	7	86	2	14	86

5.7 Untersuchung der Proliferationsrate in der Herzregion nach dem Verlust der Xisl-1 Funktion

Der morphologische Phänotyp der durch den *Xisl-1* „knock down“ hervorgerufen wird kann wie zuvor beschrieben durch den Verlust kardialer Vorläuferzellen entstehen. Es ist jedoch auch möglich, dass *Xisl-1* die Zellproliferationsrate im kardialen Mesoderm reguliert. Dadurch würde nach dem Verlust der *Xisl-1* Funktion die Anzahl proliferierender Zellen und damit die Gesamtzellzahl abnehmen, wodurch sich ebenfalls der morphologische Phänotyp erklären ließe. Die zuvor beschriebene Regulation der Expression kardialer Markergene wäre in diesem Fall möglicherweise nur ein sekundärer Effekt, der auf die verringerte Gesamtzellzahl in kardialen Gewebe zurückgeht. Der Verlust der Isl-1 Funktion in der Maus beeinflusst die Proliferationsrate in der Herzregion negativ (Cai et al., 2003). Es ist also eine interessante Frage, ob diese Funktion des Transkriptionsfaktors zwischen Amphibien und Säugern konserviert ist.

Um die Anzahl an proliferierenden Zellen in unbehandelten *Xenopus* Embryonen (WT) im Vergleich zu islMO injizierten Embryonen zu untersuchen, wurde eine „BrdU-Markierung“ durchgeführt. Mit diesem Test ist es möglich, mitotische Zellen darzustellen. Ein in die DNA inkorporiertes Thymidinanalogon (5-Bromo-2’-deoxy-Uridin (BrdU)) kann durch einen

spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (s. Material und Methoden). Von den zur BrdU-Markierung verwendeten Embryonen wurden mittels eines Vibratoms histologische Schnitte (10μm) angefertigt. Um die Proliferationsrate angeben zu können, muss auch die Gesamtzellzahl ermittelt werden. Hierzu wurde eine Färbung der histologischen Schnitte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) durchgeführt. Dieser Farbstoff bindet DNA und färbt somit die Zellkerne. Die Anzahl der gefärbten Zellkerne ergibt die Gesamtzellzahl eines Gewebes. Die BrdU und DAPI-positiven Zellen wurden in 3 aufeinanderfolgenden Schnitten eines Embryos in der posterioren Region des Herzens gezählt. Es ergibt sich je ein Mittelwert für die Gesamtzellzahl und die Anzahl an proliferierenden Zellen eines Embryos. Die Mittelwerte aller untersuchten Embryonen wurden dann nochmals gemittelt.

In nicht injizierten Kontrollembryonen wurden im Durchschnitt 31 proliferierende (BrdU-positive) Zellen gezählt (Abb. 16, WT oberstes Diagramm). In islMO injizierten Embryonen wurden im Durchschnitt nur 24 proliferierende Zellen detektiert. Dies ist ein statistisch signifikanter Unterschied (Students t-Test $p<0,05$) (Abb. 16, islMO, oberstes Diagramm).

Die durchschnittliche Gesamtzellzahl der Kontrollembryonen beträgt 66. Durch die islMO Injektion verringerte sich die durchschnittliche Zellzahl in der posterioren Region des linearen Herzschlauchs auf 48. Dieser Unterschied ist ebenfalls statistisch signifikant (Students t-Test $p<0,02$) (Abb. 16, mittleres Diagramm).

Die Gesamtzellzahl und die Anzahl an proliferierenden Zellen in der posterioren Region des primären Herzschlauchs ermöglicht es die Proliferationsrate zu bestimmen. Die Proliferationsrate errechnet sich als prozentualer Anteil der proliferierenden Zellen an der Gesamtzellzahl. Die Proliferationsrate der posterioren Herzregion in nicht injizierten *Xenopus* Embryonen beträgt 47% der Gesamtzellzahl. Durch den Verlust der *Xisl-1* Funktion wird sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl an proliferierenden Zellen statistisch signifikant erniedrigt. Die Proliferationsrate im posterioren linearen Herzschlauch beträgt nach islMO Injektion 52%. Der Unterschied zu den Kontrollembryonen ist nicht signifikant.

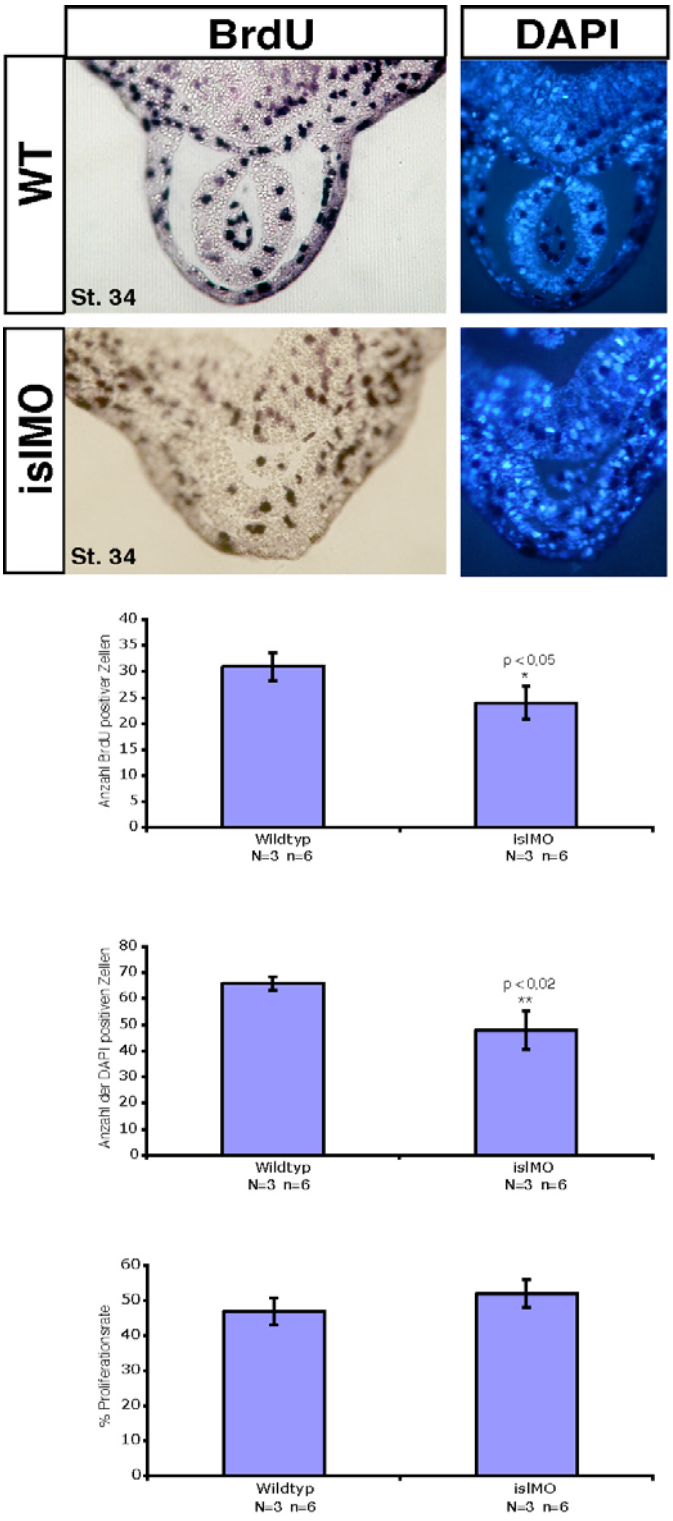


Abb. 16 Analyse der Proliferationsrate im posterioren Teil des Herzschlauchs von *Xenopus laevis*. Es wurde die Anzahl proliferierender Zellen (BrdU) im posterioren Herzschlauch unbehandelter Wildtypembryonen (WT) und in islMO injizierten Embryonen (islMO) bestimmt. Eine statistische Auswertung der Experimente ist in dem obersten Balkendiagramm dargestellt. Außerdem ist die Gesamtzellzahl (DAPI) bestimmt worden. Eine statistische Auswertung der Experimente ist im mittleren Balkendiagramm dargestellt. Die Proliferationsrate wurde in dem untersten Balkendiagramm dargestellt. Für alle Diagramme gilt: die Anzahl unabhängiger Experimente (N) sowie die Anzahl der einzelnen, analysierten Embryonen (n) sind angegeben. Außerdem wurde der Standardfehler berechnet und im Diagramm dargestellt. Die p-Werte des Students t-Tests sind in den Diagrammen angegeben.

5.8 Untersuchungen zur Überexpression von Xisl-1 mRNA

Die Funktionsverluststudien haben gezeigt, dass *Xisl-1* ein notwendiger Regulator der Herzentwicklung von *Xenopus laevis* ist. Es sollte nun durch die Überexpression von *Xisl-1* mRNA der Frage nachgegangen werden, ob Xisl-1 für die Induktion kardialer Markergene ausreichend ist. Dazu wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt.
Zunächst ist die Induktion kardialer Markergene in animalen Kappen untersucht worden (Abb. 17). Die animalen Kappen wurden mit Aktivin behandelt, um ein mesendodermales Zellschicksal zu induzieren. *Xisl-1* ist in allen drei Keimblättern exprimiert und benötigt möglicherweise einen mesodermalen Kontext um die Transkription entsprechender Markergene zu induzieren. Um dies zu überprüfen wurden auch unbehandelte animale Kappen zur Markergenanalyse mittels semiquantitativer RT-PCR herangezogen. In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde untersucht ob *Xisl-1* mRNA für die Induktion kontraktilen Gewebes in ventralen Marginalzonen (VMZ) Explantaten ausreichend ist (Abb. 18). Dies wurde für andere potente Regulatoren der Herzentwicklung (z.B. Dkk-1 und Wnt-11) in *Xenopus laevis* gezeigt (Schneider und Mercola, 2001; Pandur et al., 2002). Zusätzlich sollte die Überexpression in der dorsalen Marginalzone des Froschembryos klären, ob *Xisl-1* eventuell eine Expansion spezifizierter Progenietoren bewirkt und die terminale Differenzierung kardialer Vorläuferzellen inhibiert (Abb. 19).

5.8.1 Überexpression von *Xisl-1* in Aktivin behandelten animalen Kappen

Die Untersuchungen zur Induktion von kardiovaskulären Markergene durch *Xisl-1* mRNA wurden zunächst mittels animaler Kappen Explantate begonnen. Es wurde 1ng *Xisl-1* mRNA im 2-Zellstadium bilateral in den animalen Pol injiziert. Im St.9 wurden animale Kappen präpariert (s. Material und Methoden). Diese wurden anschließend zur Mesoderminduktion mit Aktivin behandelt und bis zum St.19 (4 Experimente) bzw. St.24 (2 Experimente), St.27 (1 Experimente) und St.30 (1 Experiment) kultiviert. Die verschiedenen späteren Stadien wurden gewählt, um auch Markergene die im St.19 noch nicht exprimiert sind, zu detektieren. Um zu zeigen, dass *Xisl-1* auf einen mesodermalen Kontext angewiesen ist, wurden auch unbehandelte animale Kappen auf die Expression der Markergene hin analysiert. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurden die kardiovaskulären Markergene *FoxP1, GATA-4, -6 Nkx2.5*, *TnIc, cA*, *Xfli* und *Hex* untersucht. *Histon 4 (H4)* diente als Ladekontrolle (Abb. 17).

Es konnte gezeigt werden, dass die Injektion von *Xisl-1* mRNA die Expression von *FoxP1* in der Aktivin behandelten animalen Kappe induziert (in sechs von acht unabhängigen Experimenten) (Abb. 17). Das *Xenopus* FoxP1 Protein weist eine hohe Homologie zum Ortholog der Maus auf (Pohl et al. 2005). Dieses Gen wurde in der Maus als Teil des komplexen Netzwerks beschrieben, welches für die Herzentwicklung notwendig ist (Wang et al. 2004). Neben anderen Funktionen ist FoxP1 notwendig für die Entwicklung des *Truncus arteriosus.*

Die mRNA Menge der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren *GATA-4* und *–5* ist ebenfalls nach der *Xisl-1* Überexpression erhöht. *GATA-4* ist in vier von fünf unabhänigen Experimenten induziert, *GATA-5* in drei von vier (Abb 17). Die GATA Faktoren wurden von Xisl-1 nur in einem mesodermalen Kontext induziert. Beide Gene sind als frühe Spezifizierungsmarker und wichtige Regulatoren der Herzentwicklung in Vertebraten beschrieben (Jiang et al. 1996, Jiang et al. 1999, Reiter et al., 1999)

Die Transkription von *Xfli*, ein Markergen für Endothelzellen, (Meyer et al., 1995), wurde ebenfalls durch die *Xisl-1* mRNA nach der Mesoderminduktion positiv reguliert (in fünf von sechs unabhängigen Experimenten) (Abb. 17)

Hex, ein Homeodomänen Transkriptionsfaktor und Markergen für anteriores Endoderm, ist notwendig für die Entwicklung des Herzkreislauf-System in *Xenopus laevis* (Newmann et al., 1997; Foley and Mercola 2005). *Hex* wurde in drei von fünf Experimenten induziert. Hierzu war die Mesoderminduktion in den animalen Kappen Explantaten durch eine Aktivin Behandlung nötig. (Abb. 17). Die Induktion von zwei Genen, die in der Gefäßentwicklung des Krallenfroschs eine Rolle spielen, deuten auf eine mögliche Funktion von Xisl-1 während dieses Prozesses hin.

Für *Nkx2.5, cA* und *TnIc* konnte keine Induktion der Expression im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden (nicht gezeigte Daten).

Die Überexpression von *Xisl-1* in animalen Kappen in denen durch die Behandlung mit Aktivin mesodermales Gewebe induziert wurde, führt zu einer Induktion von kardiovaskulären Markergenen. In animalen Kappen, die nicht mit Aktivin behandelt wurden, konnte keine Induktion der untersuchten Markergene beobachtet werden. Xisl-1 benötigt also einen mesodermalen Kontext, um diese Markergene zu induzieren.

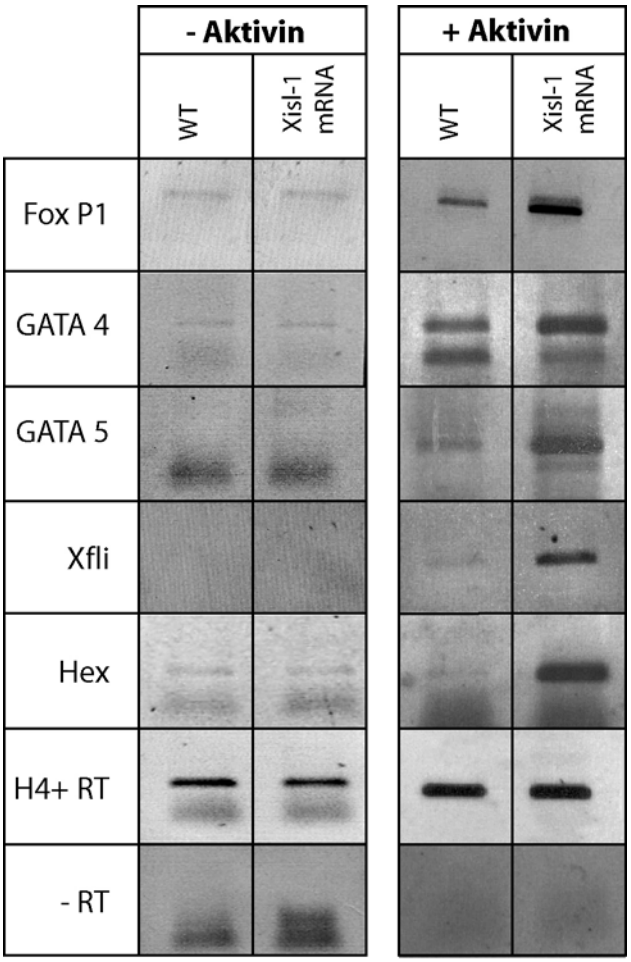


Abb. 17 Induktion kardiovaskulärer Markergene durch die Überexpression von *Xisl-1* mRNA in animalen Kappen. Die Wildtyp (WT) bzw. *Xisl-1* mRNA injizierten animalen Kappen wurden unbehandelt (-Aktivin) und zur Mesoderminduktion mit Aktivin behandelt (+Aktivin), einer Analyse der Markergenexpression mithilfe der semiquantitativen RT-PCR unterzogen. Es kann durch *Xisl-1* mRNA Injektion eine Induktion der angezeigten Markergene im mesodermalen Kontext, im Vergleich zu uninjizierten, Aktivin behandelten (WT + Aktivin) und zu den unbehandelten animalen Kappen (– Aktivin, WT und Xisl-1 mRNA) gezeigt werden. *Histon 4* (*H4*) dient als Ladekontrolle.

5.8.2 Xisl-1 mRNA ist nicht ausreichend für die Induktion kontraktilen Gewebes in VMZ Explantaten

Die Überexpression von *Xisl-1* mRNA in VMZ Explantaten sollte klären, ob der Transkriptionsfaktor in der Lage ist, ektopisch terminal differenzierte Kardiomyozyten zu induzieren. Dies kann anhand rhythmisch kontrahierender Areale in den Explantaten analysiert werden. Hierzu wurde zunächst 1ng *Xisl-1* mRNA oder 1ng *grün fluoreszierendes Protein* (*GFP)* mRNA im 4-Zellstadium bilateral in die ventrale Marginalzone injiziert. Im St. 10, wenn die Blastoporuslippe sichtbar ist, wurden die VMZ Explantate präpariert und bis ca.

St.45 kultiviert (s. Material und Methoden). Die Explantate wurden unter dem Binokular bezüglich eines kontraktilen Phänotyps ausgewertet. Konnte ein rhythmisch kontrahierendes Zellareal erkannt werden, wurde dies als Induktion eines kardialen Zellschicksals gewertet. Weder in den Wildtypkontrollexplantaten noch in den mit *GFP* mRNA bzw. *Xisl-1* mRNA injizierten Explantaten konnte ein kontraktiler Phänotyp nachgewiesen werden (Abb. 18). Außerdem wurde durch die semiquantitative RT-PCR überprüft, ob *Xisl-1* mRNA Markergene für kardiale Vorläuferzellen in VMZ Explantaten induzieren kann. Es konnte keine Induktion von *GATA-4* und *–6, Nkx2.5* oder *Tbx20* nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten). *Xisl-1* mRNA ist demnach nicht ausreichend um ektopisch ein kardiales Zellschicksal zu induzieren.

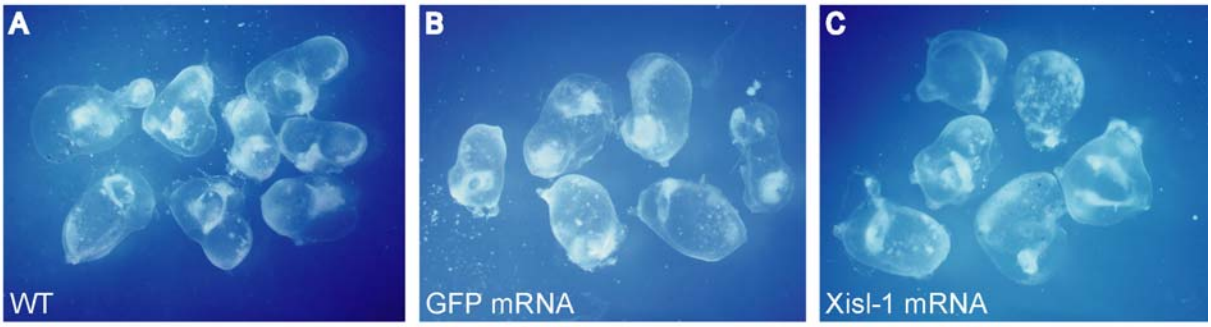


Abb. 18 Die ektopische Überexpression von *Xisl-1* mRNA in ventralen Marginalzonen Explantaten führt nicht zur Induktion von kontraktilem Gewebe. Es wurden unbehandelte VMZ Explantate (WT) (**A**) und *GFP* mRNA (**B**) bzw. *Xisl-1* mRNA (**C**) injiziert Explantate untersucht. Mehrere VMZ Explantate sind in der Abbildung dargestellt. Es konnte weder in den Kontrollexplantaten noch in den mit *Xisl-1* mRNA injizierten VMZ Explantaten kontraktiles Gewebe nachgewiesen werden.

5.8.3 Die Bildung des Herzschlauchs ist durch die *Xisl-1* Überexpression gestört

Die Daten der Überexpression von *Xisl-1* in animalen Kappen, zeigen dass Xisl-1 in einem mesodermalen Kontext kardiale Markergene induzieren kann. In Säugern wurde postuliert, dass Isl-1 notwendig ist für die Induktion von Herzvorläuferzellen, und die terminale Differenzierung zu Kardiomyozyten verhindert (Cai et al., 2003). Um zu überprüfen, ob Xisl-1 eventuell eine solche Funktion wahrnimmt, sollte nun untersucht werden ob die einseitige Überexpression von *Xisl-1* in der dorsalen Marginalzone zur Induktion des frühen Spezifizierungsmarkers *Nkx2.5* und zur Inhibition des terminalen Differenzierungsmarkergens *TnIc* ausreicht.

Es wurden Embryonen im 4-8-Zellstadium unilateral mit 1ng *Xisl-1* mRNA in die dorsale Marginalzone injiziert. Im St.30 und St.32 wurden die Embryonen fixiert und einer WMISH unterzogen. Es konnte tatsächlich in einem geringen Prozentsatz der analysierten Embryonen eine Reduktion der *TnIc* Transkripte auf der injizierten Seite beobachtet werden (Abb. 19, nicht gezeigte Daten). Eine Analyse der *Nkx2.5* Expression nach der Injektion von *Xisl-1* zeigte allerdings keine signifikante Induktion auf der injizierten Seite (nicht gezeigte Daten). Entgegen den Erwartungen kann in einem geringen Prozentsatz der Embryonen eine Reduktion der *Nkx2.5* Transkripte nach der Überexpression von *Xisl-1* mRNA beobachtet werden (nicht gezeigte Daten). Diese Reduktion an *Nkx2.5* positiven Zellen könnte auch die reduzierte Expression von *TnIc* erklären (Abb. 19, nicht gezeigte Daten).

Die Bildung des Herzschlauchs beginnt mit der Fusion der Herzfelder im St.30/31 und ist im St.32/33 abgeschlossen (Warkman und Krieg, 2007). Es kann ein weiterer unerwarteter Phänotyp nach einseitiger *Xisl-1* mRNA Injektion beobachtet werden. Die Fusion der Herzfelder und somit die Bildung des Herzschlauchs ist bei den *Xisl-1* mRNA injizierten Embryonen gestört, oder möglicherweise verlangsamt. Im St.30 ist in ca. 65% aller untersuchten Kontrollembryonen ein fusioniertes Herzfeld vorhanden, ca. 35% weisen noch zwei getrennte Herzfelder auf (Abb. 19). Bei den unilateral mit *Xisl-1* mRNA injizierten Embryonen zeigen allerdings nur 41% der Embryonen eine Fusion der Herzfelder, wohingegen 59% noch immer zwei deutlich getrennte *TnIc* Domänen aufweisen (Abb. 19). Im St.32 ist die Bildung des Herzschlauchs fast abgeschlossen. In fast 100% aller Kontrollembryonen kann dies durch die *TnIc* WMISH nachgewiesen werden. Bei den Embryonen, in denen *Xisl-1* mRNA überexprimiert wurde sind noch in 25% der untersuchten Embryonen separierte Herzfelder zu sehen (Abb. 19).

Die einseitige Überexpression von *Xisl-1* in der dorsalen Marginalzone führt in wenigen Fällen zu einer Reduktion der Expression von *TnIc* und *Nkx2.5*. *Xisl-1* mRNA scheint sowohl frühe kardiale Spezifizierungsmarker als auch terminale Differenzierungsmarker für Kardiomyozyten zu einem gewissen Grad negativ zu beeinflussen. Dieses Ergebnis impliziert eine dosisabhängige Regulation der Markergenexpression durch Xisl-1. Die Migration und Fusion der Herzfelder und die Bildung des linearen Herzschlauchs ist durch die Überexpression von *Xisl-1* gestört bzw. verzögert.

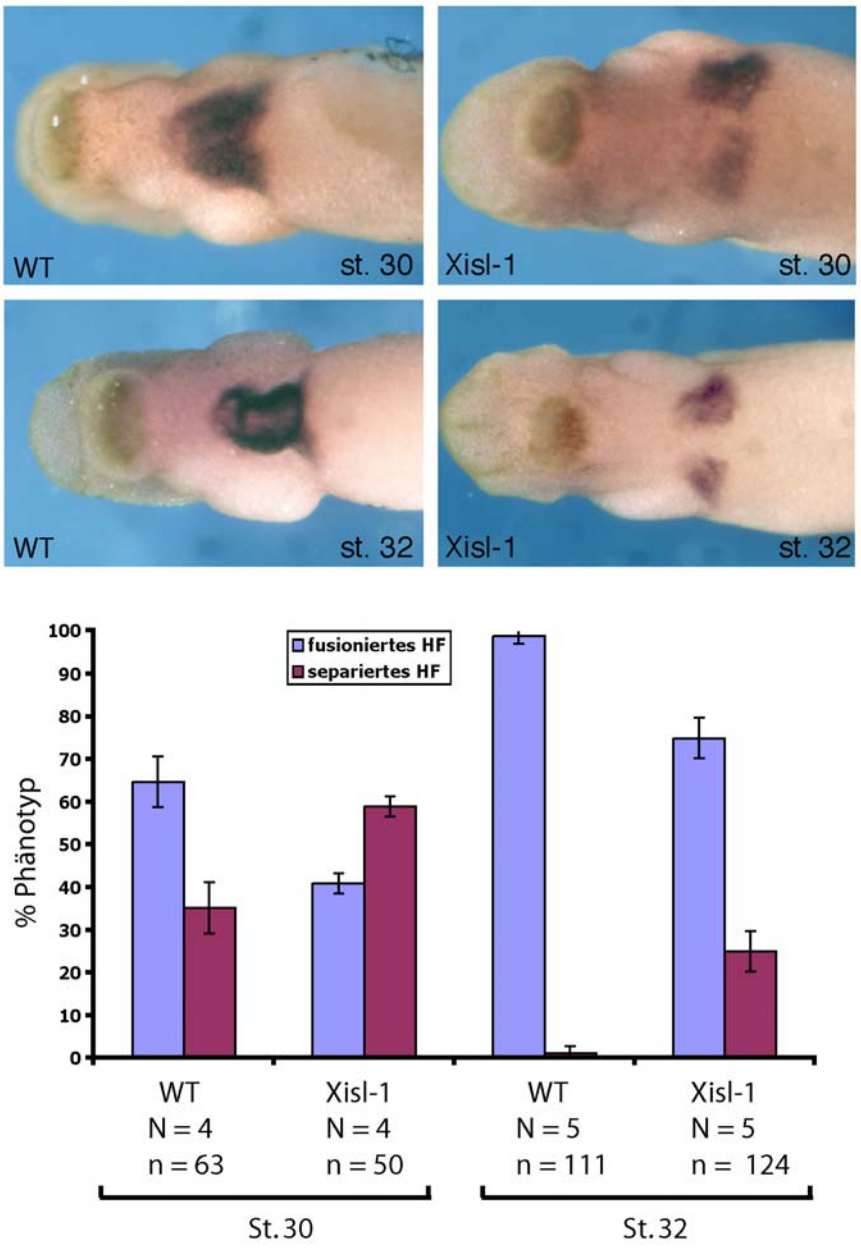


Abb. 19 Die unilaterale Überexpression von *Xisl-1* mRNA in der dorsalen Marginalzone führt zu einer gestörten Bildung des linearen Herzschlauchs. Durch eine WMISH wurde die Expression von *TnIc* in unbehandelten Kontrollembryonen (WT) und unilateral mit *Xisl-1* mRNA injizierten *Xenopus* Embryonen (Xisl-1) untersucht. Es werden ventrale Ansichten der anterioren Region repräsentativer Embryonen gezeigt. Es wurden zwei verschiedene Entwicklungsstadien analysiert (St.30 und St.32). Die Expression des terminalen Differenzierungsmarkers ist in einzelnen Embryonen negativ reguliert (Vergleich der Expression in Xisl-1 mit WT, St.30 und St.32). In WT Embryonen ist der Beginn der Fusion der Herzfelder (HF) durch eine nicht unterbrochene *TnIc* Expressionsdomäne zu erkennen (WT, St.30), wohingegen in unilateral mit *Xisl-1* mRNA injizierten Embryonen noch in der Mehrzahl zwei separierte Herzfelder detektiert werden können (*Xisl-1*, St.30). Im St.32 ist in nahezu allen Kontrollembryonen die Fusion der Herzfelder und die Bildung des linearen Herzschlauchs durch die Expression von *TnIc* zu erkennen (WT, St.32). In ca. 25% der untersuchten, *Xisl-1* injizierten Embryonen können auch in diesem Entwicklungsstadium noch zwei getrennte *TnIc* Domänen visualisiert werden (*Xisl-1*, St.32), was auf eine gestörte Bildung des primären Herzschlauchs hinweist. Eine satistische Auswertung der WMISH, in Bezug auf fusionierte bzw. separierte Herzfelder, in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien ist in dem Balkendiagramm angegeben. Die Anzahl der unabhängigen Experimenten (N) und die Anzahl der einzelnen Embryonen (n) ist ebenfalls dargestellt. Zudem ist der Standardfehler im Diagramm markiert.

5.9 Xisl-1 wird für die normale Entwicklung des Gefäßsystems benötigt

Das Gefäßsystem von *Xenopus laevis* wird durch Vaskulogenese und Angiogenese gebildet. Im ventralen, anterioren Mesoderm und im Seitenplattenmesoderm werden die Vorläuferzellen der Gefäße, die sogenannten Angioblasten, induziert. *Xmsr,* ein Markergen für spezifizierte Endothelzellen markiert alle wichtigen Strukturen des Gefäßsystems (die Aortenbögen, die *Vena cardinalis communis*, das Vitellinvenen Netzwerk, das Endokardium, die *Aorta dorsalis*, die *Vena cardinalis posterior*, die *Vena cardinalis anterior*, sowie die intersomitischen Arterien) (Devic et al., 1996) (Abb.5 Einleitung) Xmsr ist der G-Protein gekoppelte Rezeptor des Peptidliganden Apelin. Der Rezeptor ist notwendig für die Entwicklung des kardiovaskulären Systems (Inui et al., 2006).

In einer lateralen Ansicht der anterioren Region eines Embryos und in einem horizontalen Schnitt durch den Kopf- und anterioren Rumpfbereich ist die *Xisl-1* und die *Xmsr* Expression in den Aortenbögen, im Seitenplattenmesoderm und im Endokardium zu sehen. Die Expressionsdomänen der beiden Gene in diesen Domänen sind sehr ähnlich (Abb. 20A, *Xisl-1* und *Xmsr*). *Xmsr* markiert zudem die anderen beschriebenen Domänen des Gefäßsystems.

Die Expression von *Xisl-1* in bestimmten Domänen des embryonalen Gefäßsystems lassen auf eine Rolle des Transkriptionsfaktors während der Bildung dieses Organs schließen. Um diese Frage zu untersuchen, wurde die Translation von *Xisl-1* mRNA durch das islMO inhibiert und daraufhin die Expression von Markergenen des Gefäßsystems mittels WMISH untersucht (Abb. 20B-D).

Der Verlust der *Xisl-1* Funktion führt zu einer Reduktion der *Xmsr* Transkription. In den am deutlichsten betroffenen Embryonen wird *Xmsr* nach der islMO Injektion nicht mehr in den Aortenbögen, der *Vena cardinalis communis*, dem Vitellinvenen Netzwerk, dem Endokardium, den anterioren Bereichen der *Aorta dorsalis* und der *Vena cardinalis posterior*, der *Vena cardinalis anterior*, sowie in den intersomitischen Arterien exprimiert. *Xmsr* mRNA kann lediglich im caudalen Teil der *Vena cardinalis posterior* sowie in der Spitze der Schwanzknospe detektiert werden. Zudem können *Xmsr* Transkripte in einzelnen Zellen im caudalen Teil des Vitellinvenen Netzwerks visualisiert werden (Abb. 20B islMO). In Embryonen in denen der Phänotyp nicht so stark ausgeprägt ist, kann eine Expression in der *Vena cardinalis communis* und im Endokardium detektiert werden. Die Expression in den Aortenbögen war allerdings ebenfalls nicht mehr vorhanden. In einzelnen Zellen des Vitellinvenen Netzwerks können zwar *Xmsr* Transkripte detektiert werden, aber das Vitellinvenen Netzwerk wird nach dem Verlust der Xisl-1 Funktion nicht mehr ausgebildet.

Die Expression von *Xmsr* in den intersomitischen Arterien konnte ebenfalls nicht mehr gezeigt werden. In Kontrollembryonen konnten alle wichtigen Domänen des Gefäßsystem (s.o.) durch die *Xmsr* antisense RNA Sonde markiert werden. (Abb. 20B, WT).

Insgesamt reduziert sich in ca. 55% aller Embryonen, die mit islMO injiziert wurden, die *Xmsr* Expression. Bei uninjizierten Kontrollembryonen kann lediglich in knapp 9% aller untersuchten Embryonen eine Reduktion der mRNA Menge des Endothelzellen Markergens festgestellt werden. Die Expression von *Xmsr* kann durch die Koinjektion der *Δisl-1* mRNA teilweise wiederhergestellt werden (Abb. 20B Δisl-1+islMO). Nur noch etwa 32% aller Embryonen zeigen den Phänotyp nach der Koinjektion des *Δisl-1* Konstrukts.

Um die Rolle von *Xisl-1* während der Vaskulogenese näher zu untersuchen, wurden islMO injizierte Embryonen auch bezüglich der Expression von *Ami* durch die WMISH analysiert. Ami ist u.a. im Vitellinvenen Netzwerk exprimiert (Inui und Asashima, 2006). Wie zuvor für *Xmsr* kann auch für *Ami* eine reduzierte Expression im Vitellinvenen Netzwerk gezeigt werden. Im caudalen Teil des Embryos kann die Expression des Markergens weiterhin visualisiert werden. Auch die Expression in den Aortenbögen und in der *Vena cardinalis communis*, sowie in der *Vena cardinalis posterior* ist stark reduziert im Vergleich zu unbehandelten Kontrollembryonen (WT). In 55% der islMO injizierten Embryonen ist die Transkription von *Ami* stark reprimiert, wohingegen nur knapp 14% aller Kontrollembryonen ebenfalls eine verminderte Expression aufweisen (Abb. 20C). Die Funktion des Xisl-1 Proteins ist aufgrund dieser Daten notwendig um die *Ami* Expression im Gefäßsystem von *Xenopus laevis* zu gewährleisten.

In *Xenopus* ist die Transkription von *Flk-1* in unterschiedlichen Strukturen des sich entwickelnden Gefäßsystems visualisierbar. *Flk-1* ist hauptsächlich in den Aortenbögen, der *Vena cardinalis posterior*, der *Vena cardinalis communis* und im Vitellinvenen Netzwerk exprimiert. Es zeigt sich ein ähnlicher Phänotyp wie bei den zuvor untersuchten vaskulären Markergenen. Nachdem die *Xisl-1* Funktion durch das islMO inhibiert wurde, kann die Expression von *Flk-1* in den Aortenbögen nur noch auf einem reduzierten Niveau nachgewiesen werden. *Flk-1* mRNA kann noch in einzelnen Zellen des Vitellinvenen Netzwerks visualisiert werden, allerdings ist die Ausbildung des Netzwerks durch den Verlust der *Xisl-1* Funktion unterbunden. In der *Vena cardinalis communis* ist eine deutlich reduzierte *Flk-1* Transkriptmenge nach der islMO Injektion detektierbar. Die Expression von *Flk-1* in der *Vena cardinalis posterior* ist durch die verminderte Xisl-1 Proteinmenge nicht betroffen. Eine reprimierte *Flk-1* Expression konnte in fast 67% aller untersuchten islMO injizierten

Embryonen nachgewiesen werden. In den Wildtyp Embryonen zeigen nur 12% eine verminderte *Flk-1* mRNA Menge (Abb. 20D).

Die Xisl-1 Funktion ist notwendig für die normale Expression der vaskulären Markergene *Xmsr*, *Ami*, und *Flk-1*. Die Transkription der Gene ist vor allem im Vitellinvenen Netzwerk und in den Aortenbögen deutlich reduziert. Für *Xmsr* konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Expression spezifisch von der Xisl-1 Funktion abhängt, da durch die Koinjektion der *Δisl-1* mRNA die Expression des Markergens teilweise wiederhergestellt werden kann. Die Funktion von *Xisl-1* scheint sich also hauptsächlich auf die Ausbildung des Vitellinvenen Netzwerks, die sogenannte Tubulogenese bzw. auf die Verknüpfung der einzelnen Gefäße durch die Angiogenese, auszuwirken, da die Induktion von endothelialen Vorläuferzellen nur in einem kleinen Prozentsatz aller untersuchten islMO injizierten Embryonen gestört ist.

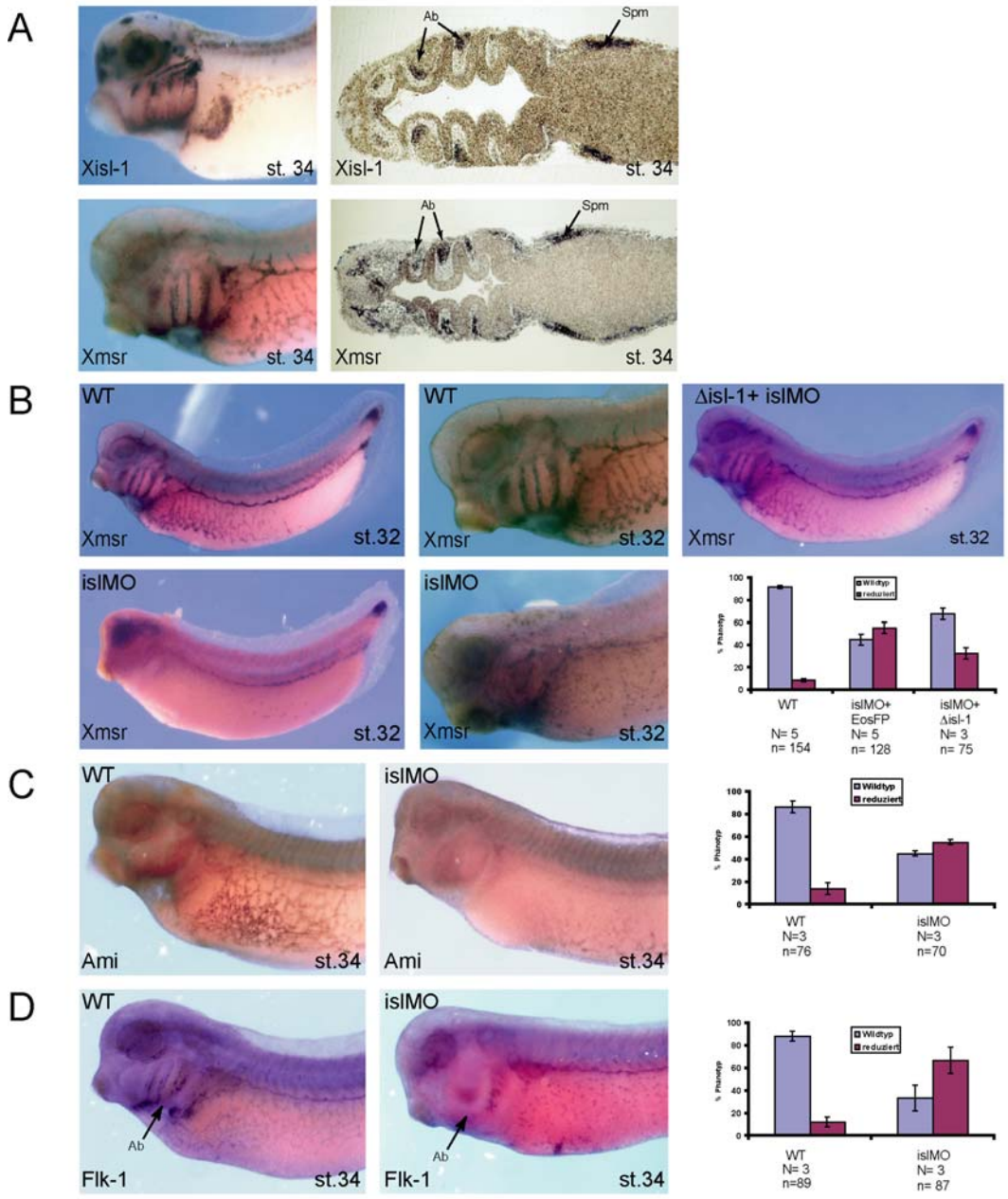


Abb. 20 Der Verlust der *Xisl-1* Funktion führt zu einer Reduktion der Expression vaskulärer Markergene. A) Eine WMISH für *Xisl-1* bzw. *Xmsr* zeigt, dass beide Gene in den Aortenbögen (Ab), im Seitenplatten Mesoderm (Spm) und im Endokardium exprimiert sind. Das Expressionsmuster beider Gene ist sehr ähnlich. Es ist eine anterior laterale Ansicht repräsentativer Embryonen gezeigt, zudem sind einige der Expressionsdomäne in einem histologischen Querschnitt zu erkennen (Ab, Spm, das Endokardium liegt außerhalb der Schnitteben). **B)** WMISH mit der *Xmsr* antisense RNA-Sonde auf islMO injizierten Embryonen und Wildtypembryonen (WT). Es ist ein gravierender (islMO, linke Bilder, laterale Ansicht eines Embryos) und ein milder Phänotyp (islMO, rechte Bilder, laterale Ansicht der Kopfregion) nach der Inhibition der *Xisl-1* Translation dargestellt. Die Expression von *Xmsr* kann in der anterioren Region des Embryos nicht mehr detektiert werden, bzw. ist stark reduziert. Die Koinjektion des islMO mit der *Δisl-1* mRNA, konnte die Expression des Endothelzellen Markergens teilweise wiederherstellen (islMO+Δisl-1, ganz rechtes Bild, laterale Ansicht eines Embryos). **C)** Die Expression der *Ami* mRNA wurde durch WMISH analysiert. Es kann gezeigt werden, dass nach islMO Injektion (islMO) die Transkription dieses Markergens, im Vergleich zu Kontrollembryonen (WT), reduziert ist. **D**) Auch für *Flk-1* kann eine negative Regulation der Transkription durch die Reduktion der Xisl-1 Proteinmenge gezeigt werden. Eine statistische Auswertung der jeweiligen Experimente inklusive des Standardfehlers ist in den Balkendiagrammen gezeigt. Die Anzahl der unabhängigen Experimente (N) und die Anzahl aller untersuchten Embryonen (n) sind ebenfalls ausgewiesen.

5.10 Die Regulation der Xisl-1 Expression durch Wachstumsfaktoren der Wnt Familie

Die Wachstumsfaktoren der Wnt Familie regulieren in *Xenopus* und anderen Modellorganismen die Kardiogenese. Es konnte in vorhergehenden Arbeiten gezeigt werden, dass der kanonische Wnt/β-Catenin Signalweg inhibiert werden muss um kardiales Gewebe zu induzieren. Der nicht-kanonische Wnt/JNK Signalweg ist dagegen notwendig für die Spezifizierung kardialer Vorläuferzellen (Schneider und Mercola, 2001; Marvin et al., 2001; Pandur et al., 2002; Brade et al., 2006).

Die Regulation von Markergenen für spezifizierte kardiale Vorläuferzellen durch Wnt Faktoren sollte in DMZ Explantaten durch semiquantitative RT-PCR untersucht werden. Es wurden zunächst 0,5ng *Wnt3a* bzw. 1ng *dominant negative Wnt-11* mRNA (*dn-Wnt-11* mRNA) bilateral in die dorsale Marginalzone von *Xenopus* Embryonen im 4-Zellstadium injiziert. Wie zuvor beschrieben wurden im St. 10 die DMZ Explantate präpariert und bis zum St. 13/14 kultiviert. *Histon 4* (*H4*) diente als Ladekontrolle.

Die Expression aller betrachteten Markergene (*Xisl-1, GATA-4, -6, Nkx2.5* und *Tbx20*) kann in den unbehandelten Kontrollexplantaten durch die RT-PCR dargestellt werden (Abb. 21, uninj.). Die Aktivierung des kanonischen Wnt Signalwegs führt zur Inhibition der Markergenexpression (Abb. 21, Wnt-3A). Die Inhibition des nicht-kanonischen Wnt/JNK Signalwegs durch *dn-Wnt-11* mRNA führt zu verminderten Transkriptmengen der untersuchten kardialen Markergene, außer für *Xisl-1* (Abb. 21, dn-Wnt-11). Die Abhängigkeit der *Tbx20* Expression von Wnt-11 ist noch nicht bekannt. Es kann durch diese Daten gezeigt werden, dass die Expression von *Xisl-1* unabhängig von der Wnt-11 Funktion ist. Dieses Ergebnis ist konträr zur Wnt-11 abhängigen Expression der bisher beschrieben Herzmarkergene *GATA-4*, -6 und *Nkx2.5*. *Xisl-1* wird allerdings wie diese Markergene negativ durch den kanonischen Wnt-Signalweg reguliert.

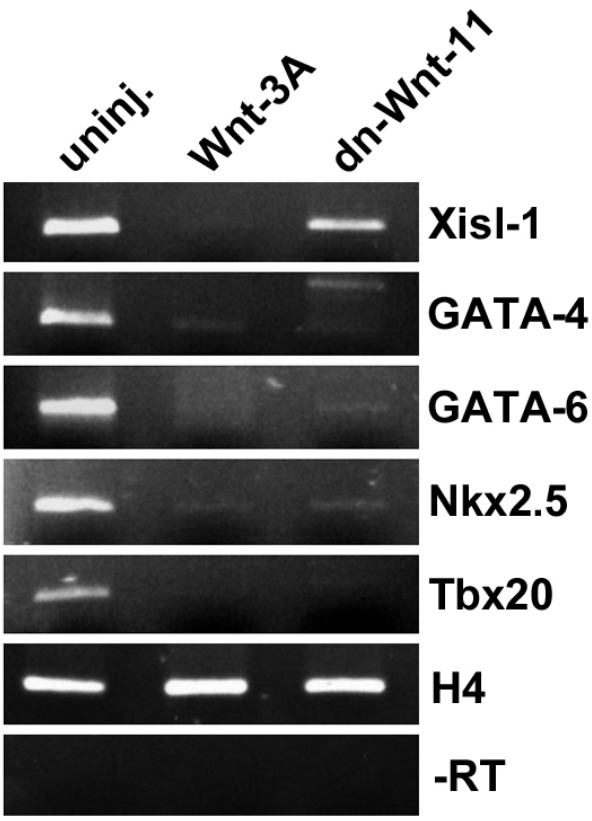


Abb. 21: Die Regulation der *Xisl-1* Expression durch Wachstumsfaktoren der Wnt Familie. Durch einen semiquantitativen RT-PCR Ansatz wurde die Expression der Markergene für spezifizierte Herzvorläuferzellen *Xisl-1*, *GATA-4*, *GATA-6*, *Nkx2.5* und *Tbx20* in dorsalen Marginalzonen Explantaten untersucht. *Histon 4* (*H4*) diente als Ladekontrolle. Alle untersuchten Markergene können in uninjizierten DMZ Explantaten nachgewiesen werden (uninj.) Die *Xisl-1* mRNA Menge wird durch die Überexpression von *Wnt-3A* negativ reguliert (Wnt-3A). Dies kann auch für die anderen untersuchten Gene gezeigt werden. *Xisl-1* ist als einziges dieser kardialen Markergene nicht von der Wnt-11 Funktion abhängig (dn-Wnt-11).

6. Diskussion

Die embryonale Entwicklung des Herzens benötigt ein komplexes Netzwerk aus Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, die zusammen die Bildung dieses Organs aus mesodermalen Zellen ermöglichen. Die Entstehung des Gefäßsystems erfordert ebenfalls die Interaktion vieler Faktoren. Die Bildung beider Organe wurde bisher unabhängig voneinander untersucht. Neuere Studien weisen allerdings darauf hin, dass die initiale Induktion des kardiovaskulären Systems auf eine multipotente kardiovaskuläre Vorläuferzellpopulation zurückzuführen ist.

Die Expression von Xisl-1 markiert ein mögliches sekundäres Herzfeld in Xenopus laevis

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von Xisl-1 mit derjenigen von Isl-1 Proteinen unterschiedlicher Spezies zeigt, dass der LIM-Homeodomänen Transkriptionsfaktor evolutionär hoch konserviert ist. Die Isl-1 Proteine der Vertebraten besitzen zu 96%-98% gleiche Aminosäuren. Die funktionellen Domänen sind sogar bis zu 100% konserviert (Tabelle 1). Die hohe Homologie der Proteinsequenz deutet auf eine konservierte Funktion hin. Die Analyse des räumlichen Expressionsmusters unterstreicht dies, denn in Maus, Haushuhn und *Xenopus* ist die mRNA des Transkriptionsfaktors in neuralem Gewebe, im Pharynxendoderm, im splanchnischen Mesoderm und in kardialem Gewebe nachweisbar (Ericson et al., 1992; Pfaff et al., 1996; Yuan und Schoenwolf, 2000; Cai et al., 2003; diese Arbeit). Die Expression von *Xisl-1* im anterioren splanchnischen Mesoderm, das den *Truncus arteriosus* umgibt stimmt mit der Lokalisation des in Amnioten beschriebenen anterioren bzw. sekundären Herzfeld (AHF) überein (s. Einleitung; Kelly et al., 2001; Waldo et al., 2001; Mjaatvedt et al., 2001). Isl-1 wurde als Markergen für das AHF in der Maus beschrieben (Cai et al., 2003). Die Zellen des AHF migrieren während der Herzschleifenbildung in den primären Herzschlauch, wo sie im Mesokardium proliferieren und schließlich im Myokardium zu Kardiomyozyten differenzieren. Durch eine klonale Zellanalyse konnte gezeigt werden, dass das Myokardium des Herzens der Maus auf zwei kardiale Vorläuferzellpopulationen zurückgeht, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten differenzieren. Beide Zellpopulationen entstehen aus einer mesodermalen Herzvorläuferzellpopulation kurz nach deren Spezifizierung. Die erste Zellpopulation bildet den primäre Herzschlauch und somit auch die ersten terminal differenzierten Herzmuskelzellen. Aus diesen entsteht der linken Ventrikel sowie Teile der Atrien und des

Sinus venosus. Die Herzvorläuferzellen der zweiten Zellpopulation wandern während der Herzschleifenbildung in den primären Herzschlauch ein. Die Progenietoren der zweiten Isl-1$^+$ Zellpopulation bilden das kontraktile Gewebe des *Truncus arteriousus*, des *Bulbus cordis*, des rechten Ventrikels, sowie Teile der Atrien und des *Sinus venosus* (Meilhac et al., 2004). Die Ausbildung der Herznerven, des Erregungsleitungssystems und der Herzklappen ist ebenfalls auf Isl-1$^+$ Vorläuferzellpopulationen angewiesen (Sun et al., 2007). Die Isl-1$^+$ Vorläuferzellpopulation trägt somit zu praktisch allen kardialen Kompartimenten in unterschiedlichen Anteilen bei und bildet eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen.

Die Existenz der zwei Herzfelder ist momentan Gegenstand einer intensiven wissenschaftlichen Diskussion. In der Maus konnte aufgrund der klonalen Zellanalyse ein gemeinsamer mesodermaler Ursprung des gesamten Myokardiums nachgewiesen werden (Meilhac et al., 2004). Zudem zeigen neueste Daten, dass Isl-1 transient in den Zellen des primären Herzfelds bzw. der ersten kardialen Vorläuferzellpopulation des Säugers exprimiert ist (Prall et al., 2007). Aufgrund dessen kann Isl-1 als ein frühes pankardiales Markergen betrachtet werden. Im Haushuhn wurde die Isl-1 Expression ebenfalls überlappend mit dem primären Herzfeld beschrieben (Yuan und Schoenwolf, 2000). Abu-Isa und Kollegen (2004) argumentierten daher, dass es nicht mehrere Herzfelder gibt, sondern vielmehr ein Herzfeld, das schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung gemustert wird. Dies führt dazu, dass kardiale Progenietorpopulationen schon kurz nach der Spezifizierung segregieren und dann zu unterschiedlichen Zeitpunkten terminal differenzieren und zur Bildung der einzelnen Kompartimente beitragen.

Die Untersuchung der Xisl-1 Expression in *Xenopus laevis*, einer niederen Vertebratenspezies, verspricht wichtige neue Erkenntnisse in Bezug auf die Existenz der verschiedenen Herzfelder sowie für die Evolution der Herzentwicklung.

Durch RT-PCR Analysen des temporalen Expressionsmusters von *Xisl-1* konnte gezeigt werden, dass *Xisl-1* Transkripte schon maternal in der befruchteten Oozyte vorhanden sind. Das Xisl-1 Protein könnte somit bereits vor der Gastrulation eine Rolle bei der Spezifizierung von Vorläuferzellen spielen. Die zygotische Expression von *Xisl-1* beginnt während der Gastrulation, einem Zeitpunkt zu dem auch die primären Herzfelder spezifiziert werden (Sater und Jacobson, 1989). Nach der Gastrulation, kann die Expression von *Xisl-1* unter anderem in den primären Herzfeldern detektiert werden. Sehr interessant hierbei ist, dass Xisl-1 zusätzlich zu den Herzvorläuferzellen der Nkx2.5$^+$ primären Herzfelder, auch Zellen markiert, die direkt an diese angrenzen. Diese Zellen können zu einem späteren Zeitpunkt anterior des

Nkx2.5$^+$ kardialen Mesoderms lokalisiert werden. Aufgrund dieser Expression kann Xisl-1 wie auch Isl-1 in der Maus als pankardiales Markergen bezeichnet werden (Prall et al., 2007). In der Maus ist, wie oben bereits erwähnt, nachgewiesen worden, dass die Isl-1$^+$ Herzvorläuferzellen des dorsalen Mesokardium in das Myokardium des linearen Herzschlauchs einwandern und so u.a. die Ausflussbahn des Herzens und den rechten Ventrikel bilden. Diese Zellen entsprechen der zu einem späteren Zeitpunkt differenzierenden zweiten kardialen Vorläuferzellpopulation. In *Xenopus* ist die Migration von zusätzlichen kardialen Zellen in den linearen Herzschlauch noch nicht untersucht worden. Allerdings kann nach der Bildung des linearen Herzschlauchs *Xisl-1* mRNA in kardialen Progenietoren des dorsalen Mesokardiums und im dorsalen Perikarddach detektiert werden. Zudem weist die Koexpression von *Xisl-1* und *Nkx2.5* im anterioren Teil des Herzmesoderms auf einen möglichen Beitrag dieser Vorläuferzellpopulation zum *Truncus arteriosus* und zum *Bulbus cordis* hin, da diese Kompartimente aus dieser Region hervorgehen (Mohun et al., 2000). Es konnte, wie auch in der Maus, zu keinem der analysierten Entwicklungsstadien eine Koexpression von *Xisl-1* und Markergenen für terminal differenzierte Kardiomyozyten beobachtet werden. Dies deutet an, dass Xisl-1 möglicherweise für die Aufrechterhaltung des kardialen Progenietorstatus notwendig ist. Außerdem markiert *Xisl-1* eine kardiale Vorläuferzellpopulation, die in derselben Region wie die Isl-1$^+$ Zellpopulation der Maus lokalisiert ist und die auch sehr wahrscheinlich ähnliche Kompartimente bildet. Aufgrund fehlender Atrium bzw. Ventrikel spezifischer Markergene konnte dies aber nicht formal nachgewiesen werden. Für die Existenz der zweiten kardialen Vorläuferzellpopulation in *Xenopus* Embryonen spricht aber, dass *Xisl-1* bis zur Bildung der Herzschleifen in kardialen Progenietoren exprimiert ist. Isl-1 scheint also auch in Amphibien eine Vorläuferzellpopulation zu markieren, die zu einem späteren Zeitpunkt in der Herzentwicklung terminal differenziert.

Im Säuger bilden Isl-1$^+$ Zellen vornehmlich die Ausflussbahn des Herzens und den rechten Ventrikel. Dieses Kompartiment ist erst in den Amnioten mit der Entstehung des vollständig getrennten Herz-Lungen Kreislaufs entstanden. Das Herz des Krallenfroschs besteht nur aus einem unvollständig septierten Ventrikel und zwei Atrien. Eine Hypothese der Evolution des Herzens der Vertebraten geht davon aus, das jeweils ganze Kompartimente neu entstanden sind und zu den bereits vorhandenen addiert wurden. Das Herz der Fische mit zwei Kammern wurde also durch die Addition eines weiteren Atriums und eines weiteren Ventrikels zum Herz der Amnioten mit vier Kammern (Fishman and Olsen 1997). Cai und Kollegen (2003) hatten darüber spekuliert, ob die Entstehung des rechten Ventrikels in

Amnioten durch die Entstehung der *Isl-1*$^+$ kardialen Vorläuferzellpopulation des AHF bedingt ist. Da in *Xenopus Xisl-1*$^+$ Zellen an der Herzentwicklung beteiligt sind, erscheint dies unwahrscheinlich. Auch Meilhac et al. (2004) hatten diese Hypothese verworfen, da sie für die zweite, Isl-1$^+$, kardiale Vorläuferzellpopulation einen Beitrag zu mehreren Kompartimenten festgestellt hatten. Sie plädierten stattdessen für ein Modell, wonach das AHF bzw. die zweite kardiale Vorläuferzellpopulation zunächst dazu entstanden ist, um die Anzahl kardialer Progenietoren zu erhöhen. Die Vorläuferpopulation wurde dann über die Erweiterung des kardialen Netzwerks an Regulatoren z.B. durch Genduplikationen, verändert um schließlich den rechten Ventrikel zu bilden (Olson, 2006).

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten stützen dieses Modell, da auch in einer Anamniaspezies Isl-1$^+$ Progenietoren einen Beitrag zum Herzen mit drei Kammern leisten. Der rechte Ventrikel wird in Amphibien nicht ausgebildet, was dafür spricht dass die Isl-1$^+$ Vorläuferzellen zur Erhöhung der kardialen Progenietorzahl entstanden sind.

Es konnte erstmals die Expression von *Xisl-1* in kardialen Progenietoren in *Xenopus*, nachgewiesen werden. Eine definitive Aussage darüber ob *Xisl-1* in *Xenopus* allerdings eine bisher unbekannte zweite kardiale Vorläuferzellpopulation markiert, oder ob der Transkriptionsfaktor nur von Zellen der bisher beschriebenen kardialen Population exprimiert wird, ist aufgrund der Daten dieser Arbeit nicht möglich, und sollte in weiteren Studien geklärt werden. Der formale Nachweis des AHF bzw. der zweiten kardialen Vorläuferzellpopulation könnte nur aufgrund von Zellschicksalsanalysen und Zelllinienmarkierung erfolgen. Idealerweise könnte diese Analyse durch transgene *Xenopus tropicalis* Embryonen, die ein fluoreszierendes Protein unter der Kontrolle des *Xisl-1* Promotors exprimieren, bewerkstelligt werden. In der aktuellen Debatte um die Existenz eines oder mehrerer Herzfelder, sprechen die Daten dieser Arbeit eindeutig für ein Herzfeld, das durch frühe Musterungsprozesse in verschiedenen kardialen Progenietorpopulation aufgeteilt wird. Dies wird im speziellen durch die Expression von Xisl-1 im primären Herzfeld unterstützt.

Funktionsverluststudien zeigen das die Xisl-1 Funktion notwendig ist für die normale Herzentwicklung in Xenopus laevis

Die wichtige Funktion von Xisl-1 während der Entwicklung des Amphibienherzens konnte durch Funktionsverluststudien gezeigt werden. Die Injektion von *Xisl-1* antisense Morpholino Oligonukleotiden (islMO) in frühe Teilungsstadien der Froschembryonen führt durch den

massiven Verlust an kardialem Gewebe zu einem morphologischen Herzphänotyp. Die grobe Beschreibung des morphologischen Phänotyps der Isl-1 Knockout-Maus, ein deformiertes Herz, in dem die Herzschleifenbildung inhibiert ist, trifft auch auf den Phänotyp der *Xenopus* Embryonen zu.

Die Ursachen für diesen Phänotyp könnten in einer gestörten Induktion der kardialen Progenietoren liegen, aber auch auf eine veränderte Zellproliferationsrate zurückzuführen sein. Die Untersuchungen der Expression der frühen kardialen Markergene *Tbx20, Nkx2.5 GATA-4* und *-6* mittels WMISH und der semiquantitativen RT-PCR zeigen, dass die Induktion kardialen Gewebes in islMO injizierten Embryonen und dorsalen Marginalzonen (DMZ) Explantaten beeinträchtigt ist. Dieses Ergebnis deutet auf eine Rolle des Xisl-1 Proteins während der Spezifizierung des kardialen Zellschicksals im anterio-ventralen Mesoderm hin. Aus zahlreichen Studien ist es mittlerweile ersichtlich, dass die Induktion der kardialen Vorläuferzellpopulation und die Expression der charakteristischen Herzmarkergene durch ein komplexes Netzwerk an Transkriptionsfaktoren reguliert wird. So wurde in der Maus gezeigt, dass Xisl-1 mit GATA-4 physikalisch interagiert und die Expression von *Myocyte enhancer factor 2c* (*Mef2c)* reguliert (Doudou et al., 2004). In Kombination mit Tbx20 und GATA-4 reguliert Isl-1 die Expression von *Nkx2.5* in der Maus (Takeuchi et al., 2005). Aus diesen Befunden wird deutlich, dass der Funktionsverlust eines dieser Faktoren die Funktion des gesamten kardialen Netzwerks beeinträchtigt. Für die frühen Spezifizierungsmarkergene, die von *Xisl-1* reguliert werden, wurde in etlichen Studien eine Rolle während der Organogenese des Herzens gezeigt.

Der Verlust der Tbx20 Funktion führt wie auch der Verlust der Xisl-1 Funktion zu einem massiven Verlust an kardialem Gewebe und einer gestörten Herzschleifenbildung. Für Tbx20 konnte der Phänotyp auf eine gestörte Zellproliferation zurückgeführt werden. Die Induktion von Herzvorläuferzellen, war nicht gestört (Brown et al., 2005). In der Maus konnte gezeigt werden, dass Tbx20 durch die Inhibition von Tbx2 ebenfalls die Zellproliferation inhibiert (Cai et al., 2005). Die Regulation des Zellzyklus durch Tbx2 konnte im Zebrafisch ebenfalls gezeigt werden (Ribeiro et al., 2007). Der Verlust der Tbx20 Funktion in Zebrafisch führte zu einem deutlichen Herzphänotyp, ähnlich demjenigen in *Xenopus* Embryonen (Szeto et al., 2002). Durch den Verlust der Tbx20 Funktion ist die Teilungsrate kardialen Gewebes in verschiedenen Vertebratenspezies beeinträchtigt. Außerdem wurde für Tbx20 in Frosch- und Mausembryonen gezeigt, dass der Faktor den ANF Promotor direkt reguliert und somit für die Reifung der Atrien notwendig ist (Cai et al., 2005; Brown et al., 2005; Plageman und Yutzey, 2005). Durch die Inhibition der *Tbx20* Expression in islMO injizierten Embryonen könnte

somit die Proliferation von kardialen Zellen, die Herzschleifenbildung und die kammerspezifische Genexpression beeinträchtigt werden.

Eine erst vor kurzem veröffentlichte Studie in der Maus, zeigte eine wichtige Funktion von Nkx2.5 in der Kontrolle der Induktion von Herzvorläuferzellen und der Proliferation spezifizierter Progenietoren. Die Expression von *Nkx2.5* in kardialen Vorläuferzellen wird durch den Wachstumsfaktor BMP-2 induziert. Nkx2.5 inhibiert daraufhin die weitere Expression des Wachstumsfaktors. Dies führt in der Folge zur verstärkten Proliferation der spezifizierten Vorläuferzellen, und verhindert die Induktion weiterer kardialer Progenietoren. Mit Nkx2.5 konnte zum ersten Mal ein Transkriptionsfaktor beschrieben werden, der die Anzahl von Vorläuferzellen und die Differenzierung bereits spezifizierter Progenietoren reguliert (Prall et al., 2007). Durch den Verlust der Nkx2.5 Expression durch die islMO Injektion in *Xenopus* Embryonen könnte somit dieses empfindliche Gleichgewicht gestört werden, was möglicherweise den Verlust kardialen Gewebes zur Folge hätte.

Auch der Transkriptionsfaktor GATA-4 inhibiert die Nkx2.5 Expression und reguliert somit ebenfalls die Anzahl der Herzprogenietoren (Jiang et al., 1999). Zudem ist die Funktion des Transkriptionsfaktors während der Spezifizierung des rechten Ventrikels und für die Proliferation der Kardiomyozyten in Maus Embryonen notwendig (Zeisberg et al., 2005).

Die Expression von GATA-6 und BMP-4 wird durch die Injektion des islMO ebenfalls stark reduziert. Diese beiden Faktoren sind für die Aufrechterhaltung der Herzvorläuferzellpopulation notwendig. GATA-6 reguliert die Expression von BMP-4. Der Wachstumsfaktor inhibiert die terminale Differenzierung kardialer Progenietoren (Shi et al., 2001; Walters et al., 2001; Peterkin et al., 2003). Der Verlust von GATA-6 sowie von BMP-4 könnte den Verlust an kardialem Gewebe erklären. Breckenridge und Kollegen (2001) konnten außerdem eine Rolle für die asymmetrische *BMP-4* Expression während der Bildung des *Cor sigmoideum* zeigen, was zu der gestörten Herzschleifenbildung in islMO injizierten Embryonen führen könnte.

Es konnte auch eine verringerte Expression von *eHAND (Hand1)* beobachtet werden. Dieser Faktor ist, wie auch *Xisl-1*, im dorsalen Mesokardium und in vaskulären Progenietoren exprimiert. Zudem können die Transkripte von *eHAND* im Myokardium und im Seitenplattenmesoderm detektiert werden (Sparrow et al., 1998). In *Xenopus* wird die Expression des basischen Helix-Schleife-Helix Transkriptionsfaktors durch FGF und BMP Signale reguliert. Die asymmetrische Expression von *eHAND* und die gleichzeitige Regulation durch BMP-4 legt eine Rolle während der Herzschleifenbildung nahe. In der Maus wird die Herzschleifenbildung von diesem Faktor allerdings nicht beeinflusst und in *Xenopus*

wurde dieser Sachverhalt bisher noch nicht untersucht. Die HAND Faktoren spezifizieren im Säuger den systemischen (linken) (eHAND) und den pulmonalen (rechten) (dHAND) Ventrikel, ermöglichen die kompartimentspezifische Genexpression und die Ausbildung des interventrikulären Septums. (Thomas et al., 1998; McFadden et al., 2005; Togi et al., 2004, Togi et al., 2006). Zudem ist belegt worden, dass eHAND die Proliferation kardialer Progenietoren reguliert (Risebro et al., 2006). Der Verlust der Xisl-1 Funktion könnte durch die Inhibition der *eHAND* Expression zu einer reduzierten Teilungsrate kardialer Progenietoren in frühen Schwanzknospenstadien führen, was die verkleinerten Herzen bzw. die gestörten Herzschleifenbildung erklären könnte.

Der panmesodermale Marker *Brachyury* (*Xbra*) und Markergene des Endoderms wie z.B. *Hex* und *Sox17β* sind durch den Verlust der Xisl-1 Funktion nicht betroffen. Dies zeigt, dass die Induktion dieser Keimblätter anscheinend nicht gestört ist. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression anderer mesodermaler Markergene nach der islMO Injektion betroffen ist.

Im Gegensatz zu den Daten aus der Maus konnte keine reduzierte Wnt-11 (und Wnt-11R, nicht gezeigte Daten) Transkriptmenge in DMZ Explantaten gezeigt werden. Der Verlust der Wnt-11 Expression in der Maus ist möglicherweise auf den Verlust des *Truncus arteriosus* zurückzuführen, der eine Expressionsdomäne von Wnt-11 im murinen Herzen darstellt (Cai et al., 2003). Das *Xenopus* Ortholog des murinen Wnt-11 (Wnt11R) ist im gesamten linearen Herzschlauch exprimiert (Garriock et al., 2005).

Die Untersuchung der Expression von Herzmarkergenen zeigt eindeutig, das Xisl-1 ein wichtiger Faktor des kardialen Netzwerks an Transkriptionsfaktoren ist. Es konnte in anderen Studien in *Xenopus* gezeigt werden, dass für die Induktion eines kardialen Zellschicksals der nicht-kanonische Wnt/JNK Signalweg aktiviert und der kanonische Wnt/β-Catenin Signalweg inhibiert werden muss (Schneider und Mercola, 2001; Pandur et al., 2002). In embryonalen Stammzellen der Maus wurde allerdings nachgewiesen, dass eine zeitliche Regulation der Aktivität des kanonischen Signalwegs für die Induktion eines kardialen Zellschicksals in „embryoid bodies“ notwendig ist. Diese Studie zeigte, dass der Wnt/β-Catenin Signalweg von Tag 0-3 der Differenzierung die Induktion von Kardiomyozyten fördert, wohingegen das Signal ab Tag 5, wenn bereits terminal differenzierte Herzmuskelzellen nachweisbar sind, inhibiert sein muss. Wnt/β-Catenin Signale inhibieren den BMP Signalweg, was zur Folge hat, dass die Differenzierung zu Kardiomyozyten zu diesem späteren Zeitpunkt verhindert wird (Naito et al., 2006).

Es war nun von Interesse, zu untersuchen ob die Wachstumsfaktoren der Wnt-Familie auch die Expression von *Xisl-1* regulieren. Dieser Frage wurde in ersten Untersuchungen mittels der semiquantitativen RT-PCR auf DMZ Explantaten nachgegangen. Interessanterweise führte die Expression eines dominant negativen Wnt-11 Konstrukts nicht zu einer reduzierten *Xisl-1* mRNA Menge. Für einige andere Markergene kardialer Progenietoren (*Tbx20, Nkx2.5, GATA-4, -6*) konnte eine Abhängigkeit der Expression dieser Gene von der Wnt-11 Funktion gezeigt werden (Pandur et al., 2002, diese Arbeit). Der nicht-kanonische Wnt Signalweg ist demnach nicht für die Induktion *Xisl-1*$^+$ kardialer Progenietoren notwendig. Allerdings muss beachtet werden, dass *Xisl-1* auch in endodermalen und ektodermalen Strukturen exprimiert wird. Der Nachweis einer Regulation der kardialen Expression von *Xisl-1* durch Wnt-11 in DMZ Explantaten mittels der semiquantitativen RT-PCR könnte aufgrund dessen nicht detektierbar sein. Der kanonische Wnt/β-Catenin Signalweg inhibiert allerdings die Expression von *Xisl-1* in DMZ Explantaten. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Regulation anderer kardialer Markergene durch diesen Signalweg. Dieser erste Befund deutet einen bisher unbekannten Mechanismus der Spezifizierung kardialer Progenietoren an.

Untersuchung der Proliferationsrate nach dem Verlust der Xisl-1 Funktion

Für die Herzschleifenbildung ist es notwendig, dass die Zellzahl des linearen Herzschlauchs zunimmt. Dies konnte für *Xenopus* Embryonen bereits gezeigt werden. Im zentralen sich auffaltenden Teil des Herzschlauchs verdoppelt sich die Zellzahl während der Bildung des *Cor sigmoideum* (Mohun et al., 2000). Diese Zunahme der Zellzahl kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen könnte es durch die Proliferation der Kardiomyozyten zu der Zunahme der Zellzahl kommen, zum anderen könnten, wie in der Maus beschrieben, Xisl-1$^+$ Herzvorläuferzellen im Mesokardium proliferieren und dann in den Herzschlauch einwandern. Die beobachteten Phänotypen der inhibierten Herzschleifenbildung und der Verlust an kardialem Gewebe nach der islMO Injektion geben Hinweise darauf, dass Xisl-1 eventuell in diesen Strukturen die Zellteilung reguliert. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte die Proliferationsrate im dorsalen Mesokardium und im dorsalen Perikarddach in den Herzen von islMO injizierten Embryonen untersucht werden. Bei den islMO injizierten Embryonen waren diese Strukturen aber aufgrund des morphologischen Phänotyps nicht eindeutig zu erkennen. Die Bestimmung der Proliferationsrate im ganzen Herzen zeigte sowohl eine signifikante Reduktion der Anzahl mitotischer Zellen, als auch der Gesamtzellzahl, was zu einer nicht signifikant unterschiedlichen prozentualen

Proliferationsrate führt. Dieser Befund widerspricht den Daten aus der Maus, die eine verminderte Teilungsrate durch den Verlust der Isl-1 Funktion belegen (Cai et al., 2003). Die Proliferationsrate wurde am posterioren Ende des primären Herzschlauchs bestimmt. Wie zuvor erwähnt konnten Mohun und Kollegen (2000) zeigen, dass es vor allem im zentralen Teil des Herzens zu einer Zunahme an kardialen Zellen kommt, wobei dieser Befund auf einer Zellkernfärbung und einer numerischen Analyse beruht. Ob diese Zunahme der Zellzahl durch die Proliferation der Kardiomyozyten während der Herzschleifenbildung zustande kommt, ist nicht abschließend geklärt. In den Amnioten wurde eine Addition von Zellen am anterioren und posterioren Ende des linearen Herzschlauchs während der Bildung der Herzschleifen gezeigt (de la Cruz et al., 1977; Viragh und Challice, 1973). Diese Zellen stammen aus dem im anterioren splanchnischen Mesoderm lokalisierten AHF bzw. gehören der zweiten kardialen Vorläuferzellpopulation an (Waldo et al., 2001; Mjaatvedt et al., 2001; Kelly et al., 2001; Meilhac et al., 2004). Dieser Sachverhalt konnte für Amphibien bisher nicht bestätigt werden. Es ist möglich, dass in der anterioren bzw. der zentralen Region des Herzens oder in einem anderen Entwicklungsstadium eventuell doch eine veränderte Teilungsrate nach der islMO Injektion bestimmt werden könnte.
Der beobachtete morphologische Phänotyp geht nach den bisherigen Daten nicht auf eine verminderte Zellproliferation in islMO injizierten Embryonen zurück sondern wahrscheinlich auf einen gestörten Induktionsprozess der durch die Regulation früher kardialer Markergene gezeigt werden konnte.

Die Überexpression der Xisl-1 mRNA führt nicht zur Induktion eines kardialen Zellschicksals

Die Funktionsverluststudien konnten belegen, dass Xisl-1 notwendig ist für die normale Herzentwicklung in *Xenopus* Embryonen. Für wichtige Regulatoren der Herzentwicklung konnte gezeigt werden, dass sie ektopisch ein kardiales Zellschicksal induzieren können (z.B. Wnt-11 und Dkk-1 (Pandur et al., 2002; Schneider und Mercola, 2001). Es sollte im Folgenden der Frage nachgegangen werden, ob die Überexpression von *Xisl-1* mRNA für die Induktion von Herzmarkergenen und kontraktilem Gewebe ausreichend ist. Hierzu wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt. Zunächst sollte die Fähigkeit von Xisl-1, ein kardiales Zellschicksal zu induzieren, mittels animaler Kappen Explantate überprüft werden.
In animalen Kappen Explantaten, die mit *Xisl-1* mRNA injiziert und die mit Aktivin behandelt wurden, konnte durch semiquantitative RT-PCR die Induktion mehrerer

kardiovaskulärer Markergene (*FoxP1, GATA-4* und *–5* sowie *Xfli* und *Hex*) nachgewiesen werden. *Xisl-1* mRNA scheint also in einem, durch Aktivin induzierten, mesendodermalen Kontext in der Lage zu sein kardiovaskuläre Markergene zu induzieren. Für *Nkx2.5, cA und TnIc* konnte dies allerdings nicht gezeigt werden (nicht gezeigte Daten). Der animale Kappenassay stellt ein *ex vivo* System dar. Ein aussagekräftigerer experimenteller Ansatz ist die Überexpression von *Xisl-1* in ventralen Marginalzonen Explantaten (VMZ). In diesen Explantaten ist ein mesodermaler Kontext gegeben. Die Überexpression von *Xisl-1* in ventralen Marginalzonen Explantaten führte nicht zu einer ektopischen Induktion von kontraktilem Gewebe oder Herzschlauch ähnlichen Strukturen. Dieses Ergebnis zeigt, dass Xisl-1 nicht ausreichend ist, um ein kardiales Zellschicksal zu induzieren. Möglicherweise fehlen hierfür notwendige Interaktionspartner des LIM-Homeodomänen Transkriptionsfaktors, um entsprechende Gene zu aktivieren oder zu reprimieren. Ob Xisl-1 als transkriptioneller Aktivator oder Repressor wirkt oder ob die Funktion kontextabhängig ist, ist nicht geklärt. Für den T-Box-Domänen Transkriptionsfaktor Tbx20 wurde vor kurzem beschrieben, dass der Faktor kontextabhängig sowohl als transkriptioneller Aktivator als auch als Repressor fungieren kann (Plagemann und Yutzey, 2004; Stennard et al., 2003). Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass bisher noch für keinen der Transkriptionsfaktoren die von Herzvorläuferzellen exprimiert werden, eine ektopische Induktion eines kardialen Zellschicksals gezeigt werden konnte. Allerdings war es z.B. durch die Überexpression von *Nkx2.5* mRNA in der dorsalen Marginalzone möglich ein vergrößertes Herz nachzuweisen (Cleaver et al., 1996). Aufgrund dessen sollte durch die Überexpression in der dorsalen Marginalzone überprüft werden, ob die Xisl-1 Funktion *in situ* eine Expansion der kardialen Vorläuferzellpopulation bewirken kann. Zudem ist Isl-1 in der Maus als Faktor beschrieben, der für die Aufrechterhaltung des Progenietorstatus notwendig ist. Diese Funktion sollte auch in *Xenopus* Embryonen analysiert werden. Wenn Xisl-1 für die Aufrechterhaltung der Herzvorläuferzellpopulation notwendig sein sollte, könnte die Überexpression zu einer Expansion der *Nkx2.5* Expression und zu einer Repression der Expression von terminalen Differenzierungsmarkergenen, wie z.B. *TnIc* führen.

Nach der Injektion von *Xisl-1* mRNA in die dorsalen Marginalzone konnte keine Expansion kardialer Markergenen (weder *Nkx2.5* noch *TnIc*) oder ein morphologisch vergrößertes Herz beobachtet werden. In diesem Fall sollten die möglicherweise notwendigen Interaktionspartner vorhanden sein. Allerdings könnten diese nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen was ebenfalls eine mögliche, induzierende Wirkung von Xisl-1 verhindern würde. Ob die Xisl-1 Funktion für die Aufrechterhaltung des Progenietorstatus

notwendig ist, kann leider nicht beantwortet werden, da sowohl die Expression von *Nkx2.5* als auch die Expression von *TnIc* in knapp 20% aller Embryonen im St. 32 durch die Überexpression negativ reguliert wurde. Der beobachtete Phänotyp könnte durch verschiedene Funktionen von Xisl-1 in einem frühen und in einem späteren Entwicklungsstadium erklärt werden. Xisl-1 ist eventuell am Ende der Gastrulation dosisabhängig für die Spezifizierung bzw. die Expansion und Migration der Herzvorläuferzellen notwendig. Zum Zeitpunkt der Bildung des linearen Herzschlauchs ist aber die Aufrechterhaltung des Progenietorstatus der Herzvorläuferzellen von Xisl-1 abhängig. Mit der Injektion der *Xisl-1* mRNA in die dorsale Marginalzone im vier Zellstadium, kann nur die Funktion während früher Entwicklungsstadien untersucht werden, da durch den negativen frühen Effekt die spätere Funktion nicht mehr untersucht werden kann. Für Agtrl1b, das Ortholog von Xmsr in Zebrafisch, konnte der gleiche kardiale Phänotyp in Funktionsverluststudien und nach der Überexpression des Faktors detektiert werden. In diesem Fall konnte gezeigt werden, dass dieser Phänotyp durch die gestörte Migration der Herzvorläuferzellen entsteht. Wenn die Zellen nicht mehr wandern können, erhalten sie auch nicht mehr die notwendigen Signale zur weiteren Differenzierung (Scott et al., 2007). Eventuell ist ein ähnlicher Mechanismus im Falle der Xisl-1 Überexpression für die reduzierte Markergenexpression verantwortlich. Weitere Experimente mit hormoninduzierbaren Konstrukten könnten eine mögliche frühe und späte Funktion von Xisl-1 während der Kardiogenese des Krallenfroschs aufklären und eine definitive Aussage darüber zulassen, ob Xisl-1 für die Aufrechterhaltung einer kardialen Progenietorpopulation notwendig ist.

Interessanterweise zeigt die Überexpression von *Xisl-1* in der dorsalen Marginalzone aber noch einen anderen Phänotyp. 25% aller analysierten Embryonen im St.32 zeigen zwei nicht fusionierte Herzfelder. Ein ähnlicher Phänotyp konnte auch für andere Faktoren, die für die Entwicklung des kardiovaskulären Systems notwendig sind beschrieben werden. Die Überexpression des Xmsr Liganden *Apelin* führt zunächst ebenfalls zu einer gestörten Fusion der Herzfelder. Die Expression des terminalen Differenzierungsmarkers *TnIc* scheint reduziert zu sein. Die Fusion der Herzprimordien ist allerdings nur verzögert, da in einem späteren Entwicklungsstadium kein *Cardia bifida* Phänotyp mehr beobachtet werden kann, sondern nur ein morphologisch verändertes Herz. Embryonen, die mit *Apelin* bzw. *Xmsr* antisense Morpholino Oligonukleotid injiziert wurden zeigen ebenfalls diesen Phänotyp, der demjenigen der islMO injizierten Embryonen sehr ähnlich ist (Inui et al., 2006).

Xisl-1 ist notwendig für die normale Ausbildung des peripheren Gefäßsystems in Xenopus laevis

Die Entwicklung des Gefäßsystems wird durch zwei wichtige Prozesse gewährleistet. Die Vaskulogenese bezeichnet die *de novo* Induktion von endothelialen Progenietorzellen, unter Angiogenese versteht man dagegen das Auswachsen von Gefäßen aus bereits bestehenden. Grundsätzlich findet die Induktion der Angioblasten im gesamten Mesoderm mit Ausnahme des Kopfmesoderms statt (Fig.4; Coultas et al., 2005).
Xisl-1 Transkripte können in Strukturen des Gefäßsystems von *Xenopus* detektiert werden. Außerdem konnte für *Xisl-1, Xmsr* und *Xfli* (nicht gezeigte Daten) ein sehr ähnliches Expressionsmuster beobachtet werden. In animalen Kappen Explantaten ist zudem die Induktion diverser vaskulärer Markergene gezeigt worden. Dies weist auf eine Funktion von Xisl-1 während der Gefäßentwicklung des Froschembryos hin.
Aufgrund dieser Hinweise wurde die Expression der vaskulären Markergene *Xmsr*, *Ami* und *Flk-1* nach islMO Injektion untersucht. Die Analyse zeigt eine Abhängigkeit der Markergenexpression von der Xisl-1 Funktion. Am deutlichsten betroffen ist die Expression der Gene im Vitellinvenen Netzwerk und in den Aortenbögen. Die Angioblasten die diese Strukturen bilden, werden im anterio-ventralen Mesoderm spezifiziert (Walmsley et al., 2002), eine Region in der auch *Xisl-1* exprimiert wird. Der mildere Phänotyp zeigt induzierte Angioblasten, aber die Ausbildung des Vitellinvenen Netzwerks ist gestört. In diesem Fall ist die Tubulogenese beeinträchtigt. Dieser Prozess wird durch Faktoren, die im Endoderm gebildet werden reguliert. In der Maus ist die *Sonic Hedgehog (Shh)* Expression im Endoderm von der Isl-1 Funktion abhängig (Lin et al., 2006). Es ist gezeigt worden, dass Shh, welches im Endoderm gebildet wird für die Tubulogenese in den Amnioten notwendig ist (Vokes et al., 2004). Möglicherweise ist also Xisl-1 in einer Signalkaskade zur Regulation der Ausbildung von primitiven Gefäßen oberhalb von *Shh* anzusiedeln. Weitere Experimente die diese Verbindung zeigen wären notwendig und würden interessante Einblicke in die molekularen Grundlagen der Gefäßentwicklung der Amphibien bieten. Inui und Kollegen (2006) haben, wie bereits erwähnt, gezeigt, dass der Verlust der Xmsr (G-Protein gekoppelter Rezeptor) bzw. der Apelin (Peptidligand von Xmsr) Funktion und der „knock down“ von *Xfli* zu einer negativen Regulation von kardiovaskulären Markergenen führt und zu einem morphologischen Herzphänotyp. Im Zebrafisch konnte in zwei Studien belegt werden, das Agtrl1b/Apelin für die Migration von kardialen Progenietoren und Zellen des Seitenplattenmesoderms notwendig ist (Zeng et al., 2007; Scott et al., 2007). In

Funktionsverluststudien und durch die Überexpression der mRNA der beiden Faktoren konnte ein deutlicher Herzphänotyp gezeigt werden. Die Vaskulogenese scheint in diesen Embryonen, ähnlich wie in *Xenopus* Embryonen, nicht gestört zu sein. Allerdings ist die Angiogenese, eventuell indirekt durch den Herzphänotyp, inhibiert (Scott et al., 2007). Scott und Kollegen (2007) erklären zudem, dass es erste noch nicht publizierte Hinweise darauf gibt, dass die agtrl1b Knockout Maus einen kardiovaskulären Phänotyp aufweist. Die Funktion von Agtrl1b/Apelin scheint in den Vertebraten konserviert zu sein. Beide Faktoren besitzen eine wichtige Funktion während der Bildung des Herz-Kreislaufsystems der Wirbeltiere. Möglicherweise reguliert Xmsr/Apelin auch in *Xenopus* die Migration der Vorläuferzellpopulationen wie es im Zebrafisch gezeigt werden konnte.

In *Xenopus* Embryonen ist gezeigt worden, dass die Expression von *Xmsr* und *Nkx2.5* zumindest teilweise im anterio-ventralen Mesoderm eines St. 22 Embryos überlappt (Inui et al., 2006). *Xisl-1* mRNA ist ebenfalls in dieser Region exprimiert. Diese Befunde legen eine multipotente kardiovaskuläre Progenietorpopulation in *Xenopus* nahe. Nach den Daten, die in dieser Arbeit präsentiert werden und den Erkenntnissen aus dem Säugetiermodell (Moretti et al., 2006), gibt es deutliche Hinweise darauf, dass Isl-1 im Zusammenspiel mit anderen kardialen bzw. endothelialen Markergenen (z.B. *Nkx2.5* und *Flk-1*) eine kardiovaskuläre Vorläuferzellpopulation definiert. Moretti und Kollegen (2006) beschreiben eine zunächst multipotente Zellpopulation welche die Markergene *isl-1, Nkx2.5* und *Flk-1* exprimiert. Diese Population ist nur kurze Zeit nachweisbar. Während der weiteren Entwicklung des Embryos trennt sich diese kardiovaskuläre Progenietorzellpopulation in eine isl-1^+/Flk-1^+ Zellpopulation und eine isl-1^+/Nkx2.5^+ Zellpopulation auf. Erstere bildet dann Endothelzellen und glatte Muskelzellen, wohingegen die zweite Zellpopulation Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen bildet (Abb. 22, Anton et al., 2007). Die Plastizität dieser Isl-1^+ multipotenten Vorläuferzellpopulation ist noch nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise markiert Isl-1 in frühen Stadien der Embryonalentwicklung eine mesodermale Subpopulation, wobei die Isl-1 Funktion nicht für alle gebildeten Zellpopulationen notwendig sein muss. Eine ähnliche Funktion konnte in Mausembryonen, für Flk-1 gezeigt werden. Der Rezeptor markiert eine große Bandbreite mesodermaler Zellpopulationen, die aber abgesehen von den hämatopoetischen und den endothelialen Vorläuferzellen nicht auf die Flk-1 Funktion angewiesen sind (Ema et al., 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen den Befund einer multipotenten kardiovaskulären Zellpopulation, welche sowohl endotheliale als auch kardiale Vorläuferzellen bilden kann.

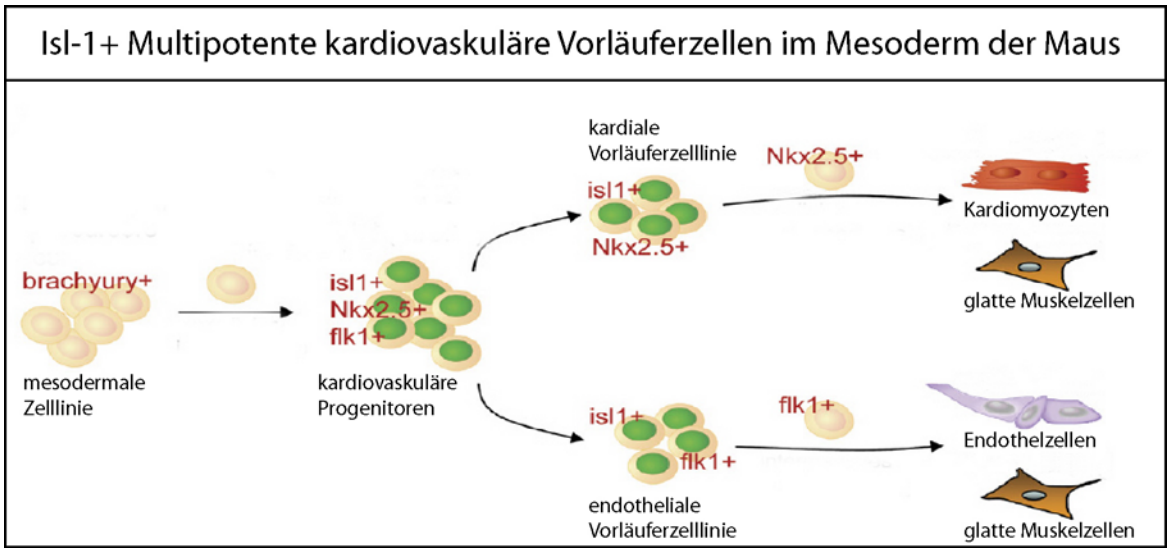


Abb. 22 Isl-1 markiert kardiovaskuläre Progenietorzellen im Mesoderm. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten unterstützen Befunde aus der Maus, wonach im Mesoderm eine transiente kardiovaskuläre Zellpopulation detektierbar ist, welche sowohl zu Kardiomyozyten als auch zu Endothelzellen und zu glatten Muskelzellen differenzieren kann (verändert nach Moretti et al., 2006).

Die Rolle von *Xisl-1* als Markergen für eine multipotente mesodermale Vorläuferzellpopulation eröffnet sehr interessante Perspektiven für zukünftige Studien. So ist es von großem Interesse diese Vorläuferzellpopulation formal in *Xenopus* nachzuweisen, um Rückschlüsse auf evolutionäre Aspekte der Entwicklung des kardiovaskulären Systems zu erhalten. Das molekulare Verständnis sowohl der Kardiogenese als auch der Vaskulogenese sowie der morphologischen Aspekte dieser Prozesse kann großen Einfluss auf die Entwicklung von neuen Therapiemethoden genetisch bedingter Erkrankungen dieser Organe haben.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die zeitliche und räumliche Expression von *Xenopus Islet-1* (*Xisl-1*) charakterisiert. Zudem wurde die Funktion des Transkriptionsfaktors während der Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems untersucht. Das Xisl-1 Protein ist unter den Vertebraten hoch konserviert. Die Expression von *Xisl-1* konnte spezifisch in Herzvorläuferzellen, Strukturen des Gefäßsystems sowie in den Plakoden bzw. den Ganglien einiger kranialer Nerven und in endodermalem Gewebe visualisiert werden.

Vor kurzem wurde *Isl-1* als ein Markergen des anterioren oder sekundären Herzfelds (AHF) in der Maus beschrieben (Cai et al., 2003). Es war also von Interesse, die Existenz des AHF auch in Amphibien nachzuweisen. Auch wenn dieser formale Nachweis in *Xenopus* im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen ist, so gibt es doch starke Hinweise darauf, dass die nachgewiesene *Xisl-1*$^+$ Herzvorläuferzellpopulation das AHF bildet. Die Expression von *Xisl-1* konnte in einer sehr ähnlichen anatomischen Lokalisation visualisiert werden. Diese Herzvorläuferzellen bilden wahrscheinlich im Frosch ähnlich Kompartimente wie im Säuger.

Die Expression von *Xisl-1* in kardialem Gewebe implizierte eine wichtige Rolle für Xisl-1 während der normalen Herzentwicklung von *Xenopus*. Die Funktion von Xisl-1 während der Organogenese des Herzens wurde mittels Funktionsverluststudien und durch die Überexpression der Xisl-1 mRNA untersucht. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass der Verlust der Xisl-1 Funktion zu einem morphologischen Herzphänotyp führt. Mittels der WMISH (Ganzkeimfärbung) und der semiquantitativen RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion) konnte gezeigt werden, dass die Xisl-1 Funktion für die Expression kardialer Markergene notwendig ist. Die Zellproliferation scheint nicht von Xisl-1 reguliert zu werden. Aus diesen Untersuchungen wurde ersichtlich, dass Xisl-1 Teil des komplexen Netzwerks an Regulatoren ist, dass der normalen Herzentwicklung zugrunde liegt.

Die Überexpression von Xisl-1 in dorsalen oder ventralen Marginalzone Explantaten oder in ganzen Embryonen führte nicht zu einer Induktion eines kardialen Zellschicksals, aber zu einer gestörten Ausbildung des linearen Herzschlauchs. Dies deutet eine dosisabhängige Funktion des Transkriptionsfaktors während der Herzentwicklung an.

Der Verlust der Xisl-1 Funktion führt außerdem zu einer gestörten Expression endothelialer Markergene. Xisl-1 ist somit notwendig für die Entwicklung des Gefäßsystems.

Xisl-1 konnte aufgrund der Daten dieser Arbeit als wichtiger Regulator der Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems von *Xenopus* laevis beschrieben werden.

8 Summary

In this study the spatial and temporal expression pattern of *Xenopus Islet-1* (*Xisl-1*) and its function during cardiovascular development was characterized. The aminoacid sequence of the vertebrate Isl-1 protein is highly conserved among species. This implicates a conserved role during development. *Xisl-1* is specifically expressed in heart precursor cells, vascular tissues, cranial placodes and ganglia and in the endoderm.

Recently, Isl-1 has been described as a marker gene for the anterior heart field (AHF) (Cai et al., 2003). It was of interest to demonstrate the existence of the AHF in amphibians. Although it was not possible to directly proof the precence of the AHF the data gives some hints that the *Xisl-1*$^+$ progentiors indeed constitute this precursor cell line. *Xisl-1*$^+$ cells were visualized in a very similar anatomical location and generate most likley the same cardiac compartments.

The expression of *Xisl-1* in cardiac tissues implicates a role for Xisl-1 during normal cardiogeneses in the frog. This issue was analysed using gain and loss of function studies. It was shown that loss of Xisl-1 function leads to a morphological heart phenotype. RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) and whole mount in situ hybridization analyses exhibit the requiremnet of Xisl-1 function for the expression of cardiac marker genes. Cell proliferation seems not to be regulated by Xisl-1. From this data it was obvious that Xisl-1 is part of the regulatory network which orchestrates normal cardiac development.

The gain-of-function experiments showed that Xisl-1 is not sufficient to induce a cardiac cell fate in dorsal or ventral marginal zone explants or whole embryos. On the contrary *Xisl-1* mRNA injection lead to an altered formation of the linear heart tube. This phenotype argues for a dose-dependend role of Xisl-1 during cardiac develolment.

Xisl-1 function is additionally required for normal organogenesis of the vascular system. Loss of Xisl-1 function inhibits expression of endothelial marker genes.

The data of this study established Xisl-1 as an important regulator of cardiovascular development.

9 Literatur

Abuin,A., Hansen,G.M., and Zambrowicz,B. (2007). Gene trap mutagenesis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 129-147.

Abu-Issa,R., Waldo,K., and Kirby,M.L. (2004). Heart fields: one, two or more? *Dev. Biol.* **272,** 281-285.

Akiyama,T., Kawasaki,Y. (2006). Wnt signalling and the actin cytoskeleton. Oncogene. **25**, 7538-44.

Altschul,S.F., Madden,T.L., Schäffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., and Lipman,**D.J.** (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res*. **25**:3389-3402.

Anton,R., Kuhl,M., and Pandur,P. (2007). A molecular signature for the "master" heart cell. *Bioessays.* **29,** 422-426.

Bang,A.G. and Goulding,M.D. (1996). Regulation of vertebrate neural cell fate by transcription factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6,** 25-32.

Baron,M. (2001). Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/Progenietor cells by hedgehog-mediated signals. *Differentiation.* **68,** 175-185.

Bodmer,R. (1993). The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila. *Development.* **118,** 719-729.

Brade,T., Manner,J., and Kuhl,M. (2006). The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodelling in the mature heart. *Cardiovasc. Res.* **72,** 198-209.

Brand,T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev. Biol.* **258,** 1-19.

Breckenridge,R.A., Mohun,T.J., and Amaya,E. (2001). A role for BMP signalling in heart looping morphogenesis in Xenopus. *Dev. Biol.* **232,** 191-203.

Briscoe,J., Pierani,A., Jessell,T.M., and Ericson,J. (2000). A homeodomain protein code specifies Progenietor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell.* **101,** 435-445.

Brown,D.D., Binder,O., Pagratis,M., Parr,B.A., and Conlon,F.L. (2003). Developmental expression of the Xenopus laevis Tbx20 orthologue. *Dev. Genes Evol.* **212,** 604-607.

Brown,D.D., Martz,S.N., Binder,O., Goetz,S.C., Price,B.M., Smith,J.C., and Conlon,F.L. (2005). Tbx5 and Tbx20 act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis. *Development.* **132,** 553-563.

Buckingham,M., Meilhac,S., and Zaffran,S. (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat. Rev. Genet.* **6,** 826-835.

Cai,C.L., Liang,X., Shi,Y., Chu,P.H., Pfaff,S.L., Chen,J., and Evans,S. (2003). Isl1 identifies a cardiac Progenietor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev. Cell.* **5,** 877-889.

Cai,C.L., Zhou,W., Yang,L., Bu,L., Qyang,Y., Zhang,X., Li,X., Rosenfeld,M.G., Chen,J., and Evans,S. (2005). T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis. *Development.* **132,** 2475-2487.

Charron,F. and Nemer,M. (1999). GATA transcription factors and cardiac development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10,** 85-91.

Chen,J.N. and Fishman,M.C. (1996). Zebrafish tinman homolog demarcates the heart field and initiates myocardial differentiation. *Development.* **122,** 3809-3816.

Chenn,A. and Walsh,C.A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science.* **%19;297,** 365-369.

Choi,K., Kennedy,M., Kazarov,A., Papadimitriou,J.C., and Keller,G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* **125,** 725-732.

Cleaver,O.B., Patterson,K.D., and Krieg,P.A. (1996). Overexpression of the tinman-related genes XNkx-2.5 and XNkx-2.3 in Xenopus embryos results in myocardial hyperplasia. *Development.* **122,** 3549-3556.

Cleaver,O., Krieg,P.A. (1998) VEGF mediates angioblast migration during development of the dorsal aorta in Xenopus. Development. **125**, 3905-14.

Coultas,L., Chawengsaksophak,K., and Rossant,J. (2005). Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature.* **438,** 937-945.

de la Cruz,M.V., Sanchez,G.C., Arteaga,M.M., and Arguello,C. (1977). Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *J. Anat.* **123,** 661-686.

Devic,E., Paquereau,L., Vernier,P., Knibiehler,B., and Audigier,Y. (1996). Expression of a new G protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in Xenopus laevis. *Mech. Dev.* **59,** 129-140.

Dodou,E., Verzi,M.P., Anderson,J.P., Xu,S.M., and 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,** 3931-3942.

Ema,M., Takahashi,S., and Rossant,J. (2006). Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal Progenietors. *Blood.* **107,** 111-117.

Ericson,J., Thor,S., Edlund,T., Jessell,T.M., and Yamada,T. (1992). Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene Islet-1. *Science.* **256,** 1555-1560.

Firulli,A.B., McFadden,D.G., Lin,Q., Srivastava,D., and Olson,E.N. (1998). Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat. Genet.* **18,** 266-270.

Firulli,A.B. (2003). A HANDful of questions: the molecular biology of the heart and neural crest derivatives (HAND)-subclass of basic helix-loop-helix transcription factors. *Gene.* **312:27-40.,** 27-40.

Fishman,M.C. and Olson,E.N. (1997). Parsing the heart: genetic modules for organ assembly. *Cell.* **91,** 153-156.

Foley,A.C. and Mercola,M. (2005). Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex. *Genes Dev.* **19,** 387-396.

Foley,A.C., Gupta,R.W., Guzzo,R.M., Korol,O., and Mercola,M. (2006). Embryonic heart induction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1080:85-96.,** 85-96.

Garriock,R.J., D'Agostino,S.L., Pilcher,K.C., and Krieg,P.A. (2005). Wnt11-R, a protein closely related to mammalian Wnt11, is required for heart morphogenesis in Xenopus. *Dev. Biol.* **279,** 179-192.

Gilbert,S.F., (ed). (2006). Developmental Biology 8th ed. *Sinauer Associates, Inc., Publishers*; Sunderland, Massachussetts, USA.

Goetz,S.C., Brown,D.D., and Conlon,F.L. (2006). TBX5 is required for embryonic cardiac cell cycle progression. *Development.* **133,** 2575-2584.

Gove,C., Walmsley,M., Nijjar,S., Bertwistle,D., Guille,M., Partington,G., Bomford,A., and Patient,R. (1997). Over-expression of GATA-6 in Xenopus embryos blocks differentiation of heart precursors. *EMBO J.* **16,** 355-368.

Green,J. (1999). The animal cap assay. *Methods Mol. Biol.* **127:1-13.,** 1-13.

Green,J.B. and Smith,J.C. (1990). Graded changes in dose of a Xenopus activin A homologue elicit stepwise transitions in embryonic cell fate. *Nature.* **347,** 391-394.

Grow,M.W. and Krieg,P.A. (1998). Tinman function is essential for vertebrate heart development: elimination of cardiac differentiation by dominant inhibitory mutants of the tinman-related genes, XNkx2-3 and XNkx2-5. *Dev. Biol.* **204,** 187-196.

Habener,J.F., Kemp,D.M., and Thomas,M.K. (2005). Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology.* **146,** 1025-1034.

Harvey,R.P., Rosenthal,N. (ed). (1999). Heart Development. *Academic Press*; San Diego, USA, London, UK.

Harvey,R.P. (2002). Patterning the vertebrate heart. *Nat. Rev. Genet.* **3,** 544-556.

Hausen,P., Riebesell,M. (1991). The early development of Xenopus laevis An Atlas of the Histology. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*; Tübingen.

Hobert,O., Westphal,H. (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* **16**, 75-83

Huber,T.L., Kouskoff,V., Fehling,H.J., Palis,J., and Keller,G. (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature.* **432,** 625-630.

Inui,M., Fukui,A., Ito,Y., and Asashima,M. (2006). Xapelin and Xmsr are required for cardiovascular development in Xenopus laevis. *Dev. Biol.* **298,** 188-200.

Inui,M. and Asashima,M. (2006). A novel gene, Ami is expressed in vascular tissue in Xenopus laevis. *Gene Expr. Patterns.* **6,** 613-619.

Iraha,F., Saito,Y., Yoshida,K., Kawakami,M., Izutsu,Y., Daar,I.O., and Maeno,M. (2002). Common and distinct signals specify the distribution of blood and vascular cell lineages in Xenopus laevis embryos. *Dev. Growth Differ.* **44,** 395-407.

Jiang,Y. and Evans,T. (1996). The Xenopus GATA-4/5/6 genes are associated with cardiac specification and can regulate cardiac-specific transcription during embryogenesis. *Dev. Biol.* **174,** 258-270.

Jiang,Y., Drysdale,T.A., and Evans,T. (1999). A role for GATA-4/5/6 in the regulation of Nkx2.5 expression with implications for patterning of the precardiac field. *Dev. Biol.* **216,** 57-71.

Kapuscinski,J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech. Histochem.* **70,** 220-233.

Karlsson,O., Thor,S., Norberg,T., Ohlsson,H., and Edlund,T. (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature.* **344,** 879-882.

Kattman,S.J., Huber,T.L., and Keller,G.M. (2006). Multipotent flk-1+ cardiovascular Progenietor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev. Cell.* **11,** 723-732.

Kelly,O.G. and Melton,D.A. (2000). Development of the pancreas in Xenopus laevis. *Dev. Dyn.* **218,** 615-627.

Kelly,R.G., Brown,N.A., and Buckingham,M.E. (2001). The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev. Cell.* **1,** 435-440.

Kelly,R.G. (2005). Molecular inroads into the anterior heart field. *Trends Cardiovasc. Med.* **15,** 51-56.

Kessel,M. and Gruss,P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell.* **67,** 89-104.

Key,B. and Devine,C.A. (2003). Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies. *Methods Cell Sci.* **25,** 1-6.

Kimelman,D. (2006). Mesoderm induction: from caps to chips. *Nat. Rev. Genet.* **7,** 360-372.

Koibuchi,N., Taniyama,Y., Nagao,K., Ogihara,T., Kaneda,Y., and Morishita,R. (2006). The effect of VEGF on blood vessels and blood cells during Xenopus development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344,** 339-345.

Kolker,S.J., Tajchman,U., and Weeks,D.L. (2000). Confocal imaging of early heart development in Xenopus laevis. *Dev. Biol.* **218,** 64-73.

Korzh,V., Edlund,T., and Thor,S. (1993). Zebrafish primary neurons initiate expression of the LIM homeodomain protein Isl-1 at the end of gastrulation. *Development.* **118,** 417-425.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227,** 680-685.

Laugwitz,K.L., Moretti,A., Lam,J., Gruber,P., Chen,Y., Woodard,S., Lin,L.Z., Cai,C.L., Lu,M.M., Reth,M. et al. (2005). Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature.* **433,** 647-653.

Levine,A.J., Munoz-Sanjuan,I., Bell,E., North,A.J., and Brivanlou,A.H. (2003). Fluorescent labeling of endothelial cells allows in vivo, continuous characterization of the vascular development of Xenopus laevis. *Dev. Biol.* **254,** 50-67.

Lickert,H., Kutsch,S., Kanzler,B., Tamai,Y., Taketo,M.M., and Kemler,R. (2002). Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm. *Dev. Cell.* **3,** 171-181.

Lin,L., Bu,L., Cai,C.L., Zhang,X., and Evans,S. (2006). Isl1 is upstream of sonic hedgehog in a pathway required for cardiac morphogenesis. *Dev. Biol.* **295,** 756-763.

Lyons,I., Parsons,L.M., Hartley,L., Li,R., Andrews,J.E., Robb,L., and 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,** 1654-1666.

Marvin,M.J., Di,R.G., Gardiner,A., Bush,S.M., and Lassar,A.B. (2001). Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.* **15,** 316-327.

McFadden,D.G., Barbosa,A.C., Richardson,J.A., Schneider,M.D., Srivastava,D., and Olson,E.N. (2005). The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development.* **132,** 189-201.

Meilhac,S.M., Esner,M., Kelly,R.G., Nicolas,J.F., and Buckingham,M.E. (2004). The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev. Cell.* **6,** 685-698.

Meyer,D., Stiegler,P., Hindelang,C., Mager,A.M., and Remy,P. (1995). Whole-mount in situ hybridization reveals the expression of the Xl-Fli gene in several lineages of migrating cells in Xenopus embryos. *Int. J. Dev. Biol.* **39,** 909-919.

Mjaatvedt,C.H., Nakaoka,T., Moreno-Rodriguez,R., Norris,R.A., Kern,M.J., Eisenberg,C.A., Turner,D., and Markwald,R.R. (2001). The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev. Biol.* **238,** 97-109.

Mohun,T., Orford,R., and Shang,C. (2003). The origins of cardiac tissue in the amphibian, Xenopus laevis. *Trends Cardiovasc. Med.* **13,** 244-248.

Mohun,T.J., Leong,L.M., Weninger,W.J., and Sparrow,D.B. (2000). The morphology of heart development in Xenopus laevis. *Dev. Biol.* **218,** 74-88.

Moody,S.A. (1987). Fates of the blastomeres of the 32-cell-stage Xenopus embryo. *Dev. Biol.* **122,** 300-319.

Moody,S.A. and Kline,M.J. (1990). Segregation of fate during cleavage of frog (Xenopus laevis) blastomeres. *Anat. Embryol. (Berl).* **182,** 347-362.

Moretti,A., Caron,L., Nakano,A., Lam,J.T., Bernshausen,A., Chen,Y., Qyang,Y., Bu,L., Sasaki,M., Martin-Puig,S. et al. (2006). Multipotent embryonic isl1+ Progenietor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell.* **127,** 1151-1165.

Naito,A.T., Shiojima,I., Akazawa,H., Hidaka,K., Morisaki,T., Kikuchi,A., and Komuro,I. (2006). Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 19812-19817.

Nakamura,T., Sano,M., Songyang,Z., and Schneider,M.D. (2003). A Wnt- and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 5834-5839.

Nascone,N. and Mercola,M. (1995). An inductive role for the endoderm in Xenopus cardiogenesis. *Development.* **121,** 515-523.

Newman,C.S., Chia,F., and Krieg,P.A. (1997). The XHex homeobox gene is expressed during development of the vascular endothelium: overexpression leads to an increase in vascular endothelial cell number. *Mech. Dev.* **66,** 83-93.

Nieto,M.A., Sargent,M.G., Wilkinson,D.G., and Cooke,J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science.* **264,** 835-839.

Noden,D.M. (1989). Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140,** 1097-1103.

Oettgen,P. (2001). Transcriptional regulation of vascular development. *Circ. Res.* **89,** 380-388.

Olson,E.N. (2006). Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science.* **313,** 1922-1927.

Pandur,P., Lasche,M., Eisenberg,L.M., and Kuhl,M. (2002). Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature.* **418,** 636-641.

Peterkin,T., Gibson,A., and Patient,R. (2003). GATA-6 maintains BMP-4 and Nkx2 expression during cardiomyocyte precursor maturation. *EMBO J.* **22,** 4260-4273.

Peterkin,T., Gibson,A., Loose,M., and Patient,R. (2005). The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16,** 83-94.

Pfaff,S.L., Mendelsohn,M., Stewart,C.L., Edlund,T., and Jessell,T.M. (1996). Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell.* **84,** 309-320.

Plageman,T.F., Jr. and Yutzey,K.E. (2004). Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development. *J. Biol. Chem.* **279,** 19026-19034.

Plageman,T.F., Jr. and Yutzey,K.E. (2005). T-box genes and heart development: putting the "T" in heart. *Dev. Dyn.* **232,** 11-20.

Pohl,B.S., Rossner,A., and Knochel,W. (2005). The Fox gene family in Xenopus laevis:FoxI2, FoxM1 and FoxP1 in early development. *Int. J. Dev. Biol.* **49,** 53-58.

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. et al. (2007). An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart Progenietor specification and proliferation. *Cell.* **128,** 947-959.

Raffin,M., Leong,L.M., Rones,M.S., Sparrow,D., Mohun,T., and Mercola,M. (2000). Subdivision of the cardiac Nkx2.5 expression domain into myogenic and nonmyogenic compartments. *Dev. Biol.* **218,** 326-340.

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.

Reiter,J.F., Alexander,J., Rodaway,A., Yelon,D., Patient,R., Holder,N., and Stainier,D.Y. (1999). Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev.* **13,** 2983-2995.

Ribeiro,I., Kawakami,Y., Buscher,D., Raya,A., Rodriguez-Leon,J., Morita,M., Rodriguez,E.C., and Izpisua Belmonte,J.C. (2007). Tbx2 and Tbx3 Regulate the Dynamics of Cell Proliferation during Heart Remodeling. *PLoS. ONE.* **2:e398.,** e398.

Risebro,C.A., Smart,N., Dupays,L., Breckenridge,R., Mohun,T.J., and Riley,P.R. (2006). Hand1 regulates cardiomyocyte proliferation versus differentiation in the developing heart. *Development.* **133,** 4595-4606.

Roman,B.L. and Weinstein,B.M. (2000). Building the vertebrate vasculature: research is going swimmingly. *Bioessays.* **22,** 882-893.

Rupp,R.A., Snider,L., and Weintraub,H. (1994). Xenopus embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev.* **8,** 1311-1323.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning A laboratory manual 2nd ed.*Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, USA

Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74,** 5463-5467.

Sater,A.K. and Jacobson,A.G. (1989). The specification of heart mesoderm occurs during gastrulation in Xenopus laevis. *Development.* **105,** 821-830.

Sater,A.K. and Jacobson,A.G. (1990). The role of the dorsal lip in the induction of heart mesoderm in Xenopus laevis. *Development.* **108,** 461-470.

Sato,N. (2004). Gene delivery into the chicken embryo by using replication-competent retroviral vectors. *Fukushima J. Med. Sci.* **50,** 37-46.

Schlosser G, Ahrens K. (2004) Molecular anatomy of placode development in Xenopus laevis. Dev Biol. **271**, 439-66.

Schneider,V.A. and Mercola,M. (2001). Wnt antagonism initiates cardiogenesis in Xenopus laevis. *Genes Dev.* **15,** 304-315.

Schultheiss,T.M., Xydas,S., and Lassar,A.B. (1995). Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development.* **121,** 4203-4214.

Scott,I.C., Masri,B., D'Amico,L.A., Jin,S.W., Jungblut,B., Wehman,A.M., Baier,H., Audigier,Y., and Stainier,D.Y. (2007). The g protein-coupled receptor agtrl1b regulates early development of myocardial Progenietors. *Dev. Cell.* **12,** 403-413.

Shi,Y., Katsev,S., Cai,C., and Evans,S. (2000). BMP signaling is required for heart formation in vertebrates. *Dev. Biol.* **224,** 226-237.

Singh,M.K., Christoffels,V.M., Dias,J.M., Trowe,M.O., Petry,M., Schuster-Gossler,K., Burger,A., Ericson,J., and Kispert,A. (2005). Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2. *Development.* **132,** 2697-2707.

Sive,H.L., (ed). (2000). Early Development of Xenopus laevis A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* Cold Spring Harbor, New York, USA

Smith,S.J., Kotecha,S., Towers,N., and Mohun,T.J. (2000). Xenopus Hand2 expression marks anterior vascular Progenietors but not the developing heart. *Dev. Dyn.* **219,** 575-581.

Sparrow,D.B., Kotecha,S., Towers,N., and Mohun,T.J. (1998). Xenopus eHAND: a marker for the developing cardiovascular system of the embryo that is regulated by bone morphogenetic proteins. *Mech. Dev.* **71,** 151-163.

Srivastava,D., Thomas,T., Lin,Q., Kirby,M.L., Brown,D., and Olson,E.N. (1997). Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat. Genet.* **16,** 154-160.

Srivastava,D. (2006). Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell.* **126,** 1037-1048.

Stalsberg,H. and DeHaan,R.L. (1969). The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev. Biol.* **19,** 128-159.

Stennard,F.A., Costa,M.W., Elliott,D.A., Rankin,S., Haast,S.J., Lai,D., McDonald,L.P., Niederreither,K., Dolle,P., Bruneau,B.G. et al. (2003). Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev. Biol.* **262,** 206-224.

Stennard,F.A. and Harvey,R.P. (2005). T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. *Development.* **132,** 4897-4910.

Stern,C.D. (2005). The chick; a great model system becomes even greater. *Dev. Cell.* **8,** 9-17.

Sun,Y., Liang,X., Najafi,N., Cass,M., Lin,L., Cai,C.L., Chen,J., and Evans,S.M. (2007). Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev. Biol.* **304,** 286-296.

Szeto,D.P., Griffin,K.J., and Kimelman,D. (2002). HrT is required for cardiovascular development in zebrafish. *Development.* **129,** 5093-5101.

Takeuchi,J.K., Mileikovskaia,M., Koshiba-Takeuchi,K., Heidt,A.B., Mori,A.D., Arruda,E.P., Gertsenstein,M., Georges,R., Davidson,L., Mo,R. et al. (2005). Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development. *Development.* **132,** 2463-2474.

Thomas,T., Yamagishi,H., Overbeek,P.A., Olson,E.N., and Srivastava,D. (1998). The bHLH factors, dHAND and eHAND, specify pulmonary and systemic cardiac ventricles independent of left-right sidedness. *Dev. Biol.* **196,** 228-236.

Thor,S. and Thomas,J.B. (1997). The Drosophila islet gene governs axon pathfinding and neurotransmitter identity. *Neuron.* **18,** 397-409.

Togi,K., Kawamoto,T., Yamauchi,R., Yoshida,Y., Kita,T., and Tanaka,M. (2004). Role of Hand1/eHAND in the dorso-ventral patterning and interventricular septum formation in the embryonic heart. *Mol. Cell Biol.* **24,** 4627-4635.

Togi,K., Yoshida,Y., Matsumae,H., Nakashima,Y., Kita,T., and Tanaka,M. (2006). Essential role of Hand2 in interventricular septum formation and trabeculation during cardiac development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343,** 144-151.

Tonissen,K.F., Drysdale,T.A., Lints,T.J., Harvey,R.P., and Krieg,P.A. (1994). XNkx-2.5, a Xenopus gene related to Nkx-2.5 and tinman: evidence for a conserved role in cardiac development. *Dev. Biol.* **162,** 325-328.

Viragh,S. and Challice,C.E. (1973). Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse. *J. Ultrastruct. Res.* **42,** 1-24.

Vogeli,K.M., Jin,S.W., Martin,G.R., and Stainier,D.Y. (2006). A common Progenietor for haematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula. *Nature.* **443,** 337-339.

Vokes,S.A., Yatskievych,T.A., Heimark,R.L., McMahon,J., McMahon,A.P., Antin,P.B., and Krieg,P.A. (2004). Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development.* **131,** 4371-4380.

Waldo,K.L., Kumiski,D.H., Wallis,K.T., Stadt,H.A., Hutson,M.R., Platt,D.H., and Kirby,M.L. (2001). Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development.* **128,** 3179-3188.

Walmsley,M., Ciau-Uitz,A., and Patient,R. (2002). Adult and embryonic blood and endothelium derive from distinct precursor populations which are differentially programmed by BMP in Xenopus. *Development.* **129,** 5683-5695.

Walters,M.J., Wayman,G.A., and Christian,J.L. (2001). Bone morphogenetic protein function is required for terminal differentiation of the heart but not for early expression of cardiac marker genes. *Mech. Dev.* **100,** 263-273.

Wang,B., Weidenfeld,J., Lu,M.M., Maika,S., Kuziel,W.A., Morrisey,E.E., Tucker,P.W. (2004) Foxp1 regulates cardiac outflow tract, endocardial cushion morphogenesis and myocyte proliferation and maturation. Development. **131**, 4477-87.

Wardle,F.C. and Sive,H.L. (2003). What's your position? the Xenopus cement gland as a paradigm of regional specification. *Bioessays.* **25,** 717-726.

Warkman,A.S. and Krieg,P.A. (2007). Xenopus as a model system for vertebrate heart development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18,** 46-53.

Wendler,C.C. and Rivkees,S.A. (2006). Sphingosine-1-phosphate inhibits cell migration and endothelial to mesenchymal cell transformation during cardiac development. *Dev. Biol.* **291,** 264-277.

Wilson,L. and Maden,M. (2005). The mechanisms of dorso-ventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev. Biol*. **282**, 1-13.

Wolpert,L., (ed). (1999). Entwicklungsbiologie. *Spektrum Akademischer Verlag GMBH*, Heidelberg, Berlin.

Wu,S.M., Fujiwara,Y., Cibulsky,S.M., Clapham,D.E., Lien,C.L., Schultheiss,T.M., and Orkin,S.H. (2006). Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell.* **127,** 1137-1150.

Yochem,J. and Herman,R.K. (2003). Investigating C. elegans development through mosaic analysis. *Development.* **130,** 4761-4768.

Yuan,S. and 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,** 204-207.

Zeisberg,E.M., Ma,Q., Juraszek,A.L., Moses,K., Schwartz,R.J., Izumo,S., and Pu,W.T. (2005). Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *J. Clin. Invest.* **115,** 1522-1531.

Zeng,X.X., Wilm,T.P., Sepich,D.S., and Solnica-Krezel,L. (2007). Apelin and its receptor control heart field formation during zebrafish gastrula

10 Anhang

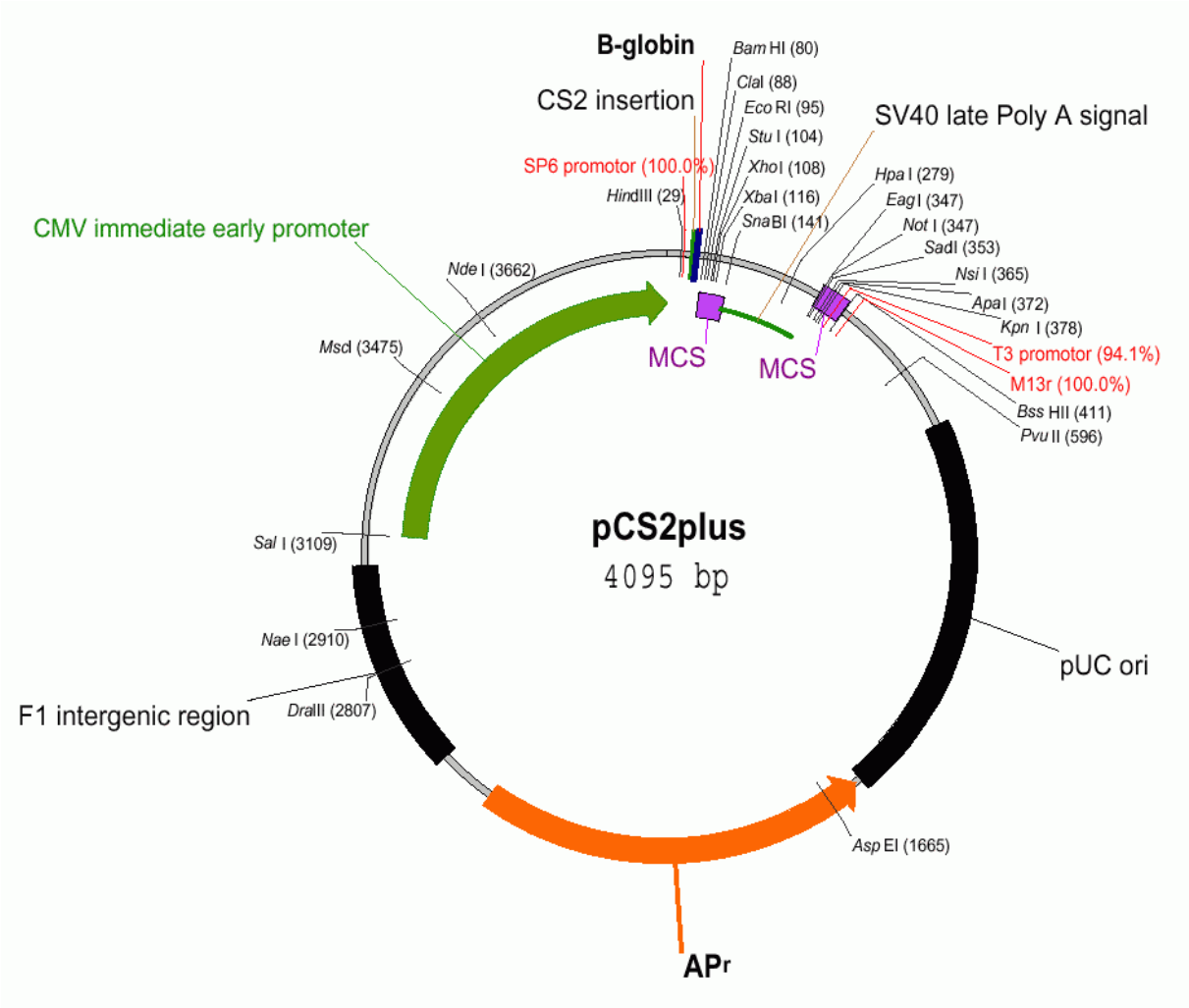
10.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
agtrl1b	*angiotensin related 1b*
AHF	anteriores Herzfeld
Amp	Ampicillin
Ang	*Angiopoitin*
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
AV-Knoten	Atrio-ventrikular-Knoten
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BMP-4	*Bone morphogenetic protein 4 (Knochenwachstumsfaktor 4)*
bp	Basenpaar
BrdU	5-Bromo-2'-deoxy-Uridin
cA	*cardiac-α-actin*
cDNA	copy DNA
CMO	Kontrollmorpholino
dam	Dam Methylase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrrocarbonat
DIG	Digoxygenin
Dkk-1	*Dickkopf 1*
DMZ	dorsale Marginalzone
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dn-Wnt-11	*dominant negatives Wnt 11*
DTT	Dithiothreitol
DWMISH	doppel whole mount in situ Hybridisierung
FGF	*Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten Wachstumsfaktor)*
Flk-1	*fetal liver kinase 1*
Flt-1	*Fms-like tyrosine kinase 1*
FLUO	Fluoresceine
FoxP1	*Forkhead Homeobox Transkriptionsfaktor P1*
Frzb	*Frizzled b*
GFP	*green fluorescence protein (grün fluoreszierendes Protein)*
H4	*Histon 4*
HAND	*Heart and neural crest derived*
HIF-1α	*hypoxia inducible factor 1α*
Hox	*Homeobox*
Ihh	*indian hedgehog*
Isl-1/Xisl-1	*(Xenopus) Islet-1*
IslMO	Islet-1 Morpholino
JNK	*jun-N-terminale Kinase*
kb	Kilobasen
LIM	***L**in11, **I**sl-1 und **M**ec-3*

MBSH	Modified Barts saline High salt
Mef2c	*Myocyte enhancer factor 2c*
MEM	MOPS, EGTA $MgSO_4$
MEMFA	MOPS, EGTA $MgSO_4$ Formaldahyd
Morpholino	antisense Morpholino Oligonukleotid
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Boten Ribonukleinsäure)
NBT	4-Nitroblau Tetrazoliumchlorid
Nkx	*Homeodomänen Transkriptionsfaktoren der Nk-Klasse*
ORF	offener Leserahmen
PBS	phospate buffered saline
PBST	Posphate buffered saline Tween20
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PDGF	*Platelet derived Growth Factor ((Blut)Blättchen Wachstumsfaktor)*
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SAP	shrimp alkaline phosphatase
Scl	*Selenocysteinlyase*
SDS	sodium dodecyl sulfate
SHF	sekundäres Herzfeld
Shh	*sonic hedgehog*
SSC	Sodium Chloride Sodium Citrate
St.	Stadium
TBE	Tris Borat EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline Tween20
Tbx	*T-Box*
TE	Tris EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β	*Tumor growth factor β (Tumor Wachstumsfaktor β)*
Tie	*Tyrosine Kinase receptor*
TnIc	*Troponin Ic*
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslated region (nicht translatierter Abschnitt)
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
VMZ	ventrale Marginalzone
WMISH	whole mount in situ hybridization (Ganzkeimfärbung)
WT	Wildtypembryonen
Xbra	*Xenopus Brachyury*
Xfli/Fli-1	*(Xenopus) Friend leukemia intergration 1*
Xmsr	*Xenopus mesenchyme associated serpentine recptor*
Xnr	*Xenopus Nodal related (Xenopus Nodal verwandt)*
Xwnt-8	*Xenopus Wnt-8 (Wnt: Kombination aus wingless und int-1)*

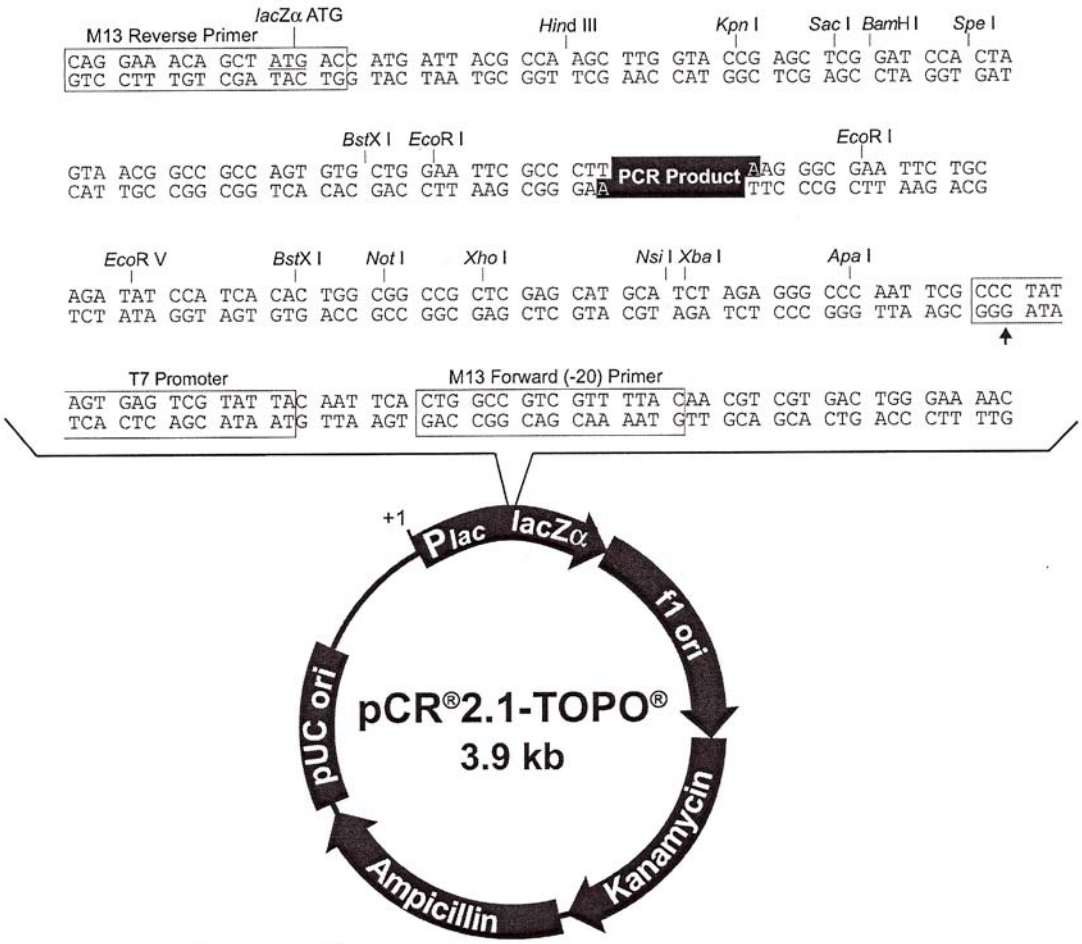
10.2 Vektorkarten

10.2.1 pCS2+ Vektorkarte



Das Xisl-1 cDNA Konstrukt wurde über die Schnittstellen EcoRI und XhoI in den pCS2+ Vektor kloniert.

10.2.2 pCR2.1 TOPO® Vektorkarte (Invitrogen®)



Comments for pCR®2.1-TOPO®
3931 nucleotides

*Lac*Zα fragment: bases 1-547
M13 reverse priming site: bases 205-221
Multiple cloning site: bases 234-357
T7 promoter/priming site: bases 364-383
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
f1 origin: bases 548-985
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
pUC origin: bases 3136-3809

10.3 Xisl-1 Sequenzen

10.3.1 Xisl-1 cDNA Sequenz

GAATTCGGCACGAGCTGACACAATTTCACTGTGGACATTACACCCTCTAACAGCT
ATGGGAGAT**ATG**GGAGACCCACCAAAAAAAAAGCGCCTGATTTCTCTGTGTGTT
GGATGCGGGAATCAGATCCACGACCAATATATACTGAGGGTTTCCCCGGACTTGG
AGTGGCACGCAGCTTGCCTCAAATGCGCAGAATGTAGCCAATACCTGGATGAGA
GCTGCACTTGTTTTGTTAGGGATGGCAAAACCTACTGTAAAAGGGACTATATCAG
GTTGTACGGGATCAAGTGCGCCAAGTGCAACATCGGCTTCAGCAAGAACGACTTC
GTCATGAGGGCTCGCTCCAAGGTCTATCACATCGAGTGTTTCCGCTGCGTGGCGT
GTAGTCGCCAACTGATCCCGGGGGACGAGTTCGCGTTGAGGGAGGACGGACTCTT
CTGTCGGGCAGACCACGACGTGGTGGAAAGGGCCAGCTTGGGGGGCAGCGANCC
TCTCAGTCCCCTTCACCCAGGAAGACCCCTACAGATGGCAGCAGAACCCATTTGT
GCCCGGCAGCCCGCGCTCCGACCCCACGTGCACAAGCAGCCAGAGAAGACCACC
AGGGTCAGGACGGTTCTTAATGAGAAGCAACTTCACACCTTGAGGACCTGCTACG
CTGCCAACCCCAGGCCTGATGCTCTGATGAAGGAACAGCTCGTGGAAATGACTGG
ACTCAGTCCCAGGGTCATCAGGGTCTGGTTTCAGAACAAGAGGTGCAAGGACAA
AAAGAGAAGCATCCTGATAAAGCAGCTACAGCAACAGCAACCTAACGACAAAAC
CAATATACAAGGGATGACAGGGACCCCTATGGTGGCCTCCAGTCCCGAAAGACA
CGACGGTGGGTTACAGGCGAACCCGGTGGAAGTGCAGACTTATCAGCCCCCCTG
GAAAGTCCTCAGTGACTTTGCCCTACAGAGTGACATTGATCAGCCGGCCTTCAGC
AACTGACCTGTTTCTCACAGGTTAATTTTTCAGAAGGAGGACCTGGCTCTAACTCT
ACAGGGAGTGAGGTGGNCTCCATGTCCTCCCAGCTCCCAGATACCCCAAACAGCA
TGGTAGCCAGCCCTATAGAGGCATGATGGGCATGGACTGGTTCCCTCTGTTGAGG
GCAAAGCTTGGACTGAAAGGAAGTGTTTTAGGACCCAGCAGACAGAGAATCCAG
CCAACTCCATAGGATGCGGGGCCGCCTACAGAACATGGGATGGCAGCCACACTG
TGAAGACAATCATGGGATCTTACTAGGAGTGAAGGACAAGGACATGGTGGTTGG
AGTATCACGGCAGACAAGATTGAGTGCTGTAGAGGATTTCTATCTATGGATCTCC
AAAAATAGCATTTAACCTTCCCCCCATACCCCCCATTGGAACATCCCAGAACAGA
CCAAGATGGACCCAGATAGGAGGGATCACCCTAATCCCAATGGTGCTTCTTTTAT
CTCTCCTGACATCACTTAATCACTGCCCTGCCAAACAGGAGCTGCGATCGATCTG
CAGGCAGCACCCCAGACTCAAGTTAAAGGGACNGTGCTTGGGGATCCCTGCAGG
GTGAGATGTTGGAGTTGCCATGTAGTGTTTCACCTGGGGGTGTGGAAATCCAGGT
CGCCTATAGCATGCACCACTTGTCCTTTCTCATGAAACCTTATTAACGTTAAAAAA
AACTACATTAATGGGGGGGGGGGGAGTAAAACAAAGACAACAGCTAAAGACACT
GCTTATTTTTTTTTCCAATATAATTTTTTTTTTTTTTTAATGCTCAAACCAAGTCTA
GGAAGCATCGCAACAACAAGGTATACCTCTCTCTCTCTCTGCCACATGCGTCTCT
GGATTGCGTCTGATTCTTGTCTGTCCAAGGACTTTGATTTTTTTTGTTGCCCCCAA
AGATGTGTATAGTTATCGGTTCAAACGACTGTTCCTCTCTGGAAATAAAGAGAAA
AAAAAGGCAGCATTTTTTTTTTTTGTTTGCTCTTGAATTGCAAATTATAAAGTAAT
TTATTATTTATTGTCGGAAGACTTGCCACTTTTCATGTTTATTTGACTATATTTNNT
GTTTGCTGAAGTAAAAATATCGATTAAAAAAAAAAANAAAAAAACTCGAG

10.3.2 Xisl-1 Protein Sequenz

Xisl-1 Proteinsequenz

```
  1 M  G  D  M  G  D  P  P  K  K  K  R  L  I  S 15
 16 L  C  V  G  C  G  N  Q  I  H  D  Q  Y  I  L 30
 31 R  V  S  P  D  L  E  W  H  A  A  C  L  K  C 45
 46 A  E  C  S  Q  Y  L  D  E  S  C  T  C  F  V 60
 61 R  D  G  K  T  Y  C  K  R  D  Y  I  R  L  Y 75
 76 G  I  K  C  A  K  C  N  I  G  F  S  K  N  D 90
 91 F  V  M  R  A  R  S  K  V  Y  H  I  E  C  F 105
106 R  C  V  A  C  S  R  Q  L  I  P  G  D  E  F 120
121 A  L  R  E  D  G  L  F  C  R  A  D  H  D  V 135
136 V  E  R  A  S  L  G  G  S  D  P  L  S  P  L 150
151 H  P  G  R  P  L  Q  M  A  A  E  P  I  C  A 165
166 R  Q  P  A  L  R  P  H  V  H  K  Q  P  E  K 180
181 T  T  R  V  R  T  V  L  N  E  K  Q  L  H  T 195
196 L  R  T  C  Y  A  A  N  P  R  P  D  A  L  M 210
211 K  E  Q  L  V  E  M  T  G  L  S  P  R  V  I 225
226 R  V  W  F  Q  N  K  R  C  K  D  K  K  R  S 240
241 I  L  I  K  Q  L  Q  Q  Q  Q  P  N  D  K  T 255
256 N  I  Q  G  M  T  G  T  P  M  V  A  S  S  P 270
271 E  R  H  D  G  G  L  Q  A  N  P  V  E  V  Q 285
286 T  Y  Q  P  P  W  K  V  L  S  D  F  A  L  Q 300
301 S  D  I  D  Q  P  A  F  Q  Q  L  T  C  F  S 315
316 Q  V  N  F  S  E  G  G  P  G  S  N  S  T  G 330
331 S  E  V  A  S  M  S  S  Q  L  P  D  T  P  N 345
346 S  M  V  A  S  P  I  E  A  * 354
```

Sequenz der Proteindomänen von Xisl-1

>XISL-1 LIM1:

```
16 L  C  V  G  C  G  N  Q  I  H  D  Q  Y  I  L 30
31 R  V  S  P  D  L  E  W  H  A  A  C  L  K  C 45
46 A  E  C  S  Q  Y  L  D  E  S  C  T  C  F  V 60
61 R  D  G  K  T  Y  C  K  R  D
```

>XISL-1 LIM2:

```
    K  C  A  K  C  N  I  G  F  S  K  N  D 90
 91 F  V  M  R  A  R  S  K  V  Y  H  I  E  C  F 105
106 R  C  V  A  C  S  R  Q  L  I  P  G  D  E  F 120
121 A  L  R  E  D  G  L  F  C  R  A  D
```

>XISL-1 HOX:

```
  181 T  T  R  V  R  T  V  L  N  E  K  Q  L  H  T 195
  196 L  R  T  C  Y  A  A  N  P  R  P  D  A  L  M 210
  211 K  E  Q  L  V  E  M  T  G  L  S  P  R  V  I 225
  226 R  V  W  F  Q  N  K  R  C  K  D  K  K  R  S 240
  241 I  L  I
```

10.4 Hardware und Software

Die Datenverarbeitung erfolgte mit einem Macintosh iMac G5 und einem Acer PC. Die Bildverarbeitung wurde mit Adobe Photoshop 7.0 (Mac) bzw. Photoshop Elements 1.0.1 (PC) und mit Adobe Illustrator 10.0.3 (Mac) bzw. Adobe Illustrator 10 (PC) durchgeführt. Die Textverarbeitung wurde mit Word X für Mac (2001) und Word 2000 (PC) durchgeführt.

Der BLAST-Sequenzvergleich wurde über die Webseite des NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) durchgeführt (http://130.14.29.110/BLAST/). Die Gesamtheit der Sequenzen von Genbank (National Institute of Health (NIH), USA) wurde hierbei durchsucht (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/).

Offene Leserahmen wurden durch die Software "ORFinder" des NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/) identifiziert.

Primer wurden mittels der Software "Primer3" (http://frodo.wi.mit.edu/) entworfen.

Alignments wurden durch die "DiAlign Software" (Genomatix; http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl) durchgeführt.

Proteindomänen wurden durch die Software "SMART" (http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl) ermittelt

Lebenslauf

Name: Brade
Vornamen: Thomas Ulrich
geboren am: 02.02. 1977 in Ulm

Schulbildung:

1983 – 1987: Grundschule Tomerdingen
1987 – 1993: Realschule Dornstadt; Abschluss: Mittlere Reife
1993 – 1996: Valckenburg Schule Ulm, Ernährungswissenschaftliches Gymnasium;
Abschluss: Abitur

Hochschulbildung:

1996 – 2002: Studium der Biologie an der Universität Ulm

Februar 2001- Oktober 2001: Diplomprüfungen in Mikrobiologie, medizinischer Mikrobiologie, Genetik und analytischer Chemie.

Oktober 2001 – Juli 2002: Diplomarbeit in der Abteilung Virologie, Universitätsklinikum Ulm; Titel: „Die Charakterisierung des M97-Proteins des murinen Zytomegalievirus“

Abschluss des Studiums im Juli 2002 mit Diplom in Biologie, Gesamtnote: „sehr gut“

Oktober 2002- Juni 2003: Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Virologie

Juli 2003- Juni 2007: Doktorand in der Abteilung Molekulare Biologie und Biochemie
Titel der Dissertation: „Untersuchungen zur Bedeutung von *Xenopus Islet-1* für die kardiovaskuläre Entwicklung von *Xenopus laevis*“
Voraussichtlicher Abschluss der Promotion Mitte Juli 2007

Lehrtätigkeiten

SS 2000 und SS 2001: Betreuer im Grundpraktikum Pflanzenphysiologie (Versuch: Isolation von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial)
<u>während der Diplomarbeit:</u>
Betreuung von Praktikanten (Biologiestudenten im Hauptstudium)
<u>während der Doktorarbeit:</u>
Betreuung einer Bachelor Arbeit (Fach: Biochemie)
Betreuung von Praktikanten (Biologiestudenten im Hauptstudium)
Betreuung des Grundpraktikums Biochemie für Mediziner (Versuch: Proteine)
Betreuung von integrierten Seminaren für Mediziner (Thema: Pathobiochemie II)

weitere Tätigkeiten:

September 1997 – September 1998: Zivildienst bei Deutschen Roten Kreuz
Oktober 1999 - Januar 2000: Betreuung der Tierzucht der Abteilung Zoologie, Universität Ulm

Publikationen und Konferenzbeiträge:

Publikationen:

Brade T, Männer J and Kühl M. The Role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodelling in the mature heart. Cardiovasc. Res. **72** 198-209 2006 (Review)

Brade T, Gessert S, Kühl M and Pandur P. Islet-1 is required for cardiovascular development in *Xenopus* laevis, eingereicht zur Publikation bei Developmental Biology

Gessert S, Maurus D, **Brade T**, Pandur P and Kühl M. Characterization of DM-GRASP in *Xenopus* development, in Vorbereitung

Konferenzbeiträge:

Poster:

GfE PhD Summer School 2004, Günzburg:
Characterization of Xenopus Islet-1

German-Italian *Xenopus* Meeting 2005, Loveno di Menaggio, Italien:
Characterization of Xenopus Islet-1

Vorträge:

Horizons in Molecular Biology International PhD Symposium 2006, Göttingen:
Characterization of Xenopus Islet-1 during heart development

Danksagung

Ich möchte zunächst Herrn Prof. Dr. Michael Kühl für die Überlassung des interessanten Themas und die erstklassige Betreuung danken. Zudem für all die Unterstützung und die Möglichkeit meine Arbeit auf Tagungen zu präsentieren.

Des Weitern Danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Knöchel für die Übernahme des ersten Gutachtens.

Frau Prof. Dr. Anita Marchfelder, danke ich für das zweite Gutachten.

Frau Dr. Petra Pandur gilt mein ganz besonderer Dank für die angenehme Betreuung, und ihren unermüdlichen Einsatz. Ich danke Ihr außerdem für all die vielen anregenden Diskussionen und dafür, dass Sie mit mir Ihre Begeisterung für die Entwicklungsbiologie geteilt hat. Außerdem stehe ich tief in Ihrer Schuld für das Ausmerzen auch des letzten Kommafehlers und für die Perfektionierung meiner Abbildung.

Doris Weber danke ich für hervorragende technische Unterstützung und die vielen *in situs*. Außerdem dafür, dass Sie mir so manchen Kniff für das eine oder andere Experiment gezeigt hat.

Susanne Gessert danke ich im Besonderen für all Ihre Unterstützung während des Projekts. Außerdem für die vielen Lacher die wir zusammen hatten, und all die Diskussionen und Ratschläge technischer Art.

Robert Cus gilt mein Dank für jegliche Art von Diskussion von der Wissenschaft bis zur Politik.

Roman Anton möchte ich für all die Diskussionen und die Unterstützung danken.

Max Schuff danke ich für die anregenden Diskussionen und alle die Tipps rund ums Experimentieren. Für jeden einzelnen seiner Kalauer danke ich Ihm im Besonderen.

Nabila Bardine sei dafür gedankt, dass Sie mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und mir in der einen oder anderen Kaffeepause Gesellschaft geleistet hat.

Dr. Stefan Wacker gilt mein besonderer Dank dafür, das er Sein unendliches Wissen über den Frosch mit mir geteilt hat und mir es somit erspart hat stundenlang in Büchern nachzuschlagen.

Dr. Ovidu Sirbu gilt mein aufrichtigster Dank für all die Diskussionen und die angenehme Gesellschaft in der Raucherecke. Außerdem danke ich Ihm im Besonderen dafür, dass er mich bestärkt hat nach San Diego zu gehen und dort ein gutes Wort für mich eingelegt hat. Ich danke Ihm zusätzlich dafür dass er seine Begeisterung für die Wissenschaft mit mir geteilt hat.

Bei allen andern Mitarbeitern der Institute für Biochemie und Biochemie und Molekulare Biologie, allen voran unseren Sekretärinnen Stefanie Scherer und Isabel Burkhart gilt mein Dank für die Unterstützung, das angenehme Arbeitsklima und die vielen Tipps und Tricks sowie gewinnbringende Gespräche.

Dr. Daniel Maurus möchte ich danken, für die Diskussionen die wir geführt haben, auch die wissenschaftlichen und die Motivation weiter zu machen auch im Angesicht des Zweifels.

Meinen Freunden, Daniel, Gabriela, Mario, Alice, Katrin, Raphael, Gregoire, Kristina, Felix, Peter, Kana, Daniela, Robbi, Tobi und all den anderen die ich vergessen habe, danke ich dafür das sie immer da waren, und mir gezeigt haben das es auch ein Leben jenseits der Bench gibt.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Zunächst möchte ich mich bei meinem Großvater bedanken, er hat mich viel gelehrt. Meiner Oma und meinem Opa gilt mein besonderer Dank für all die Unterstützung über all die Jahre. Meiner Tante Gredl und meinem Onkel Thommy möchte ich dafür Danken, dass Sie für mich immer ein offen Ohr hatten und mir Rückhalt geboten haben. Nicht zuletzt will ich meinen Geschwistern Sybille, Julian und Konstantin danken, dass sie immer für mich da waren und mich wie sie konnten unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Ohne euch hätte ich nichts erreicht... VIELEN DANK.

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Grundsätze und Empfehlungen „Verantwortung in der Wissenschaft“ der Universität Ulm habe ich zur Kenntnis genommen und unterschrieben.

Ulm im Mai 2007