

Untersuchungen zur Rolle von *hand2* in der Schilddrüsenentwicklung des Zebrafischs

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Thomas Wendl
aus Stuttgart

Köln 2005

Berichtersteller:

Prof. Dr. Siegfried Roth

Prof. Dr. Diethard Tautz

Tag der mündlichen Prüfung:

09.02.2006

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln unter Anleitung von Dr. Klaus Rohr, Prof. Dr. Siegfried Roth und Prof. Dr. José Campos Ortega durchgeführt.

Für seine große Hilfsbereitschaft, Unterstützung und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion möchte ich mich herzlich vor allem bei Dr. Klaus Rohr bedanken, da dies wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Außerdem danke ich ihm für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Bei Prof. Dr. Siegfried Roth möchte ich mich bedanken für die Betreuung und Unterstützung der Doktorarbeit nach dem Tod von Prof. Dr. José Campos Ortega. Prof. Dr. Diethard Tautz danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Burkhard Alt für wertvolle Diskussionen und die Korrektur dieser Arbeit und Julia von Gartzten für die Hilfe bei tausenden von in situ Färbungen. Ebenso möchte ich Osama Elsalini, Dejan Adzic, Saskia Reibe und allen Mitgliedern der Fischgruppe für ihre Unterstützung und des Schaffens eines exzellenten Arbeitsklimas danken.

Jeff Schoenebeck und Deborah Yelon vom Skirball Institute Of Biomolecular Medicine der NYU möchte ich für das Einweisen in die Fate Mapping Experimente und für viele hilfreiche Diskussionen über die gesamte Arbeit danken. Mein Dank gebührt ebenso Alexander Picker vom Max-Planck-Institut in Dresden für das Einweisen in die Implantationstechnik.

Martin Hobe, Peter Bommert, Oliver Clarenz und Roman Zimmermann möchte ich für das geniale Doktorandendasein innerhalb und außerhalb des Instituts danken. Die Zeit mit euch war Weltklasse!

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Julia Zanker für ihre stete Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Der Zebrafisch als Modellorganismus	3
1.2	Die Entwicklung des Zebrafischs <i>Danio rerio</i>	3
1.3	Die Einwicklung des Herzens	5
1.4	Die Zebrafisch <i>hands off</i> Mutante	10
1.4.1	Der Herzphänotyp	11
1.4.2	Der Flossenphänotyp	12
1.4.3	<i>hand</i> Gene in anderen Wirbeltieren	14
1.5	Die Zebrafisch <i>miles apart</i> Mutante	14
1.6	Die Entwicklung des Endoderms im Zebrafisch	16
1.7	Die Schilddrüse	19
1.8	Die Entwicklung der Schilddrüse in Wirbeltieren	19
1.9	Fibroblast Growth Factors	22
1.10	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	24
2.2	Puffer, Lösungen und Medien	24
2.3	Zebrafische	25
2.4	Histologische Methoden	26
2.4.1	Fixierung und Aufbewahrung	26
2.4.2	Einbetten in Durcupan	27
2.4.3	Einbetten in Glycerin	27
2.5	In situ Hybridisierungen	28
2.6	Antikörperfärbungen	30
2.7	Mikroinjektionen	31
2.8	Anlagenplan	32
2.9	Transplantationen	33
2.10	Mikropartikel Implantationen	34
3	Ergebnisse	36
3.1	<i>pax2.1</i> ist im Schilddrüsenprimordium ab 24 hpf exprimiert,	36

<i>pax8</i> ab 28 hpf	
3.2 <i>han</i>^{S6} Mutanten entwickeln keine Schilddrüse	39
3.3 <i>han</i>^{C99} Mutanten zeigen eine verkleinerte Schilddrüse	41
3.4 Das Expressionsmuster von <i>hand2</i> und die Position der Schilddrüse	43
3.5 Erstellen eines Anlagenplans	47
3.6 Die Schilddrüse in der <i>Cardia bifida</i> Mutante <i>miles apart</i>	51
3.7 Wildtypzellen können in nicht-zellautonomer Weise die Schilddrüse in <i>han</i>^{S6} Mutanten retten	53
3.8 Das Schilddrüsenprimordium entsteht unabhängig von der <i>hand2</i> Kiemenbogenexpression	58
3.9 Fgf1 und Fgf2 Proteine können die Schilddrüse in <i>han</i>^{S6} Mutanten retten	61
4 Diskussion	65
4.1 Die Entwicklung der Schilddrüse im Zebrafisch weist viele Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede ...	65
4.2 Welches <i>hand2</i> exprimierende Gewebe ist für das Entstehen der Schilddrüse verantwortlich	67
4.3 Die Zebrafisch <i>han</i>^{S6} Mutante als geeignetes Modell frühe Prozesse in der Schilddrüsenentwicklung zu untersuchen	70
4.4 Die Lage des Schilddrüsenprimordiums und seiner Vorläuferzellen	72
4.5 FGF Proteine können das Schilddrüsenprimordium in <i>han</i>^{S6} Mutanten retten	73
5 Zusammenfassung	76
6 Abstract	78
7 Literatur	79
8 Abkürzungen, Symbole und Konventionen	89
9 Erklärung	91
10 Lebenslauf	92

1 Einleitung

1.1 Der Zebrafisch als Modellorganismus

Der Zebrafisch *Danio rerio* gehört neben der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, dem Krallenfrosch *Xenopus laevis*, dem Nematoden *C. elegans*, dem Huhn *Gallus gallus* und der Maus *Mus musculus* zu den wichtigsten Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie.

Zu den Vorteilen des Zebrafischs gehören vor allem die Entwicklung außerhalb des Mutterleibes und die am Anfang der Entwicklung völlig durchsichtigen Embryonen, die ein Betrachten seiner inneren Organe unter einem einfachen Stereomikroskop möglich machen. Durch Zugabe von Pigmenthemmern wie PTU kann diese Transparenz sogar noch länger aufrecht erhalten werden.

Die schnelle Entwicklung, wichtige Organe, wie z.B. das Herz sind schon nach 24 hpf funktionsfähig, die kurze Generationsdauer von etwa drei Monaten, die einfache Haltung und die vielfältigen Möglichkeiten verschiedener Manipulationen trugen dazu bei, dass der Zebrafisch als erstes Wirbeltier für genetische Screens in großem Maßstab verwendet werden konnte (z.B. Mullins et al., 1994).

1.2 Die Entwicklung des Zebrafischs *Danio rerio*

Die Entwicklung des Zebrafischs beginnt mit der Befruchtung des Eies. Die entstandene einzellige Zygote (1A) teilt sich daraufhin in kurzen Zeitabständen mitotisch in Blastomere, die bis zum 8-Zellstadium (1B) syncytial miteinander verbunden bleiben. Es folgen weitere Zellteilungen ohne Zellwachstum, so dass eine Zellmasse aus mehreren tausend Zellen am animalen Pol entsteht (1D). Einige Zellen bilden extraembryonales Gewebe (*Yolk Syncytial Layer*). Der Großteil der Zellen breitet sich anschließend über den Dotter aus (1E), ein Vorgang der als Epibolie bezeichnet wird (Kimmel, 1995). Bei 50% Epibolie beginnt die Gastrulation mit der Entwicklung eines Organisators, dem *Shield* (1F), der die dorsale Seite des Embryos festlegt. In einem Vorgang, der Involution

genannt wird, wandern Zellen über den *Shield* und die Randzone in den Raum zwischen YSL und äußerer Zellschicht ein und strömen wieder in Richtung animale Pol. Während dieses Vorgangs werden die drei Keimblätter festgelegt. Aufgrund von Konvergenz- und Extensionsbewegungen entsteht auf der Dorsalseite der Embryo (1G).

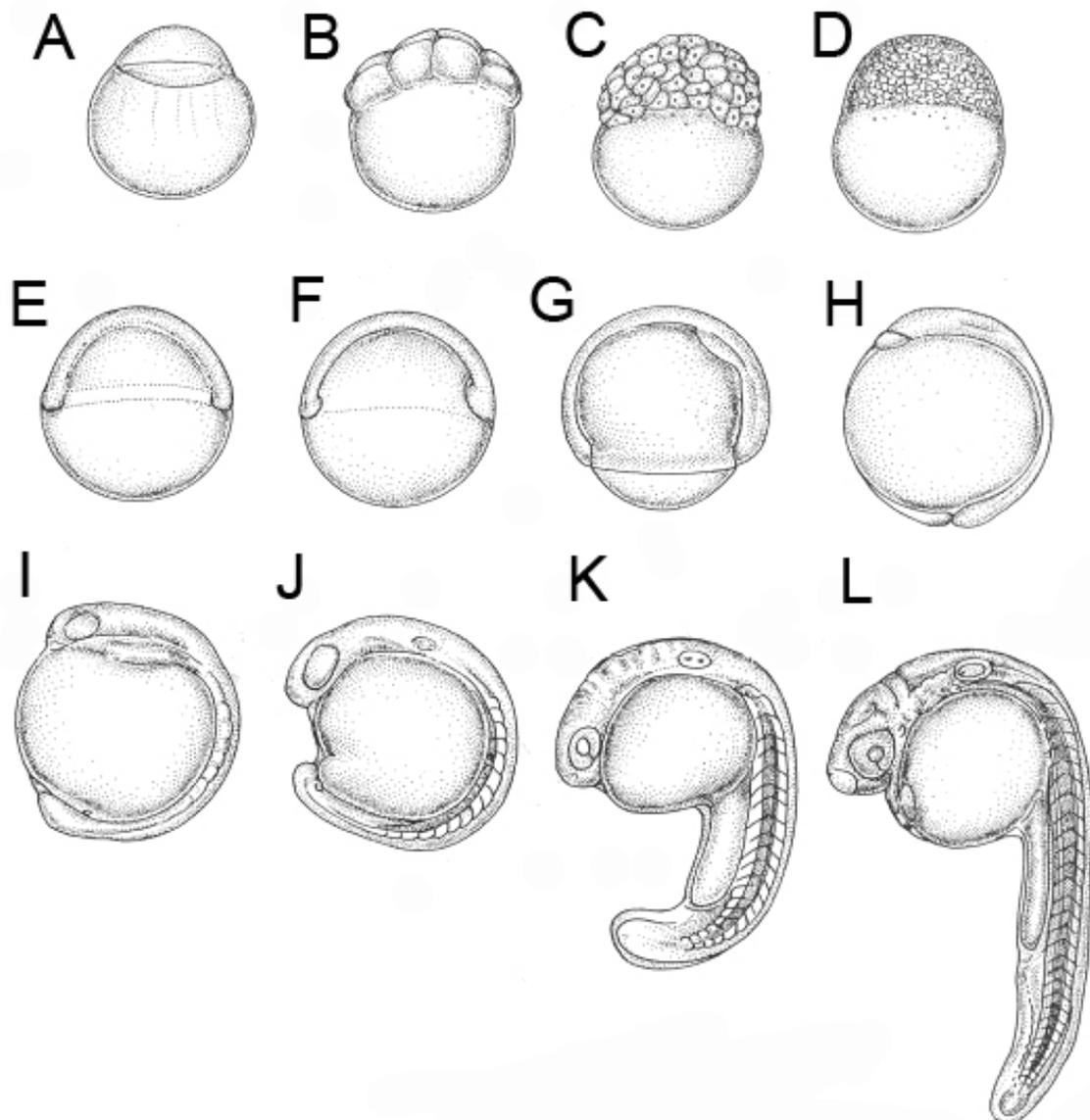


Abb. 1: Die Entwicklung des Zebrafischs in den ersten 24 h (aus Kimmel et al., 1995)

A 1-Zellstadium (15 min), B 8-Zellstadium (1,5 h), C 128-Zellstadium (2,25 h), D *high*-Stadium (3,3 h), E Keimring-Stadium (5,7 h), F *Shield*-Stadium (6 h), G 75% Epibolie (8 h), H *Tailbud*-Stadium (10 h), I 6-Somitenstadium (12 h), J 14-Somitenstadium (16 h), K 21-Somitenstadium, L Primordium-6-Stadium (25 h). Alle Altersangaben beziehen sich auf die Entwicklung bei einer Temperatur von 28,5°C.

Bei etwa 10 hpf entsteht am vegetalen Pol die Schwanzknospe (*Tailbud*, 1H). Anschließend werden entlang der antero-posterioren Achse die Somiten gebildet (1I). Parallel dazu entwickelt sich das zentrale Nervensystem, die Neuralleiste, sowie die wichtigsten sensorischen Organe. Bei 24 hpf (1L) ist die Form des zukünftigen Zebrafischs bereits zu erkennen, der Embryo ist weit entwickelt, die meisten Organe sind angelegt und das Herz schlägt schon.

Auf die für die vorliegende Arbeit besonders wichtigen Teilaspekte der Entwicklung des Zebrafischs wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

1.3 Die Entwicklung des Herzens

Wie in allen Wirbeltieren ist das Herz das erste innere Organ, das sich im Zebrafisch bis zur Funktionsfähigkeit entwickelt. Das Herz besteht aus einer Vorkammer, dem Atrium, und einer Hauptkammer, dem Ventrikel. Beide Kammern bestehen wiederum aus einer äußeren muskulären Schicht, dem Myokardium, und einer inneren endothelialen Schicht, dem Endokardium. Das Zebrafischherz beginnt bereits bei 22 hpf zu schlagen, bei 24 hpf setzt die Blutzirkulation ein.

Zelllinienanalysen im Zebrafisch zeigen, dass sich Herzvorläuferzellen in den äußeren vier Zellreihen der marginalen Blastomeren bei etwa 40% Epibolie befinden (Stainier et al., 1993; Warga und Nüsslein-Volhard, 1999).

In dieser Region liegen sowohl endokardiale, als auch myokardiale Herzvorläuferzellen. Teilt man diese Region in Grade ein, d.h. 0° entspricht der dorsalen Mittellinie und 180° der ventralen Mittellinie (siehe Abb. 2), findet man sowohl endokardiale als auch myokardiale Herzvorläuferzellen auf beiden Seiten in einem Winkel von etwa 55° - 140° . Eine klonale Analyse zeigt, dass endokardiale und myokardiale Zellen auf die selben Vorläuferzellen zurück gehen. Im Unterschied dazu haben sich atriale und ventrikuläre Herzvorläuferzellen schon wesentlich früher zu zwei getrennten Zelllinien entwickelt (Stainier et al., 1993) Myokardiale Herzvorläuferzellen, die später zum Ventrikel werden, entstehen dabei in einem Winkel zwischen 60° und 120° , atriale myokardiale

Herzvorläuferzellen in einem Winkel von 90° bis 140° (Abb. 2A) (Keegan et al., 2004).

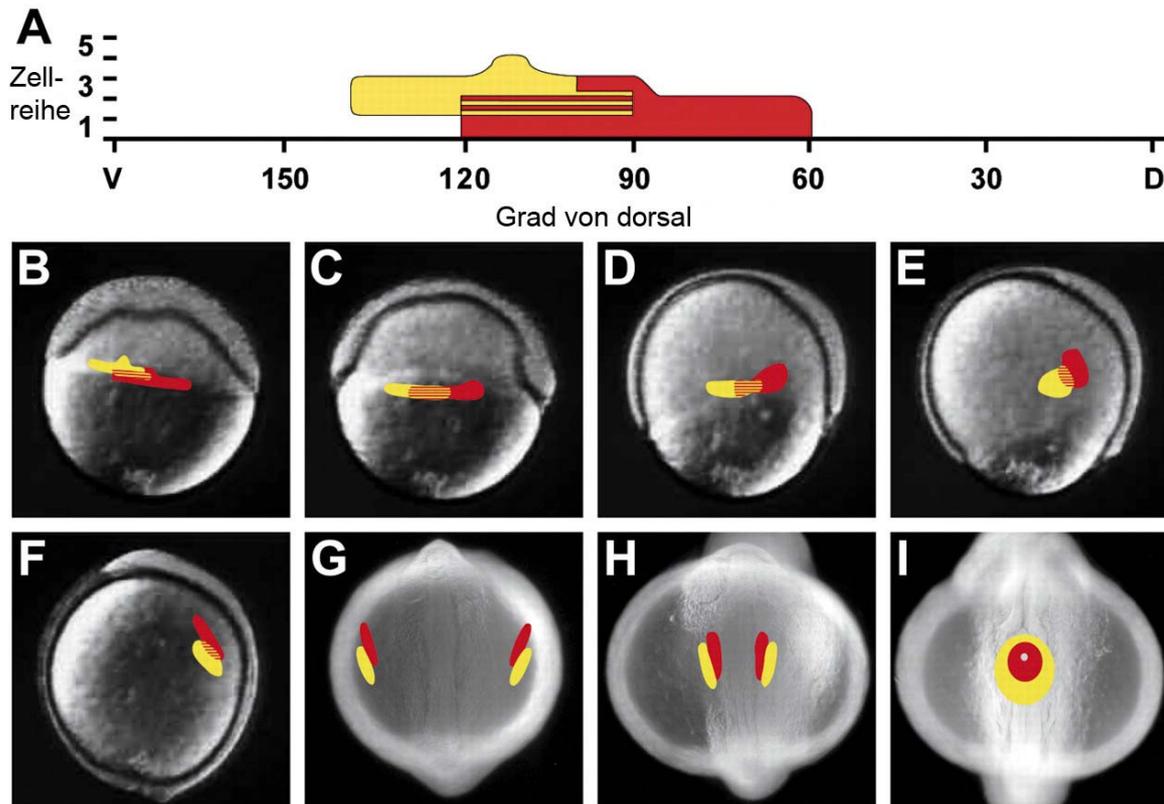


Abb. 2: Wanderungsbewegung myokardialer Herzvorläuferzellen des Atriums (gelb) und des Ventrikels (rot) (aus Keegan et al., 2004). A,B Repräsentation des Anlagenplans myokardialer Herzvorläuferzellen bei 40% Epibolie, Modell der weiteren Wanderungsbewegung mit der Position der Zellen im *shield*-Stadium (2C), 70% Epibolie (2D), 85% Epibolie (2E) und *tailbud*-Stadium (2F) in lateraler Ansicht. Position der myokardialen Herzvorläuferzellen in Dorsalansicht im 5-Somitenstadium (2G), 15-Somitenstadium (2H) und 22-Somitenstadium (2I).

Während der Gastrulation gehören die Herzvorläuferzellen zu den ersten mesodermalen Zellen, die am *shield* in die darunterliegende Schicht einwandern (Warga und Kimmel, 1990). Nach der Gastrulation stellen die Herzvorläuferzellen Subpopulationen des Seitenplattenmesoderms dar (Lateralplattenmesoderm, LPM) und bewegen sich auf beiden Seiten auf die Mittellinie zu (Abb. 2D-H).

Ab Beginn der Somitogenese exprimiert das LPM zahlreiche myokardiale Differenzierungsgene, wie *nkx2.5*, *hand2* und einige der *gata* Gene (4/5/6) (Abb. 3).

Ab dem 13-Somitenstadium werden myokardiumspezifische Gene, wie z.B. *cardiac myosin light chain 2 (cmlc2)*, in einer Subpopulation der *nkx2.5* Expressionsdomäne angeschaltet (Abb. 3). Dabei scheint die *Chorda dorsalis* die posteriore Grenze des Herzfeldes im LPM festzulegen (Goldstein und Fishman,

1998). Im medianen Teil des Herzfeldes wird ebenfalls ab dem 13-Somitenstadium das Gen *vmhc* in den Vorläuferzellen des Ventrikels exprimiert. Etwas später wird auch *atrial myosin heavy chain (amhc)* im äußeren Teil des Herzfeldes exprimiert.

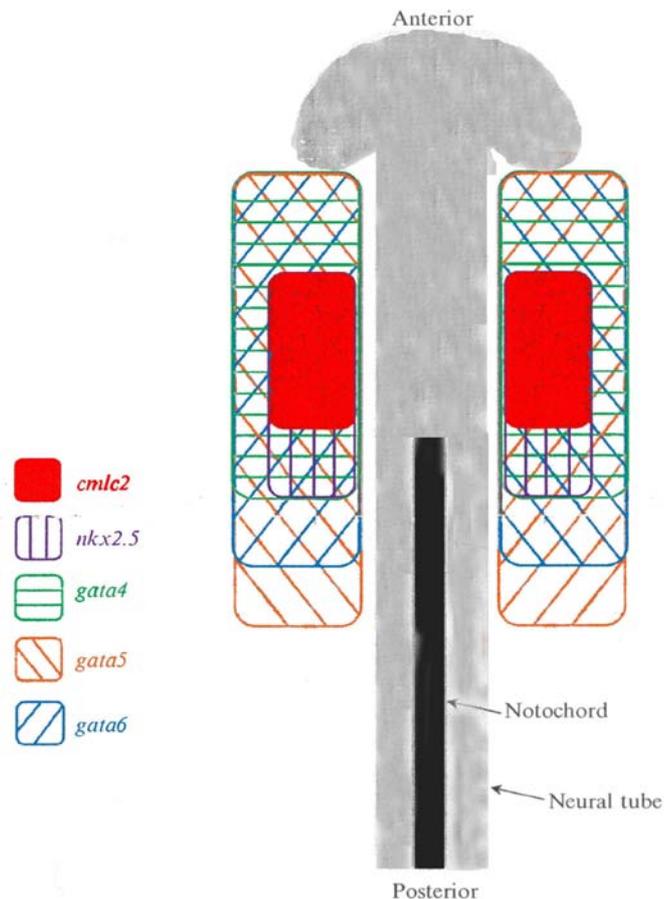
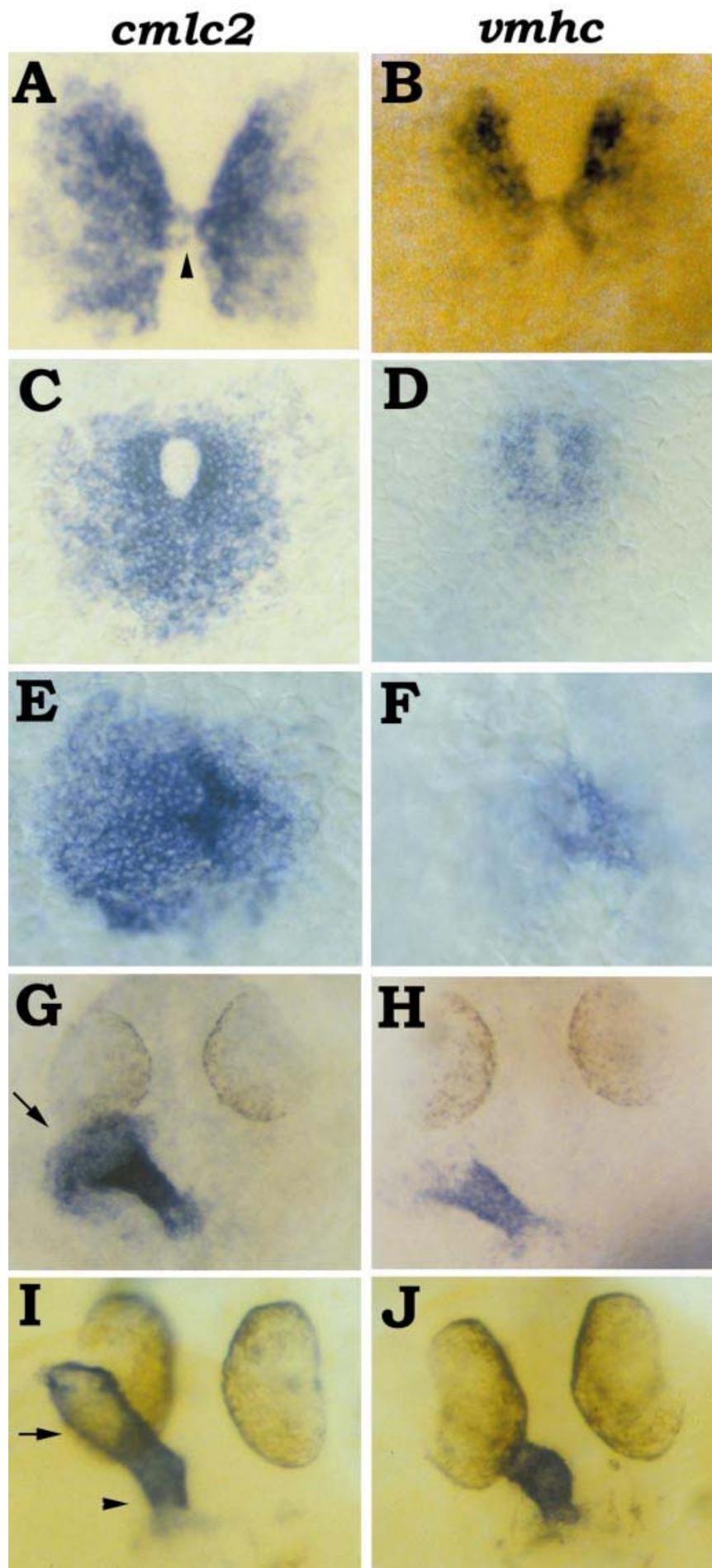


Abb. 3: Herzmarker im Seitenplattenmesoderm im 13-Somitenstadium (nach Trinh und Stainier, 2004). Erläuterungen siehe Text

Im 16-Somitenstadium sind die myokardialen Herzvorläuferzellen beidseitig der Mittellinie als Streifen angeordnet und liegen dort ventral des anterioren Endoderms und dorsal des *Yolk Syncytial Layer (YSL)*.

Abb. 4: Expression von Herz- und Ventrikelmarkern während der Fusion der beiden Seitenplattenmesodermhälften (aus Yelon et al., 1999). Expression des Herzmarkers *cmlc2* (A, C, E, G, I) und des Ventrikelmarkers *vmhc* (B, D, F, H, J) aus dorsaler Sicht. Im 18-Somitenstadium (A, B) ist der erste Kontakt der beiden Hälften über eine Brücke (Pfeilspitze) zu sehen, im 21-Somitenstadium (C, D) bilden die Herzvorläuferzellen einen Kegel, Ventrikelvorläuferzellen liegen mittig an der Spitze des Kegels, im 23-Somitenstadium (E, F) dreht sich der Kegel mit der dorso-ventralen Achse in die antero-posteriore Achse, bei 24 hpf streckt sich der Herzschlauch in AP-Richtung, atriales Gewebe kondensiert noch (Pfeil), bei 26 hpf (I, J) ist das Herz in Atrium (Pfeil) und Ventrikel (Pfeilspitze) gegliedert.



Im 18-Somitenstadium bewegen sich diese bilateralen Streifen aus myokardialen Herzvorläuferzellen in Richtung Mittellinie, fusionieren dort (Abb. 4A, B) und bilden einen Kegel (Abb. 4C, D). Dieser Kegel besteht zunächst aus einem dorsalen inneren Ring von ventrikulären und einem ventralen äußeren Ring von atrialen Herzvorläuferzellen. Ins Innere dieses Kegels wandern endokardiale Vorläuferzellen ein (Stainier et al., 1993; Yelon et al., 1999).

Eine Analyse der *cloche* Mutante (*clo*), bei der endokardiale Zellen komplett fehlen, zeigt, dass diese Zellen für die korrekte Wanderung der myokardialen Zellen und der folgenden Herzschlauchbildung erforderlich sind (Stainier et al., 1995; Trinh und Stainier, 2004).

Bei ca. 22 hpf (Abb. 4E, F) dreht sich der entstandene Herzkegel. Die ventrikuläre Spitze dreht sich nach posterior, die atriale ventrale Teil nach anterior, d.h. aus der ursprünglichen dorso-ventralen Achse wird eine antero-posteriore Achse. Zwischen 22 hpf und 26 hpf streckt sich der Kegel nun in AP-Richtung und bildet den Herzschlauch (Abb. 4G – J) (Yelon et al., 1999).

Parallel zu diesem Vorgang findet das „*cardiac jogging*“ statt, bei dem sich der Herzschlauch von der Mittellinie auf die linke Seite verschiebt. Dieser Vorgang wird von den asymmetrisch exprimierten Komponenten des Nodal-Signaltransduktionsweg, *lefty-1*, *cyclops* und *southpaw* reguliert (Bisgrove et al., 1999; Long et al., 2003).

Ab ca. 26 hpf folgt das sogenannte „*heart looping*“, bei dem ein Knick zwischen Atrium und Ventrikel entsteht und der Herzschlauch eine S-förmige Bahn beschreibt (Chen et al., 1997; Chin et al., 2000).

1.4 Die Zebrafisch *hands off* (*han*) Mutante

Ein Großteil der Experimente in der vorliegenden Arbeit wurde mit der *hands off* (*han*) Mutante durchgeführt.

Der Zebrafisch *han* Locus spielt in der Differenzierung, Musterbildung und Morphogenese zweier Seitenplattenmesodermderivate, dem Myokardium und den Vorderflossen, eine wichtige Rolle (Yelon et al., 2000). In verschiedenen genetischen Screens wurden zwei Mutanten isoliert, die Mutationen im *hands off* Locus aufweisen: Die *han*^{S6} und die *han*^{C99} Mutation.

Die *han*^{S6} Mutation wurde in einem Screen ENU-induzierter Mutationen identifiziert, bei denen eine veränderte Immunofärbung zweier Herzantikörper beobachtet wurde: dem MF20-Antikörper, der den gesamten myokardialen Teil des Herzes anfärbt, und dem S46-Antikörper, der den atrialen Teil des Myokardiums anfärbt (Alexander et al., 1998). Bei der *han*^{S6} Mutation handelt es sich um eine Deletion, bei der der komplette *han* Locus fehlt. Dementsprechend repräsentiert *han*^{S6} ein Nullallel.

Die *han*^{C99} Mutation wurde in einem unabhängigen Screen für Gamma-Strahlen induzierte Mutationen entdeckt. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Insertion eines 5 kb großen Fragments zwischen die Basen 346 und 347 der 5'-UTR des Gens. Diese Insertion führt zu einem falschen *Splicing* der mRNA und damit vermutlich zu einer Fehlfunktion des Proteins (Yelon et al., 2000).

Beide Mutationen komplementieren nicht füreinander.

Auf der Suche nach dem genetischen Defekt, der für die *han* Mutationen verantwortlich ist, konnten Yelon et al. (2000) zeigen, dass der *han* Locus für den Helix-Windung-Helix Transkriptionsfaktor Hand2 (kurz für: Heart and neural crest derivatives 2) codiert. Das zugehörige Gen *hand2* (auch *dhand* genannt) wurde von Angelo et al. (2000) kloniert und dessen Expression im Herzgewebe, den Flossen und den Neuralleistenderivaten der Kiemenbögen beschrieben. Aus Studien in Maus- und Hühnchenembryonen ist *hand2* ebenfalls dafür bekannt, dass es in diesen Geweben exprimiert ist (Cross et al., 1995; Hollenberg et al., 1995; Srivastava et al., 1995).

Der Herzphänotyp und der Flossenphänotyp der *han* Mutanten wurde erstmals von Yelon et al. (2000) vorgestellt. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Schilddrüsenphänotyp ist bisher nicht beschrieben.

1.4.1 Der Herzphänotyp

Während der frühen Somitogenese bis zum 10-Somitenstadium zeigt sich, dass in homozygoten *han*^{S6} Mutanten und in Wildtypen die Expression von LPM Markern identisch ist. Zwischen dem 10- und 15-Somitenstadium dehnt sich in Wildtypen die LPM Marker Expression mediolateral aus. Diese Vergrößerung der Expressionsdomäne findet in homozygoten *han*^{S6} Mutanten nicht statt (Yelon et al., 2000).

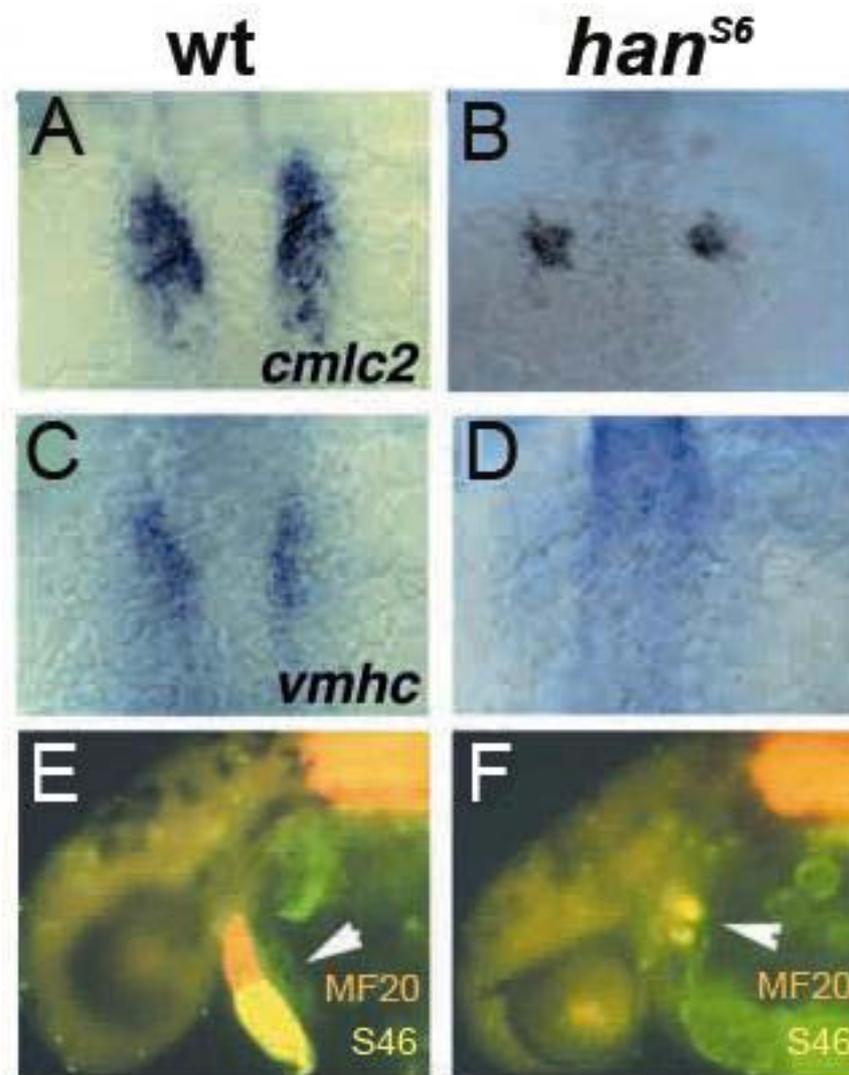


Abb. 5: Defekte des Myokardiums in homozygoten *han*^{S6} Mutanten (aus Yelon et al., 2000)
cmlc2 und *vmhc* Expression ist in *han*^{S6} Mutanten bereits im 15-Somitenstadium reduziert (B, D). Bei 36 hpf (E, F) ist das Wildtyp-Herz (E, Pfeilspitze) klar in Atrium (gelb) und Ventrikel (orange) gegliedert. In homozygoten *han*^{S6} Mutanten sind zwei Gruppen myokardialer Zellen zu sehen (F, Pfeilspitze). Diese bestehen vor allem aus atrialem Gewebe.

Homozygote *han*^{S6} Mutanten weisen starke morphologische Defekte des Herzens ab 22 hpf auf. Es ist nahezu kein kontraktiles Gewebe oder zirkulierendes Blut zu finden (Yelon et al., 2000). Schon in Stadien ab 24 hpf ist ein schwaches Herzödem sichtbar. In Herz-Antikörperfärbungen (Abb. 5E, F) und *cmlc2* Expressionsstudien (Abb. 5A, B) wird deutlich, dass sich in homozygoten *han*^{S6} Mutanten nur sehr wenig myokardiales Gewebe bildet. Während wildtypische Embryonen ein einzelnes mittiges Herz bilden, entwickeln homozygote *han*^{S6} Mutanten zwei kleine laterale Gruppen myokardialer Zellen, die nie an der Mittellinie fusionieren. Dieser Typ eines Herzdefektes wird auch als *Cardia bifida* bezeichnet. Ebenso ist das wildtypische Herz in Atrium und Ventrikel gegliedert, während das Herz homozygoter *han*^{S6} Embryonen vor allem aus atrialem Gewebe besteht (Abb. 5E, F). Die Expression ventrikulärer Marker, wie z.B. *vmhc*, ist sehr stark reduziert (Abb. 5C, D).

Homozygote *han*^{C99} Mutanten weisen einen gegenüber *han*^{S6} abgeschwächten Phänotyp auf. Vergleiche von homozygoten *han*^{S6} mit homozygoten *han*^{C99} Mutanten zeigen, dass die *cmlc2* Expressionsdomäne in *han*^{C99} Mutanten größer ist als in *han*^{S6} Mutanten, ebenso ist der Ventrikelmarker *vmhc* in *han*^{C99} Mutanten nicht so stark reduziert, wie in *han*^{S6} Mutanten. Phänotypische Vergleiche zeigen außerdem, dass die bilateralen myokardialen Zellpopulationen in homozygoten *han*^{C99} Embryonen langsam fusionieren und einen kleinen Herzschlauch bilden, aber in homozygoten *han*^{S6} immer als bilaterale Zellgruppen erhalten bleiben und nicht fusionieren (Yelon et al., 2000).

1.4.2 Der Flossenphänotyp

Der *han* Locus ist nicht nur für die korrekte Ausprägung der kardiogenen anterioren Portion des LPMs wichtig sondern auch essentiell für die korrekte Spezifizierung des posterioren LPMs, und damit für die ordnungsgemäße Entwicklung der Brustflossen (Grandel und Schulte-Merker, 1998). In Wildtypembryonen teilt sich das Mesenchym der Brustflossen normal und bildet beidseitige Flossenknospen aus. Dieser Prozess ist in *han*^{S6} Mutanten verzögert. Homozygote *han*^{S6} Mutanten weisen ein undifferenziertes Mesenchym auf, das sich nicht, wie im Wildtyp, allmählich ausdehnt, sondern verkümmert bleibt. Das Mesenchym der wildtypischen, sowie der mutanten Brustflossen, exprimiert schon

in frühen Stadien *tbx5*. Ab 24 hpf zeigt sich jedoch, dass die *tbx5* Expression in den mutanten Flossen abnimmt, während sie in wildtypischen Embryonen erhalten bleibt (Abb. 6A-D). Auch die Expression von *sonic hedgehog* (*shh*) in der Zone polarisierender Aktivität (ZPA) im posterioren Teil der Flossenknospe (Neumann et al., 1999) ist in homozygoten *han*^{S6} Mutanten nicht vorhanden. Daher zeigen die Vorderflossen in homozygoten *han*^{S6} Embryonen keine AP-Polarität (Yelon et al., 2000).

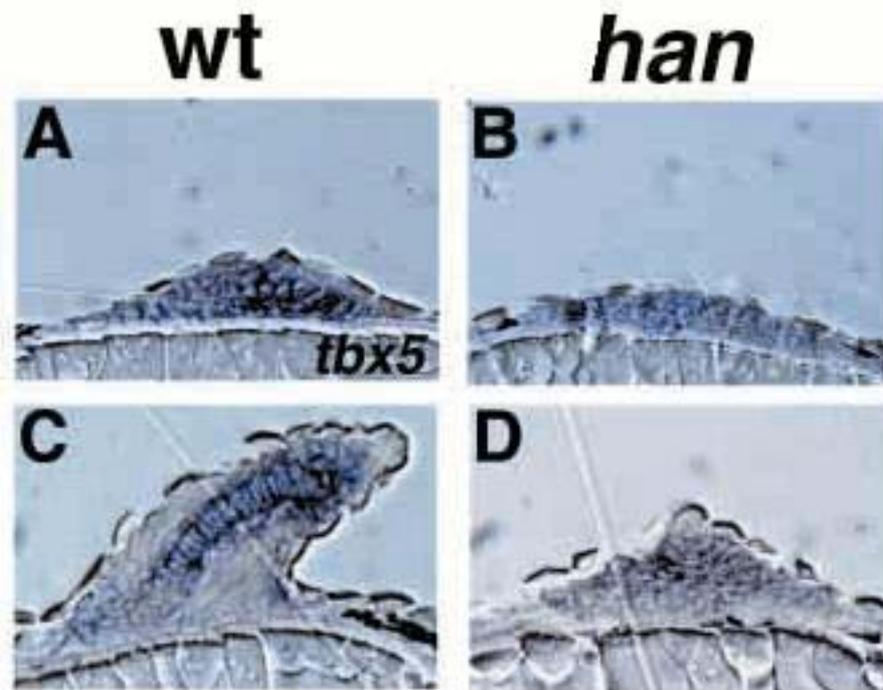


Abb. 6. Homozygote *han* Mutanten weisen Vorderflossendefekte auf (nach Yelon et al., 2000) Längsschnitte durch die Anlagen der Vorderflossen in homozygoten *han*^{S6} Mutanten nach in situ Hybridisierung für *tbx5* Expression bei 32 hpf (A, B) und 48 hpf (C, D). *han*^{S6} Mutanten weisen eine Verzögerung in der Ausbildung der Flossenknospe, sowie eine Reduktion der *tbx5* Expression auf. Die mutante Flosse (B, D) streckt sich nicht.

Im Gegensatz zu den verschiedenen Herzphänotypen, unterscheidet sich der Flossenphänotyp von homozygoten *han*^{S6} und *han*^{C99} Mutanten nur unwesentlich. In beiden Fällen dehnen sich die mutierten Vorderflossen nicht aus, die *tbx5* Expression bleibt nicht erhalten und beide weisen keine *shh* Expression in der ZPA auf und damit keine Polarität auf.

1.4.3 *hand* Gene in anderen Wirbeltieren

Obwohl viele Gene im Zebrafisch gegenüber anderen Wirbeltieren dupliziert sind, scheint es sich mit dem *hand2* Gen genau andersherum zu verhalten. In Maus (Srivastava et al., 1995), Huhn (Srivastava et al., 1995; Howard et al., 1999) und *Xenopus* (Sparrow et al., 1998; Angelo et al., 2000) gibt es zwei *hand* Gene: *hand1* und *hand2*. Ein *hand1* (oder *ehand*) Gen konnte im Zebrafisch bisher nicht gefunden werden.

Im Huhn und in *Xenopus* sind die beiden *hand* Gene überlappend exprimiert (Srivastava et al., 1995; Angelo et al., 2000) und scheinen in ihrer Funktion redundant zu sein. In der Maus überlappen beide *hand* Gene nur teilweise. *hand2* ist dabei zunächst im gesamten Herzschlauch exprimiert, während *hand1* Expression auf Regionen, die zum *Bulbus arteriosus* und zum linken Ventrikel werden, beschränkt ist (Firulli et al., 1998; Srivastava et al., 1997). Mit Beginn des *heart loopings* beschränkt sich die *hand2* Expressionsdomäne jedoch auf den *Bulbus arteriosus* und den rechten Ventrikel.

Srivastava et al. (1997) haben eine *hand2*^{-/-} Maus erzeugt, die anstatt zweier nur einen Ventrikel besitzt. Sie stirbt jedoch an Herzdefekten in einem frühen Stadium (bei E10.5). Darüberhinaus gibt es eine *Nkx2.5*^{-/-}*Hand2*^{-/-} Doppel-knockout Maus (Yamagishi et al., 2001). Diese entwickelt nur eine einzige Herzkammer, die als Atrium identifiziert werden konnte. Unter anderem aufgrund der Ähnlichkeit dieser Mutante mit der Zebrafisch *han*^{S6} Mutante wird vermutet, dass diese Mutante einem *hand-null-state* gleichkommt, also einem kompletten *Knockout* der *hand* Gene.

1.5 Die Zebrafisch *miles apart* Mutante

In allen Wirbeltieren wandern myokardiale Herzvorläuferzellen während der frühen Gastrulation ein und liegen während der Somitogenese in zwei bilateralen Streifen im anterioren LPM vor. Die Zellen des LPMs wandern dann zur Mittellinie, fusionieren und bilden den Herzschlauch. Im Zebrafisch sind acht Mutationen bekannt, bei denen dieser Prozess gestört ist und zwei seitlich gelegene Herzen entstehen (*Cardia bifida*). Eine dieser Mutationen ist *miles apart* (*mil*).

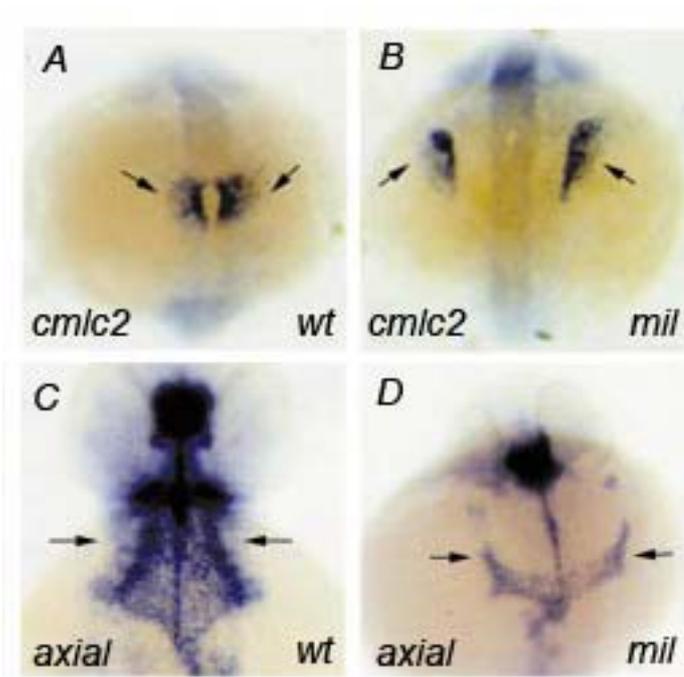


Abb. 7: Die Zebrafisch *miles apart* Mutante (aus Kupperman et al., 2000)

In homozygoten *mil* Mutanten (B, D) ist die Wanderungsbewegung des Seitenplattenmesoderms (B) und des Endoderms (D) in Richtung Mittellinie gestört.

Im Unterschied zu homozygoten *han*^{S6} Mutanten, bei denen *Cardia bifida* in Kombination mit einer massiven Reduktion des myokardialen Gewebes auftritt (s.o.), sind bei homozygoten *mil* Mutanten myokardiale Marker, wie z.B. *nkx2.5* und *cmlc2* auf einem normalen, wildtypischen Niveau exprimiert und die Anzahl der myokardialen Vorläuferzellen ist mit der in Wildtypen vergleichbar. Einzig und allein die Wanderungsbewegung in Richtung Mittellinie unterbleibt in homozygoten *mil* Mutanten vollständig. Im 20-Somitenstadium, wenn die Herzvorläuferzellen in Wildtypen schon in Richtung Mittellinie gewandert sind, liegen die myokardialen Herzvorläuferzellen in homozygoten *mil* Mutanten immer noch in zwei bilateralen Streifen vor (Abb. 7A und B) (Kuppermann et al., 2000).

Das myokardiale Gewebe differenziert sich zu Muskelgewebe des Herzens und es entstehen zwei vollständige Herzschläuche. Beide bilateralen Herzen haben ein Endokardium und sind in der Lage, unabhängig voneinander zu schlagen. Nichtsdestotrotz ist keine Blutzirkulation in diesen Mutanten zu beobachten, vermutlich wegen der fehlenden Verbindung zur dorsalen Aorta (Stainier et al., 1996).

Homozygote *mil* Mutanten weisen wie viele andere *Cardia bifida* Mutanten auch ein zweistreifiges Endoderm auf, das nicht an der Mittellinie fusioniert. Dennoch werden alle endodermalen Organe angelegt und differenzieren sich. *mil* Mutanten legen die Vermutung nahe, dass die Wanderungsbewegung und die Differenzierung dieser Gewebe von zwei unabhängigen Signalwegen gesteuert werden (Kuppermann et al., 2000).

1.6 Die Entwicklung des Endoderms im Zebrafisch

Fate Mapping Experimente haben gezeigt, dass Zellen aus der marginalen Region der frühen Blastula sich zu Mesoderm und Endoderm entwickeln (Kimmel et al., 1990; Warga und Nüsslein-Volhard, 1999). Während in frühen Blastulastadien diese Zellen noch bipotent sind und sowohl zu Mesoderm als auch zu Endoderm werden können, steht in späteren Blastulastadien das Schicksal dieser Zellen schon fest. Bei 50% Epibolie sind die Endodermvorläuferzellen in den vier marginalen Zellreihen zu finden, die Mehrheit von ihnen in den zwei marginalsten Reihen. Detaillierte *Fate Mapping* Studien konnten zeigen, dass endodermale Zellen, die vor der Involution am *Shield* auf der dorsalen Seite des Embryos liegen, später eine anteriore Position, z.B. im Pharynx, einnehmen. Laterale Zellen finden sich in den Verdauungsorganen wieder und ventrale Zellen im posterioren Teil des Verdauungstraktes (Warga und Nüsslein-Volhard, 1999; Bally-Cuif et al., 2000).

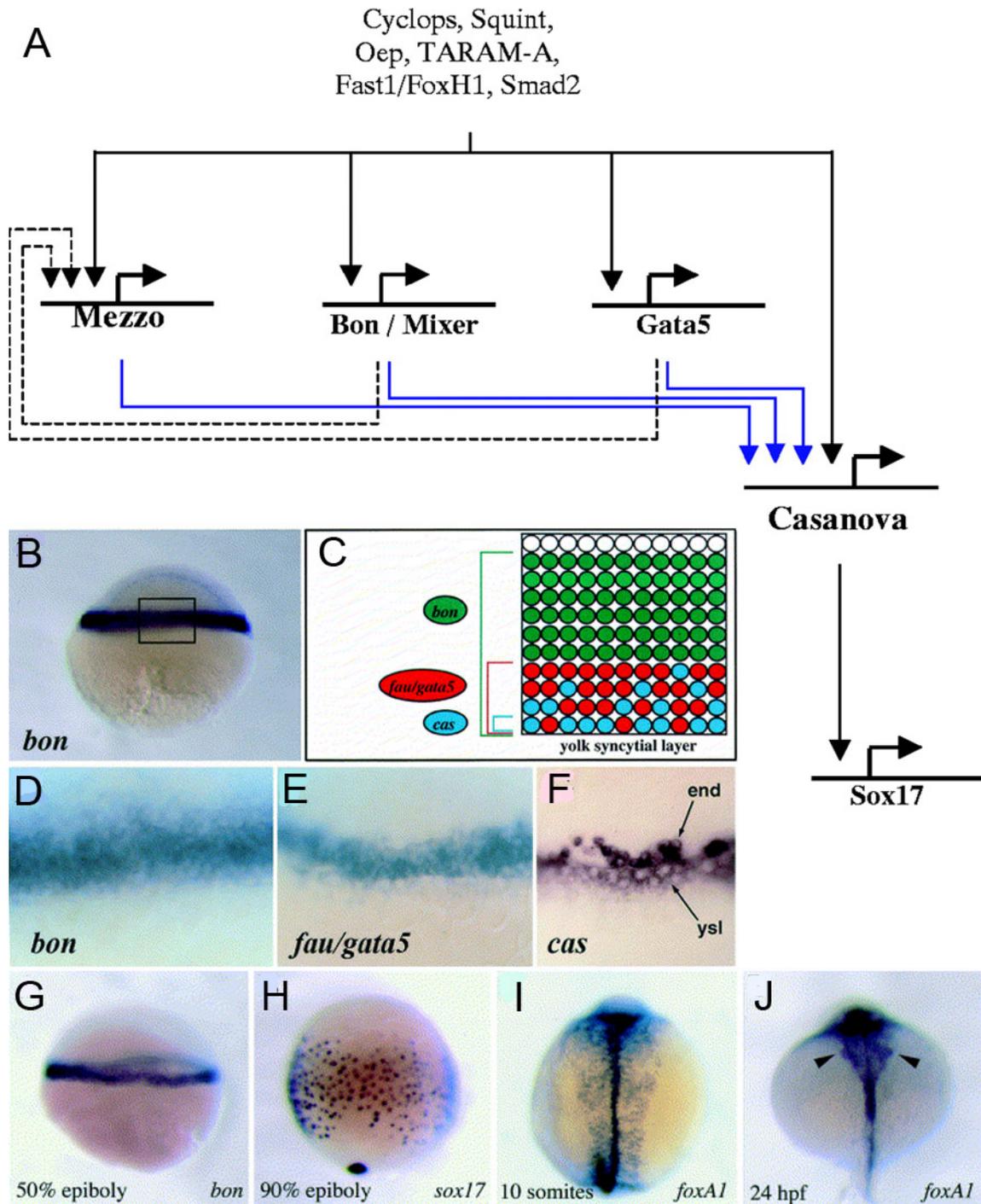


Abb. 8: Die Entwicklung des Endoderms im Zebrafisch (A aus Poulain und Lepage, 2002; B-J aus Ober et al., 2003). A: Schema des Signalweges in der frühen Endodermentwicklung, B: *bon/mixer* Expression in der marginalen Blastula, C: schematischer Ausschnitt aus B mit Darstellung der Expressionsdomänen in den verschiedenen Zellreihen der marginalen Blastula bei ca. 30% Epibolie, D, E, F Vergrößerungen der *bon*-, *gata5*- bzw. *cas*- Expression, G: *bon* Expression bei 50% Epibolie, H *sox17* Expression bei 90% Epibolie, I: *foxA1* Expression im 10-Somitenstadium und bei 24 hpf (J).

Analysen von Zebrafisch Mutanten haben den Nodal-Signalweg als ersten wichtigen Signalweg der Endodermbildung identifiziert (Review von Stainier, 2002; Warga und Nüsslein-Volhard, 2002). Mutanten, denen Nodal-Faktoren fehlen, wie z.B. *cyclops (cyc)* und *squint (sqt)* (Feldman et al., 1998), sowie Mutanten, denen die maternal zygotischen Faktoren *one-eyed pinhead (Mzoep)*, ein Korezeptor des Nodal-Signalwegs, fehlen (Zhang et al., 1998), entwickeln kein Endoderm und nur wenig Mesoderm. Die Injektion von *lefty1* (früher: *antivin*), einem kompetitiven Inhibitor des Nodal-Signalweges, führt ebenfalls zu einem kompletten Verlust des Endoderms (Thisse und Thisse, 1999; Thisse et al., 2000). Die Injektion von mRNA einer konstitutiv-aktiven Form des Nodal-Rezeptors, *taram-a** (Renucci et al., 1996), ist hingegen hinreichend um endodermspezifische Genexpression im gesamten Embryo auszulösen (Alexander und Stainier, 1999).

Dem Nodal-Signalweg im Zebrafisch sind mehrere Transkriptionsfaktoren (Abb. 8A) nachgeschaltet, die im Falle von Mutationen spezifische Endodermdefekte auslösen können. Diese Transkriptionsfaktoren sind Casanova (Cas) (Kikuchi et al., 2001), Bon/Mixer (Kikuchi et al. 2000), Gata5 (Reiter et al., 2001) und Mezzo (Poulain und Lepage, 2002). Des weiteren zeigen neueste Untersuchungen, dass es auch maternale Komponenten epigenetisch von Casanova gibt. So wurde kürzlich der Transkriptionsfaktor Eomesodermin (Eomes) beschrieben (Bjornson et al., 2005).

Endodermale Vorläuferzellen exprimieren als eines der ersten Gene *sox17* (Abb. 8H; Alexander und Stainier, 1999), das für einen Transkriptionsfaktor codiert. Dieser Transkriptionsfaktor wird vermutlich von Cas direkt angeschaltet.

Später exprimieren diese Zellen eine Reihe von Fox Faktoren (früher: Forkhead Domäne Gene). Im Zebrafisch sind bisher neun dieser Gene bekannt (Strähle et al., 1993; Odenthal und Nüsslein-Volhard, 1998). Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind z.B. *foxA2* (voriger Name: *axial*) und *foxA3* (voriger Name: *fkd2*). Wie *cas* und *sox17* sind diese Gene in der marginalen Blastula, vom *Shield*-Stadium an exprimiert. Gegen Ende der Gastrulation kommt ein weiteres Fox Gen ins Spiel: *foxA1* (voriger Name: *fkd7*) (Odenthal und Nüsslein-Volhard, 1998). Diese Fox Gene sind in der endodermalen Zelllinie bis in die Organogenese-Stadien exprimiert (Abb. 8I, J).

1.7 Die Schilddrüse

Die Schilddrüse ist ein endokrines Organ vorwiegend endodermaler Herkunft, das für die Produktion des Schilddrüsenhormons in allen Wirbeltieren verantwortlich ist. Das Schilddrüsenhormon spielt eine tragende Rolle in der Regulation des Stoffwechsels und ist wichtig für Wachstum und Reifung, insbesondere des Gehirns und der Knochen. Darüber hinaus beeinflusst das Schilddrüsenhormon die Wirksamkeit anderer Hormone.

Die Schilddrüse besteht im wesentlichen aus einem Zelltyp, den Schilddrüsenfollikelzellen (Gorbman und Bern, 1962). Die Schilddrüsenfollikelzellen bilden kugelförmige Follikel, die ein kolloid-gefülltes Lumen umschließen. Die Follikelzellen produzieren zunächst das langkettige Protein Thyroglobulin, welches in das Kolloid sekretiert wird. Im Kolloid werden die Tyrosylreste des Thyroglobulins jodiert und je zwei Reste fusioniert. Dadurch entstehen die noch kovalent an Thyroglobulin gebundenen Schilddrüsenhormone Thyroxin (T₄, mit vier Jodmolekülen) und Trijodthyronin (T₃, mit drei Jodmolekülen) (Frieden und Lipner, 1971). Solange diese im Kolloid gelagert werden, bleiben T₃ und T₄ an das Thyroglobulin gebunden. Werden diese gebundenen Formen des Schilddrüsenhormons von den Follikelzellen transzytotisch aufgenommen, kann T₄ und T₃ in den Vesikeln proteolytisch abgespalten werden. Freies T₄ und T₃ wird dann von den Follikelzellen in die Blutzirkulation ausgeschüttet.

1.8 Die Entwicklung der Schilddrüse in Wirbeltieren

Die Entwicklung der Schilddrüse wird aufgrund von Beobachtungen an Säugetieren in verschiedene Schritte gegliedert. Zuerst schnüren sich Zellen des primitiven Pharynxbodens ab, evaginieren in das ventralgelegene mesenchymale Gewebe und erreichen die anteriore Wand der Trachea. Nach massivem Wachstum des Primordiums differenzieren sie sich zu Follikelzellen (Macchia, 2000). Während des Wachstums wandern C-Zellen aus der Neuralleiste ein (Manley und Capecchi, 1998).

Auf molekularer Ebene sind -vor allem durch Arbeiten an Säugetieren- nur wenige Gene bekannt, die im Schilddrüsenprimordium exprimiert werden.

Eines dieser Gene ist der Transkriptionsfaktor *Nkx2.1* (oder *Ttf1*, *Thyroid transcription factor 1*). *Nkx2.1* ist in der sich entwickelnden Schilddrüse von Säugetieren exprimiert (Lazzaro et al., 1991). Mäuse, denen dieses Gen fehlt, entwickeln keine Schilddrüse (Kimura et al., 1996). Da in diesen Mäusen nicht einmal C-Zellen beobachtet werden können, geht man von einer frühen Rolle von *Nkx2.1* in der Organogenese aus (Kimura et al., 1996).

Pax8 spielt ebenfalls eine Rolle in der Entwicklung der Schilddrüse (Macchia et al., 1998; Mansouri et al., 1998). *Pax8*^{-/-} Mäuse entwickeln eine Schilddrüse, die allerdings nur aus C-Zellen besteht, die Follikelzellen fehlen (Mansouri et al., 1998). *Pax8* ist vermutlich für die Spezifikation oder Differenzierung der Follikelzellen notwendig.

Das Homöobox Gen *Hex* ist ebenfalls für die Bildung der Schilddrüse erforderlich. In *Hex*^{-/-} Mäusen bleibt die Entwicklung der Schilddrüse nach dem Ablösen des Primordiums vom Pharynxepithelium stehen (Martinez Barbera, 2000).

Die wichtigsten Stadien der Schilddrüsenentwicklung im Zebrafisch wurden im wesentlichen von Rohr und Concha (2000) anhand der Expression von *nk2.1a* (Zebrafisch-Ortholog von *Nkx2.1*) beschrieben. Ab etwa 24 hpf ist im ventralen Pharynx in der Nähe des Herzschlauchs *nk2.1a* exprimiert (Abb.9A). Durch Erstellen eines Anlagenplans konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Domäne um die Schilddrüsenanlage handelt. Diese Domäne scheint der morphogenetischen Bewegung des Unterkiefers zu folgen und sich in Richtung anterior zu bewegen, so dass der Abstand zu den Augen kleiner wird. Bei 32 hpf ist die Schilddrüsenanlage im ventralen Pharynxepithelium zu finden (Abb. 9C). Bei etwa 40 hpf verliert das Schilddrüsenprimordium den Kontakt zum Pharynxepithelium, löst sich ab und wandert in das darunter liegende Gewebe ein (Abb. 9D). Bei ca. 55 hpf erreicht die Schilddrüsenanlage ihre endgültige Position im ventralen Pharynxmesenchym (Abb. 9F).

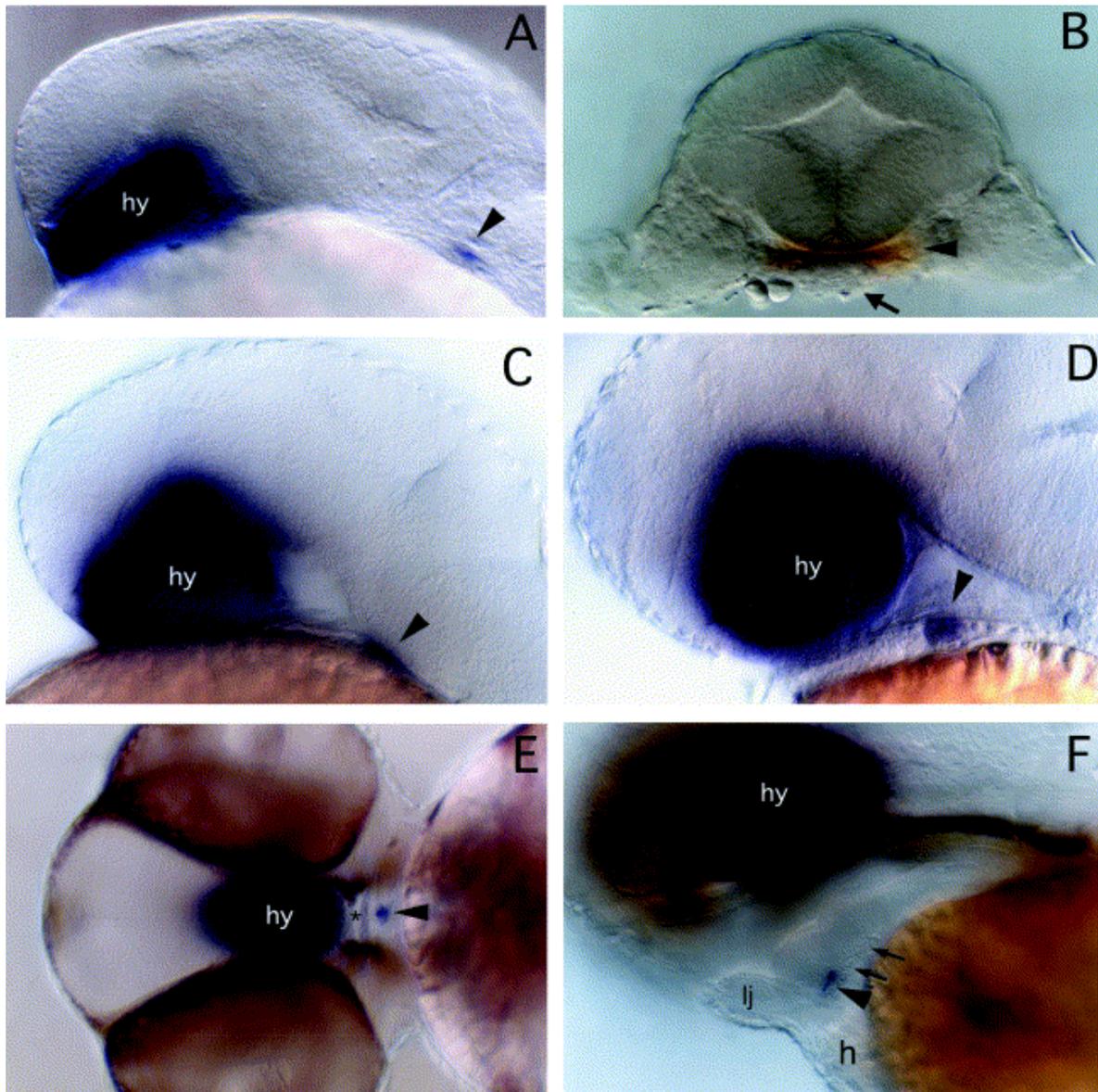


Abb. 9: Die Entwicklung der Schilddrüse im Zebrafisch (aus Rohr und Concha, 2000). Expression von *nk2.1a* in der Schilddrüsenanlage bei 24 hpf (A, B), 32 hpf (C), 40 hpf (D), 48 hpf (E) und 55 hpf (F) in lateraler Ansicht (A, C, D, F), im Querschnitt (B) und in ventraler Ansicht (E). Die Pfeilspitze zeigt jeweils auf das Schilddrüsenprimordium (h, Herz; hy, Hypothalamus; lj, Unterkiefer (*lower jaw*); * Pharynx)

Des Weiteren konnte von Klaus Rohr gezeigt werden, dass das Zebrafisch Gen *hhex* (Ho et al., 1999), wie dessen Maus-Ortholog, in der Schilddrüsenanlage exprimiert wird. In weiteren Studien konnte anhand von Morpholino-*knockdown* Experimenten gezeigt werden, dass *nk2.1a* und *hhex* Schilddrüsenwachstum und -Differenzierung regulieren und *downstream* von Nodal-Faktoren agieren (Elsalini et al., 2003).

Über die Induktion der Schilddrüse ist bisher nichts bekannt.

1.9 Fibroblast Growth Factors

Fibroblast Growth Factors (FGFs) sind sekretierte Proteine, die in vielen entwicklungsbiologischen Prozessen eine Rolle spielen. In Maus und Mensch sind bisher 22 verschiedene FGFs bekannt, im Zebrafisch derzeit 10.

Serls et al. (2004) konnten in einem *in vitro* Versuch mit Gewebekulturen aus ventralem Endoderm eines Mausembryos zeigen, dass durch Zugabe von FGF1 und FGF2 in das Kulturmedium *Nkx2.1* Expression in diesem Gewebe angeschaltet wird. Damit konnte vermutet werden, dass diese FGFs in der Induktion der Schilddrüse eine Rolle spielen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch Einwirken von kardialem Gewebe derselbe Effekt zu beobachten ist, d.h. ebenfalls *Nkx2.1*-Expression in ventralem Endodermgewebe angeschaltet wird.

Da *Fgf1* und *Fgf2* im Herzgewebe der Maus exprimiert werden (Jung et al., 1999), ist vermutlich das kardiale Mesoderm Quelle für die beiden FGFs.

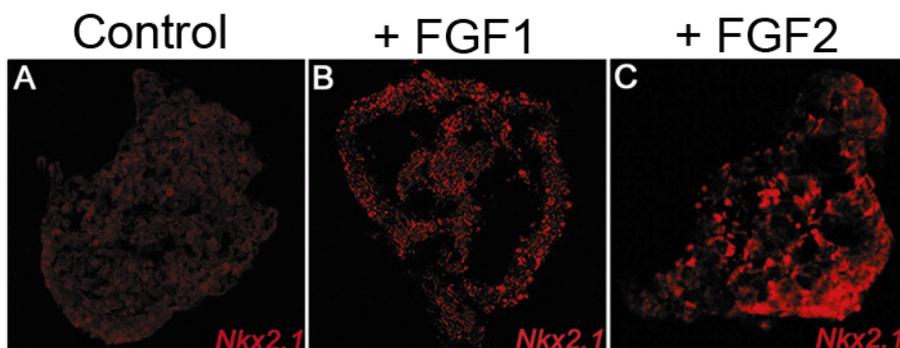


Abb. 10: FGF1 und FGF2 können die Expression von *nkx2.1* *in vitro* induzieren (aus Serls et al., 2004). Immunofärbung (Anti-NKX2.1 AK, rot) von Gewebekulturen aus ventralem Endoderm eines Mausembryos (A-C). In der Kontrolle (A) keine Färbung, starke Färbung bei Zugabe von 500ng/ml FGF1-Protein (B) oder 50 ng/ml FGF2-Protein (C).

Im Zebrafisch ist es möglich, den FGF-Signalweg durch Zugabe einer Chemikalie (SU 5402, Calbiochem) völlig zu unterdrücken (Mohammadi et al., 1997). Dabei inhibiert SU 5402 die Kinase-Aktivität von Fgfr1. Da alle anderen FGF-Rezeptoren mit Fgfr1 Dimere bilden, wird der FGF-Signalweg vollständig ausgeschaltet. Es konnte gezeigt werden, dass Inhibition des FGF-Signalwegs zwischen 18 hpf und 22 hpf zu einem Verlust der Schilddrüse im Zebrafisch führt (D. Adzic, Diplomarbeit 2005). Insofern ist davon auszugehen, dass auch im Zebrafisch *fgf1* und *fgf2* epigenetisch von *nk2.1a* sind.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, den Schilddrüsendefekt in *han*^{S6} Mutanten zu untersuchen und die Rolle von *hand2* in der Schilddrüsenentwicklung des Zebrafischs zu beschreiben. Weiterhin sollten mit *pax2.1* und *pax8* zwei weitere Gene, die in der Schilddrüse selbst exprimiert sind, beschrieben werden. Durch neuere Arbeiten über FGF-Signalwege konnte die Arbeit auf die Suche möglicher *downstream*-Faktoren von *hand2* in der Schilddrüsenentwicklung ausgeweitet und eine Rettung der Schilddrüse in der Mutante mit Hilfe der FGFs getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Für im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten experimentelle Arbeiten wurden Chemikalien der Qualität pro analysis (p. a.) verwendet. Diese wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Biomol (Hamburg), Biozym (Hameln), Fluka (Neu-Ulm), Life Technologies (Karlsruhe), Merck-Eurolab (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen).

Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer wurden von den Firmen Invitrogen GmbH (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Fermentas (St. Leon-Rot) und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) bestellt.

Verbrauchsmaterial stammte von Roth (Karlsruhe) und Sarstedt (Rommelsdorf) und Filtermaterial von den Firmen Schleicher & Schüll (Dassel), Macherey & Nagel (Düren) und Amersham (Freiburg).

2.2 Puffer, Lösungen und Medien

Alle verwendeten Standardlösungen und -puffer, sowie Nährmedien zur Kultivierung von *E.coli* wurden nach den Angaben von Sambrook und Russell (2001) unter Verwendung von doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O, Wasserreinigungssystem Milli-Q von Millipore, Eschborn) angesetzt. Lösungen für molekularbiologische Arbeiten sowie Nährmedien wurden vor Gebrauch autoklaviert bzw. sterilisiert (0,2 µm Filter, Roth). Medien wurden, insofern erforderlich, vor dem Giessen von Nährplatten mit den entsprechenden Antibiotika versetzt.

2.3 Zebrafische

2.3.1 Verwendete Zebrafischstämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Zebrafisch-Wildtyplinie entstammt ursprünglich einem Kölner Zoofachgeschäft (im Folgenden als *Wildtyp* bezeichnet).

Die *hands off* Mutante gibt es in zwei Varianten: Bei *han*^{S6}, dem starken Allel handelt es sich um eine Deletion (~100 kb). Diese Mutation wurde in einem Screen für ENU induzierte Mutationen, die Veränderungen der MF20 Immunofärbung aufwiesen, entdeckt (Alexander et al., 1998).

Bei *han*^{C99}, dem schwachen Allel, handelt es sich um eine Insertion (Yelon et al., 2000). Die Linie entstammt einem Screen für durch Gammastrahlen induzierte Mutationen als Teil des „Zebrafisch Deletions Projekt“.

Die *miles apart* Mutante wurde erstmals von Stainier et al. (1996) beschrieben.

2.3.2 Haltung und Zucht von Zebrafischen

Die Haltung der für die Experimente verwendeten Fische erfolgte in einem geschlossenen Aquariensystem der Firma Schwarz (Aquarienbau Göttingen), bei einem Lichtrhythmus von 14 h hell zu 10 h dunkel. Die Wassertemperatur wurde in einem Bereich von 24 - 28°C gehalten.

Das zur Aquarienfüllung verwendete und über Aktivkohle gereinigt Leitungswasser wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit VE Wasser verschnitten (Leitwert von ca. 500 - 600 µS/cm, Gesamthärte 17 - 20°dH). Nitrit- und Ammoniumkonzentration (nicht nachweisbar), Nitratkonzentration (< 50 mg / l) und pH-Wert (=7) wurden in regelmäßigen Zeitabständen kontrolliert und bei Abweichung nachreguliert.

Das Futter bestand aus einer Kombination aus herkömmlichem Fischtrockenfutter, frischgeschlüpfen Larven des Salinenkrebse *Artemia salina* sowie *Bosmidien*, heimische Süßwasserkrebse, die tiefgefroren bezogen und über mehrere Monate gelagert werden konnten.

Die Eiablage und Aufzucht der Fische geschah in Anlehnung an die Angaben „*The Zebrafish Book*“ (Westerfield, 1994).

Junge Zebrafisch-Embryonen wurden in Zebrafisch-Ringer (1/3 ZFR) gehalten. Dieser wurde wie folgt angesetzt:

Zebrafisch Ringer:

Stocklösungen

- | | | |
|----|---------|---|
| #1 | (25 x) | 169,5 g / l NaCl; 5,4 g / l KCl; 29,75 g / l Hepes (Sigma) |
| #2 | (100 x) | 26,4 g / l; CaCl ₂ ; 34,96 g / l; CaCl ₂ x 2 H ₂ O; Autoklavieren. |

$\frac{1}{3}$ ZFR: 12 ml #1 + 9 ml #2 + 879 ml dd H₂O; auf pH 7,2 mit NaOH, 1N einstellen.

Um der ab ca. 20 hpf einsetzenden Pigmentierung entgegenzuwirken, wurde dem Zebrafisch-Ringer eine 0,003%ige PTU-Lösung zugesetzt.

2.3.3 Bestimmung der Entwicklungsstadien

Die Bestimmung der Entwicklungsstadien erfolgte durch einfache Beobachtung am Stereomikroskop bei 8- bis 40-facher Vergrößerung und orientierte sich an den veröffentlichten Beschreibungen von Kimmel et al. (1992, 1995).

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Fixierung und Aufbewahrung

Vor dem Fixieren wurden die Embryonen entweder von Hand oder mit Hilfe von Pronase (Sigma) dechorioniert. Die Embryonen wurden ü.N. bei 4°C in einer 4%igen PFA -Lösung fixiert, bzw. 2 h bei RT. Das PFA wurde anschließend mehrmals zunächst mit PBT, dann mit Methanol ausgewaschen. Die Embryonen wurden bei -20°C in Methanol gelagert.

2.4.2 Einbetten in Durcupan (Einbettungsmedium für fixierte Embryonen)

Durcupan (mittelfest, *Fluka*) wurde wie folgt angesetzt:

32 ml Epoxydharz,

+ 27 ml Härter,

+ 1 ml Beschleuniger,

+ 0,6 ml Weichmacher.

Epoxydharz und Härter wurden zusammengefügt und gründlich vermischt. Tropfenweise wurde Beschleuniger zugegeben und schließlich der Weichmacher sehr gründlich bis zur völligen Schlierenfreiheit untergerührt. Das leicht zähflüssige Durcupan wurde in Einmal-Spritzen abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt.

Zunächst wurden die Embryonen jeweils 2 x 5 min in 50 %igem, 70 %igem, 90 %igem und 95 %igem Ethanol, sowie für jeweils 2 x 10 min in 100 %igem Ethanol und 100 %igem Azeton entwässert. Daraufhin wurden diese ü.N. in einem 1 : 1 Gemisch aus 100 %igem Azeton und Durcupan (mittelfest) inkubiert und offen stehen gelassen, damit das Azeton abdampft.

Schließlich wurden sie in Einbettungsförmchen mit frischem Durcupan (mittelfest) überführt und ü.N. bei 65°C stehen gelassen.

2.4.3 Einbetten in Glycerin

Aus nachfixierten Embryonen wurde das PFA mit PBT ausgewaschen jeweils in 30 %iges, 50 %iges, 70 %iges und 90 %iges Glycerin inkubiert, bis sie zu Boden sanken. Die Aufbewahrung erfolgte in 90- oder 100%igem Glycerin.

2.5 In situ Hybridisierungen

In situ Hybridisierungen wurden im wesentlichen nach dem „Zebrafishbook“ (Westerfield, 1994) durchgeführt.

In Methanol gelagerte Embryonen wurden in PBT gewaschen und anschließend mit Proteinase K (Sigma # P-2308; Stock-Lsg: 2 mg/ml) behandelt.

Folgende Inkubationszeiten wurden bei der Proteinase K Behandlung verwendet:

Stadium	Verdünnung	Dauer
<18 Som	keine Behandlung	keine Behandlung
18 Som	1:1000	5 min
24 hpf	1:1000	6 min
26 hpf	1:1000	8 min
28 hpf	1:1000	10 min
30 hpf	1:1000	30 min
32 hpf	1:500	25 min
35 hpf	1:250	10 min
48 hpf	1:250	35 min
55 hpf	1:250	45 min
72 hpf	1:100	60 min

Die Proteinase K wurde kurz mit PBT ausgewaschen und die Embryonen mit 4% PFA nachfixiert. Die Embryonen wurden danach etwa 5 Mal mit PBT ausgewaschen und anschließend mind. 2 h bei 60°C in Hyb⁺ (Hyb⁻: 50 %iges Formamid; 5 x SSC, 0,1 %iges Tween 20; Hyb⁺: 976 µl Hyb⁻, 10 µl denaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg / ml), 10 µl Heparin (5 mg / ml), 4 µl Hefe-tRNA (25 mg / ml) prähybridisiert.

Hybridisiert wurde ü.N. bei 60°C.

Digoxigenin gelabelte Sonden wurden von linearisierten Plasmiden mit Hilfe eines „RNA labeling and detection Kit“ (Roche) hergestellt.

Folgende Sonden wurden für diese Arbeit verwendet:

Sonde	Vektor	Plasmid von	linearisiert mit	Polymerase
<i>foxA2 (axial)</i>	pBSII	Strähle et al.	Dra1	T3
<i>hand2</i>	unbekannt	D. Yelon	Bam H1	T7
<i>hhex</i>	pGEMT	E. Ober	Nco 1	SP6
<i>nk2.1a</i>	pCS2+	K. Rohr	Bam H1	T7
<i>pax2.1</i>	pGEM-3Zf(+)	I. Mikkola	Bam H1	T7
<i>pax8</i>	pT7 blue	Pfeffer/Bussl.	Bam H1	T7
<i>tbx20 (cb826)</i>	pBSII-SK+	ZF stock center	Not 1	T7
<i>TG (cb717)</i>	pBSII-SK+	ZF stock center	Not 1	T7

Hierauf folgten je 15 min Waschschritte in Hyb+/2xSSC Gemischen (75:25, 50:50, 25:75), ein Mal Spülen in 2xSSC und zwei 30 minütige Waschschritte in 0,2xSSCT, alle bei 60°C.

Die folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zunächst etwa fünf Mal Waschen in PBT, danach 2-3 h Blocken in 0,5%iger Blocking Reagenz Lösung (Roche) und 2-3h inkubieren in Anti-DIG AP (1:5000) in Blocking Reagenz Lösung. Daraufhin wurde mehrere Male in kurzer Folge mit PBT gewaschen und übernacht bei 4°C gelagert.

Vor dem Färben wurden die Embryonen weitere 2 h in PBT, anschließend mehrere Male in phosphatfreier Pufferlösung (Xpho-Puffer) gewaschen. Zum Färben wurden die Embryonen in Färbeschalen überführt, in Färbelösung inkubiert und im Dunkeln zum Entwickeln stehen gelassen.

Folgende Färbelösungen wurden verwendet:

- BM Purple (Fertiglösung von Roche, #11 442 074 001)
- Magenta Phos Lösung (Magenta Phos von Sigma, #B-5667, Stocklsg.: 50 mg/ml in DMF; zum Färben 3,5µl pro 1 ml Xpho)

Nach der Färbung wurde mehrmals in PBT gewaschen, in 4%PFA nachfixiert, erneut mehrmals in PBT gewaschen und schließlich in 50%, 70%, 90% und 100% Glycerin inkubiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.6 Antikörperfärbungen

Die hier beschriebenen histologischen Methoden wurden nach Westerfield 1994 in geringfügig modifizierter Form durchgeführt.

Die Embryonen wurden mit Ausnahme derer, die auf Schilddrüsen-Funktionalität mit Anti-T4 Antikörper getestet wurden, mit PTU behandelt.

Für die Anti-T4 Antikörperfärbung wurden die Embryonen in einer 10%igen H_2O_2 -Lösung in Methanol ü.N. im Dunkeln gebleicht. Diese Lösung mit den Embryonen wurde dann mit der 4-fachen Menge an PBT verdünnt, den Tag über im Dunkeln stehen gelassen, in Methanol überführt und auf $-20^\circ C$ gelagert.

Die Embryonen wurden -wenn nicht schon für eine vorausgegangene in situ Färbung- mit Proteinase K entsprechend o.g. Tabelle behandelt.

Prinzipiell wurden alle Nachschritte bei $4^\circ C$ durchgeführt und vorher und nachher möglichst oft gewaschen.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

1. AK	Beschreibung	Verdünnung	bezogen von
α -T4	Kaninchen Anti-Thyroxin Antikörper	1 : 4000	DakoCytomation
α -TG	polyclonaler Kaninchen Anti- human Thyroglobulin Antikörper	1 : 6000	ICN Biomedicals
α -TH	Polyklonaler Kaninchen Anti- Tyrosin Hydroxylase Antikörper	1 : 200	Chemicon
MF20	Monoklonales anti-Myosin schwere Kette, Überstand, Maus	1 : 100	Developmental Studies Hybridoma Bank

2. AK	Beschreibung	Verdünnung	bezogen von
b-G-α-M- HRP	biotinylierter Ziege-Anti-Maus Antikörper, Meerrettich- Peroxidase konjugiert	1 : 200	Vectastain
b-G-α-R- HRP	biotinylierter Ziege-Anti- Kaninchen Antikörper, Meerrettich-Peroxidase konjugiert	1 : 200	Vectastain

Geblockt wurde für 2 h im Serum jenes Tieres aus dem der zweite AK stammte. Daraufhin wurden die Embryonen im ersten AK für 2 h inkubiert, ü.N. in PBT ausgewaschen, im zweiten, biotinylierten AK für mind. 2 h inkubiert und 2 h in PBT ausgewaschen. Für die nächsten Schritte wurde das ABC-Kit (Vectastain) verwendet. Dieses wurde ü.N. ausgewaschen, die Embryonen in Kulturschalen überführt, mehrmals in PBS gewaschen, 30 min in DAB (0,1%ig in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2)), welches 1:5 in PBS verdünnt war. Zum Färben wurde 1 μ l 0,3%iges H₂O₂ hinzupipettiert.

Nach erfolgter Färbung wurde mit PBT gewaschen und mit 4% PFA nachfixiert.

2.7 Mikro-Injektionen

Die Injektionen wurden ausschließlich im 1-Zellstadium vorgenommen. Die Morpholinos wurden mit Hilfe des Pneumatic PicoPump von WPI direkt in den Dotter der Embryonen injiziert. Für alle Mikro-Injektionen wurden Borosilikatglaskapillaren mit Filament (*Hilgenberg*, Art.Nr. 1403501) eingesetzt. Zum Ziehen der Kapillaren stand ein WPI-Puller zur Verfügung, bei dem stets „Programm 75“ verwendet wurde.

Morpholino	Morpholino Oligo Sequenz	Beschrieben von
<i>endothelin 1 (edn1)</i>	5'-GTAGTATGCAAGTCCCGTATTCCAG-3'	Miller et al., 2001
<i>lockjaw 3.1 (low)</i>	5'-GAAATTGCTTACCTTTTTTGATTAC-3'	Knight et al., 2003

2.8 Anlagenplan (*fate mapping*)

Die verwendete Anlagenplan Strategie ist eine Modifikation bereits beschriebener Protokolle (z.B. Keegan et al., 2004), weiterentwickelt durch Jeff Schoenebeck (Skirball Institute Of Biomolecular Medicine, persönliche Kommunikation).

Die Versuche wurden am Skirball Institute Of Biomolecular Medicine der NYU in New York durchgeführt.

Im Einzellstadium wurden Wildtyp-Embryonen mit ~5nl einer 2,5%igen Caged-Fluorescein Lösung (DMNB-caged-fluorescein and biotin, lysine fixable, Molecular Probes, #D-7146) in 5 mg/ml Phenolrot in 0,2M KCl injiziert. Um Hintergrundfärbung zu vermeiden wurden alle Schritte des *fate mappings* im Dunkeln durchgeführt.

Im 6-Somitenstadium wurden die Embryonen dechorioniert und auf einer agarosebeschichteten Petrischale ausgerichtet. Im 6- bis 9-Somitenstadium wurden vorzugsweise endodermale Zellen 1-2 Sekunden einem 375 nm Stickstoff Laser (Micropoint Laser System, Photonic Instruments) ausgesetzt, der durch ein 40-faches Wasserimmersionsobjektiv an einem Zeiss Axioplan 2 Mikroskop fokussiert war. Das Mikroskop war mit einer gekühlten CCD Kamera (Pentamax, Princeton Instruments) und einer automatischen Blende (Uniblitz) ausgestattet und wurde durch die Software Metamorph 4.5 Imaging System (Universal Imaging) gesteuert. In jedem Experiment wurde die Position des Uncagens schriftlich und photographisch festgehalten.

Die Embryonen wurden anschließend PTU behandelt und bei 55 hpf in PFA fixiert. Danach wurde zunächst eine in situ Hybridisierung mit *nk2.1a* als Sonde und Magenta Phos als Substrat durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurde das Fluorescein wie folgt detektiert:

Nach dem Nachfixieren wurden die Embryonen in 4% PFA eine Stunde bei 60°C inkubiert, das PFA wurde mit PBT ausgewaschen, die Embryonen 2 h in Blocking Reagenz und schließlich übernacht bei 4°C in Anti-Fluorescein AP Fab (1:5000) in Blocking Reagenz inkubiert. Daraufhin wurde in zuerst in PBT, dann in Xpho gewaschen und in einer NBT/BCIP-Lösung (4,5µl NBT (75 mg/ml in 70% Dimethylformamid) und 3,5µl BCIP (50 mg/ml BCIP-Toluidinsalz in DMF) in Xpho-Puffer) gefärbt.

2.9 Transplantationen

In den Transplantationsexperimenten wurden stets RDA/BDA (1 : 1 Rhodamin Dextran Amin (Molecular Probes) 50 mg / ml in 0,3 KCl; Biotin Dextran Amin 10.000 MW (Molecular Probes)) gelabelte Zellen im 1000-Zellstadium in gleich alte *han*^{S6} Mutanten transplantiert.

Zu Beginn wurde das RDA/BDA Gemisch in Zebrafisch Embryonen im 1-Zellstadium injiziert. Im 1000-Zellstadium wurden sowohl injizierte Wildtypen, als auch Mutanten dechorioniert und in den Vertiefungen der agarosebeschichteten Petrischalen ausgerichtet.

Wildtypzellen wurden über eine abgebrochene Kapillare ohne Filament (Hilgenberg, #1413017) durch ein Öldrucksystem (Zeiss) mit Hilfe von Mikromanipulatoren (Zeiss) herausgesaugt und unter die oberste Zellschicht am Rand der Blastomere der Mutanten eingefügt.

Die erzeugten Chimären wurden in 1/3 ZFR mit PTU gehalten und bei 55 hpf fixiert.

Die fixierten Embryonen wurden einer dreifach-Färbung unterzogen, zuerst eine *nk2.1a* in situ Hybridisierung mit BM Purple als Substrat (s.o.), dann eine Biotin-Detektion mit einer Nickel-DAB-Lösung als Substrat und schließlich eine Herz-Antikörperfärbung mit dem MF20 Antikörper und DAB als Substrat (s.o.).

Biotin wurde mit Hilfe des ABC Kits (Vectastain) nach folgendem Protokoll detektiert:

Nach der in situ Färbung wurde übernacht mit PBT gewaschen. Der AB Komplex wurde eine halbe Stunde vorinkubiert und schließlich wurden die Embryonen 2 h darin inkubiert. Dann wurde übernacht in PBT gewaschen und anschließend die Embryonen 30 min in einer Lösung inkubiert, die aus 300µl DAB, 64µl NiCl₂ und 640 µl PBS pro ml Lösung bestand. Für die Färbereaktion wurde 1µl 0,03%iges H₂O₂ hinzupipettiert. Nach erfolgter Färbereaktion wurde mit PBT gewaschen und mit 4%PFA nachfixiert.

2.10 Mikropartikel Implantationen

Die Mikropartikel Implantationen erfolgten im wesentlichen nach bereits beschriebenen Protokollen (z.B. Reifers et al., 2000). Dieses Protokoll wurde von A. Picker erweitert und persönlich gezeigt.

Für die Mikropartikel Implantationen wurden Polystyrene Beads von Polysciences (Katalog # 07314) mit einem Durchmesser von 45 µm gewählt. Die Mikropartikel-Lösung wurde durch Schütteln suspendiert, ein Tropfen Mikropartikel-Suspension in ein Eppendorf Röhrchen mit 500 µl Ethanol versetzt, aliquotiert und 10 min bei 14000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Mikropartikel wurden bei 50°C getrocknet. Proteinlösung wurde hinzupipettiert und für mind. 48h bei 4°C inkubiert.

Als Proteine wurden FGF1 (aFGF von Sigma (Produkt #: F5542), human recombinant, Stocklsg. 250 µg / ml) und FGF2 (bFGF von Roche (Kat. # 11123149001), Stocklsg. 100 µg / ml) verwendet.

Die Mikropartikel-Implantationen wurden in einer modifizierten Zebrafisch Ringerlösung (116 mM NaCl, 3 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES) durchgeführt.

Embryonen wurden auf agarosebeschichteten Petrischalen dechorioniert und dann in 42°C warme 1,2%ige LMP Agarose (Invitrogen # 15517-014) in modifiziertem Zebrafischringer überführt. Die Embryonen wurden mit der Agarose auf eine kleine Petrischale pipettiert und vor dem Erkalten der Agarose ausgerichtet. Mit dem Skalpell wurden Keile zum Embryo geschnitten, Ringer hinzugefügt und die Konturen am Embryo mit einer stumpfen Wolframnadel

nachgezogen. Anschließend wurden die Agarosekeile entfernt, so dass ein Zugang zum Embryo entstand. Mit einer Kapillare wurde Mineralöl (Sigma # M-8410) auf die zu öffnende Stelle des Embryos aufgetragen, so dass die Epidermiszellen abstarben und ein Loch entstand. Mikropartikel wurden in die Nähe der Embryonen pipettiert und mit einer stumpfen Wolframnadel in die durch Einwirken des Öls entstandene Öffnung geschoben. Nach 30 min wurde der Embryo aus dem Agaroseblock befreit und in eine frische Petrischale überführt. Die implantierten Embryonen wurden PTU-behandelt und bei ca. 28 hpf fixiert. Die fixierten Embryonen wurden in einer in *nk2.1a* situ Hybridisierung gefärbt und z.T. mit einer MF20 Antikörperfärbung gegengefärbt.

3 Ergebnisse

3.1 *pax2.1* ist im Schilddrüsenprimordium des Zebrafischs ab 24 hpf exprimiert, *pax8* ab 28 hpf

Bei Beginn der vorliegenden Doktorarbeit waren im Zebrafisch zwei Gene bekannt, die, wie in der Maus (Lazzaro et al., 1991; Macchia et al., 1998; Martinez Barbera et al., 2000), auch im Schilddrüsenprimordium des Zebrafischs exprimiert sind: *nk2.1a* und *hhex*. *nk2.1a* und *hhex* sind ab 24 hpf im Schilddrüsenprimordium des Zebrafischs exprimiert (Rohr und Concha, 2000).

Die Gene *pax2.1* und *pax8* waren bisher vor allem aus Studien über die Gehirnentwicklung des Zebrafischs bekannt (Lun und Brand, 1998; Reifers et al., 1998). Die Expression im Schilddrüsenprimordium des Zebrafischs wurde bisher nicht beschrieben.

Hiermit wird nun gezeigt, dass *pax2.1* und *pax8* im Schilddrüsenprimordium exprimiert werden. *pax2.1* ist wie *hhex* und *nk2.1a* ab 24 hpf im ventralen Teil des primitiven Pharynx exprimiert (Abb. 11A). *pax8* Expression im Schilddrüsenprimordium beginnt bei 28 hpf. Die Expression beider Gene in der Schilddrüse wurde bis mind. 72 hpf nachgewiesen.

In in situ Doppelfärbungen mit den bereits bekannten Zebrafisch-Schilddrüsenmarkern konnten die Expressionsdomänen aller dieser Gene in der Schilddrüse verglichen werden (Abb. 11B, C, D). In *hhex*-gefärbten *wholemout* Embryonen (Abb. 11C) scheint eine leicht vergrößerte Expressionsdomäne vorzuliegen. In Querschnitten durch das Schilddrüsenprimordium von Zebrafischembryonen zeigte sich bei *hhex*-gefärbten Embryonen anhand morphologischer Kriterien, dass das *hhex* Gen nicht nur im kompletten Schilddrüsenprimordium exprimiert wird, sondern auch im angrenzenden Herzgewebe (nicht dargestellt). Im Schilddrüsenprimordium überlappen alle vier Schilddrüsenmarker aber vollständig.

Im Schilddrüsenprimordium der Maus ist das Orthologe Gen *pax2* nicht exprimiert (Daten nicht dargestellt).

Im Zebrafisch führen Mutationen im *pax2.1* Gen zum *no isthmus (noi)* Phänotyp, der ähnliche Defekte, wie bei *pax2* Mutationen in der Maus aufweist (Brand et al.,

1996; Lun und Brand, 1998; Macdonald et al., 1997; Majumdar et al., 2000). Das Allel *tu29* der *noi* Mutante trägt eine Punktmutation im *pax2.1* Gen und entspricht einem Nullallel (Lun und Brand, 1998).

Um die Frage zu klären, ob das Fehlen von *pax2.1* zu einem schilddrüsenspezifischen Phänotyp führt, wurde die Expression aller Schilddrüsenmarker in *noi^{tu29/tu29}* Mutanten untersucht.

Dabei zeigt sich, dass *hhex* und *nk2.1a* im Schilddrüsenprimordium bei 24 bzw. 30 hpf exprimiert sind (Abb. 11E –H). Sowohl die *hhex* Expression (Abb. 11E, F), als auch die *nk2.1a* Expression (Abb.11G, H) ist im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert. *pax8* Expression ist zu keinem Zeitpunkt detektierbar (Abb. 11I, J). Ab etwa 30 hpf ist keine *nk2.1a* Expression zu beobachten, wenig später verschwindet auch die *hhex* Expression.

In Zebrafisch Wildtypembryonen werden ab 72 hpf Schilddrüsenhormone in der Schilddrüse produziert. Funktionelle Tests mit einem Anti-T4 Antikörper beweisen, dass bei etwa 7 dpf in *noi^{tu29/tu29}* Mutanten kein Schilddrüsenhormon, d.h. weder Thyroxin (T4, Abb. 11L) noch Trijodthyronin (T3, hier nicht dargestellt) gebildet wird, wohingegen in Wildtypen fünf bis sieben Follikel zu finden sind (Abb. 11K).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass in Abwesenheit von *pax2.1* ein Schilddrüsenprimordium gebildet wird. Der spätere Verlust der Schilddrüsenmarkerexpression und die Abwesenheit von *pax8* zeigen jedoch, dass *pax2.1* für die korrekte Entwicklung der Schilddrüse erforderlich ist.

Abb. 11 (folgende Seite): *pax2.1* im Schilddrüsenprimordium

A: Expression von *pax2.1* im wt bei 24 hpf, das Schilddrüsenprimordium (Pfeil) liegt im ventralen Pharynx, in situ Doppelfärbungen von *pax2.1* + *pax8* (B), *hhex* + *nk2.1a* (C) und *hhex* + *pax8* in wt Embryonen bei 32 hpf zeigen vollständig überlappende Expressionsdomänen. *hhex* (E, F) und *nk2.1a* (G, H) sind in homozygoten *noi^{tu29/tu29}* Mutanten reduziert, *pax8* ist ausgeschaltet (I, J). In homozygoten *noi^{tu29/tu29}* Embryonen wird kein T4 produziert (K, L)

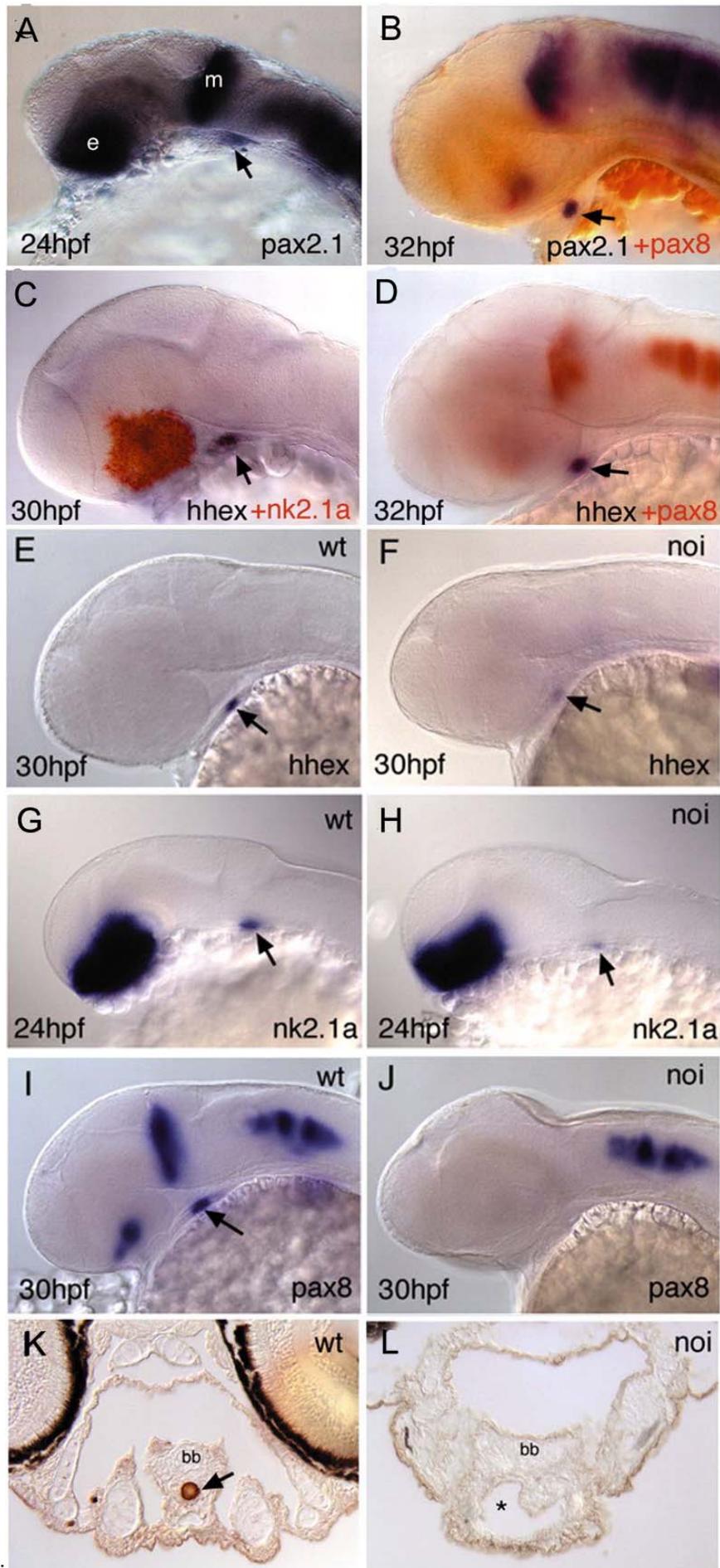


Abb. 11:

3.2 *han*^{S6} Mutanten entwickeln keine Schilddrüse

Von Rohr und Concha (2000) wurde beobachtet, dass die Schilddrüse sehr nahe am Herz entsteht und in ihrer morphogenetischen Bewegung der Bewegung des Herzens folgt. Aufgrund dieser Beobachtung wurden bereits existierende Herzmутanten auf einen Schilddrüsenphänotyp untersucht. Bei diesem „Rescreening“ von Mutanten fielen die Zebrafisch *han* Mutanten auf, von denen es zwei Allele gibt: *han*^{S6} und *han*^{C99}. Bei *han*^{S6}, einem Nullallel, handelt es sich um eine vollständige Deletion des *hand2* Gens, bei *han*^{C99} um eine Insertion mit einem schwächeren Herzphänotyp, als in *han*^{S6} Mutanten beobachtet wurde (Yelon et al., 2000).

In dieser Arbeit wurden zunächst die bekannten Schilddrüsenmarker in homozygoten *han*^{S6} Mutanten und in ihren wildtypischen Geschwistern getestet. Dabei ist zu erkennen, dass in allen homozygoten Mutanten die Expressionsdomäne im Schilddrüsenprimordium schon ab 24 hpf komplett fehlt, wohingegen andere Expressionsdomänen dieser Gene, z.B. im Gehirn, unverändert sind (Abb. 12A-F). Es zeigt sich auch anhand von Expressionsstudien an 55 hpf alten *han*^{S6} Mutanten (hier nicht dargestellt), dass auch später die Expression im Schilddrüsenprimordium ausbleibt und nicht verzögert einsetzt. In wenigen Fällen ist in Stadien bis 35 hpf in manchen homozygoten Mutanten eine schwache, diffuse *nk2.1a* Expression im Endoderm an der ungefähren Stelle des Schilddrüsenprimordiums zu beobachten, diese ist aber spätestens bei 55 hpf verschwunden.

In Zebrafisch Wildtypembryonen sind ab 72 hpf Schilddrüsenhormone in der Schilddrüse nachzuweisen. Funktionelle Tests mit einem Anti-T4 Antikörper zeigen, dass in homozygoten *han*^{S6} Mutanten kein Schilddrüsenhormon, d.h. weder Thyroxin (T4, Abb. 12G, H) noch Trijodthyronin (T3, hier nicht dargestellt) gebildet wird.

Expressionsanalysen mit Endodermmarkern, wie *foxA2* (voriger Name: *axial*) zeigen, dass das Endoderm homozygoter *han*^{S6} Mutanten bei 24 hpf wildtypisch ist (Abb. 12I, J).

In vorläufigen Studien zur Apoptose konnte in Stadien zwischen 18 hpf und 30 hpf keine auffällige Häufung von Zelltod im Endoderm festgestellt werden (hier nicht dargestellt).

Die Abwesenheit von *hand2* führt damit zum kompletten Verlust der Schilddrüsenmarkerexpression von Beginn an, scheint aber keine Auswirkung auf die korrekte Ausprägung des Endoderms zu haben.

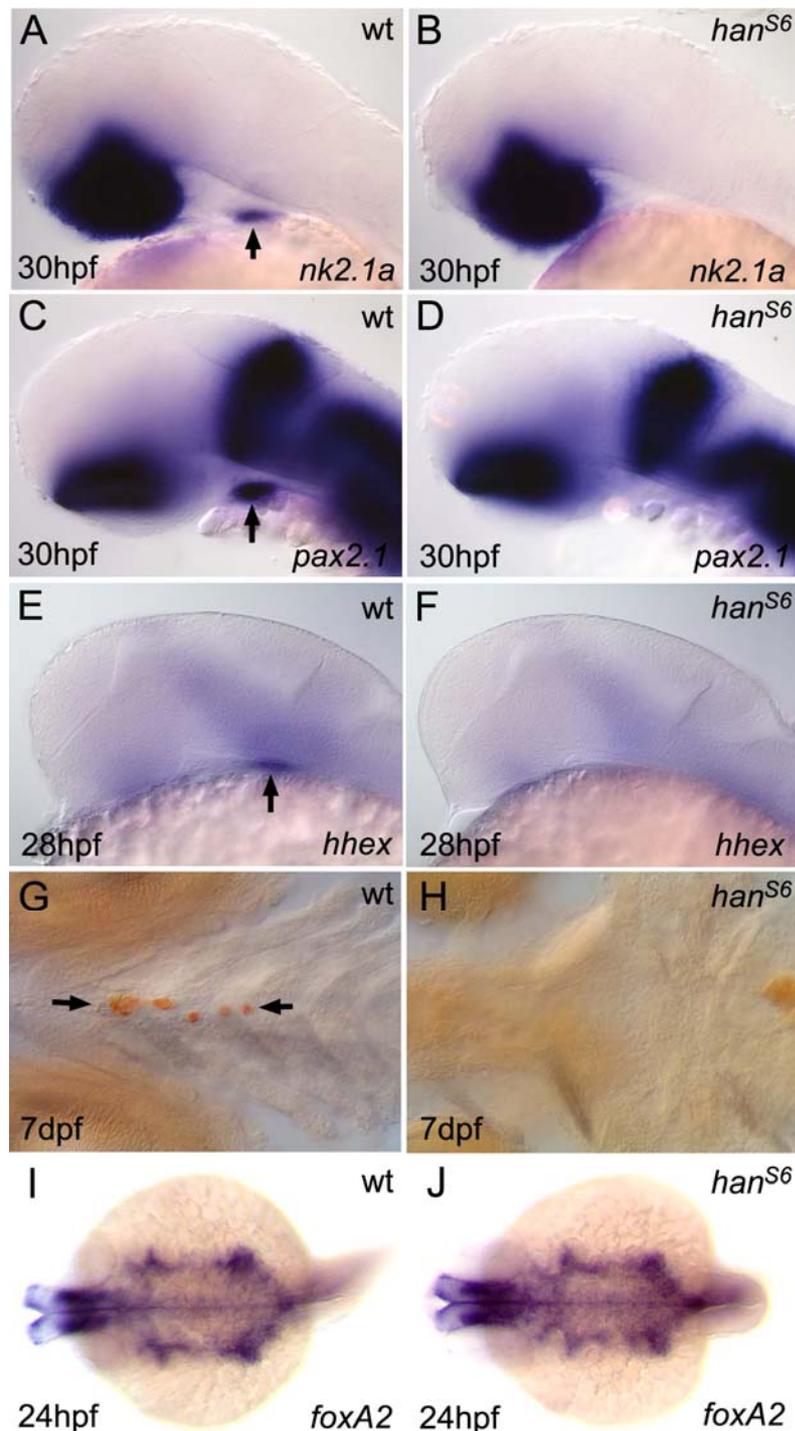


Abb. 12: Das Schilddrüsenprimordium in Wildtypen und homozygoten *han^{S6}* Mutanten
 Vergleich der Expressionsmuster der Schilddrüsenmarker *nk2.1a* (A, B), *pax2.1* (C, D) und *hhex* (E, F) zwischen 30 bzw. 28 hpf alten homozygoten *han^{S6}* Mutanten (B, D, F) und deren nicht-mutanten Geschwistern (A, C, E). Homozygote *han^{S6}* Mutanten entwickeln keine Schilddrüse. Anti-T4 AK Färbung zeigt T4-positive Follikel in Wildtypen (G) und keine gefärbten Zellen in homozygoten *han^{S6}* Mutanten. Die Expression von endodermalen Markern ist normal in homozygoten *han^{S6}* Mutanten (J) gegenüber den wildtypischen Geschwistern (I).

3.3 *han*^{C99} Mutanten zeigen eine verkleinerte Schilddrüse

Im Gegensatz zum starken Allel *han*^{S6}, bei dem eine etwa 100 kb große Region im Genom deletiert ist, handelt es sich beim schwachen Allel *han*^{C99} um eine Insertion, die zu falschem *Splicing* und damit zu einem fehlerhaften Protein führt (Yelon et al., 2000).

Kurz nach 24 hpf ist in *han*^{C99} Mutanten, im Unterschied zu *han*^{S6} Mutanten, bereits mit den Schilddrüsenmarkern *nk2.1a*, *hhex*, *pax2.1* und *pax8* ein Schilddrüsenprimordium zu sehen (Daten nicht dargestellt), das in diesem Stadium nicht von den Schilddrüsenprimordien seiner wildtypischen Geschwister zu unterscheiden ist.

Bei 55 hpf ist die Schilddrüse in homozygoten *han*^{C99} Mutanten (Abb. 13B, D, F, H) kleiner und eher kugel- als linsenförmig, als im Wildtyp (Abb. 13A, C, E, G). Die Position der Schilddrüse in *han*^{C99} Mutanten ist etwas weiter posterior im Bezug zum Pharynx, dennoch ist die relative Position der Schilddrüse zum Herz die gleiche, wie im Wildtyp: die Schilddrüse liegt zu diesem Zeitpunkt dorsal auf dem posterioren Ende des Ventrikels und dem *Bulbus arteriosus* (*outflow tract* des Herzens).

In Anti-T4 Antikörperfärbungen (Abb. 13I, J) ist zu sehen, dass die Schilddrüse ab 72 hpf funktional ist und Schilddrüsenhormone produziert. Es zeigt sich aber, dass die Schilddrüse später nur aus etwa einem Drittel bis halb so vielen Follikeln besteht, wie im Wildtyp. In seltenen Fällen sind zwei bilaterale Follikel zu sehen.

Da in homozygoten *han*^{C99} Mutanten immer ein Schilddrüsenprimordium entsteht und dieser Phänotyp nur wenig Rückschlüsse auf die Rolle von *hand2* in der Schilddrüsenentwicklung zulässt, spielt diese Mutante in den weiteren Betrachtungen in dieser Arbeit keine Rolle.

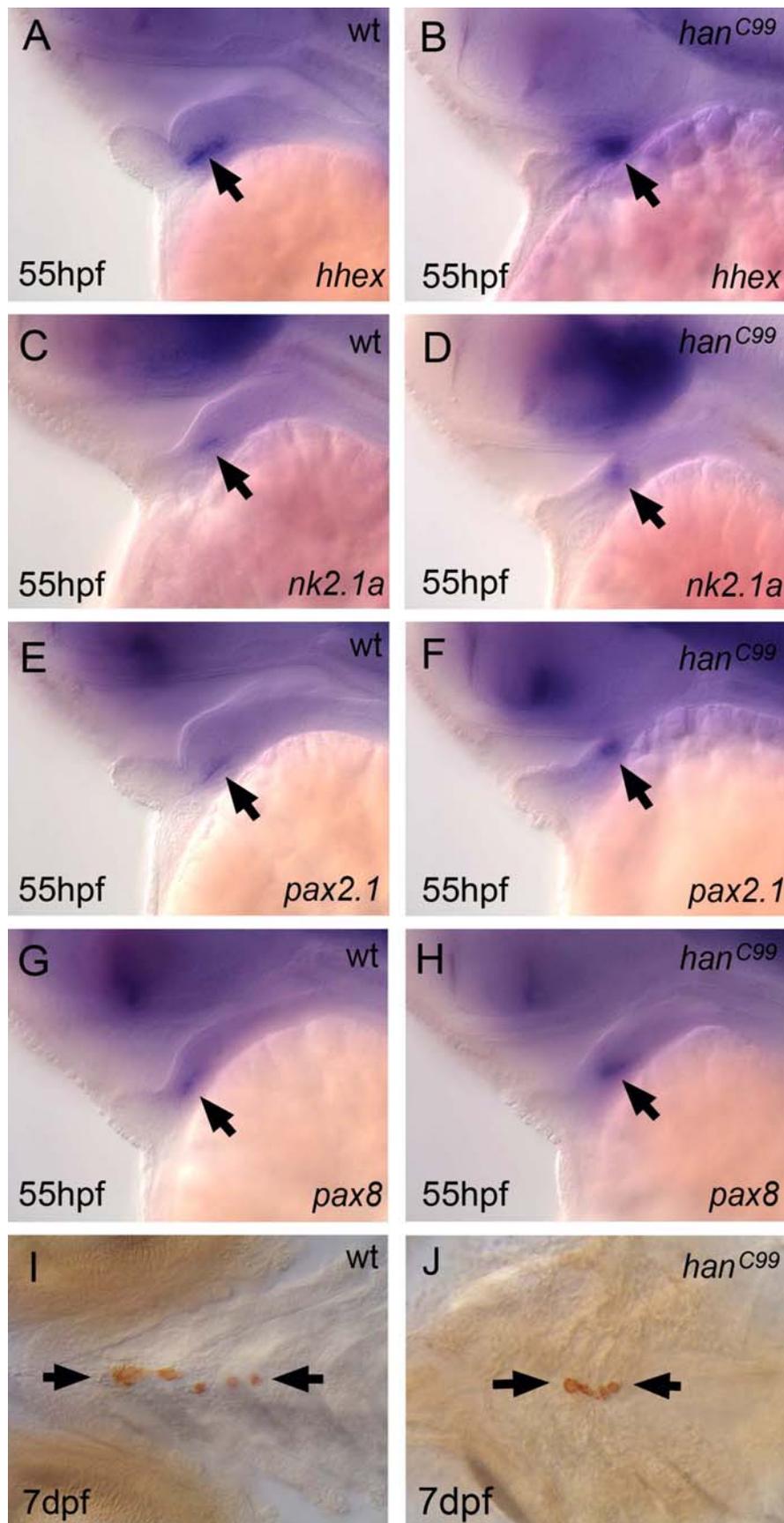


Abb. 13: Homozygote *han^{C99}* Mutanten weisen eine Schilddrüse auf. Diese ist jedoch kleiner als im Wildtyp. Vergleich der Expressionsmuster von *hhex* (A, B), *nk2.1a* (C, D), *pax2.1* (E, F) und *pax8* (G, H) zwischen Wildtypen (A, C, E, G) und homozygoten *han^{C99}* Mutanten (B, D, F, H). Die Schilddrüse in homozygoten *han^{C99}* Mutanten ist funktional, aber hypomorph (I, J)

3.4 Das Expressionsmuster von *hand2* und die Position der Schilddrüse

Der *hands off* Locus codiert für den bHLH Transkriptionsfaktor Hand2. Die Expression des zugehörigen Gens *hand2* im Herz und den Flossen wurde bereits von Yelon et al. (2000) beschrieben und in der Einleitung dieser Dissertation detaillierter dargestellt. An dieser Stelle soll vor allem auf weitere Expressionsdomänen eingegangen werden. Ebenso sollen die morphogenetischen Bewegungen der einzelnen Gewebe, in denen *hand2* exprimiert wird, durch den Vergleich mit der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (*midbrain hindbrain boundary*, MHB) aufgezeigt werden. Die MHB wird im folgenden durch *pax2.1* Expression dargestellt.

pax2.1 ist bereits in frühen Somitogenese-Stadien (Stadienerklärung in der Einleitung) in der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (*midbrain-hindbrain boundary*, MHB) exprimiert und überlappt in keiner Expressionsdomäne mit *hand2*. Insofern eignet sich *pax2.1* hervorragend, um die Lage der MHB mit dem *hand2* exprimierenden Teil des anterioren Seitenplattenmesoderms (*lateral plate mesoderm*, LPM) zu vergleichen.

hand2 ist von Beginn der Somitogenese an in zwei bilateralen Streifen in einem Großteil des LPMs exprimiert. Das anteriore Ende des LPMs reicht bis zu den Augenanlagen, das posteriore Ende umläuft die Schwanzknospe (Yelon et al., 2000; nicht dargestellt).

Die *hand2* Expression bleibt während allen Somitogenese-Stadien erhalten, die beiden Streifen teilen sich jedoch ab dem ca. 5-Somitenstadium in einen anterioren und einen posterioren Teil auf, so dass dazwischen eine Lücke entsteht. In diesem Stadium liegt die MHB etwa 5- 10 Zelldurchmesser weiter anterior zum *hand2* exprimierenden anterioren LPM.

Im 12-Somitenstadium reichen die beiden *hand2* exprimierenden Streifen mit dem anterioren Ende gerade bis zu MHB (Abb. 14A). In der weiteren Entwicklung verschieben sich die beiden Gewebe gegeneinander, dabei bewegt sich das Seitenplattenmesoderm anteriorwärts im Vergleich zur MHB.

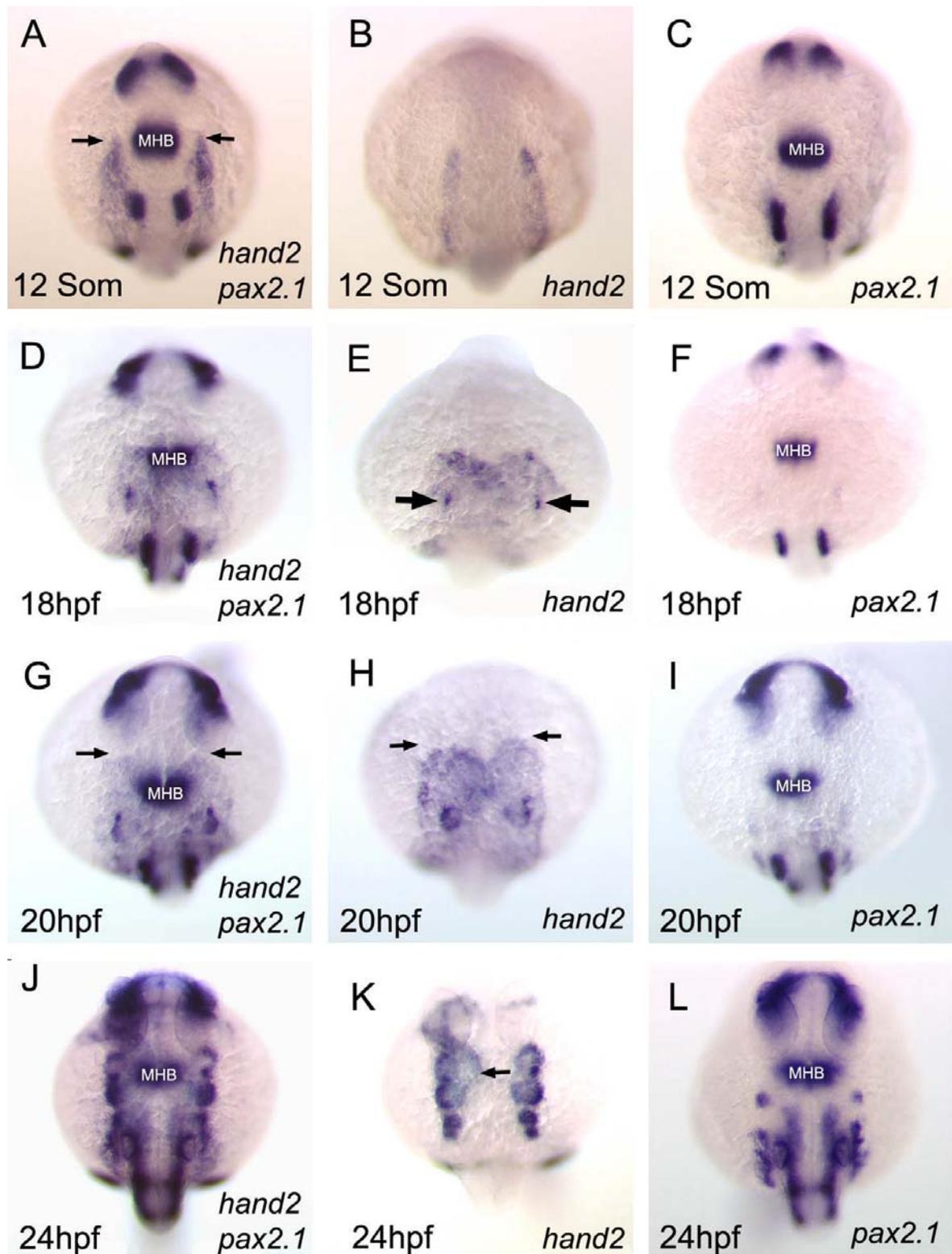


Abb. 14: Die Expression von *hand2* im Vergleich zur Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (MHB)
 A – C: im 12-Somitenstadium, die *hand2* Expressionsdomäne im zweistreifigen LPM reicht anterior bis zur MHB heran (A, Pfeile), D – F: Im 18-Somitenstadium fusionieren die beiden *hand2* exprimierenden LPM-Hälften unterhalb der MHB (D) und eine punktförmige, bilaterale Expressionsdomäne (E, Pfeile) tritt auf. G – I: Die fusionierenden *hand2* exprimierenden LPM-Hälften schieben sich bei 20 hpf in anteriorer Richtung unterhalb der MHB vorbei (G). Das anteriore Ende der *hand2* Expression liegt bereits anterior von der MHB (G, H, Pfeile). J – K: Das Herz hat sich komplett unter der MHB durchgeschoben und liegt nun mit dem *Bulbus arteriosus* (Pfeil) unterhalb der MHB (J, K). MHB: Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze

Im 18-Somitenstadium setzen zwei Prozesse ein, die das Expressionsmuster von *hand2* deutlich verändern (Abb. 14D, E, F). Zum einen wandern *hand2*-exprimierende Zellen des zweistreifigen Seitenplattenmesoderms in Richtung Mittellinie. Im 20-Somitenstadium fusionieren die beiden bilateralen Streifen ventral von der MHB (14D). Während der folgenden Bildung und des Ausdehnens des Herzschlauches nach anterior-links schiebt sich die *hand2* exprimierende Herzdomäne unterhalb der MHB vorbei (Abb. 14G, H, I) und erreicht ihre endgültige Position, bei der der posteriore Teil des Ventrikels und der *Bulbus arteriosus* ventral von der MHB zu liegen kommen (Abb. 14J, K, L).

Zum anderen wandern Zellen aus der Neuralleiste zuerst anterior (Abb. 14H) dann posterior (Abb. 14K) in die Region der Kiemenbögen ein und exprimieren dort *hand2*, so dass sich die Anzahl der Kiemenbögen mit fortschreitender Entwicklung erhöht.

Ab dem 18-Somitenstadium sind außerdem zwei kleine bilaterale Punkte an den Spitzen der Aortenbögen zu sehen (Abb. 14E, Pfeile), deren Herkunft bislang unbekannt ist. Diese beiden Punkte sind ab ca. 24 hpf genau zwischen dem ersten und zweiten Kiemenbogen zu finden (Abb. 14K, 15 D).

Diese unbekannte, punktförmige Expressionsdomäne sollte näher untersucht werden. Die bilateralen Punkte weisen eine ähnliche Lage, wie eine *tbx20* Expressionsdomäne auf (Abb. 15B, Pfeil). *tbx20* Expression ist bisher im Herz, der dorsalen Aorta und in cranialen Motorneuronen beschrieben. Über diese Expressionsdomäne ist nichts bekannt. Ebenso ähnelt die Lage der beiden Punkte den Tyrosin-Hydroxylase-positiven (TH+) „*arch associated cells*“ (Abb. 15C) (Guo et al., 1999).

Vergleiche dieser drei Domänen zeigen, dass die Tyrosin-Hydroxylase-positiven Zellen mit den *tbx20* exprimierenden Zellen überlappen (Abb. 15E, G), während diese nur benachbart und nicht überlappend zu den *hand2* exprimierenden Zellen liegen (Abb. 15D, F).

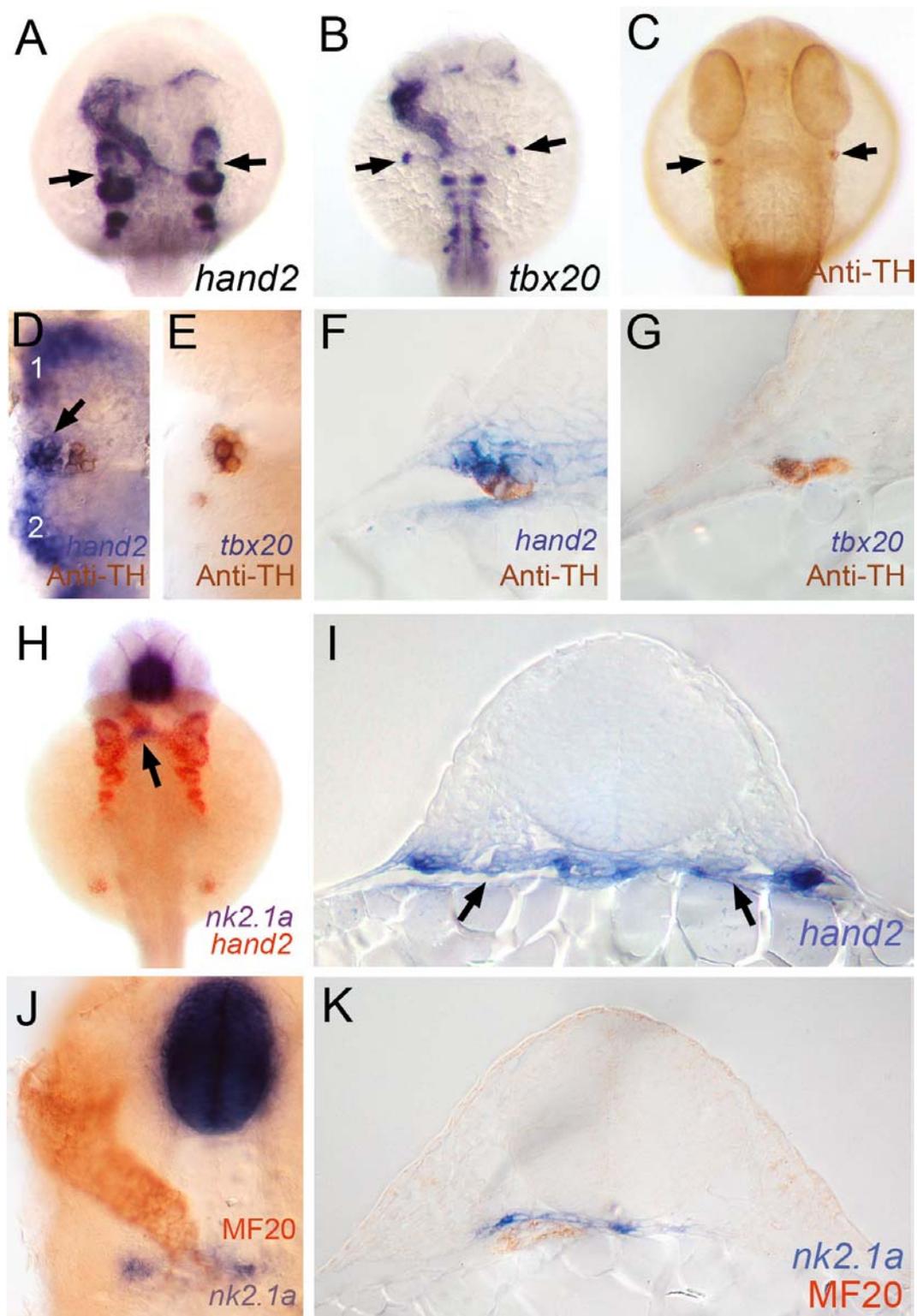


Abb. 15: Expression von *hand2*

A: Expression von *hand2* bei 26 hpf in zwei bilateralen Punkten zwischen den Kiemenbögen 1 und 2 (siehe auch Abb. D, Pfeil), B: Expression von *tbx20* bei 26 hpf in zwei bilateralen Punkten (Pfeile), C: TH-positive Zellen in zwei bilateralen Punkten bei 26 hpf; die Expressionsdomäne von *hand2* überlappt nicht mit TH-positiven Zellen (D), dies ist auch in Schnitten zu sehen (F). Die Expressionsdomäne von *tbx20* überlappt mit TH-pos. Zellen (E, In Schnitten: G). H: Doppelfärbung von *nk2.1a* und *hand2*, das Schilddrüsenprimordium liegt dem *Bulbus arteriosus* auf (Pfeil), I: In Querschnitten ist zu sehen, dass *hand2* auch im Endoderm (angedeutet durch Pfeile) exprimiert ist. J: Das Schilddrüsenprimordium (*nk2.1a* Domäne) und das Herz (MF20-Färbung) liegen asymmetrisch auf der linken Körperseite. Die ist auch in Querschnitten durch die Schilddrüsenregion (K) zu sehen.

Vergleiche zwischen der *hand2* Expression und der *nk2.1a* Schilddrüsendomäne zeigen, dass das Schilddrüsenprimordium, dorsal auf dem posterioren Ende des Ventrikels und dem *Bulbus arteriosus* aufliegt (Abb. 15H). Die MHB, die oben beschriebenen zwei *hand2* exprimierenden Punkte, das posteriore Ende des Ventrikels bzw. der *Bulbus arteriosus* und das Schilddrüsenprimordium liegen also in diesem Stadium auf derselben antero-posterioren Höhe (Abb. 15J). Die Flossen sind sehr weit vom Schilddrüsenprimordium entfernt.

In Schnitten durch die Herz- und Kiemenregion (Abb. 15I) zeigt sich, dass *hand2* in diesem Stadium auch in diesem Teil des Endoderms exprimiert ist. Damit ist *hand2* auch in der Schilddrüse selbst exprimiert (Vgl. Abb. 15K).

Die Schilddrüse wird in bisherigen Veröffentlichungen traditionell als Mittellinienorgan bezeichnet. Anhand von den im Rahmen dieser Arbeit gemachten wholemount Färbungen (Abb. 15J) und Schnitten durch das Schilddrüsenprimordium (Abb. 15K) konnte gezeigt werden, dass das Schilddrüsenprimordium in sehr frühen Stadien links von der Mittellinie zu finden ist, genau wie das posteriore Ende des Ventrikels. In den Schnitten ist außerdem deutlich zu erkennen, dass das Schilddrüsenprimordium direkt an das Herzgewebe angrenzt und keinerlei Zellschichten dazwischen zu finden sind.

3.5 Erstellen eines Anlagenplans: Schilddrüsenvorläuferzellen entstammen dem Endoderm auf der Höhe der MHB

Mit allen bisher bekannten Schilddrüsenmarkern ist das Schilddrüsenprimordium frühestens ab 24 hpf zu erkennen. Über die Lage der Schilddrüsenvorläuferzellen und aus welchem Teilbereich des Endoderms diese sich rekrutieren war bisher nichts bekannt.

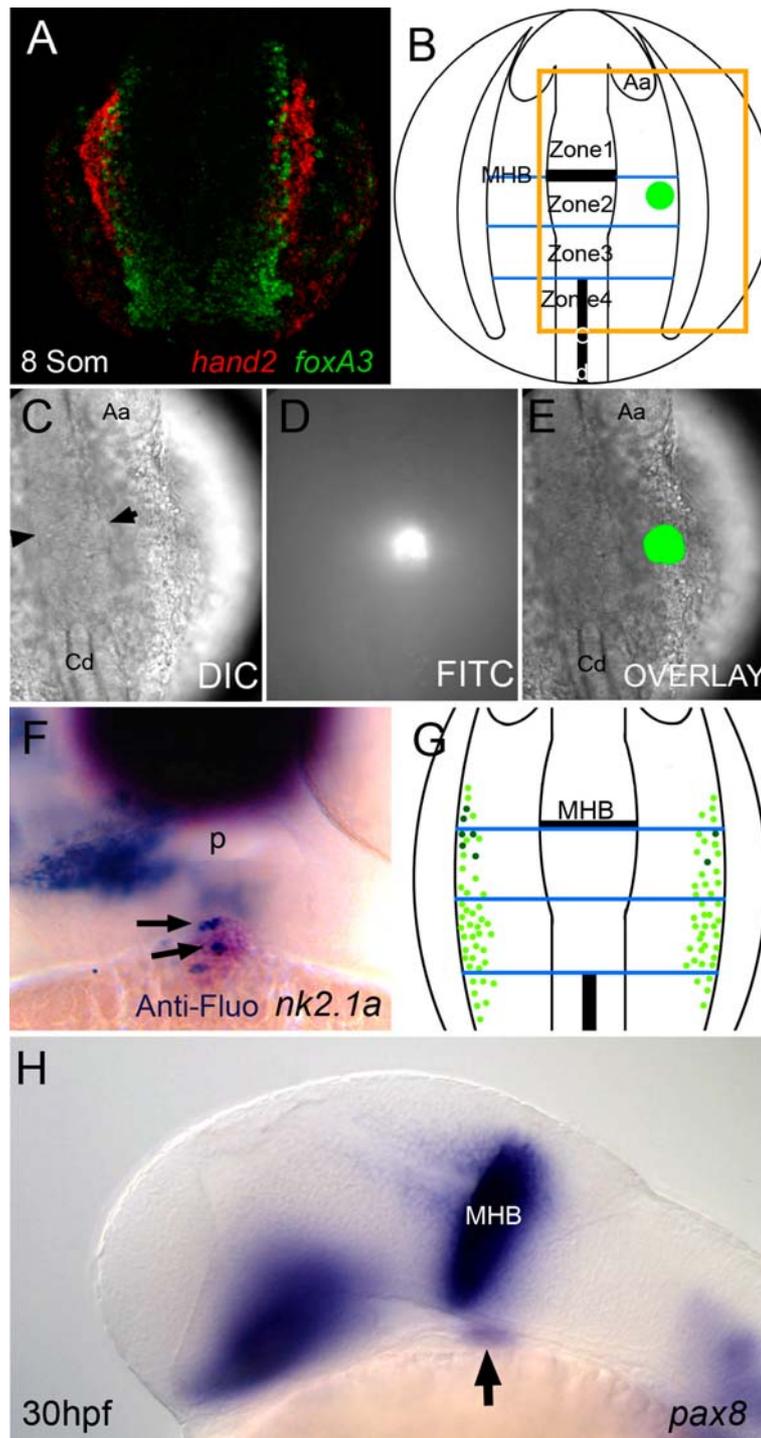


Abb. 16: Erstellen eines Anlagenplans

A: Lage der Endodermzellen (grüne *foxA3* Färbung) im 8-Somitenstadium im Vergleich zum *hand2* exprimierenden LPM (rot) (Bild mit freundlicher Genehmigung von J. Schoenebeck), B: Das Endoderm wurde in 4 Zonen eingeteilt, in denen Zellen aktiviert wurden (z.B. grüne Markierung in Zone2 der rechten Körperseite). C – E: Prozess des *Uncagens* von *caged* Fluorescein im 8-Somitenstadium in DIC (C)- und FITC- Optik (D), künstliche Überlagerung der Bilder in (E). Zellen wurden mit Hilfe eines Laserstrahls aktiviert und zum Leuchten gebracht (D). Das Schicksal dieser Zellen konnte bei 55 hpf (F) in einer in situ Färbung festgestellt werden. (F) zeigt denselben Embryo, wie in (C – E). Die markierten Zellen (Pfeile) liegen innerhalb der Schilddrüsenprimordiums. p Pharynx G: Anlagenplan im 8-Somitenstadium: schematische Darstellung der Schilddrüsentreffer (dunkelgrün) und Pharynxtreffer (hellgrün). Die Schilddrüsentreffer konzentrieren sich auf die Region der MHB. H: Lage des Schilddrüsenprimordiums (Pfeil) bei 30 hpf im Vergleich zur MHB. Aa Augenanlage, Cd *Chorda dorsalis*

Zum Beantworten dieser Frage wurde ein Anlagenplan im 8-Somitenstadium erstellt. Die genaue Technik des Erstellens des Anlagenplans ist im Material und Methoden-Teil dieser Arbeit beschrieben. Kurz gesagt wird der Embryo im Einzellstadium mit einem noch unsichtbaren Farbstoff injiziert. Der Embryo entwickelt sich dann im Dunkeln bis zum etwa 8-Zellstadium. Alle Zellen enthalten dann diesen unsichtbaren Farbstoff. In diesem Stadium werden dann einzelne Zellen vorzugsweise im Endoderm mit einem Laserstrahl bestrahlt, in denen dann der unsichtbare Farbstoff aktiviert wird und zu Leuchten beginnt. Das Schicksal dieser Zellen kann nun verfolgt werden und die Zellen mit einer Nachweisreaktion auch nach dem Fixieren sichtbar gemacht werden.

Das Zeitfenster zwischen dem 6- und dem 9-Somitenstadium erwies sich als besonders günstig, da das Endoderm zuvor aus vereinzelt, nicht zusammenhängenden Zellen besteht, welche sich erst ab etwa dem 6 Somitenstadium zu einem kompakten, bilateralen Gewebe zusammenfügen. Später, etwa ab dem 9- bis 10-Somitenstadium wandert das Endoderm auf dem Weg Richtung Mittellinie unter das Neuralrohr und ist dann für die Aktivierung mit einem Laserstrahl unzugänglich.

Im 8-Somitenstadium liegt das *hand2* exprimierende LPM am äußersten seitlichen Rand des Embryos und kann morphologisch im Lichtmikroskop erkannt werden. Die Lage der beiden bilateralen Endoderm-Streifen, die morphologisch kaum zu erkennen sind, konnte aber über die relative Position zum LPM und zur MHB bestimmt werden. Fluoreszenz doppel-in-situ-Färbungen, betrachtet unter einem konfokalen Mikroskop (Aufnahme von J. Schoenebeck, Abb. 16A, Endoderm in grün, *hand2* exprimierendes LPM in rot) zeigen, dass das Endoderm im Vergleich zum anterioren LPM etwas weiter medio-dorsal ebenfalls in zwei Streifen vorliegt. Allerdings ragen die beiden Endoderm-Streifen sowohl anterior als auch posterior über die Enden des anterioren, *hand2* exprimierenden LPM-Streifen hinaus.

Die MHB ist in diesem Stadium als breiteste Stelle des Gehirns zu erkennen, etwa auf der Hälfte der Strecke zwischen Augenblase und der Spitze der *Chorda dorsalis*, die ebenfalls im Lichtmikroskop zu sehen ist (Abb. 16C, Pfeilspitzen).

Das Endoderm wurde in AP-Richtung in vier Regionen eingeteilt (Abb. 16B):

Region 1: anterior zur MHB

Region 2: posterior zur MHB bis zur Mitte zwischen MHB und der Spitze der *Chorda dorsalis*

Region 3: von der Mitte zwischen MHB/Spitze der *Chorda dorsalis* bis zum anterioren Ende der *Chorda dorsalis*

Region 4: posterior von der Spitze der *Chorda dorsalis*

Jede dieser Regionen besteht somit auch aus einer linken und einer rechten Hälfte. Mit Hilfe eines UV-Laser-Mikroskops konnten nun einzelne Zellgruppen durch Aktivieren des bis dahin unsichtbaren Farbstoffs markiert und die markierten Zellen einer dieser Regionen zugeordnet werden. In einer in situ Färbung mit *nk2.1a* als Schilddrüsenmarker wurde festgestellt, ob sich die markierten Zellen bei 55 hpf innerhalb oder außerhalb des Schilddrüsenprimordiums befinden (z.B. innerhalb des Schilddrüsenprimordiums in Abb. 16F, Pfeile). Weiterhin wurde dokumentiert, ob sich jene Zellen, die bei 55 hpf außerhalb der Schilddrüse gefunden werden, wiederum innerhalb oder außerhalb des Pharynxepitheliums befinden.

Die Ergebnisse des Anlagenplans sind wie folgt:

Insgesamt wurde der Versuch 224 Mal in etwa 20 unabhängigen Experimenten durchgeführt. In genau 100 Fällen wurden Zellen des Pharynxepitheliums mit dem Laserstrahl aktiviert (45 %). Zellen, die später im Pharynxepithelium landen (Pharynxtreffer) wurden auch in weiter anterior gelegenen Regionen, wie die in Abb. 16A sichtbare Endoderm-Expressionsdomäne (grün) gefunden.

In insgesamt acht Versuchen wurden mit dem Laserstrahl Zellen markiert, die sich dann bei 55 hpf innerhalb des Schilddrüsenprimordiums befanden (Schilddrüsentreffer). Das entspricht 3,6 % aller Versuche, 8 % der Versuche, bei denen Zellen des Pharynx getroffen wurden oder 22,2 % aller Versuche mit Pharynxtreffern aus den Regionen 1 und 2.

Als wichtigstes Ergebnis des Anlagenplans lässt sich festhalten, dass alle acht Schilddrüsentreffer dem Endoderm auf Höhe der MHB entstammen. Diese Schilddrüsenvorläuferzellen befinden sich im 8-Somitenstadium etwa fünf bis zehn Zelldurchmesser vom *hand2*-exprimierenden LPM entfernt. Die relative Position der Schilddrüsenvorläuferzellen zur MHB spiegelt sich in der Position des Schilddrüsenprimordiums bei 24 hpf wieder. Das Schilddrüsenprimordium liegt bei 24 hpf ventral oder leicht posterior von der MHB (Abb. 16H).

In den Regionen 3 und 4 wurden keine Schilddrüsentreffer registriert. Demnach entstammen alle Schilddrüsentreffer einer kleinen, die MHB flankierenden Region des Endoderms.

Auffällig ist auch, dass auf der linken Seite sechs Schilddrüsentreffer registriert wurden, während dies auf der rechten Seite in nur zwei Versuchen gelang. Auch dies steht im Einklang mit den Beobachtungen nach 24 hpf: Das Schilddrüsenprimordium liegt zwischen 24 und 28 hpf asymmetrisch auf der linken Körperseite.

Weiterhin wurden in 50 Experimenten Zellen des Herzes getroffen (nicht dargestellt). Dabei konnte allerdings nicht zwischen Myokardium und Endokardium unterschieden werden. In weiteren 27 Fällen wurden markierte Zellen in Blutgefäßen des Kopfes gefunden (nicht dargestellt). Diese Daten decken sich mit Beobachtungen aus einem Anlagenplan der Herzvorläuferzellen im 8-Somitenstadium von J. Schoenebeck (persönliche Mitteilung).

3.6 Die Schilddrüse in der *Cardia bifida* Mutante *miles apart*

Wie oben gezeigt werden konnte, entsteht die Schilddrüse nach der Wanderung und Fusion der beiden LPM-Hälften asymmetrisch auf Höhe der MHB und liegt dorsal dem Ventrikel und dem *Bulbus arteriosus* auf.

In der *miles apart* (*mil*) Mutante ist diese Wanderungsbewegung der Herzvorläuferzellen in Richtung Mittellinie gestört, beide Seitenplattenmesodermhälften entwickeln je ein funktionsfähiges Herz auf ihrer Seite. Das Endoderm bleibt ebenfalls als zwei bilaterale Streifen erhalten und wandert nicht zur Mittellinie (Kuppermann et al., 2000).

Was passiert jedoch mit der Schilddrüse, wenn sowohl das Seitenplattenmesoderm, als auch das Endoderm nicht an der Mittellinie fusionieren?

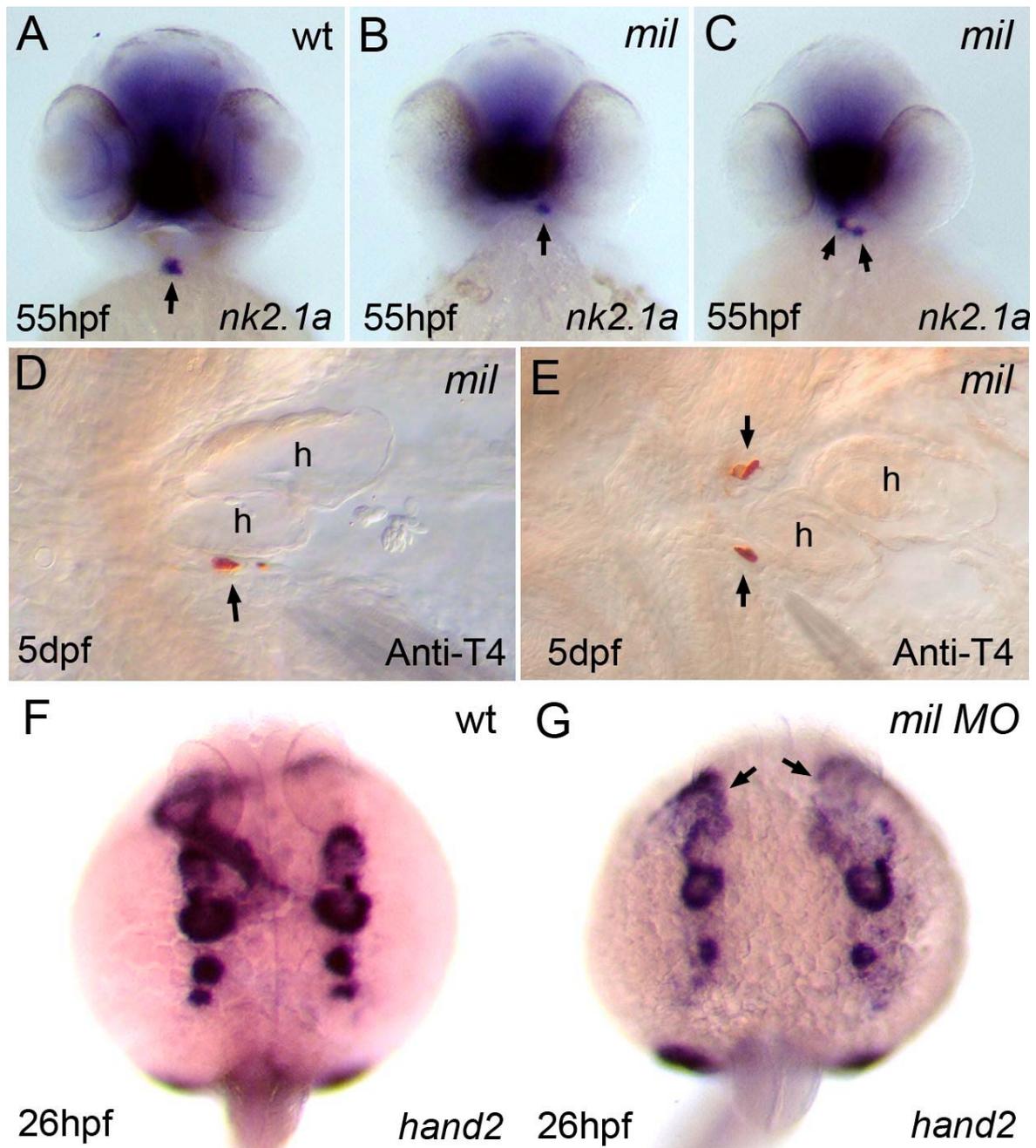


Abb. 17: Die Schilddrüse in der *Cardia bifida* mutante *miles apart* (*mil*)

A – C: *nk2.1a* in situ Färbungen, A: Schilddrüsenprimordium im Wildtyp bei 55 hpf, B: einseitiges Schilddrüsenprimordium in homozygoter *mil* Mutante, C: beidseitige Schilddrüsenprimordium in homozygoter *mil* Mutante, D, E: Anti-T4 Antikörperfärbungen, in homozygoten *mil* Mutanten entsteht entweder eine einseitige Schilddrüse (D) oder eine beidseitige Schilddrüse (E). In *mil* MO injizierten Embryonen ist zu sehen, dass die beiden *hand2* exprimierenden LPM Hälften nicht fusionieren (G, Pfeile), die Kiemenbogenexpression von *hand2* ist normal (F, G)

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden homozygote *mil* Mutanten auf die Expression der Schilddrüsenmarker getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass zum „normalen Zeitpunkt“ bei 24 hpf entweder zwei bilaterale

Schilddrüsenprimordia (Abb. 17C, bei 55 hpf) oder ein einseitiges, asymmetrisches Schilddrüsenprimordium entstehen (Abb. 17B, bei 55 hpf). In diesem Fall liegt das Schilddrüsenprimordium aber wesentlich weiter lateral, d.h. von der Mittellinie entfernt, als im Wildtyp. Aus jedem Schilddrüsenprimordium entsteht eine funktionsfähige Schilddrüse, die in der Lage ist das Schilddrüsenhormon T4 zu produzieren. Dies konnte mit Antikörperfärbungen gegen das Schilddrüsenhormon (Anti-T4) gezeigt werden (Abb. 17D, E).

Daraus kann geschlossen werden, dass die Schilddrüse in homozygoten *mil* Mutanten unabhängig zweiseitig induziert werden kann. Der *Cardia bifida* Phänotyp hat einen „Thyroidea bifida“ Phänotyp zur Folge. Dies ist ein erster Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen LPM- und Endoderm-Entwicklung. Die ist jedoch noch kein Beweis für eine Interaktion der beiden Gewebe, da in *mil* Morpholino-Oligonukleotid-injizierten Embryonen das *hand2* exprimierende Kiemenbogengewebe ebenfalls bilateral, wie im Wildtyp, vorliegt (Abb. 17F, G).

Wildtypen, die mit Morpholino-Oligonukleotiden gegen *mil* injiziert wurden, weisen denselben Phänotyp, wie homozygote *mil* Mutanten auf (Miller et al., 2001). Expressionsstudien an diesen Embryonen zeigen, dass die *hand2* Expression in den Kiemenbögen unverändert wildtypisch ist (Abb. 17F, G), während die beiden *hand2* exprimierenden Seitenplattenmesodermhälften nicht fusionieren (Abb. 17G, Pfeile).

3.7 Wildtypzellen können in nicht-zellautonomer Weise die Schilddrüse in *han*^{S6} Mutanten retten

hand2 ist im Seitenplattenmesoderm, in den Kiemenbögen, in den Flossen und im Endoderm, also auch im Schilddrüsenprimordium selbst exprimiert.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit war die Frage nach der Zellautonomie von *hand2*, d.h. ist *hand2* für die Schilddrüse zellautonom oder nicht zellautonom erforderlich, von primärem Interesse.

Um dieser Frage nachzugehen wurden Transplantationsexperimente durchgeführt. Dabei wurden Wildtypembryonen im Einzellstadium mit einer Labelling-Mixtur aus Biotin und Rhodamin injiziert. Damit trugen alle Zellen der injizierten Wildtypembryonen diese Markierung. Im etwa 1000-Zellstadium bis zum

Beginn der Epibolie wurden den markierten Wildtypembryonen Zellen mit einer Kapillare entnommen und in gleichaltrige *han*^{S6} Embryonen transplantiert.

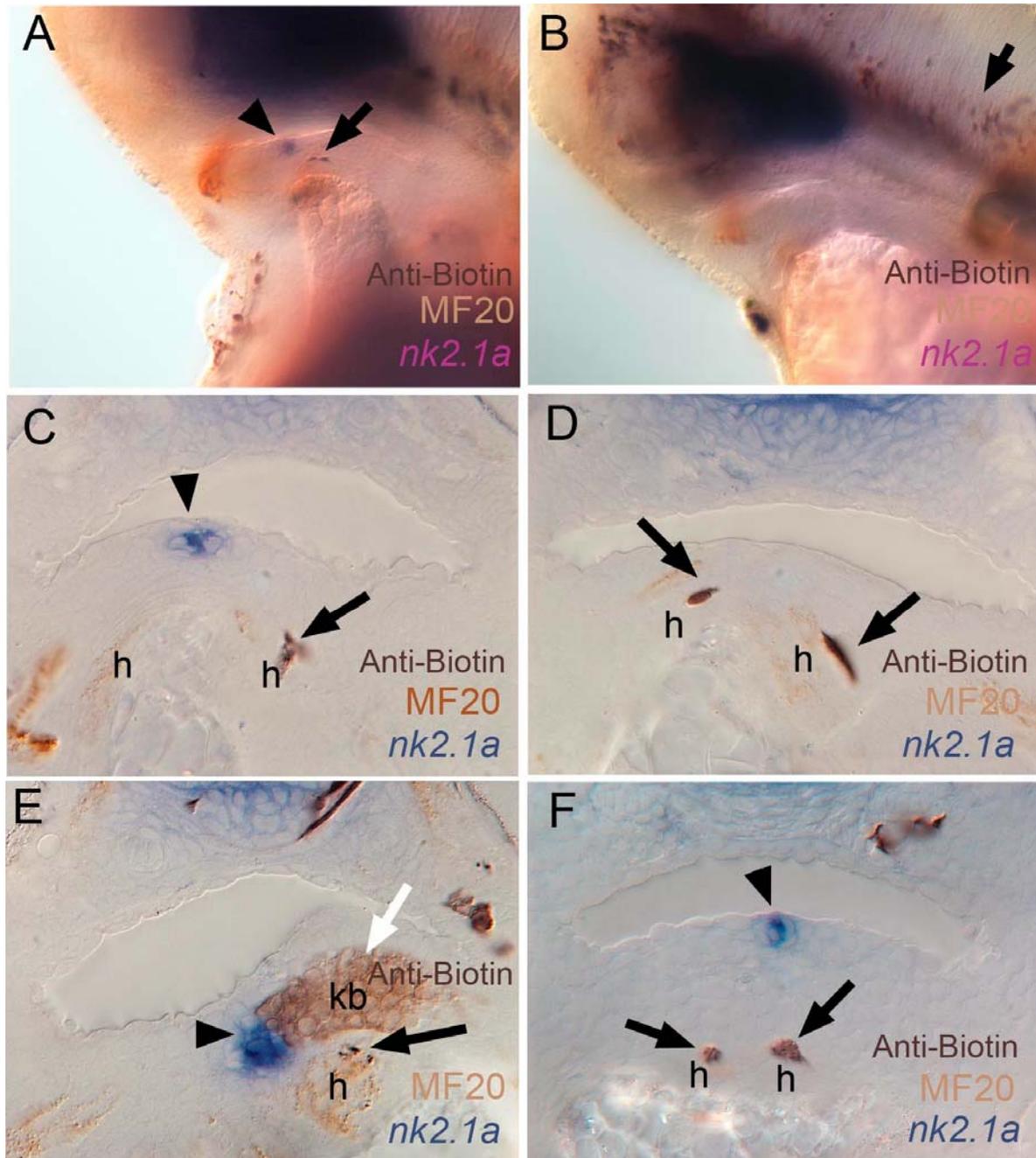


Abb. 18: Transplantationsexperimente

Dreifachfärbungen von 55 hpf alten Embryonen, violett/blau: *nk2.1a* in situ Färbung, hellbraun: MF20 AK Färbung des Herzens, dunkelbraun/schwarz: Anti-Biotin Färbung der transplantierten Wildtypzellen, A: homozygoter *han*^{S6} Empfängerembryo mit *nk2.1a* gefärbtem Schilddrüsenprimordium (Pfeilspitze), Wildtypzellen sind hier im Herz zu finden (Pfeil), B: homozygoter *han*^{S6} Empfängerembryo ohne Schilddrüsenprimordium, Wildtypzellen sind z.B. im Gehirn zu finden (Pfeil), C, D: Schnitte durch den Embryo aus A durch die Region des Schilddrüsenprimordiums (C, Pfeilspitze) und weiter posterior (D). Wildtypzellen sind im Herz zu finden (Pfeile), E: homozygoter *han*^{S6} Empfängerembryo mit Schilddrüsenprimordium (Pfeilspitze) und transplantierten Wildtypzellen in den Kiemenbögen (weißer Pfeil) und im Herz (schwarzer Pfeil), F: homozygote *han*^{S6} Empfängerembryo mit Schilddrüsenprimordium (Pfeilspitze) und transplantierten Wildtypzellen im bilateralen Herz (Pfeile)

Um die homozygoten *han*^{S6} Empfängerembryonen anschließend sicher von den heterozygoten *han*^{S6} Empfängerembryonen zu unterscheiden, wurden die transplantierten Embryonen auf ihren Flossenphänotyp bei 55 hpf untersucht und anschließend fixiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass nicht gleichzeitig beide Flossen durch die Wildtypzellen vollständig gerettet wurden (Eine Genotypisierung mit Hilfe einer PCR ist bei diesen Chimären unmöglich).

Die Wildtypzellen wurden nun mit einem Biotin-Detektionskit angefärbt (schwarz) und das Schilddrüsenprimordium in einer *nk2.1a* in situ Hybridisierung gegengefärbt (violett). Um im Falle eines nicht-zellautonomen Wirkens von *hand2* Aussagen über andere Gewebe treffen zu können, wurde in einer weiteren Färbung das Herz angefärbt. Vorgegangene Experimente (s.o.) haben gezeigt, dass Schilddrüse und Herz in engen räumlichen Kontakt zueinander liegen.

Anhand dieser Dreifach-Färbung konnte festgestellt werden, ob

- a. in den homozygoten *han*^{S6} Empfängerembryonen eine Schilddrüse entstanden ist
- b. wenn ja, in welchem der *hand2* exprimierenden Gewebe die transplantierten Zellen zu finden sind.

Insgesamt wurden Wildtypzellen in 327 Embryonen aus *han*^{S6} Gelegen in 18 unabhängigen Versuchen transplantiert. Von diesen 327 Embryonen zeigten 240 Embryonen den wildtypischen Phänotyp (73,4%), 87 Embryonen waren homozygote *han*^{S6}/wt Chimären (26,6%).

In zwölf dieser Chimären konnte ein Schilddrüsenprimordium mit *nk2.1a* gefunden werden (13,8%)(Abb. 18A, Pfeilspitze). Das Schilddrüsenprimordium in allen homozygoten *han*^{S6} Empfängerembryonen war wesentlich kleiner als im Wildtyp. Außerdem lag es in allen Fällen weiter posterior, als im Wildtyp. Dennoch war auch hier zu beobachten, dass seine relative Position zum Herz wie im Wildtyp war. Demnach können Wildtypzellen die *nk2.1a* Expression im Schilddrüsenprimordium retten.

Eine Übersicht über die Position der Wildtypzellen in den zwölf *han*^{S6} Empfängerembryonen mit gerettetem Schilddrüsenprimordium gibt Tabelle 1.

Tabelle 1:

Nummer des Transplantierten	Wildtypzellen im Herz	Wildtypzellen in den Kiemenbögen	Wildtypzellen im ventralen Endoderm	Wildtypzellen im Schilddrüsenprimordium
1	✓	-	✓	-
2	✓	✓	✓	-
3	-	✓	-	-
4	✓	✓	-	-
5	✓	✓	-	-
6	✓	✓	✓	-
7	✓	✓	✓	-
8	✓	✓	✓	-
9	✓	-	-	-
10	✓	✓	-	-
11	-	✓	✓	-
12	-	✓	✓	-

Als wichtigste Aussage dieser Zusammenstellung ist festzuhalten, dass im geretteten Schilddrüsenprimordium selbst nie transplantierte Wildtypzellen beobachtet wurden. Demzufolge ist *hand2* nicht-zellautonom für die Entwicklung des Schilddrüsenprimordiums erforderlich.

Also muss *hand2* in einen anderen Gewebe erforderlich sein.

In sieben von zwölf homozygoten *han*^{S6} Empfängerembryonen mit gerettetem Schilddrüsenprimordium wurden Wildtypzellen im ventralen Endoderm gefunden, meist jedoch sehr weit vom Schilddrüsenprimordium entfernt. Damit ist eine Funktion von *hand2* im Endoderm für die Entwicklung des Schilddrüsenprimordiums sehr unwahrscheinlich.

In neun von zwölf Fällen konnten transplantierte Wildtypzellen im Herz beobachtet werden (Abb. 18A, Pfeil, 18C - F). Viele Wildtypzellen, die anhand ihrer Biotin-Markierung in Herzrudimenten homozygoter *han*^{S6} Empfängerembryonen gefunden worden sind, sehen sehr nekrotisch aus (z.B. Abb. 18E, schwarzer

Pfeil). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass im Herz homozygoter *han*^{S6} Empfängerembryonen Wildtypzellen zuvor abgestorben sind und nicht mehr detektiert werden konnten. In keinem Fall wurde beobachtet, dass die beiden LPM-Hälften der *han*^{S6} Empfängerembryonen durch die Einwirkung der Wildtypzellen fusionierten. Das entstandene, verkümmerte Herz blieb bilateral und es konnte unter Lichtmikroskop-Bedingungen kein Schlagen beobachtet werden. Demzufolge konnte dieses Merkmal auch zur Absicherung des mutanten Phänotyps herangezogen werden. Trotz des Vorhandenseins zweier bilateraler, wenn auch verkümmertes Herzen konnte in keinem Fall, ein bilaterales Schilddrüsenprimordium, wie in der *miles apart* Mutante gefunden werden.

In zehn von zwölf Fällen wurden Wildtypzellen in der potentiell *hand2* exprimierenden Kiemenbogenregion gefunden (Abb. 18E, weißer Pfeil). In allen Fällen wurden zumindest in einer dieser beiden Regionen Wildtypzellen gefunden. Die Vorderflossen sind während der gesamten Somitogenese sehr weit vom entstehenden Schilddrüsenprimordium entfernt. Sie scheiden als mögliche Signalquelle für eine Induktion oder gewebeerhaltende Faktoren aus und wurden daher nicht weiter in diesen Experimenten untersucht.

Ob Wildtypzellen in den beobachteten bilateralen *hand2* exprimierenden Punkten zu finden waren, konnte nicht ermittelt werden. Dennoch ist davon auszugehen, dass aufgrund der Größe dieser Strukturen (ca. 10 Zellen) nur sehr selten Wildtypzellen darin enthalten waren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Wildtypzellen das Schilddrüsenprimordium in homozygoten *han*^{S6} Empfängerembryonen retten können und *hand2* nicht-zellautonom für die Schilddrüsenentwicklung erforderlich ist. Am wahrscheinlichsten ist, dass *hand2* Expression im Herz oder den Kiemenbögen für die Entwicklung des Schilddrüsenprimordiums eine Rolle spielt. Ob *hand2* Expression in einem dieser Gewebe hinreichend für eine Rettung der Schilddrüse ist, kann anhand der Datenlage nicht festgestellt werden.

3.8 Das Schilddrüsenprimordium entsteht unabhängig von der *hand2* Kiemenbogenexpression

Die Transplantationsexperimente (siehe voriges Kapitel) zeigen, dass *hand2* sehr wahrscheinlich im Herz oder in den Kiemenbögen eine Rolle für die Entwicklung des Schilddrüsenprimordiums spielt. Um zu entscheiden, in welchem dieser beiden Gewebe *hand2* nötig ist, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt.

Die Idee dieses Experiments liegt im Ausschalten der Gene, die epigenetisch von *hand2* in den Kiemenbögen exprimiert werden. Hierfür wurden Morpholino-Oligonukleotide verwendet. Dabei handelt es sich um künstliche Nukleotide, die an mRNA Transkripte binden und deren Translation hemmen. Diese Oligonukleotide sind stabil und werden nicht enzymatisch abgebaut.

Um die *hand2* Expression in den Kiemenbögen nahezu auszuschalten bzw. herunterzuregulieren wurden Morpholino-Oligonukleotide (MO) gegen die Transkripte der Gene *tfap2a* und *endothelin-1 (edn1)* in Wildtypembryonen im Einzellstadium injiziert. *tfap2a* codiert für einen Transkriptionsfaktor, der in der *lockjaw (low)* Mutante eine Punktmutation trägt und dort die Spezifizierung und Wanderung eines Teils der Neuralleistenzellen unterbindet (Knight et al., 2003).

endothelin-1 codiert ebenfalls für einen Transkriptionsfaktor, der in der Zebrafischmutante *sucker (suc)* mutiert ist. Mutationen von *sucker* unterbinden die Entwicklung des Unterkiefers und anderen ventralen Knorpeln des Zebrafischkopfs. *tfap2a* und *endothelin-1* gelten als epigenetisch von *hand2* in vielen, aber nicht allen Kiemenbögen. Von beiden Morpholino-Oligonukleotiden wurde gezeigt, dass sie *hand2* herunterregulieren können (Miller et al., 2000; T. Schilling, persönliche Mitteilung).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Morpholino-Oligonukleotide sowohl einzeln als auch in Kombination injiziert. Die injizierten Embryonen wurden bei ca. 28 hpf fixiert. Die Hälfte der fixierten Embryonen wurde auf *hand2* die andere Hälfte auf *nk2.1a* Expression getestet. Es konnte somit festgestellt werden, ob ein Ausschalten der *hand2* Expression in den Kiemenbögen zu einem Verlust des Schilddrüsenprimordium führt.

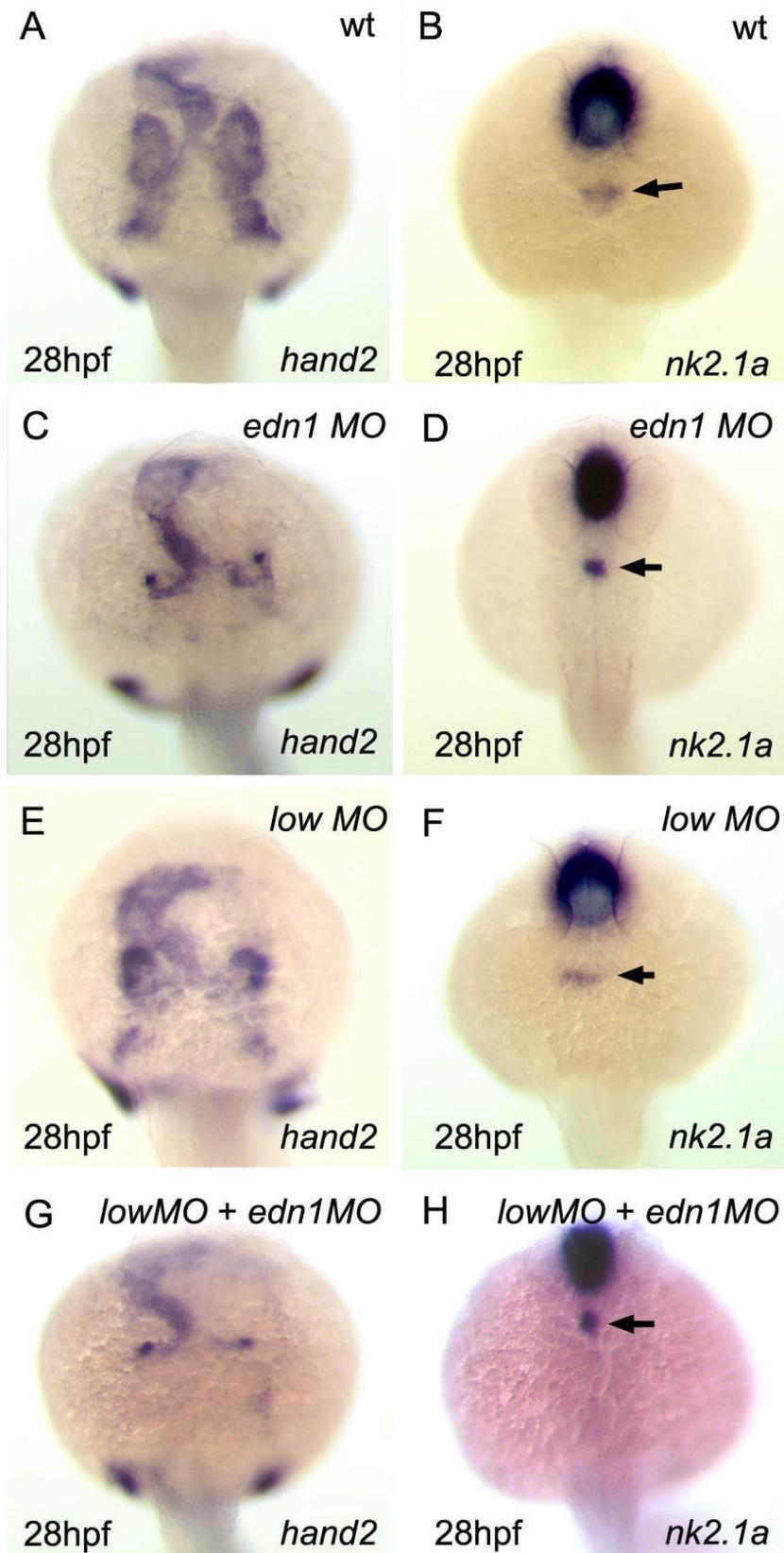


Abb. 19: Herunterregulieren der *hand2* Kiemenbogenexpression durch Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden (MO) in Wildtypembryonen Durch Injektion von *edn1* MO ist die *hand2* Expressionsdomäne in allen Kiemenbögen außer dem zweiten herunterreguliert (C). Durch Injektion von *low* MO ist die *hand2* Expressionsdomäne in allen Kiemenbögen posterior vom ersten herunterreguliert (E). Durch Koinjektion beider MO wird die *hand2* Expressionsdomäne in allen Kiemenbögen nahezu komplett ausgeschaltet (G). Das Schilddrüsenprimordium ist in allen Fällen vorhanden (B, D, F, H)

Die Phänotypen der Morpholino-Oligonukleotid-injizierten Wildtypembryonen sind in Abb. 19 dargestellt. Die Injektion von *edn1* Morpholino-Oligonukleotiden führt zur kompletten Abwesenheit der *hand2* Expression im ersten, dritten und allen folgenden Kiemenbögen, die *hand2* Expression im zweiten Kiemenbogen ist nur leicht reduziert (Abb. 19C). Der Phänotyp entspricht dem von Miller et al. (2000) beschriebenen Phänotyp. Dieser wurde in 36 von 38 MO-injizierten Embryonen aus drei unabhängigen Versuchen erreicht.

Die Injektion von *low* Morpholino-Oligonukleotiden führt zu keiner wesentlichen Veränderung der *hand2* Expression im ersten Kiemenbogen, aber zu einer starken Reduktion aller weiter posterior gelegenen Kiemenbögen (Abb. 19E). Diese Reduktion wurde in 23 von 33 injizierten Embryonen aus zwei unabhängigen Versuchen beobachtet.

Bisher war nicht bekannt, wie beide Morpholino-Oligonukleotide zusammen wirken und ob sie sich in ihrer Wirkung addieren.

Injiziert man beide Morpholino-Oligonukleotide zusammen, wird in der Regel die gesamte *hand2* Expression in den Kiemenbögen ausgeschaltet (Abb. 19G). Die Wirkung der beiden Morpholino-Oligonukleotide addiert sich also. Die verbleibende Hintergrundfärbung ist auf die Expression von *hand2* im darunterliegenden Endoderm zurückzuführen. Dies ist an Schnitten durch die Kiemenbogengegend dieser Embryonen zu sehen (nicht dargestellt). Die vollständige Reduktion der *hand2* Expression in den Kiemenbögen wurde in 73 von 80 Fällen in fünf unabhängigen Versuchen erreicht.

Unverändert bleiben in allen Versuchen jene zwei *hand2* exprimierenden Punkte an den Aortenbögen. Diese exprimieren weiterhin *hand2*.

Die *nk2.1a* Expression im Schilddrüsenprimordium ist in allen untersuchten Embryonen vorhanden (Abb. 19B, D, F, H). Bei den Einzel-Morpholino-Oligonukleotid-Injektionen ist die Form und Größe des Schilddrüsenprimordiums in der Regel wildtypisch (Abb. 19D, F), bei den Doppel-Morpholino-Injektionen ist das Schilddrüsenprimordium in allen Fällen vorhanden und von der Größe vergleichbar mit wildtypischen Schilddrüsenprimordia, es ist aber in den meisten Fällen in AP-Richtung anstatt in LR-Richtung gestreckt (Abb. 19H).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass das Schilddrüsenprimordium unabhängig von der *hand2* Kiemenbogenexpression entsteht.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2:

Injizierte Morpholino-Oligonukleotide	Anzahl der Embryonen mit reduzierter <i>hand2</i> Expression/Gesamtzahl	Anzahl der Embryonen mit Schilddrüse / Gesamtzahl
Kontroll-MO	0 / 15 = 0%	14 / 14 = 100%
edn1-MO	36 / 38 = 95%	46 / 46 = 100%
low 3.1-MO	23 / 33 = 70%	38 / 38 = 100%
low 3.1-MO + edn1-MO	73 / 80 = 91%	95 / 95 = 100%

3.9 Fgf1 und Fgf2 Proteine können die Schilddrüse in *han*^{S6} Mutanten retten

Wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde ist *hand2* nicht in der Schilddrüse selbst erforderlich. *hand2* codiert jedoch für einen Transkriptionsfaktor. Demnach muss es Faktoren geben, die die Signale zum Entstehen der Schilddrüse vermitteln.

Abe et al. (2002) konnten in in vitro Versuchen zeigen, dass *FGF2* in der Zahnentwicklung der Maus *downstream* von *HAND2* exprimiert wird. Serls et al. (2005) konnten in in vitro Experimenten nachweisen, dass in endodermalem Gewebe aus dem ventralen Vorderdarm der Maus durch Zugabe von FGF1- und FGF2-Proteinen der Transkriptionsfaktor Nkx2.1, dem Maus-Homolog von Zebrafisch Nk2.1a, angeschaltet wird. (Im Gegensatz zum Zebrafisch ist dieser Transkriptionsfaktor in der Maus auch in der Lunge zu finden.)

Fgf1 und Fgf2 könnten daher auch in der Schilddrüsenentwicklung des Zebrafischs als Signalmoleküle fungieren und eine ähnliche Rolle übernehmen. Um dies im Zebrafisch in vivo zu testen wurden Mikropartikel mit rekombinanten humanen FGF1 und FGF2 Proteinen beladen und in homozygote *han*^{S6} Mutanten im 18-Somitenstadium möglichst nahe an das Endoderm implantiert. Dabei

wurden in verschiedenen Versuchen die Mikropartikel sowohl mit FGF1 alleine, mit FGF2 alleine und mit beiden FGFs zusammen beladen. Die Embryonen wurden nach der Implantation mit PTU behandelt und bei ca. 28 hpf fixiert.

Als Kontrolle wurden die Mikropartikel mit BSA beladen und implantiert.

In einer *nk2.1a* in situ Färbung wurde getestet, ob ein Schilddrüsenprimordium entstanden ist und mit einer MF20 Herz-Antikörperfärbung konnte der Herzphänotyp sichtbar gemacht werden.

Da durch Injektion von *fgf1* und *fgf2* mRNA in homozygoten *han*^{S6} Mutanten das Herz morphologisch unverändert blieb (D. Adzic, Diplomarbeit 2005), kann ausgeschlossen werden, dass das Herz in homozygoten *han*^{S6} Mutanten durch das Einwirken der FGF Proteine wieder vollständig hergestellt wird. Die Implantationen wurden mit äußerster Vorsicht von einer Körperseite durchgeführt und kein Gewebe jenseits der Mittellinie zerstört. Daher kann ausgeschlossen werden, dass das komplette Herz in den Wildtypen durch die Implantation der Mikropartikel zerstört wurde. Selbst wenn eine Seitenplattenmesodermhälfte die Implantation der Mikropartikel zerstört worden wäre, müsste in jedem Fall die andere Seite intakt geblieben sein und ein Herz bilden. Insofern konnte anhand des Herzes festgestellt werden, ob es sich um Mutanten oder Wildtypen handelt.

Wie schon unter Punkt 3.2 berichtet wurde, konnte in wenigen Fällen beobachtet werden, dass selbst homozygote *han*^{S6} Mutanten eine kleine *nk2.1a* exprimierende Domäne im Endoderm entwickeln. In diesem Versuch wurde daher die relative Häufigkeit des Auftretens dieser *nk2.1a* Expressionsdomäne in homozygoten *han*^{S6} Mutanten, die mit Kontroll-Mikropartikeln implantiert wurden, verglichen mit homozygoten *han*^{S6} Mutanten, die mit FGF-Proteinen beladenen Mikropartikeln implantiert wurden.

Eine Zusammenstellung der Daten ergibt folgende Tabelle:

Tabelle 3:

Protein	Anzahl der implantierten homozygoten <i>han</i> ^{S6} Mutanten mit geretteter Schilddrüse	Gesamtzahl der implantierten homozygoten <i>han</i> ^{S6} Mutanten	Anteil derer mit Schilddrüse in Prozent
FGF1	4	6	67%
FGF2	5	6	83%
FGF1 + FGF2	21	26	81%
Kontrolle	6	13	46%

Homozygote *han*^{S6} Mutanten weisen demnach unter der Einwirkung von FGF Proteinen häufiger ein Schilddrüsenprimordium auf. Dabei scheint, dass sowohl FGF1 und FGF2 alleine, als auch in Kombination die Schilddrüse in manchen homozygoten *han*^{S6} Mutanten retten zu können. Die Gesamtzahl der Versuche mit FGF1 und FGF2 alleine ist jedoch zu gering, um diese These zu beweisen.

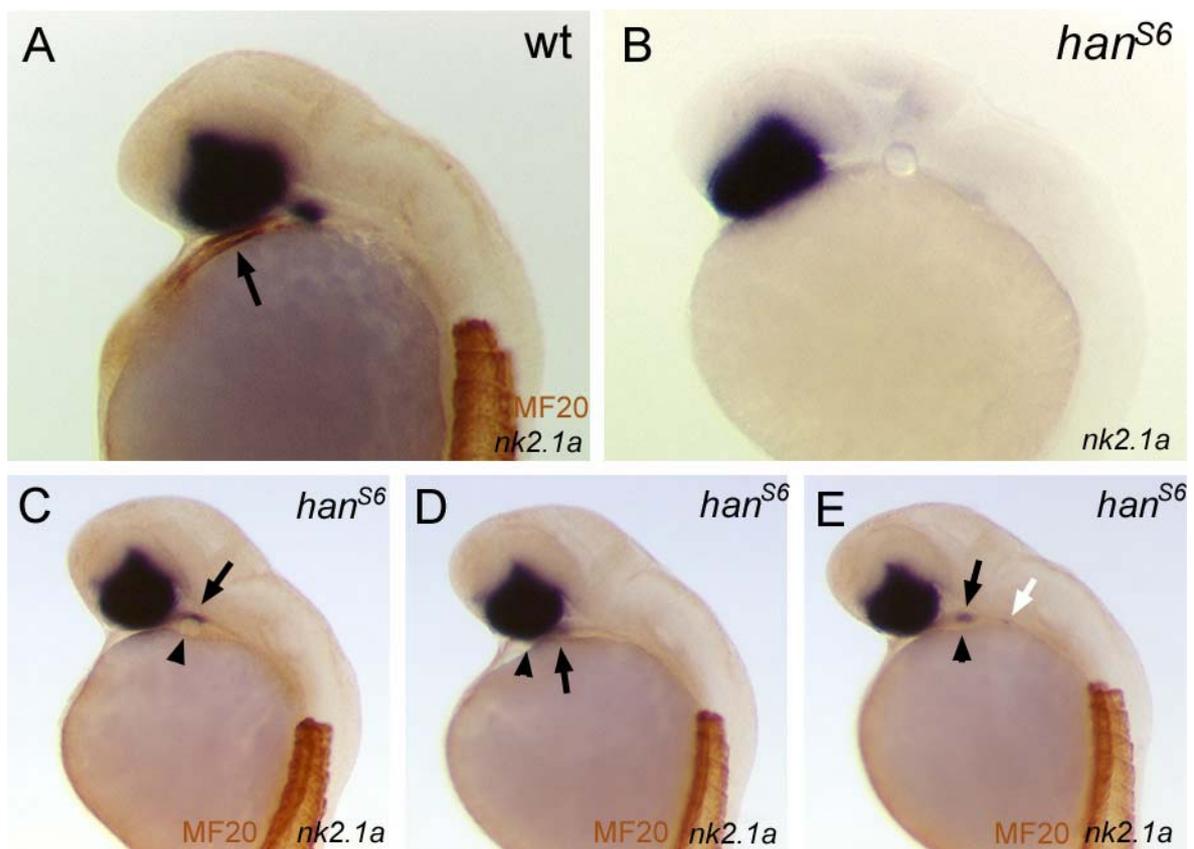


Abb. 20: Implantation von Mikropartikeln, die mit FGF1 und FGF2 Proteine beladen wurden. A: Wildtypembryo mit MF20 Expression im Herz (Pfeil), B: Kontrolle: homozygote *han*^{S6} Mutante mit BSA beladenem Mikropartikel, C – E: homozygote *han*^{S6} Mutanten mit gerettetem Schilddrüsenprimordium (schwarze Pfeile), die Position der Mikropartikel mit FGF1 + FGF2 ist durch eine schwarze Pfeilspitze indiziert. In (E) ist ein weiteres Schilddrüsenprimordium (weißer Pfeil) dorsal von den HerZRudimenten zu sehen.

Das Auftreten eines Schilddrüsenprimordiums in homozygoten *han*^{S6} Mutanten durch Einwirken beider FGF Proteine wurde häufiger beobachtet (Abb. 20C – E). Außerdem zeigen diese Embryonen einen klareren Phänotyp: in einigen Fällen wurde ein kleines Schilddrüsenprimordium in der Nähe des rudimentären Herzens (Abb. 20E, weißer Pfeil) und ein großes Schilddrüsenprimordium im Endoderm auf der Höhe des implantierten Mikropartikels gefunden (Abb. 20E). Das Schilddrüsenprimordium in den geretteten homozygoten *han*^{S6} Mutanten ist in den meisten Fällen wesentlich größer, als jene kleine Restdomäne, die in Kontrollembryonen beobachtet wurde.

Vermutlich kann also die Schilddrüse durch FGF1 und FGF2 gerettet werden. Das Auftreten von ektopischen Schilddrüsenprimordien, also Primordien, die nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zum Herzen liegen (Abb. 20C – E) spricht ebenfalls für eine entscheidende Rolle der FGFs in der Schilddrüsenentwicklung.

4 Diskussion

4.1 Die Entwicklung der Schilddrüse im Zebrafisch weist viele Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zu anderen Wirbeltieren auf

Wie in anderen Wirbeltieren ist die strukturelle Einheit der Zebrafischschilddrüse der Schilddrüsenfollikel (Leatherland, 1994; Rauther, 1940). Die Schilddrüsenfollikel im Zebrafisch bilden jedoch kein kompaktes Organ, sondern liegen einzeln entlang der ventralen Aorta in der Kiemenregion. Dennoch entsteht die Schilddrüse im Zebrafisch und in anderen Wirbeltieren in vergleichbaren Regionen. So entsteht In höheren Vertebraten das Schilddrüsenprimordium im Pharynxepithelium auf der Höhe des zweiten Kiemenbogens (Noden, 1991; Shain et al, 1972). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Schilddrüsenprimordium des Zebrafischs auf der Höhe zwischen dem ersten und dem zweiten Kiemenbogen im ventralen Pharynxepithelium entsteht. Dies wurde schon in klassischen morphologischen Studien allgemein an Teleostiern angedeutet (Rauther, 1940).

Darüber hinaus scheint eine weitgehend ähnliche genetische Regulation der Entwicklung des Schilddrüsenprimordiums vorzuliegen. Rohr und Concha (2000) konnten bereits zeigen, dass *nk2.1a* im Schilddrüsenprimordium des Zebrafischs exprimiert ist und dass auch Zebrafisch *hhex* neben anderen Expressionsdomänen (Ho et al. 1999) in der Schilddrüse des Zebrafisches nachweisbar ist. Die orthologen Gene *Nkx2.1* (Lazzaro et al., 1991) und *Hhex* (Martinez Barbera et al., 2000) wurden im Schilddrüsenprimordium der Maus beschrieben.

Aus Arbeiten an Mäusen sind zwei weitere Gene bekannt, die im Schilddrüsenprimordium exprimiert werden: *Pax8* (Macchia et al., 1998) und *Ttf2* (de Felice et al, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *pax8* auch im Schilddrüsenprimordium des Zebrafischs exprimiert wird. Ebenfalls konnte in dieser Arbeit die Expression von *pax2.1* im Schilddrüsenprimordium des Zebrafischs nachgewiesen werden. Das orthologe Gen in der Maus, *Pax2*, ist jedoch nicht in der Schilddrüse exprimiert. Bislang ist nicht bekannt, ob es ein *Ttf2*

Gen im Zebrafisch gibt. Damit sind drei der vier aus dem Schilddrüsenprimordium der Maus bekannten Gene auch im Zebrafisch exprimiert.

Innerhalb der Gruppe der *pax* Gene gibt es verschiedene Paralog-Untergruppen. Dabei stellen *pax2*, *pax5* und *pax8* eine Paralog-Gruppe, genauso, wie *pax1/9*, *pax4/6* und *pax3/7* (Dahl et al., 1997, Review). Paraloge Gene entstehen nach der klassischen Vorstellung durch Genduplikation und anschließender Degeneration eines der Duplikate, während das andere die ursprüngliche Funktion beibehält (Force et al., 1999). *pax* Gene derselben Paralog-Gruppe sind oft in denselben Organsystemen exprimiert.

Im Falle des Zebrafischs sind zwei Gene der *pax2/5/8* Paralog-Gruppe in der sich entwickelnden Schilddrüse exprimiert, wohingegen in der Maus nur *Pax8* im Schilddrüsenengewebe eine Rolle spielt. In *Xenopus* ist *pax8* nicht im Schilddrüsenprimordium exprimiert und es scheint so, als ob dort *pax2* das einzige *pax* Gen ist, das in der Schilddrüse exprimiert wird (Heller und Brandli, 1999).

pax5 ist in keinem der untersuchten Wirbeltiere in der Schilddrüse exprimiert. Das Amphioxus *pax2/5/8* Gen, das mutmaßliche Vorläufergen dieser *pax* Paralog-Gruppe, ist im Endostyl exprimiert, einer Struktur, die als homolog zur Wirbeltierschilddrüse gilt (Kozmik et al., 1999; Kluge et al., 2005). Das legt nahe, dass schon das *pax2/5/8* Vorläufergen eine Rolle in der Schilddrüsenentwicklung spielt. Während der Evolution der Tetrapoden hat dann vermutlich *pax5* und entweder *pax2* oder *pax8* diese Funktion verloren, während im Zebrafisch sowohl *pax2.1*, als auch *pax8* diese Rolle in der Schilddrüsenentwicklung behalten haben. Im Laufe der Zeit führten vermutlich Unterschiede in der Genregulation dazu, dass im Zebrafisch die *pax2.1* Expression früher als die *pax8* Expression im Schilddrüsenprimordium beginnt.

Die Evolution der Wirbeltiere ist von Genomduplikationen geprägt, wobei es in der Linie der Teleostier vermutlich zu einer zusätzlichen Genomduplikation (im Vergleich zu anderen Wirbeltierlinien) kam (Postlethwait et al., 1998). Diese Duplikation könnte erklären, warum es ein zweites *pax2* Gen, *pax2.2*, in Zebrafisch gibt. Dieses Gen ist jedoch nicht im Schilddrüsenprimordium des Zebrafischs exprimiert. Genauso gibt es zwei *nk2.1* Gene im Zebrafisch, *nk2.1a* und *nk2.1b*, von denen nur *nk2.1a* in der Schilddrüse des Zebrafischs exprimiert wird (Rohr et al., 2001). Es sieht also ganz danach aus, als liege im Falle dieser

Genduplikationen eine Subfunktionalisierung (Force et al., 1999) vor, die zum evolutiven Erhalt jeweils beider Paralogen geführt hat.

4.2 Welches *hand2* exprimierende Gewebe ist für das Entstehen der Schilddrüse verantwortlich

Bei der Zebrafisch *han*^{S6} Mutante handelt es sich um eine Mutante, bei der das *hand2* Gen vollständig deletiert ist (Yelon et al., 2000). *hand2* ist im Seitenplattenmesoderm (LPM), aus dem sich der myokardiale Teil des Herzens entwickelt, in den Kiemenbögen, einer bilateralen Domäne zwischen dem ersten und zweiten Kiemenbogen und den Vorderflossen exprimiert (Yelon et al., 2000). Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass *hand2* im Zebrafischendoderm exprimiert ist. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen an Maus- und Hühnerembryonen. In beiden Organismen wurden Transkripte von *hand2* im Darm, der bekanntlich endodermaler Herkunft ist, gefunden (Cserjesi et al., 1995; Hollenberg et al., 1995; Wu und Howard, 2002).

In homozygoten *han*^{S6} Mutanten ist mit allen Schilddrüsenmarkern kein Schilddrüsenprimordium nachweisbar, von einer winzigen, diffusen *nk2.1a* Expressionsdomäne in sehr frühen Stadien abgesehen. Die Transplantationsexperimente in dieser Arbeit konnten zeigen, dass in der Schilddrüsenentwicklung *hand2* in einer nicht-zellautonomen Art und Weise wirkt. *hand2* ist weder in der Schilddrüse selbst, noch im umgebenden Endoderm für die Bildung des Schilddrüsenprimordiums erforderlich. Durch die Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden, die die *hand2* Expression in den Kiemenbögen herunterregulieren bzw. nahezu ausschalten, konnte nachgewiesen werden, dass das Schilddrüsenprimordium unabhängig von dieser *hand2* Expressionsdomäne entsteht.

Zwischen den Kiemenbögen 1 und 2, in der Nähe der Aortenbögen verbleiben jedoch auch in den Morpholino-Experimenten zwei punktförmige *hand2* Expressionsdomänen, die demnach auch eine Rolle bei der Entstehung der Schilddrüse spielen können. Von diesen Punkten konnte gezeigt werden, dass sie in unmittelbarer Nachbarschaft einer Gruppe von Zellen liegen, die das Enzym

Tyrosin-Hydroxylase produzieren. Diese Gruppen von Zellen sind als *arch-associated-cells* (AAC) bekannt (Guo et al., 1999) und bilden später vermutlich den *Glomus caroticus*. Dabei handelt es sich um periphere Neuronen, die eine endokrine Funktion haben. Diese gehören zu einer Gruppe von arteriellen Chemorezeptoren. Vermutlich sind also jene *hand2* exprimierenden Zellen ebenfalls Bestandteil des *Glomus caroticus*. Es scheint eher unwahrscheinlich, dass diese Struktur Einfluss auf die Bildung der Schilddrüse hat. Zum Zeitpunkt des Entstehens des Schilddrüsenprimordiums im Zebrafisch besteht diese Struktur auf beiden Seiten aus etwa zehn Zellen. Diese liegen zwar auf der selben Höhe entlang der anterior-posterioren Achse, jedoch sehr weit lateral und viele Zelldurchmesser von der Schilddrüsenanlage entfernt. Nach der Auswertung finden sich keine Hinweise darauf, dass sich in den Transplantationsexperimenten dieser Arbeit transplantierte Wildtypzellen unter dieser Gruppe von Zellen befunden haben, mit Sicherheit nicht in allen zwölf Fällen einer Rettung des Schilddrüsenprimordiums. Die Vorderflossen scheiden als Signalquelle für Faktoren, die zum Entstehen der Schilddrüse führen, mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit aus. Sie sind zu weit vom sich entwickelnden Schilddrüsenprimordium entfernt.

Im Falle einer Rettung des Schilddrüsenprimordiums in den homozygoten *han*^{S6} Empfängerembryonen waren in allen Fällen Wildtypzellen entweder im Herz, in den Kiemenbögen oder in beiden Strukturen zu finden. Beide Gewebe könnten also redundant zum Entstehen des Schilddrüsenprimordiums beitragen. Die verbleibende *hand2* Herzexpression -nach dem Herunterregulieren der *hand2* Expression in den Kiemenbögen durch die Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden- ist zwar hinreichend für das Entstehen des Schilddrüsenprimordiums, sie muss aber unter Umständen nicht notwendig sein.

Die Ergebnisse der Transplantationsexperimente zeigen aber auch, dass in neun von den zwölf homozygoten *han*^{S6} Empfängerembryonen, in denen ein Schilddrüsenprimordium entstanden ist, Wildtypzellen im Herz zu finden waren. Da fast alle Wildtypzellen, die in den homozygoten *han*^{S6} Empfängerembryonen gefunden worden sind, nekrotisch aussahen, kann angenommen werden, dass sich in weiteren Fällen Wildtypzellen im Herz befunden haben. Diese könnten zuvor abgestorben und nicht mehr detektiert worden sein.

Für einen Zusammenhang zwischen dem mesodermalen Herzgewebe und dem endodermalen Schilddrüsenprimordium sprechen jedoch noch weitere Indizien. Bei einem *Rescreening* existierender Herzmutanten, das von K. Rohr durchgeführt wurde, wurden in der Tat weitere Herzmutanten entdeckt, die auch einen Schilddrüsenphänotyp aufweisen. Homozygote *acerebellar (ace)* Mutanten beispielsweise, bei denen das Gen *fgf8* mutiert ist, weisen ein verkleinertes Herz und auch eine verkleinerte Schilddrüse auf. Homozygoten *cloche (clo)* Mutanten fehlt das Endokardium. Auch sie weisen ein verkleinertes Schilddrüsenprimordium auf. Unter allen Herzmutanten im Zebrafisch, die länger als 24 hpf überleben, gelten homozygote *han*^{S6} Mutanten als diejenigen Mutanten, bei denen das Herzgewebe am massivsten reduziert ist. Übereinstimmend mit dieser Tatsache ist, dass in diesen Mutanten auch das Schilddrüsenprimordium unter allen untersuchten Mutanten am massivsten reduziert, d.h. nicht vorhanden ist.

Weitere Unterstützung für eine enge Beziehung von mesodermalem Herzgewebe und Endoderm bei der Entwicklung der Schilddrüse gibt die *miles apart (mil)* Mutante (Kuppermann et al., 2000). In homozygoten *mil* Mutanten findet die Wanderungsbewegung des Seitenplattenmesoderms und des Endoderms zur Mittellinie nicht statt. Untersuchungen von Kupperman et al. (2000) und eigene Untersuchungen bestätigen, dass in homozygoten *mil* Mutanten allein die Wanderungsbewegung dieser beiden Gewebe gestört ist, die Gewebe an sich sind normal entwickelt. In homozygoten *mil* Mutanten wird auf jeder Körperseite ein Herz gebildet. Das Herzgewebe beider Herzen selbst ist morphologisch intakt und exprimiert alle wichtigen myokardialen Differenzierungsmarker, wie z.B. *cardiac myosin light chain 2 (cmlc2)* oder *ventricular myosin heavy chain (vmhc)* (Kuppermann et al., 2000). Ebenso fangen beide Herzen noch vor 24 hpf an zu schlagen. Das Endoderm in homozygoten *mil* Mutanten exprimiert ebenfalls alle wichtigen Differenzierungsmarker. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Expression von Schilddrüsenmarkern in homozygoten *mil* Mutanten zeigt, dass entweder zwei bilaterale Schilddrüsenprimordien oder ein einseitiges Schilddrüsenprimordium gebildet werden. Alle beobachteten Primordien entwickeln sich zu funktionalen Schilddrüsenfollikeln, die in der Lage sind, Schilddrüsenhormone zu produzieren.

Nicht zuletzt deutet die direkte Nachbarschaft von Schilddrüsenprimordium und Herzgewebe und die asymmetrische Lage beider Gewebe auf eine enge Verbindung.

Vermutlich geht also das Fehlen eines Schilddrüsenprimordiums in homozygoten *han*^{S6} Mutanten auf das defekte, wesentlich kleinere und nicht korrekt spezifizierte Herz zurück, ein möglicher Einfluss der Kiemenbögen kann aber nicht ausgeschlossen werden.

4.3 Die Zebrafisch *han*^{S6} Mutante als geeignetes Modell frühe Prozesse in der Schilddrüsenentwicklung zu untersuchen

Im Unterschied zu anderen Wirbeltieren ist im Zebrafisch nur ein Gen der *hand* Familie von bHLH Transkriptionsfaktoren vorhanden: *hand2*. In der Maus (Srivastava et al., 1995), im Huhn (Srivastava et al., 1995; Howard et al., 1999) und in *Xenopus* (Sparrow et al., 1998; Angelo et al., 2000) wurden zwei *hand* Gene gefunden und beschrieben: *hand1* und *hand2*. Ein *hand1* Gen konnte im Zebrafisch nicht gefunden werden (Angelo et al., 2000). Interessanterweise zeigen bisherige Veröffentlichungen, dass die Anzahl der *hand* Gene in den verschiedenen Species mit der Anzahl der Herz-Vorkammern und der Struktur des Blutkreislaufsystems korreliert. Das Herz des Zebrafischs besteht aus einer Vorkammer (Atrium) und einer Hauptkammer (Ventrikel) und führt nur venöses Blut. In Amphibienherzen (zwei Vorkammern, eine Hauptkammer) wird trotz Lungen- und Körperkreislauf das Blut noch stark durchmischt. Bei Säugern und Vögeln sind zwei Vorkammern und zwei Hauptkammern vorhanden und damit Lungen- und Körperkreislauf völlig getrennt.

Aus dem Huhn ist bekannt, dass beide *hand* Gene im Herz überlappend exprimiert werden. Die Inkubation von Hühnerembryonen mit *hand1* und *hand2 antisense* Oligonukleotiden zeigt beispielsweise, dass die einzelnen Oligonukleotide keinen Effekt auf die Embryonalentwicklung haben, während beide zusammen die Entwicklung des Herzens stören (Srivastava et al., 1995). Daher scheinen *hand1* und *hand2* in ihrer Funktion in der Entwicklung des Huhns weitgehend redundante Rollen zu spielen. Über die Entwicklung der Schilddrüse in diesen Embryonen ist

nichts bekannt. Es kann aber vermutet werden, dass damit auch beide *hand* Gene in die Entwicklung der Schilddrüse involviert sind.

In *Xenopus* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die beiden *hand* Gene in ihrem Expressionsmuster nahezu vollständig überlappen (Angelo et al., 2000). Funktionelle Studien über die *hand* Gene aus *Xenopus* liegen jedoch nicht vor.

In der Maus ist die Expression von *Hand1* in der linken Herzkammer (Körperkreislauf) und *Hand2* in der rechten Herzkammer (Lungenkreislauf) komplementär. Übereinstimmend mit der *Hand2* Expression im rechten Ventrikel des Herzens zeigen *Hand2*^{-/-} Mäuse eine starke Reduktion des rechten Ventrikels (Srivastava et al., 1997). Die *Hand2*^{-/-} Mäuse sterben aufgrund dieses Herzfehlers bei Tag E 10,5. Über das Entstehen der Schilddrüse in diesen *knockout*-Mäusen ist nichts bekannt. In wildtypischen Mäusen beginnt die Expression der Schilddrüsenmarker *Nkx2.1*, *Hhex* und *Pax8* bei E 9,0. Vermutlich würde die kurze Zeitspanne vom Auftreten der Schilddrüsenmarkerexpression bis zum Tod der *Hand2*^{-/-} *knockout*-Mäuse nicht ausreichen, um sicher festzustellen, ob ein Schilddrüsenprimordium entsteht oder nicht. In diesem Punkt bieten Untersuchungen am Zebrafisch einen großen Vorteil. Selbst in Zebrafischembryonen, denen das komplette Herz fehlt, reicht die Diffusion der Nährstoffe aus, um relativ lange zu überleben. Homozygote *han*^{S6} Mutanten sind trotz des Fehlens eines essentiellen Organs, wie dem Herz, sehr lange lebensfähig und sterben erst zwischen 7 und 10 dpf. Nahezu alle Gewebe, in denen *hand2* nicht exprimiert wird, entwickeln sich weitgehend normal.

Mäuse, denen das *Hand1* Gen fehlt, sterben am Tag E 8,5 an Defekten der Plazenta und anderen extraembryonalen Geweben (McFadden et al., 2005). Damit sterben sie während der frühen Bildung des Herzens und vor Beginn der Schilddrüsenmarkerexpression (ab Tag E 9,0). Durch konditionelle *Hand1* *knockout* Mäuse konnte schließlich nachgewiesen werden, dass ein herzspezifischer *knockout* von *Hand1* zu einer Reduktion des linken Ventrikels führt. Über eine mögliche Rolle von *Hand1* in der Entwicklung des Schilddrüsenprimordiums der Maus kann aber nur spekuliert werden.

4.4 Die Lage des Schilddrüsenprimordiums und seiner Vorläuferzellen

Mit den bisher bekannten Schilddrüsenmarkern ist das Schilddrüsenprimordium frühestens ab 24 hpf zu erkennen. Um die Frage nach der Herkunft dieser Zellen zu klären wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Anlagenplan im 8-Somitenstadium erstellt. Dabei zeigte sich, dass Schilddrüsenvorläuferzellen dem Endoderm auf der Höhe der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (MHB) entstammen. Diese Lage der Schilddrüsenvorläuferzellen spiegelt sich in der Lage dieser Gewebe bei 24 bis 32 hpf wieder. Gene, wie *pax2.1* (ab 24 hpf) oder *pax8* (ab ca. 28 hpf), sind sowohl im Schilddrüsenprimordium, als auch in der MHB exprimiert. Dabei zeigt sich, dass das Schilddrüsenprimordium ventral, leicht posterior zur MHB liegt. Damit liegen beide Gewebe im 8-Somitenstadium und zwischen 24 und 32 hpf in der gleichen relativen Position zueinander. Es ist anzunehmen, dass sich die Lage der beiden Gewebe auch im Zeitraum dazwischen nur unwesentlich verändert. Die lichtmikroskopisch sichtbare MHB kann also als Repräsentant für die AP-Position der Schilddrüsenvorläuferzellen im Endoderm angesehen werden.

Studien von D. Adzic (Diplomarbeit, 2005) zeigen, dass ein chemisch induziertes Ausschalten des FGF-Signallings zwischen 18 und 22 hpf zu einem Verlust des Schilddrüsenprimordiums in Wildtypembryonen führt. Dementsprechend kann man vermuten, dass in diesem Zeitraum eine Signalkaskade, in die FGF Proteine involviert sind, zur Induktion des Schilddrüsenprimordiums im Endoderm führt.

Der Vergleich der *hand2* Expression mit der *pax2.1* Expression (MHB) in diesem Zeitraum wurde im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt (Abb. 14). Das *hand2* exprimierende LPM fusioniert bei 18 hpf an der Mittellinie ventral von der MHB und schiebt sich darauf anteriorwärts „unter“ ihr hindurch. Das Endoderm liegt zu diesem Zeitpunkt als dünne Zellschicht dorsal auf dem LPM. Demzufolge sind im oben beschriebenen Zeitraum von 18 bis 22 hpf das *hand2* exprimierende LPM und die Schilddrüsenvorläuferzellen direkt benachbart. Die *hand2* Expressionsdomäne in den Kiemenbögen ist zu diesem Zeitpunkt etwa 10 bis 20 Zelldurchmesser von der MHB und damit von den Schilddrüsenvorläuferzellen entfernt.

Schon in Stadien ab 20 hpf, spätestens jedoch ab 22 hpf, befindet sich das entstehende Herz links von der Mittellinie auf der linken Körperseite. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, befindet sich auch das Schilddrüsenprimordium

zwischen 24 und 28 hpf asymmetrisch links von der Mittellinie und liegt dorsal direkt auf dem Herz (Abb. 15).

Auch der Anlagenplan im 8-Somitenstadium weist eine Asymmetrie der Verteilung der Schilddrüsenvorläuferzellen auf. So fanden sich markierte Zellen des linken Teils des Endoderms häufiger in der Schilddrüse wieder (in sechs von 17 Versuchen in diesem Bereich), als aus dem rechten Teil des Endoderms (in zwei von 18 Versuchen in diesem Bereich). Demnach werden mehr endodermale Zellen der linken Körperseite für die Bildung des Schilddrüsen-primordiums rekrutiert, als von der rechten Körperseite. Dies könnte auf eine asymmetrische Induktion der Schilddrüse hindeuten.

Die direkte Nachbarschaft der Schilddrüsenvorläuferzellen und des *hand2* exprimierenden LPM sprechen für eine Interaktion dieser beiden Gewebe. Die beobachtete Asymmetrie des frühen Schilddrüsen-primordiums, sowie seiner Vorläuferzellen deuten ebenfalls an, dass das Herz für das Entstehen der Schilddrüse verantwortlich ist.

4.5 FGF Proteine können das Schilddrüsenprimordium in *han*^{S6} Mutanten retten

Die Transplantationsexperimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass *hand2* nicht im Schilddrüsenprimordium selbst erforderlich ist, sondern in einer nicht-zellautonomen Weise in der Entwicklung des Schilddrüsenprimordiums wirkt. Ferner deuten die Transplantationsexperimente, die Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden und die Arbeit an anderen Herzmutanten auf eine tragende Rolle der *hand2* Expression im LPM/Herz bei der Entstehung des Schilddrüsenprimordiums im Zebrafisch hin.

Das Gen *hand2* codiert jedoch für den Transkriptionsfaktor Hand2, der mit seiner Helix-Windung-Helix-Domäne an die DNA in den *hand2* exprimierenden Zellen selbst bindet. Demnach muss es andere Faktoren geben, die *downstream* von *hand2* zum Entstehen der Schilddrüse führen.

Abe et al. (2002) konnten zeigen, dass sekretierte Faktoren der FGF-Familie bei der Zahnentwicklung der Maus *downstream* von *hand2* agieren. Zugabe von

FGF2 Proteinen führte dabei in in vitro Experimenten zur Entwicklung von Zähnen in Mausgewebe. Serls et al. (2005) haben ebenfalls in in vitro Versuchen gezeigt, dass durch Einwirken von FGF1 und FGF2 auf ventrales Endodermgewebe von Mäusen der Transkriptionsfaktor Nkx2.1 exprimiert wird. Dieser Transkriptionsfaktor ist u.a. im Schilddrüsenprimordium von Mäusen exprimiert. Diese neuen Erkenntnisse führten zu weiteren Experimenten im Zebrafisch, in denen festgestellt werden konnte, dass FGF-Proteine auch in der Schilddrüsenentwicklung des Zebrafisch eine Rolle spielen. So konnte D. Adzic (Diplomarbeit, 2005) nachweisen, dass ein Ausschalten des FGF-Signalweges in einem Zeitraum zwischen 18 und 22 hpf zu einem Verlust des Schilddrüsenprimordiums führt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch Injektion von *fgf1* und *fgf2* mRNA in homozygote *han^{S6}* Mutanten das Schilddrüsenprimordium in diesen Mutanten gerettet wird (D. Adzic, Diplomarbeit, 2005). Das Expressionsmuster von *fgf1* und *fgf2* in Zebrafischwildtypen und homozygoten *han^{S6}* Mutanten gibt leider keinen Aufschluss über die ursprüngliche Quelle der FGF Signale, die zu einer Rettung des Schilddrüsenprimordiums führen. *fgf1* und *fgf2* sind sowohl in Zebrafischwildtypen, als auch in homozygoten *han^{S6}* Mutanten ubiquitär exprimiert (D. Adzic, Diplomarbeit, 2005). Beide *fgf* mRNA Transkripte liegen vermutlich in verschiedenen *Splicing*-Varianten vor, die z.T. eine Nukleus-Lokalisations-Sequenz (NLS) tragen. Eine Regulation findet wahrscheinlich posttranslational auf Proteinebene statt.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass durch die Implantation von Mikropartikeln, die mit rekombinanten menschlichen FGF1 und FGF2 Proteinen beladen waren, ein Schilddrüsenprimordium in homozygoten *han^{S6}* Zebrafischmutanten entsteht. Das entstandene Schilddrüsenprimordium lag dabei in einigen Fällen im endodermalen Gewebe, das direkt an die Herzzrudimente der homozygoten *han^{S6}* Mutanten angrenzt. In manchen Fällen konnte aber auch ein ektopisches Schilddrüsenprimordium im Endoderm an der Stelle des implantierten, mit FGF Proteinen beladenen Mikropartikels beobachtet werden. Das Entstehen dieses ektopischen Schilddrüsenprimordiums deutet darauf hin, dass Fgf1 und Fgf2 bezogen auf die Schilddrüse nicht zellautonom wirken. Eine mögliche Quelle für diese FGF Signale lässt sich mangels klarem Expressionsmuster nicht ausmachen, sie könnte aber durchaus im Herz oder den Kiemenbögen liegen.

Demnach könnten FGF-Signale auf zweierlei Arten wirken. Sie könnten zum einen in einer Signalkaskade wirken, an deren Ende gewebeerhaltende Faktoren entstehen, die das Schilddrüsenprimordium am Absterben hindern, oder sie könnten in einer Signalkaskade wirken, die zur Induktion des Schilddrüsenprimordiums führt. Gegen den ersten Fall sprechen aber vorläufige Studien zur Apoptose in homozygoten *han*^{S6} Mutanten, die keinen gehäuften Zelltod zwischen 18 und 22 hpf im Endoderm aufzeigen.

Vermutlich spielen also FGF-Proteine eine Rolle in der Induktion des Schilddrüsenprimordiums. Ob sie die induktiven Signale in dieser Kaskade selbst darstellen, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Dafür müsste gezeigt werden, dass FGF-Rezeptoren in einem kompetenten Gewebeteil des Endoderms, den Schilddrüsenvorläuferzellen, exprimiert sind, und ein gezieltes Ausschalten dieser FGF-Rezeptoren in den Schilddrüsenvorläuferzellen zu einem Verlust der Schilddrüsenmarkerexpression führt.

5 Zusammenfassung

Die Schilddrüse ist ein endokrines Organ der Wirbeltiere. Erste Untersuchungen legen nahe, dass die Mechanismen ihrer Entwicklung bei den verschiedenen Wirbeltierarten sowohl auf morphologischer, als auch auf molekularer Ebene konserviert sind. Allerdings sind die molekularbiologischen Grundlagen der Schilddrüsenentwicklung noch weitgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten genetische und molekularbiologische Mechanismen der frühen Schilddrüsenentwicklung im Modellorganismus Zebrafisch untersucht werden.

Das Schilddrüsenprimordium im Zebrafisch entwickelt sich ab 24 hpf im ventralen Pharynxepithel und befindet sich ventral von der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze. Ferner liegt das Schilddrüsenprimordium asymmetrisch links von der Mittellinie in direktem Kontakt zum ventral, ebenfalls links gelegenen Herz. Ein Hinweis auf eine mögliche Beziehung des Schilddrüsenprimordiums zum Herz zeigt sich auch an Zebrafisch-Herzmutanten. Unter den bekannten Zebrafisch-Herzmutanten weisen viele eine defekte Schilddrüse auf. Eine dieser Mutanten ist die Zebrafisch *hands off (han)* Mutante, in der das Gen *hand2* deletiert ist. Mit dieser Mutante wurden die meisten Experimente in dieser Arbeit durchgeführt.

In der *hands off* Mutante ist zu beobachten, dass kein Schilddrüsenprimordium entsteht. Das Gen *hand2* wird im Seitenplattenmesoderm, aus dem sich der myokardiale Teil des Herzens entwickelt, und in den Kiemenbögen exprimiert. Außerdem ist es in einer bilateralen Domäne zwischen dem ersten und zweiten Kiemenbogen, im Endoderm und in den Vorderflossen exprimiert. Durch Transplantation von Wildtypzellen in *hands off* Mutanten konnte gezeigt werden, dass *hand2* in der Entwicklung des Schilddrüsenprimordiums nicht-zellautonom wirkt. Um das *hand2* exprimierende Gewebe zu identifizieren, dass im Wildtyp einen nicht-zellautonomen Einfluss auf die Schilddrüse hat, wurde durch die Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden die *hand2* Kiemenbogenexpression ausgeschaltet. Dabei war zu erkennen, dass das Schilddrüsenprimordium unabhängig von dieser Expressionsdomäne entsteht. Dies deutet darauf hin, dass das Herz eine tragende Rolle bei der Entwicklung der Schilddrüse spielt.

Im Herz sind viele sekretierte Faktoren der FGF Familie exprimiert. Um eine Rolle dieser Proteine in der Schilddrüsenentwicklung zu testen, wurden Mikropartikel, die mit FGF1 und FGF2 Proteinen beladen waren, implantiert. Dabei konnte in *hands off* Mutanten ein Rettung des Schilddrüsenprimordiums beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass FGF-Proteine eine nicht-zellautonome Rolle in der Entwicklung der Schilddrüse "*downstream*" von *hand2* spielen. Ob sie direkte induktive Signale darstellen, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

6 Abstract

The thyroid gland is an endocrine organ in all vertebrates. Preliminary studies reveal that the morphologic and molecular mechanisms of its development are highly conserved in vertebrate species. However, the underlying molecular base of thyroid development remains largely unknown. In this study, we use zebrafish as a model to investigate the genetic and molecular mechanisms of thyroid development.

The thyroid primordium develops in the ventral pharyngeal epithelium from 24 hpf. It is localised ventral of the midbrain hindbrain boundary and asymmetrically left to the midline adjacent to the heart. Further evidence for a possible relation of heart and thyroid primordium is given by several zebrafish heart mutants. Many zebrafish heart mutants also display a thyroid phenotype. One of these mutants is the *hands off* (*han*) mutation, in which the *hand2* gene is deleted. Most experiments in this study were performed using this mutant.

hands off mutants don't show a thyroid primordium at all. The gene *hand2* is expressed in the lateral plate mesoderm, which forms the myocard of the heart and in the pharyngeal arches. In addition, it is expressed in a bilateral domain between the first and second branchial arch, in the endoderm and the pectoral fins. Transplantation of wildtype cells into *hands off* mutants demonstrates that *hand2* is acting in a non-cellautonomous fashion. To identify the *hand2* expressing tissue having a non cellautonomous effect on the thyroid primordium I injected morpholinos that abolish *hand2* expression in the pharyngeal arches. It turned out that the thyroid primordium develops independently of *hand2* expressing pharyngeal arches. This suggests a major role for the heart in thyroid development.

Secreted factors of the FGF family are known to be expressed in the heart. To test a possible role of FGFs in thyroid development, beads were soaked in recombinant FGF1 and FGF2 proteins and were implanted into *hands off* mutants. As a result, the thyroid primordium could be rescued in *hands off* mutants. Thus, FGF proteins act downstream of *hand2* in a non cellautonomous way with respect to thyroid development. It remains unclear whether FGFs are direct inductive signals for the thyroid.

7 Literatur

Abe M, Tamamura Y, Yamagishi H, Maeda T, Kato J, Tabata MJ, Srivastava D, Wakisaka S, Kurisu K. (2002). Tooth-type specific expression of dHAND/Hand2: possible involvement in murine lower incisor morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 2002 Nov;310(2):201-12.

Adzic D. (2005). Die Rolle von FGFs in der Schilddrüsenentwicklung des Zebrafischs. Diplomarbeit. 2005.

Ahn DG, Ruvinsky I, Oates AC, Silver LM, Ho RK. (2000). *tbx20*, a new vertebrate T-box gene expressed in the cranial motor neurons and developing cardiovascular structures in zebrafish. *Mech Dev.* 2000 Jul;95(1-2):253-8.

Alexander J, Stainier DY, Yelon D. (1998). Screening mosaic F1 females for mutations affecting zebrafish heart induction and patterning. *Dev Genet.* 1998;22(3):288-99.

Alexander J, Stainier DY. (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Curr Biol.* 1999 Oct 21;9(20):1147-57.

Angelo S, Lohr J, Lee KH, Ticho BS, Breitbart RE, Hill S, Yost HJ, Srivastava D. (2000). Conservation of sequence and expression of *Xenopus* and zebrafish dHAND during cardiac, branchial arch and lateral mesoderm development. *Mech Dev.* 2000 Jul;95(1-2):231-7.

Bally-Cuif L, Goutel C, Wassef M, Wurst W, Rosa F. (2000). Coregulation of anterior and posterior mesendodermal development by a hairy-related transcriptional repressor. *Genes Dev.* 2000 Jul 1;14(13):1664-77.

Bisgrove BW, Essner JJ, Yost HJ. (1999). Regulation of midline development by antagonism of lefty and nodal signaling. *Development.* 1999 Jun;126(14):3253-62.

Bjornson CR, Griffin KJ, Farr GH 3rd, Terashima A, Himeda C, Kikuchi Y, Kimelman D. (2005). Eomesodermin is a localized maternal determinant required for endoderm induction in zebrafish. *Dev Cell*. 2005 Oct;9(4):523-33.

Brand M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Beuchle D, Lun K, Furutani-Seiki M, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, van Eeden FJ, Nusslein-Volhard C. (1996). Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development*. 1996 Dec;123:179-90.

Chen JN, van Eeden FJ, Warren KS, Chin A, Nusslein-Volhard C, Haffter P, Fishman MC. (1997). Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish. *Development*. 1997 Nov;124(21):4373-82.

Chin AJ, Tsang M, Weinberg ES. (2000). Heart and gut chiralities are controlled independently from initial heart position in the developing zebrafish. *Dev Biol*. 2000 Nov 15;227(2):403-21.

Cross JC, Flannery ML, Blonar MA, Steingrimsson E, Jenkins NA, Copeland NG, Rutter WJ, Werb Z. (1995). Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development. *Development*. 1995 Aug;121(8):2513-23.

Cserjesi, P., Brown, D., Lyons, G.E., Olson, E.N.(1995). Expression of the novel basic helix-loop-helix gene eHAND in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development (1995) *Dev. Biol.*, 170 pp. 664-678

Dahl, E., Koseki, H. and Balling, R. (1997). Pax genes and organogenesis. *BioEssays* 19, 755-765.

De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, Macchia PE, Mattei MG, Mariano A, Scholer H, Macchia V, Di Lauro R. (1998). A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet*. 1998 Aug;19(4):395-8.

- Elsalini OA, von Gartzen J, Cramer M, Rohr KB. (2003). Zebrafish *hhex*, *nk2.1a*, and *pax2.1* regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors. *Dev Biol.* 2003 Nov 1;263(1):67-80.
- Feldman B, Gates MA, Egan ES, Dougan ST, Rennebeck G, Sirotkin HI, Schier AF, Talbot WS. (1998). Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature.* 1998 Sep 10;395(6698):181-5.
- Firulli AB, McFadden DG, Lin Q, Srivastava D, Olson EN. (1998). Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor *Hand1*. *Nat Genet.* 1998 Mar;18(3):266-70.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L. and Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151, 1531-1545.
- Frieden EH, Lipner H. (1971). *Biochemical Endocrinology of the Vertebrates.* Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
- Goldstein AM, Fishman MC. (1998). Notochord regulates cardiac lineage in zebrafish embryos. *Dev Biol.* 1998 Sep 15;201(2):247-52.
- Gorbman A, Bern HA. (1962). *Textbook of comparative Endocrinology.* New York: John Wiley and Sons Ltd.
- Grandel H, Schulte-Merker S. (1998). The development of the paired fins in the zebrafish (*Danio rerio*). *Mech Dev.* 1998 Dec;79(1-2):99-120.
- Guo S, Wilson SW, Cooke S, Chitnis AB, Driever W, Rosenthal A. (1999). Mutations in the zebrafish unmask shared regulatory pathways controlling the development of catecholaminergic neurons. *Dev Biol.* 1999 Apr 15;208(2):473-87.
- Ho CY, Houart C, Wilson SW, Stainier DY. (1999). A role for the extraembryonic yolk syncytial layer in patterning the zebrafish embryo suggested by properties of the *hex* gene. *Curr Biol.* 1999 Oct 7;9(19):1131-4.

Hollenberg SM, Sternglanz R, Cheng PF, Weintraub H. (1995). Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol Cell Biol.* 1995 Jul;15(7):3813-22.

Howard M, Foster DN, Cserjesi P. (1999). Expression of HAND gene products may be sufficient for the differentiation of avian neural crest-derived cells into catecholaminergic neurons in culture. *Dev Biol.* 1999 Nov 1;215(1):62-77.

Keegan BR, Meyer D, Yelon D. (2004). Organization of cardiac chamber progenitors in the zebrafish blastula. *Development.* 2004 Jul;131(13):3081-91.

Kikuchi Y, Agathon A, Alexander J, Thisse C, Waldron S, Yelon D, Thisse B, Stainier DY. (2001). *casanova* encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish. *Genes Dev.* 2001 Jun 15;15(12):1493-505.

Kikuchi Y, Trinh LA, Reiter JF, Alexander J, Yelon D, Stainier DY. (2000). The zebrafish *bonnie* and *clyde* gene encodes a Mix family homeodomain protein that regulates the generation of endodermal precursors. *Genes Dev.* 2000 May 15;14(10):1279-89.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995 Jul;203(3):253-310.

Kimmel CB, Warga RM, Schilling TF. (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development.* 1990 Apr;108(4):581-94.

Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ. (1996). The *T/eBP* null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* 1996 Jan 1;10(1):60-9.

Kluge B, Renault N, Rohr KB. (2005). Anatomical and molecular reinvestigation of lamprey endostyle development provides new insight into thyroid gland evolution. *Dev Genes Evol.* 2005 Jan;215(1):32-40. Epub 2004 Dec 8.

Knight RD, Nair S, Nelson SS, Afshar A, Javidan Y, Geisler R, Rauch GJ, Schilling TF. (2003). lockjaw encodes a zebrafish tfap2a required for early neural crest development. *Development*. 2003 Dec;130(23):5755-68.

Kozmik, Z., Holland, N. D., Kalousova, A., Paces, J., Schubert, M. and Holland, L. Z. (1999). Characterization of an amphioxus paired box gene, *AmphiPax2/5/8*: developmental expression patterns in optic support cells, nephridium, thyroid-like structures and pharyngeal gill slits, but not in the midbrain-hindbrain boundary region. *Development* 126, 1295-1304.

Kupperman E, An S, Osborne N, Waldron S, Stainier DY. (2000). A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature*. 2000 Jul 13;406(6792):192-5.

Lazzaro D, Price M, de Felice M, Di Lauro R. (1991). The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development*. 1991 Dec;113(4):1093-104.

Leatherland, J. F. (1994). Reflections on the thyroidology of fishes: from molecules to humankind. *Guelph. Ichtyol. Rev.* 2, 1-64.

Long S, Ahmad N, Rebagliati M. (2003). The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. *Development*. 2003 Jun;130(11):2303-16.

Lun K, Brand M. (1998). A series of no isthmus (noi) alleles of the zebrafish pax2.1 gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary. *Development*. 1998 Aug;125(16):3049-62.

Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A, Fenzi G, Gruters A, Busslinger M, Di Lauro R. (1998). PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet*. 1998 May;19(1):83-6.

Macchia PE. (2000). Recent advances in understanding the molecular basis of primary congenital hypothyroidism. *Mol Med Today*. 2000 Jan;6(1):36-42. Review.

Macdonald R, Scholes J, Strahle U, Brennan C, Holder N, Brand M, Wilson SW. (1997). The Pax protein Noi is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain. *Development*. 1997 Jun;124(12):2397-408.

Majumdar A, Lun K, Brand M, Drummond IA. (2000). Zebrafish no isthmus reveals a role for pax2.1 in tubule differentiation and patterning events in the pronephric primordia. *Development*. 2000 May;127(10):2089-98.

Manley NR, Capecchi MR. (1998). Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev Biol*. 1998 Mar 1;195(1):1-15.

Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. (1998). Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet*. 1998 May;19(1):87-90.

Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D, Beddington RS. (2000). The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development*. 2000 Jun;127(11):2433-45.

McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, Schneider MD, Srivastava D, Olson EN. (2005). The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development*. 2005 Jan;132(1):189-201. Epub 2004 Dec 2.

Miller CT, Kimmel CB. (2001). Morpholino phenocopies of endothelin 1 (sucker) and other anterior arch class mutations. *Genesis*. 2001 Jul;30(3):186-7.

Miller CT, Schilling TF, Lee K, Parker J, Kimmel CB. (2000). sucker encodes a zebrafish Endothelin-1 required for ventral pharyngeal arch development. *Development*. 2000 Sep;127(17):3815-28.

Mohammadi M, M. G., Sun L, Tang C, Hirth P, Yeh BK, Hubbard SR, Schlessinger J (1997). Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* 276: 955-960.

Mullins MC, Hammerschmidt M, Haffter P, Nusslein-Volhard C. (1994). Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol.* 1994 Mar 1;4(3):189-202.

Neumann CJ, Grandel H, Gaffield W, Schulte-Merker S, Nusslein-Volhard C. (1999). Transient establishment of anteroposterior polarity in the zebrafish pectoral fin bud in the absence of sonic hedgehog activity. *Development.* 1999 Nov;126(21):4817-26.

Noden, D. M. (1991). Vertebrate craniofacial development: the relation between ontogenetic process and morphological outcome. *Brain Behav. Evol.* 38, 190-225.

Ober EA, Field HA, Stainier DY. (2003). From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mech Dev.* 2003 Jan;120(1):5-18. Review.

Odenthal J, Nusslein-Volhard C. (1998). head domain genes in zebrafish. *Dev Genes Evol.* 1998 Jul;208(5):245-58.

Picker A, Brand M. (2005). Fgf signals from a novel signaling center determine axial patterning of the prospective neural retina. *Development.* 2005 Nov;132(22):4951-62. Epub 2005 Oct 19.

Postlethwait, J. H., Yan, Y. L., Gates, M. A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E. S., Force, A., Gong, Z. et al. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* 18, 345-349.

Poulain M, Lepage T. (2002). Mezzo, a paired-like homeobox protein is an immediate target of Nodal signalling and regulates endoderm specification in zebrafish. *Development.* 2002 Nov;129(21):4901-14.

Rauther, M. (1940). *Bronns Klassen und Ordnungen des Tierreichs.* Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H: Leipzig.

Reifers F, Bohli H, Walsh EC, Crossley PH, Stainier DY, Brand M. (1998). Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development.* 1998 Jul;125(13):2381-95.

Reiter JF, Alexander J, Rodaway A, Yelon D, Patient R, Holder N, Stainier DY. (1999). Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev.* 1999 Nov 15;13(22):2983-95.

Renucci A, Lemarchandel V, Rosa F. (1996). An activated form of type I serine/threonine kinase receptor TARAM-A reveals a specific signalling pathway involved in fish head organiser formation. *Development.* 1996 Dec;122(12):3735-43.

Rohr KB, Barth KA, Varga ZM, Wilson SW. (2001). The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron.* 2001 Feb;29(2):341-51.

Rohr KB, Concha ML. (2000). Expression of nk2.1a during early development of the thyroid gland in zebrafish. *Mech Dev.* 2000 Jul;95(1-2):267-70.

Sambrook, Russel (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* CSHL Press 2001.

Serls AE, Doherty S, Parvatiyar P, Wells JM, Deutsch GH. (2005). Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development.* 2005 Jan;132(1):35-47.

Shain, W. G., Hilfer, S. R. and Fonte, V. G. (1972). Early organogenesis of the embryonic chick thyroid. I. Morphology and biochemistry. *Dev. Biol.* 28, 202-218.

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, pp. 151–163.

Srivastava D, Cserjesi P, Olson EN. (1995). A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science.* 1995 Dec 22;270(5244):1995-9.

Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN. (1997). Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet.* 1997 Jun;16(2):154-60. Erratum in: *Nat Genet* 1997 Aug;16(4):410.

Srivastava D. (1999). HAND proteins: molecular mediators of cardiac development and congenital heart disease. *Trends Cardiovasc Med.* 1999 Jan-Feb;9(1-2):11-8. Review.

Stainier DY, Lee RK, Fishman MC. (1993). Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development.* 1993 Sep;119(1):31-40.

Stainier DY, Weinstein BM, Detrich HW 3rd, Zon LI, Fishman MC. (1995). Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Development.* 1995 Oct;121(10):3141-50.

Stainier DY. (2002). A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation. *Genes Dev.* 2002 Apr 15;16(8):893-907. Review.

Strahle U, Blader P, Henrique D, Ingham PW. (1993). Axial, a zebrafish gene expressed along the developing body axis, shows altered expression in cyclops mutant embryos. *Genes Dev.* 1993 Jul;7(7B):1436-46.

Szeto DP, Griffin KJ, Kimelman D. (2002). HrT is required for cardiovascular development in zebrafish. *Development.* 2002 Nov;129(21):5093-101.

Thisse B, Wright CV, Thisse C. (2000). Activin- and Nodal-related factors control antero-posterior patterning of the zebrafish embryo. *Nature.* 2000 Jan 27;403(6768):425-8.

Thisse C, Thisse B. (1999). Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development.* 1999 Jan;126(2):229-40.

Trinh le A, Stainier DY. (2004). Cardiac development. *Methods Cell Biol.* 2004;76:455-73.

Warga RM, Kimmel CB. (1990). Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development.* 1990 Apr;108(4):569-80.

Warga RM, Nusslein-Volhard C. (1999). Origin and development of the zebrafish endoderm. *Development.* 1999 Feb;126(4):827-38.

Westerfield "The zebrafish book." www.zfin.org.

Wu, X., Howard, M.J. (2002). Transcripts encoding HAND genes are differentially expressed and regulated by BMP4 and GDNF in developing avian gut (2002) *Gene Expression*, 10 pp. 279-293

Yamagishi H, Yamagishi C, Nakagawa O, Harvey RP, Olson EN, Srivastava D. (2001). The combinatorial activities of Nkx2.5 and dHAND are essential for cardiac ventricle formation. *Dev Biol.* 2001 Nov 15;239(2):190-203.

Yelon D, H. S., Stainier DYR (1999). "Restricted Expression of Cardiac Myosin Genes Reveals Regulated Aspects of Heart Tube Assembly in Zebrafish." *Developmental Biology* 214: 23-37.

Yelon D, Ticho B, Halpern ME, Ruvinsky I, Ho RK, Silver LM, Stainier DY. (2000). The bHLH transcription factor hand2 plays parallel roles in zebrafish heart and pectoral fin development. *Development.* 2000 Jun;127(12):2573-82.

Zhang J, Talbot WS, Schier AF. (1998). Positional cloning identifies zebrafish one-eyed pinhead as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation. *Cell.* 1998 Jan 23;92(2):241-51.

8 Abkürzungen, Symbole und Konventionen

Abs	–	Absorption (in nm)
AK	–	Antikörper
AP	–	Alkalische Phosphatase
BCIP	–	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BDA	–	Biotin Dextran Amin
BSA	–	(<i>bovine serum albumine</i>) Rinderserumalbumin
DAB	–	Diaminobenzidin
dd H ₂ O	–	doppelt destilliertes H ₂ O
DEPC	–	Diethylpyrocarbonat
Dig	–	Digoxygenin
DMF	–	Dimethylformamid
dpf	–	<i>days post fertilisation</i> , Tage nach der Befruchtung
EDTA	–	Ethylen-Diamin-Tetraacid
Em	–	Emission (in nm)
FDA	–	Fluoreszein Dextran Amin
h	–	Stunde
HEPES	–	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethan)-Sulfonsäure
hpf	–	<i>hours post fertilisation</i> , Stunde(n) nach der Befruchtung
LPM	–	<i>lateral plate mesoderm</i> , Seitenplattenmesoderm
MHB	–	<i>midbrain hindbrain boundary</i> , Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze
min	–	Minute
MO	–	Morpholino-Oligonukleotide
mRNA	–	(<i>messenger RNA</i>) Boten-RNA
NBT	–	Nitro-Blue-Tetrazolium
nm	–	Nanometer
PBS	–	(<i>phosphate buffered saline</i>) Phosphat-gepufferte Salzlsg.
PBT	–	PBS mit 1%igem Tween 20
PFA	–	Paraformaldehyd
pH	–	(von lat. <i>pondus hydrogenii</i> ; Wasserstoff-Gewicht) negativer dekadischer Logarithmus der aktuellen Hydroniumionenaktivität
RDA	–	Rhodamin Dextran Amin

RT	–	Raumtemperatur
s	–	Sekunden
SSC	–	<i>standard saline citrat</i>
TAE	–	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Tris	–	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	–	(<i>unit</i>) Reaktionseinheit
ü.N.	–	über Nacht
UV	–	ultraviolette Strahlung
VE	–	voll entsalztes Wasser
ZF	–	Zebrafisch

Die Genetische Nomenklatur in dieser Arbeit hält sich an die üblichen Konventionen:

Gene, mRNAs und Phänotypen werden klein und *kursiv* geschrieben, außer in der Maus groß und *kursiv* .

Proteine nicht kursiv und deren Anfangsbuchstaben jeweils groß geschrieben.

9 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Siegfried Roth, Prof. Dr. José Campos Ortega und Dr. Klaus Rohr betreut worden.

Köln, den _____

Teilpublikationen:

Wendl T, Lun K, Mione M, Favor J, Brand M, Wilson SW, Rohr KB. (2002).

Pax2.1 is required for the development of thyroid follicles in zebrafish. Development. 2002 Aug;129(15):3751-60.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Thomas Peter Wendl
Geburtsdatum	12. Juli 1971
Geburtsort	Stuttgart
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1978 – 1982	Besuch der Grundschule Stuttgart-Birkach
1982 – 1991	Besuch des Paracelsus-Gymnasiums-Hohenheim, Stuttgart-Plieningen
Juni 1991	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

Aug. 1991 – Okt. 1992	Zivildienst bei der Lebenshilfe Stuttgart e.V
-----------------------	---

Akademische Ausbildung

WS 1993/94 – SS 2001	Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen in den Fächern Biologie, Mathematik und Informatik mit Abschluß Staatsexamen (Sek. 2)
WS 1996/97 – SS 1997	Auslandsstudium an der Universidad de Granada in Spanien mit einem ERASMUS-Stipendium im Fach Mathematik
Oktober 1999	Staatsexamensprüfung im Hauptfach Mathematik
Mai 2000	Staatsexamensprüfung im Hauptfach Biologie
Juni – Dezember 2000	Staatsexamensarbeit am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen bei Prof. Dr. F. Bonhoeffer mit dem Thema: „ <i>in vitro</i> Versuche zur Untersuchung der Wirkung von Ephrinen auf die axonale Lenkung von retinalen Ganglienzellen des Huhns“
Mai 2001	Staatsexamensprüfung im Erweiterungsfach Informatik
WS 01/02- WS 05/06	Doktorarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln unter der Leitung von Dr. Klaus Rohr, Prof. Dr. J.A. Campos Ortega und Prof. Dr. S. Roth mit dem Thema: „Untersuchungen zur Rolle von <i>hand2</i> in der Schilddrüsenentwicklung des Zebrafischs“