

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS–JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR–JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Mare Laurits

Neuraalharja transgeensed markerid hiire südame arengus

Bakalaaurusetöö

Juhendaja, dotsent Raivo Raid

Tartu 2008

Sisukord

Lühendid	3
Sissejuhatus	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1. Selgroogsete neuraalhari	5
1.2. Neuraalharja erinevad piirkonnad ja nende derivaadid	7
1.3. Südame neuraalhari	9
1.4. Südame neuraalharja rakkude osalus väljavoolukulga arengus	10
2.1. Ideaalse neuraalharja rakkude markeri kriteeriumid	12
2.2. Kana-vuti kimäärid neuraalharja rakkude migratsiooni mudelsüsteemina	12
2.3. Imetaja neuraalharja rakkude migratsiooni uurimine	12
3.1.1. <i>Cx43-LacZ</i> transgeen.....	13
3.1.2. Konneksiinide perkonna transkriptsioonifaktorid	13
3.2.1. <i>Pax3-Cre</i> transgeen	15
3.2.2. Pax-perekonna transkriptsioonifaktorid	16
3.3.1. <i>Wnt1-Cre</i> transgeen	16
3.3.2. Wnt-perekonna transkriptsioonifaktorid.....	17
4.1. Gata3 osaleb südame väljavoolukulga arengus	18
4.2. Gata-perekonna transkriptsioonifaktorid.....	19
Arutelu	21
Kokkuvõte	22
Summary	23
Tänuavaldused	24
Kirjandus	25

Lühendid

AAA (*aortic arch anomalies*) – aordikaare anomaaliad

DORV (*double outlet right ventricle*) – paaris äravooluavaga parem vatsake

E – hiire embrüonaalne arengupäev

EMT (*epithelial-mesenchymal transformation*) – epiteliaal-mesenhümaalne transformatsioon

in situ – loomulikus asendis

in vitro – katseklaasis

LacZ – *Escherichia coli* β -galaktosidaasi kodeeriv geen

NH - neuraalhari

nls (*nuclear localization signal sequence*) – tuuma lokalisatsiooni signaaljärjestus

PTA (*persistent truncus arteriosus*) – püsiv arteriaaltüvi

PNS –perifeerne närvisüsteem

TGA (*transposition of the great arteries*) – suurte arterite ümberasetus

wild-type – transgeenita hiir

Märkus. Geenide tähised on tekstis esitatud kaldkirjas, valkude puhul püstkirjas.

Sissejuhatus

Eksperimentaalembrioloogia areng sõltub sobivate mudelorganismide ja katsemetoodikate olemasolust. Kuigi Wilhelm His kirjeldas presumptiivse epidermise ja neuraalitoru vahel kraniokaudaalselt kulgevat rakkude kogumit juba 1868. aastal, tekkis kaasaegne neuraalharja kontseptsioon alles 1980-90-ndatel aastatel just tänu vutt/kana transplantatsioonikatsetele. Vuti rakutuumas on suur kondenseerunud kromatiiniga ala, mis teeb ta eristatavaks kana rakutuumadest. Nii saab varajases arengustaadiumis olevasse kana embrüosse transplanteeritud vuti rakkude saatust jälgida kuni definitiivsete kudede ja organite moodustumiseni. 1980-ndatel leidis Margaret Kirby, et keskkõrva algest kuni kolmanda somiidini jääv neuraalharja piirkond moodustab nn. südame neuraalharja, mis osaleb südame vatsakestevahelise vaheseina, aordi ja tema harude arengus.

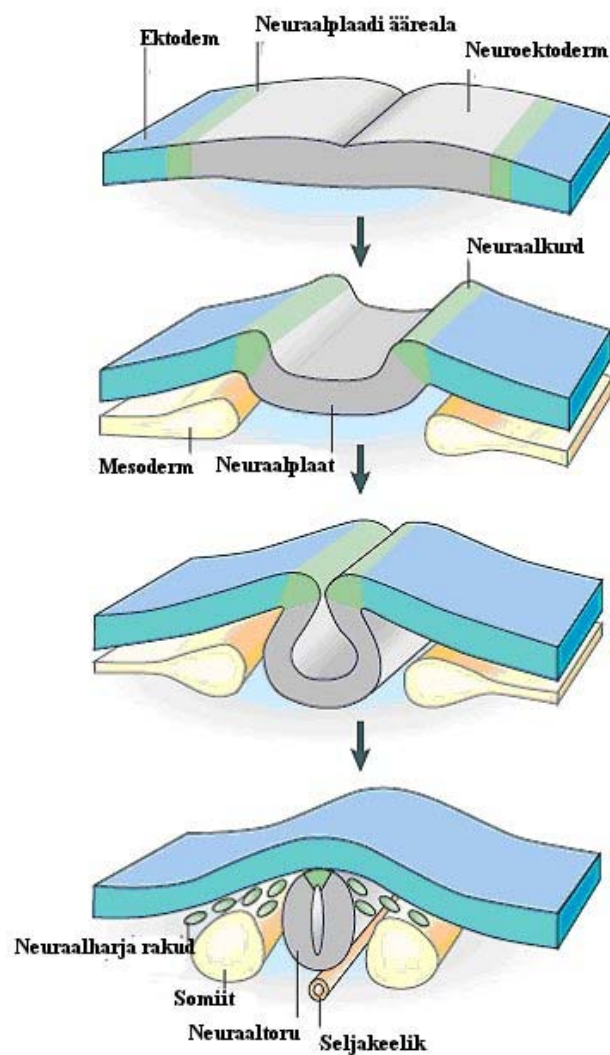
Imetajate südame neuraalharja migratsiooni ja tema derivaatide saatuse uurimist takistas pikka aega sobivate markerite puudumine. Süstitavate vitaalvärvidega ja *in vitro* katsetega oli küll näidatud, et imetaja südame neuraalharja rakud migreeruvad lõpusekaartesse analoogiliselt lindudele, kuid rakkude edasine saatus jäi lahtiseks. Vitaalvärvid ei taga rakkude püsivat märgistamist, sest värv lahjeneb rakupooldumiste reas ja välistada ei saa ka värvi ühest rakust teise ümberpaiknemist difusiooni või mõne muu protsessi teel. Uute neuraalharjaspetsiifiliste transgeensete hiireliinide konstrueerimine tekitas südame neuraalharja rakkude saatuse uurimises uue kvalitatiivse hüppe, mis näitas, et imetajate neuraalharja rakkude migratsioon ja morfogenees on suuresti sarnane lindude omaga. Kuid samas on lõplikult kummutamata ka kahtlused, kas ja kuivõrd on saadud andmed ülekantavad *wild type* hiires ja intakses linnumunas toimuvatele protsessidele.

Bakalaureusetöö eesmärgiks on analüüsida kirjanduse põhjal neuraalharja transgeenseid markergeene: nende molekulaargeneetilist olemust, ekspressioonimustreid südames ja rakendatavust neuraalharja rakkude ja nende derivaatide märkimiseks. Kirjanduse ülevaatesse on lisatud lõik arengubioloogia õppetoolis saadud veel avaldamata andmetest Gata3 osalusest südame väljavoolukulgl ja sellest lähtuvate arterite arengus. Arutelu seostatakse kirjanduse analüüs võimalike katsetega Gata3 rolli selgitamiseks hiire südame arengus.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Selgroogsete neuraalhari

Neuraalhari (NH) on selgroogsete arengus lühiajaline struktuur, mille moodustumine algab gastrulatsiooni algfaasis ning lõpeb neuraaltoru sulgumisega (Mayor jt., 1995). Ektodermis neuraalplaadi ja tulevase epidermise interaktsioonide tulemusena indutseeritakse rakud, mis panevad aluse neuraalharjale (Joonis 1) (Cammill ja Bronner-Fraser, 2003). Neuraalplaadi kokkurullumisel närvitoruks käivitub epiteliaal-mesenhümaalne transformatsioon (EMT), mille käigus epiteliaalsest blastist segregeeruvad rakud muutuvad mesenhümaalseteks ja hakkavad migreerima laiali üle terve organismi (Thiery., 2003). Homoloogiline NH on iseloomulik kõikidele selgroogsetele organismidele. Tema üldine ehitus, tekkimise ja eraldumise mehhanismid on konserveerunud evolutsioonis, kuid eri loomarühmades siiski ka erinevad (Huang ja Saint-Jeannet, 2004). Nii näiteks, lindudel, kaladel ja kahepaiksetel initsieerib NH rakkude segregatsiooni närvitoru sulgumine, kuid hiire NH rakud eralduvad juba enne närvitoru sulgumist (Kulesa jt., 2004). Konnal ja kanal osalevad NH moodustumises ka seljakeelikut ümbritsevast mesodermist tulevad signaalid (Sellec ja Bronner-Fraser, 1995; Monsoro-Burq jt, 2003). Tundub, et nimetatud signaalid ei oma olulist rolli hiire ja vöödilise pisidaanio (*Danio rerio*) NH induktsioonis.



Joonis 1. Neuraaltoru ja neuraalharja rakkude moodustumine. Ektodermist (sinine), neuroektodermist (hall) ja mesodermist (kollane) pärinevad signaalid indutseerivad neuraalplaadi ääreala (roheline) arenema NH rakkudeks neuraaltoru moodustumisel. Neuraalplaadi äärealadest moodustuvad embrüo teljega paralleelsed neuraalkurrud, mis suurenedes lähenevad teineteisele, seejärel liitudes moodustavad neuraaltoru. Neuraalharja rakud (rohelised) migreeruvad neuraalkurdudelt või tekkivast neuraaltorust sõltuvalt liigilistele iseärasustele (Cammill ja Bronner-Fraser, 2003, järgi).

1.2. Neuraalharja erinevad piirkonnad ja nende derivaadid

Enamus NH rakke on pluripotentsed ja võivad aluse panna väga erinevatele rakutüüpidele (Le Douarin ja Dupine, 2003). NH rakud osalevad näo piirkonna kõhr-, side- ja luukoe, kraniaalsete neuronite, neerupealiste säsi, Schwanni rakkude, melanotsüütide, südameveresoonkonna mesenhüümi ja silelihasrakkude moodustumisel (Tabel I) (Dupin jt., 2001). Erinevad diferentseerumispotentsid sugereerisid küsima, kas tegu võiks olla tüvirakkudega? Esimesed tõendid selle kohta saadi hiire NH rakkude kloonimisel *in vitro* (Ito jt., 1993). Paljudel kloonidel oli nii eneseuuendamise võime (ingl *self-renewal capacity*) kui ka võime diferentseeruda erinevateks raku- ja koeliikideks (Ito jt., 1993). Hilisemad tööd on näidanud, et NH rakud moodustavad heterogeense rakkude kogumi. Üks osa NH rakke on juba enne migratsiooni küllalt täpselt determineeritud (Perez jt., 1999), teine osa aga transleerib ise transkriptsioonifaktoreid, mis on suutelised suunama pluripotentsete NH rakkude diferentseerumist neuraaltorust migreerumisel (Harris ja Erickson, 2007). Enamike NH rakkude lahkneemispotentsiaal väheneb migreerumise käigus järkjärgult. Nende tegelik saatus määratakse kindlaks konkreetse ümbruse poolt, kus nad organismis parasjagu viibivad (Paratore jt., 2002) ja osaliselt ka selle poolt, kuhu nad on määratud migreeruma (Dupin jt., 2000).

Tabel I. Neuraalharja derivaadid selgroogsete embrüotes (Dupin jt., 2001, täiendatud).

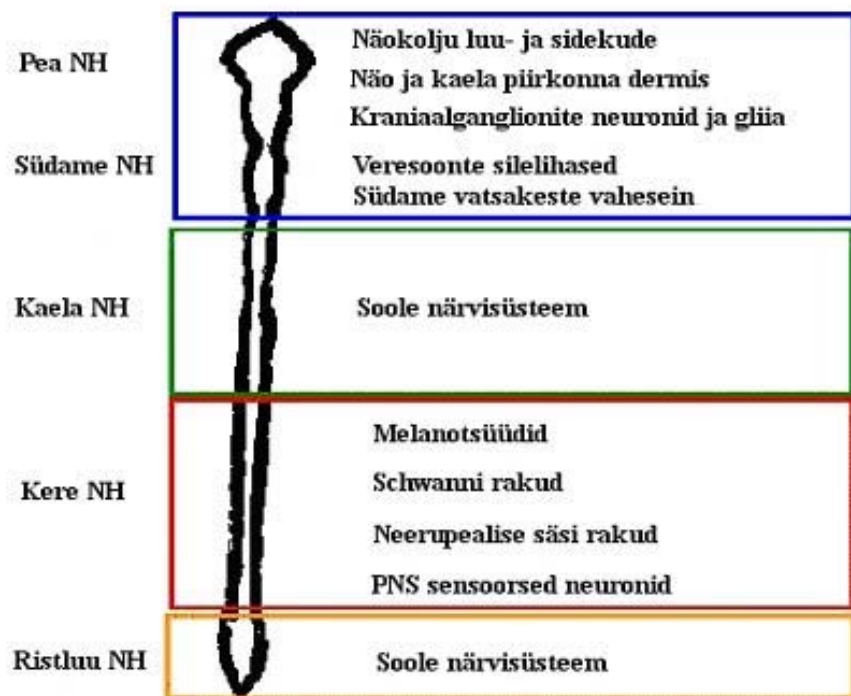
Närvisüsteemi rakud	Pigmendirakud	Endokriinsed ja parakriinsed rakud	Mesodermaalsed derivaadid
Kraniaalsed neuronid (V, VII, IX, X)	Melanotsüüdid	Neerupealiste säsi rakud	Kõhr- ja luukude
Spinaalganglioni neuronid		Kaltsitoniini tootvad c-rakud	Lihaste ja näärmete sidekoeline strooma
PNS gliia rakud			Südame vatsakeste vahesein

Autonoomse närvisüsteemi ganglioni neuronid			Näo ja kaela piirkonna dermis
			Kornea endoteel ja strooma
			Veresoonte silelihased

PNS – perifeerne närvisüsteem.

Enamus autoreid jagab NH vastavalt rakkude päritolule piki embrüonaaltelge ning nende poolt moodustavatele derivaatidele pea, kaela, kere ja südame neuraalharjaks. Kuid eristatakse ka ristluu NH piirkonda (Joonis 2) (Bronner Fraser, 1998).

Joonis 2. NH erinevad piirkonnad ning nende rakkude derivaadid (Bronner-Fraser, 1998, järgi).



Pea NH rakud liiguvad lõpusekaartesse, kus nad diferentseeruvad keskkõrva, lõua ning kaela piirkonna luu- ja kõhrkoeks, kraniaalganglionte neuroniteks ja gliiaks (LeDouarin ja Kalcheim., 1999). *Hox* geeni ekspressiooni alusel jaotatakse kraniaalne NH rostaalseks ja kaudaalseks osaks. Rostaalselt asetsev NH, paikneb kesk-, vaheaju piirkonnast kolmanda somiidini. Katsetes kana-vuti kimääridega on näidatud, et kraniaalse NH rostaalsest osast pärinevates rakkudes ei avaldu *Hox* geenid. Ektomesenhüümi rakud osalevad näokolju luude ning kaela ja pea piirkonna erinevate kudede moodustumises. Kraniaalse NH kaudaalne osa paikneb kolmandast kaheksanda somiidini. Sealsed *Hox* geeni avaldavad rakud omavad olulist rolli keeleluu kõhrkoe arengus (Le Douarin jt., 2004). Pea NH alamregiooniks on südame NH, mis paikneb kõrvaplakoodist kolmanda somiidini. Südame NH rakud omavad olulist rolli südame arengus (Snider jt., 2007).

Nii pea kui ka kere NH rakud suudavad diferentseeruda melanotsüütideks, neuroniteks, ja gliia rakkudeks. Kuid ainult pea NH rakud diferentseeruvad näokolju kõhr- ja luukoeks. Arvatakse, et kere NH rakud on kaotanud võime moodustada luukudet (Douarin jt., 2004). Viiendast somiidist kuni neuraalitoru kaudaalse tipuni asetseb kere NH. Dorsolateraalselt migreeruvad rakud diferentseeruvad melanotsüütideks. Ventraalselt migreeruvad rakud osalevad neerupeesäsi, Schwanni rakkude, PNS sensorsete neuronite arengus (Bronner-Fraser, 1995).

Kaela ja ristluu NH rakud asustavad soole, kus nad moodustavad parasümpaatilisi neuroneid, mis reguleerivad soole peristaltikat ja veresoonte laienemist (Burns ja Douarin, 2001).

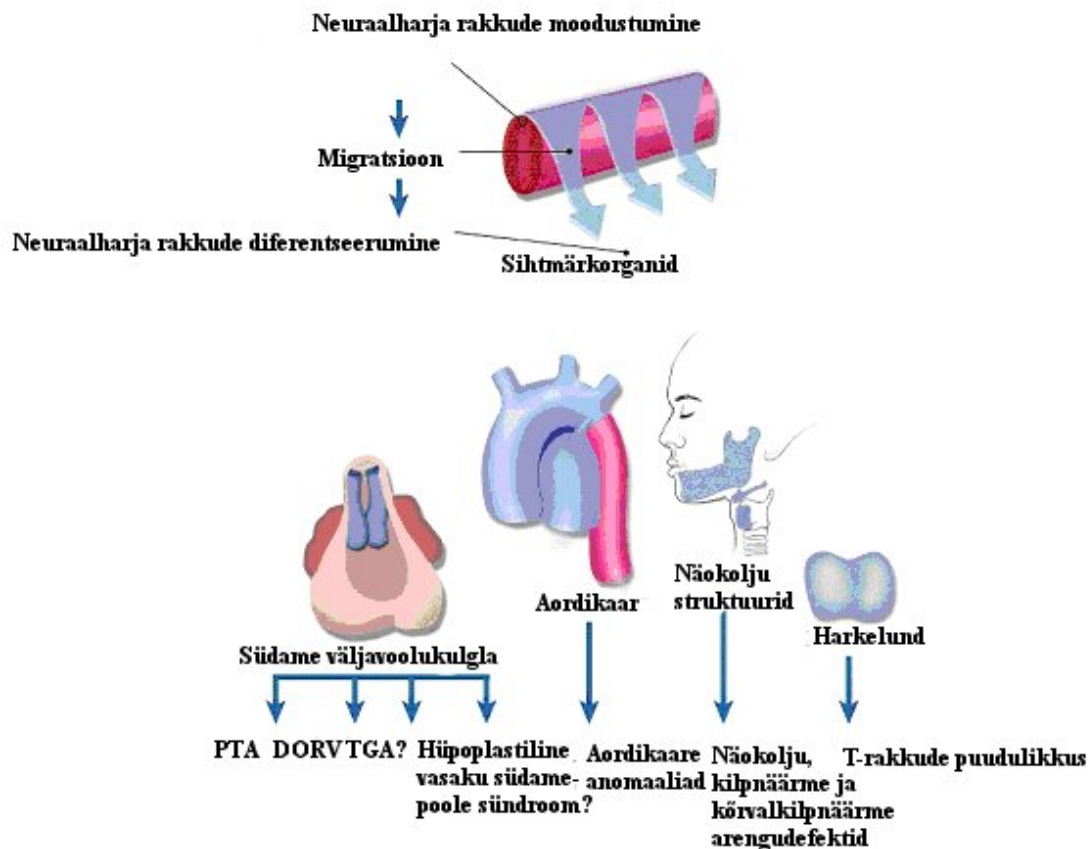
1.3. Südame neuraalhari

Kõrvaplakoodi ja kolmanda somiidi vahelisel alal paikneb südame NH (Martinsen jt., 2003). Sealsed rakud on olulised südame arengus (Hudson ja Kirby, 2007). Kana embrüos vastava piirkonna eemaldamine põhjustab väljavoolukulgla ja suurte arterite arenguhäireid (Hudson ja Kirby, 2003, Kirby ja Waldo, 1995,). Lisaks esineb ka harkelundi, kõrvalkilpnäärme ja kilpnäärme vaegmoodustus ehk hüpoplaasia või väljaarenematus ehk aplaasia (Bockman jt., 1984). (Joonis 3) (Kenneth, 2000). Ektomesenhüümi rakud, mis pärinevad südame NH-st, panevad aluse suurte arterite silelihaskestale, harkelundi, kõrvalkilpnäärme ja kilpnäärme sidekoele ning vatsakese ja suurte veresoonte (aordi ja kopsutüve) vaheseinale (Epstein jt., 2000). Südame NH rakud aitavad kaasa ka koja-vatsakese- ja aordi-pulmonaalklappide moodustumisele (Waldo jt., 1999, Nakamura jt., 2006). Lisaks tagavad südame NH rakud südame erutusjuhtesüsteemi arengu (Nakamura jt., 2006, Poelmann ja Gittenberger-de Groot, 1999).

1.4. Südame neuraalharja rakkude osalus väljavoolukulgla arengus

Südame väljavoolukulgla jaotatakse tinglikult parema ja vasaku vatsakese väljavoolukulglaks. Kopsutüvi ja kopsuklapp moodustavad parema vatsakese väljavoolukulgla. Vasaku vatsakese väljavoolukulgla koosneb aordiklapist, tõusvast aordist, aordikaarest ja aordikaare arteritest. Väljavoolukulgla struktuuride hulka kuuluvad ka kolmhölmaline klapp parema koja ja vatsakese vahel ning mitraalklapp vasaku koja ja vatsakese vahel, vatsakestevaheline sein ja südame pärgarterid (Jang jt., 2000).

Hiire embrüonaalsel arengupäeval 10,5 liiguvad südame neuraalharja rakud kolmanda, neljanda ja kuuenda lõpusekaare kaudu väljavoolukulgla endokardiaalsetesse padjanditesse. Seal osalevad neuraalharja rakud distaalselt asetseva aortikopulmonaarse vaheseina ning proksimaalselt paikneva konotrunkaalse vaheseina moodustumisel. Need vaheseinad jaotavad väljavoolukulgla aordiks ja kopsutüveks. Samaaegselt moodustuvad väljavoolukulgla endokardiaalsetest padjanditest väljavoolukulgla poolkuuklapid, mis paiknevad konotrunkaalse ja aortikopulmonaalse vaheseina ühenduskohas (Jiang jt., 2000).



Joonis 3. Südame neuraalharja rakkude osalus erinevate organite morfogeneesis ning nende puudumise või defektse migratsiooni seotud arengudefektid (Kenneth, 2000).

PTA (*persistent truncus arteriosus*; püsiv arterioostüvi), DORV (*double outlet right ventricle*; paaris äravooluavaga parem vatsake) on väljavoolukulga arengudefektid, mille põhjuseks peetakse südame NH rakkude migratsioonihäireid. Südame NH rakkude puudumine või defektse migratsiooni tulemuseks on aordikaare, näokolju ja harkelundi arenguhäired ning T-rakkude puudumine. Arvatakse, et südame NH rakud mõjutavad väljavoolukulga moodustumisel ka hüpoplastilise vasaku südamepoole sündroomi ja TGA (*transposition of the great arteries*, suurte arterite ümberasetus) kujunemist.

2.1. Ideaalse neuraalharja rakkude markeri kriteeriumid

NH rakkude migratsiooni uurimiseks oleks ideaalne marker, mis avaldub vaid NH rakkudes, on detekteeritav NH formeerumise ja migratsiooni vältel ning NH derivaatides. Uusaldusväärsete tulemuste saamiseks ei tohi eksperimentis kasutatavad manipulatsioonid mõjutada markeri ekspressioonimustrit vaid peavad peegeldama *in vivo* toimuvat.

2.2. Kana-vuti kimäärid neuraalharja rakkude migratsiooni mudelsüsteem

Kana-vuti kimäärid on südame NH rakkude migratsiooni uurimisel mudelsüsteem, mis vastab eelpool mainitud nõuetele (Waldo jt., 1998). Kana ja vuti tuuma morfoloogia erinevus on tsütoloogiliselt tuvastatav (Le Douarin, 2004). Vuti rakutuumas on suur kondenseerunud kromatiiniga ala, mis kanal puudub. Seetõttu varajases arengustaadiumis kana embrüosse transplanteeritud vuti NH rakud on eristatavad kana rakkudest (Le Douarin, 2004). Kana-vuti kimäärides on võimalik tuvastada NH rakkude osalust organite morfogeneesis. Tundub, et manipulatsioonid ei mõjuta kimäärade arengut, kuna arengudefekte ei esine (Le Douarin jt., 2005, Waldo jt., 1998). Seega on kana-vuti kimäärid südame NH rakkude migratsiooni uurimisel usaldusväärne mudelsüsteem. Samas tuleb arvestada võimalike muutustega *in vitro* tingimustes toimivas NH rakkude migratsioonis.

2.3. Imetajate neuraalharja rakkude migratsiooni uurimine

Lindudes kasutatavat tehnoloogiat pole võimalik rakendada imetajates. Imetajate südame NH rakkude morfogeneesi uurimiseks polnud pikka aega kana-vuti kimääridega võrreldavat rakkude märgistamissüsteemi, kuna puudus spetsiifiline markergeen, mis avalduks NH formeerumisel, migratsioonil ning diferentseerumisel. Migreeruvate imetaja NH rakkude märgistamiseks ei sobinud *in situ* hübriidiseerimine ja immunohistokeemilisi katsed, kuna enamike kandidaatgeenide ekspressioon reguleeritakse alla enne terminaalset koe väljakujunemist (Lo jt., 1997, Li jt., 1999).

Transgeensed markergeenid võimaldasid suunata geeni ekspressiooni ning märgistada kindlat rakkude populatsiooni. Bakteriaalse *LacZ* geeni viimine NH geeni promootorjärjestuse kontrolli alla võimaldas detekteerida rakke kuni transgeeni ekspressiooni allareguleerimiseni (Lo jt., 1997, Echelard jt., 1994, Waldo jt., 1999). Seega *LacZ* geeni ekspressioon on seotud NH

geeni ekspressiooni aktiivsusega. Samas kahekomponentne Cre/lox süsteemi kasutamisel märgistatakse rakud ka peale esimese transgeeni ekspressiooni allareguleerimisest (Waldo jt., 1999, Epstein jt., 2000). Viiruse *Cre-rekombinaasi* ekspressioon pannakse NH-a geeni promootorjärjestuse kontrolli alla. Cre-rekombinaasi transleeriv hiir ristatakse Cre-reporterhiirega. Rekombinatsioon reportergeeni lookuses tagab markeri translatsiooni. Enamlevinud markeriteks on *E.coli* β -galaktosidaas ja GFP (green fluorescent protein) (Soriano, 1999).

3. Neuraalharja transgeensed markerid

3.1.1. Transgeen *Cx43-LacZ*

Esimene transgeenne hiireliin *Cx43-LacZ* südame NH rakkude ja nende derivaatide tuvastamiseks sisaldas *konneksiin-43 (Cx43)* 6,5 kb suurust promootorjärjestust, mille külge oli lisatud bakteriaalne *LacZ* geen (Lo et al., 1997). Konstrukti oli lisatud ka tuumalokalisatsiooni signaal (nls), mis β -galaktosidaasi histokeemilisel värvimisel annab histoloogilisel lõigul hästi lokaliseeritava tuuma värvumise. Juhuslikult avastati, et selle transgeeni avaldumismuster sarnanes NH rakkude paigutusega lindudes. *LacZ* avaldus NH rakkudes piki kogu embrüo kraniokaudaalset telge, kaasaarvatud südame NH. Edasised süstitimiskatsed kultiveeritud E8,5 arengupäevaste embrüotega tõestasid, et NH rakud on ühendatud funktsioneerivate aukliidustega (Lo jt., 1999). Südame NH derivaatide osas tehti võrdlev analüüs kana-vutt kimääridega, mis näitas tõepoolest, et märgistunud olid kõik teadaolevad südames paiknevad NH päritoluga rakud (Waldo et al., 1999).

3.1.2. Konneksiinide perekonna transkriptsioonifaktorid

Valguperekonda konneksiin kuuluvad transmembraansed valgud, mis selgroogsetes moodustavad aukliiduseid (Evans ja Martin, 2002). Kuna aukliiduseid on tuvastatud embrüogeneesi varajases staadiumis, siis omistatakse neile oluline roll informatsiooni vahendamisel arenguprotsessis (Huang jt., 1998). Membraankanalitena tagavad aukliidused ionide, väikeste molekulide ja sekundaarsete metaboliitide liikumise rakust rakku (Bruzzone jt., 1996). Iga konneksiin sisaldab nelja transmembraanset (M1-M4), kahte rakuvälist (E1-E2) ning kolme tsütoplasmaatilist regiooni. Iga ekstratsellulaarne piirkond sisaldab konserveerunud positsioonides tsüsteiinijääke, mis moodustavad tsütoplasmaatilisel poolel disulfiidsildasid, mis

ühendavad rakuväliseid regioone. Konneksiini valkude õige topoloogia tagab plasmamembraani läbiva ühenduse (Leube., 1995). Kui kahe külgneva raku konneksonid ehk poolaukliidusest, paiknevad kohakuti, siis moodustub kanal, mis ühendab rakkude tsütoplasmat.

Definiitiivse südame müokardis vahendavad aukliidused elektriliste impulsside ülekannet, koordineerides südamerütmi kujunemist ning kodade ja vatsakeste, kui autonoomsete üksuste, kontraktsiooni sünkroonsust. Südames on levinumad kolm aukliiduseid moodustavat valku – konneksiin-43 (Cx43), konneksiin-40 (Cx40), konneksiin-45 (Cx45), mida transleeritakse südame eri piirkondades eri ulatuses. Kõige levinumaks aukliidust moodustavaks valguks südames on konneksiin-43, esinedes nii kodades kui ka vatsakeses (Lo, 2000).

Hiire embrüonaalses arengus algab Cx43 valgu translatsioon blastotsüsti staadiumis, muutudes hilisemas arengujärgus koe- ja organspetsiifilisemaks. Alates organogeneesi varajastest staadiumidest esineb Cx43 silmaläätses, reetinas, neerus, käbinäärmes ja ajuriptatsis (Yancey jt., 1992). *In situ* hübridiseerimisega on näidatud Cx43 mRNA avaldumist neuraalharja tekkimise piirkonnas hiire arenguperioodil E8,0 - 8,5 (Lo jt., 1997). Kuigi *Cx43-LacZ* avaldub tugevalt südame väljavoolukulga mesenhüümis arenguperioodil E9,5-10,5 (Lo jt., 1997; Waldo jt., 1999), ei ole seal detekteeritud mRNA-d ega valku. *In situ* hübridiseerimise signaal saab märgatavaks vatsakestes E10,5 ja muutub intensiivseks E12,5, teistes südame piirkondades jääb see kas väga nõrgaks, või ei ületa taustvärvumist (Ruangvoravat ja Lo, 1992). Konfokaalmikroskoobi abil detekteeritav Cx43 valku näitav immuonofluorestsents ilmub vatsakestesse embrüonaalsel arengupäeval 10,0 ja kodadesse arenguperioodil E13-13.5 (Yancey jt., 1992).

Konneksiin-43 on elulise tähtsusega valk. Cx43 homosügootne mutatsioon ei ole küll embrüonaalselt letaalne, kuid hiired surevad peale sünni südamepuudulikkuse tagajärjel. (Lo jt., 1999). Kuigi Cx43 homosügootsel mutantel hiirel esinevad häired nii tüümuse kui ka ganglionide arengus, peetakse surma peamiseks põhjuseks pulmonaalse väljavoolukulga arenguhäiret (Lo jt., 1999). Vaatamata sellele, et homosügootsete mutantide surma põhjuseks peetakse väljavoolukulga defekti, ei avaldu Cx43 märkimisväärsel hulgal väljavoolukulglas (Kirby ja Waldo, 1995). Samas kardiaalsetes NH rakkudes avaldub Cx43 (Lo jt., 1999) ning nemad omavad olulist rolli väljavoolukulga moodustamises (Kirby ja Waldo, 1995). NH rakud migreeruvad oma algsest positsioonist rakugruppidena areneva väljavoolukulga piirkonda ning Cx43 ekspressiooni tase on ilmselt oluline, et tagada selleks migratsiooniks vajalike aukliiduste arv, kuna see mõjutab osteselt migreeruvate südame NH rakkude populatsiooni suurust (Lo jt., 1999). Seega südame arenguhäired tekivad nii Cx43 üle-, alaekspressioonil, kui ka täielikul puudumisel (Ewart jt., 1997). Arvatakse, et aukliidused võivad mõjutada südame arenemist,

kontrollides südame arengus oluliste NH rakkude arvu ning aktiivsust. (Lo jt., 1999). *Cx43-LacZ* heterosügootsetel hiirtel esinevad südame defektid, mis ei ole letaalsed (Huang jt., 1998).

3.2.1. Transgeenid *Pax3-LacZ* ja *Pax3-Cre*

Pax3 geen sattus tähelepanu alla tänu *Spotch* mutatsiooni uuringutele. *Spotch* lookuses võib olla viis erinevat mutantset alleeli, millega kaasneb *Pax3* mutatsioon (Sp , Sp^d), geenisisene (Sp^{2H}) või täielik deletsioon (Sp^r , Sp^{4H}) (Epstein jt., 1993, Goulding jt., 1993, Vogan jt., 1993). *Spotch* (Sp^{2H}) homosügootsel mutantsel hiirel kirjeldati lisaks harkelundi, kilpnäärme ja kõrvakilpnäärme arenguhäiretele ka püsivat arteriaaltüve (*persistent truncus arteriosus*, PTA) (Gonway jt., 1997). *Spotch* homosügootsed mutantsed hiire embrüod surevad südamedefektide tulemusena arengupäeval 14,0 (L jt., 1999). Sarnased südamedefektid kaasnevad NH eemaldamisega kana embrüos. Seepärast arvati, et *Spotch* mutantne hiiremudel võib esindada NH rakkude migratsiooni häireid imetajas (Conway jt., 1997).

Kõigepealt konstrueeriti analoogiliselt *Cx43-LacZ*-le transgeen *Pax3-LacZ*, milles bakteriaalne *LacZ* oli *Pax3* 1,6 kb promootorjärjestuse kontrolli all (Li jt., 1999). β -galaktosidaasi värvusreaktsioon lokaliseerus hiire embrüonaalsel arengupäeval 11,5 dorsaalses neuraaltorus ja spinaalganglionides, värvumata jäid somiidid, mis on tediaolevalt mitteneuraalse päritoluga *Pax3* ekspressiooni piirkond (Goulding jt., 1991). Seega oli eeldatavasti NH spetsiifilisus selle transgeeni avaldumismustril olemas, kuid *LacZ* geen ei avaldunud lõpusekaartes ja väljavoolukulglas, kuhu südame NH rakud migreeruvad. Ka selgus, et endogeenne *Pax3* reguleeritakse alla südame NH rakkude migratsiooni käigus, mida näitab tema transkripti ja valgu puudumine lõpusekaartes ja väljavoolukulglas (Epstein jt., 2000). Edasi kasutati Cre-lox strateegiat. Sama *Pax3* 1,6 kb promootorjärjestuse kontrolli alla viidi viiruse *Cre* ja saadi *Pax3-Cre* hiireliin (Epstein jt., 2000). Kui seda hiireliini ristata Cre-reporterhiirega saadakse transgeenne hiir, kelle rekombinatsiooni läbi teinud rakud ja nende järglased jäävadki β -galaktosidaasi sünteesima sõltumata endogeense *Pax3* ekspressiooni allareguleerimisest. Seega saadi eluaegselt avalduv märgis, mis võimaldab identifitseerida nii NH rakkusid kui ka nende järglasi. *Pax3-Cre/ROSA26* transgeenses hiire embrüos migreeruvad märgisega rakud, nagu NH rakudki, läbi 3., 4., 6. lõpusekaare. Lisaks sellele detekteeriti märgisega rakke E10,5 südame väljavoolukulglas, neuraaltorus, spinaalganglionides ning hilisemas arengus aordi, tema harude, arterioosjuha ja kopsuarterite silelihastes (Li jt., 2000). Kõik need kohad vastavad eeldatavate NH rakkude paiknemisele. Üllatav oli aga ribikõhre värvumine.

3.2.2. Pax-perekonna transkriptsioonifaktorid

Transkriptsioonifaktorite perekonda *Pax* kuuluvad geenid omavad arengus olulist rolli koospetsiifiliste transkriptsiooni regulaatoritena. Seda perekonda iseloomustab unikaalne DNA sidumisjärjestus (Chalepakidis jt., 1991, Treisman jt., 1991). Kuna N-terminus on enam konserveerunud kui C-terminus, siis arvatakse, et järjestust äratundev regioon asub C-terminuses (Vogan ja Cros, 1997). Esimesena identifitseeriti *Pax* geen *Drosophilas* ning hiljem on leitud mitmeid homolooge nii selgrootutes kui ka selgroogsetes. Hiires on esindatud üheksa *Pax* geeniperekonna liiget *Pax1-Pax9* (Wallin jt., 1993). *Pax* transkriptsioonifaktorite klassifikatsiooni aluseks on obiligatoorse paarilise domeeni, lisa oktapeptiidi ning täieliku või osalise homodomeeni esinemine (Callaerts jt., 1997). Uurimused erinevate *Pax* geenide ekspressioonimustrite kohta hiires ja teistes mudelorganismides viitavad nende suurele osalusele organogeneesis. *Pax* geenid omavad olulist rolli kesknärvisüsteemi, neerude, meeelundite, pankrease, kilpnäärme, harkelundi, kõrvalkilpnäärme ning lihaste moodustumisel (Wher ja Gruss, 1996, Mansouri jt., 1994; Dahl jt., 1997; Terzic jt., 1998).

Pax3 ekspressioon algab *wild-type* hiire embrüos neuraaltoru dorsaalses osas NH rakkude eraldumise piirkonnas E8,5 (Goulding jt., 1991). Kohe peale seda ilmub transkript somiitide eelsesesse mesodermi. Edasi säilib ekspressioon eelmisest tekkivas külgmises dermatomüotoomis ja sellest omakorda tekkivates hüpaksiaalsetes lihastes (Tassabehji jt., 1992). Alates E14,0 kaob *Pax3* transkript kogu embrüost ja ilmub uuesti küpsetes Schwanni rakkudes (Kioussi et al., 1995).

Hiire embrüonaalsel arengupäeval 9,5 on *Pax3* mRNA NH rakkudes vaevalt detekteeritav. E10,5-ks on *Pax3* geeni ekspressioon tuvastatav juba märkimisväärsel tasemel. Kuna eelnevate uurimuste kohaselt migreeruvad hiire NH rakud südamesse E10,5, siis järeldati, et migreeruvates südame NH rakkudes avaldub *Pax3* enne väljavoolukulglasse jõudmist (Conway jt., 1997).

3.3.1. *Wnt1-Cre* transgeen

Wnt1-LacZ transgeenses hiires on *LacZ* ekspressioon *Wnt1* 5,5kb promootorjärjestuse kontrolli all (Echelard jt., 1994) β -galaktosidaasi värvusreaktsioon histoloogilisel lõigul detekteeriti neuraalplaadis, neuraaltoru dorsaalses piirkonnas ning migratsiooni alustvates NH rakkudes. Kuid *LacZ* geen ei avaldunud NH derivaatides. Selgus, et NH rakkudes kaob *Wnt1* geeni ekspressioon, kui NH rakud migreeruvad neuraaltorust. Edasises arengu käigus ei avaldu

Wnt1 NH rakkudes ega ka NH derivaatides (Echelard jt., 1994). Seega, *Wnt1-LacZ* transgeen ei taga vajalikku märgistust NH rakkude morfogeneesi uurimiseks.

Wnt1-Cre transgeen konstrueeriti analoogiliselt *Pax3-Cre*-le. *Wnt1-Cre* hiirelin saadi viiruse *Cre*-rekombinaasi ekspressiooni viimisel *Wnt1* 5,5kb promootorjärjestuse kontrolli all (Danielian jt., 1998). Seda hiirelini ristati *Cre*-reporterhiirega ning saadi transgeenne hiir, kelle rekombinatsiooni läbinud rakud ja nende järglased sünteesivad β -galaktosidaasi sõltumata *Wnt1-Cre* transgeeni aktiivsusest (Jiang jt., 2000). Kana-vuti kimäärides ja imetajas tehtud katsete põhjal loodeti, et märgistatud rakud, mis pärinevad NH-st, on detekteeritavad hiire embrüonaalses arengus ning ka sünnijärgselt. Spinaalganglioni, perifeerse närvisüsteemi, melanotsüütide, neerupealiste säsi ning näokolju mesenhüümi märgistus viitab piki embrüonaaltelge toimunud rekombinatsioonile *R26R* reportergeenis. Lisaks puudus uuritud arenguperioodidel mittspetsiifiline ekspressioon ektodermis, endodermis, endoteelis, epiteelis, seljakeelikus ning seda ümbritsevas mesodermis (Jiang jt., 2000). Seega NH rakud ning nende järglased on detekteeritavad eluaegse märgisega.

Wnt1-Cre/ROSA26 transgeenses hiire embrüos migreeruvad märgisega rakud 3., 4., 6., lõpusekaarde. Lisaks on märgisega rakud detekteeritavad hiire embrüonaalsel arengupäeval 10,5 väljavoolukulglas (Jiang jt., 2000). *Wnt1-Cre* transgeense hiire aortikopulmonaalvaheseinas ja konotrunkaalpadjandite mesenhüümis esines märgatavalt intentsiivsem märgis, kui detekteeriti *Cx43-LacZ* hiires (Waldo jt., 1999, Jiang jt., 2000). Samas rakkude väljavoolukulglasse jõudmise ajastus ja paiknemine on kooskõlas NH rakkude omaga. Sarnaselt kana-vuti kimääridega tuvastati *Wnt1-Cre* transgeenses hiires märgisega rakke arterioosjuhas, aordikaares, õlavarrepeatüves ja paremas ja vasakus ühisunearteris. Lisaks on tähistatud ka tõusev aort ja kopsutüvi ning väljavoolukulglaapid (Jiang jt., 2000). Saadud tulemused on kooskõlas kana-vuti kimäärides tuvastatud südame NH rakkude paiknemisega (Waldo jt., 1998, Waldo jt., 1999). Pärgararterite seintes esinenud märgis oli üllatav, kuna kana-vuti kimäärides pole seda tuvastatud (Jiang jt., 2000, Waldo jt., 1998).

3.3.2. Wnt-perekonna transkriptsioonifaktorid

Wnt transkriptsioonifaktorite perekonda kuuluvad sekreteeritavad glükoproteiinid, mis omavad olulist rolli selgroogsete embrüogeneesis, reguleerides rakkude proliferatsiooni, migratsiooni, apoptoosi ning histo- ja organogeneesi. (Dale, 1998, Wodarz ja Nusse, 1998). Wnt

signalisatsioon on keskse tähtsusega kesknärvinärvisüsteemi, rinnanäärmete, maksa, platsenta, juuste, hammaste ning südame-veresoonkonna arengus (Uustalo jt., 1999).

Wnt1 ja *Wnt3a* avalduvad NH rakkudes neuraaltoru moodustumise perioodil (Dorsky jt., 1998). *Wnt1/Wnt3a* defektsetel homosügootsetel mutantsetel hiirtel esinevad NH derivaatide arenguhäired. Arvatakse, et see pole tingitud NH rakkude migratsiooni ega diferentseerumise häiretest, vaid pigem presumptiivsete NH rakkude ekspansiooni puudulikkusest neuraaltorus (Ikeya jt., 1997).

4.1. Gata3 osaleb südame väljavoolukulga arengus

Kirjanduses on vähe andmeid transkriptsioonifaktor Gata3 osalemise kohta südame arengus. Esimest korda nimetati südant *Gata3* ekspressiooni kohana 1994. aastal, mil ülevaatlilik ekspressiooniuurimus näitas radioaktiivse *in situ* hübridiseerimisega, et *Gata3* geenil on avaldumiskohad ka embrüonaalses südames (George jt., 1994). Edasi leidsid Lakshmanan ja kaasautorid, et *Gata3* promootoris on regioon, mis võib reguleerida selle geeni ekspressiooni embrüonaalse südame endokardis (Lakshmanan jt., 1999).

Meie töögrupp on näidanud, et nii endogeense *Gata3* kui ka *Gata3-LacZ* ekspressioon südames saab alguse hiire embrüonaalsel arengupäeval 9,5 väljavoolukulglas (Raid jt., 2008). Arenguperioodil E10.5-E11.5 on ekspressioon kõige intensiivsem, esinedes rikkalikult väljavoolukulgla endokardiaalse padjandi rakkudes ja lõpusekaarte mesenhüümis. Edasi endogeene *Gata3* reguleeritakse alla, *Gata3-LacZ* aga avaldub üleneva aordi ja aordikaare, temast lähtuvate õlavarre-peatüve ja parema ühisunearteri, vasaku ühisunearteri, kopsutüve ja arterioosjuha silelihasrakkudes ning poolkuuklappides. Niisugune ekspressioonimuster kattub peamiste transgeensete NH markerite ekspressioonimustriga (Epstein jt., 2000; Jiang jt., 2000; Waldo jt., 1999), sisendades β -galaktosidaas-positiivsete rakkude neuraalharja päritolu. Kõige otsesem tee selle selgitamiseks on kolokalisatsioonikatsete läbiviimine.

Homosügootsed mutantsed *Gata3-LacZ/LacZ* hiire embrüod surevad hiljemalt E12.0 vanuselt (Pandolfi jt., 1995). Peamiseks embrüo surma põhjusteks on noradrenaliini vaegus sümpaatilises närvisüsteemis (Lim jt., 2000). Adrenergiliste retseptorite agonistide (Kaufman jt., 2003) lisamine tiinete emaste joogivette korvab noradrenaliini puudust ja pikendab embrüote eluiga kuni E18,5. Sellistel farmakoloogiliselt pikendatud elueaga hiire embrüotele arenevad välja definitiivsed südamed, millede kõige enamlevinumaks defektiks on vatsakestevahelise seina

defekt (VSD) koos püsiva arteriaaltüvega (PTA) (Raid jt., 2008). Just need defektid esinevad 90% linnu embrüotel, kellel on eemaldatud südame neuraalhari (Kirby ja Waldo, 1995).

4.2. Gata transkriptsioonifaktorid

Transkriptsioonifaktorite perekonna Gata moodustavad valgud, mis sisaldavad kahte „tsinksõrme“ motiivi ning DNA-ga seostumis konsensusjärjestust (A/T)GATA(A/G), mille järgi on nad ka oma nime saanud (Ko ja Engel, 1993). Ekspressioonimustri alusel on Gata faktorid jaotatud kahte alam perekonda, vastavalt Gata1, Gata 2, Gata 3 ja Gata 4, Gata 5, Gata 6. Gata1, -2, ja -3 omavad olulist rolli ja avalduvad peamiselt hematopoeetilistes tüvirakkudes, reguleerides T-lümfotsüütide, erütrotsüütide ja megakarüotsüütide diferentseerumisest (Molkentin, 2000). Gata4,-5, -6 avalduvad mesodermi ja endodermi derivaatides nagu süda, kops, maks, gonaadid ja sool, kus nad on olulised koespetsiifilise geeniekspressiooni regulaatorid (Technau ja Scholz, 2003).

Andmed *Gata3* ekspressioonist vereloomega mitte seotud kudedes ja organites hägustab eelpool mainitud klassifikatsiooni.. Juba E10,0 arengupäeva vanuses hiire embrüos avaldub *Gata3* geen tsentraalses ja perifeerses närvisüsteemis, neerus, neerupealistes, harkelundi alges ning arenevas silmas (George jt.,) .Lisaks avaldub *Gata3* geen ka sisekõrvas (Lilleväli jt., 2004). Hilisemas arengus, E11,0 vanuselt on ekspressiooni detekteeritud ka maksas (George jt., 1994). ja pärisnahas (Kaufman jt., 2003)

Arutelu

Käesoleva bakalaureusetöö teema valiku tingisid arengubioloogia õppetoolis saadud andmed, et endogeense *Gata3* (E9,5-11,5) ja *Gata3-LaZ* (E9,5 kuni sünnini) ekspressioonimuster (Raid jt., 2008) ühtib põhijoontes transgeensete NH markerite ekspressioonimustriga südames (Epstein jt., 2000; Jiang jt., ., 2000; Waldo jt., 1999). Selline suur kattumine ekspressioonimustrites virgutab hüpoteesi, et vähemal või rohkemal määral avaldub *Gata3* südames just NH-st pärit rakkudes. Selgust aitaks tuua rakutüübispetsiifiliste markerite ilmutamine koos *Gata3*-ga ja nende kolokalisatsiooni analüüs. Nagu me kirjanduse ülevaates näitasime, on hiire südame NH ja tema derivaadid defineeritud just transgeensete markerite kaudu. *Pax3*, *Wnt1*, *Cx43* mRNA ja valgu avaldumine ei peegelda NH päritolu südames, vastupidi, enamikel juhtudel on näidatud, et nad kas puuduvad täiesti NH derivaatidest või on nende hulk allapoole usaldusväärset detekteerimistaset (Conway jt., 1997, Lo jt., 1997, Echelard jt., 1994). Seega on need geenid markergeenidena kasutatavad ainult transgeensete hiireliinide olemasolul. Kui valida, kas regulaatorjärjetuse kontrolli alla on õigem viia *LacZ* või *Cre*, siis eelistada tuleks viimast. Nii *Wnt1* kui ka *Pax3* regulaatorjärjestusi sisaldavate transgeenide puhul tehti enne *Cre* hiireliini *LacZ* hiireliin (Lo jt., 1997, Echelard jt., 1999), kuid mõlemal juhul ei avaldunud märgis südame NH-st pärit rakkudes.

Meil on edaspidiseks tööks olemas *Cx43-GFP-Cre* hiireliin, milles on *Cx43* 6,5 kb suuruse promootorjärjestuse kontrolli alla pandud lisaks *Cre*-le ka *GFP* (Green Fluorescent Protein). Võimalike katsete planeerimisel lähtumegi sellest hiireliinist.

1. Lihtsaimaks märkimiskeemiks on *Gata3* immuunohistokeemiline ilmutamine *Cx43-Cre-GFP* hiireliinis punase fluorestseeruva märgisega (näiteks, Texas Red). *GFP* transleeritakse samaaegselt endogeense *Cx43*-ga. Kui *Gata3* ja *Cx43* kolokaliseeruvad, on tulemuseks oranži värv, kui mitte, siis vastavalt, kas roheline või punane helendus. Selle skeemi tugev külg on transkriptsioonifaktori *Gata3* vahetu detekteerimine. Nõrkuseks võib osutuda *Gata3* valgu madal kontsentratsioon rakkudes.

2. Alternatiivse märkimiskeemi annab ristani *Cx43-Cre-GFP/Gata3-LacZ* kasutamine. Näiteks, anti-*Cre* või anti-*GFP* ensüümkonjugaadiga märkimine ja hilisem järjestikune ilmutamine X-gal'i ja Fast Red'ga (aluselise fosfataasi korral). Selle märkimisviisi tugevuseks võib pidada asjaolu, et transgeenid avalduvad rakkudes enamasti dekteeerimiseks piisaval määral ja et *Gata3-LacZ* leidub ka nendes rakkudes, milles endogeenne *Gata3* on allareguleeritud. Seega saame skriinida ka definitiivseid kudesid südame vaheseintes ja klappides ning silelihasrakke

veresoontes. Nõrkuseks on aga võimalus, et *Gata3-LacZ* avaldub ka siisugustes rakkudes ja nende järglastes, kus endogeenne *Gata3 in vivo* ei ole avaldunud ja ei avaldu.

3. Tulemuslik võib olla ka samaaegne β -galaktosidaasi värvimine ja *Gata3* mRNA ilmutamine *in situ* hübriidsatsiooniga ristandis Cx43-Cre-GFP/Rosa26. See on alternatiiv esimesele skeemile, kui *Gata3* valgu detekteerimine immuonofluorestsentsiga ebaõnnestub.

Kokkuvõte

Töös käsitletakse hiire neuraalharja ja selle derivaatide transgeensete markergeenide *Pax3-Cre*, *Wnt1-Cre* ja *Cx43-LacZ* molekulaargeneetilist olemust ja nende ekspressioonimustreid südames. Vaatamata väikestele erinevustele langeb ekspressioonimuster südames ja suurtes veresoontes kokku nii omavahel kui ka etalonina kasutatud vutt-kana transplantatsioonikimäärade südame neuraalharja derivaatide kaardiga. Kardiaalse neuraalharja rakud migreeruvad läbi 3.,4.,6. lõpusekaare südame väljavoolukulglasse, kus nad osalevad vatsakete vaheseina ning aordi ja kopsutüve proksimaalse vaheseina moodustumises. Hiljem avalduvad transgeensed markerid üleneva aordi ja aordikaare, temast lähtuvate õlavarre-peatüve ja parema ühisunearteri, vasaku ühisunearteri, kopsutüve ja arterioosjuha silelihasrakkudes ning poolkuuklappides. Niisugune ekspressioonimuster sarnaneb arengubioloogia õppetoolis uuritava *Gata3* ekspressioonimustriga südames ja temast lähtuvates suurtes veresoontes. Arutelus pakutakse välja kolm erinevat *Cx43-Cre-GFP* hiireliinil põhinevat *Gata3* ja *Cx43-Cre-GFP* koekspressiooni analüüsi skeemi, näitamaks *Gata3* valgu, mRNA ja *Gata3-LacZ* olemasolu südame neuraalharja rakkudes ja nende derivaatides.

Summary

Neural crest transgenic markers in mouse heart development

In this report the expression patterns of the mouse transgenic marker genes *Pax3-Cre*, *Wnt1-Cre* and *Cx43-LacZ* are analysed in the cardiac neural crest and their derivatives. Despite a minor ectopic expression they are useful for revealing the neural crest cell and their derivatives in the mouse heart and great outflow vessels as been supported also by quail-chick chimeras transplantation experiments. Cardiac neural crest cells migrate through the pharyngeal arches 3, 4 and 6 to populate the cardiac outflow tract, where they contribute to the proximal septum between aorta and pulmonary trunk and interventricular septum. Further, the cardiac neural crest cells contribute to the semilunar valves and smooth muscle of the ascending aorta, aortic arch, pulmonary trunk, ductus arteriosus, right and left carotid arteries and artery innominata. Described expression pattern closely coincides to the *Gata3* expression pattern examined by us in the mouse heart and great outflow vessels. To demonstrate *Gata3* protein, mRNA and *Gata3-LacZ* localisation in the cardiac neural crest cells and their derivatives we propose three coexpression analysis schemes based on a new *Cx43-Cre-GFP* transgenic mouse line.

Tänuavaldused

Tänan oma juhendajat Raivo Raidi juhendamise ja huvitava teema eest. Suured tänud Merly Malvale asjakohaste nõuannete eest. Suur aitäh laboriseltskonnale mitmekülgse abi ja meeldiva aasta eest.

Kirjanduse loetelu

Bockman, D.E. and Kirby, M.L. (1984). Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science*. 223: 498-500.

Burns, A.J. and Le Douarin, N.M.(2001). Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat. Rec.* 262: 16-28.

Bronner-Fraser, M. (1995). Origins and developmental potential of the neural crest. *Exp. Cell Res.* 218: 405-417.

Bruzzone, R., White, T.W., and Paul, D.L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238: 1-27.

Callaerts, P., Halder, G. and Gehring, W.J. (1997). Pax-6 in development and evolution. *Annu. Rev. Neurosci.* 20:483-532.

Chalepakis, G., Jones, F.S., Edelman, G.M. and Gruss P. (1994). Pax-3 contains domains for transcription activation and transcription inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 12745-12749.

Cammill, L.S. and Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 795-805.

Conway, S.J., Henderson, D.J. and Copp, A.J. (1997). Pax3 is required for cardiac neural crest migration in the mouse: evidence from the *spotch* (Sp2H) mutant. *Development*. 124: 505-514.

Couly, G., Grapin-Botton, A., Coltey, P. and Le Douarin, N. M. (1996). The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited: the regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior and posterior neural fold. *Development*. 122: 3393-3407.

- Dahl, E., Koseki, H. and Balling, R. (1997). Pax genes and organogenesis. *Bioessays*. 19:755-765.
- Dale, T.C. (1998). Signal transduction by the Wnt family ligands. *Biochem. J.* 329: 209-223.
- Death, Migration, and Function During Vertebrate Embryogenesis. *Dev. Dyn.* 229: 14-29.
- Dorsky, R.I., Moon, R.T., and Raible, D.W. (1998). Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature*. 396: 370-373.
- Dupin, E., Calloni, G., Real, C., Gonçalves-Trentin, A. and Le Douarin, N.M. (2007). Neural crest progenitors and stem cells. *C. R. Biol.* 330: 521-529.
- Dupin, E., Real, C. and Le Douarin, N. (2001). The neural crest stem cells: control of neural crest cell fate and plasticity by endothelin-3. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73: 533-545.
- Echelard, Y., Vassileva, G. and McMahon, A.P. (1994). Cis-acting regulatory sequences governing Wnt-1 expression in the developing mouse CNS. *Development*. 120: 2213-2224.
- Epstein, J.A., Li, J., Lang, D., Chen, F., Brown, C.B., Jin, F., Lu, M.M., Thomas, M., Liu, E. and Wessels, A.C.W. (2000). Migration of cardiac neural crest cells in *Spotch* embryos. *Development*. 127: 1869-1878.
- Epstein, D.J., Vogan, K.J., Trasler, D.G., and Gros, P. (1993). A Mutation within Intron 3 of the Pax-3 Gene Produces Aberrantly Spliced mRNA Transcripts in the *Spotch* (Sp) Mouse Mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90: 532-536.
- Ewart, J.L., Cohen, M.F., Meyer, R.A., Huang, G.Y., Wessel, A., Gourdie, R.G., Chin, A.J., Park, S.M., Lazatin, B.O., Villabon, S. and Lo, C. W. (1997). Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. *Development*. 124: 1281-1292.

George, K.M., Leonard, M.W., Roth, M.E., Lieuw, K.H., Kioussis, D., Grosveld, F. and Engel, J.D. (1994) Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development* 120: 2673-86.

Goulding, M.D., Lumsden, A. and Gruss, P. (1993). Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development*. 117: 1001-1016

Goulding, M., Sterrer, S., Fleming, J., Balling, R., Nadeau, J., Moore, K.J., Brown, S.D., Steel, K.P. and Gruss, P. (1993). Analysis of the Pax-3 gene in the mouse mutant *splotch*. *Genomics*. 17: 355-363.

Harris, M.L. and Erickson, C.A. (2007). Lineage spetsification in neural crest cell pathfinding. *Dev. Dyn.* 236: 1-19.

Huang, G.Y., Cooper, E.S., Waldo, K., Kirby, M.L., Gilula, N.B. and Lo CW. (1998). Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *J. Cell. Biol.* 143: 1725-1734.

Huang, X. And Saint-Jeannet, J.P. (2004). Induction of the neural crest and opportunities of life on the edge. *Dev. Biol.* 275: 1-11.

Hudson, M.R. and Kirby, M.L.(2007). Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 18: 101-110.

Ikeya, M., Lee, S.M., Johnson, J.E., McMahon, A.P., and Takada, S. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature*. 389: 966-970.

Ito, K., Morita, T. and Sieber-Blum, M. (1993). In vitro clonal analysis of mouse neural crest development. *Dev. Biol.* 157: 515-525.

- Jiang, X., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P. and Sucov, H.M. (2000) Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127: 1607-1616.
- Kaufman, C.K., Zhou, P., Pasolli, H.A., Rendl, M., Bolotin, D., Lim, K.C., Dai, X., Alegre, M.L. and Fuchs, E. (2003) GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev* 17: 2108-2122.
- Kirby, M.L. and Waldo, K.L. (1995) Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* 77: 211-215.
- Kuellsa, P., Ellies, D.L. and Trainor, P.A. (2004). Comparative Analysis of Neural Crest Cell death, migration, and function during vertebrate embryogenesis. *Dev. Dyn.* 229: 14-29.
- Lakshmanan, G., Lieuw, K.H., Lim, K.C., Gu, Y., Grosveld, F., Engel, J.D. and Karis, A. (1999) Localization of distant urogenital system-, central nervous system-, and endocardium-specific transcriptional regulatory elements in the GATA-3 locus. *Mol Cell Biol* 19: 1558-1568.
- Le Douarin, N.M. (2004). The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. *Mech. Dev.* 121: 1089-1102.
- Le Douarin, N.M., Creuzet, S., Couly, G. and Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development.* 131: 4637-4650.
- Le Douarin, N.M. and Dupin, E. (2003). Multipotentiality of the neural crest. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13: 529-536.
- Le Douarin, N.M. and Kalcheim, C. (1999). *The Neural Crest* (second edition). New York: Cambridge. University Press. 445p.
- Leube, R.E. (1995). The topogenic fate of the polytopic transmembrane proteins, synaptophysin and connexin, is determined by their membrane-spanning domains. *J.Cell. Sci.* 108: 883-894

- Li, J., Chen, F. and Epstein, J.A. (2000) Neural crest expression of Cre recombinase directed by the proximal Pax3 promoter in transgenic mice. *Genesis* 26: 162-4.
- Li, J., Liu, K.C., Jin, F., Lu, M.M. and Epstein, J.A. (1999) Transgenic rescue of congenital heart disease and spina bifida in *Spotch* mice. *Development* 126: 2495-503.
- Lim, K.C., Lakshmanan, G., Crawford, S.E., Gu, Y., Grosveld, F. and Engel, J.D. (2000) *Gata3* loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat Genet* 25: 209-212.
- Lo, C.W. (2000). Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circ. Res.* 87: 346-348.
- Lo, C.W., Cohen, M.F., Huang, G.Y., Lazatin, B.O., Patel, N., Sullivan, R., Pauken, C. and Park, S.M. (1997). *Cx43* gap junction gene expression and gap junctional communication in mouse neural crest cells. *Dev. Genet.* 20: 119-132.
- Lo, C.W., Waldo, K.L. and Kirby, M.L. (1999). Gap junction communication and the Modulation on Cardiac Neural Crest Cells. *Trends. Cardiovasc. Med.* 9: 63-69.
- Mansouri, A., Stoykova, A. and Gruss, P. (1994). Pax gene in development. *J. Cell. Sci.* 18: 35-42.
- Martinsen, B.J., Groebner, N.J., Frasier, A.J., and Lohr, J.L. (2003). Expression of cardiac neural crest and heart genes isolated by modified differential display. *Gene. Expr. Patterns.* 3: 407-411.
- Monsoro-Burq, A.H., Fletcher, R.B. and Harland, R.M. (2003). Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals. *Development.* 130: 3111-3124.
- Mayor, R., Morgan, R. And Sargent, M.G. (1995) Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* . 121: 767-777.

- Nakamura, T., Colbert, M.C. and Robbins, J. (2006). Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system. *Circ. Res.* 98: 1547-1554.
- Nelson, W.J. and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*.303: 1483–1487.
- Nusse, R. And Varmus, H.E. (1992). Wnt genes. *Cell.* 69: 1073-1087.
- Pandolfi, P.P., Roth, M.E., Karis, A., Leonard, M.W., Dzierzak, E., Grosveld, F.G., Engel, J.D. and Lindenbaum, M.H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat. Genet.* 11: 40-44.
- Perez, S.E., Rebelo, S. and Anderson, D.J. (1999). Early specification of sensory neuron fate revealed by expression and function of neurogenins in the chick embryo. *Development.* 126: 1715-1728.
- Poelmann, R.E. and Gittenberger-de Groot, A.C. (1999). A subpopulation of apoptosis-prone cardiac neural crest cells targets to the venous pole: Multiple functions in heart development. *Dev. Biol.* 207: 271–286.
- Paratore, C., Hagedorn, L., Floris, J., Hari, L., Kléber, M., Suter, U. and Sommer, L. (2002). Cell-intrinsic and cell-extrinsic cues regulating lineage decisions in multipotent neural crest-derived progenitor cells. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 193-200.
- Raid, R., Krinka, D., Abdelwahid, E., Bakhof, L., Jokinen, E., Kärner, M., Malva, M., Meier, R., Pelliniemi, L.J., Ploom, M. and Karis, A. (2008) Lack of Gata3 results in conotruncal heart anomalies in mouse. *Mech. Dev.* (submitted).
- Ruangvoravat, C.P. and Lo, C.W. (1992) Connexin 43 expression in the mouse embryo: localization of transcripts within developmentally significant domains. *Dev. Dyn.* 194: 261-81.
- Waldo, K.L., Lo, C.W. and Kirby, M.L. (1999) Connexin 43 expression reflects neural crest patterns during cardiovascular development. *Dev. Biol.* 208: 307-23.

Sellec, M.A. and Bronner-Fraser, M. (1995). Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development*. 121: 525-538.

Snider, P., Olaopa, M., Firulli, A.B. and Conway, S.J. (2007). Cardiovascular Development and the Colonizing Cardiac Neural Crest Lineage. *ScientificWorldJournal*. 7:1090-1113.

Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 21 (1): 70-71.

Suzuki, H.R. and Kirby, M.L. (1997). Absence of neural crest cell regeneration from the postotic neural tube. *Dev. Biol.* 184: 222–233.

Tassabehji, M., Read, A.P., Newton, V.E., Harris, R., Balling, R., Gruss, P., Strachan, and T. (1992). Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature*. 355: 635-636.

Terzic, J., Muller, C., Cajovic, S. and Saragababic, M. (1998). Expression of Pax-2 gene during human development. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 701-707.

Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15: 740-746.

Treisman, J., Harris, E. And Desplan C. (1991).The paired box encodes a second DNA-binding domain in the Paired homeo domain protein. *Genes. Dev.* 5: 594-604.

Vogan, K.J., Epstein, D.J., Trasler, D.G. and Gros, P. (1993). The splotch-delayed (Spd) mouse mutant carries a point mutation within the paired box of the Pax-3 gene. *Genomics*. 17: 364-369.

Vogan, K.J. and Gros, P. (1997). The C-terminal subdomain makes an important contribution to the DNA binding activity of the Pax-3 paired domain. *J. Biol. Chem.* 272: 28289-28295.

Wehr, R. and Gruss, P. (1996). Pax and vertebrate development. *Int. J. Dev. Biol.* 40: 369-377

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U. and Söhl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383: 725-737.

Waldo, K.L., Lo, C.W. and Kirby, M.L. (1999). Connexin 43 expression reflects neural crest patterns during cardiovascular development. *Dev Biol.* 208: 307–323.

Waldo, K., Miyagawa-Tomita, S., Kumisik, D. and Kirby, M.L. (1998). Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: aortic sac to ventricular septal closure. *Dev. Biol.* 196: 129-144.

Wodarz, A. and Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev. Biol.* 14: 59-88.

Yancey, S.B., Biswal, S. and Revel, J.P. (1992) Spatial and temporal patterns of distribution of the gap junction protein connexin43 during mouse gastrulation and organogenesis. *Development* 114: 203-212.