

# **BMP UND SMAD SIGNALE IM KARDIOVASKULÄREN SYSTEM**

---

**INAUGURAL-DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES  
DOCTOR RERUM NATURALIUM  
(DR. RER. NAT.)

AN DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT IN GIESSEN  
FACHBEREICH 08 (BIOLOGIE UND CHEMIE)

VORGELEGT VON  
**SANDRA BÜCKER**  
GEB. AM: 25.08.1979 IN SCHWELM  
IM JANUAR 2011

DIESE ARBEIT WURDE AM  
**MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR HERZ- UND LUNGENFORSCHUNG**  
(W.G. KERCKHOFF INSTITUT)  
IN BAD NAUHEIM ANGEFERTIGT

DEKAN: PROF. DR. VOLKMAR WOLTERS  
1. GUTACHTER: PROF. DR. RAINER RENKAWITZ  
2. GUTACHTER: PROF. DR. DR. THOMAS BRAUN

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 11.03.2011

## Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Sandra Bucker

Bad Nauheim, den 14.01.2011

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>2</b>   | <b>EINLEITUNG: .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2.1</b> | <b>DIE TGF-<math>\beta</math> SUPERFAMILIE: .....</b>                                | <b>11</b> |
| 2.1.1      | TGF- $\beta$ REZEPTOREN.....   | 12        |
| 2.1.1.1    | Regulation der TGF $\beta$ -Rezeptor Aktivierung.....                                | 14        |
| 2.1.2      | DIE SMAD PROTEINE .....  | 15        |
| 2.1.2.1    | R-Smads und Co-Smad Smad4 .....  | 15        |
| 2.1.2.2    | I-Smads:.....  | 17        |
| 2.1.3      | SMAD UNABHÄNGIGE TGF- $\beta$ SIGNALWEGE UND CROSSTALKS .....                        | 18        |
| <b>2.2</b> | <b>DIE BEDEUTUNG DER BMPs FÜR DAS KARDIOVASKULÄREN SYSTEM .....</b>                  | <b>18</b> |
| 2.2.1      | DIE HERZENTWICKLUNG - EIN ÜBERBLICK .....  | 19        |
| 2.2.2      | DIE BMPs UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE HERZENTWICKLUNG .....                            | 22        |
| 2.2.2.1    | Bmp Knock-outs.....  | 24        |
| 2.2.2.2    | Bmp-Rezeptor Knock-outs.....   | 25        |
| 2.2.2.3    | Bmp-Rezeptoren TypII .....   | 25        |
| 2.2.2.4    | Bmp-Rezeptor TypI Knock-outs.....  | 29        |
| 2.2.3      | BMP10 - DIE HERZENSANGELEGENHEIT .....   | 32        |
| <b>2.3</b> | <b>ZIEL DIESER ARBEIT .....</b>  | <b>34</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAL &amp; METHODEN: .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>3.1</b> | <b>BAKTERIEN.....</b>  | <b>35</b> |
| 3.1.1      | LÖSUNGEN,REAGENZIEN UND MEDIEN.....  | 35        |
| 3.1.2      | VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME.....  | 35        |
| 3.1.3      | KULTIVIERUNGSVERFAHREN .....   | 36        |
| 3.1.4      | LAGERUNG.....  | 36        |
| 3.1.5      | TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN .....   | 36        |
| 3.1.5.1    | Herstellung elektrokompenter Bakterien.....  | 36        |
| 3.1.5.2    | Transformation elektrokompenter Bakterien.....                                       | 37        |
| <b>3.2</b> | <b>NUKLEINSÄUREN.....</b>  | <b>38</b> |
| 3.2.1      | LÖSUNGEN & REAGENZIEN .....  | 38        |
| 3.2.2      | PRIMER, OLIGOS UND PLASMIDE.....   | 39        |
| 3.2.3      | ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN.....  | 42        |
| 3.2.3.1    | Präparative Plasmid-Isolierung aus Escherichia coli (Mini-Präp).....                 | 43        |
| 3.2.3.2    | Analytische Plasmid-Isolierung aus Escherichia coli mittels kommerzieller Kits ..... | 43        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.2.3.3    | Speedprep Minipräparation .....   | 43        |
| 3.2.3.4    | BAC Isolierung aus Escherichia coli.....  | 44        |
| 3.2.3.5    | Präparation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen .....                       | 44        |
| 3.2.3.6    | Präparation genomischer Mausschwanz-DNA.....  | 44        |
| 3.2.3.7    | Präparation der Gesamt-RNA aus Mausgeweben und eukaryotischen Zellen .....          | 45        |
| 3.2.4      | KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄURELÖSUNGEN.....                              | 45        |
| 3.2.4.1    | Photometrische Konzentrationsbestimmung .....                                       | 45        |
| 3.2.4.2    | Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung.....                                    | 45        |
| 3.2.5      | MODIFIKATION VON NUKLEINSÄUREN .....  | 46        |
| 3.2.5.1    | Sequenzspezifische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen .....         | 46        |
| 3.2.5.2    | Dephosphorylierung von DNA.....   | 46        |
| 3.2.5.3    | Annealing, Phosphorylierung und Klonierung von synthetischen Oligonukleotiden ..... | 46        |
| 3.2.5.4    | Anwendungen des Klenow Fragments .....  | 47        |
| 3.2.5.5    | Ligation von DNA-Fragmenten.....  | 47        |
| 3.2.5.6    | Recombineering basierte Methode zur Modifizierung von Vektoren.....                 | 47        |
| 3.2.6      | AUFREINIGUNG VON DNA.....   | 48        |
| 3.2.6.1    | Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung.....                               | 48        |
| 3.2.6.2    | Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....                           | 48        |
| 3.2.6.3    | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Gelelution) .....                   | 49        |
| 3.2.6.4    | Aufbereitung rekombinanter BAC-DNA für Pronukleus Injektionen.....                  | 49        |
| 3.2.7      | POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....  | 51        |
| 3.2.7.1    | RT-PCR (Reverse Transkription).....   | 51        |
| 3.2.8      | SEQUENZIERUNGEN MIT ABI PRISM™-SYSTEM 310.....                                      | 52        |
| 3.2.9      | SOUTHERN BLOT: IDENTIFIZIERUNG UND ANALYSE KLONIRTER DNA.....                       | 52        |
| 3.2.9.1    | Restriktionsenzymatische Spaltung genomischer DNA und Gelelektrophorese .....       | 53        |
| 3.2.9.2    | Southern Blot auf eine Nylonmembran mit einem Hochsalz-Puffer:.....                 | 53        |
| 3.2.9.3    | DNA-Sondenmarkierung und Hybridisierung.....  | 53        |
| 3.2.10     | GENEXPRESSIONSANALYSEN MITTELS DNA ARRAY .....                                      | 54        |
| <b>3.3</b> | <b>PROTEINE – EXTRAKTION, AUFTRENNUNG UND IMMUNODETEKTION .....</b>                 | <b>54</b> |
| 3.3.1      | LÖSUNGEN & REAGENZIEN .....   | 54        |
| 3.3.2      | PROTEINEXTRAKTION AUS MAUSGEWEBEN UND AUFBEREITUNG FÜR GELELEKTROPHORESE.....       | 55        |
| 3.3.3      | PROTEINBESTIMMUNG MITTELS BIORAD DC.....  | 56        |
| 3.3.4      | PROTEIN-GELELEKTROPHORESE .....   | 56        |
| 3.3.5      | WESTERNBLOT .....   | 57        |
| 3.3.6      | VISUALISIERUNG DER GEBLOTTEN PROTEINE MIT REDALERT™.....                            | 58        |
| 3.3.7      | IMMUNODETEKTION GEBLOTTETER PROTEINE.....   | 58        |
| <b>3.4</b> | <b>HERSTELLUNG EINES POLYKLONALEN MATBMP10 ANTIKÖRPERS.....</b>                     | <b>59</b> |
| <b>3.5</b> | <b>HISTOLOGISCHE TECHNIKEN.....</b>   | <b>60</b> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.5.1      | LÖSUNGEN & REAGENZIEN .....   | 60        |
| 3.5.2      | PARAFFINDÜNNNSCHNITTE .....   | 61        |
| 3.5.3      | KRYOSCHNITTE.....   | 62        |
| 3.5.4      | HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG (H&E-FÄRBUNG).....  | 62        |
| 3.5.5      | KERNFÄRBUNG MIT METHYLGRÜN .....  | 63        |
| 3.5.6      | LACZ-FÄRBUNG AUF KRYOSCHNITTEN LACZ TRANSGENER GEWEBE.....  | 63        |
| <b>3.6</b> | <b>IMMUNOHISTOCHEMISCHE TECHNIKEN .....</b>   | <b>64</b> |
| 3.6.1      | LÖSUNGEN & REAGENZIEN .....   | 64        |
| 3.6.2      | ANTIKÖRPERFÄRBUNG AUF PARAFFINDÜNNNSCHNITTEN MITHILFE DES ABC KITS.....   | 64        |
| <b>3.7</b> | <b>MANIPULATIONEN DES MODELLTIERS MAUS .....</b>  | <b>65</b> |
| 3.7.1      | VERWENDETE MAUSLINIEN.....  | 65        |
| 3.7.2      | EMBRYONALE STAMMZELLEN – KULTUR, TRANSFORMATION UND SELEKTION MURINER ES-ZELLEN<br>66   |           |
| 3.7.2.1    | Zellkulturmedien & Puffer .....   | 66        |
| 3.7.2.2    | Zellkulturreagenzien.....   | 67        |
| 3.7.2.3    | Zelllinien.....   | 67        |
| 3.7.2.4    | Mitomycin Behandlung embryonaler Maus-Fibroblasten Zellen.....  | 67        |
| 3.7.2.5    | Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen der Maus .....   | 68        |
| 3.7.2.6    | Vorbereitung der ES-Zellen für die Blastozysten-Injektion .....   | 68        |
| 3.7.3      | MURINE KRANKHEITSMODELLE .....  | 69        |
| 3.7.3.1    | Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie (Lungenhochdruck).....  | 69        |
| 3.7.3.2    | Die tranverse Aortenkonstriktion – Eine Druck-induzierte linksventrikuläre Hypertrophie.....                                    | 70        |
| 3.7.3.3    | Arteriogenese-Modell.....   | 71        |
| 3.7.4      | TAMOXIFEN INJEKTIONEN .....   | 72        |
| 3.7.5      | MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE (MRT).....  | 72        |
| <b>3.8</b> | <b>FOTODOKUMENTATION.....</b>   | <b>73</b> |
| <b>4</b>   | <b><u>ERGEBNISSE:</u>.....</b>  | <b>74</b> |
| <b>4.1</b> | <b>DIE GENERIERTEN BMP10-LACZ TRANSGENEN MAUSLINIEN (B10LAZ) MACHEN ZUSÄTZLICHE<br/>BMP10 EXPRESSIONSDOMÄNEN SICHTBAR .....</b> | <b>74</b> |
| 4.1.1      | DIE GENERIERUNG DER REPORTERMAUS BMP10-LACZ.....  | 74        |
| 4.1.2      | BMP10 WIRD IM VENTRIKULÄREN ENDOKARD ADULTER HERZEN EXPRIMIERT.....   | 76        |
| 4.1.3      | BMP10 WIRD WÄHREND DER EMBRYONALENTWICKLUNG AUCH AUßERHALB DES HERZENS<br>EXPRIMIERT.....                                       | 78        |
| <b>4.2</b> | <b>DER KONDITIONELLE BMP10 <i>KNOCK-OUT</i>.....</b>  | <b>81</b> |
| 4.2.1      | KLONIERUNG DES BMP10-ZIELVEKTORS .....  | 82        |
| 4.2.2      | HOMOLOGE REKOMBINATION DES BMP10-ZIELVEKTORS IN ES-ZELLEN.....  | 83        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.2.3      | ETABLIERUNG STABILER MAUSLINIEN MIT KONDITIONELLEM BMP10-ALLEL .....  | 85         |
| 4.2.4      | DIE EXON2 DELETION VERMITTELT EINEN FUNKTIONELLEN BMP10 KNOCK-OUT .....   | 86         |
| 4.2.5      | BMP10 <sup>LOX<sup>PNEO</sup></sup> MUTANTE MÄUSE ZEIGEN KEINEN PHÄNOTYP .....  | 86         |
| 4.2.6      | ATRIALES BMP10 HAT KEINE ESSENTIELLE KARDIALE FUNKTION .....  | 87         |
| 4.2.7      | DIE BEDEUTUNG DES ATRIALEN BMP10 FÜR PATHOLOGISCHE UMBAUPROZESSE .....  | 89         |
| 4.2.7.1    | Die Ausprägung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie oder die resultierende rechtsventrikuläre Hypertrophie bleibt durch den Verlust atrialen BMP10 unbeeinflusst ..... | 90         |
| 4.2.7.2    | BMP ist für die Arteriogenese ein wichtiger Effektor .....  | 91         |
| 4.2.7.3    | Der Verlust atrialen BMP10 hat keinen Effekt auf die TAC induzierte linksventrikuläre Hypertrophie.....   | 94         |
| 4.2.8      | DIE ROLLE VON BMP10 WÄHREND DER KARDIOGENESE.....   | 95         |
| 4.2.8.1    | Der Bmp10 Knock-out im postnatalen Herzen mithilfe der Ckmm-Cre Linie hat keinen Einfluss auf das kardiale Wachstum .....   | 95         |
| 4.2.8.2    | Das myokardiale BMP10 ist für die frühe Kardiogenese nicht essentiell .....   | 96         |
| 4.2.8.3    | Die mit der Nkx2.5-Cre überlappende Bmp10 Expression ist essentiell für die Kardiogenese .....  | 98         |
| 4.2.8.4    | Endokardiales Bmp10 ist für die Kardiogenese entbehrlich .....  | 98         |
| 4.2.8.5    | Die kardiale Bmp10 Expression in den $\alpha$ MHC-Cre und Tie2-Cre Expressionsdomänen ist für die frühe Herzentwicklung nicht essentiell .....                                  | 101        |
| <b>4.3</b> | <b>BMP10 FUNKTIONSGEWINNANALYSEN BESTÄRKEN EINE VASKULÄRE FUNKTION DES SEKRETIERTEN FAKTORS.....</b>  | <b>101</b> |
| 4.3.1      | DIE EKTOPISCHE MYOKARDIALE BMP10 EXPRESSION VERMINDERT DAS POSTNATALE KARDIALE WACHSTUM.....  | 104        |
| 4.3.2      | DIE EKTOPISCHE BMP10 EXPRESSION IM ENDOTHEL VERURSACHT DORSONUCHEALE ÖDEME .....  | 105        |
| <b>4.4</b> | <b>IDENTIFIZIERUNG BMP/SMAD-SENSIBLER ZIELGENE <i>IN VIVO</i>.....</b>  | <b>107</b> |
| 4.4.1      | GENERATION DER ROSA26-SMAD6 UND ROSA26-SMAD7 LINIE.....   | 107        |
| 4.4.2      | CHARAKTERISIERUNG DER LINIEN ROSA-SMAD6 UND ROSA-SMAD7 .....  | 108        |
| 4.4.3      | DIE ROSA26-SMAD6 LINIE ERMÖGLICHT DIE KONDITIONELLE EXPRESSION VON SMAD6 .....  | 109        |
| 4.4.4      | DER ROSA26-PROMOTOR ERLAUBT DIE EXPRESSION VON SMAD6 IN PHYSIOLOGISCH RELEVANTEN MENGEN .....   | 111        |
| 4.4.5      | EKTOPISCHE KARDIALE SMAD6 EXPRESSION INDUZIERT SEPTUMDEFEKTE UND POSTNATALE LETHALITÄT .....  | 112        |
| 4.4.6      | MICROARRAY GESTÜTZTE UNTERSUCHUNGEN DES TRANSKRIPTOMS IDENTIFIZIERTEN POTENTIELLE BMP/SMAD SENSITIVE TARGETS.....   | 114        |
| <b>5</b>   | <b><u>DISKUSSION:</u>.....</b>  | <b>120</b> |
| <b>5.1</b> | <b><i>BMP10-LACZ</i> TRANSGENE LINIEN MACHEN NEUE KARDIALE UND EXTRAKARDIALE EXPRESSIONSDOMÄNEN SICHTBAR.....</b>   | <b>120</b> |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 5.1.1      | BMP10 WIRD IM ENDOKARD DES HERZENS EXPRIERT .....  | 121        |
| 5.1.2      | BMP10 IST KEIN HERZ-SPEZIFISCHER FAKTOR .....  | 122        |
| <b>5.2</b> | <b>DER KONDITIONELLE BMP10 <i>KOCK-OUT</i> ERMÖGLICHTE DIE GEZIELTE ANALYSE ALLER BMP10-EXPRESSIONSDOMÄNEN.....</b>  | <b>124</b> |
| 5.2.1      | DAS ATRIALE BMP10 IST FÜR DIE EMBRYOGENESE NICHT ESSENTIELL .....  | 126        |
| 5.2.2      | PATHOLOGISCHE STIMULI MACHEN DIE BEDEUTUNG DES ARTIALEN BMP10 FÜR DAS KARDIOVASKULÄRER SYSTEM SICHTBAR.....  | 127        |
| 5.2.2.1    | Die atriale Bmp10-Deletion hat keinen Einfluss auf die Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie und das rechtsventrikuläre Remodeling .....   | 128        |
| 5.2.2.2    | BMP10 ist ein positiver Effektor der Arteriogenese.....  | 129        |
| 5.2.2.3    | BMP10 hat keinen Einfluss auf das pathologische hypertrophe Wachstum des Herzens .....   | 131        |
| 5.2.3      | DIE BEDEUTUNG DER EMBRYONALEN, KARDIALEN BMP10 EXPRESSION.....   | 131        |
| 5.2.3.1    | Der Verlust der frühen kardialen Bmp10 Expression ist embryonal lethal .....   | 132        |
| 5.2.3.2    | Die endokardiale Bmp10-Expression ist für die Kardiogenese nicht essentiell.....   | 133        |
| 5.2.3.3    | Die adulte BMP10 Expression ist für die kardiale Organhomöostase vollständig entbehrlich .....   | 134        |
| 5.2.3.4    | Die Bmp10 Expression zwischen E8.75 und E11.5 ist kritisch für die Kardiogenese .....  | 134        |
| <b>5.3</b> | <b>DIE ROSA26-BMP10 MAUSLINIE ERMÖGLICHT RÄUMLICH UND ZEITLICH GESTEUERTE BMP10 FUNKTIONSGEWINNANALYSEN <i>IN VIVO</i> .....</b>   | <b>136</b> |
| 5.3.1      | EKTOPISCHE BMP10 EXPRESSION IM ENDOTHEL INDUZIERT TRANSIENTE DORSONUCHEALE ÖDEME, DOCH IHRE BEDEUTUNG FÜR DAS ADULTE SYSTEM BLEIBT VORERST UNGEKLÄRT .....                                       | 137        |
| <b>5.4</b> | <b>DIE KONDITIONELLE EXPRESSION INHIBITORISCHER SMADS UNTERSTREICHT DIE NOTWENDIGKEIT EINER BALANCIERTEN BMP-SIGNALGEBUNG UND ERMÖGLICHT DIE IDENTIFIZIERUNG BMP/SMAD-SENSITIVER ZIELE .....</b> | <b>139</b> |
| 5.4.1      | DER ROSA26-PROMOTOR ERMÖGLICHT DIE KONDITIONELLE EXPRESSION PHYSIOLOGISCH RELEVANTER DOSEN DES INHIBITORISCHEN SMAD6 .....   | 140        |
| 5.4.2      | DIE EKTOPISCHE HERZ-SPEZIFISCHE SMAD6 EXPRESSION RESULTIERT IN SEPTUMDEFEKTEN.....   | 141        |
| 5.4.3      | SMAD6 - EIN POTENTIELLER INHIBITOR DER DROSHA-ABHÄNGIGEN MICRORNA-PROZESSIERUNG <i>IN VIVO</i> .....   | 141        |
| 5.4.4      | SMAD6 VERMITTELT DIE NEGATIVE GENREGULATION VON FAKTOREN, DIE BEKANNTERMAßEN IN KARDIOPATHIEN INVOLVIERT SIND .....  | 142        |
| 5.4.5      | SMAD6 EXPRESSION IM POSTNATALEN HERZEN – DIE CHANCE DIE BEDEUTUNG DER BMP-SIGNALGEBUNG IN PATHOLOGISCHEN UMBBAUPROZESSEN ZU ERHELLEN.....  | 144        |
| <b>6</b>   | <b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:.....</u></b>  | <b>145</b> |
| <b>7</b>   | <b><u>LITERATUR: .....</u></b>   | <b>146</b> |
|            | <b><u>DANKSAGUNG .....</u></b>   | <b>152</b> |

# **1 ZUSAMMENFASSUNG**

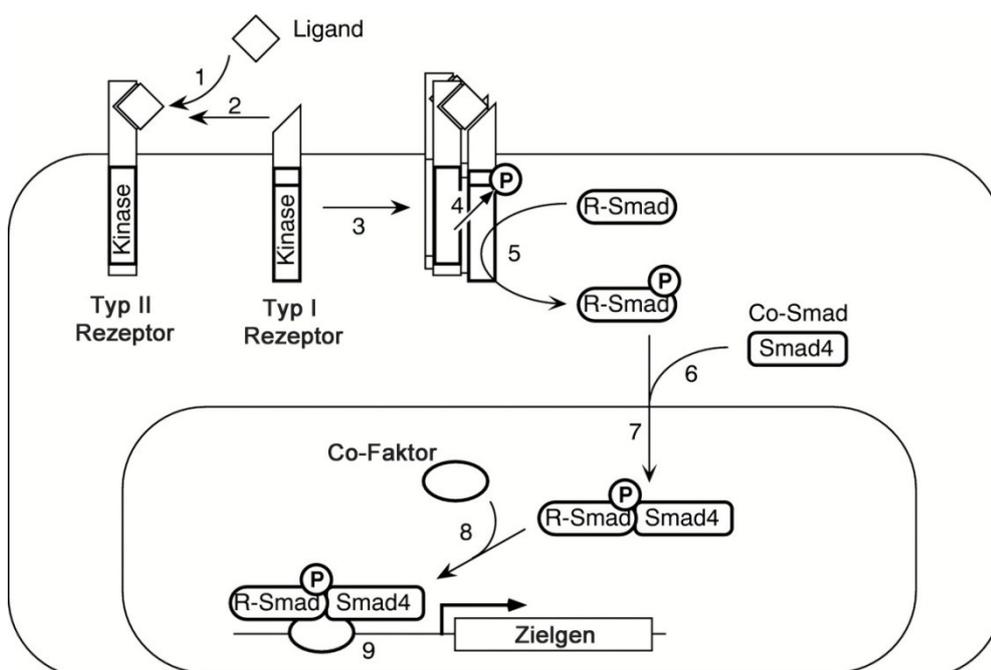
Der BMP/Smad-Signalweg ist an der Regulation vielfältiger Prozesse während der Kardiogenese beteiligt. Aufgrund dieser Vielfalt ist der BMP-Signalweg ein mögliches Ziel therapeutischer Ansätze zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen. Bisher jedoch ist die Bedeutung vieler Faktoren der Signalkette für das embryonale und adulte kardiovaskuläre System unbekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Herz-spezifischen Faktors „Bone Morphogenetic Protein 10“ (*engl.*, BMP10) für das kardiovaskuläre System mithilfe verschiedener, hierfür generierter transgener Mausmodelle untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass BMP10 ein breiteres Funktionsspektrum hat als bisher vermutet. Der Wachstumsfaktor wird nicht nur, wie bisher angenommen, im embryonalen und adulten Herzen, sondern während der Embryogenese auch in den Kiemenbögen und der fötalen Leber exprimiert. Zudem zeigt BMP10 auch innerhalb des Herzens ein anderes Expressionsmuster. So wird Bmp10 sowohl im embryonalen als auch im adulten Herzen nicht nur im Myokard, sondern auch im Endokard exprimiert. Funktionsverlustanalysen ergaben, dass die ventrikuläre myokardiale Expression zwischen E8.75-E10.5 für die frühe Kardiogenese essentiell ist, während atriales und endokardiales BMP10 für die kardiale Entwicklung und Organhomöostase entbehrlich ist. Ferner konnte im konditionellen Mausmodell erstmals die BMP10 Funktion im adulten Organismus untersucht und eine extrakardiale Wirkung des sekretierten Zytokins bewiesen werden. Das von atrialen adulten Myozyten sekretierte BMP10 übernimmt eine wichtige Rolle in Umbauprozessen des peripheren vaskulären Systems. Hier befördert es die Arteriogenese nach arterieller Okklusion.

Die im Rahmen der Dissertation durchgeführte Analyse des BMP/Smad-Signalweges beschränkte sich nicht allein auf den Liganden BMP10. Eine weitere Zielsetzung war es, BMP/Smad-abhängige Zielgene im kardiovaskulären System *in vivo* zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde ein Mausmodell generiert, das einen Inhibitor dieses Signalweges – SMAD6 – konditionell ektopisch exprimiert. Die kardiale ektopische Expression des inhibitorischen SMAD6 ermöglichte zum ersten Mal die Identifizierung BMP/Smad-sensibler Zielgene im embryonalen Herzen. Phänotypisch resultiert die negative Regulation der BMP/Smad-Signalkaskade durch SMAD6 in ventrikulären Septumdefekten, die perinatal zum Tod der mutanten Mäuse führt. Microarray-basierte Analysen des Transkriptom identifizierten *Cyr61* als BMP/Smad-abhängiges Zielgen, das bekanntermaßen für die atrioventrikuläre Septierung essentiell ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass SMAD6 die Expression von MicroRNAs negativ reguliert.

## 2 EINLEITUNG:

Bone morphogenetic proteins (*engl.*; BMPs) sind an der Regulation vielfältiger Prozesse der Kardiogenese beteiligt. Sie regulieren die Differenzierung von Mesoderm zu Kardiomyozyten und sind an der Formation ventrikulärer Herzkammern, der Septierung und Klappenbildung im atrioventrikulären Kanal und Ausflusstrakt beteiligt. Aufgrund dieser Vielfalt an kardialen Aktivitäten sind sie interessante Kandidaten für zu entwickelnde therapeutischer Ansätze von kardiovaskulärer Erkrankungen. Doch bisher ist die Bedeutung vieler Faktoren der BMP-Signalkette für das embryonale und adulte kardiovaskuläre System unbekannt.



**Abbildung 1: Der TGF-β/Smad-Signalweg.** Die Bindung eines Ligandendimers aus der TGF-β Familie (1) bringt die Typ II und Typ I-Rezeptoren in räumliche Nähe (2) und ermöglicht so die Komplexierung der Rezeptoren. Es erfolgt die Phosphorylierung der GS-Domäne der Typ I Rezeptoren durch die Kinase-Aktivität des Typ II-Rezeptors (4). Der aktivierte Typ I Rezeptor phosphoryliert R-Smads (5), was die Komplexierung der R-Smads mit dem Co-Smad Smad4 ermöglicht (6). Der Smad-Komplex transloziert in den Nukleus (7), wo er in Kombination mit Co-Faktoren an die regulatorischen Elemente des Zielgens bindet (9) und seine Transkription reguliert. (Die Abbildung wurde der Arbeit von Massague [1998] entlehnt.)

Die BMPs gehören zur Superfamilie der TGF-β Wachstumsfaktoren (*transforming growth factors, engl.*) und repräsentieren eine Unterfamilie von mehr als 20 Mitgliedern. Die Wachstumsfaktoren der TGF-β Superfamilie agieren über einen heteromeren Rezeptorkomplex an der Zelloberfläche und einen intrazellulären vermittelnden Smad-Komplex, bestehend aus zwei R-Smads (Rezeptor-regulierte Smads) und dem gemeinsamen vermittelnden Smad, Smad4 (Co-Smad). Der heteromere

Rezeptorkomplex besteht aus Typ I und Typ II Serin/Threonin-Kinasen, welche nach der Bindung der Liganden die R-Smads phosphorylieren und auf diese Weise die Komplexbildung mit dem Co-Smad ermöglichen. Der formierte Smad-Komplex transloziert in den Nukleus und reguliert die Transkription (*Massague 1998; Shi and Massague 2003*).

Die Signalgebung der TGF- $\beta$  Familie wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Eine Art der Regulation basiert auf einer weiteren Untergruppe der Smad Proteine, den inhibitorischen Smads (I-Smads) Smad6 und Smad7. Auf intrazellulärer Ebene kontrollieren die I-Smads die TGF- $\beta$  Signalgebung, indem sie die Komplexbildung der R-Smads mit dem Co-Smad kompetitiv hemmen und indem sie Proteine des TGF- $\beta$  Signalweges durch die Rekrutierung von E3-Ubiquitin Ligasen für die Degradierung markieren (*Moustakas and Heldin 2009*). Außerdem interferieren sie mit der TGF- $\beta$  Signalkaskade durch Interaktionen mit transkriptionellen Repressoren wie Histondeacetylasen (*Ichijo, Voutetakis et al. 2005*). Smad6 scheint vorzugsweise die Bmp-Signalkaskade zu inhibieren, während Smad7 sowohl mit der BMP, als auch der TGF- $\beta$  Signalkette interferiert (*Hanyu, Ishidou et al. 2001*).

Eine Missregulation des Tgf- $\beta$ /Bmp-Signalgebung kann zu einer Reihe von Krankheiten führen, die unter anderem Missbildungen des Skeletts, Osteoporose sowie kardiovaskuläre- und auch metabolische Leiden, muskuläre Krankheiten und Krebs umfassen (*Nickel, Sebald et al. 2009*).

## **2.1 Die Tgf- $\beta$ Superfamilie:**

Die Mitglieder der Tgf- $\beta$  Superfamilie sind sekretierte, multifunktionale Wachstumsfaktoren, die eine Fülle von Prozessen während der Entwicklung, Homöostase und Regeneration von Geweben und Organen steuern.

Im Jahre 1978 wurden die Tgf- $\beta$ s (Transforming growth factor  $\beta$ , *engl.*) anhand ihrer Fähigkeit, Zellen zu transformieren, entdeckt (*de Larco and Todaro 1978*) und waren in den folgenden Jahren namensgebend für eine immer größer werdende Proteinfamilie. Die Tgf- $\beta$  Superfamilie umfasst heute in Vertebraten eine Gruppe strukturell verwandter Proteine mit mehr als 30 Mitgliedern. Neben den TGF- $\beta$ s beinhaltet diese Superfamilie die BMPs (*b*one *m*orphogenetic *p*roteins, *engl.*), GDFs (*g*rowth *d*ifferentiation *f*actors, *engl.*), Activine und Nodal (*Moustakas and Heldin 2009*). Es handelt sich bei allen Familienmitgliedern um sekretierte Proteine, die sich durch eine sogenannte Cysteinschleife, bestehend aus mindestens sechs Cysteinen, welche über Disulfidbrücken verbunden sind, auszeichnen (*Vitt, Hsu et al. 2001*).

Alle Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie werden als lange inaktive Präproproteine exprimiert, die ein N-terminales Signalpeptid, eine Prodomäne und das C-terminale reife Peptid enthalten. Das Signalpeptid dirigiert das translatierte Protein in den sekretorischen Pfad, während die Prodomäne die korrekte Faltung des Proteins garantiert. Die Prozessierung dieser Pro-Form zu einem reifen Protein erfolgt durch proteolytische Spaltung. Als Dimere, Homo- und auch Heterodimere, werden die reifen Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie schließlich sekretiert (*ten Dijke and Arthur 2007*).

Alle Mitglieder dieser Familie entfalten ihre Wirkung außerhalb der Zelle, indem sie als Dimere an ihre Rezeptoren, die Typ I und Typ II Serin/Threonin-Kinasen, binden (Abbildung 1). In diesem Ligand/Rezeptor-Komplex phosphoryliert die Typ II-Serin/Threonin-Kinase, welche als eine konstitutiv aktive Kinase angesehen wird, den Typ I-Rezeptor. Der auf diese Weise aktivierte Typ I Rezeptor kann nun seinerseits das erhaltene Signal durch Phosphorylierungen an die intrazellulären Komponenten des TGF- $\beta$  Signalweges weitergeben, namentlich an die Smad Proteine (*Shi and Massague 2003*).

Bisher sind acht Smad Proteine bekannt, die sich in drei funktionelle Gruppen unterteilen lassen. Die Rezeptor-regulierten Smads (R-Smads) Smad1, 2, 3, 5 und 8, den Co-Mediator (Co-Smad) Smad4 und die inhibierenden Smads (I-Smads) Smad6 und 7. Die R-Smads werden direkt durch den aktivierten Typ I Rezeptor phosphoryliert, dimerisieren zunächst, um sich dann mit den Co-Smad Smad4 zusammen zu lagern. Dieser heteromere Komplex transloziert in den Zellkern, wo er dann in Kombination mit anderen Co-Faktoren die Transkription von Zielgenen reguliert (*Massague and Wotton 2000*).

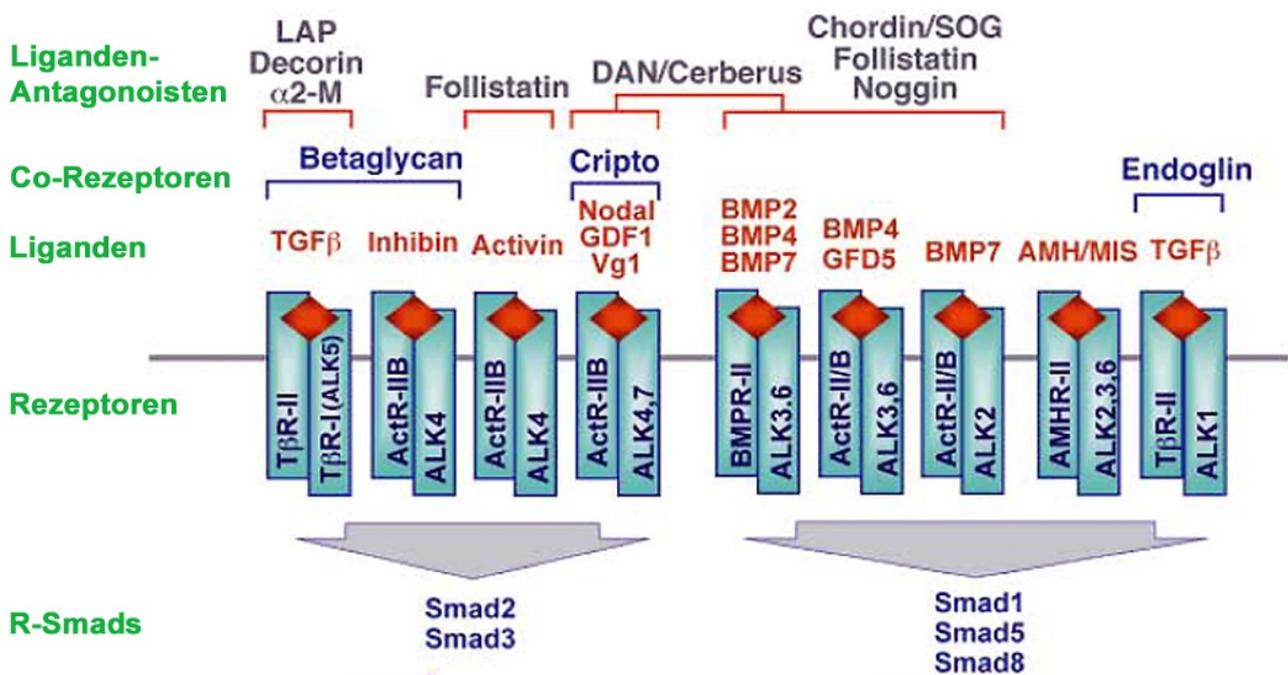
Die Mitglieder der Tgf- $\beta$  Superfamilie können anhand ihrer Sequenzähnlichkeiten und der Signalwege, die sie im einzelnen stimulieren, in zwei Unterfamilien eingeteilt werden: Auf der eine Seite ist die Tgf- $\beta$ /Activin/Nodal-Subfamilie, die ihre Signale vornehmlich mittels der R-Smads Smad2/3 weitergibt und die BMP/GDF/MIS Subfamilie, welche als intrazelluläre Transmitter vorrangig die R-Smads Smad1/5/8 verwendet (*Shi and Massague 2003; Kahlem and Newfeld 2009*).

### **2.1.1 Tgf- $\beta$ Rezeptoren**

Alle Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie übermitteln ihr Signal über die Typ I und Typ II Rezeptoren, die in der Anwesenheit des Ligandendimers einen heterotetrameren Komplex bilden. Heute sind 12 Mitglieder der Serin/Threonin-Kinase Rezeptor Familie in Vertebraten bekannt. Dabei handelt es sich um 7 Typ I (auch ALKs genannt; *activin-receptor-like kinases*) und 5 Typ II Rezeptoren. Beide Rezeptortypen bestehen aus einer N-terminalen, extrazellulären, Ligandenbindenden Domäne; einer anschließenden Transmembran-Domäne; sowie der C-terminalen

Serin/Threonin-Kinase Domäne. Die Bindung des Ligandendimers an die TypII Rezeptoren ermöglicht diesen, die Typ I Rezeptoren in der charakteristische GS-Domäne zu phosphorylieren. Bei der GS-Domäne handelt es sich um die juxtamembrane Region der Typ I Rezeptoren, welche besonders reich an Glyzin- und Serin-Resten ist. Durch ihre Phosphorylierung ändert sich die Konformation der Kinase-Region des TypI Rezeptors derart, dass sie nun in der Lage ist, R-Smads zu binden und phosphorylieren.

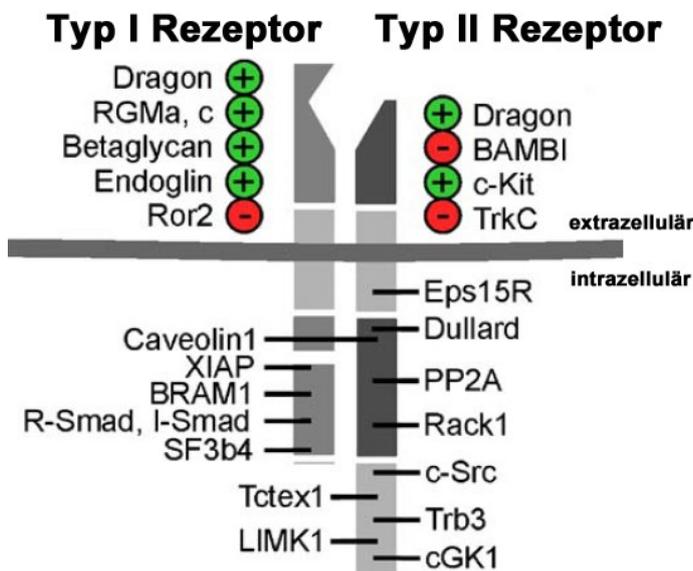
Die verschiedenen Mitglieder der Tgf- $\beta$  Superfamilie binden an bestimmte Kombinationen von Typ II und Typ I Rezeptoren (Abbildung 2). Die Mitglieder der Tgf- $\beta$ /Aktivin/Nodal-Subfamilie, binden an den Tgf- $\beta$  Typ II (Tgf $\beta$ RII) oder Activin Typ II A und B (ActR-II A und ActR-IIB) Rezeptor, sowie an die Typ I Rezeptoren Alk-1, Alk-4, Alk-5 und Alk-7, was vornehmlich zur Phosphorylierung der R-Smads Smad2 und Smad3 führt. Die Mitglieder der BMP/GDF/MIS-Subfamilie hingegen binden die TypII Rezeptoren BMP-Rezeptor Typ II (Bmpr2), ActR-IIB oder Anti-Müllerian Hormon Typ II Rezeptor (AMHRII), sowie die Typ I Rezeptoren Alk-2, Alk-3, Alk-6, die hauptsächlich die R-Smads Smad1,5 und 8 phosphorylieren (*Shi and Massague 2003*). Neuere Berichte belegen ergänzend, dass zwei Mitglieder der BMP-Familie, BMP9 und BMP10, an den Typ I Rezeptor Alk-1 binden (*David, Mallet et al. 2007; David, Mallet et al. 2008*).



**Abbildung 2: Tgf- $\beta$  Liganden, ihre Antagonisten, Rezeptoren und Co-Rezeptoren.** Durch die Affinität der Liganden zu bestimmten Rezeptoren und Co-Rezeptoren lassen sich die Liganden in zwei Gruppen einordnen. Die Tgf- $\beta$ /Aktivin/Nodal-Gruppe stimuliert vorwiegend die Phosphorylierung von Smad2 und 3, die BMP/GDF/MIS-Gruppe die Phosphorylierung von Smad1, 5 und 8. Extrazelluläre Antagonisten und Co-Rezeptoren spezifizieren die TGF- $\beta$ /Bmp-Signalkaskade zusätzlich. (Die Abbildung wurde der Arbeit von Shi und Massague [2003] entlehnt).

### 2.1.1.1 Regulation der TGF $\beta$ -Rezeptor Aktivierung

Die Regulation der Tgf- $\beta$  Rezeptoren erfolgt sowohl auf der extrazellulären als auch auf der intrazellulären Ebene. Auf extrazellulärer Ebene (Abbildung 2) wird zum einen die Zugänglichkeit der Rezeptoren für die Liganden reguliert. Hier sind besonders zwei Klassen von Molekülen zu nennen. Einerseits die Gruppe von kleinen löslichen Proteinen, die als Antagonisten des TGF- $\beta$  Signalweges wirken, indem sie an die Liganden binden und die Komplexbildung mit ihren Rezeptoren verhindern. Dazu gehören das Proteoglykan Decorin und das Protein  $\alpha$ 2-Macroglobulin, die freies TGF- $\beta$  binden, sowie die Follistatine, die Aktivin binden und auch die Proteinfamilien Noggin/Chordin/SOG, Twisted Gastrulation (Tsg) und DAN/Cerberus, deren Mitglieder BMPs binden. Auch die Proregion des TGF- $\beta$  Proproteins, welche nach proteolytischer Abspaltung kovalent an das reife Protein gebunden bleibt und LAP (*latency-associated polypeptide*) genannt wird, verhindert die Anlagerung von TGF- $\beta$  an seinen Rezeptor.



**Abbildung 3: Regulation des Tgf- $\beta$ /Bmp-Signalwegs auf dem Niveau der Rezeptoren.** Die Tgf- $\beta$  Rezeptoren Typ I und Typ II werden durch verschiedene Co-Rezeptoren positiv (+) oder negativ (-) reguliert. Doch auch die intrazellulären Domänen der Rezeptoren interagieren mit einer Vielzahl von Faktoren, die das Tgf- $\beta$ /Bmp-Signal modulieren. (Abbildung modifiziert nach Siebert, Kopf et al. 2009)

Die zweite Klasse von Molekülen, die mit der Aktivierung der Tgf- $\beta$  Rezeptoren interferiert, beinhaltet Membran-verankerte Proteine, die als akzessorische Rezeptoren bzw. Co-Rezeptoren fungieren und somit die Ligand/Rezeptor-Interaktion begünstigen. Als Vertreter dieser Klasse seien hier Betaglycan (auch bekannt als TGF $\beta$ R Typ III), das Betaglycan-verwandte Protein Endoglin, Critpo, RGMa (Repulsive Guidance Molecule, *engl.*) und Dragon (RGMb), sowie die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) c-Kit genannt. Zuletzt seien noch das Protein BAMBI (Bmp and Activin membrane bound protein) und die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) Ror2 und TrkC erwähnt. Hier handelt es sich um besondere Antagonisten des BMP-Signalweges. Bei BAMBI handelt es sich um eine Art „Schein“-Rezeptoren für BMPs. Es besitzt Ähnlichkeiten mit dem TGF- $\beta$  Typ I Rezeptoren und konkurriert mit diesen um den Liganden, ohne allerdings das Signal an

intrazelluläre Smads weiterzugeben. Die RTKs Ror2 und TrkC binden an Bmp-Rezeptoren und modulieren durch kompetitive Hemmung oder durch die Inhibition von Smad-Phosphorylierungen die Bmp/GDF-Signalgebung (*Shi and Massague 2003; Miyazono, Kamiya et al. 2009; Sieber, Kopf et al. 2009*).

Die intrazelluläre Regulation der TGF- $\beta$  Rezeptoren-Aktivierung beinhaltet die Interaktion mit Faktoren des Endozytose-Systems, Phosphatasen, Kinasen und Zytoskelett-assoziierten Proteinen. Als Faktoren des Endozytose-Systems seien Caveolin 1 und Eps15R genannt, welche an der Internalisierung der aktivierten Rezeptoren beteiligt sind, welche sich positiv auf den Erhalt der Smad-Signalgebung auswirkt (*Hartung, Bitton-Worms et al. 2006*). Dullard und PP2A sind zwei Vertreter von Phosphatasen, die mit TGF- $\beta$  Rezeptoren interagieren und durch Dephosphorylierung der Rezeptoren selbst oder der Rezeptor-regulierten Smads, die Dauer und Intensität des TGF- $\beta$ /Bmp-Signals beeinflussen. LIMK1, c-Src und cGSK1 sind nur einige Beispiele für Kinasen, die entweder direkt mit der intrazellulären Domäne der TGF- $\beta$  Rezeptoren oder indirekt durch Adapter-Proteine mit ihr interagieren. Häufig sind es diese Kinasen, die abseits der kanonischen TGF- $\beta$ /Smad Signalkaskade die Verknüpfung mit anderen Signalwegen herstellen (*Sieber, Kopf et al. 2009*).

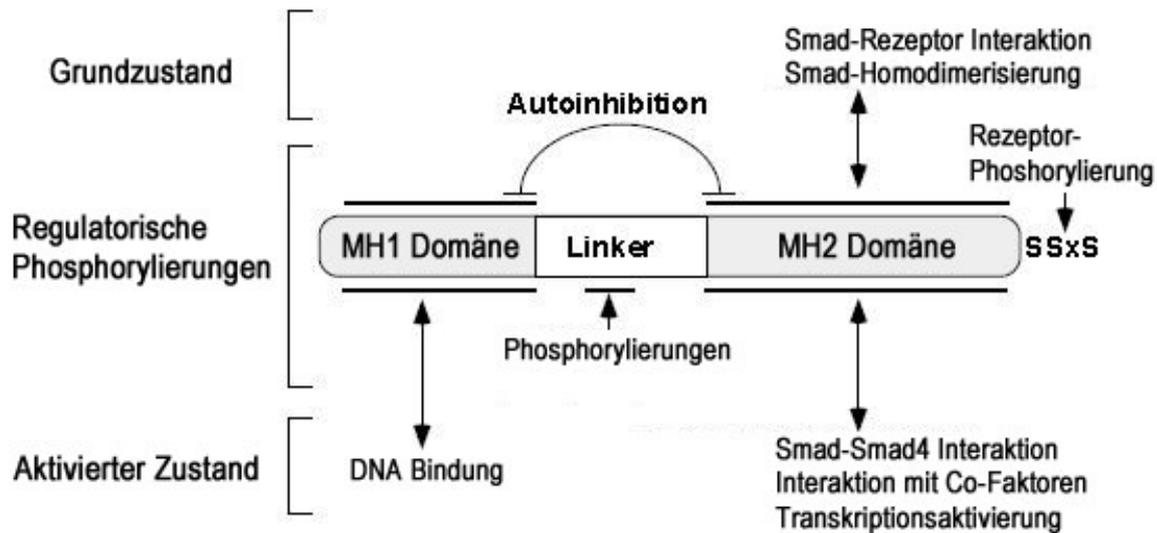
### **2.1.2 Die Smad Proteine**

Der erste intrazelluläre Mediator des Tgf- $\beta$  Signalwegs, Mothers Against DPP (MAD), wurde 1995 in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (*Sekelsky, Newfeld et al. 1995*). Nur wenig später wurden dann die orthologen Mediatoren in Vertebraten aufgespürt und SMADs genannt (*Hoodless, Haerry et al. 1996; Liu, Hata et al. 1996; Thomsen 1996*). Heute sind acht Smad Proteine bekannt, die sich in drei funktionelle Gruppen unterteilen lassen. Die Rezeptor-regulierten Smads (R-Smads), Smad1, 2, 3, 5 und 8, den Co-Mediator (Co-Smad) Smad4 und die inhibierenden Smads (I-Smads), Smad6 und 7.

#### **2.1.2.1 R-Smads und Co-Smad Smad4**

Die R-Smads und Smad4 haben einen ähnlichen Aufbau. In ihren N-Termini befindet sich eine konservierte Domäne, die Mad-Homologie 1 (MH1) Domäne, welche im Falle der Smads 1, 3, 4, 5 und 8 DNA bindet (Abbildung 4). Smad2 liegt in verschiedenen Splice-Varianten vor. Die am häufigsten vorkommende ist jene, in der Exon 3 nicht heraus gespleißt wurde. Der von Exon 3 codierte Proteinabschnitt in der MH1 –Domäne behindert die DNA-bindende Funktion. Doch neben

dieser Splice-Variante liegt in geringer Menge die Variante Smad2 $\Delta$ Ex3 vor, die durch das Fehlen des von Exon3 codierten Bereichs, ebenfalls DNA binden kann (Yagi, Goto *et al.* 1999).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der R-Smads und ihre funktionellen Domänen.** Das Schema bietet eine Übersicht der Interaktionen und Modifikation an den verschiedenen Domänen der R-Smads, die im unphosphorylierten (Grundzustand) oder phosphorylierten (aktivierter Zustand) möglich sind (Abbildung modifiziert nach Massague 1998).

In den C-Termini der R-Smads und Smad4, befindet sich die Mad-Homologie 2 (MH2) Domäne. Sie ermöglicht Smad-Rezeptor, Smad-Smad und möglicherweise auch Smad-Co-Aktivator/Repressor Interaktionen im Nukleus. Die MH1 und MH2 Domänen sind separiert durch eine Prolin-reiche, nicht sehr stark konservierte, sogenannte Linker-Region.

Die R-Smads werden durch verschiedene interagierende zytoplasmatische Proteine mit der Zellmembran verankert und so in die räumliche Nähe der Tgf- $\beta$  Rezeptoren gebracht. Auf diese Weise fördern Proteine wie SARA (Smad anchor for receptor activation) die Rezeptor-vermittelte Phosphorylierung von Smad2/3, und Endofin oder auch CD44 die Phosphorylierung von Smad1. Die Phosphorylierung der R-Smads durch die Tgf- $\beta$  Typ I Rezeptoren erfolgt am SXS-Motiv, am äußersten C-terminalen Ende der MH2 Domäne. Nicht-phosphorylierte inaktive R-Smads nehmen eine selbst inhibierende Struktur an, in der MH1 und MH2 Domäne miteinander interagieren. Durch die Phosphorylierung des SXS-Motivs kommt es zur Konformationsänderung, welche die in der MH1-Domäne lokalisierte Kernleitsequenz (NLS, nuclear leading sequence, *engl.*) und auch die Linker-Region für interagierende und modifizierende Proteine zugänglich macht (Massague, Seoane *et al.* 2005; Ross and Hill 2008). Die Linker-Region bietet so eine weitere Plattform zur Modulation des TGF- $\beta$  Signals und Interaktion mit anderen Signalwegen. Insbesondere Prolin-abhängige Kinasen wie die MAP-Kinasen (MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinases) oder die

CDKs phosphorylieren die Linker-Region der R-Smads und beeinflussen auf diese Weise den nuklearen Import, die Degradierung oder Interaktionen der SMADs mit transkriptionellen Co-Aktivatoren/Repressoren (*Alarcon, Zaromytidou et al. 2009; Guo and Wang 2009*).

### **2.1.2.2 I-Smads:**

Die inhibitorischen Smads Smad6 und Smad7 sind Schlüsselfaktoren in der Regulation der TGF- $\beta$  Signalkaskade und werden unter anderem als Antwort auf ein TGF- $\beta$  Signal exprimiert. Sie enthalten, wie die R-Smads und das Co-Smad, ebenfalls eine MH1 und MH2 Domäne, jedoch ist die MH1-Domäne stark verkürzt und weist nur eine geringe Homologie mit der N-terminalen Region der R-Smads und Smad4 auf (*Ross and Hill 2008*). Darüber hinaus entbehren die I-Smads das C-terminale SXS-Motiv.

Die I-Smads inhibieren den TGF- $\beta$  Signalweg auf verschiedenste Art und Weise. Dabei ist Smad6 als Inhibitor bekannt, der vornehmlich die Bmp Rezeptor Typ I (Alk-1, Alk-2, Alk-3 und Alk-6) vermittelten Signale hemmt. Smad7 hingegen ist weniger spezifisch und bindet alle TGF- $\beta$  Typ I Rezeptoren (*Goto, Kamiya et al. 2007*). Vereinfachend kann zusammengefasst werden, dass SMAD6 die Signale der TGF- $\beta$  Subfamilie BMP/GDF/MIS, die über Smad1, 5 und 8 weiter gegeben werden, hemmt, während Smad7 die Signale der BMP/GDF/MIS und Tgf- $\beta$ /Aktivin/Nodal Subfamilien hemmt, die über die R-Smads 1, 2, 3, 5 und 8 weiter gegeben werden.

Die I-Smads hemmen die TGF- $\beta$  Signalkaskade zum einen kompetitiv, indem sie mit R-Smads um die Bindung an den TGF- $\beta$  Rezeptorkomplex oder das Co-Smad konkurrieren. Außerdem wurde gezeigt, dass die I-Smads in der Lage sind, Ubiquitin-abhängige Degradierungen innerhalb des Tgf- $\beta$  Signalweges zu vermitteln. Die I-Smads rekrutieren die E3 Ubiquitin Ligasen Smurf1 und 2 sowie deren Co-Faktoren in den TGF- $\beta$  Rezeptorkomplex, und leiten auf diese Weise seine Degradierung ein. Des Weiteren vermitteln sie auch die Assoziation von E3 Ubiquitin Ligasen mit R-Smads, was ebenfalls zu deren Degradierung führt (*Lonn, Moren et al. 2009*). Auch im Zellkern können die I-Smads negativ mit dem Tgf- $\beta$  Signalweg interferieren. Hier interagieren sie unter anderem mit Transkriptionsrepressoren wie Histondeacetylasen, um so die Expression von Tgf- $\beta$  Zielgenen reprimieren (*Ichijo, Voutetakis et al. 2005*).

Vornehmlich sind Daten und Fakten bezüglich der Funktionen inhibitorischer Smads *in vitro* generiert worden. Doch im Jahr 2000 veröffentlichten K. M. Galvin *et al.* den ersten murinen *Knock-out* eines I-Smads – den *Smad6 Knock-out* (*Galvin, Donovan et al. 2000*). Die Deletion der Smad6 MH2-Domäne war durch die Insertion einer Neomycin/lacZ-Kassette erfolgt, so dass die Mauslinie nicht nur Funktionsverlustanalysen erlaubte, sondern auch als Reporter der Smad6

Expression diene. Die Autoren zeigten, dass Smad6 im kardiovaskulären System hauptsächlich im Endothel größere Gefäße verschiedener Organe, wie Lunge und Gehirn, und im Ausflusstrakt sowie in den atrioventrikulären Kissen des sich entwickelnden Herzen exprimiert wird. Der Verlust des funktionsfähigen SMAD6 Proteins in den *Smad6 KO* Mäusen führt bei einigen Tieren zum vorzeitigen Tod, jedoch viele überleben bei guter Gesundheit. Nähere Untersuchungen des kardiovaskulären Systems ergaben, dass Smad6 Einfluss auf die Herzklappenentwicklung, die Ausflusstraktseptierung sowie den Gefäßwiderstand nimmt.

### **2.1.3 Smad unabhängige Tgf- $\beta$ Signalwege und Crosstalks**

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, ist die Tgf- $\beta$ /Bmp-Signalgebung an einer überwältigenden Anzahl von Zellantworten beteiligt. Deshalb ist es nicht überraschend, dass ein solch weitreichendes Regel- und Stellwerk nicht nur der geradlinigen Abfolge des kanonischen Signalweges folgt, sondern sich vielmehr durch ein komplexes Netzwerk auszeichnet und somit das Potential für die Diversität, Flexibilität sowie die Empfindlichkeit des Tgf- $\beta$ /Bmp Signals bietet.

In den letzten Jahren finden sich immer mehr Berichte, in denen von alternativen Tgf- $\beta$  Signalwegen oder Crosstalks mit anderen kanonischen Signalwegen berichtet wird. Der Ligandgebundene, aktivierte Tgf- $\beta$  Rezeptorkomplex aktiviert durch Phosphorylierungen, oder auch direkte Interaktion, Komponenten anderer bekannter Signalwege (Kapitel 2.1.1.1). Aber auch weitere Komponenten des Tgf- $\beta$ /Bmp-Signalweges, hauptsächlich die Smads, scheinen befähigt, mit anderen Signalwegen zu interagieren (Kapitel 2.1.2.1). Als Beispiele für interagierende Signalwege, die durch Tgf- $\beta$ /Bmp-Signale beeinflusst werden und/oder selbst Einfluss auf den Tgf- $\beta$ /Bmp-Signalweg nehmen, seien hier die MAPK-, die die PI3K/Akt-, die Wnt-, die Hh- sowie die Notch-Signalwege erwähnt (*Guo and Wang 2009; Zhang 2009*).

## **2.2 Die Bedeutung der BMPs für das kardiovaskuläre System**

Wachstum des Eizylinders, Spezifizierung und Entwicklung von Keimzelle, Festlegung der Körperachsen, Epidermisinduktion, frühe Entwicklung des ZNS, Neuralleistenzellen- und Plakodenentwicklung, Knochenbildung und Anlage kraniofazialer Strukturen, Entwicklung der Augen und Gliedmaßen, all das sind Entwicklungsprozesse die durch BMPs beeinflusst werden. Man könnte sagen, dass jedes Organ des Körpers im Laufe seiner Entwicklung notwendigerweise auf die Bmp-Signalgebung angewiesen ist. Auch die Entwicklung des Herzens ist von BMP Signalen abhängig. Als das erste Organ, das während der Embryogenese erscheint und dessen

Funktion bereits so früh essentiell für das Überleben des Embryos ist, hat das Herz schon immer besondere Aufmerksamkeit erhalten. Funktionsstörungen des erwachsenen Herzens sind weltweit mit etwa 30 % die Todesursache Nummer 1 (*Mathers C 2004*). Darüber hinaus sind 19 bis 75 angeborene Herzfehler in 1.000 Lebendgeburten feststellbar (*Hoffman and Kaplan 2002*), die nicht selten zum Tod des Neugeborenen führen und immer eine anomale Kardiogenese zur Grundlage haben (*Bruneau 2008*). Es ist somit das Anliegen vieler Forscher, die Entwicklungsprozesse, die einem gesunden oder einem kranken Herzen zugrunde liegen, zu entschlüsseln, um mit den gewonnenen Erkenntnissen Therapien für das geschädigte Herz zu entwickeln. So soll auch die Erforschung der BMPs zum besseren Verständnis erworbener und erblicher Herzerkrankungen beitragen.

### **2.2.1 Die Herzentwicklung - Ein Überblick**

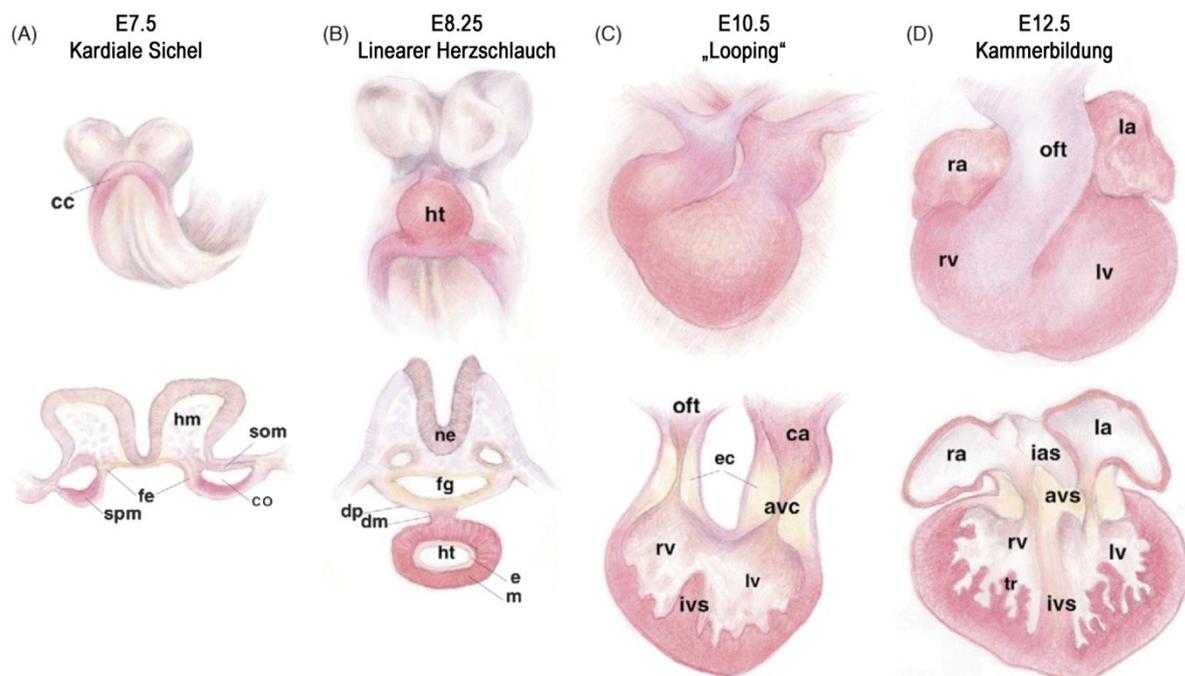
Nach der Gastrulation ist das Herz das erste Organ, das im Embryo gebildet wird. Seine zirkulatorische Funktion ist schon sehr früh essentiell für das Überleben des Embryos.

Während der Gastrulation wandern die Herzvorläuferzellen gemeinsam mit den Zellen, die das endodermale und mesodermale Keimblatt formen werden, durch den Primitivstreifen. Nachdem sie in die tieferen Schichten des sich bildenden Embryos eingewandert sind, bewegen sie sich nach lateral und kranial bis sie schließlich im anterioren Bereich der Seitenplatten lokalisiert sind. Diese Herzgründerzellen, die nun bilateral im anterioren viszeralem Mesoderm angeordnet sind, werden in ihrer Gesamtheit als Herzfeld bezeichnet (*Brand 2003; Dunwoodie 2007*). Dabei wird heute zwischen dem primären und dem sekundären Herzfeld unterschieden. Diese unterscheiden sich in ihrem Expressionsprofil und tragen zu verschiedenen Zeitpunkten zur Bildung verschiedener Strukturen des Herzens bei (*Waldo, Kumiski et al. 2001; Dyer and Kirby 2009*).

Vermutlich sind es Signale des anterioren Entoderms und/oder dessen Vorläuferzellen, die die Herzentwicklung induzieren. Drei Familien von sekretierten Wachstumsfaktoren, BMPs („*bone morphogenetic proteins*“, engl.), FGFs („*fibroblast growth factors*“, engl.) und WNTs („*wingless related proteins*“, engl.), scheinen wesentlich an der Spezifizierung des kardialen Zellschicksals beteiligt zu sein. Für BMPs und FGFs konnte in verschiedenen experimentellen Ansätzen gezeigt werden, dass sie ein kardiales Zellschicksal induzieren können, während für die Wnt-Familie neben induzierenden auch supprimierende Eigenschaften ausgemacht werden konnten (*van Wijk, Moorman et al. 2007*).

Die meist kranial gelegenen Anteile des bilateralen Herzfeldes werden durch komplexe morphogenetische Bewegungen des anterioren Darmrohrs in Richtung der Mittellinie des Embryos bewegt und formen so die kardiale Sichel (Abbildung 5). Diese Struktur ist in der Maus erstmals

sichtbar an Embryonaltag E7-7.5. Im weiteren Verlauf der Entwicklung fusioniert die kardiale Sichel – bestehend aus dem bilateralen Herzfeld – auf der ventralen Seite des Embryos zu einem primitiven Herzschlauch (E8), der unmittelbar anfängt zu pulsieren. Dieser Herzschlauch besteht bereits aus zwei Schichten, dem inneren Endokard (epitheliales Gewebe) und dem äußeren Myokard (kraftentfaltendes muskuläres Gewebe), welche durch eine extrazelluläre Matrix voneinander getrennt sind. Er hat seinen Ursprung vornehmlich in den Zellen des primären Herzfeldes. Der primitive Herzschlauch enthält bisher nicht alle Anlagen des zukünftigen 4-kammerigen Herzens, sondern wird hauptsächlich zum linken Ventrikel beitragen. Im Verlauf der weiteren Embryogenese elongiert der Herzschlauch durch die Rekrutierung weiterer mesodermaler Zellen aus dem sekundären Herzfeld, welches nun dorsal hinter dem sich gebildeten Herzschlauch liegt und bis in die mesodermale Schicht der Kiemenbögen reicht. Diese werden hauptsächlich zur Entwicklung des Ausflusstraktes aber auch andere Strukturen des 4-kammerigen Herzen beitragen.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kardiogenese.** *avc*: atrioventrikulärer Kanal, *avs*: atrioventrikuläres Septum, *ca*: gemeinsames Atrium, *cc*: kardiale Sichel, *co*: Cölon, *dm*: dorsal Mesokard, *dp*: dorsal Perikard, *e*: Endokard, *fg*: Vorderdarm; *hm*: Kopfmesoderm, *ias*: interatriales Spetum, *ivs*: interventrikuläres Septum, *la*: linkes Atrium, *lv*: linker Ventrikel, *m*: Myokard, *ne*: neurales Epithel, *oft*: Ausflusstrakt, *fe*: Endoderm des Vorderdarms, *ra*: rechtes Atrium, *rv*: rechter Ventrikel, *som*: somatisches Mesoderm, *spm*: viszerales Mesoderm, *tr*: Trabekel. Abbildung nach Dunwoodie 2007.

Der nächste Schritt der Herzentwicklung ist gekennzeichnet durch die Herzschleifenbildung, ein morphogenetischer Prozess, der den anfänglich geraden Herzschlauch in einen gekrümmten Herzschlauch transformiert, dessen konvexe Seite zur rechten Seite des Embryos hin orientiert ist.

Während dieses Prozesses wird zunächst eine C-förmige Struktur gebildet, die anschließend in eine S-förmige Struktur umgebildet wird. Durch nachfolgende, komplexe morphogenetische Bewegungen werden die relativen Positionen der Herzkammern und ihre vaskulären Verbindungen zueinander etabliert. Dabei rotiert die ventrale Oberfläche des sich nach rechts krümmenden Schlauches und wird so zur äußeren Wölbung, der Zone des aktiven Wachstums. Die dorsale Oberfläche des Herzschlauches wird zur inneren Wölbung, deren folgende Umgestaltung essentiell für die finale Anordnung des Aus- und Einflusstraktes des Herzens ist. Während der Herzscheitelbildung und des Wachstums des Herzschlauches werden distinkte Kompartimente wie Atrium und Ventrikel erkennbar (Abbildung 5). Die Bildung der atrialen und ventrikulären Kompartimente in ihrer korrekten Position innerhalb des Herzschlauches benötigt präzise Positionsinformationen, die durch Transkriptionsfaktoren und sekretierte Faktoren vermittelt werden. Jede Herzkammer zeichnet sich durch charakteristische morphologische und kontraktile Fähigkeiten aus (*Christoffels, Habets et al. 2000; Moorman and Christoffels 2003; Srivastava 2006; Dunwoodie 2007*).

Durch die Septierung, d.h. durch das Einziehen von Herzscheidewänden (Septa) und durch die Bildung von Herzklappen werden schließlich die vier Kammern des erwachsenen Herzens voneinander abgegrenzt und in einen venösen (oder Einfluss-) Pol und einen arteriellen (oder Ausfluss-) Pol separiert. Während der frühen Bildung des Herzschlauches werden am anterioren und posterioren Pol so genannte „Kissen“ angelegt, welche zunächst aus extrazellulärer Matrix dem sogenannten „*cardiac jelly*“ bestehen. Wechselseitige Signale zwischen Endo- und Myokard, die durch Mitglieder der Tgf- $\beta$  Proteinfamilie vermittelt werden, induzieren die Transformation von endokardialen Zellen endothelialen Charakters zu mesenchymalen Zellen (Endothelial-mesenchymale Transformation, EMT). Diese wandern in die Kissen ein, differenzieren zum Gewebe der Herzklappen und sind an der Septierung des Einfluss- und Ausflusstraktes maßgeblich beteiligt. Darüber hinaus ist eine weitere Population an Zellen, bekannt als kardiale Neuralleistenzellen, an der Septierung des Herzens beteiligt. Es handelt sich dabei um eine spezifische Subpopulation der Neuralleistenzellen, multipotenten migratorischen Vorläuferzellen, die an einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen beteiligt sind und in mannigfaltige Zelltypen differenzieren können. Die kardialen Neuralleistenzellen entstehen durch Delamination aus dem Neuralrohr und haben ihren Ursprung in der Region, die zwischen dem Hinterhirn und dem vierten Somiten liegt. Sie durchlaufen die EMT und wandern über den dritten, vierten und sechsten Kiemenbogen in das Herz ein, wo sie insbesondere für die Septierung des Ausflusstraktes essentiell sind (*Lamers and Moorman 2002; Dunwoodie 2007; Snider, Olaopa et al. 2007*).

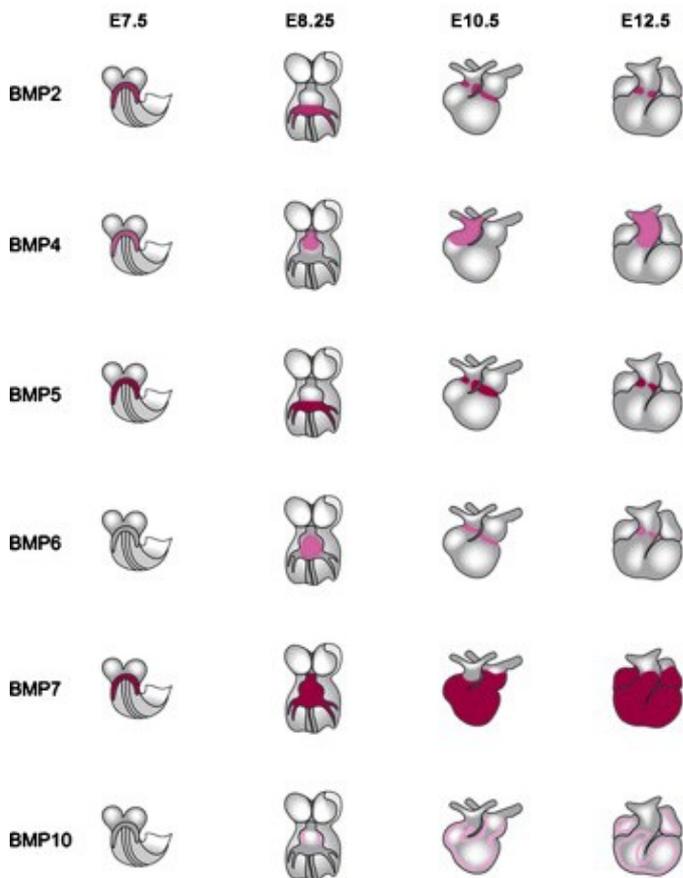
Mit dem Heranwachsen des Embryos erhöht sich der systemische Widerstand und es wird mehr Kraft benötigt, um alle Gewebe ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. Das embryonale Herz

passt sich diesen veränderten Bedingungen durch das Wachstum des Kraft-entfaltenden Myokards an. Dies ist zunächst erkennbar an der zunehmenden Trabekulierung des Herzens. Vermutlich sind es Signale des Endokards, welche das primitive, einschichtige Myokardium anregen, sich in eine mehrschichtige, kraftentfaltende Muskelwand zu entwickeln. Der Schritt dieses Prozesses beinhaltet die Proliferation, Differenzierung und Migration der Kardiomyozyten des primitiven Myokards in Richtung des ventrikulären Lumen, was zu der Ausprägung der Trabekel führt. In der Abwesenheit des koronaren, vaskulären Netzwerkes, ermöglicht die schwammartige Architektur des trabekulierten Myokards die ausreichende Oxygenierung des arbeitenden Myokards, während dieses gleichzeitig an Masse zunimmt. Mit der Entwicklung der koronaren Zirkulation kommt es schließlich zur Kompaktierung des Myokards, welches schließlich die maximale Kraft generiert. Bei der Geburt ist das humane Herz in vier Kammern, dem linken und rechten Atrium sowie den linken und rechten Ventrikel unterteilt. Jedoch die Separierung des Körper- und Lungenkreislaufs ist nicht vollständig abgeschlossen. Erst in den Wochen nach der Geburt wird das *Foramen ovale*, die embryonale Verbindung zwischen dem rechten und linken Vorhof, und der *Ductus arteriosus*, die embryonale Verbindung zwischen Aorta und Lungenarterie, vollständig verschlossen. Darüber hinaus passt sich das neonatale Herz an die steigende Arbeitslast durch Wachstum an. Zwar verlieren die Kardiomyozyten kurz nach der Geburt ihre Fähigkeit zu proliferieren, dennoch wächst das Herz in der postnatalen Phase. Dies wird ermöglicht durch die Hypertrophie der Kardiomyozyten, sprich durch die Größenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten (*Hew and Keller 2003*).

### **2.2.2 Die BMPs und ihre Bedeutung für die Herzentwicklung**

Die BMPs repräsentieren die größte Unterfamilie innerhalb der TGF- $\beta$  Superfamilie (*Blitz and Cho 2009*). Ursprünglich sind sie aufgrund ihrer Fähigkeit entdeckt und beschrieben worden, ektopische Knochenbildung zu induzieren (*Urist 1965; Wozney, Rosen et al. 1988*). Bis heute konnten aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in der Maus 14 BMPs identifiziert und in vier Untergruppen eingeordnet werden: Die Bmp2/4-Untergruppe, die Bmp5/6/7/8-Gruppe, die Bmp9/10- und die GDF5/6/7-Gruppe (*Miyazono, Kamiya et al. 2009*).

Während der Kardiogenese spielen BMPs schon früh eine wichtige Rolle. So sind Bmp Signale bereits an der Spezifizierung des Herzfeldes, bzw. an der Determinierung und Differenzierung der einwandernden mesenchymalen Herzvorläuferzellen zu Kardiomyozyten beteiligt. Es werden mindestens 6 verschiedene Bmps im Herzen exprimiert: Bmp-2, -4, -5, -6, -7 und -10. Ihre Expressionsmuster sind jeweils einzigartig, jedoch auch überlappend (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der BMP-Expressionsdomänen im embryonalen Herzen.** *Bmp2, 4, 5 und 7 werden in räumlicher Nähe zur kardialen Sichel exprimiert. An Embryonaltag (E 10.5) werden Bmp2 und Bmp5 im posterioren Herzschlauch exprimiert, während Bmp4 im anterioren Bereich des Herzschlauches und Bmp7 im gesamten Herzschlauch exprimiert wird. In den späteren Entwicklungsstadien E10.5 bis E12.5 werden Bmp2, 5 und 6 in den atrioventrikulären Kissen und im Mesenchym des Ausflusstraktes exprimiert. Bmp4 wird während dieses Zeitraums im Herzen ausschließlich im Ausflusstrakt und Bmp7 im gesamten Herzen exprimiert. Bmp10 wird im trabekulierten Myokard exprimiert.* (Yuasa S and Fukuda K 2008)

Noch bis vor wenigen Jahren war die Aufklärung der BMP-Funktionen im Herzen dadurch behindert, dass die meisten BMPs schon während der frühen Embryonalentwicklung eine essentielle Funktion haben und die konstitutiven *Knock-outs* einen embryonal lethalen Phänotyp aufweisen. Diese konstitutiven *Knock-outs* boten somit kaum Optionen, die BMP-Funktion während der späten Kardiogenese oder im adulten Herzen zu untersuchen.

Erst die neue Technik der konditionellen Geninaktivierung in Mäusen (Gu, Marth et al. 1994) ermöglichte es, die Bmp-Funktion in der Kardiogenese räumlich und zeitlich gesteuert zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die BMPs auch im weiteren Verlauf der morphogenetischen Gestaltung des Herzschlauches zu einem 4-kammerigen Herzen von essentieller Bedeutung sind. Hier sind sie vor allem an der Modellierung des Ausflusstraktes (OFT) und der Entwicklung der ventrikulären Kammern beteiligt. In den nächsten Abschnitten werden die bis heute entstandenen konstitutiven und konditionellen Linien, in welchen kardial exprimierte Bmp-Liganden oder ihre Rezeptoren inaktiviert wurden, sowie die daraus gewonnen Erkenntnisse im Einzelnen vorgestellt. Eine Zusammenfassung aller kardialen Bmp *Knock-outs* und ihrer Herz-assoziierten Phänotypen ist in Tabelle 1 aufgelistet.

### 2.2.2.1 *Bmp Knock-outs*

Im Laufe der letzten 20 Jahre sind für alle im Herzen exprimierten BMPs konstitutive *Knock-outs* generiert worden, um durch Funktionsverlustanalysen die Bedeutung dieser Proteinfamilie *in vivo* für die Herzentwicklung aufzuklären.

Die konstitutiven *Knock-outs* von Bmp2 (Zhang and Bradley 1996) und Bmp4 (Winnier, Blessing et al. 1995) sterben bereits während der Gastrulation. Durch diese frühe Lethalität der *Knock-outs* blieb die kardiale Funktion dieser beiden Proteine im Dunkeln. Zu weiterem Erkenntnisgewinn kam es hier erst im neuen Millennium mit der Generierung konditioneller *Knock-outs* von Bmp2 (Ma and Martin 2005) und Bmp4 (Liu, Selever et al. 2004). Beide Gene wurden mithilfe einer Nkx2.5-Cre Linie Herz-spezifisch ausgeschaltet und es zeigte sich, dass die Proteine für die Anlage der endokardialen Kissen im AVC (atrioventrikulären Kanal) und OFT notwendig sind. Bmp2 ist für die Entwicklung der endokardialen Kissen im AVC essentiell. Der Nkx2.5-Cre abhängige Verlust von Bmp2 in embryonalen Herzen verhindert die Bildung des „Cardiac Jelly“ und somit die Anlage der endokardialen Kissen im E9.5 Herzen (Ma, Lu et al. 2005). Der Nkx2.5-Cre vermittelte Verlust von Bmp4 hingegen behindert die Entwicklung der Endokardkissen im OFT. Diese Bmp4-defizienten Embryonen sterben um E13.5 mit Missbildungen in Derivaten der OFT Endokardkissen: Septumdefekte im OFT und membranösen VSD (Liu, Selever et al. 2004).

Neben der Bmp2/4-Gruppe sind auch Vertreter der Gruppe Bmp5/6/7/8-Gruppe im Herzen exprimiert - Bmp5, Bmp6 und Bmp7 – und von ihnen sind ebenfalls konstitutive *Knock-outs* verfügbar. Verschiedene Untersuchungen an ihnen zeigten jedoch, dass die einzelnen Vertreter dieser Gruppe eine entbehrliche Funktion während der Herzentwicklung haben. Der *Bmp5 Knock-out* (King, Marker et al. 1994), der *Bmp6 Knock-out* (Solloway, Dudley et al. 1998) und auch der *Bmp7 Knock-out* (Dudley, Lyons et al. 1995) sind lebensfähig und weisen keinerlei Herzdefekte auf. Durch die enge Verwandtschaft der Proteine dieser Gruppe, lag der Verdacht nahe, dass sie funktionell redundant sind. Dies bestätigte sich in den heute verfügbaren *Doppelknock-outs* von Bmp5/7 sowie Bmp6/7. Der *Doppelknock-out Bmp5/7* ist lethal an Embryonaltag E10.5 und zeigt, neben weiteren dramatischen extrakardialen Defekten, Defekte in den endokardialen Kissen (Solloway and Robertson 1999). Auch der *Bmp6/7 Doppelknock-out* ist embryonal lethal (Kim, Robertson et al. 2001). Der Verlust von Bmp6 und Bmp7 verursacht in dieser Linie eine verzögerte Entwicklung der endokardialen Kissen im OFT, was während der weiteren Entwicklung in Septum- und Klappendefekten resultiert. Darüber hinaus zeigen einige mutante Embryonen eine verminderte Trabekulierung der Ventrikel.

### 2.2.2.2 Bmp-Rezeptor Knock-outs

Weiteren Aufschluss über die Bedeutung der BMP-Signalgebung im Herzen, geben die *Knock-outs* der bekannten BMP-Rezeptoren zu denen heute konstitutive und zum Teil auch konditionelle *Knock-outs* existieren (Tabelle 1).

### 2.2.2.3 Bmp-Rezeptoren TypII

Bereits in den 90er Jahren sind die Activin TypII Rezeptoren Acvr2a und Acvr2b ausgeschaltet worden. Die Deletion des Startcodons und eines Teils des Acvr2a-Signalpeptids hat in der Maus keinen Herzphänotypen zur Folge (Matzuk, Kumar et al. 1995). Acvr2b-defiziente Mäuse hingegen, sind postnatal lethal und weisen eine laterale Asymmetrie, homöotische Transformationen des Skeletts und kardiale Defekte auf. Jedoch waren all diese Defekte auf eine gestörte Achsenfestlegung zurückzuführen (Oh and Li 1997).

Im Gegensatz zu den Activin Typ II Rezeptoren hat die Zerstörung des Bmp TypII Rezeptors Bmpr2 einen frühen embryonal lethalen Phänotyp als Konsequenz. Es existieren heute zwei verschiedene konstitutive *Knock-outs* des Bmpr2-Rezeptors. Der erste wurde im Jahr 2000 von Beppu et al. veröffentlicht. Hier wurde durch die Deletion von Exon 4 und 5 die Transmembran-Domäne, sowie die amino-terminale Region der Kinasedomäne zerstört. Die Entwicklung der homozygot mutanten Embryonen dieses *Knock-outs* (Bmpr2<sup>tm1Kmi</sup>) ist bereits im Eizylinder-Stadium arretiert (Beppu, Kawabata et al. 2000). Drei Jahre später wurden die Folgen eines weiteren Bmpr2 *Knock-outs* veröffentlicht (Bmpr2<sup>tmKml</sup>). Hier wurde eine 2.2 kb lange Region des genomischen Locus deletiert, welche Exon 2 enthält, und in einer Mutation der extrazellulären Domäne resultiert. Homozygot mutante Embryonen sterben zwischen E12 und Geburt und weisen Skelett- wie auch Herzanomalien auf. Im Herzen ist die Septierung des Ausflusstraktes gestört (Delot, Bahamonde et al. 2003). Der Phänotyp dieses Hypomorphs unterstreicht die Bedeutung der BMP-Signalgebung für die normale Entwicklung des OFT, wie sie auch in den *Knock-outs* der BMPs Bmp2 und 4, sowie den *Doppelknock-outs* Bmp5/7 und Bmp6/7, gefunden wurde.

Weitere Einblicke in die Bedeutung der Bmpr2-vermittelten Signale ermöglicht der konditionelle *Knock-out* Bmpr2<sup>tm1.2Enl</sup> (Beppu, Lei et al. 2005; Beppu, Malhotra et al. 2009). Hier ermöglicht die Cre-vermittelte Rekombination der *loxP*-Erkennungssequenzen die Deletion des für die Transmembran- und aminoterminalen Kinasedomäne codierenden Bereichs. Genau wie in dem von Beppu et al. 2000 veröffentlichten konstitutiven *Knock-out*. Durch die Verpaarung der konditionellen Bmpr2<sup>tm1.2Enl</sup> Mauslinie mit verschiedenen Cre-Linien, ist es den Autoren gelungen, die Rolle des Bmpr2-Rezeptors in den verschiedenen Geweben des Herzens näher zu beleuchten.

**Tabelle 1: Konsequenzen der Deletion kardial exprimierter Bmps und Bmp-Rezeptoren im Mausmodell.** ASD: atrialer Septumdefekt, AVC: atrioventrikulärer Kanal, DORV: *Double Outlet Right Ventricle*, (engl.), HHT2: Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie Typ 2 (Morbus Osler), OFT: Ausflusstrakt, VSD: ventrikulärer Septumdefekt.

| Gen                             | Linien                             | Beschreibung   | Phänotyp  | Referenz                            |
|---------------------------------|------------------------------------|--|---|-------------------------------------|
| <b><u>Typ II Rezeptoren</u></b> |                                    |  |   |                                     |
| <b><i>BmprII</i></b>            | $Bmpr2^{tm1Kmi}$                   | Deletion der Transmembran-Domäne sowie N-terminaler Region der Kinasedomäne ( $\Delta$ Exon 4, 5).                               | Homozygote Mutanten sind im Eizylinder-Stadium arretiert.   | <i>Beppu, Kawabata et al. 2000</i>  |
|                                 | $Bmpr2^{tm1Kml}$                   | Mutation der extrazellulären Domäne ( $\Delta$ Exon 2)   | Lethal zwischen E12 und Geburt, Skelett- und Herzanomalien (Septierungsdefekt des OFT).   | <i>Delot, Bahamonde et al. 2003</i> |
|                                 | $Bmpr2^{tm1.2Enl}/Tie2-Cre$        | <i>Bmpr2</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 4, 5) im Endothel/ Endokard.  | Neugeborene sterben spätestens 7d nach der Geburt mit membranösen VSD und verdickten Trikuspidal- sowie Mitralklappen. Normale Positionierung des Ausflusstraktes.  | <i>Beppu, Malhotra et al. 2009</i>  |
|                                 | $Bmpr2^{tm1.2Enl}/Wnt1-Cre$        | <i>Bmpr2</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 4, 5) in Neuralleistenzellen.   | Kleine VSD und anomale Positionierung des Ausflusstraktes (reitende Aorta).   | <i>Beppu, Malhotra et al. 2009</i>  |
|                                 | $Bmpr2^{tm1.2Enl}/SM22alpha-Cre$   | <i>Bmpr2</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 4, 5) in allen kardialen Geweben außer dem Endokards/ Endothels.                          | Perinatal lethal mit VSD und anomaler Positionierung des Ausflusstraktes (reitende Aorta).  | <i>Beppu, Malhotra et al. 2009</i>  |
|                                 | $Bmpr2^{tm1.2Enl}/Mox2-Cre$        | <i>Bmpr2</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 4, 5) im Epiblasten.  | Lethal zwischen E12.5 und P2. DORV begleitet von VSD und ASD.   | <i>Beppu, Malhotra et al. 2009</i>  |
| <b><i>Acvr2a</i></b>            | $Acvr2a^{tm1Zuk}$                  | Deletion einer Region, die das Startcodon und Teile des Signalpeptids codieren.  | Kein Herzphänotyp.  | <i>Matzuk, Kumar et al. 1995</i>    |
| <b><i>Acvr2b</i></b>            | $Acvr2b^{tm1Enl}$                  | 1.4 kb großes, 2 Exons umfassendes Fragment, das für die Transmembrandomäne und einen Teil der Kinase-Domäne codiert, deletiert. | Postnatal lethal mit anomaler lateraler Asymmetrie, homöotischer Transformationen des Skeletts und kardialen Defekten. Alle Defekte lassen sich vermutlich auf eine gestörte Achsenfestlegung zurückführen. | <i>Oh and Li 1997</i>               |
| <b><i>Acvr2a/ Acvr2b</i></b>    | $Acvr2a^{tm1Hsch}/Acvr2b^{tm1Enl}$ | Doppel-Knockout  | Entwicklung ist im Eizylinderstadium arretiert. Keine Entwicklung von Mesoderm.   | <i>Song, Oh et al. 1999</i>         |
| <b><u>Typ I Rezeptoren</u></b>  |                                    |  |   |                                     |
| <b><i>Alk-1 (Acvr1I)</i></b>    | $Acvr1I^{tm1Enl}$                  | Exon 8, das für Kinase Domäne V codiert, wurde deletiert.  | <i>Alk-1</i> homozygote Embryos sterben um E10.5 mit ausgeprägten vaskulären Anomalien. Modell für HHT2.  | <i>Oh, Seki et al. 2000</i>         |
| <b><i>Alk-2 (Acvr2)</i></b>     | $Acvr1^{tm1Enl}$                   | Exon4, das für die Transmembrandomäne codiert, wurde deletiert.  | Lethal während der Gastrulation.  | <i>Gu, Reynolds et al. 1999</i>     |
|                                 | $Acvr1^{tm1Vk}/Wnt1-Cre$           | <i>Alk2</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon7) in Neuralleistenzellen.  | Perinatal lethal aufgrund von OFT- und ventrikulären Septumdefekten. Verhinderte Migration und Differenzierung von Neuralleistenzellen. Gestörte Muskularisierung der Kiemenbogen Arterien.                 | <i>Kaartinen, Dudas et al. 2004</i> |

|   |   |  |  |                                   |
|---|---|--|--|-----------------------------------|
|   | Acvr1 <sup>tm1V<sub>k</sub></sup> /<br>Tie2-Cre                             | <i>Alk2</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon7) im Endothel/ Endokard.   | Um E14.5 embryonal lethal aufgrund von Septum- und Klappendefekten im AVC. Ursächlich ist gestörte EMT.  | Wang, Sridurongrit et al. 2005    |
|   | Acvr1 <sup>tm1V<sub>k</sub></sup> /<br>Myh6-Cre                             | <i>Alk2</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon7) im Myokard.  | Kein Herzphänotyp.   | Wang, Sridurongrit et al. 2005    |
| <b><i>Alk-3</i></b><br><b>(<i>Bmpr1a</i>)</b> | Bmpr1a <sup>tm1B<sub>hr</sub></sup>   | 6.2 kb großes genomisches Fragment deletiert ( $\Delta$ Exon 1 und 2), das Signalpeptid und 30% der extrazellulären Domäne codiert.                    | Gastrulationsdefekte und lethal vor E9.5.  | Mishina, Suzuki et al. 1995       |
|   | Bmpr1a <sup>tm1B<sub>hr</sub></sup> /<br><i><math>\alpha</math>MHC</i> -Cre | <i>Alk3</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 2) im Myokard  | Embryonen sterben um E10.5, Herzdefekte umfassen VSD, Trabekulierungs- sowie AVC Kissenefekte. Keine Defekte im OFT. Erhöhte Apoptose in Kardiomyozyten. | Gaussin, Van de Putte et al. 2002 |
|   | Bmpr1a <sup>tm2.2B<sub>hr</sub></sup> /<br>Wnt1-Cre                         | <i>Alk3</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 2) in Neuralleistenzellen.   | Lethal zwischen E11.5 und E12.5. OFT-Septierungsdefekt, verminderte Proliferation in den Ventrikeln.   | Stottmann, Choi et al. 2004       |
|   | Bmpr1a <sup>tm1B<sub>hr</sub></sup> /<br>Gata6-Cre                          | <i>Alk3</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 2) in AVC-Kardiomyozyten.  | Kardiale Klappen- und Reizleitungsdefekte  | Gaussin, Morley et al. 2005       |
|   | Bmpr1a <sup>tm2.2B<sub>hr</sub></sup> /<br>Isl1-Cre                         | <i>Alk3</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 2) in Kardiomyozyten.  | Embryonal lethal zwischen E10.5 und E14.5. Herz- und Gliedmaßenefekte. Herzanomalien umfassen OFT- und RV Defekte, VSD und ASD, Klappendefekte.          | Yang, Cai et al. 2006             |
|   | Bmpr1a <sup>tm2.2B<sub>hr</sub></sup> /<br>Flk1-Cre                         | <i>Alk3</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 2) im Endothel   | Embryonal lethal zwischen E10.5 und E11.5. Normale Hämatopoese. Gestörte Gefäßentwicklung, keine Kissenzellen im AVC, OFT Kissen unauffällig.            | Park, Lavine et al. 2006          |
|   | Bmpr1a <sup>tm2.2B<sub>hr</sub></sup> /<br>Tie2-Cre                         | <i>Alk3</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 2) im Endothel/Endokard.   | Embryonal lethal zwischen E11.5 und E12.5. Vaskuläre Leckage und anomale Zellularisierung der AVC-Kissen.  | Song, Fassler et al. 2007         |
|   | Bmpr1a <sup>tm2.2B<sub>hr</sub></sup> /<br>SM22 $\alpha$ -Cre               | <i>Alk3</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 2) in allen kardialen Geweben außer dem Endokards/ Endothels.  | Embryonal lethal um E11. Dünnes Myokard einhergehend mit verminderter Proliferation in Kardiomyozyten. Dilatation der Aorta und großer Gefäße.           | El-Bizri, Guignabert et al. 2008  |
| <b><i>Alk-6</i></b><br><b>(<i>Bmpr1b</i>)</b> | Bmpr1b <sup>tm1K<sub>ml</sub></sup>   | $\Delta$ Exon 1  | Kein Herzphänotyp  | Yi, Daluiski et al. 2000          |
| <b>Kardial exprimierte BMPs</b>               |   |  |  |                                   |
| <b><i>Bmp-2</i></b>                           | Bmp2 <sup>tm1B<sub>rd</sub></sup>   | Deletion der gesamten genomischen Region, die das reife Peptid codiert.  | Lethal zwischen E7.5 und E10.5. Amnion/Chorion-Defekte sowie frühe Herzdefekte: Miss-Positionierung der Herzanlage.                                      | Zhang and Bradley 1996            |
|   | Bmp2 <sup>tm1J<sub>fm</sub></sup> /<br><i>Nkx2.5</i> -Cre                   | <i>Bmp2</i> -Deletion ( $\Delta$ Exon 3, codiert für reifes Protein) in Kardiomyozyten.  | Lethal an E10.5. Bildung des "cardiac jelly" erfolgt nicht, keine EMT und somit keine Anlage der Endokardkissen im AVC.                                  | Ma, Lu et al. 2005                |
| <b><i>Bmp4</i></b>                            | Bmp4 <sup>tm1B<sub>lh</sub></sup>   | Deletion des genomischen Fragments, das den gesamte Bereich von Exon1 ab dem 7. Codon umfasst. Darüber hinaus wurden in Exon2ein Stop-Codon inseriert. | Lethal zwischen E6.5 und E9.5  | Winnier, Blessing et al. 1995     |

|                  |  |  |   |                                     |
|------------------|--|--|---|-------------------------------------|
|                  | Bmp4 <sup>tm1Jfm</sup> /<br>Nkx2.5-Cre   | Bmp4-Deletion ( $\Delta$ Exon 4) im Myokard.                                 | Embryonal lethal um E13.5. Anomale Morphogenese der Kiemenbogenarterien sowie gestörte OFT-Septierung und membranöser VSD.  | Liu, Selever <i>et al.</i> 2004     |
|                  | Bmp4 <sup>tm1Jfm</sup> /<br>Mef2c-AHF-<br>Cre  | Bmp4-Deletion ( $\Delta$ Exon 4) in Kardiomyozyten nahe des Kissens des OFT. | Neugeborene sterben kurz nach der Geburt. OFT-Septierungsdefekte, VSD und Klappendefekte.   | McCulley, Kang <i>et al.</i> 2008   |
| <b>Bmp5</b>      | Bmp5 <sup>se</sup>   | Spontane Punktmutation führt zu verkürztem Peptid ohne C-terminale Domäne.   | Lebensfähig, kein Herzphänotyp.   | King, Marker <i>et al.</i> 1994     |
| <b>Bmp6</b>      | Bmp6 <sup>tm1Rob</sup>   | Exon 2 Deletion ( $\Delta$ Exon 2).  | Lebensfähig, kein Herzphänotyp  | Solloway, Dudley <i>et al.</i> 1998 |
| <b>Bmp7</b>      | Bmp7 <sup>tm1Rob</sup>   | Genomische Deletion, die Exon1 und stromaufwärts gelegene Region umspannt.   | Postnatal lethal, kein Herzphänotyp   | Dudley, Lyons <i>et al.</i> 1995    |
| <b>Bmp5/Bmp7</b> | Bmp5 <sup>se</sup> /Bmp5 <sup>se</sup><br>;<br>Bmp7 <sup>tm1Rob</sup> /Bmp7 <sup>tm1Rob</sup>      | Doppel-Knockout  | Embryonal lethal an E10.5. Defekte im rostralen Neuralrohr, der Allantois, Herzen (Kissendefekte), den Kiemenbögen, Somiten und ventralen Körperwand.                               | Solloway and Robertson 1999         |
| <b>Bmp6/Bmp7</b> | Bmp6 <sup>tm1Rob</sup> /Bmp6 <sup>tm1Rob</sup> /<br>Bmp7 <sup>tm1Rob</sup> /Bmp7 <sup>tm1Rob</sup> | Doppel-Knockout  | Embryonal lethal zwischen E10.5 und E15.5. Verzögerte Entwicklung der OFT Kissen. Einige Mutanten weisen zusätzlich VSD und Klappenanomalien auf.                                   | Kim, Robertson <i>et al.</i> 2001   |
| <b>Bmp10</b>     | Bmp10 <sup>tm1Shou</sup>   | Deletion des gesamten codierenden Bereichs ( $\Delta$ Exon 1 und 2).         | Embryonal lethal zwischen E9.5 und E10.5. Kardiale Defekte umfassen ein hypoplastisches ventrikuläres Myokard (Trabekulierungs-Defekt) und Missbildungen der Kissen im AVC und OFT. | Chen, Shi <i>et al.</i> 2004        |

Durch die Verwendung der Mauslinien TEK (Tie2)-Cre, Wnt1-Cre, SM22 $\alpha$ -Cre und Mox2-Cre gelang es ihnen, Bmpr2 im Endothel/Endokard, in kardialen Neuralleistenzellen und ihren kardialen Derivaten, allen kardialen Geweben mit Ausnahme des Endokards, als auch im Epiblasten funktionsunfähig zu machen. Die TEK-Cre vermittelte Deletion im Endothel/Endokards resultiert in einem postnatal lethalem Phänotypen. Die Neugeborenen sterben spätestens an P7 mit einem membranösen VSD, sowie verdickten Mitral- und Trikuspidalklappen. Die Positionierung des Ausflusstraktes ist in wildtypischer Konformation. Der Bmpr2 Funktionsverlust in Neuralleistenzellen hingegen führt zu kleinen VSDs und einer anomalen Positionierung des Ausflusstraktes (reitende Aorta). Ein ähnlicher Phänotyp ist in den Mutanten zu beobachten, in denen, SM22 $\alpha$ -Cre getrieben, Bmpr2 in allen kardialen Geweben mit Ausnahme des Endokards ausgeschaltet wurde. Nur die Mox2-Cre getriebene Deletion führt zu einem ernsteren Phänotyp. Hier sterben die mutanten Embryonen zwischen E12 und P2 mit DORV (Double Outlet Right Ventricle, *engl.*; die großen Arterien entspringen ausschließlich aus dem rechten Ventrikel), VSDs sowie atrialen Septumdefekten (ASDs). In keinem der konditionellen *Knock-outs* ist eine Beeinträchtigung der Myokardentwicklung festgestellt worden. Deshalb ist eine exklusive Bedeutung

von *Bmpr2* für die Ausflusstrakt-Positionierung, AVC-Kissen Entwicklung und Klappenbildung im sich entwickelnden Herzen gefolgert worden (*Beppu, Malhotra et al. 2009*).

Bereits in den neunziger Jahren ist die Bedeutung der übrigen zwei bekannten Bmp-Rezeptoren des Typ II mithilfe von konstitutiven *Knock-outs* untersucht worden. Bereits 1995 ist die Phänotypbeschreibung von *Acvr2a* (*ActRIIA*) veröffentlicht worden. Ein Teil der homozygot mutanten Embryonen sterben bei der Geburt mit Missbildungen des Skeletts, jedoch ein Herzphänotyp wurde nicht beobachtet (*Matzuk, Kumar et al. 1995*). Vier Jahre später folgte die Veröffentlichung des *Acvr2b* (*ActRIIB*)-Rezeptor *Knock-outs*. Der Verlust dieses Rezeptors verursacht eine postnatale Lethalität mit gestörter lateraler Asymmetrie, homöotischer Transformationen des Skeletts und kardialen Defekten. Die kardialen Defekte umfassen eine randomisierte Herzposition, Misspositionierung der großen Gefäße, ventrikuläre und atriale Septumdefekte. Alle Defekte lassen sich laut der Autoren auf eine gestörte Achsenfestlegung zurückführen (*Oh and Li 1997*). Die isolierten Funktionsverlustanalysen zeigen, dass der Verlust eines *Acvr2*-Rezeptors keinen direkten Einfluss auf die Kardiogenese hat, falls die Septumdefekte im *Acvr2b Knock-out* tatsächlich nur auf eine gestörte Achsenfestlegung zurückzuführen sind. Um zu überprüfen, ob sich die beiden *Acvr2*-Rezeptoren funktionell komplementieren, generierten *Song et al.* einen *Acvr2a/ Acvr2b Doppelknock-out*. Hier zeigte sich, dass tatsächlich eine funktionelle Redundanz zwischen diesen beiden Rezeptoren besteht, denn der Phänotyp des *Doppelknock-outs* ist wesentlich schwerwiegender als der einzelner Rezeptor *Knock-outs*. Der Verlust beider *Acvr2*-Rezeptoren führt zum Arrest der Embryogenese im Eizylinderstadium. Hier ist die Bildung des Primitivstreifens und Mesoderms verhindert (*Song, Oh et al. 1999*). Diese frühe Lethalität des *Doppelknock-outs* verhindert die Aufklärung der *Acvr2*-vermittelten Signalgebung während der Herzentwicklung. Aufgrund ihres Expressionsmusters im murinen Embryo (*Feijen, Goumans et al. 1994*) sind sie zwar potentielle Kandidaten, die während der Kardiogenese Bmp-Signale vermitteln, jedoch sind bis heute keine konditionellen *Knock-outs* verfügbar, die eine kombinierte Deletion beider *Acvr2*-Rezeptoren spezifisch im embryonalen Herzen ermöglichen würden.

#### **2.2.2.4 Bmp-Rezeptor TypI Knock-outs**

Bmp TypI-Rezeptoren sind die Rezeptoren, die u.a. die Spezifität des Bmp-Signals vermitteln. Deshalb ist diese Ebene der Signalgebung ebenfalls ein wichtiger Ansatzpunkt, um die Funktions- und Wirkungsweise der Bmp-Signalgebung im Herzen aufzuklären. So überrascht es nicht, dass auch hier bereits eine Vielzahl von konstitutiven und konditionellen *Knock-outs* generiert worden sind und zu unserem heutigen Kenntnisstand, bezüglich der Bedeutung der BMPs für das kardiovaskuläre System, beigetragen haben.

**Alk-3 (*Bmpr1a*).** Im Jahr 1995 sind die ersten Ergebnisse eines Bmp TypI Rezeptor *Knock-outs* veröffentlicht worden. *Mishina et al.* war es gelungen, Alk-3 defiziente Embryonen zu generieren. Allerdings hat dies nicht wesentlich zur der Entschlüsselung der Alk-3 Funktion im Herzen beitragen können, da die Alk-3 defizienten Embryonen bereits Gastrulationsdefekte aufweisen und spätestens am E9.5 lethal sind (*Mishina, Suzuki et al. 1995*). Mehr Informationen konnte dann der konditionelle Alk-3 *Knock-out* ( $Bmpr1a^{tm2.2Bhr}$ ) liefern, welcher ebenfalls von *Mishina et al.* im Jahr 2002 veröffentlicht worden ist (*Mishina, Hanks et al. 2002*). Die Kombination dieser Mauslinie mit verschiedensten Cre-Linien zeichnet ein deutlich schärferes Bild der Aufgaben des Alk-3 Rezeptors im kardiovaskulären System (Tabelle 1). Bereits im selben Jahr wurden die Ergebnisse der Deletion des Alk-3 Rezeptors im Myokard mithilfe einer  $\alpha MHC$ -Cre (*Myh6*-Cre) Linie veröffentlicht (*Gaussin, Van de Putte et al. 2002*). Die homozygot mutanten Embryonen sind lethal um E15.5 aufgrund einer gestörten Herzentwicklung, die Entwicklungsdefekte der AVC-Kissen und ventrikuläre Septumdefekte umfasst. Auch eine gestörte Trabekulierung wurde hier beschrieben, die laut der Autoren auf eine verstärkte Apoptose in Kardiomyozyten zurück zu führen ist. Sie folgerten, dass Alk-3 für das Überleben von Kardiomyozyten notwendig ist und proklamieren aufgrund der Kissendefekte einen „Crosstalk“ zwischen Myokard und Kissen, der für die AVC-Klappenbildung essentiell ist.

In den nächsten Jahren folgten dann stetig weitere Veröffentlichungen zu Gewebe-spezifischen *Alk-3 Knock-outs*. So wurde eine  $SM22\alpha$ -Cre vermittelte Alk-3 Deletion beschrieben, die zum Verlust des funktionsfähigen Rezeptors in allen kardialen Geweben mit Ausnahme des Endokards führt (*El-Bizri, Guignabert et al. 2008*). In Bezug auf die Kardiogenese sind hier ähnliche Entwicklungsdefekte beschrieben, wie für die  $Bmpr1a^{tm2.2Bhr}/\alpha MHC$ -Cre homozygot mutanten Embryonen. *Gaussin et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass Alk-3 nicht ausschließlich für die frühe Entwicklung der Kissen im AVC wichtig ist, sondern auch für die normale Entwicklung der atrioventrikulären Herzklappen benötigt wird. Dies gelang ihnen durch den exklusiven konditionellen *Alk-3 Knock-out* in Kardiomyozyten des atrioventrikulären Kanals mithilfe der *Gata6*-Cre Linie. Neben einer gestörten Herzklappenentwicklung weisen die mutanten  $Bmpr1a^{tm1Bhr}/Gata6$ -Cre Mäuse eine Missbildung des *Annulus Fibrosus* auf, einem fibrösen Ring am Übergang zwischen Atrium und Ventrikel, was in einer frühzeitigen ventrikulären Erregung resultiert (*Gaussin, Morley et al. 2005*).

Doch auch außerhalb der Kardiomyozyten hat Alk-3 essentielle Funktionen für die Kardiogenese. Mithilfe einer *Wnt1*-Cre Linie konnten *Stottmann et al.* die Bedeutung des Alk-3 Rezeptors in Neuralleistenzellen und seinen Derivaten für die Herzentwicklung aufzeigen. Die spezifische Ausschaltung in Neuralleistenzellen resultiert in embryonaler Lethalität zwischen E11.5 und E12.5,

aufgrund von Missbildungen des OFTs und ventrikulären Myokardiums (Stottmann, Choi et al. 2004).

Embryonen mit funktionsunfähigen Alk-3 Rezeptoren im Endothel bzw. im Endokard (*Tie2-Cre*) sterben zwischen E11 und E12.5 mit Hämorrhagie, verursacht durch vaskuläre Leckage. Nähere Untersuchungen des embryonalen Herzen ergaben außerdem, dass aufgrund verminderter EMT und Proliferation mesenchymaler Kissenzellen die Zellularisierung der AVC Kissen gestört ist (Song, Fassler et al. 2007). Zu ähnlichen Ergebnissen war auch die Forschergruppe gelangt, die Alk-3 im Endothel/Endokard mithilfe der *Fkl1-Cre* Mauslinie ausgeschaltet hatte (Park, Lavine et al. 2006).

**Alk-6 (Bmpr1b).** Fünf Jahre nach der Veröffentlichung des konstitutiven *Alk-3 Knock-outs* wurden der *Knock-out* des nächst verwandten Rezeptors -Alk-6 (*Bmpr1b*)- veröffentlicht (Yi, Daluiski et al. 2000). Da Alk-6 nur in geringem Maße im Herzen und um E10.5 überhaupt nicht kardial transkribiert wird, überrascht es nicht sehr, dass der konstitutive KO keinen Herzphänotyp aufweist. Insbesondere, da auch funktionelle Redundanzen mit anderen Bmp Typ I-Rezeptoren wie etwa Alk-3 sehr wahrscheinlich sind (Dewulf, Verschueren et al. 1995; Chen, Yong et al. 2006).

**Alk-2 (Acvr1).** Mit der Generierung des konstitutiven *Alk-2 Knock-outs* gelang 1999 erneut der Beweis für die essentielle Bedeutung eines BMP TypI-Rezeptors für die frühe Embryonalentwicklung, denn Alk-2 defiziente Embryonen sterben bereits während der Gastrulation (Gu, Reynolds et al. 1999). Fünf Jahre später gelang es dann, durch die Verfügbarkeit eines konditionellen *Alk-2* Allels (*Acvr1<sup>tm1V<sub>k</sub></sup>*), seine Bedeutung für die Kardiogenese zu studieren. Die *Wnt1-Cre* abhängige Alk-2 Ablation in Neuralleistenzellen hat, genau wie die *Wnt1-Cre* abhängige Alk-3 Ablation, OFT- und ventrikuläre Septumdefekte zur Folge (Kaartinen, Dudas et al. 2004). Jedoch findet sich hier kein ventrikulärer Myokarddefekt.

**Alk-1 (Acvr11).** Erst seit jüngster Zeit gibt es Evidenzen für eine Interaktionen zwischen dem Alk-1 Rezeptor und Mitgliedern der Bmp-Familie. So konnte gezeigt werden, dass BMP9 und BMP10 eine Wirkung mithilfe dieses Rezeptors entfalten können (David, Mallet et al. 2007; David, Mallet et al. 2008). Doch bereits im Jahr 2000 ist der konstitutive *Alk-1 Knock-out* und seine Folgen veröffentlicht worden. Homozygot mutante Mäuse sterben um E10.5 mit ernsten vaskulären Anomalien, die sich durch Fusion der Kapillaren zur kavernen Gefäßen und Hyperdilatation der großen Gefäße auszeichnet. Des Weiteren scheint die Differenzierung der glatten Muskelzellen gestört zu sein (Oh, Seki et al. 2000). Ferner beschreiben die Autoren eine im Vergleich zum Wildtyp „unreif“ anmutendes Herz, jedoch genauere Analysen des Herzphänotypen fehlen. Vermutlich verschleiert der penetrante vaskuläre Phänotyp die Bedeutung des Alk-1 Rezeptors im Herzen, der hier im Endokard und in den AVC-Kissen exprimiert wird. Ein konditionelle Alk-1 *Knockout*-Linie böte die Möglichkeit, seine Funktion Herz-spezifisch zu untersuchen. Diese Linie

ist zwar seit 2009 verfügbar (*Park, Lee et al. 2008*), jedoch gibt es bisher keine Berichte über Untersuchungen zur Alk-1 Funktion während der Kardiogenese.

### **2.2.3 BMP10 - die Herzensangelegenheit**

Bmp10 ist ein besonderes Mitglied der Bmp-Familie, denn es ist das einzige Familienmitglied, das exklusiv im murinen Herzen exprimiert wird (*Neuhaus, Rosen et al. 1999*), wo es ein höchst dynamisches Expressionsmuster aufweist. *Chen et al.* zeigten, dass im Mausembryo *Bmp10* ab E8.75 transient in den Trabekeln der sich entwickelnden Ventrikel exprimiert wird. Hinzu kommt ab E13.5 eine Expression in den Atrien. Laut der Autoren vermindert sich die ventrikuläre Expression im Verlauf der Embryogenese, bis sie ab E16.5 kaum noch in den Ventrikeln detektierbar ist, während die Expression zunächst in beiden Atrien erhalten bleibt, bis sie im adulten Herzen exklusiv im Myokard des rechten Atrium detektierbar ist (*Chen, Shi et al. 2004*). Ungefähr zur selben Zeit wurden zwei weitere Arbeiten veröffentlicht, die das *Bmp10* Expressionsmuster mithilfe von *in situ* Hybridisierungen in *whole mounts* und Dünnschnitten von Hühnerembryonen aufzeigten. Die Arbeit von *Teichmann und Kessel* demonstriert, dass *Bmp10* ab HH13 (Hamburger und Hamilton Stadium 13) in der ventrolateralen Wand des embryonalen Hühnerherzen detektierbar ist. Der Region, die mit dem späteren primitiven Ventrikel korrespondiert. Ab HH15, ein Stadium in dem das ventrikuläre Myokard bereits mehrschichtig ist, beschreiben sie *Bmp10* Expressionsdomänen in der innersten Schicht der wachsenden Trabekel, während das kompakte Myokard, als auch das Endokard, frei von *Bmp10* Transkripten ist. Ähnlich wie in der Maus, fanden sie ab HH32 keine *Bmp10* Transkripte mehr im ventrikulären Kompartiment (*Teichmann and Kessel 2004*). Die zweite Arbeit, von *Somi und Buffing*, beschreibt ein deutlich breiteres *Bmp10* Expressionsmuster im embryonalen Hühnerherzen. Sie demonstriert, dass bereits ab HH10 *Bmp10* Transkripte im atrialen des Pol im Myokard detektierbar sind. Laut der Autoren wird *Bmp10* ab HH14 in der gesamten myokardialen Wand des Herzen, mit Ausnahme des AVCs, exprimiert, bis sie ab HH22 sukzessive abnimmt. Diese Beschreibung deckt sich weitestgehend mit den anderen beiden zuvor erwähnten Arbeiten. Jedoch bleibt, laut ihrer Ergebnisse, die *Bmp10* Expression im Myokard der Atrien unverändert und sie beschreiben darüber hinaus eine *Bmp10* Expressionsdomäne im ventrikulären Endokard. Des Weiteren fanden sie ab HH22 (entspricht in der Maus ca. E12) *Bmp10* Transkripte im Endothel der Sinusoids der embryonalen Hühnerleber (*Somi, Buffing et al. 2004*), blieben jedoch bekräftigende Abbildungen schuldig.

Entsprechend der dynamischen *Bmp10* Expression während der Kardiogenese, schlossen alle genannten Autoren, dass *Bmp10* eine Rolle während der Trabekulierung des Myokards, sprich bei der Entwicklung des Kraft-generierendes Muskels, eine bedeutsame Rolle spielt. Zudem fanden

*Chen et al.*, dass die Bmp10 Expression in Herzen *FKBP12* (*EK506 binding protein 12*)-defizienter Mäusen erhöht ist. Diese Mäusen entwickeln eine dilatierte Kardiomyopathie, die sich im Weiteren durch ventrikuläre Septumdefekte (VSDs), Hypertrabekulierung und Nicht-Kompaktierung des linken Ventrikelmyokards auszeichnet (*Shou, Aghdasi et al. 1998*). Um die Funktion von Bmp10 während der Trabekulierung zu beleuchten, generierten sie einen konstitutiven *Bmp10 Knock-out* und fanden, dass Bmp10 ein essentieller Faktor für die Herzentwicklung ist. *Bmp10*-defiziente Mäuse sterben während der frühen Embryonalentwicklung zwischen E9.5 und E10.5 mit einem unterentwickelten Herzen, das sich vom wildtypischen Herz durch hypoplastische Ventrikel, kaum vorhandene ventrikuläre Trabekel sowie eine anomale Entwicklung der endokardialen Kissen im Ausflusstrakt als auch im atrioventrikulären Kanal unterscheidet. Ursächlich für die hypoplastischen Herzen ist laut den Autoren eine, durch die BMP10-Defizienz verursachte, verminderte kardiale Proliferation (*Chen, Shi et al. 2004*).

Im selben Jahr erschien eine weitere Arbeit, die, ähnlich wie in den *FKBP12*-defizienten Herzen gefunden, eine ektopische *Bmp10* Transkription in Ventrikeln adulter, hypertrabekulierter Herzen nachwies, die darüber hinaus nicht die normale Kompaktierung des ventrikulären Myokards erfahren hatten. Die Hypertrabekulierung war in diesen Herzen durch die konditionelle *Nkx2.5*-Deletion in Kardiomyozyten hervorgerufen wurden. Um zu testen, ob BMP10 für die Hypertrabekulierung und Nicht-Kompaktierung verantwortlich ist, wurde von den Autoren durch Pronukleus-Injektion transgene Embryonen generiert, die *Bmp10* unter einem ANF-Promotor ektopisch im gesamten Myokard des Ventrikel und Atrien exprimieren sollten. Sie erhielten 77 E14.5 Embryonen, von denen 14 positiv für das Transgen waren und alle Ödeme aufwiesen. Histologische Untersuchungen ergaben, dass acht der Embryonen ventrikuläre Hypertrabekulierung und Nicht-Kompaktierung aufwiesen und die Autoren sahen somit ihre These bestätigt (*Pashmforoush, Lu et al. 2004*). Zwei Jahre später wurde eine weitere Arbeit über die Bedeutung von Bmp10 für das myokardiale Wachstum veröffentlicht. Mithilfe einer transgenen Mauslinie, die Bmp10 unter einem  $\alpha$ MHC-Promotor ektopisch exprimiert, machte die Studie deutlich, dass der Verlust von Bmp10 im ventrikulären Myokard für das hypertrophe Wachstum postnataler Kardiomyozyten notwendig ist. Somit ist BMP10 für das proliferative Wachstum des Herzens während der Kardiogenese essentiell, während ein abnehmendes BMP10 Signal am Ende der Embryonalentwicklung und schließlich im postnatalen Herzen notwendig ist, um das hypertrophe Wachstum des Herzens zu ermöglichen (*Chen, Yong et al. 2006*).

### **2.3 Ziel dieser Arbeit**

Der BMP/Smad-Signalweg ist an der Regulation vielfältiger Prozesse der Kardiogenese beteiligt und aufgrund dieser Vielfalt an kardialen Aktivitäten ein interessantes mögliches Ziel therapeutischer Ansätze zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen. Doch bisher ist die Bedeutung vieler Faktoren der Signalkette für das embryonale und adulte kardiovaskuläre System unbekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte BMP10, das während der Adoleszenz als einziges BMP-Familienmitglied exklusiv im Herzen exprimiert wird, erforscht werden. Insbesondere seine Bedeutung für erworbene und angeborene Herzerkrankungen galt es zu untersuchen. Darüber hinaus sollte ein Modell entwickelt werden, das die Identifizierung von TGF- $\beta$ /Smad und/oder BMP/Smad-sensiblen Zielgenen *in vivo* ermöglicht.

### **3 MATERIAL & METHODEN:**

Chemikalien in der Qualität reinst oder pro analysis, Enzyme, Kit-Systeme und sonstige Materialien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Applichem GmbH, J.T. Baker, Fluka, Invitrogen, Jena Bioscience, New England Biolabs (NEB), Merck, Roche Molecular Biochemicals, Roth, Sigma und Macherey & Nagel. Sämtliche Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit Wasser aus einer hauseigenen Millipore MilliQ-Anlage angesetzt, nach Bedarf autoklaviert oder steril filtriert. Auch die benötigten Gefäße, Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden bei Bedarf durch Backen in trockener Hitze sterilisiert.

#### **3.1 Bakterien**

##### **3.1.1 Lösungen, Reagenzien und Medien**

###### **Ampicillin-Stammlösung**

100 mg/ml Ampicillin Natriumsalz  
in H<sub>2</sub>O gelöst, steril filtriert, bei -20°C gelagert

###### **Chloramphenicol-Stammlösung**

20 mg/ml Chloramphenicol  
in 100% Ethanol, bei -20°C im Dunkeln gelagert

###### **Kanamycin-Stammlösung**

50 mg/ml Kanamycinsulfat  
in H<sub>2</sub>O gelöst, steril filtriert, bei -20°C gelagert

###### **LB-Agar**

35 g/L LB-Agar (Lennox)  
in H<sub>2</sub>O, autoklaviert nach Angaben des Herstellers (Roth)

###### **LB-Medium**

20 g/L LB-Medium (Lennox)  
in H<sub>2</sub>O, autoklaviert nach Angaben des Herstellers (Roth)

##### **3.1.2 Verwendete Bakterienstämme**

***Escherichia coli XL1 Blue*** (Stratagene):

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F<sup>+</sup>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

***Escherichia coli SW102*** (Warming, Costantino et al. 2005):

Stammt ab von DY380 (Lee, Yu et al. 2001): F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*dlacZ* M15 Δ*lacX74 deoR recA1 endA1 araD139* Δ(*ara, leu*) 7649 *galU galK rspL nupG* [ *λcI857 (cro-bioA)* <math>\diamond</math> *tet*]. Zusätzlich enthält das Bakterium ein *gal* Operon, dem die *galK* Kasette fehlt (Δ*galK*).

*Escherichia coli* 294-Flp/294-Cre (Gene Bridges): Leiten sich ab von dem Wildtypstamm MM294. Genotyp: MM294: *endA*, *thiA*, *hsdR17*, *supE44*. Die *E. coli* Stämme 294-Cre und 294-Flp exprimieren entweder Cre- oder Flp-Rekombinase unter der Kontrolle des  $\lambda$ PR-Promotors, der erst bei 37°C eine Expression von *Cre* bzw. *Flp* zulässt.

### **3.1.3 Kultivierungsverfahren**

Die Kultivierung der oben aufgeführten Bakterienstämme erfolgte im Luria-Bertani (LB)-Medium nach Lenox [5 g/L NaCl, 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt]. Nährböden enthielten zusätzlich 15 g/L Agar. Antibiotika wurden in Konzentrationen von 100 µg/ml (Ampicillin), 50 µg/ml (Kanamycin) oder 20 µg/ml (Chloramphenicol) zugesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte standardmäßig bei 37 °C, aerob in Schüttelkolben.

### **3.1.4 Lagerung**

Bakterien wurden auf mit Parafilm® umwickelten Agarplatten kopfüber bei 4°C für vier Wochen gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden Bakterien in Form von Glycerin-Stocks bei -80°C eingefroren. Für den Glycerin-Stock wurden 0,7 ml 80% steriles Glycerin mit 0,7 ml einer Übernachtskultur des gewünschten Bakteriums vermischt.

### **3.1.5 Transformation kompetenter Bakterien**

Viele Bakterien, darunter auch *E.coli*, nehmen DNA unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang aus dem umgebenden Medium auf. Um diese Bakterien wirksam zu transformieren, müssen die Zellen physikalisch und/oder chemisch behandelt werden. So wird ihre Fähigkeit verstärkt, DNA aufzunehmen. Zellen, die eine solche Behandlung durchlaufen haben, bezeichnet man als kompetent.

#### **3.1.5.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien**

Durch die Pulse eines sich entladenden Kondensators wird kurzzeitig ein elektrisches Feld erzeugt, das in Zellwänden Löcher hervorruft, die sich sofort wieder schließen. Fremd-DNA kann durch diese Öffnungen in Bakterien-, Pflanzen- und sogar Säugetierzellen eingeführt werden. Mit der Elektroporation können hohe Transformationsraten erzielt werden (*Andre and Mir 2004*). Für die

Transformation von Bakterien durch Elektroporation muss die Bakteriensuspension also einen niedrigen Salzgehalt haben, um ein zu schnelles Abfallen der angelegten Spannung, und damit eine ineffiziente Transformation, zu vermeiden. Um dies zu erreichen wurden 600 ml LB-Medium mit 12 ml einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Schüttler (180 rpm) inkubiert, bis eine optische Dichte OD<sub>600</sub> von 0.5-0.6 erreicht war. Die Bakteriensuspension wurde dann in sechs Sorvall® Zentrifugenbecher abgefüllt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation der Bakteriensuspension für 15 min bei 0°C und 3500 rpm (Zentrifuge: Sorvall® Evolution RC, Rotor:SLA-1500). Das Bakteriensediment wurde, nachdem es sofort wieder auf Eis gestellt wurde, in 100 ml eiskaltem sterilen Wasser durch Schütteln der Zentrifugenbecher in Eiswasser resuspendiert. Anschließend wurden die Zentrifugenbecher mit sterilem kaltem Wasser aufgefüllt und die Bakterien im Anschluss erneut abzentrifugiert, 15 min bei 0°C und 3500 rpm. Erneut wurde das erhaltene Bakterienpellet in kaltem sterilen Wasser resuspendiert, diesmal in 50 ml. Anschließend wurden jeweils zwei Bakteriensuspensionen vereint und weitere 100 ml kaltes steriles Wasser dazu gegeben. Wieder folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 0°C und 3500 rpm. Das eine Bakterienpellet wurde in 40 ml kaltem Wasser resuspendiert und die Suspension auf das andere Pellet gegeben und dieses ebenfalls resuspendiert. So wurde dann auch mit dem dritten Pellet verfahren. Die Bakteriensuspension wurde in ein 50 ml Falcon umgefüllt und in einer Heraeus® Untertischzentrifuge mit 5500 rpm für 20 min bei 0°C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde schließlich in 2 ml sterilen und kalten 10% Glycerin resuspendiert und 50 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorf® Reaktionsgefäße pipettiert, welche sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden und für die weitere Lagerung bei -80°C aufbewahrt wurden.

Die Kompetenz eines Bakterien-Aliquots ist festgelegt durch das Verhältnis transformierter Bakterienkolonien pro µg eingesetzter DNA. Es wurden nur elektrokompetente Zellen weiterverwendet, deren Kompetenz zwischen 10<sup>6</sup>/µg und 10<sup>8</sup>/µg lag.

### **3.1.5.2 Transformation elektrokompetenter Bakterien**

Zunächst wurde ein 50 µl Aliquot der elektrokompetenten *E. coli* Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µl (5 pg - 100 ng) möglichst salzfreier DNA-Lösung versetzt. Falls die DNA-Lösung sehr salzhaltig war, wurde eine Tropfen-Dialyse mit einem Millipore MF™-Membranfilter (0.025µm VSWP) durchgeführt. Das Bakterien/DNA-Gemisch wurde in eine vorgekühlte 1mm-Elektroporationsküvette (peQlab) pipettiert und mithilfe des Genepulser System (Bio-Rad) elektroporiert. Die Bedingungen für die Elektroporation waren: 2.5 µV, 25 µF, and 200 Ω. Anschließen wurden 950µl LB-Medium zu den Bakterien pipettiert, alles in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 37°C unter Schütteln (300-500 rpm) 30 min lang inkubiert.

Abschließend wurde mithilfe einer Eppendorf Tischzentrifuge die Bakterien pelletiert (30 sec, 14.000 rpm), in 100µl LB-Medium resuspendiert und auf einen Antibiotika-haltigen LB-Agar Nährboden ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zwecks Identifizierung transformierter Klone wurden mit Einzelkolonien Flüssigkulturen (2-5 ml) angesetzt und die enthaltene DNA nach der „Mini-Präparation“ (3.2.3.1) restriktionsenzymatisch (3.2.5.1) analysiert.

## 3.2 Nukleinsäuren

### 3.2.1 Lösungen & Reagenzien

#### **α[32P]-dCTP (Southern Blot)**

#### **DEPC-H<sub>2</sub>O**

0,1% ( v/v ) Diethylpyrocarbonat  
in ddH<sub>2</sub>O

#### **Ladepuffer**

50% (v/v) Glycerin  
2% Orange G

#### **Lösung A**

50 mM Tris-HCl, pH 8  
4 % Triton X-100  
2.5 M LiCl  
62.5 mM EDTA

#### **Lysispuffer(ES)**

100 mM Tris-HCl, pH 8.5  
5 mM EDTA  
0,2 % SDS  
200 mM NaCl  
80 µg/ml Proteinase K  
(Proteinase K immer frisch zusetzen)

#### **Puffer I**

10 mM EDTA, pH 8  
50 mM Tris-HCl, pH 8  
100 µg/ml RNase A

#### **Puffer II**

0.2 M NaOH  
1% (v/v) SDS

#### **TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl , pH 8.0  
1 mM EDTA, pH 8.0

#### **2x Annealing-Puffer**

20 mM Tris-HCl, pH 8  
100 mM NaCl  
2 mM EDTA, pH 8

#### **20 x SSC, pH 7 (Southern Blot)**

3 M NaCl  
0.3 M Trinatriumcitrat-dihydrat  
pH 7 mit 1M HCl einstellen

#### **Church & Gilbert Puffer (Southern Blot)**

0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.76  
1 mM EDTA  
7% SDS

#### **Denaturierungslösung (Southern Blot)**

1.5 M NaCl  
0.5 M NaOH  
0.25 M HCl

#### **NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 6.76) (Southern Blot)**

40 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
60 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### **Neutralisierungslösung (Southern Blot)**

1.5 M NaCl  
0.5 M Tris-HCl  
pH 7.0

**Puffer III**

3 M Kaliumacetat

**TAE**

40 mM Tris-Acetat

2 mM EDTA

pH 8.2

**Waschpuffer (Southern Blot)**40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.76

1 % SDS

**Größen- und Mengenstandards**

Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder Plus (Fermentas)

Gene Ruler™ DNA Ladder (Fermentas)

pUC18 Plasmid/*Sau3A*-MarkerLambda DNA/*HindIII* Marker**3.2.2 Primer, Oligos und Plasmide**

**Tabelle 2: Primer und Oligos für Klonierungen.** Mithilfe angegebener Primer amplifizierte Fragmente oder auch die durch Oligo-Annealing erhaltenen synthetischen, doppelsträngigen Oligos wurden in verschiedene Vektoren subkloniert.

| Primer/Linker-Sequenz   | Fragmentname                           | Verwendungszweck  |
|---|--|---|
| <b>Bmp10A_fwd (HindIII):</b><br>GTCAAGCTTTGTTTTCTGCATGGGGTGTG;<br><b>Bmp10B_rev(AscI)</b><br>GATGGCGCGCCAGCTGCTGATTGTCTACTTGTCTGG   | <b>Bmp10-Arm AB</b>                    | homologer Arm AB in pKO-DTA Vektor kloniert (Abbildung 15)  |
| <b>Bmp10Y_fwd(AscI)</b><br>TATGGCGCGCCAGTGAGCTTCTGCCTTTTTACA;<br><b>Bmp10Z_rev(BamHI)</b><br>GTCGGATCCAACCTCCACCGACCTTCC  | <b>Bmp10-Arm YZ</b>                    | homologer Arm YZ in pKO-DTA Vektor kloniert (Abbildung 15)  |
| <b>SpeI_loxP_KpnIEcoRI_SpeI-Linker A:</b><br>CTAGTATAACTTCGTATAATGTATGCTATAACGAAGTT<br>ATGGTACCGAATTCA;<br><b>SpeI_loxP_KpnIEcoRI_SpeI-Linker B:</b><br>CTAGTGAATTCGGTACCATAACTTCGTATAGCATACA<br>TTATACGAAGTTATA  | <b>SpeI-loxP-KpnIEcoRI-SpeI-Linker</b> | Insertion eines loxP-Elements inkl. KpnI und EcoRI Erkennungssequenz in pkoDTA-Bmp10 (Abbildung 15)             |
| <b>Bmp10 PL451 ArmA_fwd (+ Xho-Site)</b><br>ATCTCGAGTCTCCTTCCCAGTGATACC;<br><b>Bmp10 PL451 ArmA_rev (+ HindIII-Site):</b><br>TT AAG CTT CAT CTC TGG GAC CAT TGC CTG   | <b>Bmp10-Arm a</b>                     | Bmp10 homologer Arm a in PL451 Vektor kloniert (Abbildung 15)   |
| <b>Bmp10 PL451 ArmB_fwd (+ BamHI-Site)</b><br>AAGGATCCCCCTTGCAAAGAATAGGCC;<br><b>Bmp10 PL451 ArmB_rev (+ SacII-Site)</b><br>TT CCG CGG GA AGA CAA GAG GCA TGA TGG   | <b>Bmp10-Arm b</b>                     | Bmp10 homologer Arm a in PL451 Vektor kloniert (Abbildung 15)   |
| <b>BAC Prom ArmA-Fwd (AscI/XhoI)</b><br>CGCGCCCTGCCAGTTACAGCCCAGGGGAGTTAAGCCT<br>TCCTAGGTTGGCCTGGGAGCTGAGCAGAGAGTCATG<br>GGGC;<br><b>BAC Prom ArmA-Rev (AscI/XhoI)</b><br>TCGAGCCCCATGACTCTCTGCTCAGCTCCCAGGCCAA<br>CCTAGGAAGGCTTAACCTCCCCTGGGCTGTAACCTGGCA<br>GGG   | <b>B10laZ-ArmA</b>                     | Bmp10-BAC homologer ArmA in pKoldi kloniert (Abbildung 9)   |
| <b>BAC Prom ArmB-Fwd (NotI/Bgl II)</b><br>GGCCGCTCTCTGGTTCTGCCGCTGAGCGCCGTCTTCT<br>GCCTGGTGGCTCACTCGGCTTCTGGCAGCCCCATTAT<br>GGA;<br><b>BAC Prom ArmB-Rev (NotI/Bgl II)</b><br>GATCTCCATAATGGGGCTGCCAGAAGCCGAGTGAGC<br>CACCAGGCAGAAGACGGCGCTCAGCGGCAGAACCAG<br>AGAGC | <b>B10laZ-ArmB</b>                     | Bmp10-BAC homologer ArmB BAC in pKoldi kloniert (Abbildung 9)   |
| CGAACTGCTAGCAGTT  | <b>BstBI-NheI-BstBI-Oligo</b>          | Einfügen einer NheI-Schnittstelle in BstBI-Erkennungssequenz der Plasmide pReceiver-huSmad6 ORF und -huSmad7ORF |

| Primer/Linker-Sequenz   | Fragmentname               | Verwendungszweck   |
|---|----------------------------|--|
| <b>Bmp10 3'-ProbeB-Fwd:</b><br>CTGTTATTGGCGGTATGTTGTCTG<br><b>Bmp10 3'-ProbeA-Rev:</b> CTTGCGCCCTGACTGTGG   | <b>Bmp10-3' Probe [AB]</b> | Bmp10 3'-Probe für Southern Blots, kloniert in pGemT-Easy  |
| <b>Bmp10 5'-Probe C-Fwd:</b><br>GGGGCTCCTAACTCCATTGTCC<br><b>Bmp10 5'-Probe D-Fwd:</b> GCAGTAGAGATTTCCTG    | <b>Bmp10-5' Probe [CD]</b> | Bmp10 5'-Probe für Southern Blots, kloniert in pGemT-Easy  |
| <b>Rosa26-5' Probe B fwd:</b> GTGGGGTCGACTAGATGAAGG;<br><b>Rosa26-5' Probe B rev:</b> CTCACGGGTACGGGCCATTCC | <b>Rosa26-5' Probe B</b>   | Rosa26 5'-Probe für Southern Blots, kloniert in pGemT-Easy |

Tabelle 3: Sequenzierungsprimer für die DNA-Sequenzierung mithilfe des ABI Prism™ Systems (Kapitel 3.2.8).

| Name                                  | Sequenz 5' → 3'                |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Bmp10 PL451 ArmA_fwd (XhoI)</b>    | ATCTCGAGTCTCCTTTCCCAGTGATACC   |
| <b>Bmp10 PL451 ArmA_rev (HindIII)</b> | TAAAGCTTCATCTCTGGGACCATTGCCTG  |
| <b>Bmp10 PL451 ArmA_rev (SacII)</b>   | TTCCGCGGGAAGACAAGAGGCATGATGG   |
| <b>Bmp10 PL451 ArmB_fwd (BamHI)</b>   | AAGGATCCCCCTTGCAAAGAATAGGCC    |
| <b>Bmp10_0kbup_fwd</b>                | TTGGTGGGGAGGGGGTAAGGTA         |
| <b>Bmp10_11270-fwd</b>                | AGAACATAGGAGCTTTGGG            |
| <b>Bmp10_1kbdown-fwd</b>              | GACAATACTCCTCACTCCATGG         |
| <b>Bmp10_Exon2A_fwd</b>               | CGATGAAGAGGCTCTGCTGC           |
| <b>Bmp10_IntronA_fwd</b>              | CCATTCCTGAGGGGAAGTGC           |
| <b>Bmp10_PCRExon2_Sfwd(XmaI)</b>      | GATCCCGGGTGAGGGTCTTAAAGCCATAGT |
| <b>Bmp10A_fwd (HindIII)</b>           | GTCAAGCTTTGTTTTTCTGCATGGGGTGTG |
| <b>Bmp10Z_rev (BamHI)</b>             | GTCGGATCCAACCTCCCACCGACCTTCC   |
| <b>hucBMP10_Fwd</b>                   | TGCCCCGAATCAGAAGGA             |
| <b>hucBMP10_Fwd A</b>                 | TGCCCTCTGCCAACATC              |
| <b>hucBMP10_Rev</b>                   | AAGAGGAGGGGTATTTTT             |
| <b>IRES-GFP-rev</b>                   | CACCATATTGCCGTCTTTT            |
| <b>IRES-GFP-rev1</b>                  | ACGCGGAACCTCATATATGG           |
| <b>M13 fwd</b>                        | GTAAAACGACGGCCAGT              |
| <b>M13 rev</b>                        | AACAGCTATGACCATG               |
| <b>pBigT-fwd(neu)</b>                 | GTTTGTCCAAACTCATCAATG          |
| <b>pBigT-rev</b>                      | GGCAAACAACAGATGGCTGG           |
| <b>PL451-bGHpA_fwd</b>                | AAGGGGGAGGATTGGGAAGAC          |
| <b>PL451-PGK_rev</b>                  | GAAAAGCGCCTCCCCTACC            |
| <b>Rosa26-PA-fwd</b>                  | TTCTGGGAGTTCTCTGCTGC           |
| <b>Rosa26-PA-rev(neu)</b>             | CTGCATAAACCCAGATGAC            |
| <b>Smad6_FWD</b>                      | CCCCCGGCTACTCCATCAAG           |
| <b>Smad6_REV</b>                      | CCCAAGCTCCCATCCTCGTC           |
| <b>Smad7_FWD</b>                      | AAGGTGTTCCCCGGTTTCTCC          |
| <b>Smad7_REV</b>                      | CTGTCCGTCGCCCTTCTCC            |
| <b>Sp6</b>                            | AATTAACCTCACTAAAGGG            |
| <b>T7</b>                             | TAATACGACTCACTATAGGG           |

Tabelle 4: Genotypisierungsprimer. Primer für die PCR-basierte Genotypisierung der angegebenen Mauslinien.

| Mauslinie                                      | Gen                    | Primersequenzen 5'→3'  | Länge des Amplifikats [bp]            |
|--|------------------------|--|---------------------------------------|
| B10laZ   | <i>LacZ</i>            | lacZ fwd1: CCGACGGCAGCTGATTGAAG<br>lacZ rev1: ATACTGCACCGGGCGGAAGGAT   | 506                                   |
| Bmp10 LN                                       | <i>Bmp10</i>           | Bmp10-1-fwd: TCTCCTTTCCCAGTGATACC;<br>Bmp10-1-rev: GAAGACAAGAGGCATGATGG                                      | wt Allel: 842                         |
| Bmp10 LN/<br>Bmp10 LN/CMV-Cre                  | <i>Neo-Bmp10 3'UTR</i> | bGH fwd: AAGGGGGAGGATTGGGAAGAC<br>Bmp10-1-rev: GAAGACAAGAGGCATGATGG  | 647                                   |
| Ckmm-Cre                                       | <i>Ckmm-Cre</i>        | MCK-fwd: TAAGTCTGAACCCGGTCTGC<br>Cre-2: CTAGAGCCTGTTTTGCACGTT  | 480                                   |
| ckoBmp10                                       | <i>Bmp10</i>           | Bmp10-1-fwd: TCTCCTTTCCCAGTGATACC;<br>Bmp10-1-rev: GAAGACAAGAGGCATGATGG                                      | wt Allel: 842<br>floxed Allel: 987    |
| ckoBmp10/CMV-Cre                               | <i>Bmp10</i>           | Bmp10-1-fwd: TCTCCTTTCCCAGTGATACC;<br>Bmp10-1-rev: GAAGACAAGAGGCATGATGG                                      | wt Allel: 842                         |
| ckoBmp10/CMV-Cre                               | <i>Bmp10 (Δ Exon2)</i> | Bmp10-1270 fwd: AGAACATAGGAGCTTTGGG<br>Bmp10-1-rev: GAAGACAAGAGGCATGATGG                                     | 564                                   |
| ckoBmp10/CMV-Cre                               | <i>Cre</i>             | Cre-1: GTTCGCAAGAACCTGATGGACA; Cre-2:<br>CTAGAGCCTGTTTTGCACGTT   | 340                                   |
| Flk1-Cre                                       | <i>Flk1-Cre</i>        | Flk-1 Prom. fwd: AGTCTGTGCCTGAGAACTGG<br>Cre-2: CTAGAGCCTGTTTTGCACGTT  | 640                                   |
| Nkx2.5-Cre                                     | <i>Nkx2.5-Cre</i>      | Nkx2.5 antisense:<br>ACGCACTCAACTTTAATGGGAAGAG<br>Cre-sense: GATGACTCTGGTCAGAGATACCTG                        | 500                                   |
| Nppa-Cre                                       | <i>Nppa-Cre</i>        | Nppa-fwd: GACAGCAAACATCAGATCG<br>Cre-2: CTAGAGCCTGTTTTGCACGTT  | 470                                   |
| Rosa26-Bmp10                                   | <i>Bmp10-IRESGFP</i>   | hucBmp10 Fwd: TGCCCGAATCAGAAGGA<br>IRESGFP-rev: AAAAGACGGCAATATGGTG  | 447                                   |
| Rosa26-Bmp10/<br>Rosa26-Smad6/<br>Rosa26-Smad7 | <i>Rosa26</i>          | Rosa-FA: AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT<br>Rosa-RF: GGAGCGGAGAAATGGATATG<br>Rosa-SplicAC:<br>CATCAAGGAAACCCTGGACTACTG | wt Allel: 585 bp<br>mut Allel: 249 bp |
| Rosa26-Smad6                                   | <i>Smad6-IRESGFP</i>   | huSmad6 Fwd2: CCTACGACCCCAACAGC<br>IRESGFP-rev: AAAAGACGGCAATATGGTG  | 276                                   |
| Rosa26-Smad7                                   | <i>Smad7-IRESGFP</i>   | huSmad7 Fwd2: AAGGTGTTCCCCGGTTTCTCC<br>IRESGFP-rev: AAAAGACGGCAATATGGTG                                      | 337                                   |
| T(S)-Cre                                       | <i>T(S)-Cre</i>        | T-Streak fwd: AATCTTTGGGCTCCGACAG<br>Cre-rev1: ACGTTCACCGGCATCAACG   | 500                                   |
| TEK-Cre  | <i>TEK-Cre</i>         | TEK-Prom2 fwd: CAGAAATGAGACTGTTACC<br>Cre-2: CTAGAGCCTGTTTTGCACGTT   | 540                                   |
| VE-CadherinCreERT                              | <i>Cre</i>             | Cre-1: GTTCGCAAGAACCTGATGGACA<br>Cre-2: CTAGAGCCTGTTTTGCACGTT  | 340                                   |
| αMHC-Cre                                       | <i>αMHC-Cre</i>        | αMHCProm. Fwd:<br>CAGGCACTTTACATGGAGTCCTG<br>Cre-2: CTAGAGCCTGTTTTGCACGTT                                    | 800                                   |

Tabelle 5: Primer für RT-PCR Analysen (Kapitel 3.2.7.1). mus: *Mus Musculus*, rat: *Rattus norvegicus*

| Primer            | Sequenz 5' - 3'       | Template       |
|-------------------|-----------------------|----------------|
| mBmp10_cds177_fwd | GAACGAGTTTCTCAAGACGC  | musBmp10-Exon1 |
| mBmp10_cds302_rev | GCTCCGGATGATGTTAGCAG  | musBmp10-Exon1 |
| mBmp10_cds400_rev | GACGACCTCTTCATGGTGAGG | musBmp10-Exon2 |
| mBmp10_cds86_fwd  | AGTCGCCCCGGAAGAAGACAT | musBmp10-Exon1 |
| musBtg2 Fwd1      | GAAGAGAACCGACATGCTCC  | musBtg2        |
| musBtg2 Rev1      | GACACAGATGGAGCCATCC   | musBtg2        |
| musCTGF Fwd       | CTAAGACCTGTGGGATGG    | musCTGF        |
| musCTGF Rev       | GTATGTCTTCACACTGGTGC  | musCTGF        |
| musCyr61 Fwd1     | TCGGAGGTGGAGTTAACC    | musCyr61       |
| musCyr61 Rev1     | GACGCACTTCACAGATCC    | musCyr61       |

| Primer                 | Sequenz 5' - 3'        | Template          |
|------------------------|------------------------|-------------------|
| musDUSP1 Fwd           | CTCAGCCAATTGTCCTAACC   | musDUSP1          |
| musDUSP1 Rev           | CACTTGGGACTCAAACCTGC   | musDUSP1          |
| musHPRT Rev            | GCTGGTGAAAAGGACCTCT    | musHpvt           |
| musHPRT Fwd            | CACAGGACTAGAACACCTGC   | musHpvt           |
| musJun Fwd1            | CTCCGGACTGTTTCATCC     | musJun            |
| musJun Rev1            | TCTCGGTGGCAGCCTTAAGG   | musJun            |
| musKlf9 Fwd1           | TAAAGCCCATTACAGAGTGC   | musKlf9           |
| musKlf9 Rev1           | GCATGCTTGGTGAGATGG     | musKlf9           |
| musNr4a1 Fwd           | CGAACCGTGACACTTCC      | musNr4a1          |
| musNr4a1 Rev           | CCAGGCAGATGTACTTGG     | musNr4a1          |
| musratActa2_putEx6fwd2 | AACGTGCCTATCTATGAGG    | musratActa2-Exon6 |
| musratActa2_putEx7rev2 | ATGGTGATCACCTGCCC      | musratActa2-Exon7 |
| ratBmp10_fwd1          | ATATCTTCACAGAACAAGATGG | ratBmp10-Exon1    |
| ratBmp10_rev1          | ACATCAAACGATCTCTCTGC   | ratBmp10-Exon2    |

Tabelle 6: *Verwendete Plasmide und BACs.*

| Plasmid/BAC           | Notiz/Referenz  |
|-----------------------|---|
| bMQ438F3              | Das BAC, aus der bMQ BAC Bibliothek (Adams, Quail et al. 2005), enthält die Region 87339721 – 87401265 des murinen Chromosoms 6, inklusive des genomischen Bmp10 Locus. |
| pBigT                 | Srinivas, Watanabe <i>et al.</i> 2001   |
| pGemT-Easy            | pGEM®-T Easy Vektor System, Promega GmbH  |
| pIRES2EGFP            | BD Biosciences Clonetec   |
| pKO-DTA               | <i>PGK-DTA</i> Kasette enthaltener pKO Scrambler V901 (Lexicon Genetics Inc.), überlassen von T. Böttger, MPI Bad Nauheim   |
| pKoldi                | Enthält <i>LacZ</i> CDS/polyA sowie FRT-flankierte PGK-Em7-Neomycin Kasette; überlassen von S. Günther, MPI Bad Nauheim   |
| PL451                 | Liu, Jenkins <i>et al.</i> 2003   |
| pReceiver-huSmad6 ORF | Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, RZPD Plasmid #EX-R0044-M02   |
| pReceiver-huSmad7 ORF | Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, RZPD Plasmid #EX-R0043-M02   |
| Rosa26-PA             | Srinivas, Watanabe <i>et al.</i> 2001   |

### 3.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren

Je nach Ausgangsmaterial und Qualitäts- bzw. Mengenanspruch an die präparierte DNA bzw. RNA wurden verschiedene Protokolle für die Isolierung von Nukleinsäuren angewendet.

### **3.2.3.1 Präparative Plasmid-Isolierung aus *Escherichia coli* (Mini-Präp)**

Für die Gewinnung kleiner Mengen DNA mittlerer Qualität, bis zu 20 µg DNA, wurde ein nach Birnboim & Doly (*Birnboim and Doly 1979*) modifiziertes Protokoll verwendet. Die Methode beruht auf der alkalischen Lyse von Bakterien und anschließender Fällung der niedermolekularen Nucleinsäuren mittels Isopropanol. Zunächst wurden 4 ml Selektionsmedium (LB-Medium mit Antibiotikum) mit einer *Escherichia coli* (*E. coli*) Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 1,5 ml dieser Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 5000 rpm, Eppendorf 5430). Anschließend wurde das Zellpellet in 150 µl Puffer I resuspendiert, mit 200 µl Puffer II versetzt, invertiert und 5 min bei Raumtemperatur zwecks alkalischer Lyse inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Puffer III. Das Gemisch wurde ebenfalls vorsichtig invertiert und nach vollständiger Durchmischung für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nun in ein neues 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 500 µl 100% Isopropanol (vortexen) gefällt, durch Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm) pelletiert und mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt, 10 min, 14.000 rpm, wurde das Ethanol abgenommen, das DNA-Pellet getrocknet (5 min bei Raumtemperatur) und in 40 µl TE-Puffer gelöst. Die Kontrolle der isolierten Plasmid-DNA erfolgte restriktionsenzymatisch (Kapitel 3.2.5.1) mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung (Kapitel 3.2.6.2) der Fragmente.

### **3.2.3.2 Analytische Plasmid-Isolierung aus *Escherichia coli* mittels kommerzieller Kits**

Für die analytische Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Machery & Nagel Plasmid Mini- oder Maxi-Kits verwendet. Das Aufreinigungsprinzip der verschiedenen Kits basiert auf alkalischer Lyse der Zellen und einer nachfolgenden Anionenaustauschchromatographie.

Zur schnellen Gewinnung kleinerer, reiner Mengen Plasmid-DNA (bis zu 20µg) mit ausreichender Qualität für Sequenzierungsreaktionen wurde das NucleoSpin® Plasmid Kit verwendet, während die Gewinnung großer Mengen (bis zu 500µg) hochreiner Plasmid-DNA unter Verwendung des Machery & Nagel NucleBond® PC500 erfolgte.

### **3.2.3.3 Speedprep Minipräparation**

Diese Methode wurde für die Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterien mit einem hohen endogenen Gehalt an DNAsen verwendet (*E. coli 294-Flp/294-Cre*) und wurde 1992 in *Biotechniques* beschrieben (*Goode and Feinstein 1992*). Sie ist allerdings nicht gut für „low copy“ oder große (> 10 kb) Plasmide geeignet und es sollten nie mehr als sechs Proben auf einmal behandelt werden.

Zunächst wurden 1.5 ml einer Übernachtskultur bei 14.000 rpm für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl *Lösung A* (4°C) resuspendiert. Dann wurden 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben, das Gemisch 10 s gevortext und 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden jeweils 200 µl kaltes 100% Ethanol in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach der Zentrifugation wird die obere Phase vorsichtig abgenommen und zu dem vorgelegten Ethanol pipettiert, gevortext und erneut für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nachdem das Ethanol verworfen wurde, erfolgte eine Trocknung des Pellets für ca. 5 min in der Vakuumzentrifuge mit Kühlfalle. Schließlich wurde das Pellet in 10 µl TE-Puffer resuspendiert und bei Bedarf 10 mg/ml RNase A zugesetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die DNA-Lösung für eine längere Lagerung bei -20°C eingefroren wurde.

#### **3.2.3.4 BAC Isolierung aus *Escherichia coli***

Kleinere Mengen an BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*, engl.) DNA wurden aus 3 ml einer Übernachtskultur mittels der im Abschnitt 3.2.3.1 beschriebenen Mini-Präparation isoliert und anschließend in 40 µl TE resuspendiert. Für eine restriktionsenzymatische Analyse der BAC DNA mussten hier 10 µl der Minipräparation eingesetzt werden.

Um größere Mengen an BAC DNA zu gewinnen (bis zu 100 µg) wurde 100 bis 500 ml einer BAC enthaltenen *E. coli* Übernachtskultur mit dem NucleoBond® BAC 100 Kit von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers isoliert.

#### **3.2.3.5 Präparation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen**

Für die Isolation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), wurden ES-Zellen in 24-Lochschalen kultiviert. Sie wurden mit PBS gewaschen, jeweils mit 500 µl Lysispuffer(ES) überschichtet und mindestens 2 d (höchstens 3 d) bei 37°C inkubiert. Um die DNA im Weiteren aus der Lösung zu fällen, wurden 500 µl Isopropanol zugegeben und das Gemisch für 20 – 30 min in Kreisbewegungen geschüttelt, bis sich die DNA in sichtbare Fäden verdrillt hatte. Diese Fäden wurden nun mit einer gebogenen Kanüle gefischt und in 100 µl TE-Puffer überführt und über Nacht bei 56°C gelöst. Die Analyse (Genotypisierung) der DNA erfolgte mithilfe von Southern Blot Analysen (Kapitel 3.2.9).

#### **3.2.3.6 Präparation genomischer Mausschwanz-DNA**

Die Isolierung genomischer DNA aus dem Schwanzgewebe der Maus wurde nach dem Protokoll von Laird *et al.* beschrieben Protokoll (Laird, Zijderveld *et al.* 1991) vorgenommen. Das erhaltene DNA-Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer für 10 min bei 56°C gelöst und die DNA-Lösung anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Ein Mikroliter dieser DNA-Lösung wurde für die jeweilige Genotypisierungs-PCR (Kapitel 3.2.7 und Tabelle 4) eingesetzt.

### **3.2.3.7 Präparation der Gesamt-RNA aus Mausgeweben und eukaryotischen Zellen**

Die Präparation von RNA aus Geweben und eukaryotischen Zellen wurde mit dem Trizol<sup>®</sup> Reagenz von Invitrogen (# 15596) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine modifizierte Methode der sauren Guanidinthiocyanat-Phenol/Chloroform Extraktion (Chomczynski and Sacchi 1987). Die gewonnene RNA wurde anschließend in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei –80 °C zwecks Lagerung eingefroren. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde spektralphotometrisch bestimmt und die Qualität der RNA durch eine gelelektrophoretische Auftrennung beurteilt.

## **3.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen**

### **3.2.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Die Nukleinsäuren DNA und RNA weisen innerhalb ihres Absorptionsspektrums ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm auf. Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung kann daher durch die Messung der Absorption bei 260 nm in einem Spektralphotometer bestimmt werden. Dies erfolgte mit einem Spektralphotometer der Firma ThermoScientific, dem Nanodrop ND-1000. Dieses Gerät ermöglichte Konzentrationsbestimmungen in Volumina von 0.5-2 µl.

### **3.2.4.2 Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration von DNA-Fragmente innerhalb eines Gemischs (beispielsweise nach in einem restriktionsenzymatischen Verdau) wurden mithilfe eines Mengenstandards geschätzt. Dazu wurde ein Aliquot der zu messenden Probe und der Mengenstandard (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder; Fermentas # SM-1333) gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.2.6.2). Die Konzentration der Probe wurde durch den Vergleich der Intensität der Banden unter UV-Licht (254 nm) mit der Bande bekannter Konzentration des Standards abgeschätzt. Grundlage hierfür ist, dass

die Intensität der Fluoreszenz der Nukleinsäure mit eingebautem Ethidiumbromid proportional zu ihrer Menge ist.

### **3.2.5 Modifikation von Nukleinsäuren**

#### **3.2.5.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen**

Gereinigte Restriktionsendonukleasen bakteriellen Ursprungs spalten doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungsstellen. In dieser Arbeit wurde die sequenzspezifische Spaltung von DNA mithilfe verschiedener Restriktionsenzyme nach den vom Hersteller (New England Biolabs oder Jena Bioscience) vorgegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

#### **3.2.5.2 Dephosphorylierung von DNA**

Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende eines DNA-Stranges und der 5'-Phosphatgruppe am Ende eines DNA-Stranges. Um unerwünschte Ligationen zwischen zwei zueinander kompatible Enden zu verhindern, beispielsweise nach der Linearisierung eines Plasmids, ist die Dephosphorylierung die Methode der Wahl. Die Dephosphorylierung erfolgte mit der alkalischen Phosphatase SAP (Roche, #11758250001) nach den Angaben des Herstellers.

#### **3.2.5.3 Annealing, Phosphorylierung und Klonierung von synthetischen Oligonukleotiden**

Heute ist es möglich, einzelsträngige DNA-Moleküle (*single stranded* DNA, ssDNA) von jeder beliebigen Sequenz mit bis zu 100 Nukleotiden durch chemische Synthese zu erhalten. Komplementäre ssDNA-Moleküle lassen sich derart hybridisieren, dass man beispielsweise dsDNA (*double stranded* DNA, dsDNA) mit adhäsiven Enden erhält. So eröffnen synthetische Oligonukleotide die Möglichkeit, kurze Sequenzabschnitte wie etwa spezifische Linker mit Restriktionsschnittstellen oder auch *loxP*-Elemente Base für Base nach Wunsch zusammen zu setzen.

In Rahmen dieser Arbeit wurden benötigte Oligonukleotide bei der Invitrogen GmbH bestellt. Zwecks Hybridisierung zweier komplementärer ssDNAs wurden 50 pmol ssDNA-1, 50 pmol ssDNA-2, 25 µl 2 x Annealing-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl vereint und 5 min bei 95°C dann 10 min bei 70° inkubiert und abschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lagerung der erhaltenen dsOligos erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

Um die dsOligos in einen DNA-Abschnitt einfügen zu können, mussten sie noch phosphoryliert werden, denn die T4-Ligase benötigt zur Bildung einer Phosphodiesterbindung die 5'-Phosphatgruppe. Für die Phosphorylierung der dsOligos wurde die T4 Polynukleotidkinase (PNK) von Promega verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

#### **3.2.5.4 Anwendungen des Klenow Fragments**

Als Klenow-Fragment, auch Klenow-Enzym, wird das größere der beiden Proteinfragmente der DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli* bezeichnet. Es besitzt die 5'→3' Polymerase-Aktivität und die 3'→5' Exonuklease-Aktivität dieser DNA-Polymerase I.

Die 5'→3' Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragments (Promega GmbH) wurde benutzt, um nach der Restriktion mit Restriktionsendonukleasen 5'-Überhänge mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) aufzufüllen, um so beispielsweise bei anschließender Re-Ligation der aufgefüllten Enden neue Restriktionsschnittstellen zu generieren. Des Weiteren wurde die 5'→3' Polymerase-Aktivität genutzt, um in Kombination mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP (Desoxycytidintriphosphat) radioaktiv markierte DNA-Sonden zu generieren (Kapitel 3.2.9.3).

#### **3.2.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten**

Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe und 5'-Phosphatgruppe an Enden von DNA-Molekülen. Um DNA-Fragmente in Vektoren zu ligieren, wurde der Vektor und das zu ligierende Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Für einen 20  $\mu\text{l}$ -Ligationsansatz wurden 4  $\mu\text{l}$  5x Ligase-Puffer (Invitrogen # 46300) und 2 U T4-Ligase (Invitrogen #15224) verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 16 °C für 12-16h. Für die Ligation von PCR-Fragmenten wurde das pGEM-T Easy Vektorsystem von Promega (# A3600) verwendet. Der im Kit enthaltene Vektor ist bereits linearisiert und besitzt an den beiden Enden einen 3'-Polythymidin-Überhang, der es möglich macht, PCR-Produkte mit einem 5'-Polyadenin-Überhang in den Vektor zu ligieren. Die Ligation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Anschluss wurden die Ligationsansätze in Bakterien transformiert (s. 2.2.3), um die modifizierte DNA zu propagieren.

#### **3.2.5.6 Recombineering basierte Methode zur Modifizierung von Vektoren**

Recombineering („recombination-mediated genetic engineering“, *engl.*) ist eine Methode, die anders als die konventionelle Klonierung völlig unabhängig von Restriktionsenzymen die Modifikation von DNAs erlaubt. Sie beruht auf der homologen Rekombination in Bakterien

(Zhang, Buchholz et al. 1998; Liu, Jenkins et al. 2003) und ermöglicht so auch in großen DNA-Molekülen wie BACs (Bacterial Artificial Chromosomes, engl.) die positionsspezifische Modifikation in relativ kurzer Zeit.

Als Rekombination-kompetenter *E.coli* Stamm, wurde im Rahmen dieser Arbeit der *E.coli* Stamm SW102 verwendet (Warming, Costantino et al. 2005). Alle weiteren, für das Recombineering notwendigen Schritte wie die Transformation von BAC- oder Plasmid-DNA und die gerichtete Rekombination in rekombinationskompetenten *E. coli*-Bakterien, wurden streng nach dem von Liu et al. (2003) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

### **3.2.6 Aufreinigung von DNA**

#### **3.2.6.1 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung**

Zur Inaktivierung von Restriktionsenzymen und zum Entfernen anderer Proteine aus einer DNA-haltigen Lösung, wurde diese mit Wasser auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und mit demselben Volumen Phenol/Chloroform durch starkes Schütteln versetzt. Dabei kommt es zum Ausfallen der Proteine, die anschließend in der phenolischen Phase vorliegen, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase zu finden sind. Durch Zentrifugation (7 min, 13000 rpm, Eppendorf 5415D) wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein Eppendorfgesäß überführt und die enthaltene DNA durch die Zugabe von 1 ml Ethanol sowie einer 30-minütigen Inkubation bei -20°C gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, Eppendorf 5415D) sedimentiert. Abschließend wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert (10 min, 13.000rpm, Eppendorf 5415D), der Überstand vollständig abgesaugt und das an Luft getrocknete Sediment in einem angemessenem Volumen TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

#### **3.2.6.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Zur Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet, wobei die DNA in der Agarose entsprechend ihrer Größe und Form im elektrischen Feld zur Anode wandert. Der aufzutrennenden Fragmentgröße entsprechend, wurden Gele mit 0,7% bis 2% (w/v) Agarose mit jeweils 0,5 µg Ethidiumbromid versetzt verwendet. Als Gel sowie Laufpuffer diente das TAE-Puffersystem. Die zu analysierende Probe wurde, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurde, zwecks Beschwerung mit Ladepuffer (5 µl Ladepuffer auf 50 µl Probe) vermischt. Zur Größen- und Mengenabschätzung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden, ebenfalls mit Ladepuffer versetzte, Größenstandards (Kapitel 3.2.1) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei

einer konstanten Spannung von 5 V/cm bei Raumtemperatur. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (254 nm) durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und mit einer PC-gestützten Videodokumentationsanlage fotografiert. Präparative Gele wurden, um Brüche der Nukleotidsequenz vorzubeugen, nur langwelligem, energieärmerem UV-Licht (Wellenlänge > 300 nm) ausgesetzt.

### **3.2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Gelelution)**

Die Bande des zu isolierenden DNA-Fragments wurden nach der Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.6.2) mit einem Skalpell unter UV-Licht (>300 nm) so exakt wie möglich aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurde das "QIAquick Gel Extractions Kit" von der Firma Qiagen benutzt. Das Protokoll arbeitet nach dem Prinzip der selektiven Bindung von DNA an Silikon-Gel-Partikel in der Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen. Dabei macht man sich zunutze, dass DNA bei hohen Salzkonzentrationen an der Säulenmatrix haften bleibt, während Kontaminationen fort gewaschen werden. Bei niedrigen Salzkonzentrationen kann die reine DNA anschließend eluiert werden. Die verschiedenen Schritte der DNA-Isolierung wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.2.6.4 Aufbereitung rekombinanter BAC-DNA für Pronukleus Injektionen**

Für die BAC Transgenese der Maus mittels Pronukleus-Injektion wurde die BAC-DNA, befreit vom Vektorrückgrat, in einer Konzentration von 20 µg/µl in Injektionspuffer benötigt. Um ungewollte Fragmentierungen des rekombinanten BACs zu verhindern, wurde die linearisierte BAC-DNA durch ein spezielles, schonendes Verfahren isoliert: Der Sepharose CL-4B Gelfiltration (Yang, Model et al. 1997).

Zunächst erfolgte die Entfernung des Vektorrückgrats mittels Restriktionsverdau bei 37°C in einem Volumen von 500 µl für mindesten 10 h oder über Nacht. Der Restriktionsansatz enthielt 50 µg BAC-DNA und 200 U *NotI* (NEB) sowie die entsprechenden Mengen an BSA und Restriktionspuffer (Kapitel 3.2.5.1). Dann folgte die Reinigung des linearisierten BACs über die Sepharose Säule (Gelfiltration).

Präparation einer Sepharosesäule. Aus einer 5 ml Plastikpipette (CELLSTAR<sup>®</sup>, Greiner Bio-One) wurde oben das Filtermaterial entfernt, in autoklaviertem Wasser angefeuchtet und mit einer sterilen 1 ml Plastikpipette oder durch Schütteln soweit wie möglich in die Spitze der 5 ml Plastikpipette geschoben. Ein Verschluss wurde auf die Spitze der innen mit autoklaviertem Wasser befeuchteten 5 ml Pipette gesetzt, welcher zuvor durch das Zuschmelzen einer gelben Plastikspitze für Eppendorf-

Pipetten hergestellt worden war. Die Sepharose (CL-4B, Amersham, #17015001) musste zunächst durch Schwenken wieder resuspendiert werden, bevor sie mit einer autoklavierten Pasteurpipette graduell in die 5 ml Plastikpipette eingefüllt werden konnte. So wurde beim Einfüllen der Sepharose stets gewartet, bis die Sepharose sich absetzte, dann wurde der Verschluss entfernt, das Ethanol abgelassen, bis sich nur noch ein bis zwei Tropfen Ethanol oberhalb des Sepharosespiegels befanden. Dann wurde eine weitere Schicht Sepharose eingefüllt. Dies wurde wiederholt bis die Sepharose bis 1 cm unterhalb der Oberkante der 5 ml Pipette eingefüllt war. Dabei wurde strengstens beachtet, dass die Säule nicht austrocknet.

Äquilibration der Sepharosesäule. Die Äquilibration erfolgte mit 30 ml Injektionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0,1 mM EDTA; 10 mM NaCl). Dazu wurde ein Adapter aus einer blauen Spitze für Eppendorf Pipetten gebastelt, so dass eine 10 ml Spritze als Reservoir auf die Sepharosesäule aufgesteckt werden konnte. Die 30 ml Puffer benötigten 2-3 h, um über die Säule zu laufen.

Laden der Säule und Elution des BACs. Die 500 µl des BAC-Restriktionsverdau wurden mit 5 µl 10x Ladepuffer (50% Glycerin, 0.25% Bromphenolblau) versetzt, das Pufferreservoir abgenommen und die Injektionspufferlösung abgelassen, bis nur noch ca. 0,5 ml des Puffer oberhalb des Sepharosespiegels verblieben und die Säule unten wieder verschlossen. Dann wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette der Restriktionsverdau auf die Säule aufgebracht. Dabei war zu beachten, dass die Sepharose nicht aufgewirbelt wird. Die Säule wurde nun unten geöffnet, bis die DNA gerade eben ins Sepharose-Bett eingelaufen war. Dann wurde das 10 ml Reservoir erneut auf die Säule gesteckt und die DNA mit 10 ml Injektionspuffer eluiert. Dabei wurden Fraktionen mit einem Volumen von ca. 500 µl gesammelt, bis der blaue Farbstoff des Ladepuffers in den Fraktionen erschien.

Analyse der Reinigung. In der Regel befindet sich ein linearer BAC der Größe von 150 kb in Fraktion 7 – 9. Das Vektorrückgrat lässt sich in dieser Größenordnung nicht abtrennen. Von jeder gesammelten Fraktion wurden 40 µl auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Es sollten 1-3 Fraktionen eine scharf begrenzte Bande oberhalb von 10 kb zeigen. Die DNA-Konzentration der Fraktionen wurden mithilfe des Nanodrops bestimmt (Kapitel 3.2.4.1) und sollte mindestens 20 ng/µl betragen. Die gereinigte DNA konnte bei 4°C gelagert werden, sollte aber maximal 1-2 Wochen vor dem Injektionstermin isoliert und aufgereinigt werden.

Die Pronukleus-Injektion aufgereinigter BAC DNA erfolgte durch Frau Susanne Kreutzer (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim).

### 3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Die Wahl geeigneter, synthetischer Oligonukleotide (Primer) ermöglicht es, aus einem Nukleinsäuregemisch Sequenzabschnitte gezielt zu amplifizieren. Die Primer müssen für diesen Zweck mit den flankierenden Bereichen der komplementären Stränge der Ziel-DNA hybridisieren. Durch den Einsatz von hitzestabilen DNA-Polymerasen werden, ausgehend von diesen Primern in einer wiederholten, zyklischen Sequenz von Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer (Annealing) und Sequenzverlängerung (Elongation), die zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenzen amplifiziert (Saiki, Gelfand et al. 1988). Die Anzahl und Dauer der Zyklen sowie die verwendeten Temperaturen sind jeweils der Länge des gewünschten DNA-Fragments und der Schmelztemperatur der Primer anzupassen.

#### *Beispiel Reaktionsansatz:*

| Reagenz                          | Volumen (µl) |
|----------------------------------|--------------|
| Wasser                           | 15,50        |
| 10 X PCR Buffer                  | 2,50         |
| 50 mM MgCl <sub>2</sub>          | 1,25         |
| DMSO                             | 1,25         |
| 10 mM dNTP                       | 0,50         |
| 100 pmol Primer Fwd              | 1,00         |
| 100 pmol Primer Rev              | 1,00         |
| 5 U/ul <i>Taq</i> DNA Polymerase | 1,00         |
| DNA                              | 1,00         |
| <b>Summe</b>                     | <b>25,00</b> |

#### *Repräsentatives Programm eines Thermocyclers*

| Schritt | Temperatur (°C) | Zeit   |  |
|---------|-----------------|--------|--|
| 1       | 94              | 3 min  |  |
| 2       | 95              | 30 sec |  |
| 3       | 58              | 30 sec | Wiederhole Schritt 2 bis 5 für 35 Zyklen |
| 4       | 72              | 30 sec |  |
| 5       | 72              | 5 min  |  |
| 6       | 4               | ∞      |  |

PCR-Reaktionen wurden in den Thermocyclern Mastercycle<sup>®</sup> Gradient von Firma Eppendorf oder Labcycler von Firma Sensoquest unter Verwendung dünnwandiger 0,2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Alle Reaktionen wurden auf Eis angesetzt und als Enzym wurde die *Taq* DNA-Polymerase (5Prime, #2200030) sowie das zugehörige Puffersystem der 5 Prime GmbH eingesetzt.

#### 3.2.7.1 RT-PCR (Reverse Transkription)

Die RT-PCR ermöglicht den Nachweis und die Analyse von mRNA-Transkripten in einer PCR-Reaktion (z.B. für Expressionsstudien). Da RNA jedoch nicht als Ausgangsmaterial in einer PCR verwendet werden kann, wird vor der eigentlichen PCR-Reaktion eine einzelsträngige DNA-Kopie (cDNA) der eingesetzten mRNA synthetisiert. Diese reverse Transkription (RT) geschieht mithilfe von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen, den reverse Transkriptasen. Der Start einer RT-Reaktion erfolgt durch die Hybridisierung eines universellen Oligo(dT)-Primers an den PolyA-Schwanz der

im Ausgangsmaterial vorhandenen mRNAs. Ausgehend von diesem Primer synthetisiert die reverse Transkriptase die zum RNA-Strang komplementäre einzelsträngige cDNA.

Als Template für die RT-Reaktionen diente mit Trizol präparierte RNA, die anschließend durch eine 30-minütige Inkubation bei 37°C mit DNase (RQ1 DNase, Promega) von verunreinigenden genomischen DNA-Bereichen befreit wurde. Nachdem die DNase durch die Zugabe von Stop Solution (Promega) und einer 10-minütigen Inkubation bei 65°C inaktiviert wurde, erfolgte die RT-Reaktionen mit der reversen Transkriptase SuperScript™ II (Invitrogen, # 18064-071) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei alle Inkubationsschritte in PCR-Maschinen durchgeführt und die Reaktionsansätze anschließend bei 4 °C gelagert wurden. Für den Nachweis eines Transkripts innerhalb des Gemisches, wurde dieses mithilfe spezifischer Primer in der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Dazu wurde meist 1 µl des 20 µl-RT-Ansatzes als Template eingesetzt. Um falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können, wurden für die PCR-Reaktionen vorzugsweise Primer aus unterschiedlichen Exons eines Gens eingesetzt.

### **3.2.8 Sequenzierungen mit ABI PRISM™-System 310**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Kettenabbruchmethode nach F. Sanger (*Sanger, Nicklen et al. 1977*) und dem ABI PRISM™-System 310 sequenziert. Die Kettenabbruchmethode beruht im Wesentlichen darauf, dass die vier Didesoxynukleotide mit vier Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden und nach einem erfolgten Einbau einen Kettenabbruch bewirken. Die Auftrennung der markierten DNA in den ABI PRISM™- System 310 erfolgte durch Kapillarelektrophorese.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die markierende Kettenabbruch-Synthese mithilfe des BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, # 4337451) und die Aufreinigung der markierten DNA-Fragmente nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Kapillarelektrophorese der markierten DNA im ABI PRISM™- System 310 erfolgte durch eine Haus-interne Servicegruppe.

### **3.2.9 Southern Blot: Identifizierung und Analyse klonierter DNA**

Bei der Gen-gezielten Mutagenese ist es notwendig, den wildtypischen und den veränderten Locus im Genom zu identifizieren und charakterisieren. So ist es wichtig zu zeigen, dass die gewünschte Mutation eingefügt wurde, aber noch wichtiger ist es zu zeigen, dass sie an der gewünschten Stelle eingefügt wurde. Die zuverlässigste Methode dies zu überprüfen, ist der von Edwin Southern entwickelte und nach ihm benannte Southern Blot. Hierbei handelt es sich um eine Methode zum

Nachweis spezifischer, elektrophoretisch getrennter DNA-Sequenzen durch Hybridisierung mit einer markierten Nukleinsäuresonde (Probe).

### **3.2.9.1 Restriktionsenzymatische Spaltung genomischer DNA und Gelelektrophorese**

Die zu untersuchende DNA, sprich das gesamte Genom putativ transgener embryonaler Stammzellen oder Mäuse, wurde vollständig mit einem Restriktionsenzym gepalten. 20 µl genomische DNA (Absatz 3.2.3.5), 3 µl Restriktionspuffer, 3 µl Restriktionsenzym, 3 µl H<sub>2</sub>O, sowie 1 µl BSA (10 x BSA; Jena Bioscience) wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die fragmentierte DNA zusammen mit einem Größenstandard (Gene Ruler™ 1kb DNA-Ladder Plus, Fermentas) gelelektrophoretisch über ein Agarosegel (< 0,7 mm dick) aufgetrennt (3.2.6.2) und anschließend unter UV-Licht mit einem Lineal fotografiert, um so später die Positionen der gesuchten Banden auf der Nylonmembran (3.2.9.2) ausmachen zu können.

### **3.2.9.2 Southern Blot auf eine Nylonmembran mit einem Hochsalz-Puffer:**

Der Transfer des im Agarose Gel aufgetrennten Nukleinsäuregemischs auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond™ XL, Amersham Biosciences) erfolgte mit einem Hochsalzpuffer nach dem von Brown beschriebenen Protokoll (*Brown 2001*). Zunächst wird bei dieser Methode das DNA-enhaltene Agarose-Gel mit verschiedenen Lösungen vorbehandelt, um die DNA bzw. die Gelmatrix zu depurinieren, zu denaturieren und schließlich zu neutralisieren. Es folgt dann der Transfer auf die Nylonmembran und schließlich die Immobilisierung der DNA auf der Nylonmembran durch UV-Crosslinking.

### **3.2.9.3 DNA-Sondenmarkierung und Hybridisierung**

Um das oder die gewünschte(n) Fragment(e) in dem auf die Membran geblottete Fragmentgemisch zu identifizieren, wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde inkubiert, die komplementär zu einem Teil des zu identifizierenden Fragments war.

Die Generierung einer radioaktiv markierten einzelsträngigen DNA-Sonde erfolgte mithilfe des Klenow-Fragments (Promega GmbH, s. auch 3.2.5.4) durch Auffüllen der 5'-überhängenden Enden in Gegenwart von radioaktivem  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dCTP nach Angaben des Herstellers. Im Anschluss wurden die radioaktiv markierten DNA-Sonden über NAP-5™ Sephadex Säulen (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Überprüfung der Sonden-Markierung erfolgte mithilfe eines Szintillationszähler (Beckmann).

Es folgte dann die Prähybridisierung der DNA-haltigen Nylonmembran in Church & Gilbert Puffer (Kapitel 3.2.1). Zu diesem Zweck wurden die Membranen in Glas-Röhren gelegt und mit Church & Gilbert Puffer, dem 200 µg/ml Heringssperma-DNA zugefügt worden war, für 2 bis 3 Stunden bei 65 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Heringssperma-DNA (10 mg/ml) war zuvor bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt worden. Anschließend folgte die Hybridisierung mit der markierten Sonde: Zu der prähybridisierten Membran wurde Church & Gilbert Puffer gegeben, der zusätzlich 100 µg/ml Heringssperma-DNA und 3 000 000 counts/ml der markierten Sonde enthielt. Bevor jedoch die Heringssperma-DNA und die Sonde dem Church & Gilbert zugesetzt worden sind, waren die DNAs bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt worden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C unter Rotation im Hybridisierungssofen. Nicht-spezifisch gebundene Sonde wurde von der Membran, nach dem Abschütten des Sonde-enthaltenden Church & Gilbert Puffers, durch eine dreimalige Inkubation in Waschpuffer für jeweils 15 Minuten bei 65°C erreicht. Schließlich erfolgte die Visualisierung des radioaktiven Signal mithilfe eines Röntgenfilms (Kodak).

### **3.2.10 Genexpressionsanalysen mittels DNA Array**

Zur Analyse der mRNA Expression embryonaler Herzen wurde ein Affymetrix GeneChip verwendet (GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array). Die RNA wurde mit Trizol® isoliert (Kapitel 3.2.3.7), nach Herstellerangaben verarbeitet und auf den Chip hybridisiert. Die ermittelten Daten wurden mit dem RMA Algorithmus ausgewertet (Affymetrix Expression Console). Um signifikante Unterschiede in der Expression zu ermitteln, wurden mit den log<sub>2</sub>-transformierten Expressionswerten ein ungepaarter einseitiger T-Test durchgeführt (DNA Star ArrayStar 3.0 software). Die Verarbeitung der RNA, die Hybridisierungen und Transformation der gewonnenen Daten erfolgte durch die Haus-interne Servicegruppe um Herrn Thomas Böttger (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim).

## **3.3 Proteine – Extraktion, Auftrennung und Immunodetektion**

### **3.3.1 Lösungen & Reagenzien**

BSA

1 x TBS-T

1 x TBS mit 0.01/ Tween-20

**Extraktionspuffer, pH 8.0**

20 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.8  
 0.744 g EDTA  
 20 g SDS  
 150 ml ddH<sub>2</sub>O  
 pH 8.0 einstellen  
 add 200 ml H<sub>2</sub>O  
 5 ml Aliquots bei -20°C lagern  
 kurz vor Gebrauch Protease/Phosphatase-Inhibitoren  
 zufügen (Tabelle 7)

**5 x LB Probenpuffer**

3 ml 1 M Tris-HCL pH 6.8  
 10 ml 10 % SDS  
 18 ml ddH<sub>2</sub>O  
 14 ml Glycerol 87%, steril

**5 x LB Probenpuffer/DTT**

950 µl 5 x LB Probenpuffer  
 50 µl 1 M DTT  
 Muss immer frisch vor Gebrauch angesetzt werden

**MES Laufpuffer**

250 ml 20 x NuPAGE MES SDS Running Buffer  
 (Invitrogen, NP000202)  
 4750 ml H<sub>2</sub>O

**10 x TBS, pH 7.6**

400 g NaCl  
 120.5 g Tris  
 in ca. 4500 ml ddH<sub>2</sub>O lösen,  
 pH 7.6 einstellen (ca. 76 ml konz. HCl)  
 add 5 Liter ddH<sub>2</sub>O

**1 x WB-Transferpuffer**

250 ml 20 x Transferpufferstammlösung  
 3750 ml ddH<sub>2</sub>O  
 1000 ml 100% MeOH

**20 x WB-Transferpufferstammlösung (2L)**

163.2 g Bicine (Fluka)  
 209.3 g BisTris (Fluka)  
 12 g EDTA  
 mit 2 Liter ddH<sub>2</sub>O auf 2L auffüllen

**Tabelle 7: Protease/Phosphatase-Inhibitoren für Extraktionspuffer.***EP: Extraktionspuffer, Konz.: Konzentration*

| Inhibitor                           | Stock-Konz. | pro 1 ml EP                  |
|-------------------------------------|-------------|------------------------------|
| <b>Benzamidin</b>                   | 250 mg/ml   | 2 µl (immer frisch ansetzen) |
| <b>Aprotinin</b>                    | 2 mg/ml     | 1 µl (-20°C)                 |
| <b>Leupeptin</b>                    | 2 mg/ml     | 1 µl (-20°C)                 |
| <b>PMSF</b>                         | 0,2 M       | 10 µl (-20°C)                |
| <b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b> | 1 M         | 1 µl (-20°C)                 |
| <b>NaF</b>                          | 1 M         | 20 µl (-20°C)                |

**3.3.2 Proteinextraktion aus Mausgeweben und Aufbereitung für Gelelektrophorese**

Die Vorbehandlung einer Proteinprobe für eine Gelelektrophorese umfasst die Solubilisierung, Denaturierung und Reduktion, um alle Proteininteraktionen aufzubrechen. Resultat sollte eine

Lösung einzelner, nicht durch die Behandlung modifizierter, Polypeptide sein (*Rabilloud 1999*). Proteasen die in der Proteinprobe immer vorhanden sind, können zum einen durch Protease-Inhibitoren, aber auch durch Denaturierung in einem SDS-haltigen Puffer, inaktiviert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteine vornehmlich mit der mechanischen Methode der Sonifikation aus tierische Geweben isoliert. Nach der Präparation des Gewebes wurde dies im flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Für die Proteinextraktion wurde das Gewebe mit Extraktionspuffer samt zugesetzter Protease/Phosphatase-Inhibitoren überschichtet. Nun wurde das Gewebe im Extraktionspuffer mithilfe eines Sonifikators (Bandelin Sonopuls) aufgeschlossen (Einstellungen: 20 sec, 5 x 10 Zyklen, Gewebe: 40 – 50 % Power). Dabei wurde stets durch kurze Inkubationszeiten auf Eis dafür Sorge getragen, dass die Proteinlösung sich nicht erhitzt.

Abschließend wurde der Proteinlösung ein 10  $\mu\text{l}$ -Aliquot für die spätere Konzentrationsbestimmung abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Der restlichen Proteinlösung wurden 4  $\mu\text{l}$  1 M DTT pro 100  $\mu\text{l}$  Extraktionspuffer zugegeben und ebenfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **3.3.3 Proteinbestimmung mittels BioRad DC**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in einer Lösung erfolgte mittels des DC Protein Assay Kits (BioRad Laboratories, CA, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die für jede Messung neu angesetzte BSA-Standardkurve umfasste einen Bereich von 2 bis 20  $\mu\text{g}$ . Die colorimetrische Messung erfolgte an einem FLUOstar Galaxy (bMG) Messgerät (Fluorescence Microplate Reader und Fluo32-Software).

### **3.3.4 Protein-Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach Größe bzw. Masse erfolgte im Polyacrylamidgel unter Verwendung von NuPAGE<sup>®</sup> Novex Bis-Tris Gelen (4-12%) (Invitrogen) in dazu passenden Gelelektrophoresekammern (XCell SureLock<sup>™</sup>, Invitrogen) in einem 1x MES SDS Laufpuffer (NuPAGE;Invitrogen). Pro Tasche wurden 10  $\mu\text{g}$  bis 30  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen.

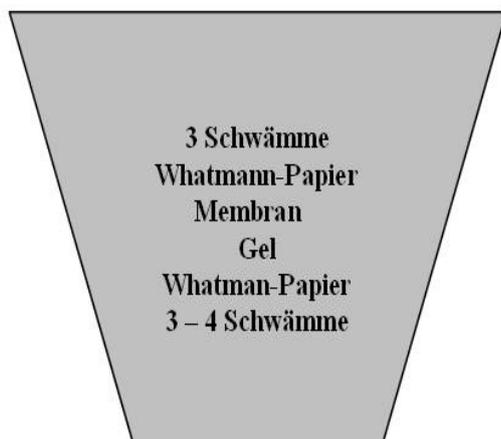
*Probenvorbereitung.* Standardmäßig wurden 10  $\mu\text{g}$  Protein in eine Tasche des NuPAGE<sup>®</sup> Novex Bis-Tris Gels aufgetragen. Dazu wurde die mit DTT versetzte Proteinlösung (3.3.2) mit 20  $\mu\text{l}$  Extraktionspuffer und 5 x LB/DTT sowie 1.5  $\mu\text{l}$  0.25%iger Bromphenolblaulösung auf ein Volumen von 100  $\mu\text{l}$  und eine Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gebracht. Bevor die 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Proteinlösung auf das Gel geladen wurde, ist sie zunächst 10 Minuten bei  $70^{\circ}\text{C}$  und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden. Dann wurde die Probe 1 min mit 14.000 rpm bei

Raumtemperatur zentrifugiert. Verdünnte und nicht verdünnte Proteinlösungen wurden nach Gebrauch wieder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

*Protein-Gelelektrophorese.* Das Gel wurde in die mit 1x MES Laufpuffer zu füllende Gelelektrophoresekammer eingespannt. Es wurden maximal 10  $\mu\text{l}$  der vorbereitete Proteinprobe (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) in eine Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde 5  $\mu\text{l}$  des Markers *Novex Sharp Prestained* (Invitrogen, # LC5800) verwendet und schließlich für 20 min eine Spannung von 75V angelegt, dann die Gelkammer in Eiswasser gestellt und die Spannung für ca. 1 Stunde auf 175 - 200 V erhöht.

### 3.3.5 Westernblot

Das Proteingemisch, das mittels Gelelektrophorese aufgetrennt worden ist, kann elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran-Membran übertragen werden, um so eine sensitive Detektion spezifischer Peptide mittels Antikörpern zu ermöglichen. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran, die sich durch eine hohe Proteinbindungsaffinität auszeichnet, wird als Western-Blot bezeichnet. Als Transfertechnik wurde ein „Semi dry“-Blotting Verfahren gewählt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 30 V für 2 h (XCell II Blot Module, Nitrozellulose-Membran, Invitrogen) in 1x Transferpuffer. Der Aufbau des Blots wurde dabei gemäß Abbildung 7 zusammengefügt. Die Schwämme, das 3 mm Whatman<sup>®</sup>-Filterpapier und die Nitrozellulose-Membran wurden in 1x Transferpuffer getränkt, bevor sie gemäß beschriebenen Aufbau luftblasenfrei im Blotmodul zusammengelegt wurden



**Abbildung 7: Westernblot-Aufbau.** Auf der Kathode ( - ) des XCellII Blot Moduls befinden sich 3 bis 4 Schwämme, gefolgt von einem Whatman Papier. Auf dem Whatman-Papier ist das Proteingel platziert, gefolgt von der Nitrozellulose-Membran, die ebenfalls mit einem Whatman-Papier überschichtet ist. Zuerst, unterhalb der Anode ( + ), befinden sich 3 weitere Schwämme.

### **3.3.6 Visualisierung der geblotten Proteine mit RedAlert™**

Nach dem Blotten der Proteine auf die Membran wurde der Blotaufbau auseinander gebaut und die Membran nach Angaben des Herstellers mit der RedAlert™ Färbelösung inkubiert (Novagen®, Merck, # 71078). Auf diese Weise konnte geprüft werden, ob die Proteine gleichmäßig auf die Membran geblottet worden waren.

### **3.3.7 Immunodetektion geblotteter Proteine**

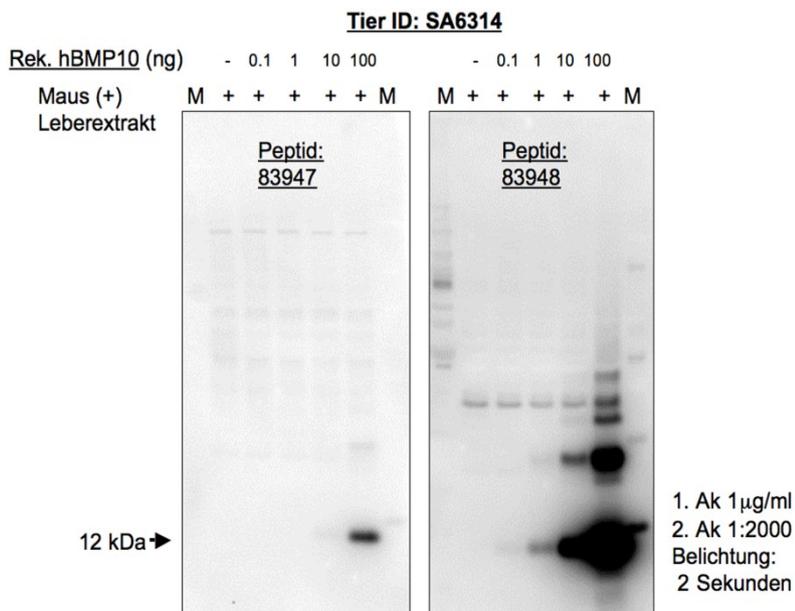
Bei der Immunodetektion von Proteinen wird die Spezifität von Antikörpern genutzt, um die Lokalisation bestimmter Antigenen sichtbar zu machen. Der verwendete Antikörper ist dabei mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein sichtbar macht. Der Antikörper, der gegen das zu findende Antigen gerichtet ist, wird als Primärantikörper (1. AK) bezeichnet. Nach der Bindung des Primärantikörpers an das Antigen bzw. an das nachzuweisende Protein, werden in einem Mehrschrittverfahren die einzelnen Komponenten des Detektionssystems dem Präparat zugeführt. Die erste Komponente dieses Detektionssystems ist meist ein markierter sekundärer Antikörper (2. AK). Das sind Antikörper, deren Antigen Immunglobuline einer bestimmten Tierart sind. Diese sekundären Antikörper können für alle primären Antikörper aus dem gewählten Tier verwendet werden und sind deshalb kommerziell erhältlich. Markiert bzw. gekoppelt oder konjugiert sind sie beispielsweise mit einem Enzym wie der Meerrettichperoxidase (HRP). Die Detektion erfolgt mithilfe eines Substrats, das unter Bildung eines Farbstoffs oder Chemilumineszenz mit diesem Enzym reagiert.

Im Anschluss an die RedAlert™ Visualisierung der membrangebundenen Proteine, wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran für den primären Antikörper durch die Inkubation in Blocking Solution (5% Magermilchpulver in TBS-T) für 1 h blockiert. Dann folgten 5 Waschschrte in TBS-T für jeweils 5 min, bevor die Membran mit dem 1. AK in 3% Magermilchpulver in TBS-T für 3h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Im nächsten Schritt wurde ungebundener 1. AK durch fünfmaliges Waschen in TBS-T entfernt, bevor die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten 2. AK in 3% Magermilchpulver/TBS-T für 1-2 h bei Raumtemperatur folgte. Erneut wurde dann ungebundener Antikörper durch fünfmaliges Waschen in TBS-T für jeweils 5 min und einem weiteren Waschschrte von 1 h entfernt. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgen unter leichtem Schütteln. Die Detektion des Antikörper-markierten Proteins bzw. der Meerrettichperoxidase erfolgte dann mit dem „SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity“ Substrat (Thermo Scientific, # 34096) in Kombination mit dem bildgebenden VersaDoc™ Imaging System (BioRad).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode stets darüber hinaus mithilfe des Pierce Western Blot Signal Enhancers (Thermo Scientific #21050) nach Angaben des Herstellers sensitiviert.

### 3.4 Herstellung eines polyklonalen matBmp10 Antikörpers

Die Herstellung eines Bmp10 Antikörpers, der spezifisch die prozessierte, aktive Form des Bmp10 Proteins (matBmp10) erkennt, wurde bei der Firma Eurogentec in Auftrag gegeben. In dem angebotenen 87-Tage AS-DOUB-LXP Programm wurden zwei Kaninchen mit zwei Peptiden immunisiert und die Antikörper anschließend durch Affinitätsreinigung isoliert.



**Abbildung 8:** *matBmp10* Antikörper detektieren spezifisch BMP10. Immunchemische Analyse der *matBmp10* Antikörper im Western Blot zeigen, dass die Antikörper gegen das prozessierte BMP10 aus dem Kaninchen SA6314 rekombinantes humanes BMP10 (R&D) bis zu einer minimalen Konzentration von 1 ng im Proteingemisch (isoliert aus der murinen Leber) nachweisen können. AK: Antikörper, M: Größenstandard, Rek. hBmp10: Rekombinantes humanes matures BMP10.

Die Peptide für die Immunisierung wurden durch den Auftraggeber vorgegeben und folgendermaßen bestimmt: Um Kreuzreaktionen des neuen matBmp10 Antikörpers mit anderen Familienmitgliedern und insbesondere mit BMP9 zu vermeiden, wurde für die Immunisierung BMP10 Peptide ausgewählt, die kaum Homologien mit anderen Familienmitgliedern aufweisen. Dies geschah mithilfe des T-Coffee „Multiple Sequence Alignment“ Programm (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/t-coffee/index.html>). Zunächst ermöglichte das Alignment der Aminosäuresequenzen aller BMP Familienmitglieder in der Maus die Identifizierung der am stärksten konservierten Bereiche innerhalb dieser Familie. In einer zweiten Runde wurden dann die BMP10- mit der BMP9-Aminosäuresequenz *aligned* und auch hier die stärksten konservierten Bereich markiert. Schließlich wurden zwei Aminosäuresequenzen aus den Bereichen des

prozessierten BMP10 Peptids ausgewählt, welche die geringsten Homologien mit BMP9 und auch den anderen BMP Familienmitgliedern aufwiesen. Diese ausgewählten Sequenzen, GNYCKKTPLYIDFKE (Peptid 83947) und LDKGVVITYKFKYEGMA (Peptid 83948), dienten schließlich als Matrize für die Synthese der Antigene. Als Trägerprotein für die Immunisierung ist KLH (Keyhole-Limpet-Hämocyanin) ausgewählt worden.

Die erhaltenen gereinigten Antikörper wurden schließlich im Western Blot auf rekombinanten humanen BMP10 getestet, das mit Proteinextrakt der murinen adulten Leber versetzt worden war. Es zeigte sich, dass der Antikörper gegen das Peptid 83947 (matBmp10\_48) aus dem Kaninchen SA6314 rekombinantes humanes BMP10 (#2926BP, R&D Systems) bis zu einer minimalen Konzentration von 1 ng im Proteingemisch nachweisen kann. Da nur ein Signal detektierbar war, wenn rekombinantes humanes BMP10 dem Leberextrakt zugesetzt wurde, ist anzunehmen, dass keine Kreuzreaktion des matBmp10 Antikörper mit dem engsten Verwandten aus der BMP-Proteinfamilie, BMP9, welches am stärksten in der Leber exprimiert wird, stattfindet.

### **3.5 Histologische Techniken**

#### **3.5.1 Lösungen & Reagenzien**

##### **0.5 M EGTA**

19.02 g EGTA  
100 ml H<sub>2</sub>O  
pH 7.5 mit 10 N NaOH eingestellt

##### **Entellan**

(Merck, #107960)

##### **Eosin Gebrauchslösung**

30 ml 1% Eosin G-Lösung  
270 ml H<sub>2</sub>O  
150 µl Eisessig  
filtrieren, dunkel aufbewahren

##### **Eosin G-Stammlösung (1%)**

1 g Eosin G (Merck, #921K11613835)  
100 ml H<sub>2</sub>O

##### **LacZ-Färbelösung (10ml)**

9.3 ml Waschlösung  
100 µl 0.5M KFeCN-Lösung A  
100 µl 0.5M KFeCN-Lösung B  
500 µl 2% X-Gal

##### **SPP-Phosphatpuffer (1L), pH 7.4**

77.4 ml 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
22.6 ml 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

##### **LacZ-Waschlösung**

2 ml 1M MgCl<sub>2</sub>  
5 ml 2% Natriumdesoxycholat  
10 ml 2% Nonidet® P40  
auf 1L mit SPP-Puffer auffüllen

##### **Methylgrün-Färbelösung(0.5%)**

0,5 g Methylgrün (Sigma, 323829)  
100 ml 0.1M Natriumacetatpuffer

**Ethanol/HCl**

200 ml 70% (v/v) Ethanol in H<sub>2</sub>O

20 ml 37% HCl

**Hämalaun**

Hematoxylin Solution Gills No.3

(Sigma-Aldrich, #GHS332)

**LacZ-Fixierlösung**

10 ml SPP-Phosphatpuffer

160 µl Glutaraldehyd-Lösung, 25% in H<sub>2</sub>O

(Sigma, G5882)

20 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>

100 µl 0.5 M EGTA, pH 7.5

**0.5 M KFeCN-Lösungen A**

16.463g K<sub>3</sub>FeCN<sub>6</sub>

100 ml H<sub>2</sub>O

filtrieren, dunkel aufbewahren

**0.5 M KFeCN-Lösungen B**

21.12 g K<sub>4</sub>FeCN<sub>6</sub>

100 ml H<sub>2</sub>O

filtrieren, dunkel aufbewahren)

**0.1M Natriumacetatpuffer**

36 g Natriumacetat-Trihydrat

100 ml ddH<sub>2</sub>O

pH 4.2

pH-Wert mit Eisessig eingestellt

**PBS**

4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O

16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O

150 mM NaCl

pH 7.3

**PolyFreeze**

(Polyscience Inc, 19636-1)

**X-Gal (2%)**

20 mg/ml X-β-Gal (Roth, #2315)

in DMFA

bei -20°C dunkel gelagert

**3.5.2 Paraffindünnschnitte**

Zur Herstellung von Paraffindünnschnitten wurden die Embryonen oder Gewebe über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend, durch die Inkubation für jeweils zwei Stunden in 70%, 80%, 90%, 96% und 100% Ethanol, unter leichtem Schütteln (ELMI Shaker S4) entwässert. Danach wurden sie in Isopropanol überführt und, nach Inkubation über Nacht, zunächst für mindestens zwei Stunden in flüssigem Paraplast (Sherwood Medical Co., #8889-502005) inkubiert. In dem Inkubationsbehälter wurde dann ein Vakuum erzeugt und weitere zwei Stunden inkubiert. Anschließend konnten die Präparate ausgerichtet und mit flüssigem Paraplast in Einbett-Schalen (Polysciences Inc., #18986) eingebettet werden. Nach Aushärtung über Nacht, wurden mit einem Mikrotom (Leica RM 2125 RT) 4-12 µm dicke Paraffindünnschnitte hergestellt, die zur Streckung in ein 46°C warmes Wasserbad (Leica HI 1210) überführt und auf Objektträger gezogen (SuperFrost Ultra Plus<sup>®</sup>, Menzel Gläser) wurden. Anschließend erfolgte eine Fixierung auf dem Objektträger bei 37°C über Nacht. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Präparate bei 4°C gelagert.

### 3.5.3 Kryoschnitte

Isolierte Embryonen oder Gewebe wurden in PBS gespült, bevor sie einige Stunden oder über Nacht in Fixans (4% PFA oder LacZ-Fixierlösung) bei 4°C inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Embryonen oder Gewebe zunächst zwecks Entwässerung in 10% Saccharose für 30 min überführt und dann in 25% Saccharose für mindestens 4 h inkubiert, bis die Objekte auf den Gefäßboden abgesunken waren. Sie wurden anschließend kurz in PBS gespült und die Embryonen/Gewebe luftblasenfrei in PolyFreeze eingebettet. Die mit PolyFreeze umschlossenen Präparate wurden nun auf Trockeneis gestellt und anschließend bei -80°C gelagert. Skelettmuskeln wurden mit PolyFreeze umschlossen und in N<sub>2</sub> gekühlten Isopentan schockgefroren, um das Platzen der Myofibrillen zu vermeiden. Das Anfertigen der 5-12 µm dicken Kryoschnitte erfolgte auf einem Kryomikrotom (Leica CM 3050). Die Schnitte wurden auf SuperFrost Ultra Plus<sup>®</sup> Objektträger (Menzel Gläser) gezogen und ca. 30 bis 60 min an Luft getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Präparate bei -20°C oder -80°C gelagert.

### 3.5.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung)

Die H&E-Färbung ermöglicht eine schnelle Übersichtsfärbung von Gewebeschnitten. Durch die positiv geladenen Komplexverbindungen des Alaun erfolgt eine Anlagerung an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren und somit die Blaufärbung der Zellkerne. Eosin ist negativ geladen und bindet sich an die positiven Gruppen von z.B. Proteinen, so kommt es zur Rosa/Rot-Färbung des Zytoplasmas.

Für H&E-Färbung von Paraffingewebeschnitten mussten diese zunächst entparaffiniert werden. Dies erfolgte durch die zweimalige Inkubation für 5 min in Xylol. Anschließend folgte die Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe, in der die Schnitte jeweils 2 min in 100%, 90%, 80%, 70% Ethanol und abschließend in ddH<sub>2</sub>O getaucht wurden. Nun folgte eine zehnmütige Inkubation in Hämalaun. Anschließend wurden die Objektträger zweimal in ddH<sub>2</sub>O gedippt bevor sie 10 min in fließendem Leitungswasser gespült wurden. Dann wurden die Präparate zehnmal kurz in Ethanol/HCl getaucht und sofort im Anschluss kräftig in Leitungswasser gespült, bevor sie weitere 7 min in stehendem Leitungswasser inkubiert wurden. Es folgte nun die Gegenfärbung mit Eosin. Hierfür wurden die Schnitte 7 min in der EosinG-Gebrauchslösung inkubiert und danach in eine aufsteigende Ethanol-Reihe überführt: 70% 2x dippen, 80% 2x dippen, 90% 2x dippen und 100% für 10 Minuten. Abschließend wurden die Präparate für 10 min in Xylol inkubiert und schließlich mit Entellan<sup>®</sup> eingedeckelt.

### **3.5.5 Kernfärbung mit Methylgrün**

Die Methylgrünfärbung markiert DNA bzw. Kerne grün. Für die Färbung wird Methylgrün in 0.1 M Natriumacetatpuffer gelöst, auf die zu färbenden Gewebeschnitte gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Inkubation der Schnitte mit Färbelösung bei höheren Temperaturen (60°C) und/oder für längere Zeit mag eine verbesserte Kernfärbung hervorbringen. Die genaue Inkubationszeit und -temperatur ist stark abhängig von der Methode, die zur Antigen-Demaskierung verwendet wurde und sollte im Einzelfall ausgetestet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sämtliche Gewebeschnitte, die mit Methylgrün gegengefärbt wurden, mit der Färbelösung für 10 min bei 60°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Färbelösung abgenommen, die Schnitte kurz in ddH<sub>2</sub>O gespült und durch zehnmaliges, schnelles Eintauchen in 95% Ethanol und zwei Runden 10maliges Eintauchen in 100% Ethanol dehydriert. Schließlich wurden die Schnitte weitere 10 min in 100% Xylol inkubiert, bevor sie Entellan<sup>®</sup> eingedeckelt wurden.

### **3.5.6 LacZ-Färbung auf Kryoschnitten lacZ transgener Gewebe**

Das *lacZ*-Gen codiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase. Sie hydrolysiert unter anderem das Substrat X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid), ein farbloses Analogon der Laktose, zu einem intensiv blau gefärbten Produkt.

Für die LacZ-Färbung wurden Kryoschnitte *lacZ* transgener Gewebe (Schnittdicke 8-20 $\mu$ m) verwendet. Die bei -80°C gelagerten Schnitte wurden 30 min bei Raumtemperatur gelagert, um ein Auftauen und Antrocknen zu ermöglichen. Dann wurden die Schnitte in PBS gewaschen, um das PolyFreeze auszuspülen. Es folgte eine zehnminütige Nachfixierung in der LacZ-Fixierlösung. Die Fixierlösung diente ebenfalls dazu, Calcium abzufangen, das im weiteren Verlauf die Enzymreaktion behindert hätte. Anschließend wurden die Schnitte 2 x 10 min in LacZ-Waschlösung gewaschen und schließlich die LacZ-Färbelösung auf die Schnitte pipettiert. Die Färbung erfolgte stets bei Raumtemperatur über Nacht. Wenn die gewünschte Farbintensität erreicht war, wurden die Schnitte 3 x in PBS gewaschen, durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe geführt, 10 min in Xylol inkubiert und mit Entellan<sup>®</sup> eingedeckelt.

### 3.6 Immunohistochemische Techniken

Als Immunhistochemie werden Methoden bezeichnet, die Proteine mithilfe von Antikörpern in histologischen Schnitten sichtbar machen. Man nutzt hier die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Der verwendete Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein im Präparat sichtbar macht (Kapitel 3.3.7).

#### 3.6.1 Lösungen & Reagenzien

**BSA** Albumin Fraktion V (Roth, #8076)

**4% PFA**

4% w/v in PBS

**DAB Peroxidase-Substrat-Lösungen**

2 DAB Tabletten (Sigma, #D5905), in 10 ml 0.1M TrisHCl-Puffer, pH 7.6, lösen und durch einen 0,2 µm Filter filtrieren. Kurz vor Gebrauch 12µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben

**Schafserum** -Hitze inaktiviert-

**Triton X 100**

**Mowiol**

2,4 g Mowiol 4-88 (Calbiochem Nr. 475904)

6 g Glycerin

6ml H<sub>2</sub>O

12 ml 0.2 M Tris/HCl-Puffer pH 8.5

Mowiol, Glycerin und Wasser mischen und einige Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen. Danach Zugabe des Tris/HCl-Puffers und mit einem Magnetrührer bei 50°C bis zur vollständigen Auflösung rühren. Bei -20°C aufbewahren für eine Langzeitlagerung (bis zu 2 Jahren), oder bei 4 °C für eine Kurzzeitlagerung bis zu 2 Wochen.

**PBS**

4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O

16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O

150 mM NaCl

pH 7.3

#### 3.6.2 Antikörperfärbung auf Paraffindünnschnitten mithilfe des ABC Kits

Das Vectastain<sup>®</sup> Elite<sup>®</sup> ABC Kit (Vector Laboratories) ist ein Immunoperoxidase System. Dieses Kit verwendet nicht markierte Primärantikörper, gefolgt durch biotinylierte sekundäre Antikörper und schließlich einen „Avidin und Biotin Meerrettichperoxidase“- Komplex. Das Prinzip dieses Detektionssystems basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin und Avidin für Biotin. Streptavidin und Avidin besitzen jeweils vier Bindungsstellen für Biotin und ermöglichen so die Amplifizierung des ursprünglichen Signals, denn an den biotinylierten sekundären Antikörper bindet Avidin oder Streptavidin, die ihrerseits nun drei weitere Biotine binden können. In dem ABC Nachweissystem sind Biotin und Avidin mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt. Dieser im

Komplex vorhandenen Peroxidase wird im letzten Schritt Wasserstoffperoxid als Substrat zugeführt. Die freierwerdenen Protonen in dieser Reaktion oxidieren ein angebotenes, zunächst fast farblose Chromogen zu seinem farbigen Endprodukt unter Bildung von Wasser. Hier wurde vornehmlich DAB (3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, Sigma #32748) als Chromogen angeboten, das ein braunes Endprodukt bildet. Die Antikörperfärbungen sind stets nach Angaben der Hersteller durchgeführt worden. Für den Nachweis von BMP10 in Paraffinschnitten wurde der proBMP10 AK von R&D Systems (*Human BMP-10 Propeptide Affinity Purified Polyclonal Ab, Goat IgG*, # AF3956) 1:100 verdünnt eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente ein biotinylierte Rabbit anti-Goat Antikörper (1:1000, Vector Laboratories; # BA-5000).

### 3.7 Manipulationen des Modelltiers Maus

Manipulationen am Modelltier Maus wurden, wenn nicht anders im Text beschrieben, nach Prinzipien und Methoden vorgenommen wie sie im folgenden Standardwerk beschrieben sind:

**MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO; A LABORATORY MANUAL**

Andras Nagy, Marina Gertsenstein, Kristina Vintersten, Richard Behringer

*Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003*

Morphologische Beurteilungen der verschiedenen Embryonalstadien und ihrer Gewebe/Organe erfolgten mithilfe des folgenden Werks:

**THE ATLAS OF MOUSE DEVELOPMENT**

M. H. Kaufman;

Academic Press, 1992

#### 3.7.1 Verwendete Mauslinien

**Inzucht-Linien.** C57BL/6J, geliefert von den Jackson Laboratories ([www.jax.org](http://www.jax.org)) oder aus hausinterner Zucht.

**Transgene Linien.** CMV-Cre (*Schwenk, Baron et al. 1995*), Flk1-Cre (*Licht, Raab et al. 2004*), Flp-Deleter (*Rodriguez, Buchholz et al. 2000*), Ckmm-Cre (*Lyons, Muhlebach et al. 1991*), Nkx2.5-Cre (*Stanley, Biben et al. 2002*), Nppa-Cre4 (*de Lange, Moorman et al. 2003*), Rosa26-LacZ (*Soriano 1999*), T(S)-Cre (*Feller, Schneider et al. 2008*), TEK-Cre (*Koni, Joshi et al. 2001*), VECadherin-CreERT (*Monvoisin, Alva et al. 2006*),  $\alpha$ MHC-Cre (*Agah, Frenkel et al. 1997*)

### 3.7.2 Embryonale Stammzellen – Kultur, Transformation und Selektion muriner ES-Zellen

Im Folgenden werden die Techniken beschrieben, die verwendet wurden um murine ES-Zellen zu kultivieren, gezielte Modifikationen an ihrem Genom mittels homologer Rekombination vorzunehmen und sie für die Injektion in Blastozysten vorzubereiten. Dabei wurde bis auf kleine Abweichungen das von Jennifer V. Schmidt beschriebene Protokoll befolgt (*Schmidt 2001*). Die Kultivierung aller genannten Zellen erfolgte in Kulturgefäßen der Firma Nunc GmbH & Co. KG in einem begasten Brutschrank (HeraCell® 150, Thermo Scientific; 10% (v/v) CO<sub>2</sub>) bei 37°C. Die Zellkulturarbeiten wurden in einer Sterilwerkbank (Heraeus HeraSafe 12) durchgeführt. Sämtliche Geräte und Lösungen wurden vor der Benutzung sterilisiert.

#### 3.7.2.1 Zellkulturmedien & Puffer

##### **ES-Medium**

415 ml DMEM (4.5 g/L Glucose; 3.97 mM L-Glutamine)

75 ml FCS

5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren

5 ml Penicillin/Streptomycin

3.5 µl β-Mercaptoethanol

500 U LIF

##### **MEF-Medium**

Wie ES-Medium nur ohne LIF!

##### **Mitomycin-Lösung**

200 ml DMEM

2 mg Mitomycin C

5% FCS

##### **Einfriermedium**

45% DMEM (4.5 g/L Glucose; 3.97 mM L-Glutamine)

45% FCS

10% DMSO

##### **PBS**

4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O

16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O

150 mM NaCl

pH 7.3

##### **Hepes-Puffer (6L):**

42,42 g NaCl

2,4 g KCl

0,36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,48 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

6 g Glucose

0,06 g Phenolrot

28.6 g Hepes

Add 5 L Zellkulturwasser, dann pH 7.3 einstellen mit NaOH oder HCl.

Add 6 L und in Zellkulturflaschen umfüllen (500 ml).

Autoklavieren und bei 4°C lagern.

##### **Trypsin-EDTA (50 ml):**

5 ml Trypsin

45 ml Hepes/EDTA

##### **Transfermedium:**

8.5ml M2

1.5ml 100%FCS

**Hepes/EDTA (2L)**

2 L HEPES-Puffer

0,073 g EDTA

**3.7.2.2 Zellkulturreagenzien**

|  |                              |
|--|------------------------------|
| DMSO   | Sigma, #D2438                |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM<br>(4.5 g/L Glucose; L-Glutamine, Natrium-Pyruvat) | Gibco/Invitrogen, #42430-025 |
| EDTA   | Sigma # E-5134               |
| Fötiales Kälberserum, FCS  | Gibco/Invitrogen, #10270-106 |
| G418/Geneticin   | Gibco, #11811098             |
| Gelatine   | Sigma, #G-1890               |
| Glutamin   | Gibco/Invitrogen, #25030-024 |
| Hepes, PUFFERAN® ≥99,5 %, CELLPURE®  | Roth, #9105.3                |
| LIF, ESGRO®  | Millipore, #ESG1107          |
| M2 Medium  | Sigma, # M7167               |
| Mineralöl  | Sigma, M8410                 |
| Mitomycin C  | Sigma, M4287                 |
| Nicht-essentielle Aminosäuren 100x (MEM 100x )   | Gibco/Invitrogen, #11140-035 |
| Penicillin/Streptomycin  | Gibco/Invitrogen, #15140-122 |
| Trypsin  | Gibco/Invitrogen, #25200-056 |
| β-Mercaptoethanol  | Gibco/Invitrogen, #31350-010 |

**3.7.2.3 Zelllinien****Tabelle 8: Verwendete ES-Zelllinie.**

| Bezeichnung | Spenderorganismus | Gewebe | Zelltyp   | Referenz/                      |
|-------------|-------------------|--------|---|--------------------------------|
| V8.1        | Maus              | ICM    | Embryonale Stammzellen<br>(129/FVB Hybridlinie) | (Eggan, Akutsu et al.<br>2001) |

**3.7.2.4 Mitomycin Behandlung embryonaler Maus-Fibroblasten Zellen**

Primäre murine Fibroblasten, gewonnen aus E14.5 Embryonen einer Neomycin-resistenten Mauslinie, wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit der Mitomycin C-Lösung im Brutschrank inkubiert (90mm-Schale: 8ml; 150mm-Schale: 20 ml). Nach 2- 4 Stunden wurde die Mitomycin C-Lösung abgesaugt und die Zellen zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, der Trypsin-Verdau mit Medium gestoppt, die Zellen abzentrifugiert, in Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen umgefüllt (1 Kryoröhrchen pro 90 mm Schale und 3 Kryoröhrchen je 150 mm Schale) und eingefroren.

### **3.7.2.5 Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen der Maus**

Pluripotente, embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Linie V8.1 (Eggan, Akutsu et al. 2001) wurden auf gelatinisierten (0.2 % Gelatine) und MitomycinC-behandelten embryonalen Fibroblasten (MEFs) beschichteten Zellkulturschalen in ES-Zellmedium kultiviert. Für die Elektroporation wurden 25 µg des gereinigten, linearisierten und in TE-Puffer aufgenommen Zielvektors eingesetzt. Die Elektroporation der vereinzelt  $1 \times 10^7$  ES-Zellen in einer 800 µl HEPES-Buffer Suspension erfolgte in einer 4mm-Elektroporationsküvette (BTX), mithilfe des BTX Elektroporations Generator ECM 830. Die Zellen wurden anschließend auf drei gelatinisierte, MEF beschichtete 10cm-Schalen ausgesät, wo die transformierten Zellen 8-10 Tage mit G418 (400 µg/ml) auf die, durch den Zielvektor vermittelte, Neomycin-Resistenz hin selektioniert wurden. G418 resistente ES-Klone wurden anschließend auf vorbereitete 96-Loch Platten (Gelatine, MEFs) vereinzelt.

Wenn die Zellen auf der 96-Lochplatte eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten, wurde die Zellen mit jeweils 50µl Trypsin/EDTA behandelt (3 min, 37°C) und durch mehrmaliges Auf und Ab pipettieren vereinzelt. Dann wurden aus jedem Loch 10 µl Zellsuspension in jeweils ein Loch einer vorbereiteten (Gelatine, MEFs) 24-Lochplatte überführt, das bereits 2 ml ES-Medium enthielt. Die restlichen 40 µl Zellsuspension wurden mit 40 µl ES-Medium versetzt, bevor 80 µl Einfriermedium dazu gegeben und alles mit 50 µl Mineralöl überschichtet wurde. Die 96er-Platten wurden im Folgenden mit Parafilm<sup>®</sup> umwickelt und bei -80°C eingefroren.

Die Zellen auf den 24-Lochplatten bzw. die aus ihnen gewonnene genomische DNA (Kapitel 3.2.3.5) wurde für die Analyse durch Southern-Blot verwendet (Kapitel 3.2.9).

### **3.7.2.6 Vorbereitung der ES-Zellen für die Blastozysten-Injektion**

Die positiv identifizierten ES-Zellklone, wurden aufgetaut und propagiert bis pro Klon eine 10cm-Schale vorhanden war. Anschließend wurden die ES-Zellen mit Trypsin/EDTA vereinzelt und auf eine unbehandelte 10cm-Schale transferiert. Etwa 1 h lang wurde diese Platte bei 37°C inkubiert, damit sich die in der Zellsuspension befindlichen Fibroblasten absetzten. Anschließend wurden die sich weiterhin in Suspension befindlichen ES-Zellen mit dem Medium abgesaugt, in Falcon-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (5 min, 900 rpm) pelletiert. Anschließend wurden die pelletierten ES-Zellen in 500 µl Transfermedium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 37°C inkubiert. Die Blastozysten-Injektion der ES-Zellen erfolgte durch Susanne Kreutzer (MPI Bad Nauheim).

### 3.7.3 Murine Krankheitsmodelle

#### 3.7.3.1 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie (Lungenhochdruck)

Die pulmonale Hypertonie ist eine Sammelbezeichnungen für Krankheiten, die durch einen zunehmenden Anstieg des Gefäßwiderstandes und einen Anstieg des Blutdrucks im Lungenkreislauf gekennzeichnet sind, oft verbunden mit einer darauf folgenden Rechts-Herzinsuffizienz. Die Idee, dass Hypoxie, d.h. Sauerstoffmangel, allein für den strukturellen Umbau der pulmonalen Arterien, der schließlich zu einem erhöhten Lungendruck führt, ausreichend ist, ist bereits seit 1963 bekannt (*Arias-Stella and Saldana 1963*). Die Hypoxie führt zu einer messbaren Zunahme der  $\alpha$ SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin, engl.) Expression in der Wand kleiner pulmonalen Arterien, welche unter normoxischen Bedingungen wenig oder gar kein  $\alpha$ SMA exprimieren. Größere Gefäße hingegen weisen eine verdickte *Tunica media* und *Tunica adventitia* auf. Dies wird, unter anderem, ebenfalls auf die verstärkte Akkumulation von glatten Muskelzellen und Myofibroblasten ( $\alpha$ SMA positiv) zurückgeführt (*Stenmark, Fagan et al. 2006*).

Hypoxische Bedingungen. Um einen möglichen Effekt von BMP10 auf die pulmonale Hypertonie festzustellen, wurden 8-12 Wochen alte, weibliche, wildtypische und mutante Wurfgeschwister der Linie *ckoBmp10/Nppa-Cre* für 21 Tagen unter chronisch hypoxischen Bedingungen (10% O<sub>2</sub>) gehalten. Dies wurde durchgeführt von der Gruppe Dr. Norbert Weissmanns, JLU Universität Gießen. Genauere Angaben zu den Haltungsbedingungen können (*Schermuly, Pullamsetti et al. 2007*) entnommen werden.

#### Beurteilung der rechtsventrikulären Hypertrophie und der pulmonalen vaskuläre Veränderungen.

Nach 21 Tagen hypoxischen Haltungsbedingungen wurden die Mäuse in die Räumlichkeiten des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim überstellt. Der Transport erfolgte in regulären Transportboxen. Die Einleitung der Narkose erfolgte durch intraperitonealer Gabe von Ketamin 120mg/kg und Xylazin 16 mg/kg Körpergewicht. Sobald die chirurgische Toleranz erreicht war, erfolgte die Perfusion der Lunge über den rechten Ventrikel mit 1 x PBS und einem Druck von 15 cm Wassersäule. Zur selben Zeit wurde die Lunge mit 1% PFA/PBS und einem Druck vom 20 cm Wassersäule über die Trachea aufgebläht. Nachdem das Blut durch die Perfusion völlig ausgespült worden war, erfolgte eine weitere Fixierung des Lungengewebes durch die Perfusion der Lunge über den rechten Ventrikel mit 1% PFA/PBS für 30 min. Abschließend wurden Herz und Lunge aus der Maus gehoben, wobei ein chirurgischer Knoten über der Trachea verhinderte, dass das PFA aus der Lunge austrat und diese weiterhin aufgebläht blieb. Herz und Lunge wurden über Nacht in 1% PFA/PBS bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag in PBS überführt.

Bestimmung des Trockengewicht des Herzens. Das Herz wurde von der Lunge präpariert und beide Atrien sowie größere Gefäße entfernt. Anschließend wurde die muskuläre Wand des rechten Ventrikels von Septum und linken Ventrikel separiert. Die Gewebe des rechten Ventrikels und des linken Ventrikels/Septum wurden je in ein unverschlossenes Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und über Nacht bei 60°C getrocknet. Am nächsten Tag wurde das Trockengewicht mit einer analytischen Feinwaage bestimmt und ins Verhältnis zum Körpergewicht der Spendermaus gesetzt.

Paraffineinbettung der hypoxischen Lungen. Die Trachea wurde von der Lunge entfernt und Letztere in 2% Agarose/PBS eingebettet. Anschließend wurde die im Agaroseblock eingebettete Lunge mithilfe eines Messerabstandshalter in 2 mm dicke Scheiben zerschnitten. Anschließend wurden die Lungenstücke sorgfältig von der Agarose befreit und nach einer Ethanol-Entwässerungsreihe in Paraffin eingebettet (Kapitel 3.5.2).

Bestimmung der Muskularisierung der kleinen peripheren pulmonalen Arterien. Die Muskularisierung der Arteriolen wurde durch die Doppelfärbung der 3µm dicken Paraffinschnitte mit den Antikörpern gegen  $\alpha$ -SMA (Sigma #A2547; Verdünnung 1:900) als Marker für glatte Muskelzellen und Myofibroblasten, und anti-human von Willebrand Faktor (Dako # A0082, Verdünnung 1:900) als Endothelmarker bestimmt. Die Färbung erfolgte mithilfe der Reagenzien von Vector Laboratories und ihren anhängigen Protokollen: VECTOR<sup>®</sup> M.O.M.<sup>™</sup> Immunodetection Kit BASIC (# BMK-2202), Vector<sup>®</sup> Streptavidin/Biotin Blocking Kit (# SP-2002), Streptavidin Horseradish Peroxidase R.T.U. (#SA-5704), VECTOR NovaRED Peroxidase Substrate Kit (# SK-4800), ImmPRESS Anti-Rabbit Ig (Peroxidase) Polymer Detection Kit (# MP-7401), DAB Peroxidase Substrate Kit (# SK-4100). Im Anschluss an die immunohistochemische Färbung erfolgte eine Gegenfärbung mit Methylgrün (Kapitel 3.5.5), bevor die Schnitte nach einer Ethanol-Entwässerungsreihe in Entellan<sup>®</sup> eingebettet wurden.

Morphometrie und Dokumentation. Mithilfe von Hellfeldmikroskopie und dem morphometrischen Visiopharm Integrator System (Visiopharm) wurde bei einer 40fachen Vergrößerung in jeder Lunge 50 – 60 randomisiert ausgesuchte Gefäße mit einem Durchmesser von 20 – 50 µm vermessen und dokumentiert.

### **3.7.3.2 Die tranverse Aortenkonstriktion – Eine Druck-induzierte linksventrikuläre Hypertrophie**

Hypertrophie entsteht als Reaktion auf eine chronische Mehrbelastung des Herzens. Diese kann mechanische, hämodynamische, hormonelle oder pathologische Stimuli als Ursache haben und ist durch die Vermehrung der kardialen Muskelmasse gekennzeichnet. Im Modell der transversen Aortenkonstriktion (TAC) wird die Hypertrophie durch eine chronische hämodynamische Mehrbelastung hervorgerufen. Diese wird durch die mechanische Verengung des Aorta

hervorgerufen. Die TAC, welche die humane Aortenstenose imitiert, ist in der Maus ein häufig benutztes Modell der kardialen Druck-induzierten Hypertrophie. Sie führt zunächst zu einer kompensierenden, linksventrikulären Hypertrophie des Herzens, jedoch auf Dauer zu einem nachteiligen Umbau des Herzens, der schließlich in Dilatation und Herzinsuffizienz endet (Rockman, Ross et al. 1991).

Die Analgesie und chirurgischen Eingriffe, die an männlichen wildtypischen und mutanten Wurfgeschwistern der Mauslinie *B10laZ* und *ckoBmp10/Nppa-Cre* vorgenommen wurden, sind von Katja Kolditz (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim) durchgeführt worden.

Beurteilung der linksventrikulären Hypertrophie anhand des kardialen Trockengewichts. Die hypertrophe Massenzunahme wurde anhand der Trockengewichte der ventrikulären Kammern, bzw. ihres Massenverhältnis zueinander, 21 d nach der TAC bestimmt. Die Herzen wurden zunächst mit 1x PBS gespült, um alles Blut zu entfernen. Anschließend wurden beide Atrien entfernt und die muskuläre Wand des rechten Ventrikels von Septum und linken Ventrikel separiert. Die Gewebe des rechten Ventrikels und des linken Ventrikels samt Septum wurden je in ein unverschlossenes Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und über Nacht bei 60°C getrocknet. Am nächsten Tag wurden das Trockengewicht mit einer analytischen Feinwaage bestimmt und in folgendes Verhältnis gesetzt: Masse rechter Ventrikel zu Masse linker Ventrikels + Septum.

### 3.7.3.3 Arteriogenese-Modell

Nach einem Gefäßverschluss gibt es zwei adaptive Mechanismen, die den unterbundenen Blutfluss versuchen wieder herzustellen, um so anhaltende Hypoxie und Gewebenekrosen zu verhindern. Zum einen das Wachstum von neuen Gefäßen ausgehend von bereits existierenden Gefäße/Kapillaren, Angiogenese genannt, und zum anderen das Wachstum bereits vorhandener Arteriolen, die Arteriogenese (Scholz, Ziegelhoeffer et al. 2002; Schaper 2009). Um den Einfluss der hier untersuchten Proteine auf die Arteriogenese zu untersuchen, wurde in transgenen Mauslinien (*ckoBmp10/Nppa-Cre* und *B10laZ*) die Okklusion der *A. femoralis* im rechten Hinterlauf durch Ligatur (Abbinden des Gefäßes mit einem chirurgischen Doppelknoten eines 6.0 nicht resorbierbaren Seidenfadens) herbeigeführt. Alle chirurgischen Eingriffe und die Analgesie wurden von Silvia Schimanski (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim) durchgeführt.

Die Gewebepfusion wurde zunächst unmittelbar vor, unmittelbar danach sowie 3 Tage, 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage nach der Ligatur mithilfe eines Laserdopplers bestimmt. Der verwendete Laserdoppler Aufbau (Doppler Perfusion Imager MLDI 5063; Moor Instruments, UK) mit dem

angeschlossenen bildgebenden System war ausgelegt, um den Blutfluss in der subkutanen Mikrozirkulation zu bestimmen, da die Laser-Penetration nur in eine Tiefe von 1-2 mm des Gewebes reicht. Der Aufbau war so ausgerichtet, dass mithilfe eines Laserstrahls (20 Hz-20 kHz), der durch einen beweglichen Spiegel ausrichtbar war, ein definierter Bereich, in welchem die beiden Hinterpfoten der Maus fixiert waren, gescannt werden konnte. Während der Messung wurden die narkotisierten Tiere in einer klimatisierten Kammer bei 37°C gehalten.

Das Wachstum prä-existierender kollateralen Gefäße wurde des Weiteren histologisch verfolgt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere an definierten Zeitpunkten narkotisiert und mit 0.1 ml Heparin *i.p.* heparinisiert. Es folgte die transkardiale Perfusion, zunächst mit einem Dilatationspuffer. Dies ermöglichte zum einen die Euthanasie des Tieres durch Ausbluten und gleichzeitig die Entspannung aller durchspülten Gefäße. Anschließend folgte eine Perfusion für 10 min mit 3 % PFA, um das Gewebe zu fixieren. Anschließend wurden die Muskeln, wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, für das Anfertigen von Kryoschnitten eingebettet.

#### **3.7.4 Tamoxifen Injektionen**

Um in der VE-CadherinCreERT Mauslinie (Monvoisin, Alva *et al.* 2006) die Cre-Expression vom VE-Cadherin Locus zu aktivieren, bedarf es der Tamoxifen-Administration. Da es das Ziel war, eine möglichst ubiquitäre CRE Expression im embryonalen Endothel zu erzielen, wurden nach den Vorgaben von Monvoisin *et al.*, dem trächtigen Muttertier an E10.5 und E12.5 1 mg Tamoxifen (in einem Volumen von 100 µl) intraperitoneal injiziert. Die injizierte Tamoxifen-Lösung war folgendermaßen bereitet worden: 10 mg Tamoxifen (Sigma, T5648) wurden mit einem Milliliter Miglyol (Neutralöl, Miglyol 812) versetzt und bei 55°C unter ständigem Schütteln (1-2 h) und gelegentlichem Vortexen gelöst. Anschließend wurde die Tamoxifen-Lösung bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **3.7.5 Magnetresonanztomographie (MRT)**

Die Magnetresonanztomographie wurde als bildgebendes Verfahren angewandt, das gleichzeitig die Berechnung verschiedener kardialer Funktionsparameter ermöglichte. Die MRT wurde von der Instituts-eigenen Servicegruppe um A. Wietelmann durchgeführt. Die Bildauswertung erfolgte mit der Mass<sup>®</sup> 4Mice 6.2 Software der Firma Medis (Leiden, NL).

### **3.8 Fotodokumentation**

Die Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe einer Carl Zeiss AxioCam auf einem Zeiss AxioPhot2 Routinemikroskop; mit einer Zeiss AxioCam Icc1 (Hellfeldaufnahmen) und MRm (Fluoreszenzaufnahmen) auf einem Zeiss Z1 Routinemikroskop (Axio Imager Z1 mit vollmotorisierter Ausstattung) sowie einer Leica DFC420C auf einem vollautomatisierten Leica M205 FA (Fluoreszenz-)Stereomikroskop. Eine anschließende, digitale Archivierung und Bildbearbeitung erfolgte mit der Zeiss AxioVision Software, Leica LAS Software und mit Photoshop 7.0. Die digitale Geldokumentation erfolgte mithilfe des BioDocAnalyze Live Profisystems von Biometra. Chemolumineszente Membranen (Western Blots) wurden mithilfe des Profisystems VersaDoc von Bio-Rad Laboratories und der zugehörigen Software QuantityOne dokumentiert.

## 4 ERGEBNISSE:

Ziel dieser Arbeit war es die Funktion der BMP Signalgebung im Herzen näher zu beleuchten. Zu diesem Zweck wurden *in vivo* Funktionsgewinn- und Funktionsverlustanalysen am Modellorganismus Maus vorgenommen. Im Besonderen hieß das, dass transgene Mauslinien generiert wurden, in denen konditionell BMP10 ausgeschaltet oder konditionell ektopisch exprimiert werden kann. Des Weiteren wurde durch Pronukleus-Injektion noch eine weitere Mauslinie generiert, die B10laZ-Maus: Hier wurde *lacZ* in das *Bmp10*-Startcodon fusioniert, um so die Expression vom *Bmp10*-Promotor sichtbar zu machen. Schließlich wurden zwei weitere Linien erstellt, welche die inhibitorischen Smads, Smad6 und Smad7, konditionell ektopisch exprimieren und die BMP Signalgebung negativ regulieren sollten. Analysen des Transkriptoms, sollten dann, die Wirkung der missregulierten BMP/Smad-Signalgebung sichtbar machen und BMP/Smad-sensitive Ziele identifizieren.

### 4.1 Die generierten *Bmp10-lacZ* transgenen Mauslinien (B10laZ) machen zusätzliche *Bmp10* Expressionsdomänen sichtbar

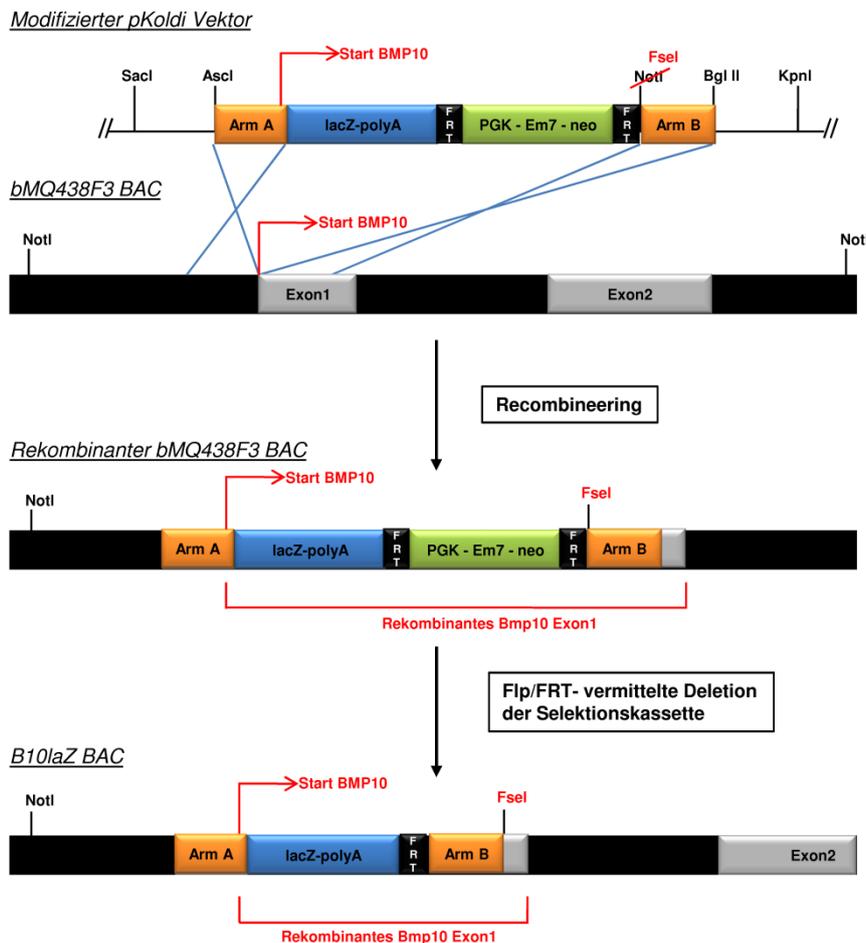
Um die Funktion eines Proteins verstehen zu können, ist es essentiell das Expressionsmuster genau zu kennen, um so Rückschlüsse auf die Lokalisation und Verteilung sowie potentielle Interaktionspartner ziehen zu können. Zu diesem Zweck wurde eine *Bmp10-lacZ* BAC-transgene Reportermaus generiert.

#### 4.1.1 Die Generierung der Reportermaus *Bmp10-lacZ*

Die Generierung einer *Bmp10-lacZ* Reportermaus erfolgte durch BAC-Transgenese. Das BAC bMQ438F3 (Tabelle 6), welches den genomischen *Bmp10* Locus enthielt, wurde wie folgt modifiziert und für die zufällige Integration in das murine Genom in die Vorkerne befruchteter Eizellen injiziert.

Die Modifikation des bMQ438F3 BACs erfolgte mittels homologer Rekombination in *E. coli* (*SW102*, Kapitel 3.2.5.6). Eine *lacZ-polyA|FRT-PGK-Em7-neo-FRT*-Kassette sollte derart mit dem *Bmp10* Startcodon fusioniert werden, dass das Leseraster erhalten blieb. Deshalb wurden die für die Rekombination notwendigen homologen Arme *B10laZ-ArmA* und *B10laZ-ArmB* in das Plasmid *pKoldi* (von S. Günther, MPI Bad Nauheim, erhalten) kloniert, welches die benötigte *lacZ|polyA-FRT-PGK|Em7|neo-FRT*-Kassette enthielt (Abbildung 9). Bei den homologen Armen handelte es

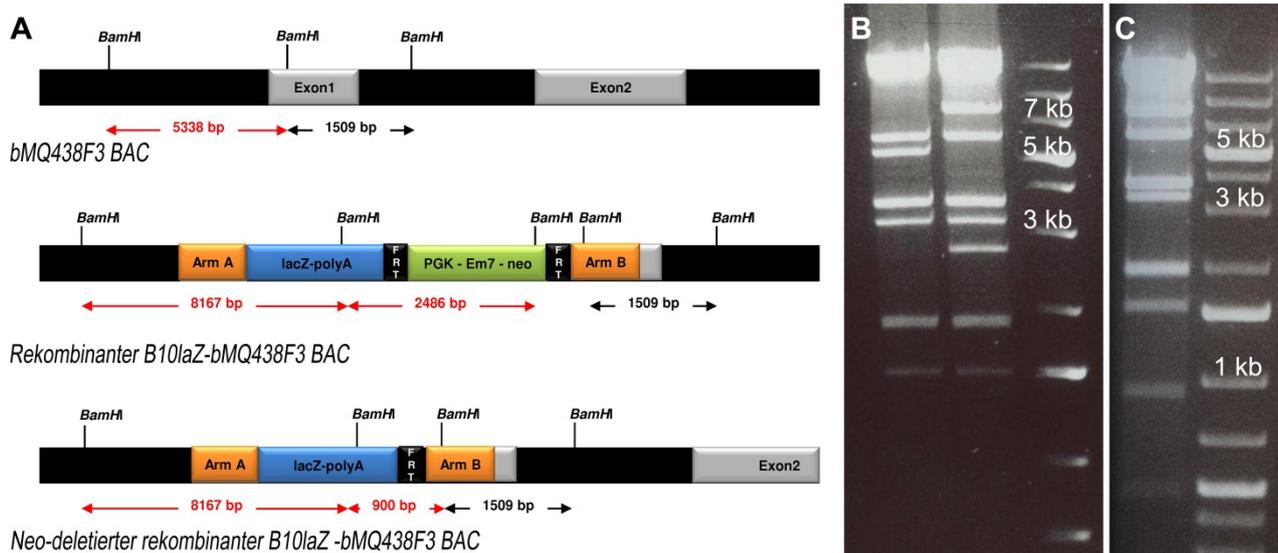
sich um synthetische Oligos, die homolog zu den *Bmp10* Positionen -64 bis +7 (Arm A) und +8 bis +77 (Arm B) waren und über, für die Insertion in den *pKoldi*-Vektor notwendigen, Restriktionsstellen *AscI* und *XhoI* bzw. *NotI* und *BglII* verfügten (Tabelle 2). Nach der Insertion der Arme in den *pKoldi*-Vektor wurde die *NotI*-Schnittstelle mithilfe des Klenow Enzyms zerstört, dabei gleichzeitig eine *FseI* Schnittstelle generiert und so das spätere Herausschneiden des BAC-Vektorrückgrates mit dem Enzym *NotI* ermöglicht.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Modifikation des *bMQ438F3* BACs.** Das *AscI/BglII* Fragment des *pKoldi*-Vektors, das neben *lacZ-polyA|FRT-PGK-Em7-neo-FRT*-Kassette auch die homologen Arme *B10laZ-ArmA* und *-ArmB* enthält, wurde durch *Recombineering* positionsspezifisch in das *Bmp10* Startcodon des *bMQ438F3* BACs fusioniert. Durch die *FLP*-vermittelte Rekombination der *FRT*-Elemente erfolgte die Deletion der Neomycin-Selektionskassette. Der so erhaltene *B10laZ* BAC war das Ausgangskonstrukt für die Generierung der *B10laZ* Linien

Im nächsten Schritt folgte die homologe Rekombination in *E.coli* (*SW102*). Zu diesem Zweck wurden die Rekombination-kompetenten *SW102* Bakterien, die bereits den *bMQ438F3* BAC enthielten, mit der *FRT-PGK|Em7|neo-FRT*-Kassette samt der homologen Arme (*AscI/BglII*-Fragment; Abbildung 9) transformiert. Die Bakterien, welche erfolgreich diese Kassette in das BAC integrieren konnten, entwickelten eine durch den bakteriellen *Em7*-Promotor getriebene, *neo*-vermittelte Kanamycin-Resistenz, die eine positive Selektion ermöglichte. Mithilfe eines *BamHI*-Kontrollverbaus des potentiell rekombinanten BACs, wurden die DNAs identifiziert, welche die *lacZ-polyA|FRT-PGK-Em7-neo-FRT*-Kassette wie gewünscht integriert hatten (Abbildung 10 A und B).

Da *neo*-Kassetten sich zum Teil supprimierend auf die Expression von Transgenen auswirken können, wurde im folgenden Schritt das rekombinante *B10lacZ-BAC* in Flipase (Flp) exprimierende Bakterien transformiert, um so die Flp/*FRT*-vermittelte Deletion der *FRT*-flankierten *neo*-Resistenzkassette zu ermöglichen (Abbildung 9). Auch hier konnte der *Bam*HI-Kontrollverdau zeigen, dass die Deletion der Resistenz-vermittelnde *neo*-Kassette erfolgreich war (Abbildung 10 C). Dieser modifizierte *neo*-deletierte *B10lacZ-BAC* wurde schließlich zur Generation *Bmp10-lacZ* BAC-transgener Tiere Pronukleus-injiziert (Kapitel 3.2.6.4).



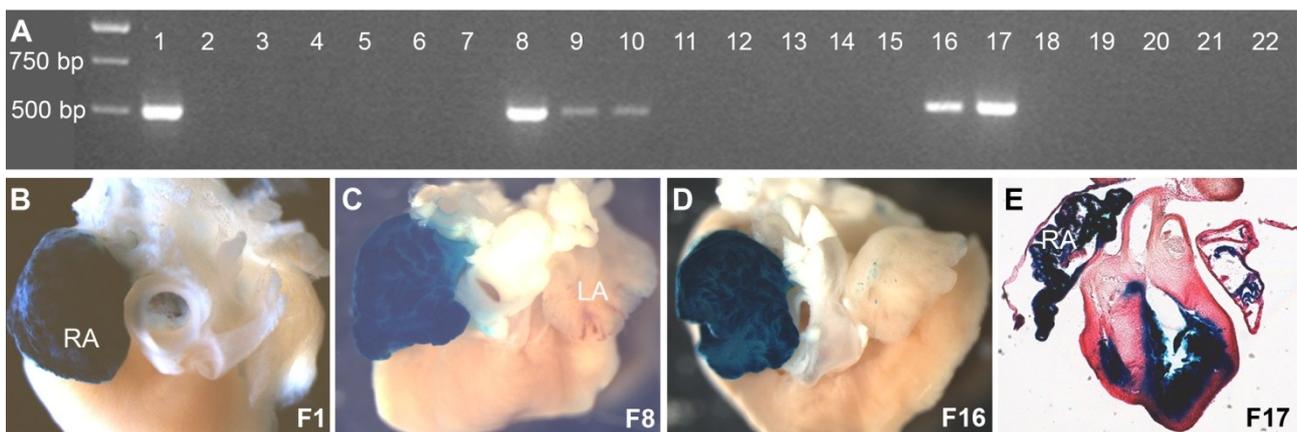
**Abbildung 10: Kontrollverdau der rekombinanten *Bmp10-lacZ* BACs.** A) Schematisch dargestellte BACs. In der obersten Reihe ist der *Bmp10* Locus auf dem BAC bMQ438F3, in der mittleren Reihe, der rekombinante, die *lacZ*|*polyA*-*FRT*-*PGK*|*Em7*|*neo*-*FRT*-Kassette enthaltene BAC und in der unteren Reihe der rekombinante BAC nach der Flp/*FRT*-vermittelten Deletion der *neo*-Kassette dargestellt. Der *Bam*HI-Verdau erzeugt in allen dargestellten Sequenzen unterschiedlich große Fragmente. B) Foto der gelelektrophoretisch aufgetrennten *Bam*HI-erzeugten Fragmente des bMQ438F3 BACs (linke Spur), sowie des rekombinanten, die *FRT*-*PGK*|*Em7*|*neo*-*FRT*-Kassette enthaltenden BACs (mittlere Spur). Der Abgleich mit dem Größenstandard (rechte Spur) zeigt, dass der *Bam*HI-Verdau der rekombinanten BACs die zwei erwarteten Fragmente mit der Größe von ca. 8 kb und 2.5 kb produzierte. C) Der Vergleich mit dem Größenstandard (rechte Spur) zeigt, dass der *Bam*HI-Verdau das 900 bp Fragment erzeugte, das durch die Flp/*FRT*-vermittelte Deletion der *neo*-Kassette erwartet wurde.

#### 4.1.2 *Bmp10* wird im ventrikulären Endokard adulter Herzen exprimiert

Die Pronukleus-Injektionen des *B10lacZ*-BACs hat insgesamt zu einer Nachkommenschaft von 22 Mäusen geführt, welche zunächst mithilfe von *lacZ*-spezifischen Primern, auf eine Integration des Transgens hin untersucht wurden. Es zeigte sich, dass insgesamt sechs Mäuse Träger des Transgens waren (Abbildung 11 A). Diese sechs Gründertiere wurden mit C57BL/6J Mäusen verpaart, wobei

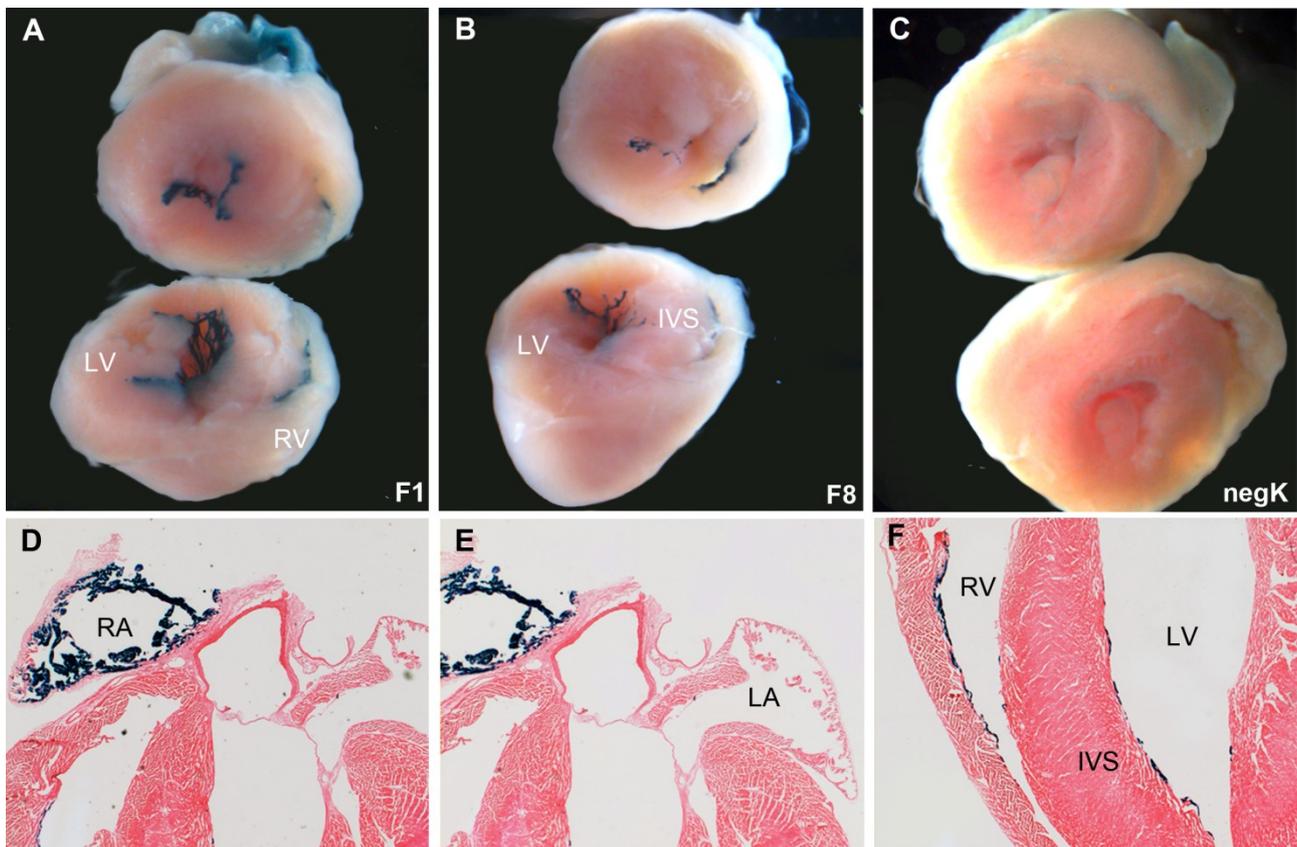
Gründertier F9 keine lebenden Nachkommen hervorbrachte. Die übrigen fünf Gründertiere gaben alle das *Bmp10-lacZ* BAC-Transgen an die F1 Generation weiter.

Um zu überprüfen, ob die F1 Generationen das Transgen tatsächlich exprimieren, wurden LacZ-Färbungen auf adulten Herzen oder auch Embryonen vorgenommen. Es zeigte sich, dass die Nachkommenschaft des Gründers F10 das Transgen nicht oder nur sehr schwach exprimiert, da in den untersuchten Herzen der F1-Generation keine LacZ-Färbung detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu ließen sich mit den Gründern F1, F8, F16 und F17 Linien etablieren, die alle das *Bmp10-lacZ* BAC-Transgen in den bekannte Expressionsdomänen (Kapitel 2.2.3), wie dem rechten Atrium exprimieren (Abbildung 11 B-E).



**Abbildung 11: Die B10laZ Gründertiere und die Expression des *Bmp10-lacZ* Transgens in ihren Nachkommen.** **A)** Gelfoto der *lacZ* Genotypisierungs-PCR der aus den Pronukleus-Injektionen hervorgegangenen Tiere. Die Tiere #1, 8, 9, 10, 16, 17 waren positiv für das *Bmp10-lacZ* Transgen und somit potentielle Gründertiere. **B-D)** Whole mount LacZ-Färbungen detektieren *BMP10-lacZ* in den rechten Atrien (RA) adulter Herzen der Nachkommen der Gründer F1, F8 und F16. **E)** LacZ-Färbung eines Kryoschnitts eines E16.5 Herzens eines F17 Nachkommen (rosa mit Eosin gegengefärbt). Blaufärbung indiziert *Bmp10-lacZ* Expression im Myokard des rechten Atriums sowie der Ventrikel.

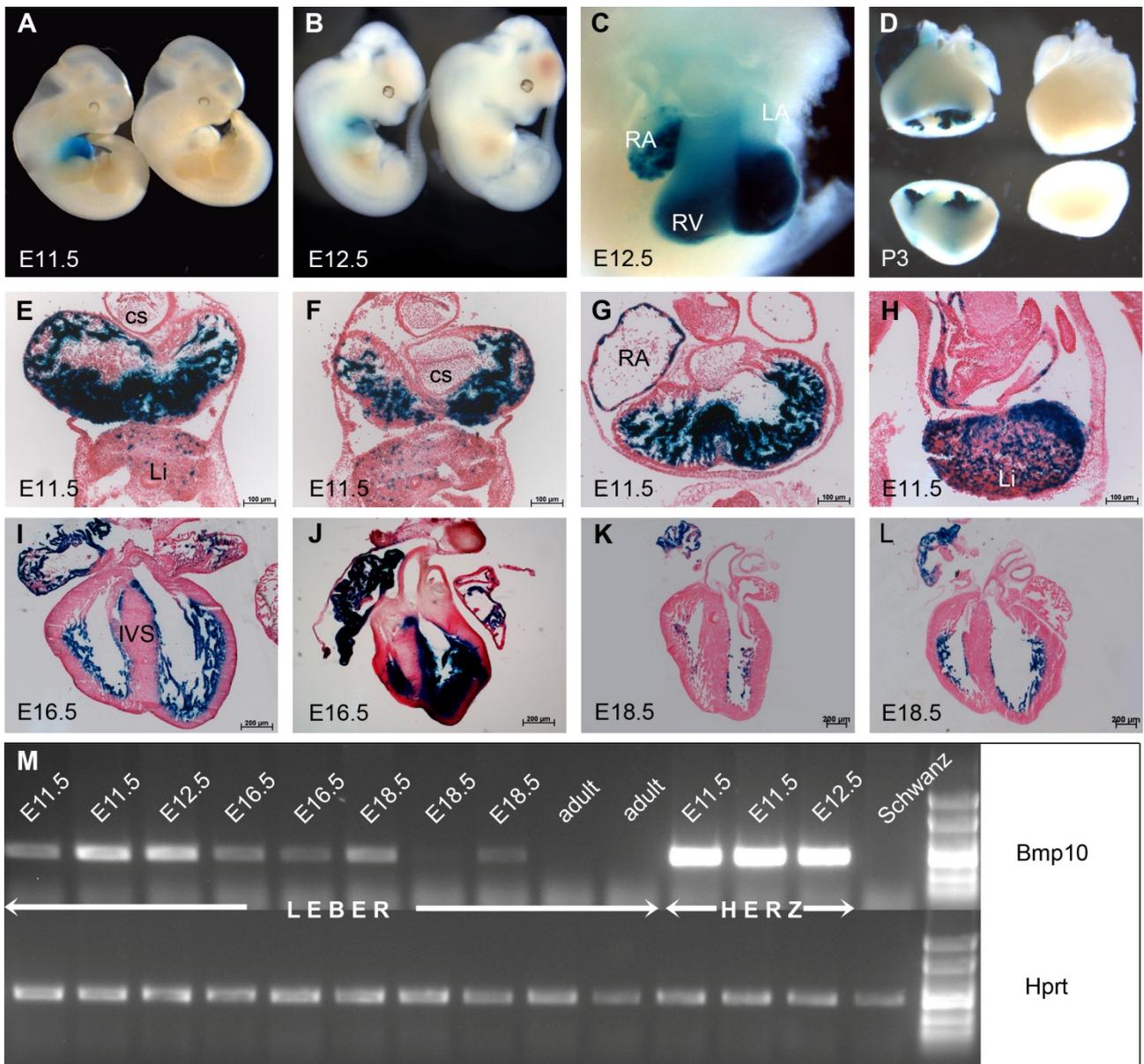
Die genauere Betrachtung der LacZ-gefärbten adulten B10laZ Herzen ergab darüber hinaus, dass nicht nur eine LacZ-Färbung im rechten adulten Atrium, sondern auch eine Färbung im Inneren der ventrikulären Kammern detektierbar ist (Abbildung 12 A-C). Um die *Bmp10-lacZ* Expressionsdomäne in den Ventrikeln besser bestimmen zu können, wurden Kryoschnitte der adulten Herzen angefertigt, welche zunächst LacZ-gefärbt und schließlich mit Eosin gegengefärbt wurden (Abbildung 12 D-F). Dabei zeigte sich, dass die LacZ-Färbung auf die innerste Zellschicht der Ventrikel, das Endokard, beschränkt ist. Da diese *lacZ* Expression in allen untersuchten unabhängigen Linien B10laZ F1, F8, F16 und F17 zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass die Expression auf die regulatorischen Elemente des *Bmp10*-Transgens zurückzuführen ist und eine neue, bisher unbekannte *Bmp10* Expressionsdomäne, im ventrikulären Kompartiment, genauer dem Endokard, des adulten Herzen der Maus sichtbar macht.



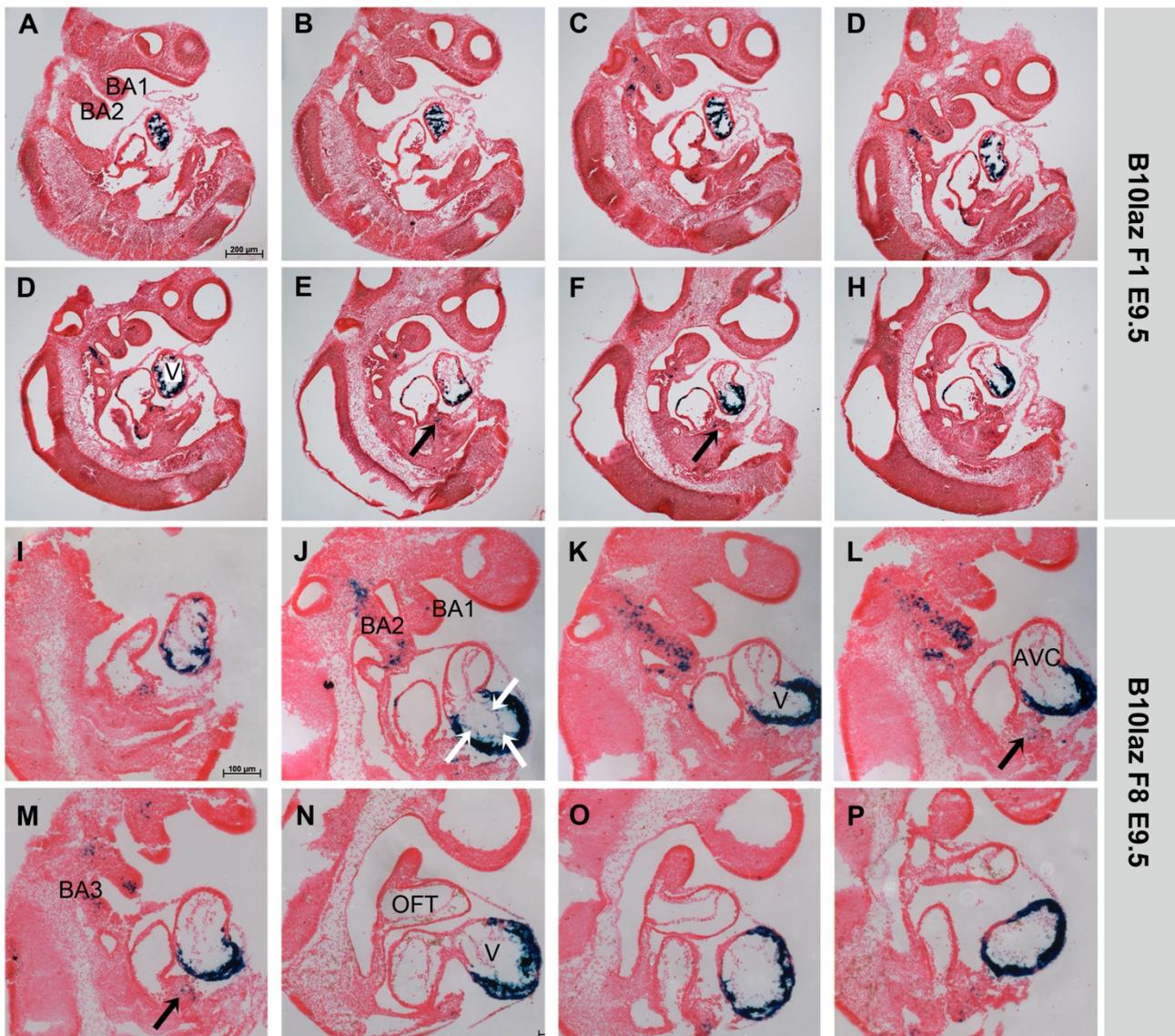
**Abbildung 12:** *B10laZ* transgene Mäuse machen neue ventrikuläre *Bmp10* Expressionsdomäne sichtbar. **A-C)** Whole mount *LacZ*-Färbung auf transversal in zwei Hälften geteilte Herzen der Linie *B10laZ* F1 (**A**) und *B10laZ* F8 (**B**) machen im Vergleich zur negativ Kontrolle (*negK*) (**C**) eine unbekannte *Bmp10-lacZ* Expressionsdomäne in der innersten Schicht der Ventrikel sichtbar. **D-E)** *LacZ*-gefärbte Kryoschnitte eines adulten *B10laZ* F1 Herzens zeigen, dass sich die ventrikulären *Bmp10-lacZ* Expressionsdomäne in der innersten Schicht der Ventrikel und somit im Endokard befindet. Für einen besseren Kontrast sind die *lacZ* gefärbten Schnitte mit Eosin (rosa) gegengefärbt worden. **F)** *LacZ*-gefärbte Kryoschnitte eines adulten *B10laZ* F1 Herzens zeigen, dass sich die ventrikulären *Bmp10-lacZ* Expressionsdomäne in der innersten Schicht der Ventrikel und somit im Endokard befindet. Für einen besseren Kontrast sind die *lacZ* gefärbten Schnitte mit Eosin (rosa) gegengefärbt worden. IVS: intraventrikuläres Septum, LV: linker Ventrikel, RA: rechtes Atrium

#### **4.1.3 *Bmp10* wird während der Embryonalentwicklung auch außerhalb des Herzens exprimiert**

Die *B10laZ* Linien F1, F8, F16 und F17 exprimieren *lacZ* in der bekannten *Bmp10* Expressionsdomäne, dem rechten Atrium des adulten Herzens. Außerdem machten sie bereits eine weitere *Bmp10* Expression im ventrikuläre Endokard des adulten Herzen sichtbar. Um die *Bmp10*-Expression auch während der Embryogenese näher zu analysieren und zu beschreiben, wurden Embryonen der Linien *B10laZ* F1 und F8 in verschiedenen Entwicklungsstadien präpariert, und auf ihre *Bmp10-lacZ* Expression hin untersucht. Ein besonderes Interesse galt dem Beginn der ventrikulären endokardialen *Bmp10* Expression, die in den adulten Herzen zu beobachten war (Kapitel 4.1.2).



**Abbildung 13: Embryonale *Bmp10-lacZ* Expression.** In allen Embryonalstadien erfolgte die Detektion der *Bmp10-lacZ* Expression mittels der LacZ-Färbung (blau) **A, B**) Die „Whole mount“ LacZ-Färbungen zeigen, dass die *BMP10-LacZ* Expression auf das embryonale Herz beschränkt ist. Rechts im Bild sind genotypisch *Bmp10-lacZ* negative (*lacZ<sup>neg</sup>*), ebenfalls LacZ-gefärbte Embryonen, zu sehen, die als negativ Kontrolle dienen. **C**) „Whole mount“ LacZ-Färbung eines E12.5 Herzens in der Vergrößerung. Bereits an E12.5 wird *Bmp10-lacZ* in den Atrien exprimiert, wobei es präferentiell im rechten Atrium exprimiert wird. **D**) „Whole mount“ LacZ-Färbung juveniler Herzen drei Tage nach der Geburt (P3), wobei es sich beim linken Herzen um die negativ Kontrolle handelt (*lacZ<sup>neg</sup>*). **E-L**) LacZ-gefärbte und Eosin gegengefärbte coronale Kryoschnitte (**E-F**) von E11.5 Embryonen der Linie F1 und (**G-H**) F8. Hier ist abseits des Herzens eine eindeutige LacZ-Färbung in der Leber zu sehen. **(I)** E16.5 Herzen der Linie F1 sowie **(J)** F17 und E18.5 Herzen der Linie **(K)** F1 sowie **(L)** F8. **M**) Gelfoto semiquantitativer RT-PCR Analysen der *Bmp10*-Expression in der fötalen und adulten C57BL/6J Leber. Als positiv Kontrolle dienten cDNAs embryonaler E11.5 Herzen und als negativ Kontrolle die cDNA einer Schwanzbiopsie. Als Standard dienen *pUC18* *Sau3A* Fragmente (ganz rechte Gelspur). CS: endokardiale Kissen, LA: linkes Atrium, Li: Leber, RA: rechtes Atrium, RV: rechter Ventrikel



**Abbildung 14:** Die *Bmp10-lacZ* Expression in transgenen *B10laZ* E9.5 Embryonen macht *Bmp10* Expressionsdomänen im ventrikulären Endokard, in Kiemenbögen und fötaler Leber sichtbar. *LacZ*-gefärbte und Eosin gegengefärbte sagittale Krysoschnitte von E9.5 Embryonen der Linie F1 (A-H) sowie der Linie F8 (I-P). Bereits in diesem frühen Entwicklungsstadium indiziert die Blaufärbung die *Bmp10*-Expression im ventrikulären Endokard (weiße Pfeile in J). Das Endokard des atrioventrikulären Kanals (AVC) und auch des Ausflusstrakts (OFT) ist jedoch für *Bmp10-lacZ* negativ. Neben der kardialen Expression im ventrikulären Myokard und Endokard ist in diesem Stadium die *Bmp10-lacZ* Expression im Leberprimordium (schwarze Pfeile in E, F, L und M) beider *B10laZ* Linien detektierbar. In den Kiemenbögen 2 und 3 (BA2 und BA3) ist ebenfalls eine neue *Bmp10* Expressionsdomäne mithilfe des *Bmp10-lacZ* Transgens nachweisbar. Alle weiteren embryonalen Strukturen weisen keine *Bmp10-lacZ* Expression auf. V: Ventrikel

Wie auch schon die Untersuchungen der adulten *B10laZ* Herzen, machte die detaillierte Studie der Embryonalstadien bisher unbekannte *Bmp10* Expressionsdomänen sichtbar. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die endokardiale *Bmp10-lacZ* Expression bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Entwicklung, nämlich E9.5 (Abbildung 14 J), im Ventrikel detektierbar ist und bis zur Geburt in diesem Kompartiment erhalten bleibt (Abbildung 13, Abbildung 14). Zum anderen waren

bereits an E9.5 Bmp10-lacZ positive Zellen im primitiven Atrium zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung stellte sich des Weiteren dar, dass Bmp10 im rechten Atrium stets stärker bzw. ubiquitär im Myokard exprimiert wurde, während im linken Atrium längst nicht alle Myozyten positiv für die Bmp10-lacZ Transkripte waren (Abbildung 13 I und J). An E18.5 und P3 wurde *Bmp10-lacZ* dann kaum oder gar nicht mehr im linken Atrium exprimiert (Abbildung 13 D, K, L). Darüber hinaus machten die beiden B10laZ Linien zwei unbekannte extrakardiale Expressionsdomänen sichtbar. Im Entwicklungsstadium E9.5 waren eindeutig lacZ-positive Zellen in den Kiemenbögen Nummer 2 und 3 nachweisbar. Auch in der fötalen Leber der Stadien E9.5 und E11.5 waren lacZ-positive Zellen zu detektieren (Abbildung 14). Da diese Expressionsdomänen in beiden B10laZ Linien zu finden waren, ist auch hier die Annahme berechtigt, dass die lacZ-Expression durch die regulatorischen Elemente des Bmp10-Locus getrieben wird. Zur Bekräftigung dieser Annahme wurde die *Bmp10* Expression der fötalen Leber mithilfe von RT-PCR Analysen wildtypischer C57BL/6J Tiere in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht (Abbildung 13 M). Hier bestätigte sich, dass Bmp10 Transkripte in der wildtypischen Leber aller untersuchten embryonalen Stadien nachzuweisen sind. Des Weiteren lieferte die semi-quantitative RT-PCR Hinweise, dass die Bmp10 Expression in der jungen fötalen Leber am stärksten ist und während der weiteren Entwicklung abnimmt, bis sie in der adulten Leber nicht oder kaum noch nachzuweisen ist.

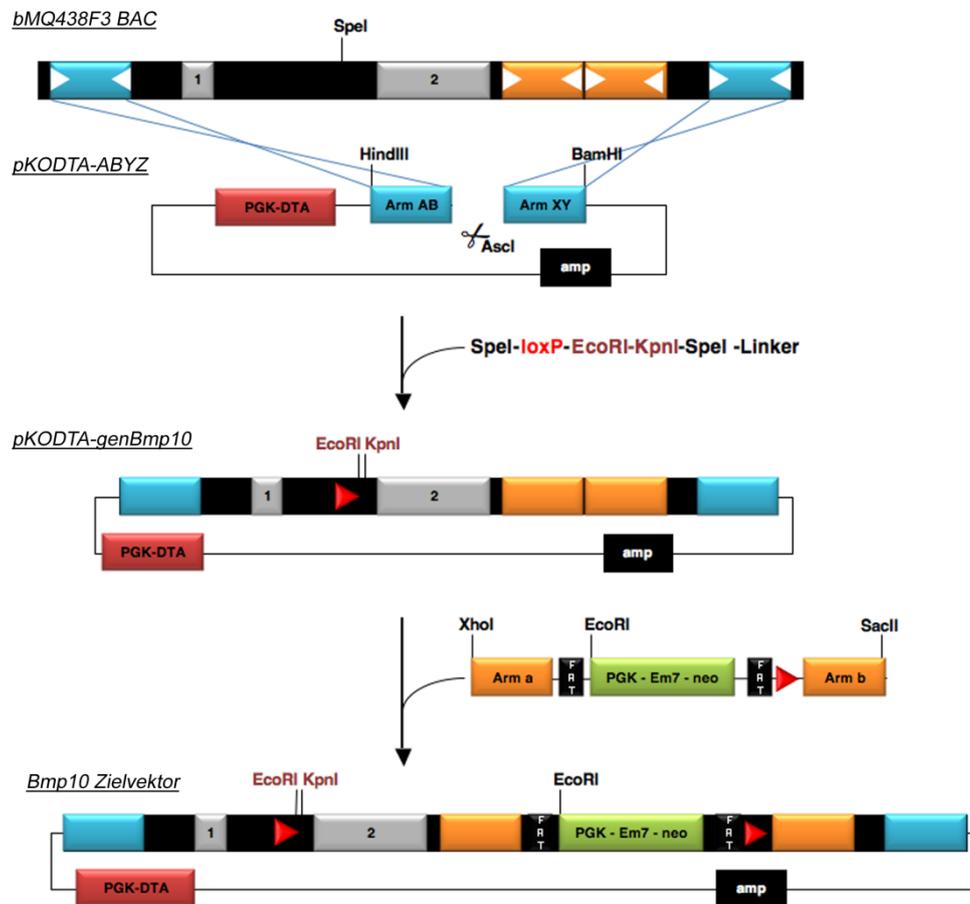
## 4.2 Der konditionelle Bmp10 Knock-out

Der konstitutive Bmp10 *Knock-out* hat gezeigt, dass BMP10 eine essentielle Rolle während der embryonalen Herzentwicklung spielt. Homozygot mutante Embryonen sterben spätestens an E10.5 mit einem deutlich unterentwickeltem Herzen (Kapitel 2.2.3). Diese frühe Lethalität des konstitutiven *Knock-outs* verhindert jedoch, die Bedeutung von BMP10 in späteren Embryonalstadien oder gar im adulten Tier aufzuklären.

Im Laufe dieser Arbeit ist es gelungen einen konditionellen *Knock-out* von *Bmp10* zu generieren, der die pränatale Letalität umgehen kann. Das Cre/loxP-System ermöglicht in dieser neuen Mauslinie eine gezielte, räumlich sowie zeitlich definierte Deletion des zweiten, das aktive Protein codierende, Exons. Dieser konditionelle *Knock-out* sollte Aufschluss über die BMP10 Funktion im sich entwickelnden und adulten kardiovaskulären System geben.

### 4.2.1 Klonierung des *Bmp10*-Zielvektors

Für die konditionelle Inaktivierung von *Bmp10* wurde, mithilfe des *Bmp10* Zielvektors, in den wildtypischen *Bmp10* Locus das *loxP*-flankierte Exon2 eingebracht. Dies sollte zum einen das wildtypische Exon2 ersetzen und sich zum anderen mithilfe einer *Cre/loxP*-vermittelten Rekombination deletieren lassen.



**Abbildung 15: Konstruktion des *Bmp10*-Zielvektors.** Das 12.4 kb genomische *Bmp10* DNA-Fragment, Exon 1 und 2 enthaltend, vorliegend im BAC *bMQ438f03*, wurde durch Recombineering, vermittelt durch die homologen Arme AB und XY (blau), in den *AscI*-linearisierten *pKODTA* Vektor integriert. Anschließend wurde der *SpeI-loxP-EcoRI-KpnI-SpeI*-Linker in die geöffnete *SpeI*-Schnittstelle stromaufwärts von *Bmp10* Exon 2 ligiert. Die FRT-flankierte PGK-Em7-neo-Kassette samt *loxP*-Erkennungsmotiv (rote Dreiecke) wurde mit *XhoI* und *SacII* aus Plasmid PL451 freigestellt, und durch Recombineering mithilfe der homologen Arme Arm a und Arm b (orange) ortsspezifisch, stromabwärts von Exon 2 inseriert. Die weißen Dreiecke zeigen die Lokalisation der Primer an, die benutzt wurden, um die verschiedenen homologen Arme zu amplifizieren.

Der Zielvektor wurde wie in Abbildung 15 skizziert generiert. Als Ausgangspunkt diente auch hier das BAC *bMQ438f03*, welches den genomische Sequenzabschnitt des murinen Chromosom 6 von Position 87339721 bis 87401265 und somit auch den *Bmp10* Locus umfasst. Eine 12.4 kb lange Region dieses BACs, die Exon 1, Intron und Exon 2 sowie 2 kb der 5'- und 4.9 kb der 3'-

flankierenden Region umspannte, wurde in den pKODTA-Vektor (freundlich überlassen von T. Böttger, MPI Bad Nauheim) subkloniert. Dieser Vektor ist ein modifizierter pKO Scrambler V901 (Lexicon Genetics Inc.), der eine *PGK-Diphtheria Toxin Fragment A (DTA)* Kasette für die spätere negative Selektion von Zufallsintegrationen in ES-Zellklonen enthält (Yagi, Nada et al. 1993).

Die Klonierung dieses 12.4 kb-Fragments wurde durch Recombineering (Kapitel 3.2.5.6) ermöglicht. Zunächst wurden via PCR, mit der bMQ438f03 BAC-DNA als Template, etwa 500 bp lange homologe Arme, Arm AB und Arm YZ, amplifiziert und in den mit *HindIII/AscI* bzw. *AscI/BamHI* geöffneten pKODTA-Vektor ligiert. Sequenzierungen des so generierten pKODTA-ABYZ Vektors bestätigten, dass die gewünschten Sequenzen integriert waren. Nun folgte die Rekombination zwischen dem BAC bMQ438f03 und dem mit *AscI* linearisierten pKODTA-ABYZ in *SW102* Zellen. Durch die positive Selektion Ampicillin-resistenter Bakterien und restriktionsenzymatische Analysen, konnten einige Klone identifiziert werden, die Träger des rekombinanten pKODTA-genBmp10 Vektors waren.

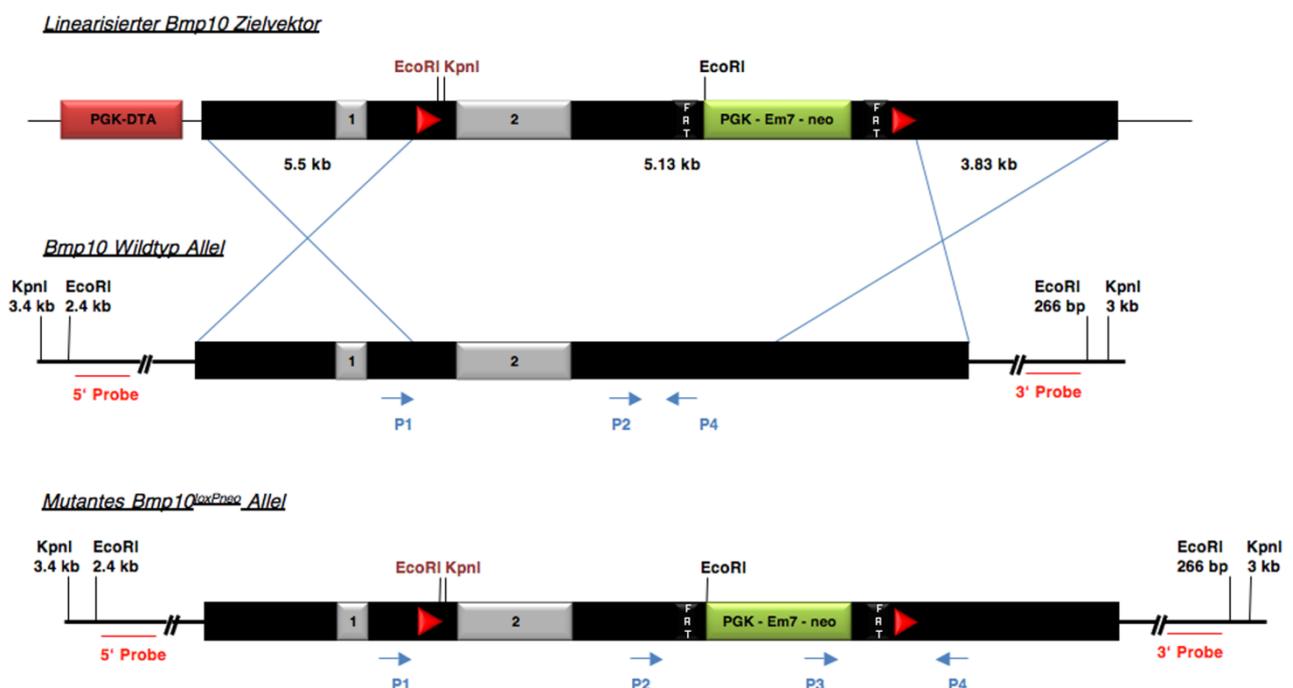
Im Folgenden wurde der subklonierten genomischen DNA in zwei weiteren Schritten die *loxP*-Elemente, sowie die *FRT*-flankierte *Neomycin*-Kasette, hinzugefügt. Zunächst wurde ein *SpeI-loxP*-Linker (Tabelle 2), bestehend aus dem *loxP*-Element sowie *EcoRI*- und *KpnI*-Erkennungssequenz, in die zwischen Exon1 und Exon2 lokalisierte *SpeI* Schnittstelle integriert. Die gewünschte Orientierung des *loxP*-Elements (5'→3') wurde durch Sequenzierungen überprüft. In einem letzten Schritt wurde nun die *FRT*-flankierte *Neomycin*-Selektionskasette sowie das zweite *loxP*-Element in den Zielvektor 3' von Exon 2 integriert. Ausgangspunkt für diesen letzten Schritt war das Plasmid PL451 (Liu, Jenkins et al. 2003). Dieses Plasmid enthält die benötigte *FRT-PGK-Em7-neo-FRT-loxP* Kasette, die durch Recombineering in den Zielvektor eingebracht wurde. Auch hier wurden homologe Arme, Arm a und Arm b, durch PCR amplifiziert, 5' und 3' von der Kasette in den *XhoI/HindIII* bzw. *BamHI/SacII* geöffneten PL451 Plasmid ligiert und schließlich das *XhoI/SacII* freigestellte Fragment durch homologe Rekombination in *E. coli SW102* in den Zielvektor integriert. Der Bmp10-Zielvektor wurde mithilfe von Sequenzierungen überprüft und im Folgenden für die Generation der konditionellen Bmp10 Knock-out Maus eingesetzt.

#### **4.2.2 Homologe Rekombination des Bmp10-Zielvektors in ES-Zellen**

Der Bmp10-Zielvektor (Kapitel 4.2.1) wurde mit *NotI* linearisiert, in ES-Zellen elektroporiert und transformierte ES-Zellen selektioniert (Kapitel 3.7.2). Durch die mit dem *loxP*-Element eingefügten Erkennungssequenzen für *KpnI* und auch *EcoRI* war es möglich, jene ES-Zellklone zu identifizieren, welche durch homologe Rekombination die mutante Sequenz in den Bmp10 Locus integriert hatten. Durch den Verdau mit einer entsprechenden Restriktionsendonuklease ließ sich in

Southern Blot Analysen mit der 5'-Probe in den mutanten *Bmp10*<sup>loxPneo</sup> ES-Zellklonen das mutante 8.9 kb Fragment und das wildtypische 18.8 kb Fragment detektieren. Die 3'-Probe detektierte hingegen ein mutantes 9.9 kb Fragment und ein wildtypisches 18.8 kb Fragment. Durch die Wahl geeigneter Primer war eine PCR-basierte Genotypisierung der ES-Zellklone ebenfalls möglich. Diese PCR diente im weiteren Verlauf ebenfalls der Genotypisierung mutanter *Bmp10* Mauslinien (Abbildung 16).

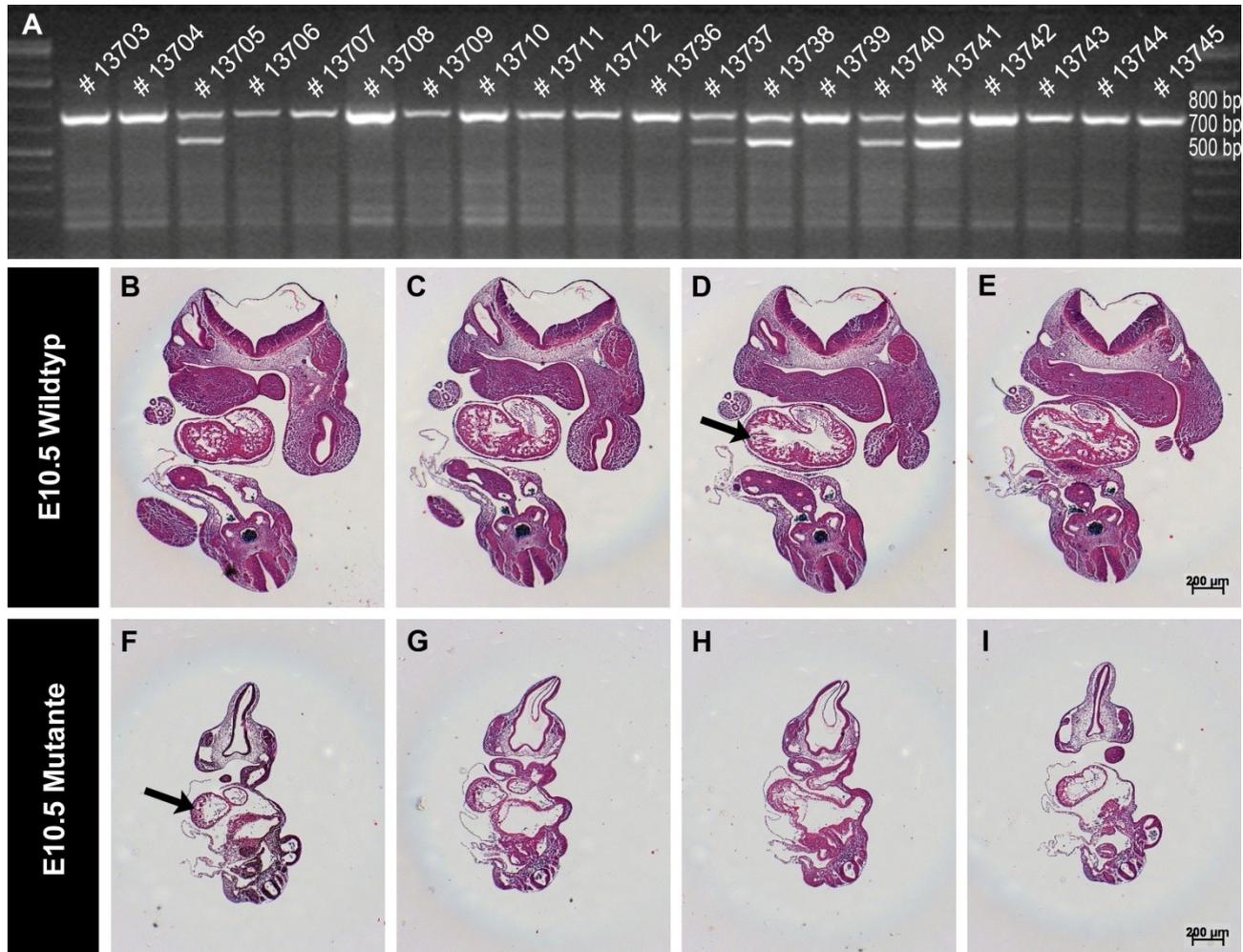
Die Southern Blot Analysen ergaben, dass die gewünschte Rekombination in 3.65 % der Fälle stattgefunden hatte: 14 positive in 384 analysierten Klonen. Von den identifizierten positiven *Bmp10*<sup>loxPneo</sup> Klonen wurden 4 Klone, #133, #212, #213 und #290, in C57BL/6J Blastozysten injiziert.



**Abbildung 16: *Bmp10* Rekombination in ES Zellen.** Die Rekombination des *Bmp10*-Zielvektors mit dem genomischen Wildtyp-Allel erfolgte über zwei homologe Bereiche von 5.5 kb (5') und 3.83 kb Länge (3'). Die für Southern Blot Analysen relevanten Restriktionsschnittstellen und DNA-Sonden (5' und 3' Probe) sind im Schema dargestellt. Eine Cre/loxP-vermittelte Rekombination (loxP Elemente sind als rote Dreiecke dargestellt) ermöglicht die Deletion von Exon 2 (grau). Die Deletion der Selektions-Kassette (grün) ist durch eine Flp/FRT-vermittelte Rekombination möglich. Die PCR-basierte Genotypisierung der ES-Zellen und aus ihnen entstandener Mäuse ist möglich mit den Primern P1 - P4. Mithilfe dieser Primer ist ebenfalls die Deletion der Selektionskassette (P2: *Bmp10*-1-fwd, P3: bGH-Fwd, P4: *Bmp10*-1-rev) oder des Exon 2 (P1: *Bmp10*-1270 fwd, P2, P4) nachweisbar.

### 4.2.3 Etablierung stabiler Mauslinien mit konditionellem *Bmp10*-Allel

Die Injektion der *Bmp10*<sup>loxPneo</sup> ES-Zellklone #133, #212, #213 und #290 resultierte jeweils in Chimären. Die Nachkommen mit dem höchsten Grad an Chimärismus in der Fellfarbe wurden in weitere Verpaarungen mit C57BL/6J Mäusen eingesetzt. Jedoch nur die Chimären entstanden aus Injektionen der Klone #133 und #212 gaben das mutante *Bmp10*<sup>loxPneo</sup> Allel in der Keimbahn weiter.



**Abbildung 17: *ckoBmp10/CMV-Cre*. Die Exon2 Deletion phänotypiert den bekannten konstitutiven *Bmp10* KO. In A) ist das Gelbild der Genotypisierungs-PCR auf Nachkommen der Verpaarung *Bmp10*LN x *CMV-Cre* zu sehen. Die 800bp Bande zeigt das wildtypische *Bmp10* Allel an, während die 560 bp Bande das mutante, Exon2 deletierte *Bmp10* Allel anzeigt. Coronale H&E-gefärbte Paraffinschnitte B-D) eines wildtypischen, heterozygoten E10.5 Embryos (*Bmp10*<sup>+/ $\Delta$ Exon2</sup>/*CMV-Cre*<sup>pos</sup>) und eines E-F) mutanten Wurfgeschwister (*Bmp10* <sup>$\Delta$ Exon2/ $\Delta$ Exon2</sup>/*CMV-Cre*<sup>pos</sup>) machen die retardierte Entwicklung in mutanten *ckoBmp10*LN/*CMV-Cre* Embryonen sichtbar. Sie ist erkennbar an der geringeren Größe und einem deutlich unterentwickelten Herzen. Pfeile deuten auf die trabekulierten E10.5 Ventrikel.**

Um den genetischen Hintergrund möglichst gleichmäßig zu halten, dienten nur das Männchen #16426 (Klon #133) und das Männchen #16931 (Klon #212) zur Etablierung der stabilen Mauslinien *Bmp10*LN und *ckoBmp10*. Die Linie *Bmp10*LN stammt direkt von den Chimären ab

und enthält neben den  $\underline{\text{LoxP}}$ -Elementen auch die FRT-flankierte Neomycin-Selektionskassette. In der ckoBmp10 Linie hingegen ist die FRT-flankierte Neomycin-Kassette deletiert und sie besitzt ausschließlich das loxP-flankierte Exon 2. Dies wurde initial erreicht, durch Verpaarungen der Bmp10 LN Linien mit der ubiquitär FLP-exprimierenden FLP-Deleter Linie (Rodriguez, Buchholz et al. 2000).

Für alle folgenden Experimente wurden ausschließlich die Nachfahren des Männchen #16426 (Klon #133) und die von ihnen abgeleiteten Linien verwendet.

#### **4.2.4 Die Exon2 Deletion vermittelt einen funktionellen BMP10 Knock-out**

Dass es sich bei dem konditionellen  $Bmp10^{\text{loxPneo}}$  Allel tatsächlich um ein funktionelles *Knock-Out* Allel handelt, wurde durch Einkreuzung der CMV-Cre Mäuse (Schwenk, Baron et al. 1995) in die die BMP10LN Linie bewiesen. Durch die ubiquitär exprimierte Cre-Rekombinase sollte im mutanten  $Bmp10^{\text{loxPneo}}$  Allel Exon2 deletiert werden, und im homozygoten Zustand den Phänotyp des beschriebenen konstitutiven Bmp10 Knock-outs kopieren (Kapitel 2.2.3). Die Genotypisierung mit den Primern P1 und P2 (Abbildung 16) der Nachkommen aus der Hybriderstellung (Bmp10LN x CMV-Cre) zeigte bereits, dass die CRE-Rekombinase die Deletion des Exon2 in den somatischen Zellen des Mausschwanzes bewirkte (Abbildung 17 A). Die morphologischen und histologischen Betrachtungen von E10.5 Embryonen der Linie ckoBmp10LN/CMV-Cre zeigten dann, dass die Exon2-Deletion in allen homozygot mutanten Embryonen einen lethalen Phänotyp um E10.5 verursacht, der den konstitutiven *Bmp10 KO* phänokopiert (Abbildung 17).

#### **4.2.5 $Bmp10^{\text{loxPneo}}$ mutante Mäuse zeigen keinen Phänotyp**

Das Cre/loxP System ist ein Werkzeug, mit dem sich Gene Raum- und Zeit-spezifisch ausschalten lassen. Damit bietet es die Möglichkeit Gene *in vivo* zu untersuchen, deren Verlust im konstitutiven Modell während der Embryogenese zum Tod des Organismus geführt hätte. Um jedoch von diesem System profitieren zu können, ist es wichtig, dass die einzelnen Elemente des Systems, wie die Selektionskassette oder die *loxP*-Elemente, nicht allein durch sich selbst einen Einfluss auf die Expression und Funktion des zu untersuchenden Proteins nehmen, und so seine Funktion verschleiern.

Um eine solche Problematik in der generierten konditionellen Bmp10 *Knock-out* Maus ausschließen zu können, wurde die Mauslinie, die neben den  $\underline{\text{LoxP}}$ -Sites auch die FRT-flankierte Neomycin-Selektionskassette enthält (Bmp10LN), auf Homozygotie hin gekreuzt. Der Erhalt homozygot mutanter, adulter, lebensfähiger (8  $Bmp10LN^{-/-}$  in insgesamt 38 Nachkommen) und fertiler

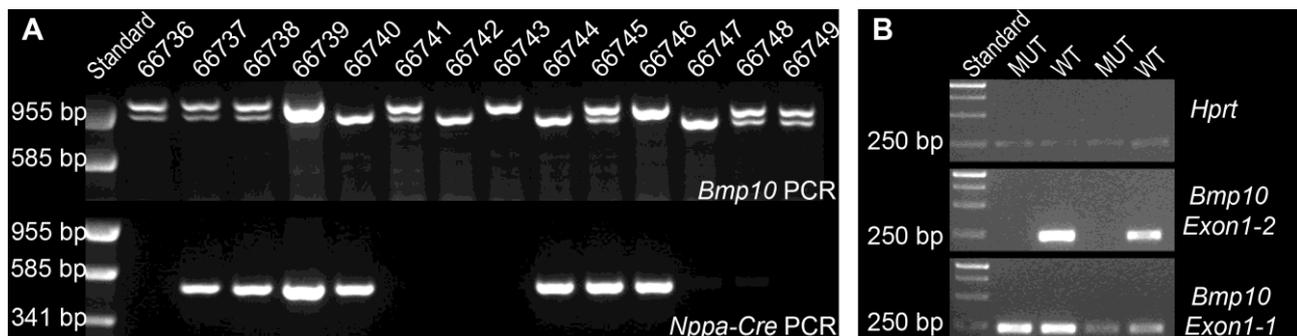
Nachkommen zeigte, dass das Einbringen der Elemente des Cre/loxP Systems in den Bmp10-Locus zu keinem offensichtlichen Phänotyp führte.

#### 4.2.6 Atriales BMP10 hat keine essentielle kardiale Funktion

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung von Bmp10 im adulten Herzen, und somit des atrialen BMP10 aufzuklären. Deshalb wurde der konditionelle *Knock-out* mit einer Atrium-spezifischen CRE-Linie verpaart, der *Nppa-Cre* Linie (de Lange, Moorman et al. 2003). Schon während der Embryonalentwicklung wird in dieser Linie die CRE-Rekombinase in den Atrien exprimiert und seine Expression bleibt auch in den adulten Atrien bestehen.

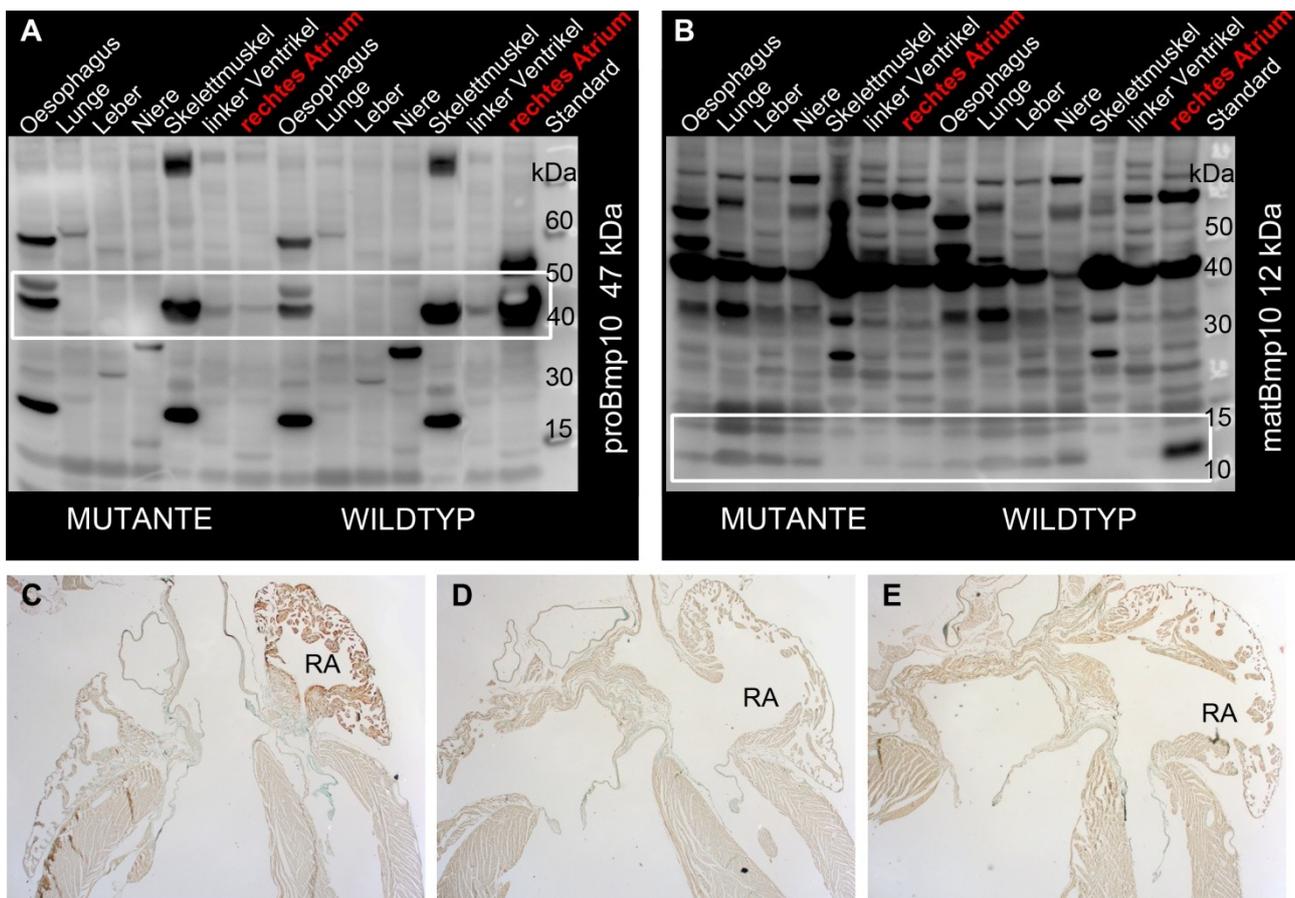
Für die Generierung mutanter Mäuse mit einem atrialen *Bmp10* *Knock-out* in den Atrien wurden heterozygote Mäuse der Linie *ckoBmp10* (*ckoBmp10*<sup>+/*flox*</sup>) mit der *Nppa-Cre* Linie (*Nppa-Cre*<sup>pos</sup>) gekreuzt. Die heterozygoten Nachkommen, die ebenfalls positiv für *Nppa-Cre* waren (*ckoBmp10*<sup>+/*flox*</sup>/*Nppa-Cre*<sup>pos</sup>), wurden untereinander verpaart, um homozygot mutante Nachkommen (*ckoBmp10*<sup>flox/flox</sup>/*Nppa-Cre*<sup>pos</sup>) zu generieren.

Die Genotypbestimmung der Nachkommenschaft mittels PCR (Abbildung 18 A) ergab, dass alle Genotypen im erwarteten Verhältnis auftraten. Somit haben die homozygoten *Bmp10*<sup>flox/flox</sup>/*Nppa-Cre*<sup>pos</sup> Mäuse, bis acht Wochen nach der Geburt, die gleiche Lebenserwartung wie ihre wildtypischen Geschwister.



**Abbildung 18:** In den mutanten *ckoBmp10/Nppa-Cre* Mäusen ist ausschließlich das mutante, um Exon2 verkürzte, Transkript detektierbar. **A)** Exemplarisches Gelfoto der Genotypisierungs-PCRs von *ckoBmp10/Nppa-Cre* Mäusen. Die 987 bp Bande zeigt das mutante und die 787 bp das wildtypische Allel an. Das Vorhandensein einer 470 bp Bande nach der *Nppa-Cre* PCR zeigt das *Nppa-Cre* Transgen an. **B)** Gelbild der RT-PCR Analysen von wildtypischen und mutanten *ckoBmp10/Nppa-Cre* rechten Atrien. In der Exon1-2 PCR bindet der erste Primer in Exon1 und der zweite in Exon2. In der *Bmp10* Exon1-1 PCR binden beide Primer in Exon1. In den mutanten Herzen ist kein vollständiges, Exon1 und 2 umfassendes, *Bmp10*-Transkript nachweisbar; nur ein verkürztes, ausschließlich Exon1 umfassendes, Transkript ist detektierbar.

Die CRE-vermittelte Rekombination der *loxP*-Elemente in den mutanten *ckoBmp10<sup>fllox/fllox</sup>/Nppa-Cre<sup>pos</sup>* Nachkommen sollte in den Atrien *Exon2* deletieren und die Expression von funktionsfähigem BMP10 verhindern. Ob dies in den mutanten Mäusen tatsächlich der Fall war, wurde zunächst mithilfe von RT-PCR Analysen untersucht. Als Template diente mRNA aus rechten Atrien mutanter und wildtypischer Herzen. In Abbildung 18 B sind die Ergebnisse dieser Analyse zu sehen. In den mutanten Atrien waren nur solche *Bmp10* Transkripte nachweisbar, die ausschließlich *Exon1* enthielten, während in den Atrien der wildtypischen Wurfgeschwistern *Exon1* und *Exon2* transkribiert wurden.



**Abbildung 19: *ckoBmp10/Nppa-Cre* - Der konditionelle BMP10 Knock-out ermöglicht die gezielte Depletion des BMP10 Proteins.** A, B) Proteinextrakte aus verschiedenen Geweben der Mutante *Bmp10<sup>fllox/fllox</sup>/nppa-Cre<sup>pos</sup>* oder des Wildtyps *Bmp10<sup>fllox/fllox</sup>/Nppa-Cre<sup>neg</sup>* wurden immunochemisch im WesternBlot analysiert. In A) weist der *Bmp10* Antikörper das nicht prozessierte Propeptid (47 kDa) im rechten Atrium nach, während es in der Mutante nicht detektierbar ist. In den Proteinextrakten der Skelettmuskeln und auch der Ösophagen von Wildtyp und Mutante wurden unspezifische Signale durch den sekundären Antikörper generiert. In B) ist das Ergebnis der Analyse der selben Extrakte unter Verwendung des *matBMP10* Antikörpers, der sich gegen das prozessierte, reife BMP10 Peptid richtet, gezeigt. Das reife 12kDa große BMP10 Peptid kann ausschließlich im rechten Atrium des Wildtypen, nicht aber der Mutante nachgewiesen werden. C-E) Die *proBMP10* Antikörperfärbung (braun) auf coronalen Paraffinschnitten adulter Herzen zeigt die Atrium-spezifische BMP10 Expression im adulten wildtypischen (C) Herzen, die in mutanten Herzen (D-E) vollständig fehlt.

Der Verlust des funktionsfähigen BMP10 Proteins in den mutanten Atrien wurde darüber hinaus durch immunochemische Verfahren nachgewiesen. Proteine isoliert aus verschiedensten Geweben wildtypischer und mutanter Tiere wurden gebロットet und anschließend mit einem Antikörper gegen das BMP10 Propeptid (proBMP10) oder gegen das reife, prozessierte Bmp10 Peptid (matBMP10, Kapitel 3.4) inkubiert. Die Abbildung 19 zeigt, dass beide Formen nur in den Atrien der Wildtypen und nicht der Mutante nachzuweisen sind. Auch mithilfe immunohistochemischer Methoden konnte in Paraffindünnschnitten wildtypischer und mutanter Herzen die BMP10 Depletion in den mutanten Atrien sichtbar gemacht werden (Abbildung 19 C-E).

Weitere Beobachtungen der mutanten  $Bmp10^{flox/flox}/Nppa-Cre^{pos}$  Tiere ergaben, dass auch das Heranwachsen zu adulten Tieren nicht gestört scheint. 90.9% (10/11) der mutanten  $Bmp10^{flox/flox}/Nppa-Cre^{pos}$ , in Verpaarungen eingesetzten Mäuse waren fertil und die Langzeitbeobachtung hat ergeben, dass mutante Mäuse mindestens 22 Monate alt werden.

Pilotuntersuchungen der Herzen von drei wildtypischen und drei mutanten ckoBmp10/Nppa-Cre Tieren im MRT haben ergeben, dass auch physiologische Parameter der mutanten Herzen unauffällig sind (Tabelle 9). Die Schlagvolumina und auch Ejektionsfraktionen der mutanten Herzen waren nicht verringert, so dass gefolgert werden kann, dass atriales BMP10 für die normale Herzfunktion verzichtbar ist.

**Tabelle 9: MRT-ermittelte physiologische Parameter adulter ckoBMP10/Nppa-Cre Herzen.** Keine Unterschiede zwischen den physiologischen kardialen Charakteristika zwischen wildtypischen ( $n=3$ ) und mutanten ( $n=3$ ) Herzen. Alle Daten wurden an mit 2% Isofluran betäubten Tieren ermittelt.

|                             | WT     |             | MUT    |             |
|-----------------------------|--------|-------------|--------|-------------|
| LV Schlagvolumen [ $\mu$ l] | 47,98  | $\pm 7,72$  | 48,66  | $\pm 3,16$  |
| LV Ejektionsfraktion [%]    | 59,64  | $\pm 6,39$  | 65,56  | $\pm 1,66$  |
| RV Schlagvolumen [ $\mu$ l] | 25,54  | $\pm 5,19$  | 26,05  | $\pm 2,35$  |
| RV Ejektionsfraktion [%]    | 50,97  | $\pm 3,06$  | 59,92  | $\pm 7,21$  |
| Körpergewicht [g]           | 31,77  | $\pm 0,80$  | 29,20  | $\pm 2,55$  |
| Herzfrequenz (2% Iso)       | 358,00 | $\pm 14,14$ | 376,33 | $\pm 35,57$ |

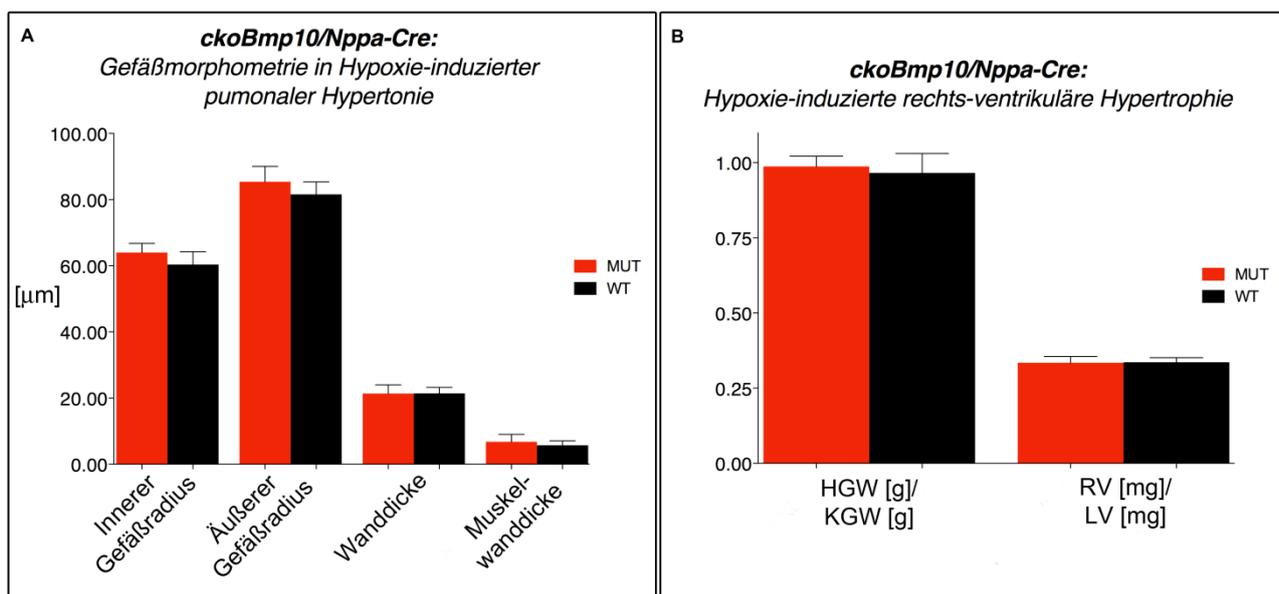
#### 4.2.7 Die Bedeutung des atrialen BMP10 für pathologische Umbauprozesse

Der Bmp10 Knock-out in den Atrien des Herzen hat gezeigt, dass hier exprimiertes BMP10 keine essentielle Funktion während der Entwicklung übernimmt. Doch ob dies auch der Fall unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen ist, war bis hierhin noch offen. Deshalb wurden der atriale Bmp10 Knock-out nun in verschiedenen Krankheitsmodellen untersucht.

#### 4.2.7.1 Die Ausprägung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie oder die resultierende rechtsventrikuläre Hypertrophie bleibt durch den Verlust atrialen BMP10 unbeeinflusst

Bmp10 wird in der adulten Maus prominent im rechten Atrium exprimiert und sekretiert. Einmal in die Zirkulation gelangt wäre das erste Organ, das es außerhalb des Herzens erreicht, die Lunge. Möglicherweise übernimmt BMP10 hier in der Lunge eine entscheidende Rolle für die Organhomöostase. Es ist bekannt, dass die BMP Signalgebung in der adulten Lunge von besonderer Bedeutung ist. Mutationen oder gar der *Knock-out* des BMP Typ II Rezeptors BMPRII führt zu einer Prädisposition für die pulmonale Hypertonie (West, Fagan et al. 2004; Takahashi, Kogaki et al. 2007; Otsuka 2008; Yu, Deng et al. 2008).

Hypoxie verursacht in wildtyischen Mäusen eine pulmonale Hypertonie mit einer begleitenden rechts-ventrikulären kardialen Hypertrophie (Tucker and Rhodes 2001). Ob Bmp10 nun ein Effektor ist, der über den BMPRII-Rezeptor wirkt und die Homöostase der Lunge unter Hypertonie-begünstigenden Bedingungen erhält, konnte mithilfe des atrialen Bmp10 *Knock-outs* geklärt werden.



**Abbildung 20: Atriale BMP10 Defizienz nimmt keinen messbaren Einfluss auf die Ausprägung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie oder die resultierende rechtsventrikuläre Hypertrophie.** **A)** Das Diagramm zeigt die mittleren Wanddicken vermessener Gefäße mit einem inneren Gefäßdurchmesser von 100 – 140  $\mu\text{m}$  und einem äußeren Gefäßdurchmesser von 136 – 190  $\mu\text{m}$ . Nach 3 Wochen hypoxischen Haltungsbedingungen sind keine signifikanten Unterschiede der Gefäß-Muskularisierung in wildtyischen (WT, n=5) und mutanten (MUT, n=5) *ckoBmp10/Nppa-Cre* Lungen detektiert worden. Auch die Gesamtdicke der Gefäßwände weist keine Unterschiede auf. **B)** Weder das auf das Körpergewicht normalisierte Herzgewicht (HGW) noch der Grad der Hypertrophie des rechten Ventrikels, bestimmt anhand des Trockengewichts des rechten Ventrikels (RV) im Verhältnis zum linken Ventrikel (LV) inklusive Septum, ist signifikant unterschiedlich zwischen WT und MUT *ckoBmp10/Nppa-Cre* Herzen.

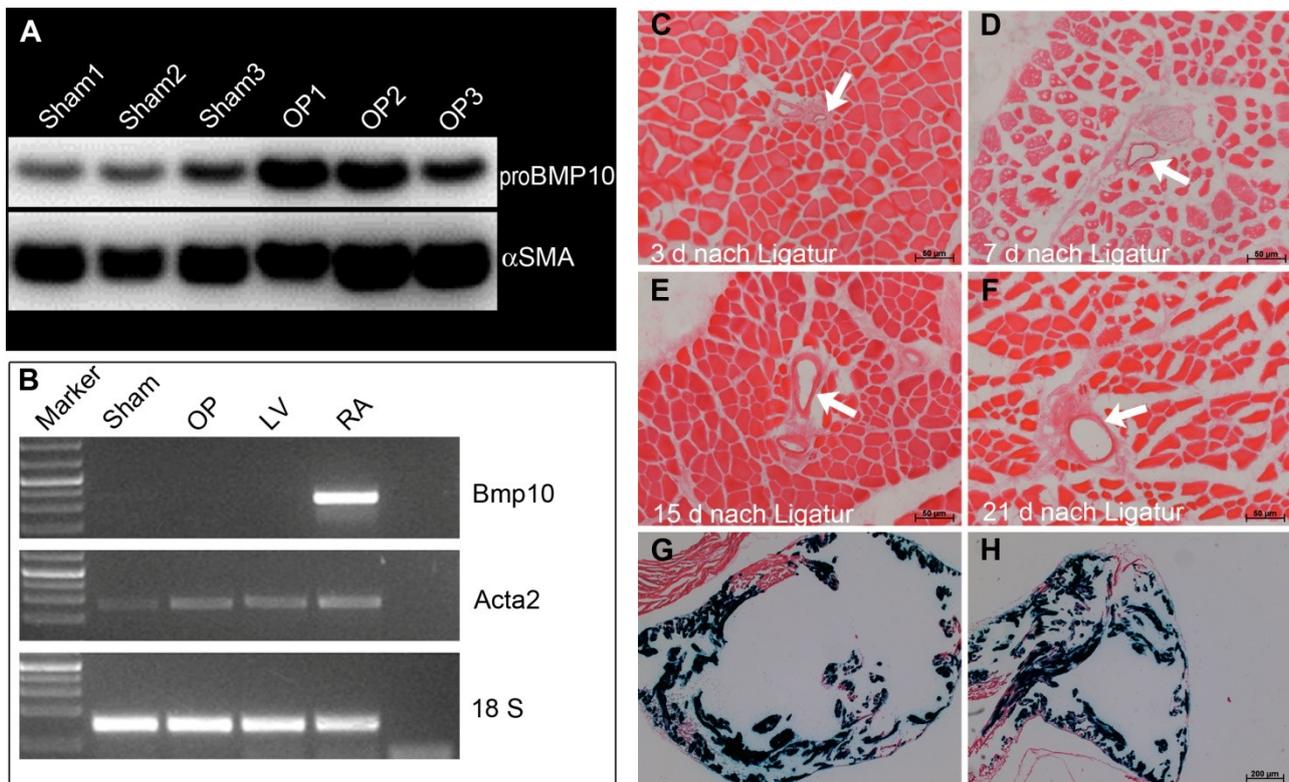
Zu diesem Zweck wurden in einem Pilotexperiment fünf mutante *Bmp10<sup>lox/lox</sup>/Nppa-Cre<sup>pos</sup>* Mäuse und fünf geeignete Kontrolltiere, *Bmp10<sup>+/+</sup>/Nppa-Cre<sup>pos</sup>* Wurfgeschwister, für 21 Tage unter hypoxischen Bedingungen gehalten (Kapitel 3.7.3.1). Anschließend wurde das Trockengewicht des rechten und linken Ventrikels inklusive intraventrikulären Septum bestimmt, um anhand ihrer Gewichtsverhältnisse zueinander den Grad der rechts-ventrikulären Hypertrophie in wildtypischen und mutanten Herzen bestimmen zu können. Außerdem wurde die Muskularisierung pulmonaler Gefäße analysiert (Kapitel 3.7.3.1). Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, hat der Verlust des atrialen BMP10 keinen Einfluss auf die Ausprägung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie und der begleitenden rechtsventrikulären Hypertrophie. Morphometrische Vermessungen muskularisierter und teilweise muskularisierter Gefäße mit einem durchschnittlichen inneren Gefäßdurchmesser von 145 µm ergaben, dass keine Unterschiede in der Gefäßmuskularisierung wildtypischer und mutanter Lungen der *ckoBmp10/Nppa-Cre* Tiere vorhanden waren. Auch die Hypertrophie des rechten Ventrikels ist in beiden Gruppen gleich stark ausgeprägt und lässt keinen Unterschied zwischen BMP10-defizienten und wildtypischen Mäusen erkennen.

#### **4.2.7.2 BMP ist für die Arteriogenese ein wichtiger Effektor**

BMP10 ist wie seine anderen BMP Familienmitglieder ein sekretierter Faktor. Von BMP9, seinem engsten Verwandten, ist bekannt, dass es sich um einen zirkulierenden Faktor handelt, der einen verlangsamen Effekt auf die Angiogenese hat. Diesen Effekt vermittelt er wahrscheinlich vornehmlich über den Rezeptor ALK1 (David, Mallet et al. 2008).

BMP10 ist als Ligand des ALK1, ALK3 und ALK6 Rezeptors beschrieben worden (Mazerbourg, Sangkuhl et al. 2005; David, Mallet et al. 2007; David, Mallet et al. 2008). Zwar wird Bmp10 im adulten Tier nur im Herzen exprimiert, jedoch ist die sekretierte Menge eventuell ausreichend, um physiologisch relevante Level im Serum aufzubauen und so eine Wirkung abseits des Herzens mittels seiner beschriebenen Rezeptoren zu entfalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob BMP10 einen Einfluss auf das Wachstum von Kollateralen hat. Das Wachstum von Kollateralen, sprich die Transformation von bereits vorhandenen kleinen Arteriolen in größere und stärker muskularisierter Gefäße, wird Arteriogenese genannt. Dieses Wachstum findet nach der Okklusion von Gefäßen statt und kann Gewebe in der Region der Okklusion erhalten, indem es einen erhöhten Blutfluss über die nun vergrößerten Kollateralen ermöglicht (Scholz, Ziegelhoeffer et al. 2002; Schaper 2009). Im Tiermodell kann eine solche Okklusion durch *Arteria femoralis* (*A. femoralis*) Ligaturen herbei geführt werden (Kapitel 3.7.3.3).

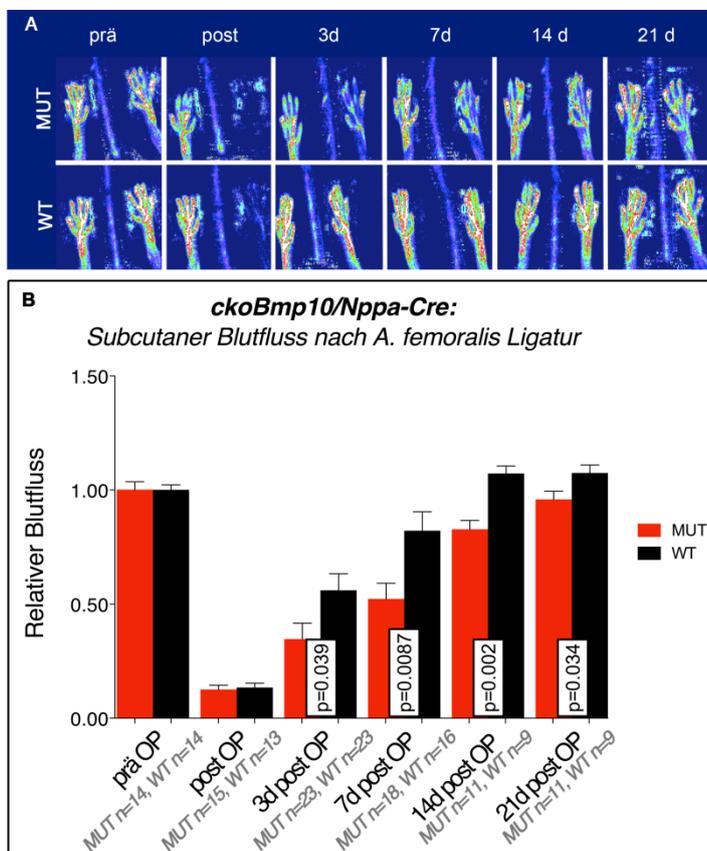


**Abbildung 21: Die Anreicherung des BMP10 Proprotein in wachsenden Kollateralen ist nicht auf eine vaskuläre Transkription zurück zu führen.** **A)** Ergebnis der immunochemischen Analyse von Proteinextrakten aus Kollateralen des Hinterbeins sieben Tage nach einer A. Femoralis Ligatur (OP1 – OP3) oder Sham-operierten Kaninchen. Der proBMP10 Antikörper detektiert erhöhte Mengen BMP10 Propeptid in den wachsenden Kollateralen. Zur Normalisierung wurde die Menge an  $\alpha$ SMA in den selben Extrakten bestimmt. **B)** Gelbild der Bmp10 RT-PCR Analyse vom RNA-Extrakten, gewonnen aus Kollateralen der Ratte 7d nach A. femoralis Ligatur (OP) oder der Kontrollbehandlung (Sham). Als Negativ-Kontrolle wurde ein ventrikuläres RNA-Extrakt, als Positiv-Kontrolle das RNA-Extrakt eines rechten Atriums, mitgeführt. Als Standard diente die 1kb DNA Ladder Plus. **C-F)** LacZ-gefärbte und Eosin gegengefärbte repräsentative transversale Kryoschnitte der Muskeln des rechten Hinterlaufs A. femoralis-ligierter B10laZ F1 Mäuse, 3d, 7d, 15d oder 17d nach Ligatur. In den Bmp10-lacZ transgenen Tieren ist keine Bmp10 Transkription in Kollateralen (weiße Pfeile) nachweisbar. **G-H)** Positiv-Kontrollen für die LacZ-Färbung in C-F waren coronal geschnittene Atrien der Tiere, die identisch mit den Tieren in C) bzw. F) waren.

Zunächst wurde durch immunochemische Analysen getestet, ob BMP10 im vaskulären System nachweisbar ist. Dazu wurde der Antikörper verwendet, welcher das BMP10 Proprotein detektiert. In Abbildung 19 A ist zu sehen, dass der Antikörper wie erwartet das BMP10 Proprotein im Proteinextrakt des rechten Atriums detektiert, aber in keinem anderen der getesteten murinen Organe beziehungsweise Gewebe. Auch in der Aorta konnte kein Signal detektiert werden. Im nächsten Schritt wurde getestet, ob BMP10 sich möglicherweise im peripheren vaskulären System anreichert. Da es aufgrund der geringen Größe nicht möglich war Kollateralgefäße in Mäusen freizustellen, wurden zunächst die Kollateralen aus dem Hinterbein von Kaninchen auf das Vorhandensein des Bmp10 Proproteins hin untersucht (Western Blots der Proteinextrakte wurden

von T. Kubin, MPI Bad Nauheim zur Verfügung gestellt). In Abbildung 21 A ist das Ergebnis dieser Analyse zu sehen. Das BMP10 Propeptid ist tatsächlich in den Kollateralen nachweisbar, vielmehr noch, es kommt im Kaninchen sogar zu einer Anreicherung in wachsenden Kollateralen nach einer *A. femoralis* Ligatur.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob *Bmp10* in den Kollateralen transkribiert wird oder tatsächlich von anderer Stelle angeschwemmt wird. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Gesamt-mRNA, gewonnen aus wachsenden oder nicht wachsenden Kollateralen von Ratten (freundlich überlassen von K. Troidl, MPI Bad Nauheim), auf das Vorhandensein von *Bmp10*-Transkripten hin untersucht. Dies geschah mithilfe von RT-PCR Analysen. Wie bereits erwartet, konnten keine *Bmp10*-Transkripte in Kollateralen von *A. femoralis* ligierten oder Sham operierten Ratten nachgewiesen werden (Abbildung 21 B). Dies bekräftigt die Hypothese, dass BMP10 aus dem Herzen über die Zirkulation angeschwemmt wird. Um diese These weiter zu erhärten und eine mögliche Funktion von BMP10 während der Arteriogenese aufzudecken, wurden nun *A. femoralis* Ligaturen an den *ckoBmp10/Nppa-Cre* Mäusen und auch B10laZ Mäusen vorgenommen.



**Abbildung 22: Der Verlust des atrialen *Bmp10* behindert die Rekonstitution des Blutflusses nach *A. femoralis* Ligatur im rechten Hinterlauf.** **A)** Repräsentative Laserdoppler-Bilder von Blutflussmessungen in Pfoten der Hinterläufe einer exemplarischen mutanten (MUT) und einer wildtypischen (WT) *ckoBmp10/Nppa-Cre* Maus. Aufgenommen direkt vor der Ligatur (prä), direkt danach (post), sowie 3, 7, 14 und 21 Tage nach der Ligatur. Links im Bild ist stets der nicht ligierte und rechts stets der ligierte Hinterlauf zu sehen. **B)** Das Diagramm stellt graphisch die Mittelwerte aller vorgenommenen Laserdoppler-Messungen und den mithilfe des T-Tests ermittelten Standardfehler dar. In den mutanten Mäusen ist die Rekonstitution des subcutanen Blutflusses nach der Ligatur signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ).

LacZ-Färbungen auf wachsenden Kollateralen der B10laZ F1 Linie detektierten keinerlei *Bmp10-lacZ* Transkription, so dass auch im Modelltier Maus eine kollaterale *Bmp10* Transkription

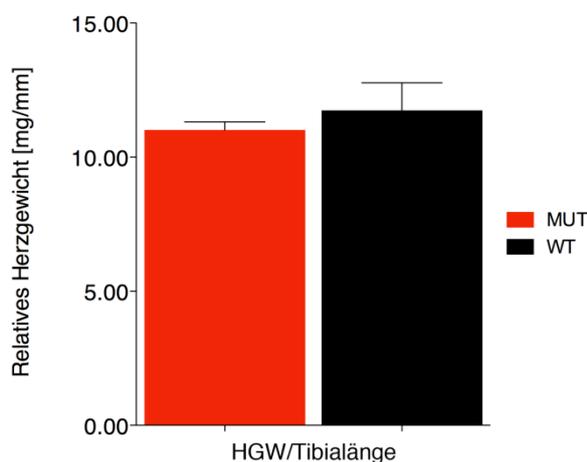
auszuschließen war (Abbildung 21 C-F). Systematische Messungen des Blutflusses in der Hinterpfote der ligierten Mäuse, mithilfe eines Laserdopplers, ergaben (Kapitel 3.7.3.3), dass die Rekonstitution des Blutflusses in mutanten *ckoBmp10/Nppa-Cre* Mäusen (*ckoBmp10<sup>-/-</sup>/Nppa-Cre<sup>pos</sup>*) im Vergleich zu den wildtypischen Wurfgeschwistern (*ckoBmp10<sup>+/+</sup>/Nppa-Cre<sup>pos</sup>*, *ckoBmp10<sup>+/-</sup>Cre<sup>pos</sup>*, *ckoBmp10<sup>+/-</sup>Cre<sup>neg</sup>*, *ckoBmp10<sup>-/-</sup>Cre<sup>neg</sup>*) verlangsamt ist. An Tag 3 nach der Ligatur wurde in den mutanten Tieren nur 60% und an Tag 21 89% des wildtypischen relativen Blutflusses erreicht (Abbildung 22).

#### 4.2.7.3 Der Verlust atrialen BMP10 hat keinen Effekt auf die TAC induzierte linksventrikuläre Hypertrophie

Im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie und ihrer begleitenden rechtsventrikulären Hypertrophie des Herzens konnte mithilfe der *ckoBmp10/Nppa-Cre* Mäuse bereits eine Funktion von atrialem BMP10 ausgeschlossen werden. Damit ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass BMP10 eine Rolle in anderen Hypertrophie-Modellen übernimmt. Deshalb wurde zusätzlich ein weiteres kardiales Hypertrophie-Modell angewandt, um die Funktion von BMP10 im pathologischen Herzen zu untersuchen. Das Modell der Wahl war hier die transverse Aortenkonstriktion, die TAC (Kapitel 3.7.3.2).

Die transverse Aortenkonstriktion wurde mit leichten Modifikationen wie von *Rockmann et al. 1991* beschrieben an *ckoBmp10/Nppa-Cre* wildtypischen und mutanten Mäusen sowie an B10laZ Mäusen vorgenommen. Nach drei Wochen wurden die Herzen präpariert und im Falle der *ckoBmp10/Nppa-Cre* Herzen die Trockengewichte der Herzen bestimmt, um den Grad der Hypertrophie sichtbar zu machen. Von B10laZ Herzen wurden Kryoschnitte angefertigt und diese LacZ-gefärbt, um die Expressionsdomänen von *Bmp10* im pathologischen Herzen sichtbar zu machen.

***ckoBmp10/Nppa-Cre:***  
TAC induzierte links-ventrikuläre Hypertrophie



**Abbildung 23:** Atrialer *Bmp10* Verlust nimmt keinen signifikanten Einfluss auf die TAC induzierte linksventrikuläre Hypertrophie. Im Diagramm sind die ermittelten Mittelwerte der relativen Herzgewichte (normalisiert auf die Tibialänge) und ihre Standardfehler (Mann-Whitney Test) dargestellt. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen der TAC-induzierten Hypertrophie in mutanten ( $n=5$ ) und wildtypischen ( $n=5$ ) Herzen festzustellen.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Untersuchungen an *ckoBmp/Nppa-Cre* Herzen zusammengefasst. Der Verlust des atrialen BMP10 hat keine Auswirkungen auf die Hypertrophiebedingte kardiale Massenzunahme, denn es sind keine signifikanten Unterschiede in der Herzmasse zwischen mutanten und wildtypischen *ckoBmp10/Nppa-Cre* Herzen messbar. Um interindividuelle Herzmassen Unterschiede zu normieren, waren die Herzmassen bezüglich ihrer Tibialängen relativiert worden. Die Untersuchungen an den *B10laZ* Herzen hat ergeben, dass die TAC induzierte linksventrikuläre Hypertrophie nicht durch eine Veränderung der *Bmp10* Expressionsdomänen im Herzen gekennzeichnet ist.

#### **4.2.8 Die Rolle von BMP10 während der Kardiogenese**

Der konstitutive *Knock-out* von *Bmp10* hat gezeigt, dass *Bmp10* schon während der frühen Embryogenese essentiell für die Herzentwicklung ist (Kapitel 2.2.3). Jedoch ist bisher ungeklärt, auf welche Weise *Bmp10* hier seine Funktion erfüllt. Deswegen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Rolle von *Bmp10* während der Herzentwicklung näher zu beleuchten.

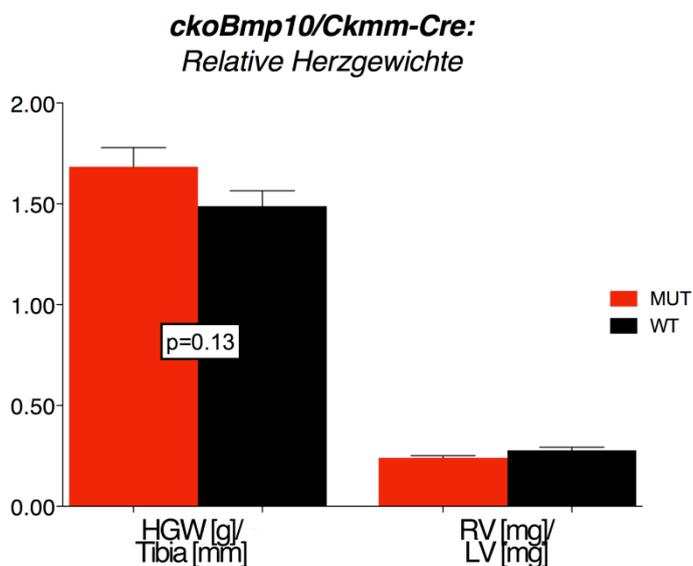
Die *Bmp10-lacZ BAC* transgenen Mäuse haben gezeigt, dass *Bmp10* ein deutlich komplexeres Expressionsprofil aufweist als bisher bekannt. Die ersten Schritte auf dem Weg zum umfassenderen Verständnis der Bedeutung von *Bmp10* für die Kardiogenese waren deshalb zunächst die sukzessive Charakterisierung seiner Expressionsdomänen im Herzen. Zu diesem Zweck wurde im Verlauf dieser Arbeit der konditionelle *Bmp10 Knock-out* mit verschiedenen *Cre*-Linien verpaart. Diese sollten es ermöglichen, *Bmp10* in den einzelnen Expressionsdomänen oder auch kombinatorisch zu deletieren. Die hervorgerufenen Phänotypen sollte dann Aufschluss über die BMP10 Funktion im Herzen geben.

##### **4.2.8.1 Der *Bmp10 Knock-out* im postnatalen Herzen mithilfe der *Ckmm-Cre* Linie hat keinen Einfluss auf das kardiale Wachstum**

Konstitutiv *Bmp10*-defiziente Mäuse sind um E9.5 lethal, aufgrund eines hypoplastischen, funktionsunfähigen Herzens (*Chen, Shi et al. 2004*). Hingegen, die ektopische Expression von *Bmp10* im postnatalen Herzen zieht ein reduziertes Größenwachstum innerhalb von sechs Wochen nach der Geburt nach sich (*Chen, Yong et al. 2006*). Ob jedoch der myokardiale BMP10 Verlust im Umkehrschluss eine exzessives hypertrophes Wachstum begünstigen würde, war bisher nicht völlig klar. Im atrialen *Bmp10 Knock-out* ist ein solcher Phänotyp zwar nicht beobachtet worden, aber möglicherweise hat myokardiales BMP10, das im postnatalen Herzen weiterhin exprimiert wird (Kapitel 4.1), diesen Effekt verschleiert.

Deshalb wurde nun der konditionelle *Bmp10* Knock-out mit der *Ckmm-Cre* Linie verpaart, in welcher CRE ab E13 im Myokard exprimiert wird. Dies sollte eine 100%ige Rekombination des mutanten Locus im gesamten Myokard des postnatalen Herzen erzielen (Lyons, Muhlebach et al. 1991; Bruning, Michael et al. 1998; Wang, Wilhelmsson et al. 1999). Anschließend wurden die Herzen adulter, mutanter *ckoBmp10<sup>flox/flox</sup>/Ckmm-Cre<sup>pos</sup>* und wildtypischer Nachkommen hinsichtlich ihrer Größe untersucht, indem das Herzgewicht bestimmt wurde.

Das erste untersuchte Paar eines wildtypischen und mutanten Herzen von *ckoBmp10/Ckmm-Cre* Wurfgeschwistern lieferte den Hinweis, dass die Deletion von *Bmp10* ein postnatales hypertrophes oder dilatives Größenwachstum verursacht. Das mutante Herz war im Vergleich zum wildtypischen Herzen stark vergrößert. Die Untersuchungen weiterer 10 Paare konnten diesen Befund jedoch nicht bestätigen, da hier kein signifikanter Unterschied ( $p=0.128$ ) zwischen mutanten und wildtypischen Herzen von Wurfgeschwistern festzustellen war (Abbildung 24). Somit nimmt die postnatale myokardiale *Bmp10*-Deletion keinen messbaren Einfluss auf das postnatale Größenwachstum muriner Herzen.



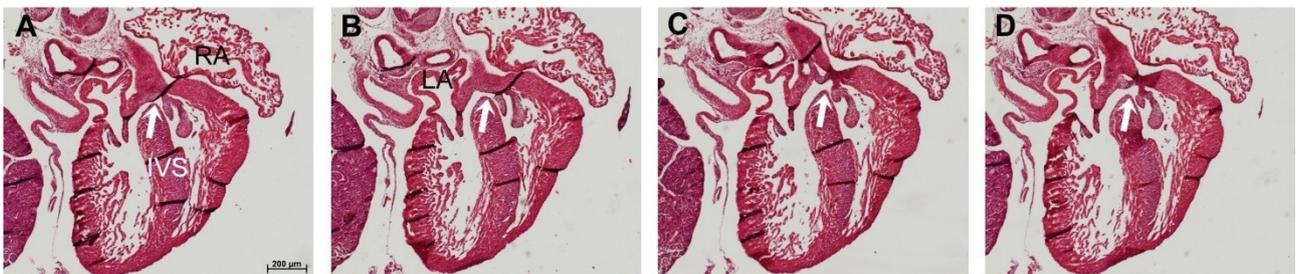
**Abbildung 24:** *ckoBmp10/Ckmm-Cre* – Die postnatale *Bmp10*-Defizienz hat keinen Einfluss auf das kardiale Größenwachstum. Das Diagramm zeigt die Mittelwert der relativen Herzgewichte, die in mutanten ( $n=10$ ) und wildtypischen ( $n=10$ ) Herzen ermittelt wurden, samt ihres Standardfehlers. Weder die Herzmasse insgesamt (normalisiert auf die Tibialänge) noch die Masse der Ventrikel (normalisiert durch ihr Verhältnis zueinander) ist zwischen Wildtyp (WT) und Mutante (MUT) signifikant verschieden (T-Test ermittelter Wert  $p > 0.1$ ).

#### **4.2.8.2 Das myokardiale BMP10 ist für die frühe Kardiogenese nicht essentiell**

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob allein das embryonale myokardiale BMP10 für die normale Herzentwicklung verantwortlich ist und das Fehlen der myokardialen Expressionsdomäne ausreicht, um den Phänotyp zu verursachen, der in den mutanten *Bmp10<sup>flox/flox</sup>/CMV-Cre<sup>pos</sup>* (Kapitel 4.2.4) Embryonen zu beobachten war. Zu diesem Zweck wurden

die Linien *ckoBmp10* und *αMHC-Cre* derart miteinander verpaart, dass in der Nachkommenschaft mutante Tiere mit dem Genotyp *Bmp10<sup>flox/flox</sup>/αMHC-Cre<sup>pos</sup>* vertreten sein sollten.

Die Analyse der Nachkommenschaft ergab, dass mutante Tiere vertreten waren. Jedoch war ihre Anzahl deutlich geringer, als sie durch eine Mendelsche Verteilung hätte angenommen werden können. Statt erwarteter 18.5 % haben nur 4% (6 mutante Tiere in insgesamt 145 Nachkommen) das Erwachsenenalter erreicht. Dies legte den Schluss nahe, dass die myokardiale *Bmp10* Deletion in einem milden Herzphänotypen resultiert, der den Tod einiger mutanten Tiere verursacht. Die Tatsache, dass keine toten Jungtiere in den Haltungskäfigen zu finden waren, sowie die Tatsache, dass es wenige überlebende mutante Tiere gab, deutete darauf hin, dass die Tiere während der Embryogenese oder kurz nach der Geburt verstarben. Um einen besseren Eindruck zu bekommen, wann die mutanten *ckoBmp10/αMHC-Cre* Tiere sterben, wurden verschiedene Embryonalstadien präpariert, morphologisch betrachtet und genotypisiert. Dies ergab, dass an E9.5 und E10.5 mutante Embryonen morphologisch nicht von ihren wildtypischen Geschwistern unterscheidbar sind. Jedoch die histologische Untersuchung eines mutanten E16.5 Herzens zeigte, dass dieses sich von wildtypischen Herzen durch eine nicht vollständige Septierung der Ventrikel unterschied. In den anderen Strukturen des Herzen allerdings wies das mutante E16.5 Herz keine auffälligen Veränderungen auf. Insbesondere das kompakte Myokard der Ventrikel schien sich ebenso wie in wildtypischen Herzen zu entwickeln.



**Abbildung 25:** Septumdefekt im mutanten E16.5 *ckoBmp10/αMHC-Cre* Herz. In A-D) sind H&E gefärbte Paraffindünnschnitte eines mutanten E16.5 *Bmp10<sup>flox/flox</sup>/αMHC -Cre<sup>pos</sup>* Herzens zu sehen. Die weißen Pfeile deuten auf den intraventrikulären Septumdefekt.

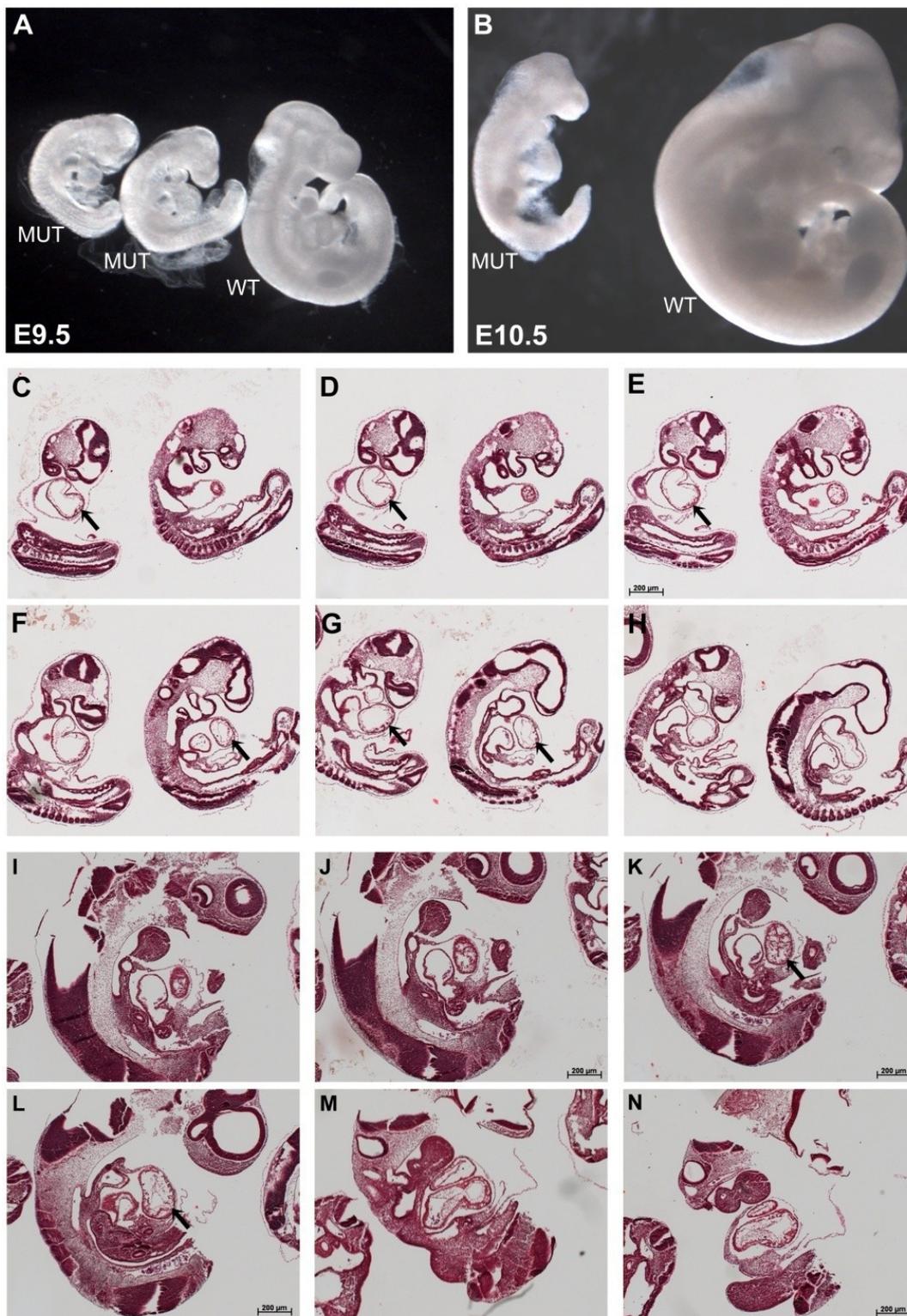
Die histologische Untersuchung eines weiteren E16.5 mutanten Herzens hingegen zeigte, dass nicht alle mutante Herzen einen Septumdefekt aufweisen, der vermutlich ursächlich für die erhöhte Lethalität der mutanten *ckoBmp10/αMHC-Cre* Tiere ist. Diese Tatsache deckt sich mit der Beobachtung, dass ein Teil der mutanten Nachkommenschaft zu adulten Tieren heranwachsen konnte. Weitere histologische Untersuchungen an einer höheren Anzahl von Tieren müssen zeigen, ob die Zahl der mutanten Herzen mit und ohne Septumdefekten, die Zahl der überlebenden (4%) bzw. nicht überlebenden mutanten Nachkommen reflektiert.

#### **4.2.8.3 Die mit der *Nkx2.5-Cre* überlappende *Bmp10* Expression ist essentiell für die Kardiogenese**

Von der *Nkx2.5-Cre* Linie ist bekannt, dass die Cre-Rekombinase hauptsächlich im Herzen exprimiert wird. Cre wird hier, getrieben durch den *Nkx2.5*-Promotor, in der kardialen Sichel exprimiert, also bereits bevor die *Bmp10*-Expression erstmals detektierbar ist. Es ist gezeigt worden, dass die hier verwendete *Nkx2.5-Cre* Linie CRE embryonal im Myokard aller 4 Herzkammern, aber auch mosaikartig im Endokard und in der Leber exprimiert (*Stanley, Biben et al. 2002*). Um zu klären, ob die kombinatorische Expression von *Bmp10* in diesen verschiedenen Zelltypen bzw. Geweben des Herzen essentiell für die Herzentwicklung ist, wurde *Bmp10* mithilfe der *Nkx2.5-Cre* Linie deletiert. Die Analyse der Nachkommenschaft zeigte, dass die *Bmp10*-defizienten Embryonen den Phänotyp des konstitutiven *Knock-outs* rekapitulieren. Bereits an E9.5 sind die mutanten *ckoBmp10<sup>flox/flox</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup>* Embryonen, im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern, in ihrer Entwicklung retardiert (Abbildung 26). Sie weisen deutlich kleinere Herzen mit nur minimaler Trabekulierung (Abbildung 26 C-N) und fehlende zellularisierte, endokardiale Kissen auf. Bereits an E10.5 sind die Embryonen verstorben, erkennbar am Verlust der kardialen Kontraktion, sowie der einsetzenden Resorption des Embryos durch den mütterlichen Organismus (Abbildung 26 B).

#### **4.2.8.4 Endokardiales *Bmp10* ist für die Kardiogenese entbehrlich**

Die *Bmp10-lacZ* transgenen Mäuse haben gezeigt, dass *Bmp10* auch im Endokard des murinen Herzens exprimiert wird. Bereits im embryonalen Herzen konnte diese Expressionsdomäne sichtbar gemacht werden (Kapitel 4.1). Da es das Ziel war zu erforschen, welche der beschriebenen *Bmp10*-Expressionsdomänen für die frühe Kardiogenese essentiell ist und die myokardiale Expressionsdomäne allein bereits ausgeschlossen werden konnte, wurde nun die Bedeutung der endokardialen Domäne untersucht. Mithilfe des konditionellen *Bmp10 Knock-outs* in Kombination mit der *Flk1-Cre* Linie sollte nun geklärt werden, welche Rolle das endokardiale *Bmp10* im Herzen übernimmt. Die *Flk1-Cre* Linie sollte CRE in endothelialen und somit auch endokardialen Zellen exprimieren (*Licht, Raab et al. 2004*). Um die Bedeutung der endokardialen *Bmp10* Expression aufzuklären, wurde die *Flk1-Cre* Linie in die *ckoBmp10/Nppa-Cre* Linie eingekreuzt. Da die verwendete *Flk1-Cre* Linie jedoch bisher nicht häufig hinsichtlich endokardialer Rekombinationsereignisse in der Literatur beschrieben ist, wurde sie sicherheitshalber auf ihre endokardiale *Cre*-Expression hin untersucht.



**Abbildung 26:** *ckoBmp10/Nkx2.5-Cre* - *Bmp10* defiziente Herzen rekapitulieren den Phänotyp des konstitutiven *KOs*. **A)** Mutante *ckoBmp10/Nkx2.5-Cre* E9.5 Embryonen sind im Vergleich zu ihren wildtypischen Wurfgeschwistern (*WT*) deutlich kleiner. **B)** An E10.5 ist die Retardierung noch deutlicher. Die mutanten Embryonen sind bereits verstorben und die einsetzende Resorption durch die Mutter ist bereits erkennbar. **C-H)** H&E gefärbte sagittale Paraffinschnitte der in **A)** gezeigten mutanten *ckoBmp10/Nkx2.5-Cre* E9.5 Embryonen. Das mutante Herzschlauch ist „geloopt“, jedoch kaum trabekuliert (Pfeile in **E,F,K**). Auch haben sich bisher keine zellularisierte endokardiale Kissen entwickelt. **I-N)** Hingegen der wildtypische Embryo besitzt bereits ausgeprägte Trabekel (Pfeil in **K**) und endokardiale Kissen (**M, N**).

Zu diesem Zweck wurde sie mit der *Rosa26-LacZ* Reporterlinie (Soriano 1999) verpaart. Diese Linie hat eine *lacZ*-Kassette mit einem vorgeschalteten *loxP*-flankierten Transkriptionsstopp in den ubiquitär exprimierten *Rosa26*-Locus integriert. Die CRE-vermittelte Rekombination der *loxP*-Elemente verursacht die Deletion der Stoppkassette, ermöglicht so die *lacZ* Transkription und somit die Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase, die schließlich mit der LacZ-Färbung sichtbar gemacht werden kann.



**Abbildung 27:** Die *Flk1-Cre* Linie exprimiert CRE nicht im Endokard. A-B) LacZ-gefärbte Kryschnitte von E13.5 *Rosa26-lacZ<sup>+/+</sup>/Flk1-Cre<sup>pos</sup>* Embryonen. Gefäße in der Körperwand sind blau gefärbt und machen so die CRE-Rekombinase Aktivität sichtbar, jedoch im embryonalen Herzen bzw. im Endokard ist keinerlei Färbung sichtbar. Schnitte wurden mit Eosin (rosa) gegengefärbt C) „Whole mount“ LacZ-gefärbtes adultes, transversal in zwei Hälften geteiltes *Rosa26-lacZ<sup>+/+</sup>/Flk1-Cre<sup>pos</sup>* Herz. Auch hier waren keine *Flk1-Cre* vermittelte Rekombinationsereignisse im Endokard der Ventrikel detektierbar. IVS: intraventrikuläres Septum, LV: linker Ventrikel, RA: rechtes Atrium, RV: rechter Ventrikel

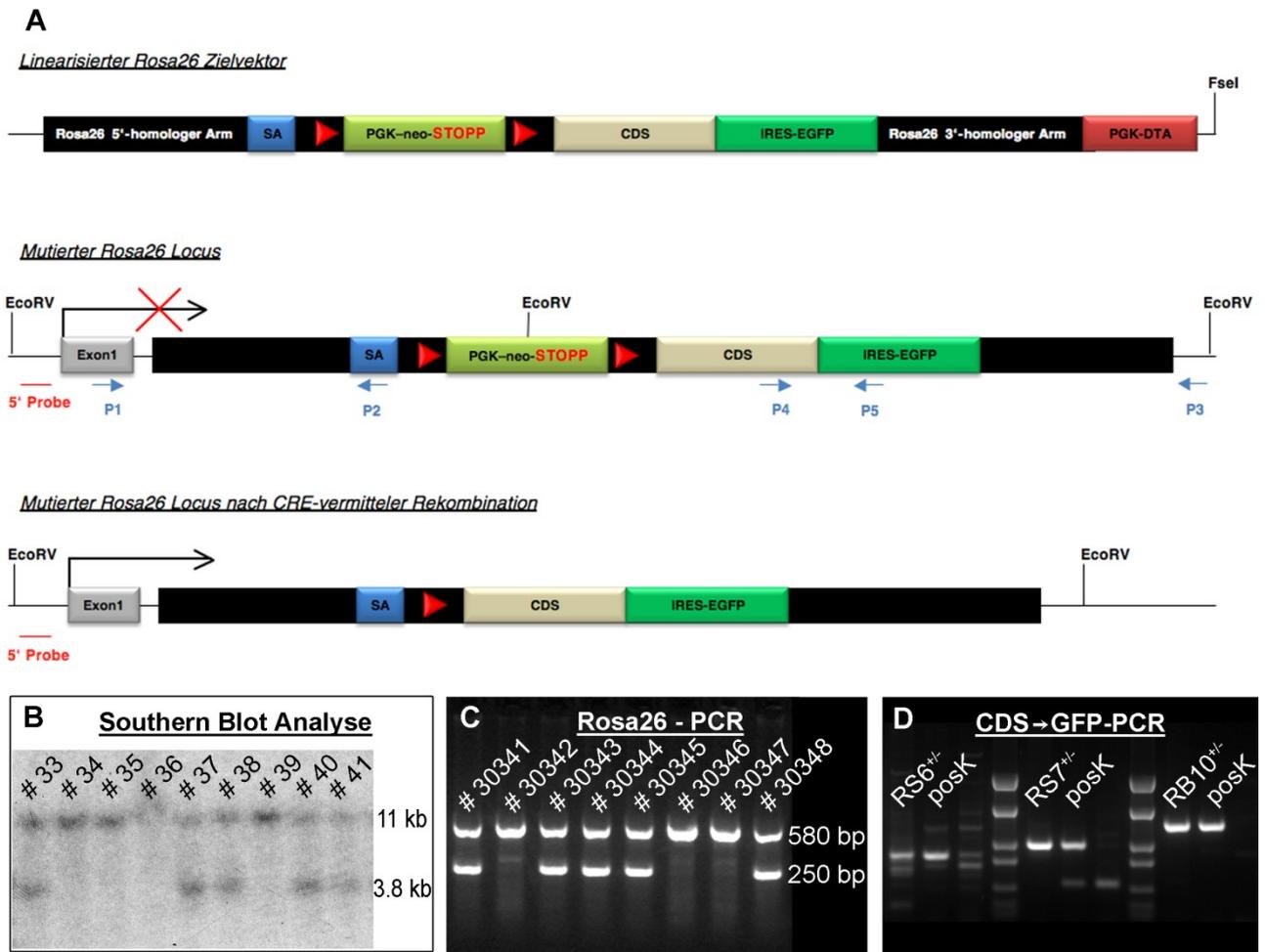
Die Untersuchung doppelt transgener *Rosa26-LacZ<sup>+/+</sup>/Flk1-Cre<sup>pos</sup>* Herzen mittels LacZ-Färbungen zeigten, dass weder in embryonalen (E13.5) noch adulten Herzen eine endokardiale, *Flk1-Cre* vermittelte, *Bmp10-lacZ* Expression nachweisbar war (Abbildung 27). Somit schien diese Linie nicht weiter geeignet, die endokardiale *Bmp10*-Funktion zu untersuchen. Es wurde deshalb auf eine etablierte endothelial/endokardial Cre-exprimierende Linie zurückgegriffen, nämlich die *TEK-Cre* Linie (Koni, Joshi et al. 2001). Hier gibt es einige Berichte, in denen die Expression von *TEK-Cre* im embryonalen Herzen beschrieben und auch verwendet wurde, um Rekombinationen im Endokard zu vermitteln (Koni, Joshi et al. 2001; Komatsu, Wakatsuki et al. 2007; Goddeeris, Rho et al. 2008). Die *TEK-Cre* Line wurde mit der *ckoBmp10* Linie verpaart und die Genotypen der Nachkommenschaft bestimmt. Es zeigte sich, dass die mutanten Tiere mit dem Genotyp *Bmp10<sup>flox/flox</sup>/TEK-Cre<sup>pos</sup>* in dem nach Mendel erwarteten Verhältnis auftraten. Daher scheint das endokardiale *BMP10* allein, wie das myokardiale *BMP10* allein, keine essentielle Rolle in der Kardiogenese zu übernehmen. Möglicherweise bedarf es den kombinatorischen Verlust der myokardialen und endokardialen Expressionsdomäne, um die Sterblichkeit der mutanten *ckoBmp10/CMV-Cre* und *ckoBmp10/Nkx2.5-Cre* Embryonen um E9.5 zu phänotypieren.

#### **4.2.8.5 Die kardiale Bmp10 Expression in den $\alpha$ MHC-Cre und Tie2-Cre Expressionsdomänen ist für die frühe Herzentwicklung nicht essentiell**

Weder das atriale, noch das myokardiale, noch das endokardiale BMP10 allein schienen für die verminderte Trabekulierung und die embryonale Lethalität um E9.5, wie sie im konstitutiven *Knock-out* oder den mutanten *Bmp10<sup>lox/lox</sup>/CMV-Cre<sup>pos</sup>* bzw. *Bmp10<sup>lox/lox</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup>* zu beobachten waren, verantwortlich. Deshalb wurde im nächsten Schritt getestet, ob nur der kombinatorische Verlust von BMP10 aus den verschiedenen Expressionsdomänen ursächlich für diesen drastischen Phänotyp sein kann. Durch geeignete Verpaarungen wurden mutante Tiere generiert, in denen entweder das myokardiale sowie das endokardiale Bmp10 oder das atriale sowie das endokardiale Bmp10 deletiert ist. Also Mäuse mit den Genotypen *Bmp10<sup>lox/lox</sup>/αMHC-Cre<sup>pos</sup>/TEK-Cre<sup>pos</sup>* oder *Bmp10<sup>lox/lox</sup>/Nppa-Cre<sup>pos</sup>/TEK-Cre<sup>pos</sup>*. Die Analyse der jeweiligen Nachkommen ergab, dass die mutanten Tiere mit dem Genotyp *Bmp10<sup>lox/lox</sup>/Nppa-Cre<sup>pos</sup>/TEK-Cre<sup>pos</sup>* in dem erwarteten Verhältnis in einem Alter von Wochen auftraten. Für die Tiere mit Genotyp *Bmp10<sup>lox/lox</sup>/αMHC-Cre<sup>pos</sup>/TEK-Cre<sup>pos</sup>* waren bisher nicht genug Tiere vorhanden, um die Verteilung der Genotypen innerhalb der Nachkommenschaft sicher zu bestimmen. Aber genau wie einige mutante Tiere der ckoBmp10/αMHC-Cre Linie bis in Erwachsenenalter überlebten, konnten bereits einige wenige ckoBmp10/αMHC-Cre/TEK-Cre adulte Tiere in der Nachkommenschaft ausgemacht werden, was gegen die Rekapitulation des früh lethalen Phänotyps der konstitutiven *Knock-outs* spricht.

### **4.3 Bmp10 Funktionsgewinnanalysen bestärken eine vaskuläre Funktion des sekretierten Faktors**

Neben Funktionsverlustanalysen bieten Funktionsgewinnanalysen ein probates Mittel, um die Funktion von Proteinen aufzuklären. So könnte das ektopische Vorhandensein eines bestimmten Effektors Krankheitsbilder bzw. veränderte Phänotypen hervorrufen, die Rückschlüsse auf die Funktion des Faktor liefern. Um auch diese Möglichkeit der Analyse auszuschöpfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Maus generiert, die Bmp10 konditionell ektopisch exprimiert. Zu diesem Zweck wurde die codierende humane Bmp10 DNA Sequenz mit einem vorgeschalteten *loxP*-flankierten Transkriptionsstopp sowie einer Neomycin-Selektionskassette und einer nachgeschalteten IRES-EGFP Kasette durch homologe Rekombination in das erste Intron des ubiquitär exprimierten Rosa26-Locus (*Soriano 1999*) integriert. Die STOPP-Kassette verhindert die Transkription des Transgens. Erst das Einkreuzen einer CRE-exprimierenden Mauslinie ermöglicht



**Abbildung 28: Der mutante Rosa26-Locus.** **A)** Zuerst ist der *FseI*-linearisierte Rosa26-Zielvektor schematisch dargestellt. Neben den für die Rekombination notwendigen homologen Armen, enthält er die loxP-flankierte STOP-Kassette, die neben dem Transkriptionstopp auch das für die positive Selektion der ES-Zellen notwendige PGK-Promotor getriebene neo-Resistenzgen, sowie eine PGK-DTA Kassetten für die negative Selektion nicht homolog rekombinierter ES Zellen enthält. Die mittlere Reihe zeigt den rekombinanten Rosa26-Locus. In das erste Rosa26-Intron ist der transgene Splice-Akzeptor (SA), die loxP-flankierte (rote Dreiecke) STOP-Kassette, die codierende Sequenz von *Bmp10*, *Smad6* oder *Smad7* (CDS) sowie die IRES-GFP Kassetten integriert. Die unterste Reihe zeigt den mutanten Rosa26 Locus nach Cre/loxP-vermittelter Deletion der STOP-Kassette. Desweiteren sind im Schema die Genotypisierungsprimer P1-P5 und die Southern Blot DNA-Sonde (5'Probe) eingezeichnet. **B)** Repräsentative Southern Blot Analyse der neo-positiv selektierten Rosa26-Bmp10 ES-Zellklone Nummer 33 – 41. In allen Klonen lässt sich mit der Rosa26-5' Probe nach einem EcoRV-Verdau der genomischen DNA das 11 kb Fragment des wildtypischen und, in Klonen Nummer 33, 37, 38, 40 und 41, zusätzlich das 3.8 kb Fragment des mutanten Allels detektieren. **C)** Gelelektrophoretisch aufgetrennte Rosa26 Genotypisierungs-PCRs in welchen die in A) eingezeichneten Primern P1,2 und 4 (P1: Rosa-FA, P2: Rosa-SplicAc, P3: Rosa-RF) verwendet wurden und die genomische DNA der Rosa26-Bmp10 Tiere 30341 – 30348 als Template diente. Das 580 bp große Amplifikat zeigt das Wildtyp-Allel an, während das 250 bp Amplifikat das mutante Rosa26 Allel anzeigt. **D)** Die Genotypisierungs PCR mit Primern, die zum einen in der codierenden Sequenz von *Smad6*, *Smad7* oder *Bmp10* (P4: huSmad6 Fwd2, huSmad7 Fwd2 oder hucBmp10 Fwd) binden, und einem Primer, der im GFP der IRESGFP-Kassetten bindet (P5: IRESGFP-rev). Repräsentativ ließ sich jeweils in einem transgenen Rosa26-Smad6 (RS6<sup>+/-</sup>), Rosa26-Smad7 (RS7<sup>+/-</sup>) und Rosa26-Bmp10 (RB10<sup>+/-</sup>) Tier zeigen, dass nicht nur die STOP-Kassette in den das Genom integriert ist, sondern auch die codierenden Sequenz für *Smad6*,

*Smad7* oder *Bmp10* samt IRES-GFP. Als positiv Kontrolle (*posK*) dienten in dieser Analyse die *Rosa26-Smad6*, *Rosa26-Smad7* und *Rosa26-Bmp10* Zielvektoren.

---

dann die räumlich und zeitlich definierte CRE-vermittelte Deletion der STOPP-Kassette und so die Transkription des Transgens vom *Rosa26*-Locus.

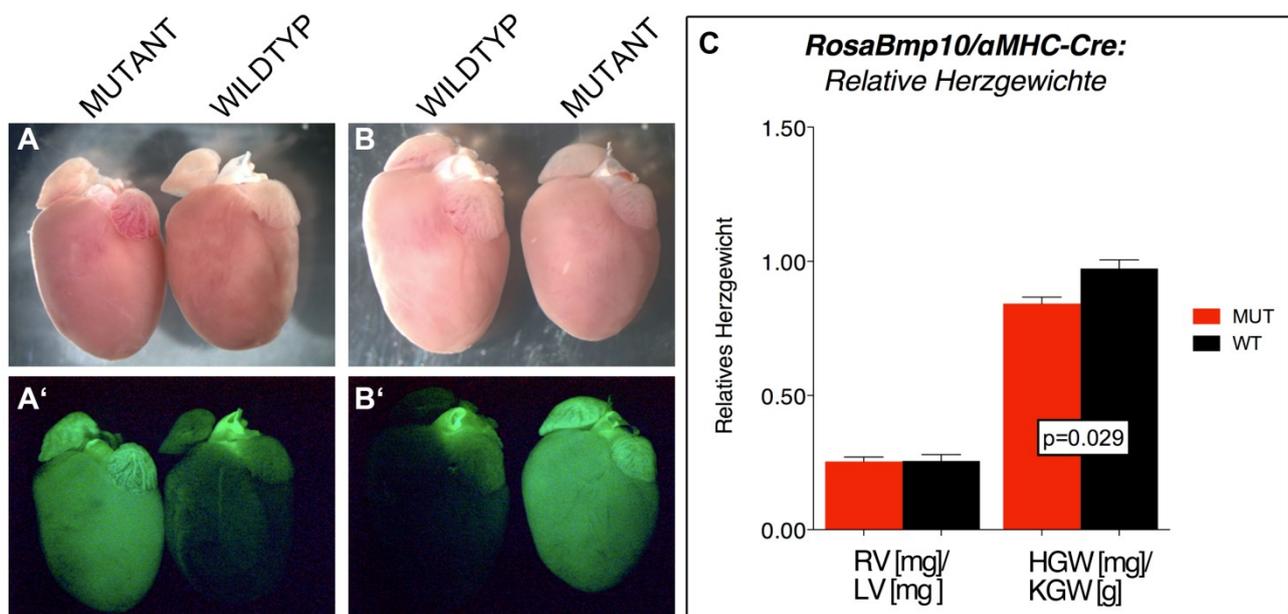
Der für die homologe Rekombination notwendige Zielvektor ist in Abbildung 28 skizziert und wurde wie folgt generiert. Die humane codierende Sequenz (CDS) von *Bmp10* lag bereits in dem Expressionsvektor pIRES2EGFP (Clontech) vor (freundlich überlassen von Isabella Piotrowska, MPI Bad Nauheim). Das *PstI/XmaI* Fragment *huBmp10-IRES2EGFP* wurde restriktionsenzymatisch herausgeschnitten und in den *pBigT* Vektor kloniert, welcher einen Splice-Akzeptor sowie eine *loxP*-flankierte STOPP-Kassette enthält. Letztere setzt sich zusammen aus *PGK-neo* als Selektionsmarker und einem *Tripel SV40 Poly(A)* Signal (tPA), dem Transkription-Terminationssignal (*Srinivas, Watanabe et al. 2001*). Im letzten Klonierungsschritt wurde mit den Enzymen *AscI* und *PacI* das Fragment in den *Rosa26*-Targetingvektor *Rosa26-PA* (*Srinivas, Watanabe et al. 2001*) kloniert, der die homologen Arme für die Rekombination in den genomischen Locus der ES-Zelle enthält. Der Zielvektor wurde mit *FseI* linearisiert, in ES-Zellen elektroporiert und transformierte ES-Zellen selektioniert (Kapitel 3.7.2).

Durch die mit der STOPP-Kassette eingefügten Erkennungssequenzen für *EcoRV* und der *Rosa26*-5' Probe (Tabelle 2), war es möglich, im Southern Blot die ES-Zellklone zu identifizieren, welche durch homologe Rekombination die mutante Sequenz in den *Rosa26*-Locus integriert hatten. In den mutanten *Rosa26-huBmp10* ES-Zellklonen ließen sich für das mutante Allel 3.8 kb große, indikative Fragmente und für das wildtypische *Rosa26*-Allel repräsentierende 11 kb große Fragmente detektieren (Abbildung 28 B). Durch die Wahl geeigneter Primer war eine Genotypisierung der ES-Zellklone ebenfalls möglich. Diese dienten im weiteren Verlauf ebenfalls der Genotypisierung der mutanten *Rosa26*-Mauslinien (Abbildung 28 C).

Die Southern Blot Analysen ergaben, dass die gewünschte Rekombination in ca. 55% der Fälle stattgefunden hatte. Von den identifizierten positiven *RBmp10* Klonen wurden vier Klone, nämlich die Klone *RBmp10 #37*, *#41*, *#50*, und *#52* in C57BL/6J Blastozysten injiziert. Jedoch nur die chimären Mäuse, hervorgegangen aus den mit Klon *#37* und Klon *#50* injizierten Blastozysten, konnten das mutante Erbgut an die nächste Generation weitergeben und waren somit Keimbahnchimäre. Diese Chimären waren die Gründertiere der Linien *Rosa26-Bmp10 (37-Chim12)* und *Rosa26-Bmp10 (50-Chim2)*. Hier konnte durch eine weitere Genotypisierungs-PCR gezeigt werden, dass nicht nur die STOPP-Kassette, sondern wie erwartet auch die codierende *Bmp10* Sequenz samt IRES-EGFP Kassette in den *Rosa26*-Locus integriert ist (Abbildung 28 C).

### 4.3.1 Die ektopische myokardiale BMP10 Expression vermindert das postnatale kardiale Wachstum

Der erste Schritt in Richtung Charakterisierung und Überprüfung der Eignung der *Rosa26-Bmp10* Linien für Funktionsgewinnanalysen war die Verpaarung der *Rosa26-Bmp10* Mäuse mit der myokardial CRE exprimierenden  $\alpha$ MHC-Cre Linie. Zum einen sollte in den doppelt heterozygoten Nachkommen *Rosa26-Bmp10<sup>+/-</sup>/αMHC-Cre<sup>pos</sup>* eine GFP-Fluoreszenz im Myokard detektierbar sein, und zum anderen eine Phänokopie der  $\alpha$ MHC-Bmp10 Maus (Chen, Yong et al. 2006) beobachtbar sein (Kapitel 2.2.3). Wenngleich hier ein etwas milderer Phänotyp erwartet wurde, da die Expression vom *Rosa26*-Promotor vermutlich schwächer als vom  $\alpha$ MHC-Promotor sein würde. Um die Dosis des exprimierten Bmp10 Transgens zu erhöhen, wurden deshalb die erhaltenen mutanten *Rosa26-Bmp10<sup>+/-</sup>/αMHC-Cre<sup>pos</sup>* Mäuse Inzucht verpaart, damit das mutante Allel reinerbig vorlag.



**Abbildung 29: Die *Rosa26-Bmp10* Linie exprimiert konditionell BMP10 in physiologisch aktiven Dosen. A-B)** Aufnahmen 6 Monate alter mutanter *Rosa26-Bmp10<sup>-/-</sup>/αMHC-Cre<sup>pos</sup>* oder wildtypischer *Rosa26-Bmp10<sup>+/-</sup>/αMHC-Cre<sup>neg</sup>* Herzen im A-B) Hellfeld oder im A'-B') blauen Kanal. Die Anregung mit blauem Licht (488 nm) zeigt, dass die mutanten doppelt transgenen Tiere GFP exprimieren. Erkennbar an der Grün-Fluoreszenz im Myokard. **C)** Relative Herzgewichte 6 Monate alter mutanter (n=4, MUT) oder wildtypischen Herzen (n=4, WT). Diagramm zeigt Mittelwerte des Herzgewichts, normalisiert gegen die Körpergewichte (KGW) und das Massenverhältnis der Ventrikel zueinander sowie die entsprechenden Standardfehler (Mann-Whitney-Test). Die Masse mutanter Herzen ist signifikant geringer als wildtypischer Herzen (Mann-Whitney Test,  $p < 0.05$ ), jedoch das Massenverhältnis der Ventrikel zueinander ist unverändert.

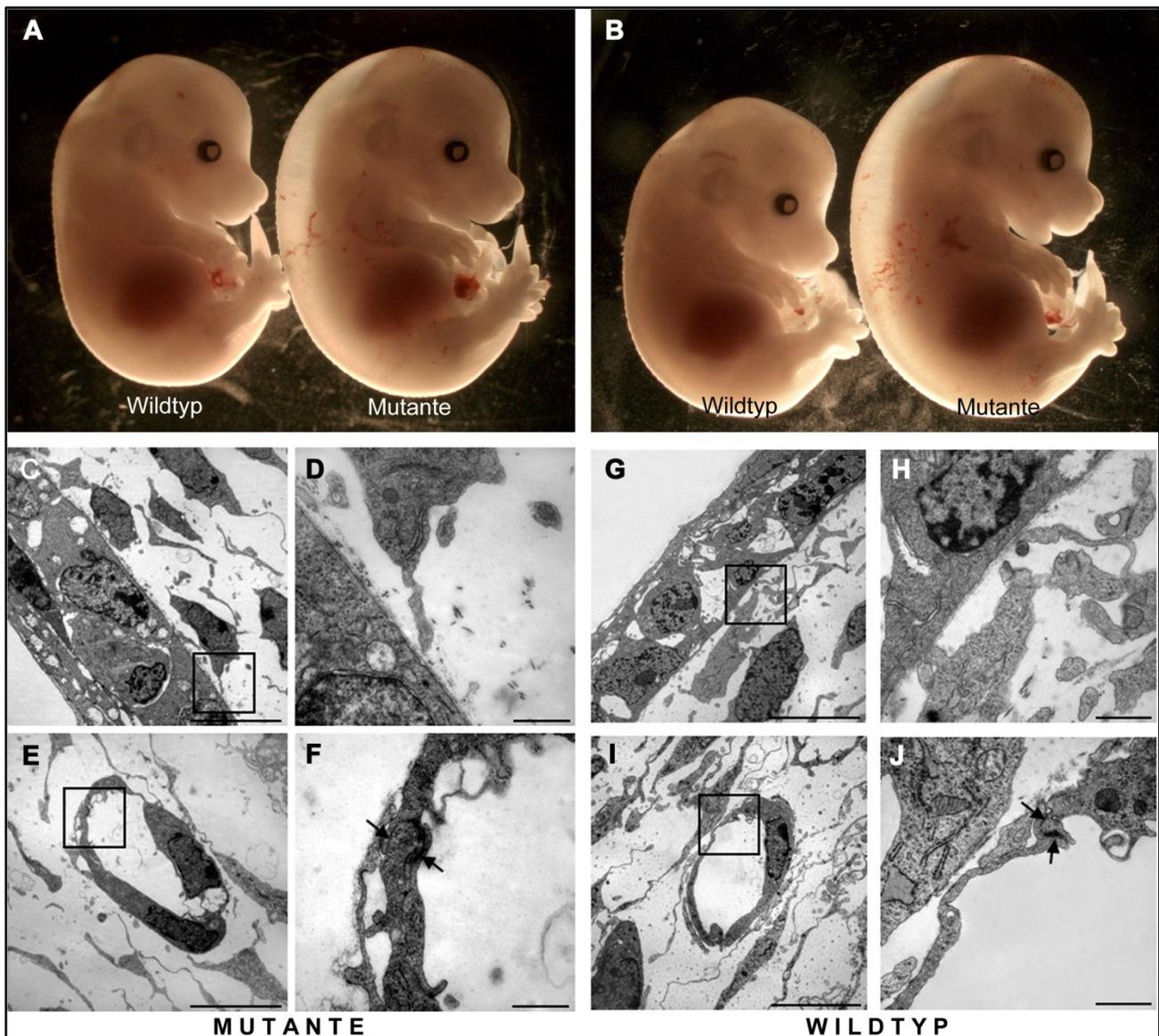
Die Herzen der Nachkommen aus den Inzucht-Verpaarungen *Rosa26-Bmp10<sup>+/-</sup>/αMHC-Cre<sup>pos</sup>* x *Rosa26-Bmp10<sup>+/-</sup>/αMHC-Cre<sup>pos</sup>* wurden hinsichtlich einer GFP-Fluoreszenz untersucht. In Abbildung 29 ist zu sehen, dass eine GFP-Fluoreszenz ausschließlich in doppelt transgenen Tieren *Rosa26-Bmp10<sup>+/-</sup>/αMHC-Cre<sup>pos</sup>* oder *Rosa26-Bmp10<sup>-/-</sup>/αMHC-Cre<sup>pos</sup>* sichtbar war. Die Bestimmung der Herz-Trockengewichte ergab, dass die αMHC-Cre vermittelte *Bmp10* Expression vom *Rosa26*-Locus im Alter von sechs Monaten zu signifikant kleineren Herzen führt (Abbildung 29 C). Die vier untersuchten mutanten Herzen waren durchschnittlich 15% kleiner als die vier untersuchten wildtypischen Herzen (0.84 mg/g Körpergewicht vs. 0.97 mg/g Körpergewicht). Diese phänotypisch beschreibbare Wirkung des ektopisch exprimierten, humanen BMP10 im Myokard beweist die physiologische Aktivität des ektopischen *Bmp10* und die Eignung der Linie *Rosa26-Bmp10* für weitere BMP10 Funktionsgewinnanalysen.

#### **4.3.2 Die ektopische BMP10 Expression im Endothel verursacht dorsonucheale Ödeme**

Da bereits die Funktionsverlustanalysen eine extrakardiale Funktion von BMP10 bewiesen hatten, nämlich seinen Einfluss auf im vaskulären System stattfindende Umbauprozesse (Kapitel 4.2.7.2), schienen weiterführende Untersuchungen zur Funktion von *Bmp10* im kardiovaskulären System mithilfe von Funktionsgewinnanalysen angebracht. Deshalb wurde in einem ersten Schritt die *Rosa-Bmp10* transgene Maus mit der induzierbaren VECadherin-CreERT Mauslinie verpaart. Nach Tamoxifen-Administration exprimiert diese Linie CRE in endothelialen Zellen (Monvoisin, Alva et al. 2006) und ist somit geeignet, die BMP10-Funktion in verschiedenen Embryonalstadien oder auch im adulten Tier zu analysieren. Um *Bmp10* schon während der Embryonalentwicklung ektopisch in Endothelzellen zu exprimieren, wurden *Rosa-Bmp10<sup>+/-</sup>* Weibchen mit *VE-Cadherin-CreERT<sup>pos</sup>* Böcken verpaart und Tamoxifen während der Schwangerschaft an E10.5 und E12.5 intraperitoneal injiziert (Kapitel 3.7.4).

Die makroskopische Betrachtung der transgenen und Tamoxifen-stimulierten Embryonen ergab, dass ein Teil der E14.5 Embryonen Ödeme im Rückenbereich und Nackenbereich, dorsonucheale Ödeme genannt, aufwies (Abbildung 30 A-B). Die Genotypisierung der Embryonen ergab, dass nur die doppelt transgenen *Rosa-Bmp10<sup>+/-</sup>/VE-Cadherin-CreERT<sup>pos</sup>* Embryonen diese Ödeme aufwies. Es ist daher auszuschließen, dass die Ödembildung auf die Behandlung mit Tamoxifen zurückzuführen ist. Sie wurde ausschließlich durch die Überexpression von BMP10 in embryonalen Endothelzellen verursacht.

Da mithilfe der VECadherinCreERT Linie *Bmp10* in endothelialen Zellen ektopisch exprimiert wurde, lag es nahe zunächst die Gefäße im Bereich des Ödems näher zu betrachten. Vermutlich ist der Verlust vaskulärer Integrität verantwortlich für einen übermäßigen Flüssigkeitsaustritt, der



**Abbildung 30:** Mutante, Tamoxifen-induzierte *Rosa26-Bmp10/VE-CadherinCreERT* E14.5 Embryonen weisen Ödeme in Rückenbereich auf, die sich nach ersten Analysen nicht auf den Verlust vaskulärer Integrität zurückführen lässt. **A, B)** Beide Aufnahmen der E14.5 *Rosa26-Bmp10/VE-CadherinCreERT* Embryonen zeigen links einen wildtypischen *Rosa26-Bmp10<sup>+/+</sup>/VE-CadherinCreERT<sup>neg</sup>* und rechts einen mutanten *Rosa26-Bmp10<sup>+/+</sup>/VE-CadherinCreERT<sup>pos</sup>* Embryo. Die mutanten Tiere weisen Ödeme im gesamten Rücken und Nackenbereich auf, während ihre weitere Morphologie unverändert ist. **C-K)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der *Rosa26-Bmp10/VE-CadherinCreERT* Embryonen aus dem Rückenbereich. **C-F)** zeigt die Aufnahmen eines mutanten *Rosa26-Bmp10<sup>+/+</sup>/VE-CadherinCreERT<sup>pos</sup>*, **G-J)** eines wildtypischen *Rosa26-Bmp10<sup>+/+</sup>/VE-CadherinCreERT<sup>neg</sup>* Embryos. **C)** und **G)** zeigen eine Übersicht, **D)** und **H)** die Detailaufnahme des in C und H gekennzeichneten Bereichs, der Kontaktstelle zwischen dorsalem Epithel und Basallamina. **E)** und **I)** zeigen die Übersicht einer Kapillare und **F)** und **J)** die Detailaufnahme der in E) und I) gekennzeichneten interendothelialen Adhäsionskontakte. Die Maßstäbe in den Übersichtsaufnahmen entsprechen 5 µm, die in den Detailaufnahmen 1 µm. Die Pfeile deuten in den Detailaufnahmen auf die endothelialen Adhäsionskontakte. Zwischen Mutante und Wildtyp lassen sich keine morphologischen Unterschiede erkennen, welche die vorliegenden Ödeme verursachen könnten.

schließlich die beobachteten Ödeme zur Folge hat. Um diese Arbeitshypothese zu testen, wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Wolfgang Kummer und Dr. Christian Mühlfeld (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen), elektronenmikroskopische Bilder angefertigt, mit einem Fokus auf Zell-Zell-Kontakt endothelialer Zellen peripherer Gefäße im Bereich der Ödeme (Abbildung 30 C-J). Leider konnten hier keinerlei Hinweise auf den Verlust vaskulärer Integrität gefunden werden. Die Zell-Zell-Kontakte schienen nicht beeinträchtigt zu sein. Die Aufgabe in der Zukunft wird sein, durch weitere histologische Untersuchungen die durch die ektopische Bmp10 Expression hervorgerufenen Organfehlbildungen zu identifizieren, die ursächlich für die Ödembildung sind.

Da die Tamoxifengabe während der Schwangerschaft um E17.5 zum Abort führt und somit die funktionelle Analyse von BMP10 im adulten kardiovaskulären System der Rosa26-Bmp10/VECadherinCreERT Linie behindert, wurde die Rosa26-Bmp10 Linie mit einer weiteren endothelialen CRE-Linie, der Flk1-Cre Linie verpaart. Die Genotypisierung der Nachkommenschaft dieser Verpaarungen ergab, dass mutante Genotyp *Rosa26-Bmp10<sup>+/-</sup>/Flk1-Cre<sup>pos</sup>* Mäuse im Mendelschen Verhältnis vertreten waren. Deshalb wurde geschlossen, dass die *Flk1-Cre* vermittelte ektopische BMP10 Expression keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit dieser Mäuse hat. Sicherheitshalber wurde in dieser Linie ebenfalls überprüft, ob hier eine Ödembildung an Embryonaltag 14.5 sichtbar ist, die eventuell im weiteren Verlauf der Entwicklung überkommen wurde. Doch die *Flk1-Cre* vermittelte ektopische Expression im embryonalen Endothel führte nicht zur Ausprägung von Ödemen.

#### **4.4 Identifizierung BMP/Smad-sensibler Zielgene *in vivo***

Wie eingangs ausgeführt wurde, ist das Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung der Bmp-Signalwege im Herzen weiter zu erhellen. Unter anderem sollte eine Modell entwickelt werden, um Bmp/Smad-sensible Zielgene *in vivo* zu identifizieren. Zu diesem Zweck ist versucht worden, Mauslinien zu generieren, die konditionell inhibitorische Smads, Smad6 und Smad7 (Kapitel 2.1.2.2), exprimieren. An ihnen sollten anschließend Transkriptom-Analysen vorgenommen werden, um Ziele zu identifizieren, die auf eine verminderte BMP-/Smad-Signalstärke reagieren.

##### **4.4.1 Generation der Rosa26-Smad6 und Rosa26-Smad7 Linie**

Für die konditionelle ektopische I-Smad Expression wurde, wie bereits im Falle der konditionellen ektopischen Bmp10 Expression, der ubiquitär exprimierte Rosa26-Locus und das von Phillip

Soriano entwickelte und durch Shankar Srinivas verfeinerte System der vorgeschalteten, konditionell deletierbaren STOPP-Kassette verwendet (Kapitel 4.3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die humanen codierenden Sequenzen (CDS) von Smad6 und Smad7 in den Rosa26-Locus eingebracht. Die Smad-Sequenzen lagen in den Expressionsvektoren pReceiver-M02 vor (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, RZPD Plasmid #EX-R0044-M02 und #EX-R0043-M02). Zunächst wurden die CDS von huSmad6 oder huSmad7 in den Expressionsvektor pIRES2EGFP kloniert. Um diese Klonierung zu ermöglichen, wurde zunächst eine *NheI*-Erkennungssequenz via synthetischer Oligonukleotide (Kapitel 3.2.5.3; Tabelle 2) in die *BstBI*-Erkennungssequenz der Plasmide pReceiver-M02-Smad6/Smad7 eingefügt. Dies ermöglichte die Klonierung der I-Smad CDS in den pIRES2EGFP-Vektor. Im Anschluss wurde aus diesen mutanten pIRES2EGFP-Plasmiden die Fragmente Smad6- bzw. Smad7-IRESEGFP restriktionsenzymatisch mit *NheI* und *NotI* herausgeschnitten und in den pBigT-Vektor kloniert. Im letzten Klonierungsschritt wurde mit den Enzymen *AscI* und *PacI* bzw. im Fall von Smad6 mit den Enzymen *AscI*, *PacI* und *AccI* das STOPP-CDS-IRESEGFP Fragment in den Vektor Rosa26-PA kloniert, welcher bekanntermaßen die homologen Arme für die Rekombination in den genomischen Rosa26-Locus enthält.

Nach der Elektroporation der *FseI* linearisierten Zielvektoren in ES-Zellen, anschließender positiver Selektion auf G418 Resistenz und Identifizierung positiver Klone mittels Southern-Blot Analysen (Abbildung 28 A), wurden die positiven ES-Zellklone Rosa26-Smad6\_#7 und Rosa26-Smad7\_10(2) und \_11(2) in Blastozysten injiziert. Da bereits die Injektionen der Klone Rosa26-Smad6\_#7 und Rosa26-Smad7\_10(2) in Keimbahnchimären resultierten, wurden keine weiteren Klone injiziert und im Falle von Smad7 die Tiere aus der Rosa26-Smad7\_11(2) Injektion nicht weiter analysiert. Die Rosa26-Smad6 Chimäre #16080 und Rosa26-Smad7 Chimäre #16088 wurden als Gründertiere für die Linien Rosa26-Smad6 und Rosa26-Smad7 eingesetzt. Für beide Linien konnte mittels einer Genotypierungs-PCR gezeigt werden, dass nicht nur die STOPP-Kassette, sondern wie erwartet auch die codierende Smad6 bzw. Smad7 Sequenz samt IRES-EGFP Kassette in den Rosa26-Locus integriert ist (Abbildung 28 C).

#### **4.4.2 Charakterisierung der Linien Rosa-Smad6 und Rosa-Smad7**

Wenn man potente Inhibitoren eines für die embryonalen Entwicklung absolut essentiellen Signalweges wie dem BMP-Signalweg untersucht, ist die Sensitivität des Systems auf kleinste Veränderungen ein Problem. Schon kleinste Unterschiede in der räumlichen und zeitlichen Expression dieser Inhibitoren könnten zu empfindlichen Störungen der Embryogenese führen. Deshalb bieten gerade konditionelle Systeme die Möglichkeit frühe Sterblichkeit zu überkommen.

Jedoch ist es zwingend notwendig, dass das System „dicht“ ist. Das bedeutet, es darf keine Expression des ektopischen Inhibitors ohne eine gezielte Aktivierung stattfinden.

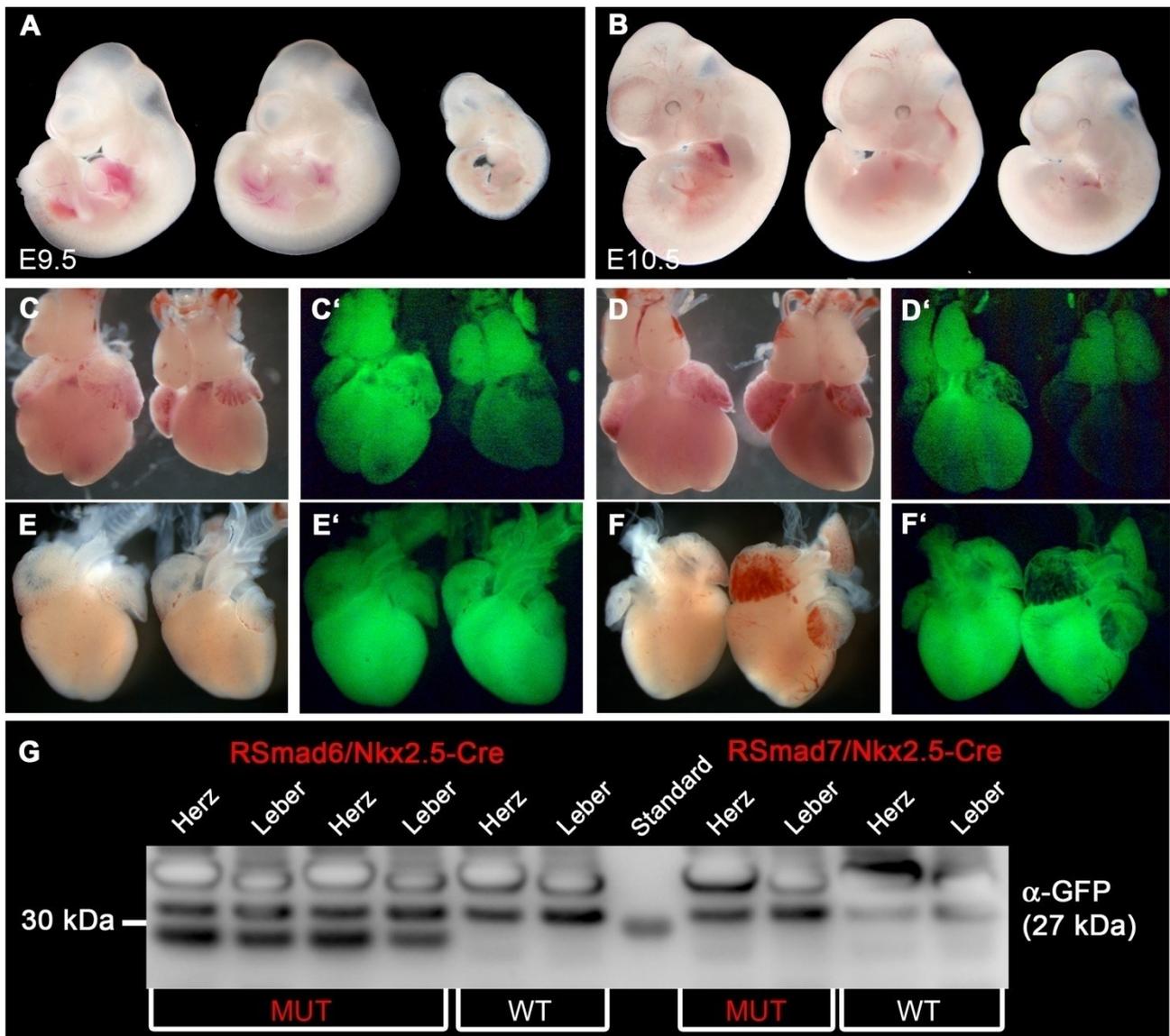
Deshalb war es im ersten Schritt der Charakterisierung der *Rosa26-Smad6/7* Mauslinien notwendig zu überprüfen, ob in den mutanten Mäusen tatsächlich keine Transkription des ektopischen *I-Smad-IRESEGFP* stattfindet. Zu diesem Zweck wurden die *Rosa26-Smad6* und *Rosa26-Smad7* Mauslinie auf Homozygotie verpaart, und untersucht, ob auch die reinerbig mutanten Mäuse *Rosa26-Smad6*<sup>-/-</sup> bzw. *Rosa26-Smad7*<sup>-/-</sup> im erwarteten Verhältnis geboren wurden.

Es zeigte sich, dass in beiden Linien die reinerbig mutanten Tiere im erwarteten Verhältnis geboren wurden, sich normal entwickelten und auch in der Lage waren, Nachkommen zu zeugen. Dies lieferte den Hinweis, dass die Expression des Transgens in beiden Linien durch die STOPP-Kassette effizient blockiert wird und keine physiologisch relevante Expression zulässt. Ob diese jedoch überhaupt vom *Rosa26*-Locus in den mutanten Mäusen möglich ist, sollten erst die Analysen der Mäuse bzw. Embryonen mit deletierter STOPP-Kassette zeigen.

#### **4.4.3 Die Rosa26-Smad6 Linie ermöglicht die konditionelle Expression von Smad6**

Ob die I-Smad Expression, getrieben vom *Rosa26*-Promotor ausreichend ist, um von physiologischer Relevanz zu sein, sollte die Analyse STOPP-deletierter transgener *Rosa26-Smad* Tiere ans Licht bringen. Die verwendeten Cre-Linien umfassten die *T(S)-Cre* Linie, welche CRE in allen mesodermalen Zellen exprimiert (Feller, Schneider et al. 2008), die *Ckmm-Cre* Linie, welche CRE in Skelettmuskeln und im perinatalen Myokard exprimiert (Bruning, Michael et al. 1998; Wang, Wilhelmsson et al. 1999) und die *Nkx2.5-Cre* Linie, welche CRE bereits in der kardialen Sichel exprimiert (Stanley, Biben et al. 2002).

BMPs sind schon während der frühen Entwicklung von essentieller Bedeutung. Sie sind beteiligt an der Gastrulation und die konstitutiven *Knock-outs* der BMPs 2 und 4 und auch die *Knock-outs* der Bmp-Rezeptoren BmpRII, Alk-2 und Alk-3 sind, aufgrund von Gastrulationsdefekten, vor dem Stadium E9.5 lethal. Die Überexpression eines I-Smads während der frühen Entwicklung sollte die für die Embryogenese essentielle BMP Signalgebung inhibieren und einen ähnlichen Phänotyp verursachen. Ob die Expression der I-Smads vom *Rosa26*-Locus einen solchen Phänotyp hervorrufen kann, wurde durch die Verpaarung der beiden Mauslinien *Rosa26-Smad6* und *Rosa26-Smad7* mit der Mauslinie *T(S)-Cre* getestet. Die *T(S)-Cre* Linie exprimiert Cre während der frühen Embryonalentwicklung (bereits vor E8) in mesodermalen Zellen und sollte hier die Deletion der STOPP-Kassette und so die ektopische I-Smad Expression in den *Rosa26-Smad* Embryonen ermöglichen.



**Abbildung 31: Rosa26-Smad – Nach der Deletion der STOPP-Kassette exprimiert nur die mutante Rosa26-Smad6 Linie ectopisches I-Smad von physiologischer Relevanz.** A,B) Die Aufnahmen zeigen links jeweils zwei wildtypische Embryonen und rechts einen mutanten E10.5 Embryo in A) bzw. E11.5 Rosa26/T(S)-Cre Embryonen in B). Die ectopische mesodermale Smad6 Expression bewirkte eine deutliche Wachstumsretardierung. C-D) E18.5 Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen samt Thymus im Hellfeld oder im Blaukanal (488 nm, C') und D') aufgenommen. Links im jeweiligen Bild ist das mutante Rosa26-Smad6<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup> Herz, rechts das wildtypische Rosa26-Smad6<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>neg</sup> zu sehen. Die mutanten Herzen weisen eine GFP-Fluoreszenz auf, die deutlich intensiver ist als die Autofluoreszenz, zu sehen in den wildtypischen Herzen. Der Thymus zeigt keine GFP-Fluoreszenz. E-F) E18.5 Rosa26-Smad7/Nkx2.5-Cre Herzen im Hellfeld oder im Blaukanal (488 nm; E') und F') aufgenommen. Links im jeweiligen Bild ist das mutante Rosa26-Smad7<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup> Herz, rechts das wildtypische Rosa26-Smad7<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>neg</sup> zu sehen. Die mutanten Herzen weisen keine von der Autofluoreszenz unterscheidbare GFP-Fluoreszenz auf. G) Immunochemische Analyse geblotteter Proteinextrakte aus mutanten (MUT) und wildtypischen (WT) Geweben der Linien Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre und Rosa26-Smad7/Nkx2.5-Cre. Der verwendete Antikörper  $\alpha$ -GFP detektiert das 27 kDa große GFP Peptid ausschließlich in den mutanten Geweben der Rosa26-Smad6<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup> Tiere, während keine GFP-Proteine in den wildtypischen Geweben oder den mutanten Geweben der Rosa26-Smad7<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup> Tiere detektierbar waren.

Es zeigte sich, dass die Verpaarung  $Rosa26-Smad6^{+/-} \times T(S)-Cre^{pos}$  keine doppelt heterozygoten Nachkommen ( $Rosa26-Smad6^{+/-}/T(S)-Cre^{pos}$ ) ergab: In vier Würfen, von insgesamt 30 Jungtieren, fand sich kein doppelt heterozygoten Jungtier, obwohl 25% der Tiere für beide Transgene hätte positiv sein müssen. Hingegen die Verpaarung  $Rosa26-Smad7^{+/-} \times T(S)-Cre^{pos}$  lieferte doppelt heterozygote Tiere ( $Rosa26-Smad7^{+/-}/T(S)-Cre^{pos}$ ) im erwarteten Verhältnis.

Das Ausbleiben doppelt heterozygoter  $Rosa26-Smad6^{+/-}/T(S)-Cre^{pos}$  Tiere legte den Schluss nahe, dass die mesodermale SMAD6 Überexpression zu einem vorzeitigen Tod der Embryonen *in utero* führte. Im Folgenden wurde deshalb ermittelt, ob und wann die mesodermale SMAD6 Expression zur embryonalen Letalität führt. Die Analyse verschiedener Embryonalstadien zeigte, dass die Embryonen um E10.5 sterben, erkennbar an der deutlichen Wachstumsverzögerung und teilweise einsetzenden Resorption durch den mütterlichen Organismus (Abbildung 31 A,B).

Dieses Ergebnis zeigt, dass nach der Deletion der Stoppkassette die Expression des humanen *Smad6* vom *Rosa26*-Locus im Modelltier Maus ausreichend ist, um von physiologischer Relevanz zu sein. Somit ist die *Rosa26-Smad6* Line gut für die Analyse der BMP Funktionen in räumlich und zeitlich definierten Stadien der Embryogenese oder Adoleszenz geeignet.

#### **4.4.4 Der Rosa26-Promotor erlaubt die Expression von Smad6 in physiologisch relevanten Mengen**

Da es Ziel dieser Arbeit war, die Bmp-Signalgebung und ihre Bedeutung für die Herzentwicklung und Homöostase näher zu beleuchten, waren beide *Rosa26-Smad* Linien parallel mit den *Cre*-Linien *Ckmm-Cre* und *Nkx2.5-Cre* verpaart worden. Durch die räumlich und zeitlich definierte kardiale ektopische Expression der Inhibitoren sollte analysiert werden wie empfindlich das kardiovaskuläre System auf Schwankungen der BMP-Signalstärke reagiert.

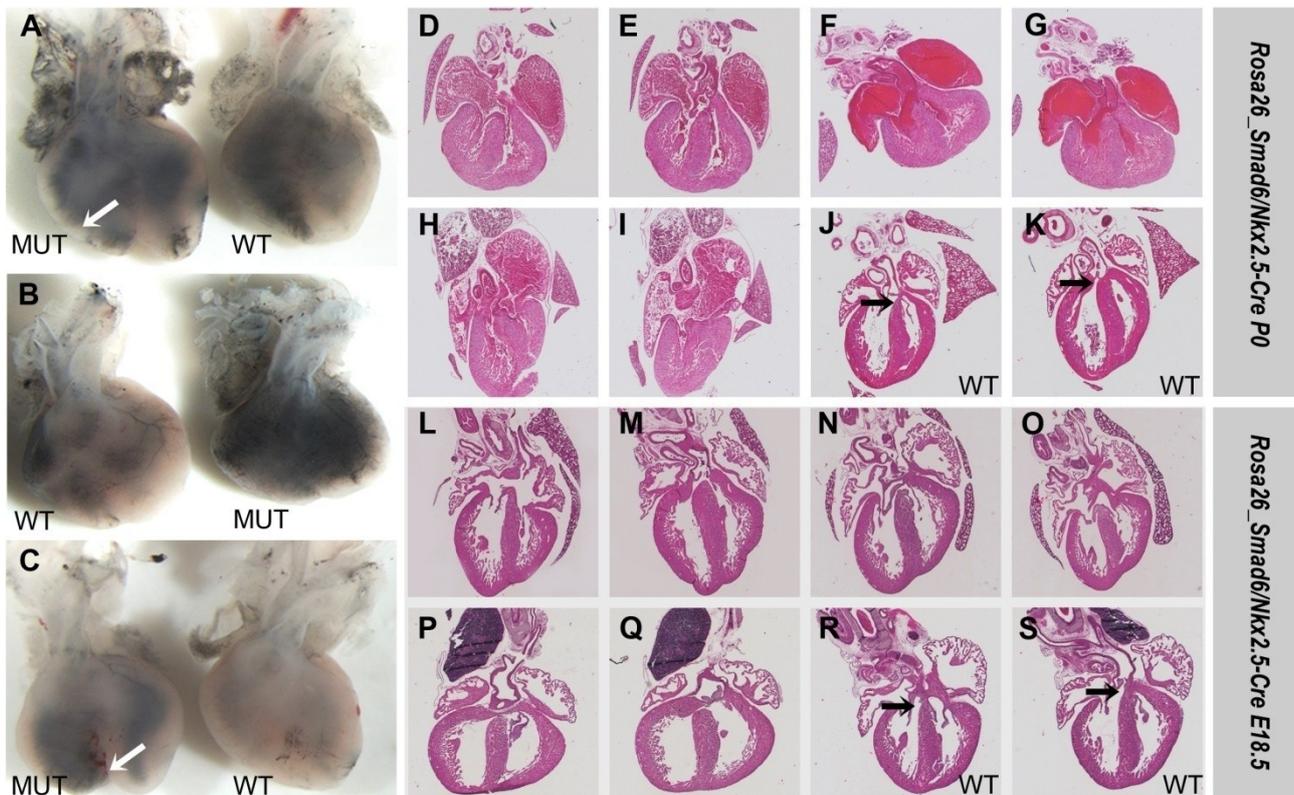
In der Nachkommenschaft aus den Verpaarungen der *Rosa26-Smad* Linien mit der *Ckmm-Cre* Linie waren die mutanten Jungtiere  $Rosa26-Smad6^{+/-}/Ckmm-Cre^{pos}$  oder  $Rosa26-Smad7^{+/-}/Ckmm-Cre^{pos}$  im nach Mendel erwarteten Verhältnis vertreten. Anderes ergab die Analyse der Jungtiere aus den Verpaarungen der *Rosa26-Smad* Linien mit der *Nkx2.5-Cre* Linie. Die Genotypisierung zeigte, dass sich keine mutanten  $Rosa26-Smad6^{+/-}/Nkx2.5-Cre^{pos}$ , wohl aber  $Rosa26-Smad7^{+/-}/Nkx2.5-Cre^{pos}$  Tiere unter den analysierten Jungtieren befanden. Somit induzierte die kardiale *Smad6* Überexpression während der frühen Embryonalentwicklung einen lethalen Phänotyp. Hingegen die *Ckmm-Cre* vermittelte *Smad6* Überexpression im perinatalen Herzen hatte keinen Einfluss auf die Sterblichkeit der Jungtiere. Langzeitbeobachtungen zeigten sogar, dass die mutanten *Rosa26-Smad6/Ckmm-Tiere* ein Alter von 2 Jahren erreichen konnten.

Wie auch schon von den Verpaarungen mit der T(S)-Cre Linie ersichtlich war, war es nicht möglich, durch das Einkreuzen anderer Cre-Linien physiologisch relevante *Smad7* Expressionslevel vom *Rosa26*-Locus zu erzielen. Zwar ist auf genomischer Ebene gezeigt worden, dass das *Smad7*-IRESGFP Transgen, genau wie das *Smad6*-IRESGFP Transgen, wie gewünscht in den *Rosa26*-Locus integriert war (Abbildung 28), doch fehlte bisher die Bestätigung, dass es tatsächlich nach der Deletion der STOPP-Kassette exprimiert wird. Um die Expression zu untersuchen, wurden zunächst E18.5 Herzen der Linien *Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre* und *Rosa26-Smad7/Nkx2.5-Cre* hinsichtlich einer GFP-Fluoreszenz vergleichend untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 31 C bis D zu sehen. In der *Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre* Linie zeigt sich, dass nur die mutanten *Rosa26-Smad6<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup>* Tiere, nicht aber die wildtypischen Tiere *Rosa26-Smad6<sup>+/+</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup>* oder *Smad6<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>neg</sup>*, eine GFP-Fluoreszenz aufweisen. In den mutanten *Rosa26-Smad7<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup>* Herzen hingegen, war keine vergleichbare GFP-Fluoreszenz detektierbar. Auch sensitivere immunochemische Nachweisverfahren zeigten, dass GFP in den mutanten *Rosa26-Smad6<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup>*, nicht aber in den mutanten *Rosa26-Smad7<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup>* Herzen detektierbar ist (Abbildung 31 G).

Nur die konditionelle *Rosa26-Smad6* Linie exprimiert detektierbare und, wie die lethalen Phänotypen der Hybridlinien *Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre* und *Rosa26-Smad6/T(S)-Cre* zeigen, physiologisch relevante SMAD6 Level.

#### **4.4.5 Ektopische kardiale *Smad6* Expression induziert Septumdefekte und postnatale Lethalität**

Die kardiale *Nkx2.5-Cre* vermittelte *Rosa26-Smad6* Expression bewirkte einen lethalen Phänotyp. Innerhalb der Nachkommenschaft der Hybridverpaarungen *Rosa26-Smad6* x *Nkx2.5-Cre* fanden sich nie mutante *Rosa26-Smad6<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup>* Jungtiere. Im Folgenden wurde systematisch überprüft, welcher Zeitpunkt in der Embryonalentwicklung oder postnatalen Entwicklung der letzte ist, an dem diese Tiere im Mendelschen Verhältnis vertreten sind. Am postnatale Tag 0 (P0), bzw. gleich nach der Geburt, fanden sich diese Genotypen im erwarteten Verhältnis. Jedoch ergaben die Beobachtungen an den Jungtieren und die anschließende Bestimmung des Genotyps mittels PCR-Analysen, dass die mutanten *Smad6<sup>+/-</sup>/Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup>* Tiere innerhalb einer Stunde nach der Geburt zyanotisch wurden und verstarben.



**Abbildung 32: Septumdefekte in Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre mutanten Herzen.** A-C) Aufnahme mutanter (MUT) und wildtypischer (WT) Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre E18.5 Herzen, die mit Tinte injiziert wurden. Zur besseren Beurteilung der abgehenden Gefäße sind die Atrien entfernt worden. Es besteht kein Unterschied in der Morphologie abgehender Gefäße zwischen WT und MUT. Ein Teil der mutanten Herzen zeichnet sich jedoch durch eine Furche im Apex des Herzens aus (weiße Pfeile). D-G) zeigen H&E gefärbte coronale Paraffinschnitte drei mutanter Smad6<sup>+/-</sup>Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup> Herzen am Tag P0, die alle einen ventrikulären Septumdefekt (schwarze Pfeile) aufweisen, der in wildtypischen Geschwistertieren, gezeigt in J) und K), nie zu beobachten war. Da die Herzen erst nach dem Tod der Jungtiere isoliert worden sind, enthalten sie noch großen Mengen an Blut. In E), F) und G) ist außerdem eine Misspositionierung der Aorta (reitende Aorta) zu sehen. In den Abbildungen L-Q) sind die gefärbten Schnitte mutanter E18.5 Herzen zu sehen, die genau wie die P0 Herzen VSD aufweisen, die auch im E18.5 wildtypischen Herzen, R) und S), nie zu beobachten waren. Das mutante Herz in L) und M) sowie das mutante Herz in P) und Q) zeichnet sich darüber hinaus durch eine reitende Aorta aus. Andere Strukturen des mutanten Herzens zeigen im Vergleich zum Wildtyp keinerlei Auffälligkeiten.

Im nächsten Schritt sollte nun die Todesursache festgestellt werden. Da *Nkx2.5-Cre* vornehmlich im embryonalen Herzen exprimiert wird und auch die Zyanose vor allem auf eine Sauerstoffunterversorgung hinwies, die in erster Linie entweder auf eine Herz- oder eine Lungenfehlfunktion hindeutete, wurden E18.5 Embryonen und ihren Herzen präpariert. Die makroskopische Untersuchung der Herzen ergab, dass sie äußerlich eher unauffällig waren. Lediglich einige der Herzen wiesen am Apex des Herzens eine Furche auf (Abbildung 32 A und C). Die Herzen wurden außerdem mit Tinte injiziert, um vaskuläre Ein- und Abgänge besser sichtbar zu machen. Jedoch konnten keine Unterschiede zwischen Wildtypen und Mutanten festgestellt werden. Aortenbogen und Lungenstamm waren separiert. Somit schied die Nicht-Septierung des

Ausflusstraktes in aufsteigende Aorta und Lungenstamm, wie sie beispielsweise in Mäusen mit *Bmpr2 Knock-outs* zu beobachten ist (Delot, Bahamonde et al. 2003), als Ursache für die Zyanose aus.

Im Folgenden wurden serielle Paraffinschnitte mutanter und wildtypischer Rosa-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen angefertigt und H&E gefärbt, um die Morphologie der E18.5 Herzen detaillierter untersuchen zu können. Hierbei fiel auf, dass die Herzen der Smad6<sup>+/-</sup>Nkx2.5-Cre<sup>pos</sup> Septumdefekte aufwiesen. Oft ging dies mit einer reitenden Aorta einher. Die in der linken Herzkammer entspringende Hauptschlagader ist dabei nach rechts verlagert, reitet somit über dem Loch an der Herzscheidewand und erhält dadurch aus beiden Herzkammern Blut. Alle anderen kardialen Strukturen wiesen, im Vergleich mit den wildtypischen Geschwisterherzen, keine Auffälligkeiten auf.

Somit bewirkt die ektopische Expression von SMAD6 in Nkx2.5-Cre positiven Zellen des Herzens Septumdefekte, zum Teil begleitet durch eine reitende Aorta, während andere Strukturen des Herzens morphologisch unbeeinflusst bleiben. Diese Septumdefekte dürften für den vorzeitigen Tod der Jungtiere, der durch eine vorangehende Zyanose gekennzeichnet ist, ursächlich sein.

#### **4.4.6 Microarray gestützte Untersuchungen des Transkriptoms identifizierten potentielle BMP/Smad sensitive Targets**

In dieser Arbeit ist erstmals die kardiale Wirkung des Inhibitors SMAD6 *in vivo* gezeigt worden. Die Phänotyp-Analyse der *Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre* Tiere ergab, dass die Mutante an kardialen Septumdefekten leidet. Diese sind vermutlich ursächlich für die Sterblichkeit kurz nach der Geburt, da die Tiere nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. Doch nicht allein die phänotypischen Konsequenzen einer ektopischen Smad6 Expression im Herzen interessierten, sondern vielmehr noch die transkriptionellen Veränderungen, die in ihrer Summe für den Phänotyp verantwortlich sind. Transkriptomanalysen sollten die Verknüpfung zwischen dem beobachteten Phänotyp und der BMP-Signalgebung sichtbar machen und bisher unbekannte Regulationsmechanismen entziffern. Deshalb wurde mithilfe eines Microarray-gestützten Experiments (Kapitel 3.2.10) das Transkriptom der mutanten und wildtypischen E18.5 Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen (Wurfgeschwister) vergleichend analysiert. Als Einschlusskriterien wurden die Signifikanzwerte  $p < 0.05$  und die Faktoren  $\geq 1.33$  als Maß der Änderung (Fold Change, *engl.*) gewählt. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse übersichtlich zusammengestellt.

Es wurden 165 RNAs gefunden, die in mutanten Herzen (n=3) mindestens um den Faktor 1.33 schwächer exprimiert sind als im Wildtyp (n=3), und somit durch SMAD6 negativ reguliert scheinen. Von diesen RNAs codieren jedoch nur 62 für bekannte, bei SwissProt

(<http://expasy.org/sprot/>) annotierte Proteine. Laut der Unigene-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) werden nur 28 der annotierten Protein-codierenden RNAs im Herzen exprimiert (Tabelle 11). Etwa ein Drittel der negativ-regulierten Gene codiert für MicroRNAs (Tabelle 12). Diese hoch konservierten, nicht codierenden RNAs spielen eine wichtige Rolle in der Genregulation. Hier greifen sie hochspezifisch auf der post-transkriptionellen Ebene in das Gen-Silencing ein (Krol, Loedige et al. 2010). Die am stärksten regulierten MicroRNAs liegen in Clustern vor und haben zum Teil überlappende Transkripte, die in der MicroArray-Analyse jedoch als nicht reguliert vorgefunden worden sind.

**Tabelle 10: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse, gewonnen in den Microarray-Analysen der ektopisch Smad6 exprimierenden Herzen.**

|            |   |
|------------|---|
| <b>165</b> | <b>annotierte RNAs wurden in den Mutanten mindestens um Faktor 1.33 schwächer exprimiert als in den Wildtypen (p&lt;0.05)</b> |
| <b>51</b>  | davon sind MicroRNAs.   |
| <b>29</b>  | sind andere nicht-codierende RNAs (t-RNA, snRNA, snoRNA, rRNA) oder nicht annotierte cDNAs (Genescan, Pseudogene).            |
| <b>62</b>  | der RNAs codieren SwissProt annotiert Proteine  |
| <b>28</b>  | der Protein-codierenden RNAs werden laut Unigene im Herzen exprimiert.  |
| <b>73</b>  | <b>annotierte RNAs wurden in den Mutanten mindestens um Faktor 1.33 stärker exprimiert als in den Wildtypen (p&lt;0.05)</b>   |
| <b>2</b>   | davon sind MicroRNAs.   |
| <b>19</b>  | sind andere nicht-codierende RNAs (t-RNA, snRNA, snoRNA, rRNA) oder nicht annotierte cDNAs (Genescan, Pseudogene).            |
| <b>40</b>  | der RNAs codieren SwissProt annotiert Proteine  |
| <b>13</b>  | der Protein-codierenden RNAs werden laut Unigene im Herzen exprimiert.  |

**Tabelle 11: Laut Unigene kardial exprimierte, in mutanten Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen negativ regulierte Gene.** Angegeben wurde das Maß der negativen (-) Regulation (Fold Change), die Unsicherheitswahrscheinlichkeit (p-Wert), die mRNA-Referenzsequenzen der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) sowie Namen und Symbole der negativ regulierten mRNAs.

| Fold Change | p-Wert | Referenz Sequenz | Symbol          | Name  |
|-------------|--------|------------------|-----------------|---|
| - 2,78      | 0,0008 | NM_007498        | <b>Atf3</b>     | activating transcription factor 3               |
| - 2,63      | 0,0035 | NM_010444        | <b>Nr4a1</b>    | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 |
| - 2,22      | 0,0014 | NM_007570        | <b>Btg2</b>     | B-cell translocation gene 2, anti-proliferative |
| - 2,03      | 0,0014 | NM_013642        | <b>Dusp1</b>    | dual specificity phosphatase 1                  |
| - 2,02      | 0,0008 | NM_015786        | <b>Hist1h1c</b> | histone cluster 1, H1c                          |

| Fold Change | p-Wert | Referenz Sequenz | Symbol         | Name  |
|-------------|--------|------------------|----------------|---|
| - 1,97      | 0,0067 | NM_010516        | <b>Cyr61</b>   | cysteine rich protein 61  |
| - 1,78      | 0,0000 | NM_007913        | <b>Egr1</b>    | early growth response 1   |
| - 1,71      | 0,0023 | AK047968         | <b>Zdhhc20</b> | zinc finger, DHHC domain containing 20  |
| - 1,70      | 0,0022 | NM_010591        | <b>Jun</b>     | Jun oncogene  |
| - 1,59      | 0,0145 | AF357416         | <b>Ncl</b>     | nucleolin   |
| - 1,59      | 0,0008 | NM_010217        | <b>Ctgf</b>    | connective tissue growth factor   |
| - 1,59      | 0,0004 | NM_026840        | <b>Pdgfr1</b>  | platelet-derived growth factor receptor-like                                    |
| - 1,58      | 0,0175 | NM_011817        | <b>Gadd45g</b> | growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma                                 |
| - 1,54      | 0,0082 | NM_001081298     | <b>Lphn2</b>   | latrophilin 2   |
| - 1,52      | 0,0015 | NM_001161845     | <b>Sgk1</b>    | serum/glucocorticoid regulated kinase 1   |
| - 1,51      | 0,0120 | NM_001042591     | <b>Arrdc3</b>  | arrestin domain containing 3  |
| - 1,51      | 0,0230 | NM_010638        | <b>Klf9</b>    | Kruppel-like factor 9   |
| - 1,47      | 0,0327 | NM_153287        | <b>Csrnp1</b>  | cysteine-serine-rich nuclear protein 1  |
| - 1,46      | 0,0081 | NM_146242        | <b>Lrrc10</b>  | leucine rich repeat containing 10   |
| - 1,45      | 0,0450 | NM_027890        | <b>Susd2</b>   | sushi domain containing 2   |
| - 1,43      | 0,0082 | AF357400         | <b>Tpt1</b>    | tumor protein, translationally-controlled 1                                     |
| - 1,43      | 0,0163 | NM_175456        | <b>Abra</b>    | actin-binding Rho activating protein  |
| - 1,39      | 0,0072 | NM_145158        | <b>Emilin2</b> | elastin microfibril interfacier 2   |
| - 1,39      | 0,0459 | NM_012010        | <b>Eif2s3x</b> | eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene X-linked |
| - 1,38      | 0,0212 | NM_010499        | <b>Ier2</b>    | immediate early response 2  |
| - 1,36      | 0,0363 | NM_176920        | <b>Lrtm1</b>   | leucine-rich repeats and transmembrane domains 1                                |
| - 1,35      | 0,0175 | NM_011580        | <b>Thbs1</b>   | thrombospondin 1  |
| - 1,34      | 0,0344 | BC083148         | <b>Rpl13</b>   | ribosomal protein L13   |

Die ektopische Smad6 Expression während der embryonalen Herzentwicklung hat darüber hinaus die positive Regulation einiger Gene bewirkt. Insgesamt 73 Gene wurden, in den zuvor gesetzten Grenzen ( $p < 0.05$  und Fold Change  $\geq 1.33$ ), verstärkt in den mutanten Herzen transkribiert. Unter ihnen befanden sich nur zwei MicroRNAs. Über die Hälfte der verstärkt exprimierten Gene codiert für in der SwissProt-Datenbank annotierte Proteine. Der von der Affimetrix-Software durchgeführte Abgleich mit der Unigene-Datenbank zeigte, dass nur eine Minderheit, nämlich 13 annotierte Protein-codierende Gene, bekanntermaßen im Herzen exprimiert wird (Tabelle 13).

**Tabelle 12: Smad6 regulierte MicroRNAs.** Aufgelistet sind MicroRNAs, die mindestens um den Faktor 1.33 in den mutanten Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen reguliert ( $p < 0.05$ ) waren und auf dem Gen-CHIP eine relative Signalstärke  $> 50$  aufwiesen. Als zusätzliche Information ist die genomische Lokalisation (Chromosom und relative Lage zu anderen MicroRNAs) der jeweiligen MicroRNAs angegeben worden. MicroRNAs, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden (Abstand  $< 10$  kb), sprich zusammen in einem Cluster liegen, sind farblich markiert.

| Fold change | p-Wert | MicroRNA           | Chromosom | Relative genomische Lokalisation                   |
|-------------|--------|--------------------|-----------|--|
| - 3,60      | 0,0108 | <b>mmu-mir-322</b> | chrX      | intergenisch                                       |
| - 3,36      | 0,0000 | <b>mmu-mir-143</b> | chr18     | Liegt in einem Cluster mit mmu-mir-145, intergenic |

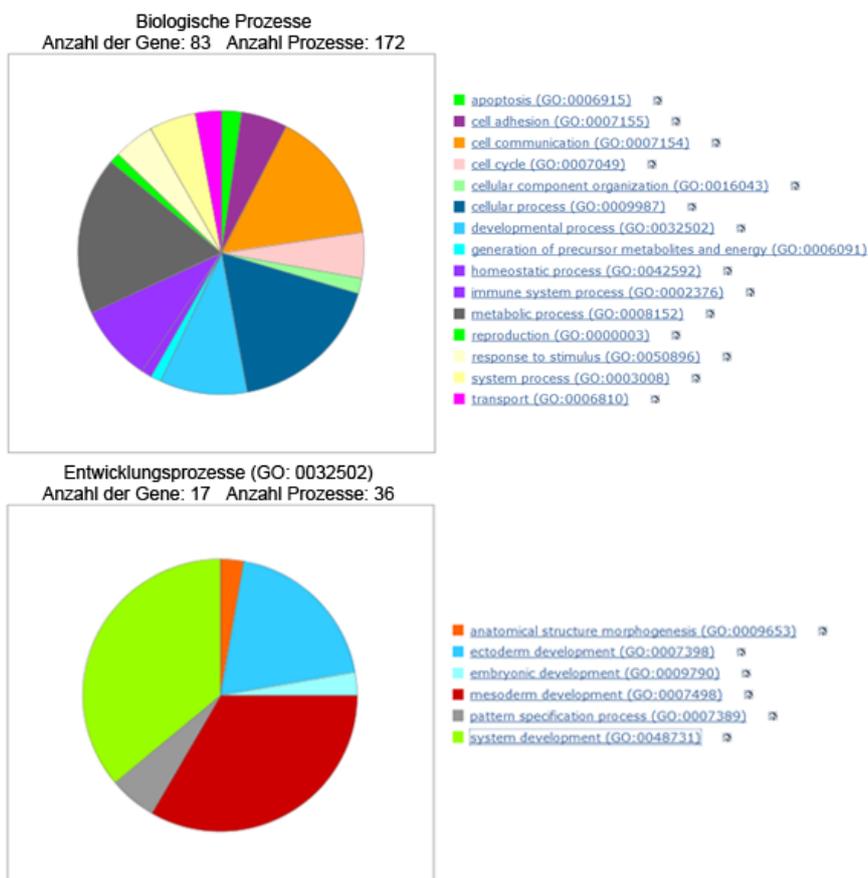
| Fold change | p-Wert | MicroRNA              | Chromosom | Relative genomische Lokalisation   |
|-------------|--------|-----------------------|-----------|--|
| - 3,25      | 0,0019 | <b>mmu-mir-23b</b>    | chr13     | Liegt in einem Cluster mit mmu-mir 27b und mmu-mir 24-1, überlappende Transkripte OTTMUST00000076332 ; ENSMUST00000060660 ; ENSMUST00000159152 ; ENSMUST0000002191 |
| - 3,01      | 0,0000 | <b>mmu-mir-145</b>    | chr18     | Liegt in einem Cluster mit mmu-mir-143, intergenic   |
| - 2,89      | 0,0003 | <b>mmu-mir-27a</b>    | chr8      | Liegt in einem Cluster mit mmu-mir-23a, intergenisch   |
| - 2,87      | 0,0002 | <b>mmu-mir-208a</b>   | chr14     | Überlappendes Transkript Myh6 ( $\alpha$ MHC)  |
| - 2,49      | 0,0024 | <b>mmu-mir-27b</b>    | chr13     | Liegt in einem Cluster mit mmu-mir 23b und mmu-mir 24-1, überlappende Transkripte OTTMUST00000076332 ; ENSMUST00000060660 ; ENSMUST00000159152 ; ENSMUST0000002191 |
| - 2,46      | 0,0010 | <b>mmu-mir-23a</b>    | chr8      | Liegt in einem Cluster mit mmu-mir-27a, intergenisch   |
| - 2,41      | 0,0044 | <b>mmu-mir-99a</b>    | chr16     | Liegt in einem Cluster mit mmu-let-7c-1, Überlappendes Transkript ENSMUST0000011423_1  |
| - 2,39      | 0,0025 | <b>mmu-let-7c-1</b>   | chr16     | Liegt in einem Cluster mit mmu-mir-99a, Überlappendes Transkript ENSMUST0000011423_1   |
| - 2,30      | 0,0064 | <b>mmu-mir-92a-1</b>  | chr14     | Überlappendes Transkript Mirhg1  |
| - 2,29      | 0,0036 | <b>mmu-mir-30e</b>    | chr4      | Überlappendes Transkript Nfyc  |
| - 2,17      | 0,0007 | <b>mmu-mir-24-1</b>   | chr13     | Liegt in einem Cluster mit mmu-mir 27b und mmu-mir 23-b, überlappende Transkripte OTTMUST00000076332 ; ENSMUST00000060660 ; ENSMUST00000159152 ; ENSMUST0000002191 |
| - 2,08      | 0,0105 | <b>mmu-mir-1-1</b>    | chr2      | intergenisch   |
| - 2,06      | 0,0012 | <b>mmu-mir-30a</b>    | chr1      | intergenisch   |
| - 1,96      | 0,0004 | <b>mmu-let-7d</b>     | chr13     | intergenisch   |
| - 1,90      | 0,0094 | <b>mmu-mir-126</b>    | chr2      | Überlappendes Transkript Egfl7   |
| - 1,80      | 0,0047 | <b>mmu-mir-133a-1</b> | chr18     |  |
| - 1,73      | 0,0032 | <b>mmu-mir-181b-1</b> | chr1      | intergenisch   |
| - 1,48      | 0,0053 | <b>Dyn3os</b>         | chr1      | Dynamamin 3, opposite strand (enthält mmu-mir199a-2 und 214)   |
| - 1,43      | 0,0419 | <b>mmu-mir-329</b>    | chr12     | intergenisch   |
| - 1,40      | 0,0141 | <b>mmu-mir-677</b>    | chr10     | Überlappendes Transkript Atp5b   |
| - 1,40      | 0,0088 | <b>mmu-mir-181b-2</b> | chr2      | Überlappendes Transkript Nr6a1   |
| - 1,39      | 0,0105 | <b>mmu-mir-487b</b>   | chr12     | Liegt in einem Cluster mit mmu-mir-382, intergenisch   |
| - 1,38      | 0,0251 | <b>mmu-mir-382</b>    | chr12     | Liegt in einem Cluster mit mmu-mir-487b, intergenisch  |
| - 1,37      | 0,0010 | <b>mmu-mir-342</b>    | chr12     | Überlappendes Transkript Evl-2   |

**Tabelle 13: Laut Unigene kardial exprimierte, in mutanten Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen positiv regulierte Gene.** Angegeben wurde das Maß der positiven Regulation (Fold-Change), die Unsicherheitswahrscheinlichkeit (p), die mRNA-Referenzsequenzen der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) sowie Namen und Symbole der positiv regulierten mRNAs.

| Fold Change | p-Wert | Referenz Sequenz | Symbol         | Name   |
|-------------|--------|------------------|----------------|--|
| 1,86        | 0,0289 | NM_029726        | <b>Trdn</b>    | triadin  |
| 1,57        | 0,0036 | NM_025374        | <b>Glo1</b>    | glyoxalase 1   |
| 1,56        | 0,0249 | NM_025677        | <b>Tsen15</b>  | tRNA splicing endonuclease 15 homolog (S. cerevisiae)            |
| 1,54        | 0,0046 | AF357383         | <b>Ipo7</b>    | importin 7   |
| 1,46        | 0,0205 | NM_026788        | <b>Mthfd2l</b> | methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2-like |

| Fold Change | p-Wert | Referenz Sequenz | Symbol             | Name  |
|-------------|--------|------------------|--------------------|---|
| 1,40        | 0,0272 | EF651836         | ENSMUSG00000079376 | predicted gene, ENSMUSG00000079376                    |
| 1,39        | 0,0442 | NM_007796        | Ctla2a             | cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha     |
| 1,38        | 0,0008 | NM_001039552     | 2210404J11Rik      | RIKEN cDNA 2210404J11 gene                            |
| 1,34        | 0,0191 | NM_013755        | Gyg                | glycogenin  |
| 1,34        | 0,0014 | NM_009994        | Cyp1b1             | cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1 |
| 1,34        | 0,0435 | NM_001024712     | 544988             | predicted gene, 544988                                |
| 1,33        | 0,0208 | AF357355         | Rian               | RNA imprinted and accumulated in nucleus              |
| 1,33        | 0,0131 | NM_001024618     | Xirp2              | xin actin-binding repeat containing 2                 |

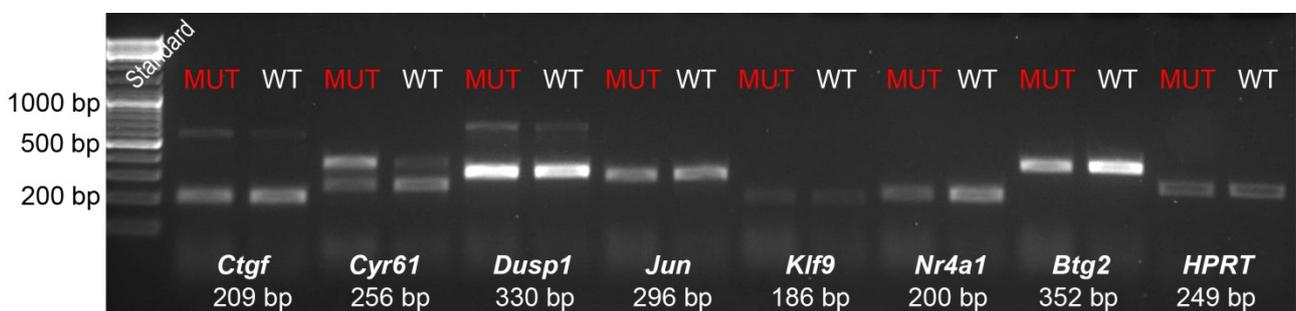
Um erste Aussagen über die Funktion der gefundenen Gene beziehungsweise ihrer Produkte zu treffen, konnten in einigen Fällen die GO Annotationen verwendet werden. Von den 102 SwissProt gelisteten Proteinen konnten 83 einer oder mehreren GO Annotationen zugeordnet werden. In Abbildung 33 ist die relative Beteiligung der in mutanten und wildtypischen Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen differentiell exprimierten Gene an biologischen Prozessen graphisch dargestellt. Von den 83 Genen sind beispielsweise 17 (20.5 %) an entwicklungsbiologischen Prozessen wie Mesoderm- oder Ektodermentwicklung beteiligt sind.



**Abbildung 33: Relative Beteiligung der in Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen differentiell exprimierten Gene an biologischen Prozessen.** 83 der 101 SwissProt annotierten Gene konnten insgesamt 172 GO annotierten biologischen Prozessen zugeordnet werden. Unter ihnen befanden sich wiederum 17 Gene, die 36 entwicklungsbiologischen Prozessen zugeordnet werden konnten. Die Tortendiagramme wurden Web-basiert erstellt, mithilfe des PANTHER Klassifikation Systems (Thomas, Campbell et al. 2003; Mi, Dong et al. 2010).

Um zu überprüfen, ob die ermittelten Daten auch mithilfe von RT-PCR Analysen reproduzierbar sind, wurde die Expression ausgewählter Kandidaten im embryonalen wildtypischen und mutanten E18.5 Rosa26-Smad6 Herzen mithilfe von RT-PCRs überprüft. Da in diesem Projekt die negative Regulation von BMP/Smad Signalgebung und ihrer Zielgene durch SMAD6 im Focus stehen sollte, wurde für diesen ersten Schritt zunächst nur Gene ausgewählt, die laut der Microarray-Daten in mutanten Herzen negativ reguliert waren. So wurden die Gene *Ctgf*, *Cyr61*, *Dusp1*, *Jun*, *Klf9*, *Nr4a1* und *Btg2* ausgewählt. Die Auswertung der GO Annotationen hatte ergeben, dass *Ctgf*, *Cyr61*, *Dusp1*, *Klf9* und *Nr4a1* zu den 20.5% der annotierten, Protein-codierenden RNAs gehörten, die an entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt sind und somit an der Ausbildung der ventrikulären Septumdefekte in den mutanten Herzen beteiligt sein könnten. Eine manuelle Literaturrecherche hatte außerdem ergeben, dass *Jun* und *Btg2* ebenfalls sehr interessante Kandidaten sein könnten. Der Verlust von *Jun* verursacht Missbildungen des Ausflusstraktes (*Eferl, Sabilia et al. 1999*), so wie sie beispielsweise auch in verschiedenen *Bmp* oder *Bmp*-Rezeptor Knock-outs zu finden sind (Tabelle 1). *Btg2* Knock-out Mäuse weisen posterior-homöotische Transformationen der axialen Wirbel auf und biochemische Evidenzen deuten auf eine Interaktion zwischen *Btg2* und *Smad1/5/8* hin (*Park, Lee et al. 2004*).

Die Abbildung 34 zeigt das Ergebnis einer semiquantitativen RT-PCR Analyse von RNAs, isoliert aus einem mutanten und einem wildtypischen Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre E18.5 Herzen. Hier ist zu sehen, dass sich die Ergebnisse der Microarray-Analyse für *Ctgf*, *Cyr61*, *Nr4a1* und *Btg2* bestätigen. Die vier Gene werden in den mutanten Herzen schwächer exprimiert. Die RT-PCR Ergebnisse für *DUSP1*, *Klf9* und *Jun* waren nicht eindeutig und weitere RT-PCR Analysen wären notwendig.



**Abbildung 34: RT-PCR Analyse E18.5 Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen hinsichtlich der mittels Mircoarray ermittelten Smad6-sensitiven Kandidaten.** Gelfoto der RT-PCR Analyse eines wildtypischen (WT) und eines mutanten (MUT) E18.5 Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen. Die Transkription der Kandidaten *CTGF*, *Cyr61*, *Dusp1*, *Jun*, *Klf9*, *Nr4a1* und *Btg2* in WT und MUT Herzen wurden verglichen, indem sie auf die Transkription des Haushaltsgens *Hprt* normalisiert wurde.

## 5 DISKUSSION:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Etablierung von genetischen *in vivo* Modellsystemen neue Untersuchungsmöglichkeiten geschaffen und die Bedeutung der BMP-Signalgebung im Herzen näher beleuchtet. Die generierten *in vivo* Modelle erlauben, die Funktion von BMP10 und SMAD6 innerhalb ihrer natürlichen und geordneten Umgebung zu untersuchen, was möglicherweise dem entscheidenden Schritt in Richtung einer therapeutischen Anwendung der untersuchten Proteine entscheidend Vorschub leisten könnte.

### 5.1 *Bmp10-lacZ* transgene Linien machen neue kardiale und extrakardiale Expressionsdomänen sichtbar

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch die Generierung BAC transgener *Bmp10-lacZ* Linien, und an ihnen vorgenommenen *Bmp10* Expressionsanalysen, die anschließenden *Bmp10* Funktionsanalysen und die Interpretation ihrer Ergebnisse optimiert. Die Kenntnis der genauen räumlichen und zeitlichen Koordinaten, die das Vorhandensein eines Proteins beschreiben, bringen Erkenntnisse über mögliche Ziele, Interaktionspartner und Funktionen des betrachteten Faktors. Sie ist die Grundlage für Funktionsverlustanalysen und deren Auswertung, da erst die Kenntnis des exakten Expressionsprofils die gerichtete Gen-Inaktivierung ermöglicht.

Die Verwendung von BACs für die Transgenese führt in der Regel zu einer Expression des Transgens, die der endogenen Expression des homologen Locus gleicht, da die große Insertgröße zumeist die Beinhaltung aller regulatorischen Elemente garantiert und Positionseffekte vermindert (Chandler, Chandler *et al.* 2007). Die Pronukleus-Injektion des *Bmp10*-BACs hat vier Gründertiere hervorgebracht, deren Nachkommen alle das Transgen exprimierten (Kapitel 4.1.1). Die Tatsache, dass ein fünftes Tier das Transgen nicht exprimierte, kann verschiedene Ursachen haben. Eine unvollständige Integration des BACs und der einhergehende Verlust regulatorischer Elemente, oder die Integration in einen „stummen“ Locus, der die Expression-treibenden Eigenschaften der integrierten regulatorischen Elemente überlagert, könnten die Expression des *Bmp10-lacZ* Transgens verhindern.

Die Verwendung des *lacZ*-Gens als Reporter bzw. seines Produktes der  $\beta$ -Galaktosidase ermöglichte eine sensitive Detektion des *Bmp10-lacZ* Transgens in den vier generierten *Bmp10-lacZ* Linien. Es zeigte sich, dass *Bmp10* deutlich breiter exprimiert wird, als bisher angenommen. Der Wachstumsfaktor war insofern immer im Focus des Interesses, da es das einzige *Bmp*-Familienmitglied zu sein schien, das Herz-spezifisch exprimiert wird. Besonders während der Adoleszenz schien es ein äußerst restriktives Expressionsmuster aufzuweisen, da es ausschließlich

im Herzen und dort nur im rechten Atrium exprimiert schien (Kapitel 2.2.3). Doch die Analyse der Bmp10 Expression mithilfe der B10lacZ transgenen Linien zeichnet ein neues Bild und bietet Raum für neue Spekulationen über die Funktion und Wirkungsweise von BMP10. Sowohl während der Embryonalentwicklung, als auch während der Adoleszenz.

### **5.1.1 BMP10 wird im Endokard des Herzens exprimiert**

Bereits die Analyse der Bmp10 Expression im adulten Herz mithilfe von vier unabhängigen B10lacZ transgenen Linien hat eine neue, bisher unbekannte Expressionsdomäne sichtbar gemacht. Sowohl die *whole mount* LacZ-Färbungen, als auch die Färbungen von Kryoschnitten transgener Herzen legen nahe, dass neben der atrialen Bmp10 Expressionsdomäne eine weitere endokardiale Expressionsdomäne in beiden Ventrikeln existiert (Kapitel 4.1.2). Dies kann durch die Lokalisation der Färbung, in der innersten Zellschicht der Ventrikel, geschlossen werden. Da die endokardiale LacZ-Färbung in vier unabhängigen B10lacZ Linien detektierbar war, sind Positionseffekte auszuschließen und die endokardiale lacZ-Expression allein regulatorischen Elementen des Bmp10 Locus zuzuschreiben. Dass es sich nicht um eine falsch-positive Färbung handelt, hervorgerufen durch endogene Galaktosidase-Aktivität, wurde stets durch das Mitführen entsprechender Kontrollgewebe ausgeschlossen. Dennoch ist eine Fehlinterpretation der Daten nicht ausgeschlossen. Möglicherweise wurde die Eosin-Färbung noch weiter innen gelegener Zellen übersehen, die aufgrund kleiner cytosolischer Kompartimente keine starke Eosin-Färbung aufweisen könnten und das Endokard darstellen. Sollte dies der Fall sein, so würde Bmp10-lacZ in den *Trabeculae carneae* exprimiert. Also in den netzförmig verbundenen, rundlichen Muskelbälkchen, die sich auf der gesamten Innenseite der Ventrikel finden. Allerdings stimmt die gefundene endokardiale Expressionsdomäne im adulten Herzen, mit dem von Somi und Buffing 2004 beschriebenen Bmp10 Expressionsmuster im HH44 Hühnerherzen überein (Kapitel 2.2.3), so dass eine endokardiale Expressionsdomäne als gesichert angesehen werden kann.

Auch in embryonalen B10lacZ Herzen wurde die Bmp10 Expression untersucht. Hier ließ sich die *Bmp10-lacZ* Expression bereits an E9.5 und auch in allen älteren Stadien im ventrikulären Endokard detektieren. Es war jedoch nie eine Bmp10 Expression im Kissenendokard nachzuweisen, was mit den bekannten Expressionsdaten übereinstimmt (Kapitel 2.2.3) „Stain Bleeding“ (*engl.*) ist jedoch ein nicht zu vernachlässigendes Problem. Durch die starke Färbung, d.h. durch große Mengen an niederschlagendem blauem Präzipitat, verschwimmen Zellgrenzen und auch umgebende Zellen erscheinen bläulich. Dies könnte eine Fehlinterpretation der Bmp10 Expression zu Folge haben. Leider war der Nachweis des BMP10 Proteins mithilfe der verwendeten Antikörper im Endokard bisher nicht möglich, da die Färbung an Gewebegrenzen der Schnitte von der starken

Hintergrundfärbungen in den entsprechenden Negativkontrollen nicht zu unterscheiden war. Die angewandten immunohistochemischen Analyse bedürfen daher einer Optimierung, um die endokardiale Expression zu bestätigen. Insbesondere fluoreszente Doppelfärbungen mit einem anerkannten endothelialen Marker, wie TEK, könnten Gewissheit bringen. Zum jetzigen Zeitpunkt kann dennoch zweifelsfrei behauptet werden, dass mithilfe der B10laZ Linien eine neue BMP10 Expressionsdomäne in den adulten Ventrikel entdeckt wurde. Die Ventrikel als BMP10-Quelle sind daher bei der Interpretation der Funktionsverlustanalysen, ermöglicht durch den generierten konditionellen *Bmp10* Knock-out, zu berücksichtigen.

Darüber hinaus ließ sich das BMP10 Expressionsprofil auch im embryonalen Myokard verfeinern. Die Expression in den Atrien beginnt früher (E9.5) als bisher angenommen und ist bereits während der Embryonalentwicklung deutlich prominenter im rechten, als im linken Atrium (Kapitel 4.1.3). Im embryonalen linken Atrium exprimieren längst nicht alle Myozyten *Bmp10-lacZ*; und bereits an E18.5 sind, trotz der Halbwertszeit der  $\beta$ -Galaktosidase von ungefähr 13 Stunden (ermittelt in Fibroblasten (*Jacobsen and Willumsen 1995*)), kaum noch positive Zellen im linken Atrium zu finden. Dies zeigt, dass BMP10 bereits während der Embryonalentwicklung und nicht erst im adulten murinen Herzen asymmetrisch in den Atrien exprimiert wird (vergleiche Kapitel 2.2.3).

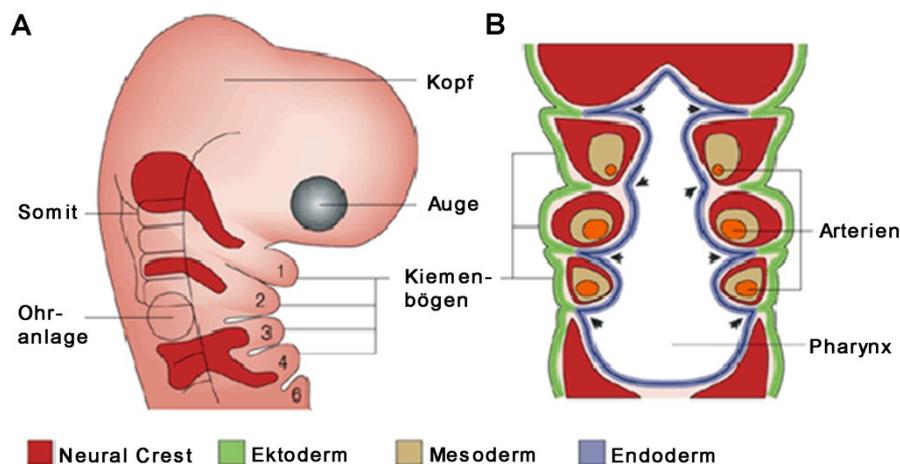
### **5.1.2 BMP10 ist kein Herz-spezifischer Faktor**

Die Detektion der *Bmp10-lacZ* Expression mithilfe von LacZ-Färbungen auf Kryoschnitten verschiedener Embryonalstadien zeigte, dass *Bmp10-lacZ* in zwei extrakardialen Domänen exprimiert wird: In den Kiemenbögen von E9.5 Embryonen und in der embryonalen Leber. Wie auch zuvor in den adulten Geweben, wurden falsch-positive Färbungen immer durch das Mitführen geeigneter Kontrollen und eventuelle Positionseffekte durch die Bestätigung des neu entdeckten Expressionsprofils in mindestens einer zweiten, unabhängigen B10laZ Mauslinie ausgeschlossen.

Jeder Kiemenbogen entwickelt sich aus allen drei Keimblättern (Abbildung 35). Er besteht aus einer ektodermalen Schicht, die sich während der weiteren Embryogenese in Epidermis und neuronales Gewebe entwickeln wird. Die innerste Schicht des Kiemenbogens setzt sich aus endodermalen Zellen zusammen und bildet die epitheliale Auskleidung des Pharynx. Sie formt durch Ausstülpungen in Richtung des Ektoderms die sogenannten Schlundtaschen, welche sich im weiteren Verlauf zu den pharyngealen Drüsen, wie Thymus und Schilddrüse, entwickeln. Zwischen Endo- und Ektoderm liegt ein Kern von Neuralleistenzellen, die durch epitheliale-mesenchymale Transformation aus Ektoderm hervorgegangen sind. Diese sind wesentlich an der Bildung kraniofazialer Knorpelanlagen und Bindegewebe beteiligt. Die Neuralleistenzellen umgeben den innersten Kern der Kiemenbögen, bestehend aus mesodermalen Zellen, welche sich in kraniofaziale

Muskulatur und die endothelialen Zellen entwickeln, welche die Kiemenbogenarterien umgeben (Graham 2003; Grevellec and Tucker 2010).

Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass Bmp10 in den Kiemenbögen exprimiert wird. Vereinzelt und teilweise auch etwas größere Verbände an Bmp10 positiven Zellen konnten in den Kiemenbögen I, II und III detektiert werden (Kapitel 4.1.3). Um die BMP10 Funktion in diesen Zellen und seine Rolle in der weiteren Embryogenese aufzuklären, ist es wichtig in weiteren Experimenten die Identität der Bmp10-positiven Zellen in den Kiemenbögen festzustellen. Aufgrund der Lokalisation der Zellen innerhalb der Kiemenbögen ist eine endodermale oder auch ektodermale Identität der Zellen auszuschließen. Da sie sich in den inneren Schichten der Kiemenbögen fanden (Abbildung 14), ist anzunehmen, dass sie entweder mesodermalen Ursprungs sind oder es sich um Bmp10-positive Neuralleistenzellen handelt. Genauere histologische Untersuchungen und geeignete Gegenfärbungen werden die Identität der Bmp10-positiven Zellen in den Kiemenbögen aufdecken. Mithilfe des konditionellen Knock-outs und geeigneten Cre-Linien könnte BMP10 hier gezielt inaktiviert und seine Bedeutung für die Embryogenese studiert werden.



**Abbildung 35: Schematische Darstellung der Kiemenbögen in Säugern.** A) Die Kiemenbögen (1-6) sind in der lateralen Aufsicht als seriell angelegte Wülste erkennbar. Alle drei Keimblätter sind an der Entwicklung der Kiemenbögen beteiligt und entwickeln sich zu den in B) dargestellten Strukturen. Pfeile deuten auf die entstehenden Schlundtaschen. Abbildung wurde (Lindsay 2001) entlehnt.

Die zweite, zu Beginn dieser Arbeit unbekannt, Bmp10 Expressionsdomäne in der Maus, welche mithilfe der B10laZ Linien entdeckt wurde, ist die hepatische Bmp10 Expression (Abbildung 13). Die LacZ-Färbung in E9.5 und E11.5 Embryonen unabhängiger B10laZ-Linien detektierten die Bmp10-lacZ Expression in der embryonalen Leber. Begleitende RT-PCR Analysen an der C57BL/6J Linie bekräftigten den Befund der hepatischen Bmp10 Expression in allen untersuchten Embryonalstadien. Sie zeigten darüber hinaus, dass die Bmp10 Expression in der Leber mit fortschreitender Entwicklung abnimmt, bis sie schließlich mittels RT-PCR, unter den gewählten

Bedingungen, in der adulten Leber nicht mehr nachzuweisen ist. Auch mittels immunochemischer Nachweisverfahren konnte in der adulten Leber kein BMP10 nachgewiesen werden, weder das unprozessierte noch das prozessierte Peptid (Kapitel 4.2.6., Abbildung 19). Bekräftigende Ergebnisse finden sich auch in der Literatur. Die Autoren *Somi* und *Buffing* beschrieben die Expression von *Bmp10* im Endothel der Sinusoids der embryonalen Hühnerleber ab HH22, was in der Maus etwa dem Stadium E12 entspricht (*Somi, Buffing et al. 2004*).

Am Ende dieser Arbeit bleibt ungeklärt, welche Zellen in der Leber Bmp10 exprimieren und welche Funktion Bmp10 hier übernimmt. Während der Embryonalentwicklung formt das endodermale Keimblatt das primitive Darmrohr. Die embryonale Leber entsteht aus seiner ventralen anterioren Region, dem ventralen Vorderdarm. An E9 bildet sich hier in der unmittelbaren Nähe zum embryonalen Herzen eine Ausstülpung, das hepatische Divertikel. Von der anterioren Region dieses Divertikel delaminieren an E9.5 die endodermalen Hepatoblasten und wandern in das benachbarte Mesenchym des Septum Transversums (Vorläufer des Zwerchfells). Die Hepatoblasten und das umgebende Mesenchym wachsen und entwickelt sich zunehmend zu dem komplexen Organ Leber, während es gleichzeitig von hämatopoetischen Zellen aus der Zirkulation besiedelt wird. An E13 macht das hämatopoetische Kompartiment 75% der Lebermasse aus. Ab E15 verlagert sich der Ort der Hämatopoese zunächst Richtung Milz und schließlich, ab E16.5, Richtung Knochenmark. Doch auch nach der Geburt sind noch einzelne Foci hämatopoetischer Zellen in der Leber zu finden (*Zorn 2008; Crawford, Foley et al. 2010*). Immunohistochemische Analysen müssen zeigen, welche Zelltypmarker mit BMP10 in der Leber co-exprimiert werden, und so über das hepatische Bmp10-exprimierende Kompartiment der embryonalen Leber Auskunft geben. Spannend ist, ob die dynamische Bmp10 Expression in der embryonalen Leber, deren Expressions-Spitze um E11.5-E12.5 mit der hämatopoetischen Funktion der Leber korreliert, möglicherweise eine Funktion von BMP10 in der Hämatopoese widerspiegelt. Die in der vorliegenden Arbeit generierte konditionelle Knock-out Linie wird dabei helfen, die Bmp10-Funktion in der sich entwickelnden Leber zu erhellen.

## **5.2 Der konditionelle Bmp10 Knock-out ermöglichte die gezielte Analyse aller Bmp10-Expressionsdomänen**

Die Generierung konditionell mutanter Mäuse beinhaltet immer die Verwendung einer Selektionskassette, die die Selektion von ES-Zellen ermöglicht. Doch eben diese Selektionskassette kann in den resultierenden Tieren zu Problemen führen. Es ist bekannt, dass *Neomycin* als Silencer auf benachbarte Loci wirken kann (*Pham, MacIvor et al. 1996*), und es findet sich mindestens ein Bericht, der zeigt, dass der PGK-Promotor bidirektional wirkt und ein antisense-Transkript erzeugt

(*Scacheri, Crabtree et al. 2001*). Auf diese Weise kann bereits die Selektionskassette auf die Transkription des untersuchten oder benachbarte Locus nehmen und die nachfolgenden Analysen behindern oder verfälschen.

Aus diesem Grund wurde für die Konstruktion des konditionellen Bmp10 *Knock-outs* eine FRT-flankierte Neomycin-Kassette verwendet. Durch die Flp/FRT-vermittelte Rekombination war es möglich die Neomycin-Kassette zu deletieren und somit einen mögliche regulatorische Wirkung zu verhindern. Die Deletion erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit der *Flp-Deleter* Linie. Sie vermittelt die ubiquitäre Rekombination zwischen Flp-Erkennungssequenzen in der frühen Embryogenese und auch in den Keimzellen (*Rodriguez, Buchholz et al. 2000*). Doch auch die Insertion der *loxP*-Elemente in sensible regulatorische Bereiche des genomischen Locus, wie z.B. Splice-Akzeptoren, beeinflussen möglicherweise die Transkription vom mutanten Locus. Deshalb wurden die Tiere mit der Neomycin-Kassette Inzucht verpaart (Kapitel 4.2.4) und es zeigte sich, dass homozygote Tiere in dem erwarteten Verhältnis geboren wurden. Dies schließt eventuelles Silencing oder fehlerhaftes Splicing, verursacht durch die *Neo*-Kassette oder *loxP*-Elemente, zwar nicht völlig aus, aber es zeigt, dass die verwendeten Elemente zumindest die Expression des Bmp10 Locus nicht so stark beeinflussen, dass ein offensichtlicher hypomorpher Phänotyp entsteht.

Dass die Deletion des zweiten Exons tatsächlich ausreichend ist, die Funktionalität des BMP10 Proteins zu unterbinden, wurde durch die konstitutive Exon2-Deletion bewiesen. Die verwendete CMV-Cre Linie vermittelt die Exzision *loxP*-flankierter DNA Bereiche bereits während der Prä-Implantationsphase der Embryogenese (*Schwenk, Baron et al. 1995*). Dies führt nicht nur in allen somatischen, sondern auch in Zellen der Keimbahn zur Rekombination *loxP*-flankierter DNA-Abschnitte. Die PCR-basierte Analyse der F1 Nachkommenschaft zeigte, dass in den doppelt heterozygoten Tiere  $BMP10 LN^{+/-}/CMV-Cre^{pos}$  das *loxP*-flankierte Exon2 deletiert worden ist und somit die gewünschte Rekombination den Genotyp  $ckoBmp10^{+/\Delta Exon2}/Cre^{pos}$  erzielte. Dieses führte in den reinerbig mutanten Tieren  $ckoBmp10^{\Delta Exon2/\Delta Exon2}/CMV-Cre^{pos}$  oder  $ckoBmp10^{\Delta Exon2/\Delta Exon2}/CMV-Cre^{neg}$  zur Lethalität um E10.5. Morphologische Betrachtungen und histologische Untersuchungen ergaben, dass die Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits in ihrer Entwicklung retardiert waren und kaum trabekulierte Herzen aufwiesen und so den konstitutiven *Knock-out* (*Chen, Shi et al. 2004*) phänotypieren. Dieses Ergebnis beweist, dass die generierte konditionelle Bmp10 *Knock-out* Linie in Kombination mit einer Cre-Linie für Funktionsverlustanalysen geeignet ist. Die *loxP*-Elemente sind für die Cre-Rekombinase zugänglich und vermitteln, wie PCR-Analysen der genomischen Schwanz DNA zeigten, die Deletion von Exon2. Da Exon2 für das reife BMP10 codiert (*Neuhaus, Rosen et al. 1999*), ist seine Deletion, wie der früh lethale embryonale Phänotyp beweist, ausreichend, um den Verlust des gesamten Bmp10 Gens zu imitieren.

Für weitere Analysen des konditionellen *Knock-outs* wurde zunächst die *FRT*-flankierte Neomycin-Kassette deletiert (Kapitel 4.2.3), um so auch unbemerkte negative Effekte der Kassette auszuschließen. Um die *Bmp10* Funktion während der Embryogenese und Adoleszenz zu analysieren, wurden die so erhaltenen *ckoBmp10* Tiere nun mit verschiedenen Cre-Linien verpaart. Dies ermöglichte die *Bmp10*-Deletion zu verschiedenen Zeitpunkten und in verschiedenen Geweben. Bei all diesen Analysen ist jedoch zu beachten, dass sowohl das etablierte *Cre/loxP*-System als auch das *Flp/FRT*-System keine absolute Kontrolle über die räumliche und zeitliche Deletion des untersuchten Gens ermöglicht. Dies liegt vor allem darin begründet, dass viele Gewebe-spezifische Promotoren keine ausreichende Cre-Transkriptionsniveaus erzielen, die eine effiziente Rekombination in allen Zellen des Gewebes ermöglichen würde. Das Ergebnis ist ein Mosaik-artige Deletion des genomischen Bereichs in dem betreffenden Gewebe. Überdies ist eine effiziente genomische Deletion abhängig von der Zugänglichkeit der *loxP*-Elemente für die CRE-Rekombinase. Die Zugänglichkeit der *loxP*-Elemente allerdings wird durch die Tertiärstruktur der DNA bestimmt (Vooijs, Jonkers et al. 2001) und ist bisher nicht vorher zu sagen. Auch der zeitliche Verlauf der Cre-vermittelten Rekombination ist nicht beeinflussbar, insofern als dass CRE zwar zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert werden kann, aber wann die Cre-vermittelte Rekombination tatsächlich stattfindet ist nicht zu beeinflussen. Diese Nachteile des *Cre/loxP*-Systems und ihr Einfluss auf die Ergebnisse wurden berücksichtigt.

### **5.2.1 Das atriale BMP10 ist für die Embryogenese nicht essentiell**

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von BMP10 im adulten Tier zu untersuchen. Während der Adoleszenz zeigt *Bmp10* sein restriktivstes Expressionsmuster. Hier wird es ausschließlich im Herz und zwar im rechten Atrium und, wie erst im Verlaufe dieser Arbeit heraus gefunden wurde, auch ventrikulär exprimiert (Kapitel 5.1.1). Dabei scheint das atriale *Bmp10* den wesentlichen Teil des adult verfügbaren BMP10 zu stellen. Deshalb wurde zunächst die prominenteste *Bmp10* Expressionsdomäne bzw. die Funktion des hier translatierten BMP10 untersucht. Dies geschah durch die *Nppa-Cre* vermittelte atriale *Bmp10* Deletion. Es wurde kein embryonaler Phänotyp erwartet, da der Verlust des embryonalen atrialen BMP10 vermutlich durch das ventrikuläre BMP10 komplementiert würde. Der Erhalt homozygot mutanter *ckoBmp10<sup>flox/flox</sup>/Nppa-Cre<sup>pos</sup>* lebensfähiger Nachkommen, die fertil sind und eine wildtypische Lebenserwartung haben, bestätigten diese Annahme. Jedoch erst anknüpfende RT-PCRs und immunochemische Analysen bewiesen, dass in den mutanten Atrien kein vollständiges *Bmp10* Transkript und somit kein *Bmp10* Protein exprimiert wurde (Kapitel 4.2.6). Dies beweist, dass das atriale *Bmp10*, unter den gegebenen physiologischen Bedingungen, keine essentielle Funktion für

die Embryogenese und das Heranwachsen hat. Die MRT-Untersuchungen demonstrierten darüber hinaus, dass das atriale BMP10 im adulten Herz keinerlei Einfluss auf physiologische Parameter des Herzens hat. Erniedrigte Schlagvolumen, wie sie bei Herzinfarkten, bei Herzmuskelerkrankungen oder bei Herzklappenerkrankungen auftreten, konnte in keinem der untersuchten mutanten Tiere gefunden werden. Somit scheint das atriale Bmp10 nicht essentiell für die Homöostase des Herzens zu sein. Bisher fehlt eine umfassende Analyse der elektrischen Eigenschaften der Bmp10-defizienten Herzen, beispielsweise mithilfe von EKGs. Allerdings wären eminente Unterschiede in Herzfrequenz oder Herzrhythmus bereits im MRT aufgefallen, insbesondere weil sie durch veränderte Schlagvolumen reflektiert worden wären. Es lässt sich daher behaupten, dass der Verlust des atrialen BMP10 keinen Effekt auf die Organhomöostase des adulten Herzens hat.

Diese Ergebnisse warfen die folgenden Fragen auf: Hat das atriale Bmp10 tatsächlich keinerlei Funktion oder bekommt es erst unter bestimmten physiologischen oder pathologischen Bedingungen eine Bedeutung? Wird der Verlust des atrialen Bmp10 möglicherweise durch das ventrikuläre, endokardial exprimierte Bmp10 substituiert? Dies wurde durch die im Folgenden diskutierten Experimente beantwortet.

### **5.2.2 Pathologische Stimuli machen die Bedeutung des atrialen Bmp10 für das kardiovaskuläre System sichtbar**

Das Organsystem eines adulten Organismus ist keine starres Gebilde, sondern es reagiert auf physiologische oder pathologische Reize, denen es sich anpasst. So reagiert das Herz beispielsweise auf einen erhöhten Druck im vaskulären System mit Wachstum, beziehungsweise einer Zunahme von Muskelmasse. Die Lunge reagiert auf einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck mit einer pulmonalen Vasokonstriktion und Umgestaltung der pulmonalen Gefäße (*Stenmark, Fagan et al. 2006*). Das vaskuläre System reagiert auf Okklusionen mit dem Wachstum von Umgehungsgefäßen. Diese anpassenden Umgestaltungen (*Remodeling, engl.*) sind jedoch nicht zwingend positiv. Im Gegenteil, gerade diese Umgestaltungen sind es oft, die ernsthaften und lebensbedrohlichen Krankheiten zugrunde liegen. Übermäßiges Herzwachstum kann in einem vergrößerten aber kraftlosen Herzmuskel resultieren, was schließlich in Herzversagen endet. Die Umgestaltung der Lunge, als Antwort auf die Hypoxie, resultiert in pulmonaler arterieller Hypertonie, dessen Folge oft eine Rechts-Herzinsuffizienz ist.

Die molekularen Mechanismen, die diesen Umgestaltungen zugrunde liegen, sind weitestgehend unbekannt. Jedoch ist gerade ihre Aufklärung zwingend, um die Umgestaltungen zu kontrollieren und therapeutisch einzusetzen. Auf zellulärer Ebene sind es Mechanismen, die zu der Umgestaltung

des betroffenen Organ führen, welche bereits während der Embryogenese zur Gestaltung des adulten Organismus beigetragen haben. Dies beinhaltet gestaltende Prozesse wie Proliferation, Migration, Apoptose, EMT oder auch die Differenzierung multipotenter Vorläuferzellen. So wundert es nicht, dass auf molekularer Ebene immer wieder die Beteiligung von Faktoren gefunden wird, die bereits während der Embryonalentwicklung an der Gestaltung eines Organs beteiligt waren.

Ob auch Bmp10 ein Faktor ist, welcher bekanntermaßen eine essentielle Funktionen während der Embryonalentwicklung hat, der auch an pathologischen Umgestaltungsprozessen beteiligt ist, wurde im Verlauf dieser Arbeit mit verschiedenen murinen Krankheitsmodellen untersucht.

#### **5.2.2.1 Die atriale Bmp10-Deletion hat keinen Einfluss auf die Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie und das rechtsventrikuläre Remodeling**

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) ist ein Sammelbegriff für Krankheiten, die sich durch einen erhöhten Gefäßwiderstand im Lungenkreislauf auszeichnen, dessen Folge oft eine Rechts-Herzinsuffizienz ist. Die WHO hat 2008 eine überarbeitete klinische Klassifikation festgelegt, die im Wesentlichen 5 Kategorien der pulmonalen Hypertonie unterscheidet: Die idiopathische PAH, die erbliche PAH, die Toxin-induzierte, die assoziierte PAH (assoziiert mit anderen Grunderkrankungen wie z.B. HIV-Infektionen oder Herzerkrankungen) und die persistente PAH von Neugeborenen (*Simonneau, Robbins et al. 2009*). Eine bemerkenswerte Änderung war hier die Aufnahme der Klasse erblicher PAH. Sie ist zurückzuführen auf die Entdeckungen der letzten Jahre, die deutlich machten, dass die familiär assoziierte PAH in 70% der Fälle mit einer Mutation des BMPRII Rezeptors einhergeht, oder in selteneren Fällen mit der Mutation des ALK-1 Rezeptors oder des ENDOGLIN Co-Rezeptors. Zusätzlich ist auch im Tiermodell gezeigt worden, dass die Expression eines dominant-negativen BMPRII-Rezeptors in postnatalen glatten Muskelzellen zu einem erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstand sowie einer rechtsventrikulären kardialen Hypertrophie führt (*West, Fagan et al. 2004*). Auch die Deletion in endothelialen Zellen prädispositioniert für die PAH (*Hong, Lee et al. 2008*). In weiteren tierexperimentellen Ansätzen konnte demonstriert werden, dass auch intrazelluläre Mediatoren der BMP-Signalgebung an der Ausbildung der PAH beteiligt sind. Die durch eine Smad8 Ablation hervorgerufene verminderte BMP-Signalgebung führt ebenfalls zur Ausprägung PAH-typischer Charakteristika (*Huang, Wang et al. 2009*). Bisher waren jedoch keine extrazellulären Effektoren des BMP-Signalweges hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Entwicklung der PAH *in vivo* untersucht worden. Dabei ist sowohl für Bmp9 als auch Bmp10 bekannt, dass sie mit den Rezeptoren BMPRII, ALK-1 und auch dem Co-Rezeptor interagieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierte konditionelle *Bmp10 Knock-out* Linie *ckoBmp10* ist bisher das einzige transgene Tiermodell, mit dem es möglich ist die Rolle von BMP10 in der Entwicklung der PAH zu untersuchen. So wurden die *ckoBmp10* Tiere zunächst mit der Atrium-spezifischen *Cre-Line* verpaart, um die prominenteste BMP10 Expression im adulten Herzen, nämlich im rechten Atrium, zu verhindern. Anschließend sind diese Tiere und ihre wildtypischen Wurfgeschwister dem Krankheitsmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie zugeführt worden (Kapitel 3.7.3.1). Es zeigte sich jedoch, dass der Verlust des atrialen BMP10 keinen erkennbaren Einfluss auf die Ausprägung der pulmonalen Hypertonie hat. Der Vergleich mit Kontrolltieren, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden, zeigte, dass zwar die hypoxischen Tiere eine verstärkte Muskularisierung der peripheren Gefäße aufwiesen, doch waren keine Unterschiede zwischen wildtypischen und mutanten Tieren feststellbar. Es konnte auch kein Unterschied in der rechts-ventrikulären Massenzunahme zwischen *Bmp10*-defizienten Herzen und wildtypischen Herzen als Antwort auf die pulmonale Hypertonie festgestellt werden (Kapitel 4.2.7.1). Jedoch bedeutet dies nicht zwingend, dass BMP10 keine Rolle in der PAH spielt oder nicht an den Prozessen die, als Antwort auf den erhöhten Widerstand im Lungenkreislauf, zur Massenzunahme des rechten Herzens führen, involviert ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass das fehlende atriale BMP10 substituiert wird. Möglicherweise komplementiert ventrikuläres BMP10, dessen Expression hier erstmals beschrieben wurde (Kapitel 5.1), den atrialen Verlust. Doch auch eine Substitution durch den engsten Verwandten BMP9, der ebenfalls in biologisch aktiven Dosen in der Zirkulation vorhanden ist (*David, Mallet et al. 2008*), ist sehr wahrscheinlich.

Sobald eine ausreichende Zahl an Tieren vorhanden ist, die *Bmp10*-defizient in Atrien und Endokard sind, könnte das Experiment wiederholt werden, um die erste Hypothese zu testen. Die Überprüfung der BMP10-Level im Serum könnten darüber hinaus ebenfalls Aufschluss geben, ob die atriale *Bmp10*-Deletion bereits zur signifikanten Erniedrigung biologisch aktiven BMP10 im adulten Organismus geführt hat. Leider konnte bisher kein Test etabliert werden, um *Bmp10* im Serum quantitativ nachzuweisen, da die verfügbaren Antikörper, sprich die kommerziellen und der eigens generierte Antikörper gegen das reife Peptid, für ELISA-Nachweisverfahren nicht geeignet waren. Um die Substitution durch den engsten Verwandten BMP9 zu testen, müsste eine *Bmp9*-defiziente Maus in die *ckoBmp10* Linie eingekreuzt werden, jedoch ist bisher keine *Bmp9 Knock-out* Maus verfügbar.

### **5.2.2.2 BMP10 ist ein positiver Effektor der Arteriogenese**

In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise auf eine Bedeutung von BMPs für die Entwicklung, Homöostase und den Umbau des vaskulären Systems (*David, Feige et al. 2009*). Sie üben

pleiotrope Effekte auf die verschiedensten Kompartimente des vaskulären Systems aus, immer in Abhängigkeit vom Zelltyp und den vorhandenen Liganden. Wie auch in Tabelle 1 zusammengefasst zu sehen ist, sind es die Bmp TypI Rezeptoren Alk-1, Alk-2 und Alk-3 die essentiell für die normale Entwicklung des vaskulären System sind. Sie alle sind Rezeptoren für den hier im Focus stehenden Liganden BMP10.

In Kapitel 4.2.7.2 wurde demonstriert, dass auch Bmp10 Einfluss auf die Gestaltung des vaskulären Systems nimmt. Es konnten zwar keine dramatischen Effekte auf die Entwicklung des Gefäßsystems in Bmp10 defizienten Mauslinien beobachtet werden, jedoch lag der Schwerpunkt dieser Arbeit vor allem auf der Homöostase, beziehungsweise Remodellierung des bereits existierenden Systems. Die Untersuchungen der Effekte von Bmp10 auf die Adaptation des vaskulären System nach der Okklusion der *A. femoralis* hat ergeben, dass bereits der Verlust des atrialen BMP10 einen deutlichen Effekt auf die Wiederherstellung des subkutanen Blutflusses hat. Die Rekonstitution des subkutanen Blutflusses ist in den mutanten Mäusen, im Vergleich zu den wildtypischen Wurfgeschwistern, deutlich vermindert.

Da die Wiederherstellung des Blutflusses nach der *A. femoralis* Ligatur hauptsächlich auf den Prozess der Arteriogenese zurückzuführen ist, das heißt auf das Wachstum bereits existierender kollateraler Gefäße (*Buschmann and Schaper 1999; Scholz, Ziegelhoeffer et al. 2002*), ist es äußerst wahrscheinlich, dass BMP10 Einfluss auf eben diesen Prozess nimmt. Ob sich diese These erhärten lässt, müssen histologische Untersuchungen der wachsenden Gefäße zeigen. Das Wachstum kollateraler Gefäße erfolgt durch die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Als Antwort auf die erhöhte Flüssigkeitsreibung, werden die Endothelzellen in den Kollateralen aktiviert. Sie sekretieren nun verschiedene Wachstumsfaktoren und exprimieren bestimmte Adhäsionsmoleküle. Monozyten lagern an die Endothelzellen an und infiltrieren die Gefäßwand und den perivaskulären Raum. Auch sie sekretieren verschiedene Wachstumsfaktoren und Proteasen, die zur Umgestaltung der extrazellulären Matrix sowie Proliferation von Endothel und glatten Muskelzellen führen. Die höchste mitotische Aktivität dieser beiden Zelltypen ist in Mäusen an Tag 3 nach der *A. Femoralis* Okklusion zu beobachten (*Scholz, Ziegelhoeffer et al. 2002*).

Der Verlust des atrialen BMP10 bewirkt in der Mutante den dramatischsten Unterschied im subkutanen relativen Blutfluss an Tag 3 und Tag 7 nach der Operation. Mutmaßlich führt die Umgestaltung der extrazellulären Matrix zu einer erhöhten Affinität für BMP10, das nun hier bindet. Dies würde die beobachtete Anreicherung von BMP10 in wachsenden Kollateralen erklären (Abbildung 21). Es bleibt zu klären ob und wie BMP10 die Proliferation und somit das Wachstum der Kollateralen begünstigt. Dies ist besonders spannend, da BMPs scheinbar Kontext-abhängige Effekte im vaskulären System ausüben. So kann BMP9 scheinbar proliferativ als auch antiproliferativ auf endotheliale Zellen wirken (*David, Feige et al. 2009; Suzuki, Ohga et al. 2010*).

Der vorhandene konditionelle Bmp10 Knock-out wird in Zukunft helfen können, die zugrunde liegenden Mechanismen dieser zellspezifischen- und umgebungsabhängigen Funktionen der BMPs im vaskulären System zu entziffern.

### **5.2.2.3 BMP10 hat keinen Einfluss auf das pathologische hypertrophe Wachstum des Herzens**

Die Untersuchungen der B10laZ transgenen Linie F1 demonstrierten, dass während des TAC-induzierten hypertrophen Wachstums des Herzens keine Veränderung in der *Bmp10* Expression zu beobachten ist (Kapitel 4.2.7.3). Mit diesem Ansatz können jedoch nur regionale Unterschiede der Expression sichtbar gemacht werden und erlaubt keine Rückschlüsse auf Quantitäten. Im Jahr 2007 erschienen Ergebnisse von Bmp10 Expressions-Analysen in hypertrophen und gesunden Rattenherzen. Es wurde gezeigt, dass ca. 50% mehr Bmp10-Transkripte in den hypertrophen linken Ventrikeln nachgewiesen werden konnten (Nakano, Hori et al. 2007). Es ist also nicht ausgeschlossen, dass pathologische Reize zur einer erhöhten oder verminderten Bmp10 Transkription in den bekannten Expressionsdomänen führt und dies die Umbauprozesse im Herzen beeinflusst.

Bisher ist nicht bekannt welche Funktion *Bmp10* im adulten Herzen übernimmt. Seine Deletion in den Atrien, der prominentesten Expressionsdomäne im adulten Tier, hatte keinen bemerkenswerten Einfluss auf Kardiogenese und das postnatale Wachstum des Herzens. Das Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen arterialen Hypertonie, welchem die ckoBm10/Nppa-Cre Mäuse bereits ausgesetzt waren, hat demonstriert, dass das Fehlen des atrialen BMP10 keinen Einfluss auf die Ausprägung der begleitenden rechtsventrikulären Hypertrophie nimmt (Kapitel 4.2.7.1). Um eine mögliche BMP10 Funktion in einem anderen Krankheitsmodell zu untersuchen, der linksventrikulären Hypertrophie, wurden die Linie ckoBmp10/Nppa-Cre der TAC (Kapitel 3.7.3.2) unterzogen. Doch auch in diesem Modell zeigte sich, dass keine messbaren Unterschiede im Grad der Hypertrophie bzw. den Herzgewichten der untersuchten mutanten und wildtypischen Herzen durch die BMP10-Defizienz bewirkt wurde (Kapitel 4.2.7.3). Doch wie bereits auch schon in Kapitel 5.2.2.1 im Zusammenhang mit der pulmonalen Hypertonie sowie der begleitenden rechtsventrikulären Hypertrophie diskutiert wurde, muss dies nicht zwingend die Entbehrlichkeit von Bmp10 für diese Prozesse bedeuten. Da uns die B10laZ Linie gezeigt hat, dass Bmp10 nicht nur in den Atrien sondern auch im ventrikulären Kompartiment des adulten Herzen exprimiert wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das fehlende Bmp10 durch ventrikuläres Bmp10 substituiert wird. Auch eine komplementäre Wirkung des engsten Verwandten BMP9 ist möglich.

### **5.2.3 Die Bedeutung der embryonalen, kardialen Bmp10 Expression**

Die B10lacZ transgenen Mauslinien demonstrierten, dass Bmp10 im embryonalen Herzen breiter als bisher angenommen exprimiert wird. Sowohl im Endokard als auch im ventrikulären trabekulierten Myokard ist die Bmp10-lacZ Expression in allen untersuchten Embryonalstadien (E9.5, E11.5, E14.5, E16.5 und E18.5) detektiert worden (Kapitel 4.1.3). Mithilfe des konditionellen Bmp10 Knock-outs und unter Zuhilfenahme verschiedener Cre-Linie wurde versucht zu ergründen, welche Bmp10 Expressionsdomänen essentiell für die Kardiogenese sind. Dabei kamen die Cre-Linien Ckmm-Cre, Nkx2.5-Cre, TEK-Cre, Flk1-Cre und  $\alpha$ MHC-Cre zum Einsatz.

### **5.2.3.1 Der Verlust der frühen kardialen Bmp10 Expression ist embryonal lethal**

Die Analyse der frühen embryonalen Bmp10 Expression im Herzen erfolgte mit der Nkx2.5-Cre Line von Richard P. Harvey. Diese Linie vermittelt in der Rosa26-LacZ Reporterlinie die effiziente Rekombination der *loxP*-Elemente bereits in den Herzvorläuferzellen der kardialen Sichel an E7.75-E8.0. Auch Zellen des zukünftigen perikardialen Mesoderm scheinen CRE zu exprimieren. Im Stadium E8.5 wird Nkx2.5-Cre ubiquitär in myokardialen Zellen exprimiert. Die Expression des Reporters in endothelialen Zellen des Herzens ist jedoch nur mosaikartig. Darüber hinaus findet sich die Cre-vermittelte *lacZ*-Expression auch in den Zellen des Vorderdarmdaches. Im Embryonalstadium 10.5 wird Cre ebenfalls ubiquitär in den myokardialen Zellen des Herzen und mosaikartig im Endokard exprimiert. Ferner ist in diesem Stadium die Nkx2.5-Cre Expression in Zellen der embryonalen Leber (Leber-Diverticulum und -Parenchymzellen), den Bronchen der sich entwickelnden Lunge, und epithelialen sowie mesodermalen Zellen der Kiemenbögen zu finden (Stanley, Biben et al. 2002).

Die homozygot mutanten  $\text{ckoBmp10}^{\text{flox/flox}}/\text{Nkx2.5-Cre}^{\text{pos}}$  Embryonen verstarben, ähnlich wie der konstitutive Knock-out, um E9.5. Dabei wiesen die mutanten Embryonen im Vergleich zu ihren wildtypischen Wurfgeschwistern eine deutliche Wachstumsretardierung auf, die mit kleineren kaum trabekulierten Herzen einherging (Kapitel 4.2.8.3). Eben diese unterentwickelten Herzen dürften ursächlich für die embryonale Lethalität sein. Vermutlich ist, ähnlich wie im konstitutiven Knock-out (Kapitel 2.2.3), die verminderte kardiomyozytäre Proliferation für die hypoplastischen Herzen verantwortlich. Doch auch die, ebenfalls für den konstitutiven KO beschriebenen, azellulären Kissen tragen vermutlich ebenfalls beträchtlich zu dem früh lethalen Phänotyp bei. Die normale Kissenentwicklung ist nämlich für die Entstehung eines unidirektionalen Blutflusses, erstmal sichtbar an E9.25, essentiell (Nishii and Shibata 2006). Jedoch nur entsprechende Proliferations-Analysen auf mutanten und wildtypischen  $\text{ckoBmp10}/\text{Nkx2.5-Cre}$  Herzen in Embryonen des identischen Entwicklungsstadiums könnten diese These bestätigen.

Dieses Experiment zeigt, dass die Deletion in den beschriebenen Nkx2.5-Cre Expressionsdomänen ausreichend ist, um den konstitutiven Knock-out zu phänokopieren. Doch Nkx2.5-CRE überlappt im Myokard, Endokard und möglicherweise in der Leber sowie im Mesoderm der Kiemenbögen mit allen in der B10laZ-Linie entdeckten Bmp10 Expressionsdomänen. Daher ermöglicht die ckoBmp10/Nkx2.5-Cre Linie es nicht, die für die frühe Kardiogenese essentielle Bmp10-Expressionsdomäne einzugrenzen. Aber sie beweist, dass es keine unentdeckten BMP10 Expressionsdomänen, außerhalb der der Nkx2.5-Cre Expressionsdomänen, gibt, die das deletierte Bmp10 ersetzen könnten.

### **5.2.3.2 Die endokardiale Bmp10-Expression ist für die Kardiogenese nicht essentiell**

Die Untersuchungen der B10laZ Linien haben gezeigt, dass Bmp10 schon im Embryonalstadium E9.5 im Endokard der Ventrikel exprimiert wird (Kapitel 5.1). Möglicherweise induziert das endokardiale BMP10 das Auswachsen der Trabekel. Diese Hypothese wurde mithilfe des konditionellen Bmp10 Knock-outs und der TEK-Cre Linie (*Koni, Joshi et al. 2001*) getestet. Diese Linie exprimiert Cre in endothelialen Zellen und somit auch im Endokard (*Goddeeris, Rho et al. 2008*). Die Analyse der Hybridlinie ckoBmp10/TEK-Cre ergab, dass die homozygot mutanten Embryonen im erwarteten Verhältnis geboren wurden und zu fertilen Tieren heranwachsen. Ob die Bmp10 Expression im embryonalen Endokard der mutanten Tiere tatsächlich verhindert wurde, konnte bisher nicht bewiesen werden. RT-PCR Analysen embryonaler Herzen sind nicht geeignet, da die endokardiale Expression durch die myokardiale Expression verschleiert wird. Auch im adulten Herzen lassen sich die endokardialen Bmp10 Transkripte, beziehungsweise ihre Abwesenheit, nicht nachweisen. Dies ist in der Sensitivität der Methode begründet. Könnte man die endokardiale Fraktion in der Gewebeprobe, die das Ausgangsmaterial für die Gesamt-RNA ist, durch bestimmte Präparationsverfahren anreichern, so wäre der Nachweis mithilfe der RT-PCR Analyse sicher möglich. Auch der Nachweis der BMP10 Proteine im Endokard mithilfe von Antikörperfärbungen auf Gewebeschnitten war bisher nicht möglich, so dass auch dieses Verfahren zum Nachweis der verhinderten Bmp10 Expression ausschied (Kapitel 5.1). Die verwendete TEK-Cre Linie ist aber eine etablierte Linie, die in den Händen verschiedener Experimentatoren nachweislich die Rekombination *loxP*-flankierter Elemente im Endokard ermöglicht hat (*Koni, Joshi et al. 2001; Komatsu, Wakatsuki et al. 2007; Goddeeris, Rho et al. 2008*). Deshalb lässt sich mit Sicherheit behaupten, dass die endokardiale BMP10 Expression für die Kardiogenese entbehrlich ist. Die im Myokard sekretierte Menge an BMP10 ist ausreichend, um den Verlust zu substituieren. Selbst der kombinierte Knock-out in Endokard und atrialen Myokard in den mutanten

ckoBmp10/Nppa-Cre/TEK-Cre Tieren konnten keinen erkennbaren negativen Effekt während Kardiogenese bewirken.

### **5.2.3.3 Die adulte BMP10 Expression ist für die kardiale Organhomöostase vollständig entbehrlich**

In Kapitel 5.1 ist diskutiert worden, dass die Ergebnisse der Bmp10 Expressionsanalysen anhand der B10laZ Linie die Möglichkeit einer Fehlinterpretation bieten. Die Schlussfolgerung, dass die beobachtete *lacZ*-Expression in der innersten Schicht der Ventrikel eine endokardiale Bmp10 Expression reflektiert, könnte sich nicht bestätigen. Wäre dies der Fall, so würde BMP10 auch im adulten Herzen im Myokard der Ventrikel exprimiert, und zwar in den spezialisierten myokardialen Strukturen der *Trabeculae carnae*. Um die Bedeutung dieser möglichen Expressionsdomäne für das adulte Herz zu untersuchen, wurde die ckoBmp10 Linie mit der Ckmm-Cre Linie verpaart und die mutanten Herzen untersucht (Kapitel 4.2.8.1). Über die Funktion der *Trabeculae carnae* ist nicht viel bekannt, doch es ist anzunehmen, dass sie die Hämodynamik und die kardiale Pumpleistung beeinflussen. Deshalb wurden die Herzen hinsichtlich ihrer Masse untersucht, um eine kardiale Hypertrophie als Antwort auf veränderte hämodynamische Bedingungen und eine verminderte Pumpleistung zu untersuchen. Desweiteren wurde beschrieben, dass die ektopische Expression von Bmp10 im postnatalen Herzen ein reduziertes Größenwachstum innerhalb von sechs Wochen nach der Geburt bedingt (Chen, Yong et al. 2006). Möglicherweise bedingt der Verlust des postnatalen myokardialen BMP einen entgegen gesetzten Effekt.

Jedoch, es war kein signifikanter Unterschied in der kardialen Masse zwischen mutanten und wildtypischen ckoBmp10/Ckmm-Cre Wurfgeschwistern festzustellen. Somit ist die adulte BMP10 Expression für die kardiale Organhomöostase vollständig entbehrlich. Weder der kombinierte *Bmp10* Verlust in atrialem Myokard und Endokard, noch der vollständige Verlust im postnatalen Myokard hat einen Einfluss auf das Wachstum des Herzen. Aber es bleibt zu klären, ob physiologische oder elektrophysiologische Parameter des Herzen durch den BMP10-Verlust ebenfalls unbeeinflusst bleiben.

### **5.2.3.4 Die Bmp10 Expression zwischen E8.75 und E11.5 ist kritisch für die Kardiogenese**

Nachdem die endokardiale Expressionsdomäne für die Kardiogenese als nicht-essentielle Domäne identifiziert wurde, wurde nun die Bedeutung der embryonalen myokardialen Expressionsdomäne isoliert studiert. Durch Kombination des konditionellen Bmp10 Knock-outs und der  $\alpha$ MHC-Cre Linie, wurde Bmp10 im Myokard deletiert und die Anzahl überlebender, homozygot mutanter Tiere

ckoBmp10<sup>flox/flox</sup>/Nppa-Cre<sup>pos</sup> innerhalb der Nachkommenschaft überprüft. Erstaunlicherweise fanden sich mutante Nachkommen, wenngleich sie hinter der nach Mendel erwarteten Anzahl zurückblieben. Anders als durch die CMV-Cre oder Nkx2.5-Cre induzierten Deletionen, verursachte die  $\alpha$ MHC-Cre vermittelte Bmp10 Deletion im Myokard keinen 100% penetranten, lethalen Phänotyp. Die Betrachtung verschiedener Embryonalstadien ergab, dass die mutanten Embryonen der Stadien E9.5, E10.5, E14.5 und auch E16.5 äußerlich nicht von den wildtypischen Embryonen unterscheidbar sind. Erste histologische Untersuchungen mutanter und wildtypischer E16.5 Herzen zeigten, dass die Entwicklung eines kompakten ventrikulären Myokards nicht gestört war. Ein solcher Phänotyp wäre zu erwarten gewesen, wenn die Trabekulierung des jungen Herzen gestört gewesen wäre. Aber die Untersuchungen lieferten den Hinweis, dass möglicherweise ventrikuläre Septumdefekte für die erhöhte Sterblichkeit der Mutanten verantwortlich sind. Dieser Verdacht bedarf jedoch der Absicherung durch Untersuchungen weiterer mutanter Herzen.

Es ist erstaunlich, dass die frühe Bmp10 Deletion keine ernsteren Auswirkungen auf die Kardiogenese hat, wie sie etwa in den ckoBmp10/CMV-Cre oder ckoBmp10/Nkx2.5-Cre Mutanten zu beobachten sind. Denn ähnlich wie in diesen Hybridlinien sollte nur noch ein Minimum an BMP10 im embryonalen Herzen vorhanden sein. Die verwendete  $\alpha$ MHC-Cre Linie (Agah, Frenkel *et al.* 1997) exprimiert  $\alpha$ MHC-Cre ab E9.0 ausschließlich in Kardiomyozyten und führt zur vollständigen Rekombination im Myokard an E11.5 (Gaussin, Van de Putte *et al.* 2002). Da der konstitutive Bmp10 Knock-out eine verminderte kardiomyozytäre Proliferation aufweist (Chen, Shi *et al.* 2004), könnte man annehmen, dass auch der graduelle BMP10 Verlust ab E9.5 ein verminderte Proliferation und deshalb ein unterentwickeltes Myokard zu Folge hat.

Es drängte sich somit der Verdacht auf, dass entweder die kombinatorische myokardiale und endokardiale BMP10-Defizienz, oder der BMP10 Verlust im Myokard vor E9.5 entscheidend für die Lethalität der mutanten ckoBmp10/CMV-Cre oder ckoBmp10/Nkx2.5-Cre Tiere ist. Um diesen Verdacht zu untersuchen, wurde die Hybridlinie ckoBmp10/ $\alpha$ MHC-Cre/TEK-Cre generiert und auch ihre Nachkommenschaft auf die Anwesenheit mutanter ckoBmp10<sup>flox/flox</sup>/ $\alpha$ MHC-Cre<sup>pos</sup>/TEK-Cre<sup>pos</sup> Tiere untersucht. Tatsächlich fanden sich diese unter ihnen, was zeigt, dass auch der kombinierte endokardiale und myokardiale BMP10-Verlust keinen dramatischen Einfluss auf die Entwicklung des Kraft-entfaltenden ventrikulären Herzmuskels hat. Jedoch muss nun in anschließenden Expressionsanalysen geprüft werden, ob, wie bei Gaussin *et al.*, auch in der ckoBmp10 Linie die  $\alpha$ MHC-CRE tatsächlich die gewünschte ubiquitäre Bmp10 Deletion in Kardiomyozyten an E11.5 ermöglicht hat. Erst mit den hier gewonnen Erkenntnissen ließe sich zweifelsfrei behaupten, dass BMP10 ab E11.5 für die Zunahme an myokardialer Masse entbehrlich ist.

Es lässt sich jedoch schlussfolgern, dass allein die myokardiale Bmp10 Expression zwischen E8.75 und E11.5 für eine normale Herzentwicklung essentiell ist, oder aber extrakardiales Bmp10 eine entscheidende Rolle während der frühen Kardiogenese spielt. Die erste These ließe sich mit einer CRE-Linie überprüfen, welche CRE so früh exklusiv in Kardiomyozyten exprimiert, dass die *Bmp10* Deletion bereits an E8.75 vollständig ist. Ein guter Kandidat wäre hier die *xMLC2-Cre* Linie (Breckenridge, Kotecha et al. 2007). Erzeugt der Verlust im kritischen Zeitraum E8.75 – E11.5 keinen mit dem ckoBmp10/Nkx2.5-Cre vergleichbaren Phänotyp, könnte zunächst zusätzlich die *TEK-Cre* Linie eingekreuzt werden, um die endokardiale Bmp10 Expression ebenfalls zu unterbinden. Kann auch dies keine ckoBmp10/Nkx2.5-Cre Phänotyp vermitteln, muss die zweite formulierte These überprüft werden. Jedoch ist es sehr unwahrscheinlich, dass allein das Kiemenbogen- oder Leber-exprimierte BMP10 eine solch essentielle Funktion in der Kardiogenese übernimmt, insbesondere da nur vereinzelte Zellen in Kiemenbögen und Leber an E9.5 BMP10 exprimieren.

### **5.3 Die Rosa26-Bmp10 Mauslinie ermöglicht räumlich und zeitlich gesteuerte BMP10 Funktionsgewinnanalysen *in vivo***

Es ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen eine konditionelle BMP10 überexprimierende Mauslinie zu generieren. Durch die Integration der codierenden Sequenz des humanen Bmp10, fusioniert mit einer *IRES-GFP* Kassetten sowie einem vorgeschalteten *loxP*-flankierten Transkriptionsstopp, in den ubiquitär exprimierten *Rosa26*-Locus ist es möglich, die Transkription des Bmp10 Transgens gezielt durch das Einkreuzen spezifischer CRE-exprimierender Mauslinien zu induzieren. Das von der bicistronischen mRNA *huBmp10-IRESGFP* codierte, grün fluoreszierende GFP Protein ermöglicht dabei die leichte visuelle Nachverfolgung der Bmp10 Expression (Kapitel 4.3).

Das humane BMP10 ist zu 85% identisch mit dem murinen BMP10. Betrachtet man nur das reife, prozessierte Protein besteht sogar eine 98%ige Homologie. Die ektopische Expression des humanen BMP10 sollte deshalb die gleichen Effekte hervorrufen, wie sie durch das murine BMP10 erzeugt werden. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst getestet, ob die Überexpression im Myokard mithilfe einer  $\alpha$ MHC-Cre Linie ein ähnlichen Phänotyp verursacht wie der 2006 von Chen et al. beschriebene Phänotyp der  $\alpha$ MHC-Bmp10 transgenen Linie. Seine Gruppe hatte gezeigt, dass die postnatale ektopische Bmp10 Expression im ventrikulären Myokard das hypertrophe Wachstum der Herzen behindert und in kleineren Herzen resultiert.

Die ersten Betrachtungen der transgenen Rosa26-Bmp10/ $\alpha$ MHCcre Herzen machten bereits deutlich, dass die myokardial exprimierte CRE Rekombinase wie geplant die ektopische Bmp10

Expression im Herzen ermöglicht. Die mutanten Herzen zeigten nämlich eine deutlich von der Autofluoreszenz unterscheidbare GFP-Fluoreszenz. Weitere Analysen mutanter Herzen bestätigten darüber hinaus, dass die ektopische Expression des humanen Bmp10 vom Rosa26-Locus von physiologischer Relevanz ist (Kapitel 4.3.1). Wie in der  $\alpha$ MHC-Bmp10 induzierte das ektopische BMP10 kleinere Herzen. Zwar ist der Rosa26-Bmp10/ $\alpha$ MHC-Cre Phänotyp etwas milder als der der  $\alpha$ MHC-Bmp10 Maus, dennoch ist die Reduktion des Herzgewichts signifikant. Die in ihrer Ausprägung abweichenden Phänotypen sind wahrscheinlich in unterschiedlichen BMP10 Expressionsniveaus begründet. Jene werden durch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren, als auch durch die Unterschiede der epigenetischen Transkriptionskontrolle in verschiedenen Hintergründen verursacht: Rosa26-Bmp10/ $\alpha$ MHC-Cre (129/C57Bl6) vs.  $\alpha$ MHC-Linie (DBA/2J/C57B6). Dennoch hat dieses Experiment zweifelsfrei bewiesen, dass die Rosa26-Bmp10 Linie geeignet ist, räumlich- und zeitlich definierte BMP10 Funktionsgewinnanalysen durchzuführen.

### **5.3.1 Ektopische Bmp10 Expression im Endothel induziert transiente dorsonucheale Ödeme, doch ihre Bedeutung für das adulte System bleibt vorerst ungeklärt**

Die Untersuchungen des konditionelle Bmp10 Knock-outs haben die Bedeutung von BMP10 für Umbauprozesse im peripheren vaskulären System aufgedeckt (Kapitel 4.2.7.2). Doch auch mithilfe von Funktionsgewinnanalysen wurde versucht, der Bedeutung des kardial exprimierten Bmp10 im gesamten Herzkreislaufsystem auf die Spur zu kommen.

In einem weiteren Experiment wurde deshalb die *Rosa26-Bmp10* Linie mit der Tamoxifen-induzierbaren VECadherin-CreERT (*Monvoisin, Alva et al. 2006*) Linie verpaart. Die Gabe von Tamoxifen in der Schwangerschaft induzierte die ektopische Bmp10 Expression in endothelialen Zellen während der frühen Embryogenese (ab  $\sim$ E11.5) und verursachte so die Ausprägung dorsonuchealer Ödeme an Embryonaltag E14.5.

Die Ursachen für Ödembildungen während der Embryonalentwicklung sind mannigfaltig. Zunächst wurde überprüft, ob das endothelial exprimierte Bmp10 einen Verlust der vaskulären Integrität bedingt, der ursächlich für einen übermäßigen Flüssigkeitsaustritt und schließlich die Ödembildung sein könnte. Doch es konnten keinerlei Hinweise auf ein defektes Endothel gefunden werden (Kapitel 4.3.2). In der Humanmedizin, bei der Pränataldiagnostik, ist die Bildung von Ödemen oft ein Indiz für Chromosomenanomalien, wie sie im Turner-Syndrom, Edwards-Syndrom und anderen gefunden werden. Sie kann aber auch ein Indiz für organische Fehlbildungen sein, die nicht mit einer karyotypischen Anomalie korrelieren. Bei diesen organischen Fehlbildungen handelt es sich

häufig um kardiovaskuläre Defekte, wie atrioventrikuläre Septumdefekte oder Trikuspidalatresien. Doch auch Fehlbildungen wie die Zwerchfellhernie oder Aortenisthmusstenose und die damit einhergehenden hämodynamischen Veränderungen im vaskulären System korrelieren mit dem Vorhandensein dorsonuchealer Ödeme (Hyett 2002; Galindo, Comas et al. 2003; Vogel, Sharland et al. 2009). Weitere systematische, morphologische Analysen der mutanten Embryonen müssen nun diese organischen Ursachen abklären. Darüber hinaus sollte eine genauere Betrachtung des lymphatischen Systems folgen. Denn auch vergrößerte juguläre Lymphsäcke können nuchealen Ödemen zugrunde liege und stellen eine Verbindung zur gestörten Modellierung des endothelialen Systems her (Haak, Bartelings et al. 2002), wie man sie durch die Endothel-spezifische ektopische Expression eines Transgens erwarten könnte.

Da der konditionelle Knock-out gezeigt hat, dass der Verlust des atrialen BMP10 nach vaskulärer Okklusion im Hinterbein zur verminderter Arteriogenese führt (Kapitel 5.2.2.2), sollte mithilfe der *Rosa26-Bmp10* Linie die Wirkung eines Überangebots an Bmp10 nicht nur im embryonalen, sondern auch im adulten vaskulären System studiert werden. Da Tamoxifen als Östrogen-Analogon zum Abort der *Rosa26-Bmp10/VE-CadherinCreERT* Embryonen um E18.5 führt, war es in diesen Tieren leider kaum möglich zu untersuchen, ob die ektopische Expression im Endothel einen positiven Effekt auf die *A. femoralis* Ligatur induzierte Arteriogenese hätte. Die mutanten E18.5 Embryonen hätten durch einen Kaiserschnitt entnommen und durch Ammentieren versorgt werden müssen. Jedoch sind die Ausfälle bei dieser Methode relativ hoch, da die Amme die Jungtiere oft nicht annimmt.

*Rosa26-Bmp10/VECadherinCreERT* Tiere könnten auch erst in adulten Stadien mit Tamoxifen induziert werden. *VECadherinCreERT/Rosa26-LacZ* Mäuse, denen für fünf Tage jeweils 2 mg intraperitoneal Tamoxifen injiziert wurden, weisen in verschiedenen Organen eine 71-92%ige Rekombinationsrate in endothelialen Zellen auf (Monvoisin, Alva et al. 2006). Für die Untersuchung der Arteriogenese im „*A. femoralis* Ligatur“-Modell müssten die *Rosa26-Bmp10/VE-CadherinCreERT* Tiere zuvor fünf Tage zusätzlich intraperitoneal gespritzt werden. Dies würde enormen Stress für Tiere bedeuten, was sich auf den Versuchsablauf negativ auswirken könnte. Um diese Problematik zu umgehen, ist die *Rosa26-Bmp10* Linie mit der konstitutiven *Flk1-Cre* Linie verpaart worden. Es zeigte sich, dass mutante *Rosa26-Bmp10<sup>+/-</sup>/Flk1-Cre<sup>pos</sup>* und *Rosa26-Bmp10<sup>-/-</sup>/Flk1-Cre<sup>pos</sup>* Nachkommen, anders als die mutanten *Rosa26-Bmp10/VE-CadherinCreERT* Embryonen, keine Ödeme an E14.5 aufwiesen. Sie reifen ohne Auffälligkeiten zu fertilen adulten Tieren heran. Dies mag in der weniger breiten CRE Expression in der *Flk1-Cre* Linie begründet sein. Anders als durch die *VE-CadherinCreERT* Linie, wird durch die *Flk1-Cre* Linie in der *Rosa26-LacZ* Reporterline beispielsweise keine Rekombination im ventrikulären Endokard (Kapitel 4.2.8.4) und kaum Rekombinationsereignisse in pulmonalen Endothelzellen (Licht, Raab et al.

2004) vermittelt. Ob sich die *Flk1-Cre* Expression von der beschriebenen VECadherin-CreERT Expression noch in weiteren Kompartimenten des vaskulären System unterscheidet, ist jedoch nicht weiter Gegenstand der vorliegenden Arbeit gewesen. Dennoch könnte die die *Rosa26-Bmp10/Flk-1-Cre* Linie verwendet werden, zu überprüfen, ob ein Überangebot an BMP10 im vaskulären System das Wachstum von Kollateralen nach *A. femoralis* Ligaturen begünstigt. So wie der Verlust von BMP10 im kardiovaskulären System das kollaterale Wachstum behindert (Kapitel 5.2.2.2). Doch zunächst muss zwingend überprüft werden, ob in der *Rosa26-Bmp10/Flk-1-Cre* Maus BMP10 tatsächlich im Endothel der Kollateralen des Hinterlaufs exprimiert wird.

#### **5.4 Die konditionelle Expression inhibitorischer SMADs unterstreicht die Notwendigkeit einer balancierten BMP-Signalgebung und ermöglicht die Identifizierung BMP/Smad-sensitiver Ziele**

Nicht allein die Untersuchung des Liganden BMP10 und seine Bedeutung für das kardiovaskuläre System war im Focus dieser Arbeit, sondern auch globale Veränderungen in der BMP Signalgebung und ihre Bedeutung für die Herzentwicklungen wurden untersucht. Dies gelang durch die ektopische Expression inhibitorischer Smads *in vivo*.

Aufgrund der essentiellen Bedeutung von BMPs für die frühe Embryonalentwicklung, könnten bereits kleinste Unterschiede in der räumlichen und zeitlichen Expression der BMP/Smad-Inhibitoren zu empfindlichen Störungen der Embryogenese führen. Um diese Problematik zu umgehen, wurden konditionelle Mausmodelle generiert, die die ektopische Expression von I-Smads räumlich und zeitlich steuerbar machten und somit einen früh lethalen Phänotyp umgehen sollten, welcher bei einer vollständigen Unterdrückung der BMP/Smad Signale unvermeidbar wäre.

Die gerichtete Insertion der codierenden Sequenzen von humanen I-Smads in den ubiquitär exprimierten *Rosa26-Locus* (Soriano 1999) sowie einer vorgeschalteten *loxP*-flankierten Stopp-Kassette und einer nachgeschalteten IRES-GFP Kassette ermöglichte genau dieses: Die CRE-abhängige, moderate Expression von Smad-IRES-EGFP, wobei die gekoppelte GFP-Expression eine visuelle Kontrolle der Expression des Transgens von dem mutanten Locus ermöglichte. Allerdings gelang die ektopische I-Smad Expression in der Maus nur im Fall von *Smad6*. Obwohl die codierende *Smad7* Sequenz, genau wie die *Smad6* Sequenz, in den *Rosa26-Locus* durch homologe Rekombination integriert worden war und das gewünschte Rekombinationsereignis mittels Southern Blot Analysen und PCRs auf genomischer DNA bestätigt wurde, konnte keine ektopische *Smad7* Expression erzielt werden (Kapitel 4.4.1 und Kapitel 4.4.3). Es bleibt zu klären, was der Grund für die verhinderte Transkription ist. Möglicherweise bedingt die *Smad7* Sequenz

eine Tertiärstruktur der DNA, die die Zugänglichkeit der *loxP*-Elemente der STOPP-Kassette für die CRE-Rekombinase behindert und so die Deletion der STOPP-Kassette verhindert. Oder aber die gebildete Tertiärstruktur behindert die Bindung von notwendigen Transkriptionsfaktoren an den Rosa26-Promotor.

#### **5.4.1 Der Rosa26-Promotor ermöglicht die konditionelle Expression physiologisch relevanter Dosen des inhibitorischen Smad6**

Die generierte Rosa26-Smad6 Line ist geeignet, den Inhibitor des Bmp/Smad Signalwegs, SMAD6, konditionell ektopisch zu exprimieren. Durch die Verpaarung mit der T(S)-Cre Linie konnte bewiesen werden, dass die CRE-Vermittelte Deletion der STOPP-Kassette in den Rosa26-Smad6 Tieren die Smad6 Expression vom Rosa26-Locus in physiologisch relevanten Mengen ermöglicht (Kapitel 4.4.3).

Die mesodermale SMAD6 Expression bedingte, wie erwartet, einen frühen lethalen Phänotyp. Von konditionellen BMP bzw. BMP-Rezeptoren Knock-outs ist bekannt, dass BMPs für die mesodermale Entwicklung und Differenzierung eminent wichtig sind (Kapitel 2.2). Insbesondere während der Herzentwicklung sind es FGFs, Wnt-Inhibitoren und BMP Signale des Endo- und Ektoderms, die im laterale Plattenmesoderm die Expression von Herz-spezifischen Transkriptionsfaktoren wie *Nkx2.5* und *GATA4*, induzieren und das kardiale Schicksal der mesodermalen Zellen festlegen (*van Wijk, Moorman et al. 2007; Nakajima, Sakabe et al. 2009*). Die T(S)-Cre vermittelte Deletion der STOPP-Kassette und die resultierende *Smad6* Expression ist der initialen Differenzierung mesodermaler Zellen zu Kardiomyozyten zeitlich nachgeschaltet und interferiert deshalb nicht mit der Entwicklung des jungen Herzen. Das primitive Herz und ein zirkulatorisches System hat sich deshalb auch in den mutanten *Rosa26-Smad6<sup>+/-</sup>/T(S)-Cre<sup>pos</sup>* Embryonen entwickelt. Möglicherweise sind es die komplexen morphologischen Prozesse, die im weiteren Verlauf der Kardiogenese zu Entwicklung des vier-kammerigen Herzen beitragen, welche durch SMAD6 gestört werden. Die verschiedenen konditionellen BMP bzw. BMP-Rezeptor Knock-outs haben gezeigt, dass BMPs in dieser Phase der Herzentwicklung für die Entwicklung der kardialen Kissen, die Septierung und Trabekulierung essentiell sind (Kapitel 25). Genauere histologische Untersuchungen der mutanten Rosa26-Smad6/T(S)-Cre Embryonen könnten zeigen, wie sich die ektopische Smad6 Expression im Mesoderm und seinen Derivaten morphologisch auf diese Prozesse auswirkt. Doch auch andere morphogenetische Prozesse, abseits des Herzens, könnten durch ektopisches mesodermales SMAD6 beeinträchtigt sein und zur Lethalität beitragen.

#### **5.4.2 Die ektopische Herz-spezifische SMAD6 Expression resultiert in Septumdefekten**

Um die Bedeutung einer balancierten BMP Signalgebung im Herzen näher zu untersuchen, wurde die Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Hybridlinie gewählt. Dies schien geeigneter als die weitere Analyse der Rosa26-Smad6/T(S)-Cre Linie, da hier kardiale Phänotypen durch extrakardiale Defekte, herbeigeführt durch die SMAD6 Expression in allen mesodermalen Derivaten, verschleiert werden könnten. Die Nkx2.5-Cre Linie exprimiert CRE ähnlich früh, aber deutlich restriktiver im Herzen als die T(S)-Cre Linie und schien deshalb für die Untersuchung des BMP-Signalgebung im Herzen geeigneter (Kapitel 5.2.3.1).

Die kardiale - Nkx2.5-Cre vermittelte - SMAD6 Expression führte zur Ausbildung ventrikulärer Septumdefekte, welche kurz nach der Geburt in Zyanose und schließlich im Tod der Neugeborenen resultierte (Kapitel 4.4.5). Wie erhofft, hat die ektopische Smad6 Expression nicht zur einer völligen Unterdrückung der BMP/Smad Signalgebung geführt. Diese hätte vermutlich zu einem früh lethalen Phänotypen geführt, ähnlich wie in verschiedenen kardialen Bmp oder BMP-Rezeptor Knock-outs. Als Beispiele seien hier der kardiale *Bmp2 Knock-out* *Bmp2<sup>tm1Jfm</sup>/Nkx2.5-Cre*, der aufgrund einer fehlenden Anlage von Endokardkissen bereits an E10.5 lethal ist, sowie der kardiale *Bmp4 Knock-out* *Bmp4<sup>tm1Jfm</sup>/Nkx2.5-Cre*, der um E13.5 mit Septumdefekten im Ausflusstrakt und den Ventrikeln embryonal lethal ist, genannt.

Um die Auswirkungen der ektopischen Expression des BMP/Smad Inhibitors auf transkriptioneller Ebene auslesen zu können, und so Bmp sensitive Zielgene zu identifizieren, wurde eine Microarray-Analyse von mutanten und wildtypischen Herzen durchgeführt.

#### **5.4.3 SMAD6 - ein potentieller Inhibitor der DROSHA-abhängigen MicroRNA-Prozessierung in vivo**

Wie eingangs ausgeführt, inhibieren die I-Smads die BMP Signalkaskade auf verschiedenen Ebenen. Zum einen kompetitiv, indem sie mit R-Smads um die Bindung an den TGF- $\beta$  Rezeptorkomplex oder um das Co-Smad4 konkurrieren. Außerdem vermitteln sie die Ubiquitin-abhängige Degradierung verschiedener Komponenten des Signalwegs. Und auch im Zellkern können die I-Smads negativ mit dem BMP Signalweg interferieren, indem sie mit Transkriptionsrepressoren wie Histon-Deacetylasen interagieren, um so die Expression von BMP Zielgenen reprimieren.

Die Microarray-Analysen lassen nicht darauf schließen, welcher inhibierende Mechanismus im Speziellen greift, aber sie konnte zeigen welche Zielgene im Herzen sensitiv auf ein Überangebot von Smad6 reagieren. Überraschenderweise ist die Expression vieler Micro-RNAs negativ durch SMAD6 reguliert. Und gerade die *Top Score Hits* sind mRNAs, die in Clustern vorliegen, d.h. sich

im Genom in räumlicher Nähe befinden und deren Transkription durch die selben Elemente gesteuert werden. Teilweise befinden sie sich in transkribierten, intragenischen Bereichen, jedoch ist keines der überlappenden Transkripte im Microarray-Screen reguliert gewesen (Kapitel 4.4.6, Tabelle 12). Daher drängt sich der Verdacht auf, dass eher BMP/Smad-beeinflusste posttranskriptionelle Regulationsmechanismen für die negative Regulation der MicroRNAs in mutanten Herzen verantwortlich sind.

Im Jahr 2008 sind Daten veröffentlicht worden, die zeigen, dass Rezeptor-regulierte Smads an der posttranskriptionellen Prozessierung von MicroRNAs beteiligt sind. Brandi N. Davis *et al.* haben gezeigt, dass R-Smads die DROSHA-abhängige Prozessierung des *miR-21* Primärtranskripts (*miR-21*) positiv beeinflussen, und dass dieser Effekt Primärtranskript-spezifisch ist (Davis, Hilyard *et al.* 2008). Wenig später hat dieselbe Gruppe eine erweiterte Liste an MicroRNAs veröffentlicht, die wahrscheinlich ebenfalls durch TGF- $\beta$  oder BMP aktivierte R-SMADs reguliert werden (Davis, Hilyard *et al.* 2010). Der Abgleich mit den in SMAD6 überexprimierenden Herzen regulierten MicroRNAs zeigt, dass es hier einen Überlapp gibt. Während BMP4 und/oder TGF- $\beta$  in humanen primären pulmonalen glatten Muskelzellen die microRNAs *hsa-mir-23a*, *hsa-mir-23b* und *hsa-mir-487b* positiv regulieren, findet sich im SMAD6 überexprimierenden Herzen die negative Regulation der konservierten MicroRNAs *mmu-mir-23a*, *mmu-mir-23b* und *mmu-mir-487b*. Vergleichende Expressionsanalysen der pri- und prä-MicroRNAs werden zeigen, ob Smad6 tatsächlich die BMP/Smad vermittelte DROSHA-abhängige Prozessierung inhibiert.

#### **5.4.4 Smad6 vermittelt die negative Genregulation von Faktoren, die bekanntermaßen in Kardiopathien involviert sind**

Neben den negativ regulierten MicroRNAs fanden sich, zahlenmäßig überwiegend, auch Proteincodierende mRNAs, die in den SMAD6 überexprimierenden Herzen reguliert waren (Kapitel 4.4.6). Von diesen ist nur eine Minderheit (42 RNAs) bei Unigene als im Herzen exprimiert aufgeführt. Das liegt zum einen daran, dass von den 238 annotierten RNAs nur 114 bei Unigene annotiert sind, da MicroRNAs und andere nicht-codierende RNAs nicht gelistet sind. Darüber hinaus bezieht sich die kardiale Expression, welche bei Unigene vermerkt ist, auf die adulte kardiale Expression. Die embryonale kardiale Expression ist nicht gesondert in der Unigene Datenbank annotiert. Von den 114 Unigene annotierten RNAs ist die Mehrheit von 80 RNAs in embryonalen Geweben exprimiert. Unter befindet sich ebenfalls die 42 RNAs, die auch im adulten Herzen exprimiert werden. Die Ausschlussmenge umfasst wahrscheinlich eine nicht zu vernachlässigende Anzahl an RNAs, die differentiell im embryonalen und adulten Herzen exprimiert wird.

Unter den differentiell exprimierten RNAs der wildtypischen und mutanten Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen, welche laut Unigene in adulten Herzen exprimiert werden, finden sich viele, die bekanntermaßen in die Herzentwicklung und Homöostase involviert sind oder mit Komponenten des BMP-Signalwegs interferieren (Tabelle 14). Insbesondere Cyr61 ist ein interessanter Kandidat, der vermutlich für die Septumdefekte in den mutanten Herzen verantwortlich ist. Denn ähnlich wie die SMAD6 überexprimierenden Herzen, leidet der *Cyr61 Knock-out* an atrioventrikulären Septumdefekten. Sogar haploinsuffiziente Cyr61 Tiere (*Cyr61*<sup>+/-</sup>) weisen in 20% der Fälle persistierende atriale Septumdefekte auf (*Mo and Lau 2006*).

**Tabelle 14: Smad6-regulierte RNAs bzw. Gene, die bekanntermaßen an der kardialen Entwicklung oder Organhomöostase beteiligt sind oder mit Komponenten des BMP-Signalwegs direkt oder indirekt interferieren.**

| Gen          | Ausgewählte Funktionen und Phänotypen   |
|--------------|---|
| <b>Atf3</b>  | <i>Atf3 KO</i> hat keinen beschriebenen Herz-Phänotyp, aber Inflammation der Lunge ( <i>Gilchrist, Henderson et al. 2008</i> ); TGF- $\beta$ R-Smad3 aktiviert die ATF3 Expression und rekrutiert ihn für den <i>Id1</i> Promotor, wo es die ID1 Expression reprimiert ( <i>Kang, Chen et al. 2003</i> ).   |
| <b>Nr4a1</b> | <i>Nr4a1 KO</i> hat keinen beschriebenen Herz-Phänotyp ( <i>Crawford, Sadovsky et al. 1995</i> ). AP-1 (c-Fos/c-Jun) bindet und transaktiviert den Nr4a1 Promotor ( <i>Wu, Lin et al. 2010</i> ). Transkriptioneller Regulator in Endothel- und glatten Muskelzellen ( <i>Zhao and Bruemmer 2010</i> ).     |
| <b>Btg2</b>  | <i>Btg2 KO</i> Mäuse zeigen posterior-homöotische Transformationen der axialen Wirbel. Biochemische Evidenzen deuten auf eine Interaktion zwischen Btg2 und Smad1/5/8 hin ( <i>Park, Lee et al. 2004</i> ).   |
| <b>Dusp1</b> | <i>DUSP-1 KO</i> ist lebensfähig und weist keinen Herz-Phänotyp auf. Vermutlich substituieren verwandte Phosphatasen seine Funktion ( <i>Dorfman, Carrasco et al. 1996</i> ). Bmp2 induziert die DUSP1 Expression ( <i>Ghayor, Ehrbar et al. 2009</i> ).  |
| <b>Cyr61</b> | <i>Cyr61 KO</i> leidet an atrioventrikulären Septumdefekten. Sogar haploinsuffiziente Cyr61 Tiere weisen in 20% der Fälle atriale Septumdefekte auf ( <i>Mo and Lau 2006</i> ). Die Cyr61 Transkription wird durch TGF- $\beta$ aktiviert ( <i>Bartholin, Wessner et al. 2007</i> ).                        |
| <b>Jun</b>   | Der Verlust von c-Jun verursacht Missbildungen des OFT ( <i>Eferl, Sibia et al. 1999</i> ).   |
| <b>Ctgf</b>  | <i>CTGF KO</i> stirbt kurz nach der Geburt aufgrund von Atemproblemen, die scheinbar durch Missbildungen des Brustkorbs hervorgerufen werden ( <i>Ivkovic, Yoon et al. 2003</i> ). Ctgf Expression wird auch von Smads reguliert ( <i>Leask and Abraham 2006</i> ).   |
| <b>Lphn2</b> | Latrophilin-2 ist an Umbauprozessen des atrioventrikulären Kanals beteiligt ( <i>Doyle, Scholz et al. 2006</i> ).   |
| <b>Sgk1</b>  | Sgk1 reguliert die Expression von CTGF ( <i>Vallon, Wyatt et al. 2006</i> ).  |
| <b>Klf9</b>  | <i>Klf9 KO</i> Tiere weisen lediglich milde neurologische Defekte auf, doch Untersuchungen von humanen Patienten mit VSD im Vergleich zu gesunden Patienten haben ergeben, dass die Klf9 Expression im septalen Myokardium reguliert ist ( <i>Morita, Kobayashi et al. 2003; Zhang, Zhou et al. 2006</i> ). |
| <b>Trdn</b>  | Triadin ist wichtig für die Organisation des sarcoplasmatischen Retikulums ( <i>Knollmann 2009</i> ).   |
| <b>Ipo7</b>  | Importin 7 ist an dem nukleären Transport der SMADs beteiligt ( <i>Yao, Chen et al. 2008</i> ).   |
| <b>Xirp2</b> | Adulte hypomorphe <i>Xirp2</i> Mäuse weisen kardiale Hypertrophie auf ( <i>McCalmon, Desjardins et al. 2010</i> ).  |

Cyr61 gehört zur CCN Familie matrizellulärer Proteine. Diese umfasst sechs Mitglieder kleiner sekretierter Cystein-reicher Proteine: CCN1 (Cyr61), CCN2 (CTGF), CCN3 (Nov), CCN4 (ELM-1, Wisp-1), CCN5 (rCOP-1, Wisp-2, *CTGF-L*) und CCN6 (Wisp-3). Sie sind Schlüssel-moleküle in Prozessen wie der Zellproliferation, Angiogenese, Tumorgenese und Wundheilung. Sie binden Wachstumsfaktoren der BMP-Familie und bewirken so ein inhibitorischen Effekt (*Katsube, Sakamoto et al. 2009*). Für *Cyr61* ist sogar bereits gezeigt worden, dass sein Promotor Konsensus-Sequenzen umspannt, die SMAD Proteine binden (*Bartholin, Wessner et al. 2007*).

Vermutlich interferiert SMAD6 mit einer R-Smad vermittelten *Cyr61* Transkription und bewirkt so die um Faktor 1.97 erniedrigte (sprich 50% geringere) Menge an Transkripten, die genau wie im *Cyr61 Knock-out* oder auch in haploinsuffizienten *Cyr61<sup>+/-</sup>* Herzen zu Septumdefekten führt. Die Ausbildung der Septumdefekte wird darüber hinaus mutmaßlich durch die negative Regulation der anderen aufgeführten Faktoren (Tabelle 14) verstärkt. Apoptose-Assays könnten zeigen, ob in den mutanten Rosa26-Smad6/Nkx2.5-Cre Herzen die Nicht-Septierung, wie im *Cyr61 KO*, auf eine verstärkte und frühzeitige Apoptose in den endokardialen Kissen zurückzuführen ist.

#### **5.4.5 Smad6 Expression im postnatalen Herzen – Die Chance die Bedeutung der Bmp-Signalgebung in pathologischen Umbauprozessen zu erhellen**

Bisher ist nur wenig über die Bedeutung der BMP/Smad Signale für Kardiopathien bekannt, da zumeist der TGF- $\beta$ /Smad Signalweg im Focus war. Doch es sein zwei Berichte genannt, die eine Beteiligung des BMP/Signalwegs belegen. Im Jahr 2009 konnten Y. Xia *et al.* zeigen, dass im Mausmodell der TAC-induzierten linksventrikulären Hypertrophie nicht nur der intrazellulären TGF- $\beta$  Mediator SMAD2 sondern auch die BMP Mediatoren SMAD1 und 5 phosphoryliert und somit aktiviert wurden (Xia, Lee *et al.* 2009). Mithilfe des *Bmp4* Knock-outs konnten A. S. Pachouri *et al.* 2010 ganz konkret zeigen, dass BMP4 die Myokardinfarktgröße beeinflussen kann. In dem Modell des Ischämie-Reperfusion induzierten Myokardinfarkts zeigten sie, dass verminderte BMP4 Level in den heterozygoten *Bmp4 KO* Tieren zu reduzierten Infarktgröße führen (Pachori, Custer *et al.* 2010).

Mit der in dieser Arbeit generierten Rosa26-Smad6 Linie ist nun ein Werkzeug in unseren Händen, um die Bedeutung des Bmp-Signalwegs in verschiedenen Krankheiten zu testen. Für Studien seiner Bedeutung für Kardiopathien würde sich besonders die Rosa26-Smad/Ckmm-Cre Linie eignen. Erste Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass diese Linie unter normalen Haltungsbedingungen eine wildtypische Lebenserwartung hat. Somit schient die postnatale kardiale Smad6 Überexpression keinen dramatischen Effekt auf die Homöostase des Herzens zu haben (Kapitel 4.4.3). Der Einsatz dieser Linie in verschiedene murine Kardiopathie-Modelle könnte zeigen, ob die Expression des BMP/Smad Inhibitors Smad6 den jeweiligen Krankheitsverlauf beeinflusst. So wird die Analyse der *Rosa26-Smad6/Ckmm-Cre* Linie vor dem Hintergrund verschiedener Kardiopathie-Modelle in Zukunft wesentlich zum Verständnis der BMP/Smad Signalgebung in Umbauprozessen des Herzen beitragen können und die Entwicklung neuer Therapieansätze für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen befördern.

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

|               |  |
|---------------|--|
| <b>µg</b>     | Mikrogramm   |
| <b>µl</b>     | Mikroliter   |
| <b>µm</b>     | Mikrometer   |
| <b>1. AK</b>  | primärer Antikörper  |
| <b>2. AK</b>  | sekundärer Antikörper  |
| <b>AVC</b>    | atrioventrikulärer Kanal   |
| <b>bp</b>     | Basenpaare   |
| <b>BSA</b>    | Bovine Serum Albumin, Albumin Fraktion V                             |
| <b>CMV</b>    | Cytomegalievirus   |
| <b>DAB</b>    | 3,3'-Diaminobenzidin   |
| <b>DEPC</b>   | Diethylpyrocarbonat  |
| <b>DMSO</b>   | Dimethylsulfoxid   |
| <b>DORV</b>   | Double outlet right ventricle, <i>engl.</i>                          |
| <b>E</b>      | Embryonaltag   |
| <b>EDTA</b>   | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| <b>EMT</b>    | Endothelial-mesenchymale Transformation                              |
| <b>engl</b>   | englisch   |
| <b>FCS</b>    | fötales Kälberserum  |
| <b>g</b>      | Gramm  |
| <b>GDF</b>    | Growth Differentiation Factor, <i>engl.</i>                          |
| <b>GFP</b>    | Grün-fluoreszierendes Protein  |
| <b>h</b>      | Stunde   |
| <b>HEPES</b>  | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure                      |
| <b>IRES</b>   | Interne ribosomale Eintrittsstelle                                   |
| <b>kb</b>     | Kilobasen  |
| <b>KO</b>     | Knock-out  |
| <b>L</b>      | Liter  |
| <b>LA</b>     | Linkes Atrium  |
| <b>LIF</b>    | Leukemia Inhibitory Factor, <i>engl.</i>                             |
| <b>LV</b>     | Linker Ventrikel   |
| <b>min</b>    | Minute   |
| <b>ml</b>     | Milliliter   |
| <b>NCC</b>    | Neural crest cells, <i>engl.</i> , Neuralleistenzellen               |
| <b>neg</b>    | Negativ  |
| <b>Nkx2.5</b> | NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)               |
| <b>Nppa</b>   | Natriuretic peptide precursor type A, <i>engl.</i>                   |
| <b>OFT</b>    | Ausflustrakt   |
| <b>P</b>      | Post natum ( <i>lat.</i> )   |
| <b>PBS</b>    | Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)           |
| <b>PCR</b>    | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, <i>engl.</i> ) |
| <b>pos</b>    | Positiv  |
| <b>RA</b>     | Rechtes Atrium   |
| <b>RV</b>     | Rechter Ventrikel  |
| <b>SDS</b>    | Natriumdodecylsulfat   |
| <b>sec</b>    | Sekunde  |
| <b>SSC</b>    | Saline-Sodium Citrate ( <i>engl.</i> )                               |
| <b>TAC</b>    | transverse Aortenkonstriktion  |
| <b>TGF-β</b>  | Transforming growth factor   |
| <b>Tris</b>   | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                                     |
| <b>VSD</b>    | Ventrikulärer Septumdefekt   |

## 7 LITERATUR:

- Adams, D. J., M. A. Quail, et al. (2005). "A genome-wide, end-sequenced 129Sv BAC library resource for targeting vector construction." *Genomics* **86**(6): 753-758.
- Agah, R., P. A. Frenkel, et al. (1997). "Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo." *The Journal of clinical investigation* **100**(1): 169-179.
- Alarcon, C., A. I. Zaromytidou, et al. (2009). "Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways." *Cell* **139**(4): 757-769.
- Andre, F. and L. M. Mir (2004). "DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications." *Gene therapy* **11 Suppl 1**: S33-42.
- Arias-Stella, J. and M. Saldana (1963). "The Terminal Portion of the Pulmonary Arterial Tree in People Native to High Altitudes." *Circulation* **28**: 915-925.
- Bartholin, L., L. L. Wessner, et al. (2007). "The human *Cyr61* gene is a transcriptional target of transforming growth factor beta in cancer cells." *Cancer letters* **246**(1-2): 230-236.
- Beppu, H., M. Kawabata, et al. (2000). "BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos." *Dev Biol* **221**(1): 249-258.
- Beppu, H., H. Lei, et al. (2005). "Generation of a floxed allele of the mouse BMP type II receptor gene." *Genesis (New York, N Y : 2000)* **41**(3): 133-137.
- Beppu, H., R. Malhotra, et al. (2009). "BMP type II receptor regulates positioning of outflow tract and remodeling of atrioventricular cushion during cardiogenesis." *Dev Biol* **331**(2): 167-175.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523.
- Blitz, I. L. and K. W. Cho (2009). "Finding partners: how BMPs select their targets." *Dev Dyn* **238**(6): 1321-1331.
- Brand, T. (2003). "Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis." *Dev Biol* **258**(1): 1-19.
- Breckenridge, R., S. Kotecha, et al. (2007). "Pan-myocardial expression of Cre recombinase throughout mouse development." *Genesis (New York, N Y : 2000)* **45**(3): 135-144.
- Brown, T. (2001). "Southern blotting." *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 2**: Unit2 9A.
- Bruneau, B. G. (2008). "The developmental genetics of congenital heart disease." *Nature* **451**(7181): 943-948.
- Bruning, J. C., M. D. Michael, et al. (1998). "A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance." *Molecular cell* **2**(5): 559-569.
- Buschmann, I. and W. Schaper (1999). "Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth." *News Physiol Sci* **14**: 121-125.
- Chandler, K. J., R. L. Chandler, et al. (2007). "Relevance of BAC transgene copy number in mice: transgene copy number variation across multiple transgenic lines and correlations with transgene integrity and expression." *Mamm Genome* **18**(10): 693-708.
- Chen, H., S. Shi, et al. (2004). "BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis." *Development (Cambridge, England)* **131**(9): 2219-2231.
- Chen, H., W. Yong, et al. (2006). "Overexpression of bone morphogenetic protein 10 in myocardium disrupts cardiac postnatal hypertrophic growth." *J Biol Chem* **281**(37): 27481-27491.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
- Christoffels, V. M., P. E. Habets, et al. (2000). "Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart." *Dev Biol* **223**(2): 266-278.
- Crawford, L. W., J. F. Foley, et al. (2010). "Histology Atlas of the Developing Mouse Hepatobiliary System with Emphasis on Embryonic Days 9.5-18.5." *Toxicol Pathol.*
- Crawford, P. A., Y. Sadovsky, et al. (1995). "Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in *NGFI-B*-deficient mice." *Molecular and cellular biology* **15**(8): 4331-4316.
- David, L., J. J. Feige, et al. (2009). "Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis." *Cytokine Growth Factor Rev* **20**(3): 203-212.
- David, L., C. Mallet, et al. (2008). "Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor." *Circ Res* **102**(8): 914-922.
- David, L., C. Mallet, et al. (2007). "Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (*ALK1*) in endothelial cells." *Blood* **109**(5): 1953-1961.
- Davis, B. N., A. C. Hilyard, et al. (2008). "SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation." *Nature* **454**(7200): 56-61.
- Davis, B. N., A. C. Hilyard, et al. (2010). "Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Droscha." *Molecular cell* **39**(3): 373-384.
- de Lange, F. J., A. F. Moorman, et al. (2003). "Atrial cardiomyocyte-specific expression of Cre recombinase driven by an *Nppa* gene fragment." *Genesis (New York, N Y : 2000)* **37**(1): 1-4.

- de Larco, J. E. and G. J. Todaro (1978). "Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **75**(8): 4001-4005.
- Delot, E. C., M. E. Bahamonde, et al. (2003). "BMP signaling is required for septation of the outflow tract of the mammalian heart." Development **130**(1): 209-220.
- Dewulf, N., K. Verschuere, et al. (1995). "Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis." Endocrinology **136**(6): 2652-2663.
- Dorfman, K., D. Carrasco, et al. (1996). "Disruption of the *erp/mkp-1* gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts." Oncogene **13**(5): 925-931.
- Doyle, S. E., M. J. Scholz, et al. (2006). "Latrophilin-2 is a novel component of the epithelial-mesenchymal transition within the atrioventricular canal of the embryonic chicken heart." Dev Dyn **235**(12): 3213-3221.
- Dudley, A. T., K. M. Lyons, et al. (1995). "A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye." Genes Dev **9**(22): 2795-2807.
- Dunwoodie, S. L. (2007). "Combinatorial signaling in the heart orchestrates cardiac induction, lineage specification and chamber formation." Seminars in cell & developmental biology **18**(1): 54-66.
- Dyer, L. A. and M. L. Kirby (2009). "The role of secondary heart field in cardiac development." Dev Biol **336**(2): 137-144.
- Eferl, R., M. Sibilica, et al. (1999). "Functions of *c-Jun* in liver and heart development." J Cell Biol **145**(5): 1049-1061.
- Eggan, K., H. Akutsu, et al. (2001). "Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(11): 6209-6214.
- El-Bizri, N., C. Guignabert, et al. (2008). "SM22alpha-targeted deletion of bone morphogenetic protein receptor 1A in mice impairs cardiac and vascular development, and influences organogenesis." Development **135**(17): 2981-2991.
- Feijen, A., M. J. Goumans, et al. (1994). "Expression of activin subunits, activin receptors and follistatin in postimplantation mouse embryos suggests specific developmental functions for different activins." Development **120**(12): 3621-3637.
- Feller, J., A. Schneider, et al. (2008). "Noncyclic Notch activity in the presomitic mesoderm demonstrates uncoupling of somite compartmentalization and boundary formation." Genes Dev **22**(16): 2166-2171.
- Galindo, A., C. Comas, et al. (2003). "Cardiac defects in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency at 10-14 weeks of gestation." J Matern Fetal Neonatal Med **13**(3): 163-170.
- Galvin, K. M., M. J. Donovan, et al. (2000). "A role for *smad6* in development and homeostasis of the cardiovascular system." Nat Genet **24**(2): 171-174.
- Gaussin, V., G. E. Morley, et al. (2005). "*Alk3/Bmpr1a* receptor is required for development of the atrioventricular canal into valves and annulus fibrosus." Circ Res **97**(3): 219-226.
- Gaussin, V., T. Van de Putte, et al. (2002). "Endocardial cushion and myocardial defects after cardiac myocyte-specific conditional deletion of the bone morphogenetic protein receptor ALK3." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2878-2883.
- Ghayor, C., M. Ehrbar, et al. (2009). "*cAMP* enhances BMP2-signaling through PKA and MKP1-dependent mechanisms." Biochem Biophys Res Commun **381**(2): 247-252.
- Gilchrist, M., W. R. Henderson, Jr., et al. (2008). "Activating transcription factor 3 is a negative regulator of allergic pulmonary inflammation." The Journal of experimental medicine **205**(10): 2349-2357.
- Goddeeris, M. M., S. Rho, et al. (2008). "Intracardiac septation requires hedgehog-dependent cellular contributions from outside the heart." Development **135**(10): 1887-1895.
- Goode, B. L. and S. C. Feinstein (1992). "'Speedprep' purification of template for double-stranded DNA sequencing." Biotechniques **12**(3): 374-375.
- Goto, K., Y. Kamiya, et al. (2007). "Selective inhibitory effects of *Smad6* on bone morphogenetic protein type I receptors." The Journal of biological chemistry **282**(28): 20603-20611.
- Graham, A. (2003). "Development of the pharyngeal arches." American journal of medical genetics Part A **119A**(3): 251-256.
- Grevellec, A. and A. S. Tucker (2010). "The pharyngeal pouches and clefts: Development, evolution, structure and derivatives." Seminars in cell & developmental biology **21**(3): 325-332.
- Gu, H., J. D. Marth, et al. (1994). "Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting." Science **265**(5168): 103-106.
- Gu, Z., E. M. Reynolds, et al. (1999). "The type I serine/threonine kinase receptor ActRIA (ALK2) is required for gastrulation of the mouse embryo." Development **126**(11): 2551-2561.
- Guo, X. and X. F. Wang (2009). "Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways." Cell Res **19**(1): 71-88.
- Haak, M. C., M. M. Bartelings, et al. (2002). "Increased nuchal translucency is associated with jugular lymphatic distension." Hum Reprod **17**(4): 1086-1092.
- Hanyu, A., Y. Ishidou, et al. (2001). "The N domain of *Smad7* is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling." J Cell Biol **155**(6): 1017-1027.
- Hartung, A., K. Bitton-Worms, et al. (2006). "Different routes of bone morphogenetic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling." Molecular and cellular biology **26**(20): 7791-7805.

- Hew, K. W. and K. A. Keller (2003). "Postnatal anatomical and functional development of the heart: a species comparison." *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **68**(4): 309-320.
- Hoffman, J. I. and S. Kaplan (2002). "The incidence of congenital heart disease." *Journal of the American College of Cardiology* **39**(12): 1890-1900.
- Hong, K. H., Y. J. Lee, et al. (2008). "Genetic ablation of the BMP2 gene in pulmonary endothelium is sufficient to predispose to pulmonary arterial hypertension." *Circulation* **118**(7): 722-730.
- Hoodless, P. A., T. Haerry, et al. (1996). "MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways." *Cell* **85**(4): 489-500.
- Huang, Z., D. Wang, et al. (2009). "Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice." *Human molecular genetics* **18**(15): 2791-2801.
- Hyett, J. A. (2002). "Increased nuchal translucency in fetuses with a normal karyotype." *Prenat Diagn* **22**(10): 864-868.
- Ichijo, T., A. Voutetakis, et al. (2005). "The Smad6-histone deacetylase 3 complex silences the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor: potential clinical implications." *J Biol Chem* **280**(51): 42067-42077.
- Ivkovic, S., B. S. Yoon, et al. (2003). "Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development." *Development* **130**(12): 2779-2791.
- Jacobsen, K. D. and B. M. Willumsen (1995). "Kinetics of expression of inducible beta-galactosidase in murine fibroblasts: high initial rate compared to steady-state expression." *Journal of molecular biology* **252**(3): 289-295.
- Kaartinen, V., M. Dudas, et al. (2004). "Cardiac outflow tract defects in mice lacking ALK2 in neural crest cells." *Development* **131**(14): 3481-3490.
- Kahlem, P. and S. J. Newfeld (2009). "Informatics approaches to understanding TGFbeta pathway regulation." *Development* **136**(22): 3729-3740.
- Kang, Y., C. R. Chen, et al. (2003). "A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells." *Molecular cell* **11**(4): 915-926.
- Katsube, K., K. Sakamoto, et al. (2009). "Role of CCN, a vertebrate specific gene family, in development." *Dev Growth Differ* **51**(1): 55-67.
- Kim, R. Y., E. J. Robertson, et al. (2001). "Bmp6 and Bmp7 are required for cushion formation and septation in the developing mouse heart." *Dev Biol* **235**(2): 449-466.
- King, J. A., P. C. Marker, et al. (1994). "BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice." *Dev Biol* **166**(1): 112-122.
- Knollmann, B. C. (2009). "New roles of calsequestrin and triadin in cardiac muscle." *J Physiol* **587**(Pt 13): 3081-3087.
- Komatsu, K., S. Wakatsuki, et al. (2007). "Meltrin beta expressed in cardiac neural crest cells is required for ventricular septum formation of the heart." *Dev Biol* **303**(1): 82-92.
- Koni, P. A., S. K. Joshi, et al. (2001). "Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow." *The Journal of experimental medicine* **193**(6): 741-754.
- Krol, J., I. Loedige, et al. (2010). "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay." *Nature reviews Genetics* **11**(9): 597-610.
- Laird, P. W., A. Zijderveld, et al. (1991). "Simplified mammalian DNA isolation procedure." *Nucleic Acids Res* **19**(15): 4293.
- Lamers, W. H. and A. F. Moorman (2002). "Cardiac septation: a late contribution of the embryonic primary myocardium to heart morphogenesis." *Circ Res* **91**(2): 93-103.
- Leask, A. and D. J. Abraham (2006). "All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker." *Journal of cell science* **119**(Pt 23): 4803-4810.
- Lee, E. C., D. Yu, et al. (2001). "A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA." *Genomics* **73**(1): 56-65.
- Licht, A. H., S. Raab, et al. (2004). "Endothelium-specific Cre recombinase activity in flk-1-Cre transgenic mice." *Dev Dyn* **229**(2): 312-318.
- Lindsay, E. A. (2001). "Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome." *Nature reviews Genetics* **2**(11): 858-868.
- Liu, F., A. Hata, et al. (1996). "A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator." *Nature* **381**(6583): 620-623.
- Liu, P., N. A. Jenkins, et al. (2003). "A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations." *Genome Res* **13**(3): 476-484.
- Liu, W., J. Selever, et al. (2004). "Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13): 4489-4494.
- Lonn, P., A. Moren, et al. (2009). "Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads." *Cell Res* **19**(1): 21-35.
- Lyons, G. E., S. Muhlebach, et al. (1991). "Developmental regulation of creatine kinase gene expression by myogenic factors in embryonic mouse and chick skeletal muscle." *Development* **113**(3): 1017-1029.
- Ma, L., M. F. Lu, et al. (2005). "Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning." *Development* **132**(24): 5601-5611.
- Ma, L. and J. F. Martin (2005). "Generation of a Bmp2 conditional null allele." *Genesis* **42**(3): 203-206.
- Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." *Annual review of biochemistry* **67**: 753-791.
- Massague, J., J. Seoane, et al. (2005). "Smad transcription factors." *Genes Dev* **19**(23): 2783-2810.

- Massague, J. and D. Wotton (2000). "Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system." The EMBO journal **19**(8): 1745-1754.
- Mathers C, B. T., Ma Fat D (2004). "The global burden of disease: 2004 update." World Health Organization.
- Matzuk, M. M., T. R. Kumar, et al. (1995). "Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II." Nature **374**(6520): 356-360.
- Mazerbourg, S., K. Sangkuhl, et al. (2005). "Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses." J Biol Chem **280**(37): 32122-32132.
- McCalmon, S. A., D. M. Desjardins, et al. (2010). "Modulation of angiotensin II-mediated cardiac remodeling by the *MEF2A* target gene *Xirp2*." Circ Res **106**(5): 952-960.
- Mi, H., Q. Dong, et al. (2010). "PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D204-210.
- Mishina, Y., M. C. Hanks, et al. (2002). "Generation of *Bmpr/Alk3* conditional knockout mice." Genesis **32**(2): 69-72.
- Mishina, Y., A. Suzuki, et al. (1995). "*Bmpr* encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis." Genes Dev **9**(24): 3027-3037.
- Miyazono, K., Y. Kamiya, et al. (2009). "Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction." J Biochem.
- Mo, F. E. and L. F. Lau (2006). "The matricellular protein *CCN1* is essential for cardiac development." Circ Res **99**(9): 961-969.
- Monvoisin, A., J. A. Alva, et al. (2006). "*VE-cadherin-CreERT2* transgenic mouse: a model for inducible recombination in the endothelium." Dev Dyn **235**(12): 3413-3422.
- Moorman, A. F. and V. M. Christoffels (2003). "Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution." Physiol Rev **83**(4): 1223-1267.
- Morita, M., A. Kobayashi, et al. (2003). "Functional analysis of basic transcription element binding protein by gene targeting technology." Molecular and cellular biology **23**(7): 2489-2500.
- Moustakas, A. and C. H. Heldin (2009). "The regulation of TGFbeta signal transduction." Development **136**(22): 3699-3714.
- Nakajima, Y., M. Sakabe, et al. (2009). "Heart development before beating." Anat Sci Int **84**(3): 67-76.
- Nakano, N., H. Hori, et al. (2007). "Interaction of *BMP10* with *Tcap* may modulate the course of hypertensive cardiac hypertrophy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(6): H3396-3403.
- Neuhaus, H., V. Rosen, et al. (1999). "Heart specific expression of mouse *BMP-10* a novel member of the TGF-beta superfamily." Mechanisms of development **80**(2): 181-184.
- Nickel, J., W. Sebald, et al. (2009). "Intricacies of BMP receptor assembly." Cytokine Growth Factor Rev **20**(5-6): 367-377.
- Nishii, K. and Y. Shibata (2006). "Mode and determination of the initial contraction stage in the mouse embryo heart." Anat Embryol (Berl) **211**(2): 95-100.
- Oh, S. P. and E. Li (1997). "The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse." Genes Dev **11**(14): 1812-1826.
- Oh, S. P., T. Seki, et al. (2000). "Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2626-2631.
- Otsuka, F. (2008). "[Pulmonary arterial hypertension and BMP system abnormality]." Nippon Rinsho **66**(11): 2083-2090.
- Pachori, A. S., L. Custer, et al. (2010). "Bone morphogenetic protein 4 mediates myocardial ischemic injury through *JNK*-dependent signaling pathway." J Mol Cell Cardiol **48**(6): 1255-1265.
- Park, C., K. Lavine, et al. (2006). "Bone morphogenetic protein receptor 1A signaling is dispensable for hematopoietic development but essential for vessel and atrioventricular endocardial cushion formation." Development **133**(17): 3473-3484.
- Park, S., Y. J. Lee, et al. (2004). "*B-cell translocation gene 2 (Btg2)* regulates vertebral patterning by modulating bone morphogenetic protein/smud signaling." Molecular and cellular biology **24**(23): 10256-10262.
- Park, S. O., Y. J. Lee, et al. (2008). "*ALK5*- and *TGFBR2*-independent role of *ALK1* in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2." Blood **111**(2): 633-642.
- Pashmforoush, M., J. T. Lu, et al. (2004). "*Nkx2-5* pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block." Cell **117**(3): 373-386.
- Pham, C. T., D. M. MacIvor, et al. (1996). "Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(23): 13090-13095.
- Rabilloud, T. (1999). "Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline." Methods Mol Biol **112**: 9-19.
- Rockman, H. A., R. S. Ross, et al. (1991). "Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(18): 8277-8281.
- Rodriguez, C. I., F. Buchholz, et al. (2000). "High-efficiency deleter mice show that *FLPe* is an alternative to *Cre-loxP*." Nat Genet **25**(2): 139-140.
- Ross, S. and C. S. Hill (2008). "How the Smads regulate transcription." The international journal of biochemistry & cell biology **40**(3): 383-408.

- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-491.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**(12): 5463-5467.
- Scacheri, P. C., J. S. Crabtree, et al. (2001). "Bidirectional transcriptional activity of PGK-neomycin and unexpected embryonic lethality in heterozygote chimeric knockout mice." *Genesis (New York, N Y : 2000)* **30**(4): 259-263.
- Schaper, W. (2009). "Collateral circulation: past and present." *Basic research in cardiology* **104**(1): 5-21.
- Schermuly, R. T., S. S. Pullamsetti, et al. (2007). "Phosphodiesterase I upregulation in pulmonary arterial hypertension: target for reverse-remodeling therapy." *Circulation* **115**(17): 2331-2339.
- Schmidt, J. V. (2001). "Embryonic Stem (ES) Cell Culture Basics." *Current Protocols in Toxicology*: 15.11.11-15.11.15.
- Scholz, D., T. Ziegelhoeffer, et al. (2002). "Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice." *J Mol Cell Cardiol* **34**(7): 775-787.
- Schwenk, F., U. Baron, et al. (1995). "A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells." *Nucleic Acids Res* **23**(24): 5080-5081.
- Sekelsky, J. J., S. J. Newfeld, et al. (1995). "Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **139**(3): 1347-1358.
- Shi, Y. and J. Massague (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." *Cell* **113**(6): 685-700.
- Shou, W., B. Aghdasi, et al. (1998). "Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12." *Nature* **391**(6666): 489-492.
- Sieber, C., J. Kopf, et al. (2009). "Recent advances in BMP receptor signaling." *Cytokine Growth Factor Rev.*
- Simonneau, G., I. M. Robbins, et al. (2009). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." *Journal of the American College of Cardiology* **54**(1 Suppl): S43-54.
- Snider, P., M. Olaopa, et al. (2007). "Cardiovascular development and the colonizing cardiac neural crest lineage." *TheScientificWorldJournal* **7**: 1090-1113.
- Solloway, M. J., A. T. Dudley, et al. (1998). "Mice lacking Bmp6 function." *Dev Genet* **22**(4): 321-339.
- Solloway, M. J. and E. J. Robertson (1999). "Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup." *Development* **126**(8): 1753-1768.
- Somi, S., A. A. Buffing, et al. (2004). "Expression of bone morphogenetic protein-10 mRNA during chicken heart development." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **279**(1): 579-582.
- Song, J., S. P. Oh, et al. (1999). "The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation, and rostral head development in mice." *Dev Biol* **213**(1): 157-169.
- Song, L., R. Fassler, et al. (2007). "Essential functions of Alk3 during AV cushion morphogenesis in mouse embryonic hearts." *Dev Biol* **301**(1): 276-286.
- Soriano, P. (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." *Nat Genet* **21**(1): 70-71.
- Srinivas, S., T. Watanabe, et al. (2001). "Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus." *BMC developmental biology* **1**: 4.
- Srivastava, D. (2006). "Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis." *Cell* **126**(6): 1037-1048.
- Stanley, E. G., C. Biben, et al. (2002). "Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene Nkx2-5." *The International journal of developmental biology* **46**(4): 431-439.
- Stenmark, K. R., K. A. Fagan, et al. (2006). "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms." *Circ Res* **99**(7): 675-691.
- Stottmann, R. W., M. Choi, et al. (2004). "BMP receptor IA is required in mammalian neural crest cells for development of the cardiac outflow tract and ventricular myocardium." *Development* **131**(9): 2205-2218.
- Suzuki, Y., N. Ohga, et al. (2010). "BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo." *Journal of cell science* **123**(Pt 10): 1684-1692.
- Takahashi, K., S. Kogaki, et al. (2007). "Hypoxia induces alteration of bone morphogenetic protein receptor signaling in pulmonary artery endothelial cell." *Pediatr Res* **61**(4): 392-397.
- Teichmann, U. and M. Kessel (2004). "Highly restricted BMP10 expression in the trabeculating myocardium of the chick embryo." *Dev Genes Evol* **214**(2): 96-98.
- ten Dijke, P. and H. M. Arthur (2007). "Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease." *Nature reviews Molecular cell biology* **8**(11): 857-869.
- Thomas, P. D., M. J. Campbell, et al. (2003). "PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function." *Genome Res* **13**(9): 2129-2141.
- Thomsen, G. H. (1996). "Xenopus mothers against decapentaplegic is an embryonic ventralizing agent that acts downstream of the BMP-2/4 receptor." *Development* **122**(8): 2359-2366.
- Tucker, A. and J. Rhodes (2001). "Role of vascular smooth muscle in the development of high altitude pulmonary hypertension: an interspecies evaluation." *High Alt Med Biol* **2**(2): 173-189.
- Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." *Science* **150**(698): 893-899.
- Vallon, V., A. W. Wyatt, et al. (2006). "SGK1-dependent cardiac CTGF formation and fibrosis following DOCA treatment." *J Mol Med* **84**(5): 396-404.

- van Wijk, B., A. F. Moorman, et al. (2007). "Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation." *Cardiovasc Res* **74**(2): 244-255.
- Vitt, U. A., S. Y. Hsu, et al. (2001). "Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **15**(5): 681-694.
- Vogel, M., G. K. Sharland, et al. (2009). "Prevalence of increased nuchal translucency in fetuses with congenital cardiac disease and a normal karyotype." *Cardiol Young* **19**(5): 441-445.
- Vooijs, M., J. Jonkers, et al. (2001). "A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent." *EMBO Rep* **2**(4): 292-297.
- Waldo, K. L., D. H. Kumiski, et al. (2001). "Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field." *Development* **128**(16): 3179-3188.
- Wang, J., H. Wilhelmsson, et al. (1999). "Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression." *Nat Genet* **21**(1): 133-137.
- Warming, S., N. Costantino, et al. (2005). "Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection." *Nucleic Acids Res* **33**(4): e36.
- West, J., K. Fagan, et al. (2004). "Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle." *Circ Res* **94**(8): 1109-1114.
- Winnier, G., M. Blessing, et al. (1995). "Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse." *Genes Dev* **9**(17): 2105-2116.
- Wozney, J. M., V. Rosen, et al. (1988). "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities." *Science* **242**(4885): 1528-1534.
- Wu, H., Y. Lin, et al. (2010). "Regulation of Nur77 expression by  $\beta$ -catenin and its mitogenic effect in colon cancer cells." *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- Xia, Y., K. Lee, et al. (2009). "Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload." *Histochem Cell Biol* **131**(4): 471-481.
- Yagi, K., D. Goto, et al. (1999). "Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3." *J Biol Chem* **274**(2): 703-709.
- Yagi, T., S. Nada, et al. (1993). "A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene." *Anal Biochem* **214**(1): 77-86.
- Yang, X. W., P. Model, et al. (1997). "Homologous recombination based modification in Escherichia coli and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome." *Nature biotechnology* **15**(9): 859-865.
- Yao, X., X. Chen, et al. (2008). "Preferential utilization of Imp7/8 in nuclear import of Smads." *J Biol Chem* **283**(33): 22867-22874.
- Yi, S. E., A. Daluiski, et al. (2000). "The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb." *Development* **127**(3): 621-630.
- Yu, P. B., D. Y. Deng, et al. (2008). "Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor is required for BMP-mediated growth arrest and differentiation in pulmonary artery smooth muscle cells." *J Biol Chem* **283**(7): 3877-3888.
- Yuasa S and Fukuda K (2008). "Multiple roles for BMP signaling in cardiac development " *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* **5**(4): 6.
- Zhang, H. and A. Bradley (1996). "Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development." *Development* **122**(10): 2977-2986.
- Zhang, H., L. Zhou, et al. (2006). "Identification of differentially expressed genes in human heart with ventricular septal defect using suppression subtractive hybridization." *Biochem Biophys Res Commun* **342**(1): 135-144.
- Zhang, Y., F. Buchholz, et al. (1998). "A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli." *Nat Genet* **20**(2): 123-128.
- Zhang, Y. E. (2009). "Non-Smad pathways in TGF-beta signaling." *Cell Res* **19**(1): 128-139.
- Zhao, Y. and D. Brummer (2010). "NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(8): 1535-1541.
- Zorn, A. M. (2008). "Liver development." *StemBook*.

## DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Thomas Braun für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses spannenden Themas, für sein ständiges Interesse, seine motivierende Unterstützung und stetige Diskussionsbereitschaft bedanken. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Renkawitz für die Mühe und Zeit bei der Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Katja Kolditz danke ich für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und die TAC Operationen, Susanne Kreuzer für die Blastozysten und Pronukleus Injektion, Thomas Böttger und Silvia Thomas für die Durchführung und Datenbearbeitung der Microarray-Analysen. Außerdem bedanke ich mich bei Thomas Kubin für die Unterstützung und die Weitergabe seines *Know-hows* bei den Western Blots. Silvia Schimanski danke ich für die Durchführung der *A. Femoralis* Ligaturen, Andre Schneider für die Beratung bei der Klonierung der verschiedenen Zielvektoren und Astrid Wietelmann für die Durchführung der MRT-Analysen. Ein ganz besonderes Dankeschön gebührt außerdem Ingrid Zieg, die während der ganzen Zeit die verschiedenen Mauslinien betreut hat.

Allen Arbeitsgruppen und Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei den beiden Frau Bachmanns, die mich in all der Zeit stets motiviert und unterstützt haben, für ihre Freundschaft bedanken.

Meiner Familie und Familie Swist, meinen Freunden und ganz besonders Markus danke ich für die Geduld und die moralische Unterstützung während der gesamten Promotionszeit. Danke, dass du die fünf Jahre der Pendelei zwischen Ruhrgebiet und Wetterau für mich auf dich genommen hast. Ich liebe dich.