

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(kommissarischer Direktor Herr Prof. Dr. Thomas Hollemann)

Überexpression von Bone Morphogenetic Protein (BMP)-10 im Hühnchenherzen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Diana Johannemann

geboren am 10.09.1982 in Halle/Saale

Betreuer: Prof. Dr. Dr. T. Braun
Gutachter: 1. Prof. Dr. T. Hollemann
2. PD Dr. H. Ebel
3. PD Dr. D. Riethmacher

Eröffnung des Promotionsverfahrens am 01.02.2011

Öffentliche Verteidigung am 06.07.2011

Für meine Familie.

Referat

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind wichtige Mediatoren in der Embryonalentwicklung. Das BMP-10 im Speziellen wird während dieser Zeit ausschließlich im Herzen exprimiert. Diese Expression, soweit bei Maus und Hühnchen bekannt, ist auf den trabekulären Anteil des Myokards der Herzanlage beschränkt. Der experimentell verursachte Verlust von BMP-10 führt zu einem Wachstums- und Entwicklungsstopp der Embryonen, da das Myokard keine Trabekelstrukturen ausbildet. Dies führt zu Herzinsuffizienz und der Embryo stirbt.

Um den Einfluss von BMP-10 auf die Trabekelbildung im embryonalen Herzen besser zu verstehen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Veränderungen durch eine Überexpression des BMP-10 Gens hervorgerufen werden. Als Modell für die Untersuchungen diene hier das Hühnchenembryo. Durch Einbringen des hühncheneigenen BMP-10 Gens mittels des Retrovirus RCAS in einen 2 bis 2,5 Tage alten Embryo wurde eine Überexpression herbeigeführt. Das Virus wurde hierbei direkt in die Herzscheife injiziert, um hier die Zellen der Herzanlage zu infizieren. Nach der weiteren Entwicklung der infizierten Hühnchenembryonen wurde die Expression von BMP-10 an 4 bis 5 Tage alten Embryonen mittels in-situ-Hybridisierung untersucht.

Kontrollembryonen, die sich ohne Manipulation entwickelten, wiesen die in der Literatur beschriebene Verteilung der BMP-10 RNS im primitiven Vorhof und in der Ventrikelanlage auf. Die Injektion des RCAS-Virus führte zu einer deutlichen Überexpression der BMP-10 RNS, sowohl im trabekulären Myokard, welches auch endogen BMP-10 exprimiert, als auch in anderen Regionen des Körpers. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, dass die Überexpression im primitiven Ventrikel zu einer Veränderung der Trabekelstrukturen führte. Die einzelnen Trabekel waren verdickt und lagen im Innenraum des primitiven Ventrikels näher beieinander. Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich vermuten, dass durch BMP-10 im Ventrikel die Proliferation der trabekelbildenden Myokardzellen stimuliert wurde. Der Truncus arteriosus hingegen wies im Vergleich zur Kontrollgruppe eine zellärmere mittlere Wandschicht auf. Dies deutet auf eine Unterdrückung der Zellproliferation durch BMP-10 in diesem Bereich hin.

Johannemann, Diana: Überexpression von Bone Morphogenetic Protein (BMP)-10 im Hühnchenherzen.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 71 Seiten, 2010

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|---|----|
| | Inhaltsverzeichnis..... | I |
| | Abkürzungsverzeichnis..... | IV |
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Die embryonale Herzentwicklung..... | 1 |
| 1.1.1 | Transkriptions- und Wachstumsfaktoren der Herzentwicklung..... | 4 |
| 1.1.2 | Die Herzentwicklung als Forschungsgebiet..... | 6 |
| 1.2 | Die Proteinfamilie der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) | 6 |
| 1.2.1 | Die Mitglieder der Transforming Growth Factor β (TGF- β)-Superfamilie..... | 6 |
| 1.2.2 | Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)..... | 8 |
| 1.2.3 | Bone Morphogenetic Protein (BMP)-10..... | 8 |
| 1.2.4 | Die BMP- bzw. TGF- β -Rezeptoren..... | 10 |
| 1.3 | Der Modellorganismus..... | 13 |
| 1.4 | Ziel der Arbeit..... | 14 |
| 2 | Material und Lösungen..... | 15 |
| 2.1 | Material..... | 15 |
| 2.1.1 | Verbrauchsmaterialien..... | 15 |
| 2.1.2 | Enzyme..... | 15 |
| 2.1.3 | Chemikalien..... | 16 |
| 2.1.4 | Antikörper | 16 |
| 2.1.5 | Bakterienstämme | 16 |
| 2.1.6 | Antibiotika | 17 |
| 2.1.7 | DNS-Größenstandards..... | 17 |
| 2.1.8 | Kits | 17 |
| 2.1.9 | Klonierungsvektoren..... | 18 |
| 2.1.10 | Oligonukleotidsequenzen..... | 18 |
| 2.2 | Lösungen..... | 19 |
| 2.2.1 | Lösungen für die DNS-Präparation..... | 19 |
| 2.2.2 | Medien zur Herstellung von kompetenten Bakterien..... | 19 |
| 2.2.3 | Medien für Agarplatten..... | 20 |
| 2.2.4 | Agarose-Gelelektrophorese..... | 20 |
| 2.2.5 | Lösungen für die Mikromanipulation an Hühnchenembryonen..... | 20 |
| 2.2.6 | Lösungen für die Präparation von Embryonen und Geweben..... | 20 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.2.7 | Lösungen für die whole mount in-situ-Hybridisierung..... | 21 |
| 2.2.8 | Lösung für die histologische Färbung..... | 22 |
| 2.2.9 | Medien für CEF-Zellen..... | 23 |
| 2.2.10 | Lösungen für die Virusherstellung..... | 23 |
| 3 | Methoden..... | 24 |
| 3.1 | Molekularbiologische Methoden..... | 24 |
| 3.1.1 | RNS-Präparation aus Gewebe..... | 24 |
| 3.1.2 | Reverse Transkription..... | 24 |
| 3.1.3 | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)..... | 25 |
| 3.1.4 | Klonierungen..... | 25 |
| 3.1.5 | Transformation..... | 25 |
| 3.1.6 | DNS-Mini-Präparation..... | 26 |
| 3.1.7 | DNS-Maxi-Präparation..... | 26 |
| 3.1.8 | Glycerolstock..... | 27 |
| 3.1.9 | Sequenzierung..... | 27 |
| 3.1.10 | Restriktionsverdau..... | 28 |
| 3.1.11 | Agarosegele und Gelelution..... | 28 |
| 3.2 | Virusherstellung..... | 28 |
| 3.2.1 | Aufarbeiten von CEF-Zellen..... | 28 |
| 3.2.2 | Transfektion von CEF-Zellen..... | 29 |
| 3.2.3 | RCAS-Virusernte..... | 30 |
| 3.2.4 | Viruskonzentrierung..... | 30 |
| 3.2.5 | Titerbestimmung vom RCAS-Virus..... | 30 |
| 3.3 | Mikromanipulation der Hühnchenembryonen..... | 31 |
| 3.3.1 | Vorbereitungen..... | 31 |
| 3.3.2 | Injektion..... | 31 |
| 3.4 | Immunhistochemische Methoden..... | 32 |
| 3.4.1 | Präparation von Embryonen..... | 32 |
| 3.4.2 | Whole mount in-situ-Hybrididsierung | 32 |
| 3.4.3 | Einbettung von Embryonen..... | 33 |
| 3.4.4 | Eosin-Färbung..... | 34 |
| 4 | Ergebnisse..... | 35 |
| 4.1 | Herstellung des cBMP-10 Virus..... | 35 |
| 4.2 | Kontrolle der Virusaktivität..... | 35 |
| 4.3 | Infizieren der Hühnchenembryonen..... | 38 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.4 | Auswertung mittels Mikroskop..... | 41 |
| 4.4.1 | Endogenes Vorkommen von BMP-10 RNS in der Herzanlage..... | 42 |
| 4.4.2 | Kardiale Veränderungen durch BMP-10 Überexpression..... | 44 |
| 4.4.3 | BMP-10 Expression in extrakardialen Organen..... | 49 |
| 5 | Diskussion..... | 54 |
| 5.1 | Herstellung des cBMP-10 Virus..... | 55 |
| 5.2 | Kontrolle der Virusaktivität..... | 56 |
| 5.3 | Infektion der Hühnchenembryonen..... | 57 |
| 5.4 | Auswertung der makroskopischen Beobachtungen..... | 58 |
| 5.5 | Auswertung der Anschnitte unter dem Mikroskop..... | 59 |
| 5.5.1 | Endogenes Vorkommen von BMP-10 RNS..... | 59 |
| 5.5.2 | Vorkommen von BMP-10 RNS bei Genüberexpression..... | 61 |
| 5.6 | Perspektiven..... | 63 |
| 6 | Zusammenfassung | 64 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 66 |
| 8 | Anlagen..... | 69 |
| 8.1 | Die Entwicklung von Hühnchenembryonen - Stadieneinteilung nach Hamburger und Hamilton (HH-Stadien)..... | 69 |
| 8.2 | Amplifiziertes cBMP-10 Fragment..... | 70 |
| 9 | Thesen der Dissertation..... | 71 |
| | Tabellarischer Lebenslauf | |
| | Selbständigkeitserklärung | |
| | Erklärung über frühere Promotionsversuche | |
| | Danksagung | |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ALK | Activin Receptor-like Kinase |
| ANP | Atriales Natriuretisches Peptid |
| Arg | Aminosäure Arginin |
| ASLV | Avian Sarcoma Leucosis Virus |
| AV-Kanal | Atrioventrikulärer Kanal |
| β | beta |
| bp | Basenpaare |
| BES | N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| BMPR | Bone Morphogenetic Protein Receptor |
| BNP | Brain Natriuretic Peptide |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| cBMP-10 | chicken Bone Morphogenetic Protein-10 |
| cDNS | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CEF | embryonale Hühnchen-Fibroblasten |
| CNC-Zellen | Cardiac Neural Crest Cells |
| CS | Chick Serum (Hühnchenserum) |
| d | Tag |
| d. h. | das heißt |
| Dig | Digoxigenin |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol (C ₁₆ H ₁₅ N ₅) |
| DEPC | Diethylene Pyrocarbonate |
| DMEM | Dulbeccos's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |

| | |
|------------|---|
| et al. | et altera |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FSB | First Strand Buffer |
| g | Gramm |
| G3PDH | Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase |
| h | Stunde |
| HCN | Hyperpolarisation activated Cyclic Nucleotide gated (channel) |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HH-Stadium | Wachstumsstadium vom Hühnchenembryo nach Hamburger und Hamilton |
| Ig | Immunglobulin |
| Ile | Aminosäure Isoleucin |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thio-galacto-pyranosid |
| IU/mL | Infectious units per milliliter |
| kbp | Kilobasenpaare |
| λ | Lambda |
| L | Liter |
| LAP | Latency-associated Protein |
| LB | Luria Bertani |
| μ | mikro |
| m | milli |
| M | Molarität |
| MEF2C | Myocyte Specific Enhancer Factor 2c |
| MHC | Myosin Heavy Chain |
| min | Minute |
| MIS | Müller-Inhibitor-Substanz (Anti-Müller-Hormon) |
| MLC | Myosin Light Chain |
| mRNS | Botenribonukleinsäure |
| n | nano |
| PBS | Phosphate Buffer Saline |
| PBT | Phosphate Buffer Saline Tween-20 |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| pH | Potentium Hydrogenii |

| | |
|--------------|--|
| RCAS | Replication-competent ASLV long terminal repeat (LTR) with a splice acceptor |
| RIRR-site | Arg, Ile, Arg, Arg - Schnittstelle |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RNasin | RNase Inhibitor |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RXXR-site | Arg, beliebige Aminosäure, beliebige Aminosäure, Arg - Schnittstelle |
| SA-Knoten | Sinuatraler Knoten |
| SBE | Smad-Binding Element |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sek | Sekunde |
| SOB | Super Optimal Broth |
| SSC | Standard Saline Citrate |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| Taq | Thermus aquaticus |
| TBST | Tris-Buffered Saline Tween-20 |
| TE | Tris-EDTA |
| TGF- β | Transforming Growth Factor β |
| t-RNS | transfer-Ribonukleinsäure |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| Tween-20 | Polyoxyethylensorbitan-Monolaurylsäure |
| U | Unit/Einheit (Maßeinheit für die Enzymaktivität) |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid |
| v. a. | vor allem |
| z. B. | zum Beispiel |

1 Einleitung

1.1 Die embryonale Herzentwicklung

Die embryonale Entwicklung von Hühnchen wurde durch Viktor Hamburger und Howard Hamilton in morphologieabhängige Stadien eingeteilt (HH-Stadien, siehe Anhang 8.1).

Im Folgenden wird nun die Herzentwicklung, die im HH-Stadium 3 beginnt, im Speziellen dargestellt. Hierbei ist anzumerken, dass sich die embryonale Entwicklung des Herzens bei Säugern und Vögeln ähnelt. Durch die lokale Nähe der Organe zueinander ist die Herzentwicklung eng mit der Ausbildung von Vordarm, Zölon und ventraler Körperwand verbunden.

Die zukünftigen Herzzellen sind bis zum HH-Stadium 4 pluripotent und liegen im Primitivstreifen der Embryonalanlage. In der weiteren Entwicklung bilden sie als Teil des lateralen Mesoderms zwei Felder auf beiden Seiten der Kopfanlage, die nach anterior aufeinanderzuwandern und sich im weiteren Verlauf halbmondförmig verbinden (siehe Abb. 1).

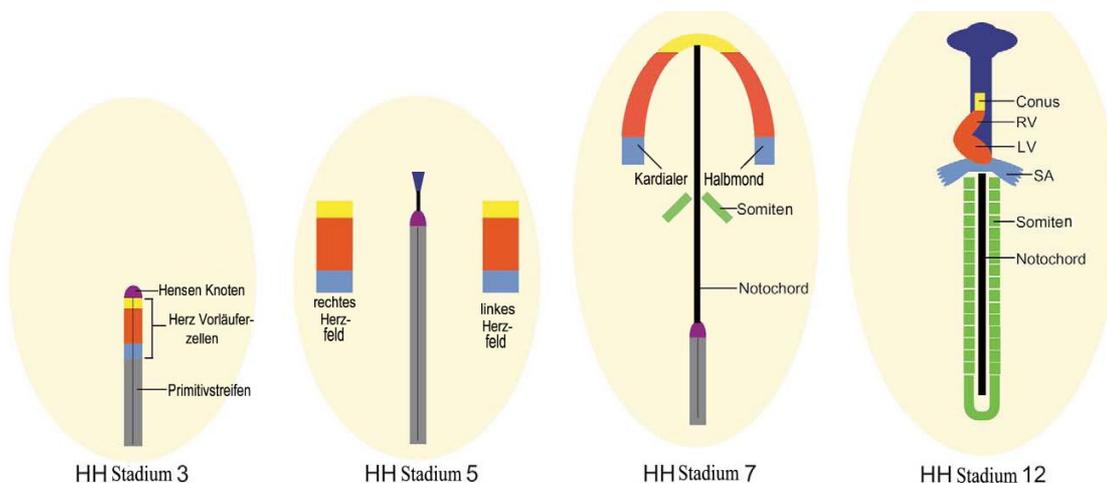


Abbildung 1: Schemazeichnung - embryonale Herzanlage.

RV = rechter Ventrikel, LV = linker Ventrikel, SA = sinoatriales Segment

Darstellung der frühen Phasen der Herzentwicklung. Bild übernommen aus T. Brand 2003.

Oben genannte Zellen differenzieren sich in eine viscerale und eine somatische Zellschicht, zwischen denen ein Spalt (Zölon) entsteht. Es bilden sich außerdem Vesikel aus der visceralen Zellschicht. Während der lateralen Abfaltung des Körpers fusionieren die paarig angelegten Hohlräume zu einem Schlauch, aus dem sich das Herz entwickelt. Die Schlauchbildung ist im HH-Stadium 9 bis 10 abgeschlossen. Der Herzschlauch ist im Inneren mit Endothelzellen ausgekleidet und besteht sonst aus lockerem Mesenchym, genannt Epimyokard. Er ist kranial durch den Truncus arteriosus und kaudal durch das Septum transversum fixiert, in welches der

Sinus venosus eingelagert ist. In diesem frühen Stadium haben die Zellen des Herzschlauchs noch Kontakt zum primitiven Darmrohr.

Die Herzanlage, deren Wand mittlerweile aus Endokard, Myokard und Epikard besteht, wächst nun schnell in die Länge und krümmt sich dabei nach ventral. Im HH-Stadium 11 rotiert der Schlauch, sodass die kaudalen Anteile nach kranial und ventral wandern. Dieser Vorgang geschieht im HH-Stadium 12 und wird als Looping bezeichnet. Nun liegen die ehemals ventralen Anteile lateral und die einst dorsalen Anteile befinden sich an der inneren Biegung des Schlauchs. Außen am Schlauch erkennt man von kaudal nach kranial eine primitive Unterteilung in den Einflusstrakt (Sinus venosus), das primitive Atrium, den Atrioventrikular-Kanal (AV-Kanal), den primitiven Ventrikel und den Bulbus cordis gefolgt vom Ausflusstrakt (Truncus arteriosus). Im Inneren des Schlauchs ist in dieser Entwicklungsphase noch keine Septierung erkennbar. Das Lumen ist mit Herzgallerte gefüllt. Das primitive Perikard befindet sich im Bereich des Sinus venosus. Im HH-Stadium 13 beginnen im Bereich des Sinus venosus peristaltische Kontraktionen. Extrakardiale Zellen aus der Neuralleiste, genannt CNC-Zellen, wandern in die Herzanlage ein. Diese Zellen sorgen im Verlauf der Herzentwicklung für die Septierung des Ausflusstrakts und die Bildung der großen Gefäße.

Die Ventrikelanlage wächst nach außen und im Inneren bilden sich Trabekelstrukturen heraus. Die Herzgallerte verschwindet in diesem Bereich (siehe Abb. 2).

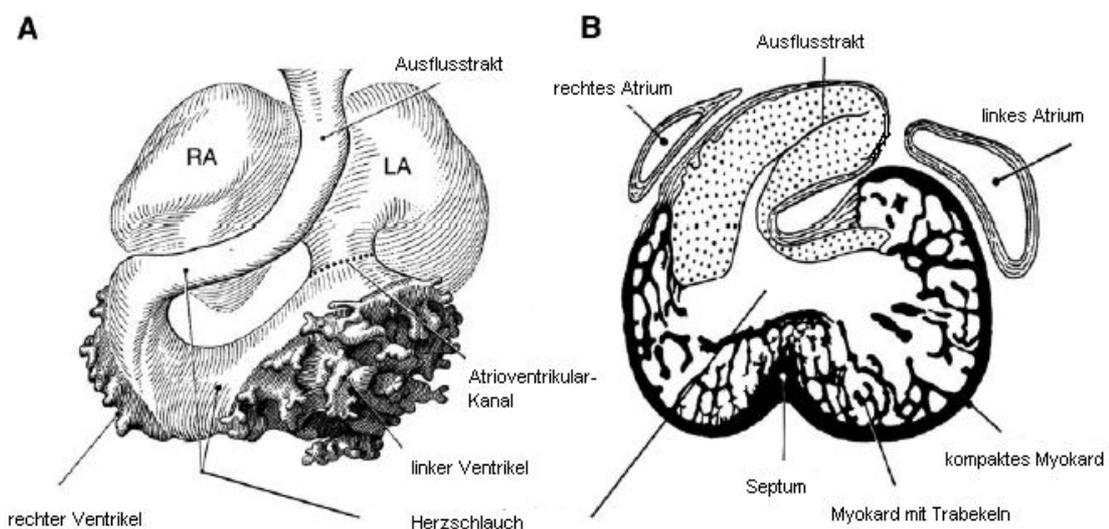


Abbildung 2: Schemazeichnung - embryonales Herz.

Stadium der Schleifenbildung bei der Herzentwicklung. Rekonstruktion eines 4 Wochen alten menschlichen Herzens als 3D-Ansicht (A) und als histologisches Schnittbild (B). RA = rechtes Atrium, LA = linkes Atrium. Der zukünftige rechte und linke Ventrikel sind noch durch den AV-Kanal verbunden [From O'Rahilly and Müller (223)]. Bild übernommen aus A.F.Moorman und V.Christoffel 2003.

Beim Hühnchen beginnt im HH-Stadium 14 die Septierung des Vorhofs. Zeitgleich bilden sich aus extrakardialen Zellen Endokardpolster im AV-Kanal heraus. Die Septierung der Kammer findet im HH-Stadium 18 statt. Beide Teilungsvorgänge erfolgen durch lokal proliferierende Mesenchymzellen der Endokardpolster. Im AV-Kanal bilden das vordere und das hintere Endokardpolster durch Auswachsen ein Hindernis für den Blutfluss. Sie leiten den Blutfluss so, dass ein rechter und ein linker Strom entsteht (siehe Abb. 3). Im Ventrikel bildet sich zusätzlich ein myokardiales Septum heraus, welches schraubenförmig auf das hintere Endokardpolster zuwächst. Im Endstadium der Entwicklung verwachsen sie miteinander. Das Septum primum im Atrium verschließt sich nicht vollständig. Das dabei offen bleibende Foramen primum ist zur Umgehung des Lungenkreislaufes notwendig. Das Septum primum wird nur bei den Säugern durch ein sekundäres Septum ersetzt.

Sind die genannten Endokardpolster ausdifferenziert, bilden sie außerdem einen Anteil der Segelklappen. Der muskuläre Klappenteil wird durch die Myokardzellen gebildet.

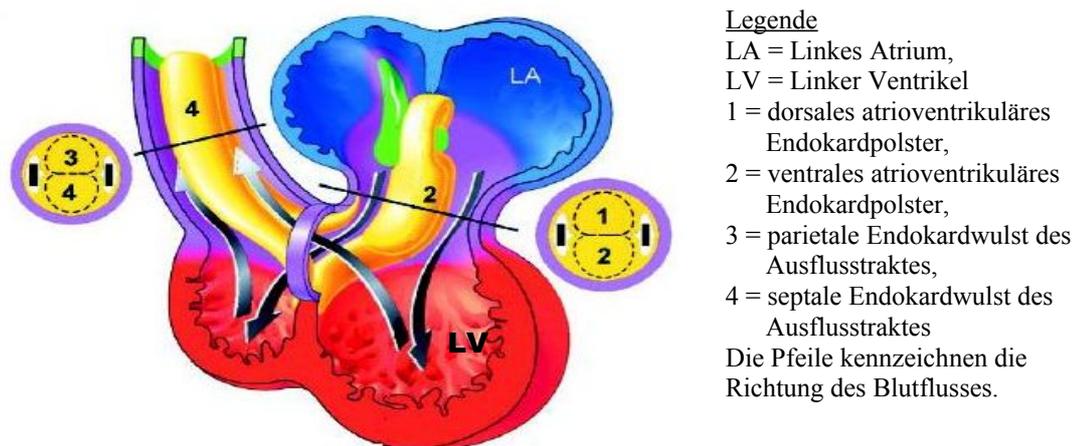


Abbildung 3: Schemazeichnung - embryonales Herz.

Herz, das sich nach der Schleifenbildung zu einem Vierkammerherzen entwickelt. Der Herzschlauch ist lila gezeichnet, die Vorhöfe blau und die Kammern rot. Die Endokardpolster sind gelb und die Verbindungen zu den Arterien sind grün dargestellt. Der Ausflusstrakt wurde nach rechts gezogen, um die innere Krümmung besser darstellen zu können [Modified from DeJong et al.]. Bild übernommen aus A.F.Moorman und V.Christoffel 2003.

Die Ventrikel sind Derivate des primären Herzfeldes. Nach der Myokardverdickung setzt die Trabekelbildung dort und am myokardialen anterioren Anteil des Ventrikelseptums ein.

Aus dem Sinus venosus entwickelt sich neben den großen zuführenden Gefäßen (Vv. cavae) auch ein Teil des rechten Vorhofs. Dieser Anteil weist eine glatte Innenwand auf. Der trabekuläre Anteil des rechten Vorhofs entsteht hingegen aus Anteilen des primitiven Atriums. Der linke Vorhof wird zum Großteil durch die einwachsenden Lungengefäße gebildet. Die Herzohren auf beiden Vorhofseiten werden durch Anteile des primitiven Atriums gebildet. In

der Vorhofregion weist am Ende der Entwicklung nur das sich verdickende Myokard der Herzohren Trabekelstrukturen an der Innenseite auf.

Im Bereich des Ausflusstraktes (Truncus arteriosus und Conus arteriosus) entstehen später aus extrakardialen mesodermalen Zellen die Aorta und der Truncus pulmonalis. Auch hier bilden sich Endokardpolster-ähnliche Strukturen, die den Ausflusstrakt längs in zwei Gefäße teilen. Beide weisen keine Trabekelanteile auf.

Im HH-Stadium 26 bis 28 hört das Herz auf sich in peristaltischen Wellen zu kontrahieren. Ein normaler Herzschlag beginnt.

1.1.1 Transkriptions- und Wachstumsfaktoren der Herzentwicklung

Während der unterschiedlichen Entwicklungsschritte des Herzens spielen Mitglieder der TGF- β Familie eine wichtige Rolle. Die Gene für BMP-2 und BMP-4 als Vertreter dieser Familie sind schon vor der Bildung des Herzschlauchs nachweisbar. BMP-2 und BMP-4 leiten die Kardiogenese ein und induzieren außerdem kardiale Transkriptionsfaktoren, z. B. GATA 4, Nkx 2.5 und ν MHC (ventricular Myosin Heavy Chain). Diese Faktoren sorgen unter anderem dafür, dass sich mesodermale Zellen zu Myozyten differenzieren und sich im entsprechenden Entwicklungsstadium zu kontrahieren beginnen (Thomas M. Schultheiss, 1997). GATA 4 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und beeinflusst die Expression von Troponin C und I, α - und β -MHC, ANP, BNP und BMP-4. Seine Zielgene werden vor allem für die Differenzierung von kardialen Zellen aus dem Mesoderm benötigt (Monica Dentice et al., 2004). Nkx 2.5 ist als kardialer Transkriptionsfaktor für verschiedene Signalwege mitverantwortlich, z. B. für die Entwicklung der Vorhöfe, der Ventrikel und der Zellen des Erregungsleitungssystems. Später in der Herzentwicklung erfolgt die Induktion der Proteine MLC2v und MEF2C. Fehlt Nkx 2.5, kommt es durch eine Unterbrechung der Entwicklung des Herzschlauchs zum Tod des Embryos (Kishiro Monzen et al., 1999). Das Protein MEF2C ist ein kardialer Transkriptionsfaktor, der die Bildung von Zellmustern in der frühen Phase der Kardiogenese steuert (Hanying Chen et al., 2004). Als Negativregulator von Nkx 2.5 sorgt der T-Box-Faktor Tbx2 für den Aufbau eines Gradienten von ANP innerhalb des Gewebes. Nur durch die lokal exakt geregelte Genexpression kann es zur differenzierten Ausbildung von bestimmten kardialen Strukturen kommen. Im Fall von Tbx2 ist es die Ausbildung der Ventrikel (Vincent M. Christoffels et al., 2004). Die schweren Peptidketten (MHC) bilden zusammen mit den leichten Peptidketten (MLC) das Myosinfilament in der Muskelzelle. Ein spezifischer Marker für die embryonalen differenzierten Herzmuskelzellen ist ν MHC. Er lässt sich in frühen Stadien der Kardiogenese nachweisen (Thomas M. Schultheiss, 1997).

In späteren Phasen der Kardiogenese werden weitere Faktoren v. a. für die Spezialisierung einzelner Gewebe benötigt. Aus der frühen Kardiogenese bekannte Faktoren übernehmen nun neue Aufgaben. So sind beispielsweise HCN für die Schrittmacherfunktion des Erregungsleitungssystems im Embryo (SA-Knoten, AV-Knoten, His-Bündel und Purkinje-Zellen) und Sacrolipin für die Kontraktionsfähigkeit der Zellen zuständig. Beide Faktoren werden durch Nkx 2.5 reguliert (Mohammed Pashmforoush et al., 2004). BMP-2 und BMP-4 werden in späteren Stadien der Kardiogenese vor allem im Myokard des AV-Kanals und des Ausflusstraktes neben den Endokardpolstern exprimiert. BMP-2 sorgt durch Einleitung einer Differenzierung von Endothel zu Mesenchym für die Entwicklung der Herzklappen (Segelklappen) während BMP-4 vor allem für eine korrekte dorsal-ventral Entwicklung verantwortlich ist. Andere BMPs, z. B. BMP-5, befinden sich während der frühen Entwicklungsstadien im Endoderm und steuern von dort die Differenzierung von Mesoderm zu kardialen Vorläuferzellen. BMP-5 besitzt in der späten Phase der Kardiogenese noch weitere Funktionen wie die Bildung der Endokardpolster im AV-Kanal. Fehlen BMP-5 und BMP-7, kommt es zu Missbildungen der Herzscheidewand und der Ventrikel. Werden jedoch BMP-6 und BMP-7 nicht exprimiert, kommt es zu Veränderungen bei der Ausbildung des Ausflusstraktes und bei der Klappen- und Septumstehung (Toshiyuki Yamagishi et al., 2001). Bei Fehlfunktionen, auch der Rezeptoren und Proteine im BMP-Signaltransduktionsweg, kommt es zu einem frühen Abort. Ist zum Beispiel der Typ-I-Rezeptor ALK3 nicht vorhanden, werden die Endokardpolster und die Ventrikelwand fehlerhaft ausgebildet. Die Trabekelanteile entwickeln sich jedoch normal (Hanying Chen et al., 2004).

Ein weiterer wichtiger Wachstumsfaktor im Herzen ist BMP-10. Es ist in den Ventrikeln für die Reifung und Trabekelbildung zuständig. Fehlt dieses Protein, so findet auch keine Trabekelbildung statt, die äußeren Myokardanteile sind hypertroph und der Embryo stirbt. BMP-10 hält ein bestimmtes Nkx 2.5 Level aufrecht und steht mit diesem Faktor in einem negativen Feedback-Mechanismus: BMP-10 fördert die Nkx 2.5 Bildung während Nkx 2.5 reprimierend auf BMP-10 wirkt. Ein Fehlen des BMP-10-regulierenden Nkx 2.5 ist für den Embryo ebenfalls tödlich: Hierbei kommt es zu einer erhöhten BMP-10 Konzentration und damit zu einer übermäßigen Trabekelbildung (Hanying Chen et al., 2004). Eine Mutation im codierenden Gen des Proteins Nkx 2.5 kann zu Herzerkrankungen führen. Beim Menschen konnte eine Form der Herzinsuffizienz aufgrund einer heterozygoten Nkx 2.5 Mutation nachgewiesen werden, bei der kurze Zeit nach der Geburt Arrhythmien und AV-Blöcke auftreten und das Myokard mit einer hypertrophen Kardiomyopathie reagiert. Bei Mutation von Nkx 2.5 wurden außerdem kongenitale Fehlbildungen, wie Septumdefekte, Defekte im Ausflusstrakt und ein hypoplastisches Linksherz mit Arrhythmien, beschrieben. Solche Defekte lassen sich nicht vollständig chirurgisch beheben (Mohammad Pashmforoush et al., 2004).

1.1.2 Die Herzentwicklung als Forschungsgebiet

Genetische Defekte kardialer Transkriptions- und Wachstumsfaktoren können die Ursache für einen Abort im Embryonalstadium oder für einen Großteil der angeborenen Herzfehler sein. Ein typischer Defekt ist ventrikuläres spongiöses Myokard mit übermäßiger Trabekelbildung. Das Herz ist vergrößert und es kommt zu kongestivem Herzversagen. Häufig sind zusätzliche Fehlbildungen wie ein Ventrikelseptumdefekt oder Pulmonalstenosen vorhanden. Mit dem Wissen über die Rolle der BMPs in der Herzentwicklung wird weiter geforscht, um in Zukunft bereits kongenital korrigierend in die Entwicklung eingreifen zu können. Es gibt bereits Experimente *in vitro*, bei denen das fehlende Protein von außen zugeführt wurde und sich das Herz daraufhin fehlerfrei entwickelt hat (Hanying Chen et al., 2004). Auch das Bild der postnatalen Myozytenentwicklung hat sich geändert. Bisher ist man davon ausgegangen, dass sich Myozyten nach der Geburt nicht mehr teilen können. Neuere Forschungsergebnisse besagen jedoch, dass Herzmuskelzellen noch ein geringes Potential zur Regeneration haben. Untersuchungen von embryonalen und adulten Stammzellen sollen auch im Gebiet der Kardiogenese neue Möglichkeiten aufdecken, die in der zukünftigen Therapie von Herzinfarkten genutzt werden könnten (Martina Buggisch, 2007).

1.2 Die Proteinfamilie der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

1.2.1 Die Mitglieder der Transforming Growth Factor β (TGF- β)-Superfamilie

Die Transforming Growth Factor β -Superfamilie weist neben den BMPs noch andere Mitglieder auf, wie zum Beispiel TGF- β , Aktivine und Inhibine, Müller-Inhibitor-Substanz (MIS) und neurotrophe Faktoren von Gliazelllinien (GDNF). Ihr Einflussbereich erstreckt sich von der Embryonalentwicklung bis hin zur Induktion von Umbauvorgängen im adulten Gewebe durch Zell-Zell-Signalübertragung (Peter ten Dijke et al., 2003). Der Mensch besitzt 34 Mitglieder dieser Proteinsuperfamilie in seinem Genom. Eine Übersicht ist in Abbildung 4 dargestellt.

Alle Mitglieder besitzen eine hoch konservierte Struktur im Molekulaufbau und nutzen einen Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor zur Signalweiterleitung. Die Peptide tragen typischerweise am aminoterminalen Ende eine Signalsequenz, der eine Prodomäne folgt. Am carboxyterminalen Ende befindet sich das reife Peptid. Dieses wird durch Furin-vermittelte Spaltung freigesetzt. Nach der Abspaltung kann es zu einer homo- oder heterodimeren Komplexbildung kommen. Zwei solche Moleküle verbinden sich über eine Disulfidbrücke.

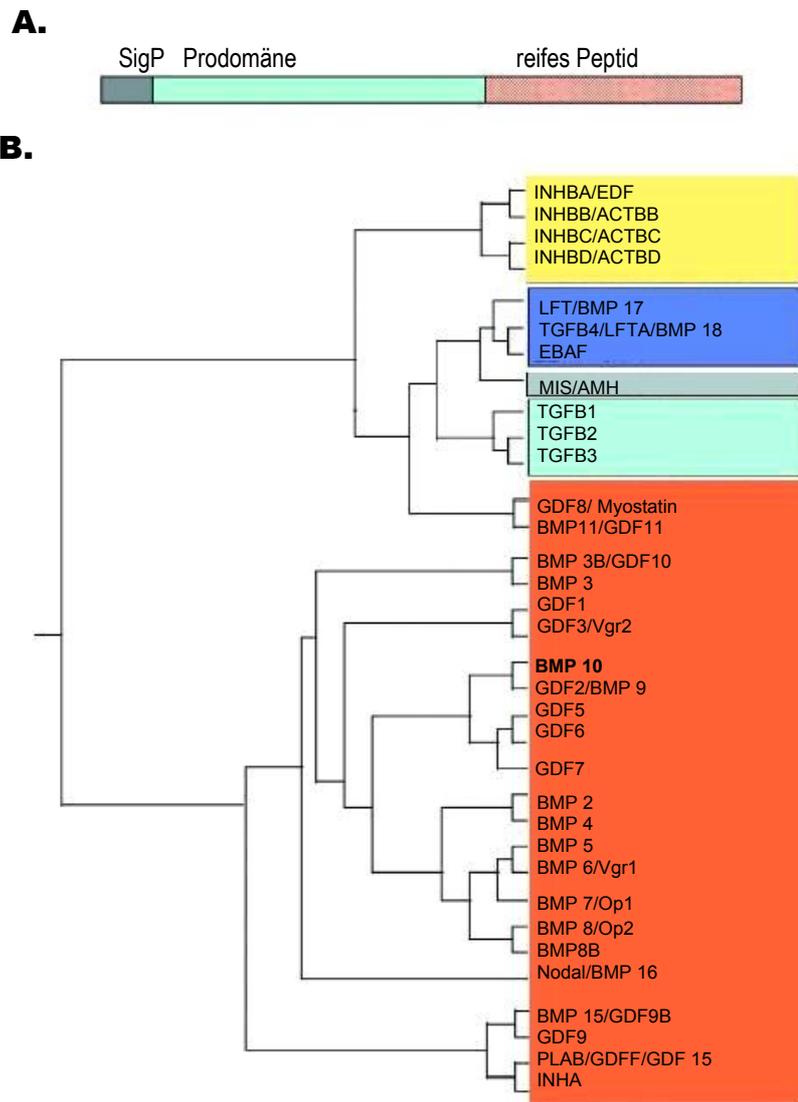


Abbildung 4: Übersicht der Mitglieder der TGF- β Superfamilie.

A: schematischer Aufbau eines TGF- β Familienmitgliedes: Signalpeptid (SigP)-Prodomäne-reifes Peptid.

B: Dendrogramm aller TGF- β Superfamilienmitglieder, die beim Menschen vorkommen. Die Mitglieder der BMP-Familie sind rot hinterlegt.

Bild modifiziert übernommen aus ten Dijke, P. et al.; JBJS 2003.

Die meisten Peptide enthalten als räumliche Struktur einen Cysteinknoten bestehend aus sieben Cysteinresten. Zwischen je zwei Cysteinresten bilden sich Disulfidbrücken aus. Zwei der drei Disulfidbrücken bilden einen Ring durch den die letzte Disulfidbrücke zieht. Der letzte Cysteinrest bildet das Verbindungsstück im dimeren Komplex. Zur Stabilisierung werden auch hydrophobe Bindungen eingegangen. Homologe Dimere sind die typische aktive Form der Proteine der TGF- β -Superfamilie.

1.2.2 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

Die Bone Morphogenetic Protein-Familie gehört zur TGF- β -Superfamilie. Ihre Mitglieder werden nicht nur bei den Säugetieren sondern auch bei Hühnchen, Drosophila und Seeigeln gefunden. Mittlerweile sind mehr als 20 verschiedene Proteine dieser Familie bekannt.

BMPs wurden vor über 40 Jahren als Proteine in demineralisierten Knochen entdeckt, die bei Zugabe zu Muskelgewebe eine Knochenbildung auslösen können. Seitdem sind viele neue Erkenntnisse über ihre Funktionen dazugewonnen worden. Eine Aufgabe der BMPs ist in der Embryonalentwicklung zu finden. Dort sind sie für die Aktivierung der Entwicklung von verschiedenen Organen zuständig. Im weiteren Entwicklungsverlauf übernehmen sie auch die Regulierung von Proliferation, Differenzierung, Migration sowie das Überleben und den gezielten Tod von Zellen. Sie sorgen für eine funktionierende Entwicklung von verschiedenen Organen und Geweben. BMPs stimulieren die Differenzierung zu Osteoblasten und inhibieren die Ausbildung von Myoblasten. Sie leiten aber auch die Entwicklung des Herzens, der Lunge, des Urogenital- und Reproduktionssystems ein, sind beteiligt an der Zahn- und Augenentwicklung und spielen eine große Rolle bei der Entwicklung von Gliedmaßen aus Extremitätenknospen. Auch postnatal haben BMPs noch Funktionen z. B. bei der Frakturheilung.

Kommt es pränatal zu Defekten bei der Expression bestimmter BMPs oder im Signaltransduktionsweg, ergeben sich erhebliche Defekte in der Embryonalentwicklung, z. B. das Fehlen von Gliedmaßen oder Aborte aufgrund der Dysfunktion von lebenswichtigen Organen wie z. B. dem Herzen.

1.2.3 Bone Morphogenetic Protein (BMP)-10

Das BMP-10 ist insgesamt 421 Aminosäuren lang. Es enthält 309 Aminosäuren in der Proregion, RIRR (= Arg, Ile, Arg, Arg) als Schnittstelle sowie die 108 Aminosäuren lange reife Region, mit den typischen 7 Cysteinresten (Herbert Neuhaus et al., 1999). Das Gen wurde bei Mensch, Maus und Hühnchen in sehr ähnlichem Aufbau gefunden, so dass am Tiermodell die Funktion und Wirkungsweise des Proteins gut erforscht werden kann.

In der Literatur wird die Funktion des BMP-10 Gens in der Embryonalentwicklung des Herzens von Maus und Hühnchen beschrieben (Hanying Chen et al., 2004, Mohammad Pashmforoush et al., 2004, Semir Somi et al., 2004). Das kodierte Protein aktiviert das Wachstum von embryonalen Kardiomyozyten. Seine Hauptaufgabe besteht in der Bildung der ventrikulären Trabekel, im engeren Sinne in der Erhaltung des Trabekelwachstums. In der frühen Embryonalphase sind die Trabekel auch für die Durchblutung der Herzanlage zuständig. Später bilden sich

aus dem Myokard der Trabekel Herzmuskelzellen für das Ventrikelseptum und die Papillarmuskeln sowie Zellen für das Erregungsleitungssystem. Fehlt das Protein als Wachstumsfaktor, so kommt es schon in frühen embryonalen Stadien der Maus zu einem insuffizienten Herzen. Es bilden sich Blutansammlungen im Kopf, Schwanz und Perikardbereich. Das Perikard ist erweitert, das Myokard teilweise hypertroph und die Trabekel im Inneren fehlen. Eine fehlerhafte Ausbildung des Gefäßsystems durch den funktionellen Defekt ist ein Sekundäreffekt. Damit ist eine normale Herzfunktion nicht mehr gewährleistet (Hanying Chen et al., 2004).

Während einer normalen Herzentwicklung differenzieren sich die Vorläuferzellen des Myokards zu einem inneren trabekelbildenden und einem äußeren myokardialen Anteil. BMP-10 kann hierbei sowohl parakrin als auch autokrin als Wachstums- und Differenzierungssignal wirken. Die BMP-10 Konzentration wird durch verschiedene Proteine reguliert. Negativregulatoren sind FKBP12 (FK 506 bindendes Protein) und Nkx 2.5. Fehlt FKBP12, ist im Herzen ein Anstieg der BMP-10 Konzentration zu finden, infolge derer eine übermäßige Trabekelbildung stattfindet. Das Resultat ist eine fehlerhafte Entwicklung des Herzens und der Tod des Embryos durch Herzinsuffizienz (Hanying Chen et al., 2004).

BMP-10 greift in die Regulierung diverser Transkriptionsfaktoren (z. B. $p57^{kip2}$, Nkx 2.5 und MEF2C) ein. Damit die Kardiogenese des Mausembryos nach der Entwicklung der Herzschleife fortgesetzt werden kann, müssen Transkriptionsfaktoren wie Nkx 2.5 und MEF2C in ausreichender Konzentration vorhanden sein. Fehlt BMP-10, so werden die genannten Transkriptionsfaktoren im Herzen weniger stark exprimiert. Die Folge ist eine mangelhafte Herzfunktion (Hanying Chen et al., 2004). Weitere Faktoren, die beim Fehlen von BMP-10 signifikant weniger exprimiert werden, sind Chisel und ANP. Beide werden durch Nkx 2.5 reguliert.

Weiterhin wird BMP-10 als Antagonist des Transkriptionsfaktors $p57^{kip2}$ beschrieben, der einen Negativregulator im Zellzyklus darstellt und während der Zeit der Kammerreifung im Bereich der Trabekel vorkommt. Er reguliert den Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus und die Differenzierung von Zellen. Wird er durch BMP-10 gestoppt, so können sich die Kardiomyozyten weiter teilen.

Interessanterweise konnte in Zellkulturversuchen (Hanying Chen et al., 2004) gezeigt werden, dass ein BMP-10 Mangel in den Zellen ausgeglichen werden kann. Nach Zugabe des Proteins in das Nährmedium fand eine normale Zellentwicklung statt.

1.2.4 Die BMP- bzw. TGF- β -Rezeptoren

Die Rezeptoren und die Signaltransduktion sind für die Mitglieder der TGF- β Familie gut untersucht. Es werden zwei Rezeptor-Typen für die Proteine der TGF- β Superfamilie unterschieden: Typ-I und Typ-II-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor. Jeder Rezeptor-Typ besitzt eine intrazelluläre Domäne mit Kinaseaktivität, eine Transmembrandomäne und einen extrazellulären Teil. Letzterer enthält eine cysteinreiche Region und die Bindungsstelle für Liganden. Der Rezeptor im Signalweg ist ein Komplex aus jeweils zwei Kinase-Rezeptoren der beiden Typen also insgesamt vier Molekülen. Die Spezifität des Rezeptors im Signalweg ergibt sich aus mehreren Subtypen der Kinase-Rezeptoren, die sich zusammenfinden. Für den Typ-I sind sieben und für den Typ-II fünf Subtypen im menschlichen Genom bekannt.

Die BMP-Dimere können als Liganden an vorhandene Rezeptor-Komplexe binden und so den Smad-Signalweg intrazellulär aktivieren. Ein BMP-Dimer kann außerdem zunächst an einen hochaffinen Typ-II-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor und anschließend zusammen mit diesem den weniger affinen Typ-I-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor binden. Auch hier wird intrazellulär der Smad-Signalweg aktiviert. Eine dritte Möglichkeit besteht in der Bindung eines BMP-Dimers an einen Typ-I-Rezeptor, der dadurch angeregt wird, seinerseits ein Dimer zu bilden und anschließend den Typ-II-Rezeptor zu rekrutieren. Es folgt intrazellulär die Aktivierung des p38/MAPK Signalwegs (Joan Massagué et al., 2000; Yigong Shi et al., 2003).

Die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor erfolgt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und hydrophobe Bindungen sorgen für Halt. Aufgrund der begrenzten Anzahl der verschiedenen intrazellulären Signalmoleküle ist die Zusammensetzung des Rezeptor-Liganden-Komplexes entscheidend für das jeweils weiterzuleitende Signal. Durch Kombination der verschiedenen Typ-I-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren mit den Typ-II-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren werden bestimmte Signale übermittelt. Dabei ist jedoch nicht jeder Rezeptor-Typ für jeden Liganden empfänglich. Tabelle 1 gibt Auskunft über die zu den Rezeptoren gehörenden Liganden (Yigong Shi et al., 2003).

Nach der Komplexbildung der beiden Rezeptor-Typen phosphoryliert die konstitutionell aktive Typ-II-Serin/Threonin-Kinase die Typ-I-Serin/Threonin-Kinase an einer glycin- und serinreichen Domäne intrazellulär. Im Signaltransduktionsweg ist somit die Typ-I-Kinase das Substrat für die Typ-II-Kinase. Die so aktivierte Typ-I-Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert im Zellinneren weitere Signalproteine.

Tabelle 1: Übersicht über TGF- β Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren und deren Liganden.
Tabelle frei übernommen aus ten Dijke et al 2001.

| Rezeptor-Typ | Rezeptoren | Liganden |
|-----------------|---------------------|------------------------|
| Typ-I-Rezeptor | ALK-1 | TGF- β , Activin |
| | ActR-I/ALK-2 | BMP, Activin? |
| | BMPR-IA/ALK-3 | BMP |
| | BMPR-IB/ALK-6 | BMP |
| | ActR-IB/ALK-4 | Activin |
| | T β R-I/ALK-5 | TGF- β |
| | ALK-7 | Nodal, Vg1, GDF1 |
| Typ-II-Rezeptor | ActR-II | Activin, BMP |
| | ActR-IIB | Activin, BMP |
| | T β R-II | TGF- β |
| | BMPR-II | BMP |
| | AMHR-II | AMH |

Zur Regulierung der Rezeptoraktivität gibt es verschiedene Mechanismen. Pseudorezeptoren, wie z. B. BAMBI, sind Transmembranproteine, die extrazellulär dem Typ-I-Rezeptor ähneln und BMPs binden. Eine intrazelluläre Signalweiterleitung findet jedoch nicht statt. Um eine effektivere intrazelluläre Signalweiterleitung zu ermöglichen existieren Ankerproteine, z. B. SARA, die dem Rezeptor seinen Signalpartner, z. B. Smad2 und 3, intrazellulär näher bringen und damit eine effektive Phosphorylierung und Signalweiterleitung ermöglichen (Peter ten Dijke et al., 2003).

Bekannte intrazelluläre Signalproteine sind die Smads (speziell für die BMPs: Smad1, 5 und 8). Diese Proteingruppe unterteilt sich in die drei Unterklassen der Receptor-regulated Smads (R-Smads), Common mediator Smads (C-Smads) und Inhibitory Smads (I-Smads) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die Unterklassen der Smads.

Tabelle frei übernommen aus ten Dijke et al 2001.

| Proteinklassen | Smad-Proteine |
|----------------|---|
| R-Smad | Smad1 Smad2 Smad3 Smad5 Smad8 |
| Co-Smad | Smad4 |
| I-Smad | Smad6 Smad7 |

Der Aufbau der Co- und R-Smads ist gleich. Sie bestehen aus zwei ähnlichen Regionen, genannt MH1 und MH2, die durch eine prolinreiche Linkerregion verbunden sind (siehe Abb. 5). Die MH1 Region interagiert mit der DNS. Die MH2 Region interagiert mit dem Typ-I-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor und enthält am Carboxy-Ende die SSXS-Sequenz, welche durch die Kinaseaktivität des Rezeptors phosphoryliert wird. Die Interaktion mit Co-Faktoren aller Art, d. h. auch mit den Co-Smads, ist nur in der MH2 Region möglich. Die I-Smads dagegen haben nur eine MH2 Region. Sie kann an Rezeptoren binden und mit anderen Smads Komplexe bilden. Außerdem hat sie die Möglichkeit, nucleozytoplasmatisches Shutteling zu vermitteln. Das Amino-Ende hat eine eigene Sequenz. Dieser Bereich kann nicht an DNS binden (siehe Abb. 5).

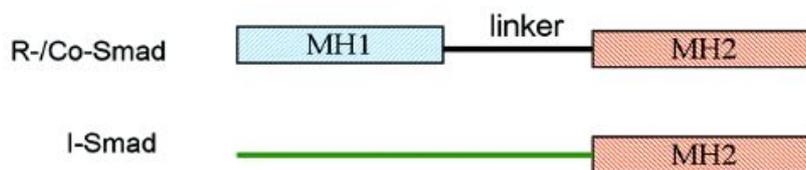


Abbildung 5: Aufbau der Smads.

Aufbau eines Smad Proteins. Bild übernommen aus ten Dijke, P. et al. JBJS 2003.

Nach Phosphorylierung eines R-Smads bildet dieser einen Komplex mit einem Co-Smad und gelangt mit dessen Hilfe in den Zellkern. Dort regulieren sie die Transkription von Zielgenen. Dabei findet eine direkte Bindung an die DNS über eine Smad-spezifische Bindungsstelle (SBE) statt und es werden weitere Co-Aktivatoren (z. B. p300 oder CBP) oder Co-Faktoren (z. B. FAST, OAZ, AP1 usw.) aktiviert. Nun kann die Transkription erfolgen. Bei einer Bindung von Co-Repressoren (z. B. TGIF, c-Ski, Sno-N) an Smads ist eine Bindung an die DNS nicht mehr möglich. Dieser intranukleäre Antagonismus richtet sich gegen Smad4 und R-Smads (Joan Massagué et al., 2000) (siehe Abb. 6).

Die beiden I-Smads funktionieren auf zwei verschiedenen Wegen. Zum Einen inhibiert Smad6 BMP-Signale durch Bindung an den aktivierten BMP-R-Smads, sodass Smad4 kompetitiv gehemmt wird und keine Translokation in den Zellkern stattfinden kann. Smad7 hingegen ist ein Inhibitor der gesamten TGF- β Superfamilie. Durch seine Bindung an den Typ-I-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor blockiert er diesen, so dass keine Phosphorylierung und Aktivierung von R-Smads möglich.

Die Regulierung der Smad Aktivität erfolgt über die E3-Ubiquitin-Ligasen Smurf1 und Smurf2, welche den Abbau von Smad1 und Smad5 in Proteasomen bzw. Lysosomen vermitteln. Sie sind auch in der Lage aktivierte Rezeptoren bzw. Liganden-Rezeptor-Komplexe zu ubiquitinieren. Der Abbau kann sowohl im Zytosol als auch im Zellkern stattfinden (Yigong Shi et al., 2003).

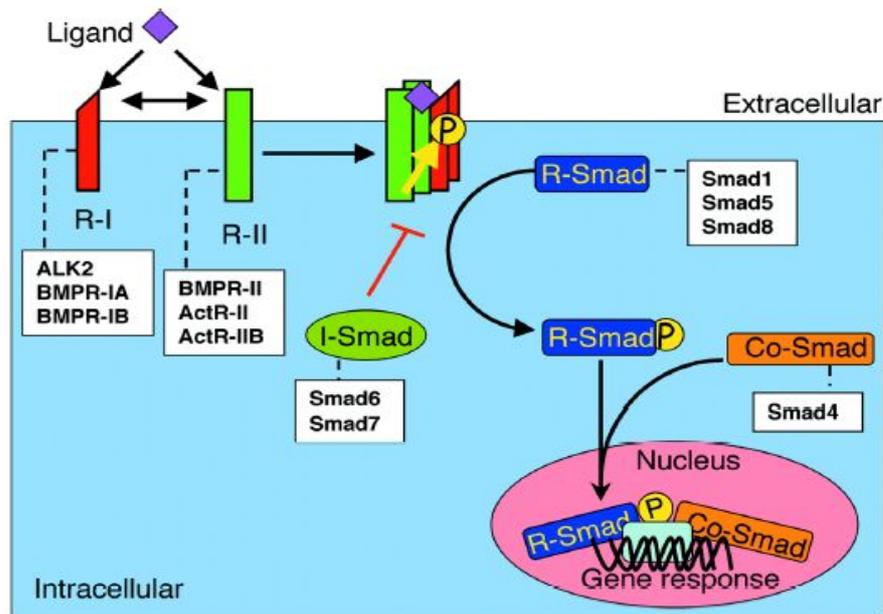


Abbildung 6: Signalkaskade nach BMP-Aktivierung

Signaltransduktion durch BMP-Rezeptoren – Dargestellt sind die Rezeptoren, die BMPs binden.

R-I = Typ-I-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor; R-II = Typ-II-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor. Nach der Komplexbildung findet die Phosphorylierung des Typ-I-Rezeptors statt. Dieser aktiviert durch Phosphorylierung die R-Smads. Nach Bindung des aktivierten R-Smads an Smad4 kann der Übergang in den Nucleus erfolgen. Dort findet die Transkription statt. I-Smads wirken in diesem Signalweg als Inhibitoren.

Bild übernommen aus ten Dijke, P. et al.; JBJS 2003

1.3 Der Modellorganismus

Für diese Arbeit wurde das Hühnchenherz als Modell gewählt, da Hühnereier leicht und kostengünstig auch in großer Anzahl verfügbar sind. Ein weiterer Vorteil liegt in der leichten Manipulierbarkeit und dem schnellen Wachstum der relativ großen Embryonen außerhalb des Muttertiers.

Zur Umsetzung der Überexpression des BMP-10 Gens wurden RCAS Viren benutzt. Die Abkürzung RCAS steht für *Replication-competent ASLV long terminal repeat (LTR) with a splice acceptor*. ASLV ist die Abkürzung für *Avian sarcoma leucosis virus*. Das RCAS System ist ein Retrovirus, in welches man ein Gen künstlich hineinbringen kann. Das Virus beinhaltet eine eigene Promotorregion und kann sein Genom zusammen mit dem eingefügten Gen in das Genom des Wirtsorganismus einbauen. Die Virusreplikation ist schnell und effizient. Dabei ist auch eine in vivo Anwendung möglich. Das Virusgenom selbst spielt bei der weiteren Zellentwicklung im Wirtsorganismus keine Rolle.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die genauere funktionelle Charakterisierung des BMP-10 Gens. Als Modell für ein sich entwickelndes Herz diente im Rahmen dieser Arbeit das Hühnchenherz. Es sollte das BMP-10 Gen im Hühnchen überexprimiert werden. Dazu musste ein Virus hergestellt werden, das für die Einschleusung des hühncheneigenen BMP-10 Gens in die kardialen Zielzellen verwendet werden kann. Das Virus war in die embryonalen Herzen einzubringen und nach einer Weiterentwicklung der Embryonen sollte die Präparation und Auswertung der beimpften Herzen erfolgen. Um das Vorkommen der BMP-10 RNS zu belegen wurde die in-situ-Hybridisierung angewandt.

2 Material und Lösungen

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

| | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Deckgläser (24 x 60 mm) | Roth oder Menzel |
| Filmmaterial | Polaroid |
| Glaskapillaren | Science Products GmbH |
| Hühnereier | Lohmann Tierzucht GmbH |
| Objektträger | Elka |
| Parafilm | American National Can |
| Plastikwaren | Greiner Labortechnik GmbH oder Nunc |
| UV-Küvetten | Eppendorf |

2.1.2 Enzyme

| | |
|---------------------|--------------------------|
| BamHI Jena | Bioscience |
| ClaI | Fermentas |
| Lysozym | Roth |
| Proteinase K | Roth |
| RNase A | AppliChem |
| RNasin | Promega |
| Superscript reverse | Transkriptase Invitrogen |
| T4-Ligase Promega | Fermentas |
| Taq - Polymerase | Eppendorf |
| XbaI Jena | Bioscience |

Verwendete Enzyme wurden mit den entsprechenden Puffern und Zusätzen (z. B. BSA) von den angegebenen Firmen bezogen.

2.1.3 Chemikalien

| | |
|---|--------------------|
| Blocking reagent #1096176 | Roche |
| BM purple AP substrate # 1442074 | Roche |
| DMEM-Medium (4500 mg/L Glukose) | Biochrom KG |
| DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) | Sigma |
| Dig RNA labeling Mix | Roche |
| dNTP | Eppendorf |
| DTT | Invitrogen |
| Entellan | Merck |
| Fetales Kälberserum | Biochrom KG |
| IPTG | Roth |
| Paraffin | Roth |
| Polyfreeze tissue freezing Medium | Polyscience Inc. |
| Sequenzierungszusätze | Applied Biosystems |
| Vectabond-Reagenz (Aminopropyltriethoxysilan) | Vector |
| X-Gal | Roth |

2.1.4 Antikörper

| | |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| 3C2 – RCAS-Virus Antikörper | freundliche Gabe von Dr. P. Neuhaus |
| Alexa-Fluor 594 Goat antiMouse IgG | Molecular probes |
| Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente | Roche |

2.1.5 Bakterienstämme

XL1 - blue, Genotyp: *rec A1 end A1 gyr A96 thi-1 hsdR17 supE44 rel A1 lac* [F' *proAB lacI^q*
ZΔM15 Tn10 (Tet^r)] (Hersteller: Stratagene)

One Shot TOP 10 E. coli, Genotyp: F- *mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74*
deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

(Hersteller: Invitrogen)

2.1.6 Antibiotika

| | |
|-------------------------|-------|
| Ampicillin | Roth |
| Kanamycin | Roth |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco |
| Tetracyclin | Merck |

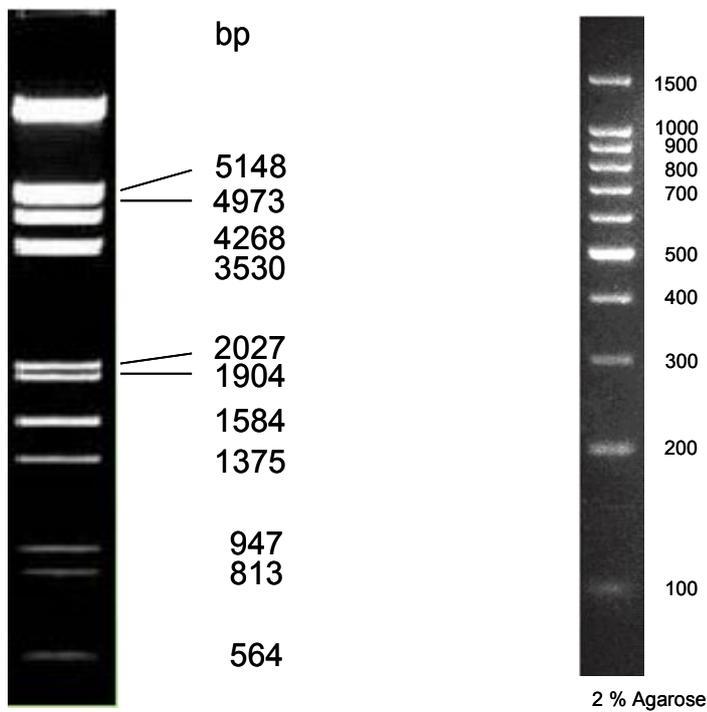
2.1.7 DNS-Größenstandards

λ DNS - EcoRI/HindIII verdaut

Ladder

Jena Bioscience

Promega



2.1.8 Kits

| | |
|-----------------------------|------------|
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen |
| TOPO TA Cloning Kit | Invitrogen |

2.1.9 Klonierungsvektoren

| Vektor | Eigenschaften | Hersteller |
|---------|--|-------------------------------------|
| pCR 2.1 | Klonierungsvektor für PCR Fragmente mit T-Überhang | Invitrogen |
| SLAX | Klonierungsvektor | freundliche Gabe von Dr. H. Neuhaus |
| RCAS | Hühnchenvirus | freundliche Gabe von Dr. H. Neuhaus |

2.1.10 Oligonukleotidsequenzen

Oligonukleotide wurden von Roth (Karlsruhe) bezogen

| Name | Sequenz vom 5'- zum 3'-Ende | Schmelztemperatur |
|----------------|-----------------------------|-------------------|
| ActEx3LT | TGG AGA AAA TCT GGC ACC AC | 52°C |
| ActEx4RT | AAT GGT GAT GAC CTG GCC GT | 52°C |
| Anfang3' | ATC CTT CAT GCT CTG GAG CA | 60°C |
| BMP10-5'-1 | CTG CCT CTT GGT TCA CC | 54°C |
| BMP10-5'-2 | AGC ACT CTT CCT TAG AGG | 54°C |
| BMP10-5'-3 | CCT CTT TTC GAT GAA TTC C | 54°C |
| BMP10-5'-UTR-1 | GAT AAA ACC GCC ACT TAG C | 56°C |
| BMP10-5'-UTR-2 | AGA GCT TGT TGA GTG TGG | 54°C |
| cBMP10-3-forw | CTC CAG CAG GAT ATG AAG C | 58°C |
| cBMP10-5-rev | GTG CCA TAG ATC TGT CTG G | 58°C |
| cBMP10-5UTR3 | GGC CGG AGC GAA GCC ATG | 62°C |
| cBMP10-5UTR4 | GAG CGA AGC CAT GGA TTC C | 60°C |
| cBMP10-ATG | ATG GAT TCC ATA GTC CTC C | 56°C |
| cBMP10-ATG-2 | GCT TCA GAA TAT GAA GAA CG | 56°C |
| cBMP10-Stop | CTA TCT GCA GCC ACA CTC | 56°C |
| Diana 3'rev | GCT TCA TAT CCT GCT GGA G | 58°C |
| Diana 5'forw | CCA GAC AGA TCT ATG GCA C | 58°C |
| DJ1-5 | GTG GGA GAC TTT TGA TGT CA | 58°C |
| DJ2-3 | GGG GTC CTC TTA CAG TAC TT | 60°C |
| M13forward | GTA AAA CGA CGG CCA G | 50°C |
| M13reverse | CAG GAA ACA GCT ATG AC | 50°C |

| Name | Sequenz vom 5'- zum 3'-Ende | Schmelztemperatur |
|--------------|---------------------------------|-------------------|
| Primer Mitte | CCT TCT GTT CAA TGT CTC CA | 58°C |
| T3 | GCT CGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG | 68°C |
| T7 | GAA TGG TAA TAC GAC TCA CTA TAG | 66°C |

Primer für mRNS von Invitrogen:

- Oligo(dT)
- random hexamers

2.2 Lösungen

2.2.1 Lösungen für die DNS-Präparation

Lösung A:

1,50 mL 20% Glukose
 1,25 mL 1 M Tris, pH 8,0
 1,00 mL 0,5 M EDTA
 46,25 mL H₂O

Lösung B: Immer frisch ansetzen!

0,2 mL 10% NaOH
 0,5 mL 20% SDS
 9,3 mL H₂O

Lösung C:

30,00 mL 5M Kaliumacetat
 5,75 mL Eisessig
 14,25 mL H₂O

2.2.2 Medien zur Herstellung von kompetenten Bakterien

FSB Medium:

100 mM KCl
 45 mM MnCl₂ x 4 H₂O
 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O
 3 mM HAcCoCl₃
 10 mM Kaliumacetat
 10 % (w/v) Glycerin
 ad 1 L H₂O
 Mit 0,1 M HCl pH von 6,4 einstellen.
 Steril filtrieren.

SOB Medium:

20,0 g Trypton
 5,0 g Hefe-Extrakt
 10,0 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 ad 1 L H₂O
 Autoklavieren und nach Erkalten Zugabe von:
 10 mL 1M MgSO₄
 10 mL 1M MgCl₂
 Steril filtrieren.

2.2.3 Medien für AgarplattenLB-Medium:

5 g Hefe-Extrakt
 5 g NaCl
 ad 1L H₂O
 pH 7,5 mit NaOH
 Für Platten: + 15 g Agar auf 1 L

Selektionsantibiotika:

Ampicillin (Endkonz.: 100 µg/mL)
 Kanamycin (Endkonz.: 30 µg/mL)

Weitere Zusätze für Platten:

IPTG (24 mg/mL) mit 100 µL/Platte
 X-Gal (50 mg/mL) mit 40 µL/Platte

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese50 x TAE:

242,0 g Tris
 57,1 mL Eisessig
 100,0 mL 0,5 M EDTA
 ad 1 L H₂O

Gel:

5 g Agarose
 ad 500 mL 1xTAE
 Zum Aufbewahren des flüssigen Gels
 Lagerung bei 65°C nötig.

2.2.5 Lösungen für die Mikromanipulation an HühnchenembryonenRinger-Lösung:

7,20 g NaCl
 0,23 g CaCl₂ x 2 H₂O
 0,37 g KCl
 ad 1L H₂O
 pH von 7,2 einstellen

Pen/Strep in Ringerlösung:

1/10 des gewünschten Endvolumens durch
 10x Pen/Strep ersetzen.

Tusche in Ringerlösung:

5,0 mL Ringerlösung
 0,5 mL Pelikan Tusche A; 17 schwarz
 Nur wenige Tage haltbar.

2.2.6 Lösungen für die Präparation von Embryonen und Geweben10 x PBS:

80,0 g NaCl
 2,0 g KCl
 14,4 g Na₂HPO₃
 2,4 g KH₂PO₃
 pH 7,2 einstellen.
 ad 1 L H₂O
 + 200 µL DEPC

4% PFA/PBS:

40 g Paraformaldehyd
 ad 1 L 1x PBS
 Zugabe von einigen Tropfen 10 N NaOH
 Zum vollständigen Auflösen des PFA
 erwärmen auf 55°C.
 pH Einstellung auf 6 bis 7 mit HCl.

Über Nacht bei 37°C, dann autoklavieren.

5x Lämmli-Puffer:

| | |
|-------|------------------|
| 3 mL | 1M Tris HCl |
| 25 mL | 50% Glycerol |
| 10 mL | 10% SDS |
| 7 mL | H ₂ O |

Lyse-Puffer: Immer frisch ansetzen.

| | |
|-------|---|
| 1 mL | Lämmli Puffer |
| 10 µL | 0,2 M PMSF (in Ethanol) |
| 2 µL | 25 mg/0,1mL Benzamidine (immer frisch lösen) |
| 1 µL | 1 M Na ₃ VO ₄ |
| 20 µL | 1 M NaF |
| 1 µL | 2 mg/mL Aprotinin |
| 1 µL | 2 mg/mL Leupeptin |

2.2.7 Lösungen für die whole mount in-situ-Hybridisierung

Alle Lösungen, die zur Hybridisierung genutzt werden, müssen absolut RNase-frei sein. Zur Herstellung dieser Lösungen Verwendung von DEPC und autoklavieren für 60 min. Ausnahme Tris-Puffer, diesen zweimal autoklavieren.

PBT:

| | |
|-------|---------|
| | PBS |
| 0,1 % | Tween20 |

t- RNS:

Hefe-RNS (10 mg/mL)

RIPA:

| | |
|---------|--|
| 2,5 mL | 10% SDS |
| 15,0 mL | 5 M NaCl |
| 5,0 mL | NP40 |
| 25,0 mL | 10% Deoxycholate |
| 1,0 mL | 0,5 M EDTA |
| 25,0 mL | 1 M Tris (pH 8,0) |
| ad | 500 mL mit DEPC Wasser, kein autoklavieren nötig. |

4% PFA/ 0,2% Glutaraldehyd in PBT:

| | |
|---------------------------------|-------------------|
| 4 % | PFA/PBT (pH 6-7) |
| 400 µL | 25% Glutaraldehyd |
| pH Einstellung mit HCl auf 6-7. | |
| ad | 50 mL PBT |

20 x SSC:

| | |
|------------------------------|------------------------|
| 17,53 g | NaCl |
| 8,82 g | Natriumcitrat |
| ad | 100 mL mit DEPC Wasser |
| pH einstellen auf 7 mit HCl. | |

Hybridisierungspuffer:

| | |
|--------|-------------|
| 250 mL | Formamid |
| 125 mL | 20 x SSC |
| 250 µL | Heparin |
| 500 µL | Tween20 |
| 125 mL | DEPC Wasser |

SSC/FA/Tween20:

5 mL 20x SSC
 25 mL Formamid
 50 µL Tween20
 ad 50 mL mit DEPC Wasser

10x TBST:

80 g NaCl
 2 g KCl
 250 mL 1 M Tris (pH 7,5)
 100 mL Tween20
 ad 1 L mit DEPC Wasser

RNase Lösung:

1,00 mL 5 M NaCl
 100,00 µL 1 M Tris (pH 7,5)
 10,00 µL Tween20
 8,89 mL DEPC Wasser

MABT:

11,6 g Maleinsäure
 8,8 g NaCl
 0,1 % Tween20
 pH Einstellung mit festem NaOH auf 7,5.
 ad 1 L mit DEPC Wasser

RNase A (10 mg/mL)Blocking-Stocklösung:

10 % (w/v) Blocking Reagenz
 (Roche) in MABT
 Stockaliquots lagern bei -20°C.

Alkalischer Phosphatase Puffer:

1,0 mL 5 M NaCl
 2,5 mL 1 M MgCl₂
 50,0 µL Tween20
 5,0 mL 1 M Tris (pH 9,5)
 2,0 mM Levamisol
 ad 50 mL mit DEPC Wasser

Färbelösung:

Boehringer BM purple AP Substrat
 2,0 mM Levamisol
 0,1 % Tween20
 Zentrifugieren und Pellet verwerfen.

Immer frisch herstellen.

2.2.8 Lösung für die histologische FärbungEosin Lösung:

12 g Eosin Y500
 500 mL 75% Ethanol

2.2.9 Medien für CEF-ZellenNährmedium:

DMEM-Medium (4500 mg/L Glukose)
 10 % Fetales Kälberserum
 2 % Chicken Serum
 1 % Pen/Strep

Gefriermedium:

0,8 mL Nährmedium
 0,1 mL Fetales Kälberserum
 0,1 mL DMSO

2.2.10 Lösungen für die Virusherstellung2 x BES:

oder:

2 x HES:

50,0 mM N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-
 aminoethansulfonsäure (BES)
 280,0 mM NaCl
 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 6,95

280 mM NaCl
 50 mM HEPES
 105 mM Na₂HPO₄, pH 7,05

pH Wert mit 1M NaOH auf 6,95 einstellen.

ad 1L H₂O

Lösung durch einen 0,45 µm Filter steril
 filtrieren und in Aliquots bei -20°C lagern.

3 Methoden

Aus Hühnchenembryonen wurde RNS gewonnen und daraus cDNS hergestellt. Der gewünschte Genabschnitt für BMP-10 wurde in einer Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert und dann in einen Vektor hineinligiert. Da der gewünschte Abschnitt zu groß war, musste die DNS in mehreren Teilen vervielfältigt, in kompetenten Bakterien vermehrt und dann wieder zusammenligiert werden.

Anschließend wurde das komplette cBMP-10 Gen sequenziert. Es wurde mit Hilfe mehrerer Vektoren in das Genom der RCAS-Viren eingebracht, bevor diese in CEF-Zellen vermehrt wurden. Die Infektiosität der Viren wurde vor der Injektion in die vorbereiteten Hühnchenembryonen geprüft. Um das Vorkommen von cBMP-10 RNS nachzuweisen, fand eine in-situ-Hybridisierung der Embryonen statt, die sich nach der Injektion weiterentwickelt hatten. Die Auswertung erfolgte makroskopisch und nach entsprechender Aufarbeitung (Einbettung in verschiedene Medien, Schneiden der Blöcke, Eosinfärbung) auch mikroskopisch.

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 RNS-Präparation aus Gewebe

Die RNS wurde aus 6 Tage alten Hühnchenembryonen gewonnen. Dazu wurden die Herzanlagen der Embryonen herauspräpariert, mit PBS kurz gewaschen und in TRIZOL Reagenz eingelegt. In dieser Lösung konnte eine Lagerung bei -80°C oder eine Homogenisierung erfolgen. Die weitere Verarbeitung fand nach den Vorgaben des TRIZOL Herstellers statt. Die RNS-Lagerung geschah in dem verarbeiteten Zustand bei -20°C .

3.1.2 Reverse Transkription

Zur Anheftung der Primer wurden $1\ \mu\text{L}$ mRNA (bzw. $100\ \text{ng}$), $1\ \mu\text{L}$ Primer (oligoDT, random hexamers bzw. siehe 2.1.10) und $8,5\ \mu\text{L}$ H_2O gemischt, für 10 min bei 65°C inkubiert und dann sofort auf Eis gestellt.

Für die cDNS-Erststrangsynthese wurde ein Mastermix, bestehend aus $4\ \mu\text{L}$ 5 x Transkriptionspuffer, $2\ \mu\text{L}$ DTT, $2\ \mu\text{L}$ dNTPs, $0,5\ \mu\text{L}$ RNasin und $1\ \mu\text{L}$ Superscript reverse Transkriptase vorbereitet. Je $9,5\ \mu\text{L}$ des Mastermixes wurden zu der Primerreaktion (s. o.) gegeben und für 90 min bei 42°C inkubiert.

Die Kontrolle der cDNS-Synthese geschah mittels G3PDH-PCR bzw. β -Aktin-PCR.

3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Der Ansatz für eine PCR-Reaktion bestand aus 1 μL cDNS, 0,5 μL dNTPs, 0,5 μL Start-(5')-Primer (10 mM), 0,5 μL Stop-(3')-Primer (10 mM), 5 μL 5 x Taq-Mastermix, 2,5 μL 10 x PCR-Puffer, 0,1 μL Taq Polymerase und 14,9 μL Wasser (Aqua bidest.).

Dieser Ansatz wurde bei 94°C in der PCR-Maschine für 2 min vorgewärmt, um dann 30 Zyklen wie folgt zu durchlaufen: Denaturierung der DNS für 1 min bei 94°C, Annealing der Primer bei der vorgegebenen Temperatur (siehe 2.1.10) für 1 min und Elongation für 1 min bei 72°C.

3.1.4 Klonierungen

Da zum Einbau des Gens in den endgültigen Vektor (RCAS) bestimmte Enzymschnittstellen notwendig waren, wurde das Gen über Zwischenschritte (Vektor pCR 2.1 und SLAX) dort eingebracht. Um den Vektor und das Gen zusammenzufügen, mussten beide mit den gleichen Restriktionsendonukleasen linearisiert werden. Zur Aufreinigung wurden beide Reaktionsansätze auf ein Elektrophoresegel aufgetragen, die jeweiligen Banden ausgeschnitten und hinterher durch Gelelution gereinigt. Die Konzentrationsmessung der gewonnenen Abschnitte erfolgte am Photometer von Eppendorf. Entsprechend der Größenanteile von Vektor und Insert wurden die einzusetzenden Volumina von Vektor und Insert für eine 1:1 Ligation und 1:2 Ligation berechnet.

Der Ligationsansatz enthielt das berechnete Volumen in μL des Inserts und des Vektors, außerdem 1 μL 10x Ligase Puffer und 1 μL T4-Ligase (10 U/ μL). Der Ansatz wurde mit Wasser (Aqua bidest.) auf 10 μL aufgefüllt und über Nacht bei 16°C ligiert.

Alternativ wurde das TOPO TA cloning Kit verwendet, dabei wurde den Herstellerempfehlungen entsprochen. Diese beinhalteten neben Informationen zur Klonierung auch Transformationshinweise.

3.1.5 Transformation

Zur Transformation, d. h. dem Einbau des Plasmids in die Bakterien und der Vermehrung der Bakterien, wurden 10 μL des Ligationsansatzes zu 200 μL der kompetenten Bakterien gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis stehen gelassen und dabei nach 15 min einmal vorsichtig gemischt. Danach wurden die Bakterien für 2 min bei 42°C hitzegeschockt. Nach Zugabe von 800 μL LB-Medium wurde das Gemisch für 30-60 min bei 37°C geschüttelt und dann für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die oberen 800 μL wurden abgenommen und verworfen. Die Bakterien wurden in den restlichen 200 μL resuspendiert und auf LB-Platten (mit

Selektionsantibiotikum, meist Ampicillin) mittels Trigalski-Spatel ausgestrichen. Bei der Blau/Weiß-Selektion der Bakterienkolonien fanden IPTG und X-Gal Platten Verwendung.

Die Platten wurden auf dem Kopf stehend über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen konnten einzelne Kolonien gepickt und in 3 mL LB-Medium mit Selektionsantibiotikum (meist Ampicillin) über Nacht vermehrt werden.

3.1.6 DNS-Mini-Präparation

Von einer Übernachtbakterienkultur wurden 1,5 mL in ein Eppendorfgefäß überführt und für 30 sek bei 14 000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 µL Lösung A resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Dazu wurden 200 µL der Lösung B gegeben, das Ganze vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Das Gleiche geschah nach Zugabe von 150 µL der Lösung C. Die Mischung wurde für 10 min bei 14 000 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurden 400 µL des Überstandes in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 1 mL abs. (oder 96%) Ethanol erfolgte die Fällung der DNS. Dazu musste das Gemisch für 5 min bei RT geschüttelt und dann 3 min bei 14 000 rpm und RT zentrifugiert werden. Das DNS-Pellet wurde in 70% Ethanol 5 min bei RT gewaschen, dann für 3 min bei 14 000 rpm und RT zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Danach wurde das Pellet in 20 µL TE-Puffer mit 50 ng/µL RNase A (pH 7,5) resuspendiert und für 15 min bei 65°C gelöst. Dies erspart einen zusätzlichen RNS Verdau. Zur Kontrolle wurde 1 µL der DNS für einen analytischen Restriktionsverdau eingesetzt.

3.1.7 DNS-Maxi-Präparation

Um größere Mengen DNS zu gewinnen, wurden die Bakterienkolonien in 200 mL LB-Medium und Selektionsantibiotikum (meist Ampicillin) in einer Übernachtskultur vermehrt. Dieses Gemisch wurde für 15 min bei 6 000 rpm und RT zentrifugiert (Sorvall). Der Überstand wurde verworfen, das Bakterien-Pellet in 10 mL Lösung A resuspendiert und in einen 50 mL Falcon überführt. Nach Zugabe von 50 µL Lysozym (10 mg/mL) wurde das Gemisch für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 20 mL Lösung B zugegeben, vorsichtig gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Das Gleiche geschah nach Zugabe von 15 mL der Lösung C. Das Gemisch wurde für 10 min bei 5 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus 3.2 RS). Der Überstand wurde durch einen Trichter mit Papierfilter in ein frisches 50 mL Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 20 mL Isopropanol wurde das Gemisch für 15 min bei RT inkubiert und danach für 10 min bei 5 000 rpm und RT zentrifugiert (Heraeus 3.2 RS). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 4 mL Aqua dest. resuspendiert und nach Zugabe von 4 mL LiCl

für 20 min auf Eis inkubiert sowie für 5 min bei 4 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus 3.2 RS). Der Überstand wurde in ein 30 mL Cortextröhrchen überführt und durch Zugabe von 18 mL abs. (oder 96%) Ethanol erfolgte die Fällung der DNS für 1 h (oder über Nacht) bei -20°C. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min bei 9 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Sorvall), der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 µL TE (pH 7,5) resuspendiert und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 10 µL RNase A (10 mg/mL), Inkubation für 30 min bei 60°C, Zugabe von 10 µL Proteinase K (10 mg/mL) und Inkubation für 1 h bei 37°C erfolgte die Phenol-Extraktion. Dazu wurden 500 µL Phenol zur Lösung gegeben, das Ganze 1 min geschüttelt, für 1 min bei 14 000 rpm und RT zentrifugiert, die wässrige Phase abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Der gleiche Vorgang erfolgte nacheinander nach Zugabe von Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol. Die DNS wurde mit 1 mL abs. (oder 96%) Ethanol und 50 µL 3M Na-Acetat für 1 h bei -20°C ausgefällt. Anschließend wurde die Lösung für 30 min bei 14 000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das DNS-Pellet in 70% Ethanol 5 min bei RT gewaschen, dann für 3 min bei 14 000 rpm und RT zentrifugiert, das Ethanol abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Danach wurde das Pellet in 200 µL TE-Puffer (pH 7,5) resuspendiert und 15 min bei 65°C gelöst. Zur Kontrolle wurde 1 µL der DNS für einen analytischen Restriktionsverdau eingesetzt.

3.1.8 Glycerolstock

Zur langfristigen Aufbewahrung der klonierten Plasmide wurden Glycerolstocks hergestellt. Dazu wurden 700 µL einer Übernachtskultur des Plasmids in LB-Medium (mit Selektionsantibiotikum) und 300 µL Glycerol gemischt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

3.1.9 Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNS wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977) angewandt.

Der Ansatz für die Sequenzierung enthielt 1 µL DNS Template (200-500 ng), 4 µL vorgefertigten Reaktionsmix, 2 µL 5x Big Dye Sequencing Buffer und 1 µL Primer (10 mM). Dieses Gemisch wurde mit Wasser (Aqua bidest.) auf 10 µL aufgefüllt.

In die PCR-Maschine durchlief dieser Ansatz 25 Zyklen wie folgt: Denaturieren der DNS für 30 sek bei 96°C, Annealing abhängig vom Primer zwischen 45°C und 60°C (siehe 2.1.10) für 15 sek und Elongation bei 60°C für 4 min.

Die Aufreinigung des Reaktionsansatzes erfolgte durch Ethanol-fällung. Dazu wurden zum hergestellten Ansatz 90 µL H₂O, 10 µL 3M Natriumacetat (pH 4,6) und 250 µL 100% Ethanol zu-

gegeben. Nach Zentrifugierung für 15 min bei 14 000 rpm und RT wurde das Ethanol wieder entfernt. Anschließend wurden erneut 250 μ L 70% Ethanol zugegeben und der Ansatz für 5 min bei 14 000 rpm und RT zentrifugiert. Dann wurde das Ethanol abermals entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet. Bei -20°C konnte dieses Pellet bis zur Sequenzierung gelagert werden. Die Analyse erfolgte im Sequenzgerät "ABI PRISM 310 Genetic Analyzer" von Perkin Elmer.

3.1.10 Restriktionsverdau

Für einen kleinen Ansatz eines Restriktionsverdau wurden die gewünschte Menge DNS, 1 μ L 10x BSA (10 mg/mL; falls erforderlich), 1 μ L 10x Puffer und 1 μ L Enzym (10 U/ μ L) gemischt und mit Wasser (Aqua bidest.) auf 10 μ L aufgefüllt.

Ein großer Ansatz für einen Restriktionsverdau enthielt das 10-fache Volumen des kleinen Ansatzes, wobei die Enzymmenge insgesamt nur 10% des Gesamtvolumens ausmachte.

3.1.11 Agarosegele und Gelelution

Zur Größenanalyse der linearisierten DNS-Abschnitte wurden 10%-ige Agarosegele hergestellt. Die Agarose wurde dafür in 1x TAE Puffer aufgeköcht und vor dem Erstarren mit 1 μ L/100 mL Ethidiumbromid versetzt. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1x TAE Puffer. Die DNS wurde mit Blue Juice Ladepuffer versetzt (1 μ L/10 μ L) und auf das Gel aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 90 V bei kleinen und 130 V bei größeren Gelen.

Zur Isolierung bestimmter DNS-Fragmente wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel auf dem UV-Tisch ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquickKits nach Angaben des Herstellers eluiert.

3.2 Virusherstellung

3.2.1 Aufarbeiten von CEF-Zellen

Der CEF-Zell-Stock wurde aufgetaut (Lagerung bei -80°C). Dann wurden die Zellen in 4 mL DMEM-Medium (4500 mg/L Glukose) mit Zusätzen (10% FCS, 2% Penicillin/Streptomycin) aufgenommen, für 5 min bei 1000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde in 5 mL DMEM-Medium (4500 mg/L Glukose) mit Zusätzen resuspendiert und auf eine 10 cm Zellkulturplatte mit 5 mL Medium gegeben. Die Zellen wuchsen bis zur gewünschten Zelldichte bei 37°C im Inkubator. Das Medium musste täglich gewechselt werden.

Zum Splitten der Zellen wurde das Medium abgesaugt und dann 5 mL PBS auf diese Platte gegeben. Die Platte wurde leicht geschwenkt und das PBS wieder abgesaugt. Danach wurden für 5 min 2 mL Trypsin zum Ablösen der Zellen zugegeben. Mikroskopisch wurde kontrolliert, ob sich die Zellen vom Untergrund abgelöst hatten. War dies der Fall, erfolgte die Zugabe von 8 mL DMEM-Medium (4500 mg/L Glukose) mit Zusätzen. Das Zellgemisch wurde von der Platte abgenommen, in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5 mL DMEM-Medium (4500 mg/L Glukose) mit Zusätzen resuspendiert. Davon wurden jeweils 1 bis 4 mL auf eine 10 cm Zellkulturplatte gegeben und mit Medium auf ein Endvolumen von 5 mL aufgefüllt. Die Zellen wuchsen bei 37°C im Inkubator, bis sie die gewünschte Zelldichte erreicht hatten.

Durch Resuspension des Zellpellets nach dem Zentrifugieren in 1 mL Gefrierschutzmedium, konnten die Zellen zur Lagerung bei -80°C Lagerung vorbereitet werden. Das Eppendorfgefäß mit der Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.2.2 Transfektion von CEF-Zellen

Die Transfektion der CEF-Zellen erfolgte an vier bis sechs aufeinanderfolgenden Tagen.

Am ersten Tag wurde der CEF-Zell-Stock auf einer 10 cm Zellkulturplatte aufgetaut und die Zellen wuchsen über Nacht in 10 mL DMEM-Medium (4500 mg/L Glukose)/10%FCS/2%CS/Pen.-Strep.. Bei einer 70-80% Konfluenz der Zellen wurde transfiziert. Vorbereitend wurden 10 µg RCAS-DNS mit 450 µL destilliertem Wasser verdünnt und 50 µL 2,5 M CaCl₂-Lösung hinzugefügt. Tropfenweise und unter Schütteln wurden dazu noch 500 µL 2x BES (HES) zugeben, alles vorsichtig gemischt und für 20-30 min bei RT inkubiert. Dann wurde das Medium von den Zellen abgenommen und 1 mL frisches Medium und die DNS-Lösung unter Schwenken zugefügt. Das Ganze wurde für 10 min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von weiteren 8 mL Medium erneut für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, 2 mL 15% Glycerol wurden zugegeben und die Zellen damit für 90 sek inkubiert. Dann wurden 10 mL PBS gegeben, die Platte leicht geschwenkt und das PBS wieder abgenommen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Danach wurden 10 mL Medium zugegeben und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am zweiten Tag sollten die Zellen konfluent sein. Wenn dies so war, wurden sie auf eine 15 cm Schale passagiert. Waren sie es nicht, erfolgte nach 24 Stunden eine erneute Kontrolle.

Am dritten Tag sollten die Zellen konfluent sein. Wenn dies so war, wurden sie auf vier 15 cm Schalen passagiert.

Als die Zellen zwischen dem vierten und sechsten Tag konfluent waren, wurden sie weitere 36 bis 48 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Virusernte.

3.2.3 RCAS-Virusernte

Das Medium über den vorbereiteten CEF-Zellen wurde durch 10 mL DMEM/1%FCS/0,2%CS/Pen.-Strep. (Ausgangsmedium 1:10 mit DMEM verdünnt) ersetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium geerntet, durch einen 0,45 Spritzenfilter gefiltert, in ein 50 mL Falcon-Röhrchen gegeben, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zu den Zellen wurden anschließend nochmals 10 mL DMEM/1%FCS/0,2%CS/Pen.-Strep. gegeben und die Virusernte an den beiden folgenden Tagen wiederholt. Abhängig vom Virus und der Konfluenz der Zellen, konnte der Titer zwischen 5×10^5 und 10^7 IU/mL variieren. Um den höchstmöglichen Titer zu erreichen, wurden die einzelnen Überstände, mit ihren unter Umständen unterschiedlichen Titern, getrennt behandelt.

3.2.4 Viruskonzentrierung

Das Medium, welches die Viren enthielt wurde aufgetaut und 3 Stunden bei 22000 rpm in einem Beckmann SW28 Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, wobei ein kleiner Rest (100-200 μL) über dem Pellet belassen wurde. Dabei war das Pellet nicht unbedingt zu sehen. Es wurde in dem verbliebenen Medium auf dem Schüttler für 15 min langsam wieder resuspendiert. Durch wiederholtes vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde es vollständig gelöst und in 20 μL Aliquots abgefüllt, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden.

3.2.5 Titerbestimmung vom RCAS-Virus

Zunächst war steriles Arbeiten mit den CEF-Zellen notwendig. Auf Vectabond beschichtete Objektträger wurden je ca. $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Zur Bestimmung der Zelldichte im Ausgangsmedium wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen auf den Objektträgern wurden für 70 Stunden mit einer Verdünnungsreihe (1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-8} , 1×10^{-10}) der RCAS-Virus-Lösung inkubiert. Zur Negativkontrolle diente Medium ohne Viren.

Die anschließenden Arbeiten wurden nicht mehr steril ausgeführt. Die Objektträger wurden beschriftet. Die folgenden Waschvorgänge erfolgten in Küvetten. Die Zellen wurden auf den Objektträgern für 5 min mit 4%PFA fixiert, dann 4 x 5 min mit PBS gewaschen und 10 min mit PBST geblockt. Danach wurden die Objektträger für 120 min mit 3C2 Antikörpern gegen

RCAS-Viren (in 1:5-facher Verdünnung) in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit PBST gewaschen. Danach wurden die Objektträger für 60 min mit Alexa-Fluor 594 Goat antiMouse IgG (in 1:500-facher Verdünnung) in einer feuchten Kammer inkubiert und erneut für 10 min mit PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI-Farbstoff (1:1000) für 5 min. Die Objektträger wurden aus der Lösung genommen, abgetropft und unter einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und ausgewertet.

Durch Einstrahlung von UV-Licht unter Verwendung bestimmter Filter wurden die Zellkerne, deren DNS mit DAPI angefärbt worden war, angeregt, unter dem Fluoreszenzmikroskop blau zu leuchten. Die mit Viren infizierten Zellen fluoreszierten rot bei Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 590$ nm. Von einem Ort eines Objektträgers wurden Bilder unter den genannten Lichtverhältnissen aufgenommen und in einem Bildbearbeitungsprogramm übereinander gelegt. Diese Darstellungen wurden ausgewertet. Der Titer ergab sich aus der Anzahl der infizierten Zellen (d. h. Anzahl der roten Zellkörper) im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellen (d. h. Anzahl der Zellkerne).

3.3 Mikromanipulation der Hühnchenembryonen

3.3.1 Vorbereitungen

Die Eier wurden 2,5 Tage bebrütet und die oben liegende Seite, an der der Embryo jeweils lag, wurde markiert. Es wurden 1x Ringerlösung mit Pen/Strep und mit Ringerlösung verdünnte Pelikan Tusche hergestellt.

Zur Absenkung der Herzfrequenz wurden die Embryonen vor der Injektion eine Stunde bei 4°C gekühlt. So wurden am Herzschlauch weniger Verletzungen durch die Manipulation hinterlassen. Die Eier wurden jeweils am hinteren (dickeren) Teil mit einer 0,9 x 40 mm Injektionskanüle angestochen und 3-5 mL Eiklar abgesaugt. Das kleine Loch wurde mit Klebeband wieder verschlossen. Die aufzuschneidende Stelle um die gemachte Markierung wurde auf dem Ei 2-reihig mit Klebeband abgeklebt und mit Hilfe einer kleinen runden Schere ein daumennagelgroßes ovales Loch geschnitten. Darunterliegende Luftblasen wurden mit einer Plastikpipette abgezogen. Der Embryo war nun gut zu sehen und zu erreichen.

3.3.2 Injektion

Mit einer 10 μ L-Pipette mit Mikroloaderspitze wurde die Virusstock-Lösung in die Kapillarinjektionsnadel pipettiert. Die Kapillarinjektionsnadelspitze wurde mit einem Folienstift markiert und unter dem Binokular abgeschnitten, sodass die Spitze so dünn wie möglich und offen war.

Das Injektionsgerät wurde eingeschaltet und getestet, ob Tropfen aus der Spitze kommen. Wegen fehlender Kontraste musste der Embryo hervorgehoben werden, indem relativ flach unter die Keimscheibe (Blastoderm) etwas Tuschelösung gespritzt (0,55 x 40 mm Nadel oder feiner) wurde. Das Ei wurde etwas geschwenkt um die Tusche zu verteilen. Mit einem Mikroskalpell, einem durch Ausglühen geschärften Wolframdraht in einer Pasteurpipette, wurde die Vitelline-Membran des Embryos eingeritzt und über dem Herzen entfernt. Die Injektionsnadel wurde postiert und unter Binokular-Sicht die Viruslösung ins Herz injiziert. Die Injektion erfolgte automatisch durch das Gerät (P_i :3500 pc, t_i : 1sek). Zum Schluss wurden zum Schutz vor Keimen und vor dem Austrocknen ca. 1-2 mL Ringerlösung mit Pen/Strep auf den Embryo gegeben. Das aufgeschnittene Loch im Ei wurde mit Klebestreifen zugeklebt und die Eier 2 Tage weiter bebrütet.

3.4 Immunhistochemische Methoden

3.4.1 Präparation von Embryonen

Die Embryonen wurden bis zum Tag 4,5 bzw. 5 bebrütet und teilweise zwischenzeitlich mit Viruslösung beimpft. Nach Entnahme der Embryonen aus dem jeweiligen Ei wurden diese in PBS gewaschen und gesäubert. Für die in-situ-Hybridisierung wurden sie über Nacht mit 4% PFA/PBS fixiert. Für eine Lagerung bei -20°C musste anschließend eine Dehydratation mittels aufsteigender Methanolreihe (25%, 50%, 75%, 100%, 100%) je 10 min auf Eis erfolgen.

3.4.2 Whole mount in-situ-Hybridisierung

Vor Beginn der Färbung wurden den Embryonen die Hirnbläschen aufgestochen, um Artefakte durch Ansammlung der Färbe-Lösung in Hohlräumen zu vermeiden.

Für die Hybridisierung war die Rehydrierung der in Methanol fixierten Embryonen durch eine absteigende Methanolreihe (75%, 50%, 25%) je 10 min auf Eis notwendig. Danach wurden die Embryonen für 2 x 10 min mit PBT auf Eis gewaschen, für 1 h mit 6% Wasserstoffperoxid/PBT auf Eis geblichen, 3 x 10 min mit PBT auf Eis, 3 x 5 min mit RIPA auf Eis, nochmals 3 x 5 min mit PBT auf Eis inkubiert und dann genau 20 min mit 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd/PBT fixiert.

Im Anschluss fanden weitere Waschvorgänge für 3 x 5 min mit PBT auf Eis, für 10 min mit Hybridisierungspuffer/PBT (1:1) bei RT und für 10 min mit Hybridisierungspuffer bei RT statt. Nach Inkubation für ein bis drei Stunden bei 65°C (oder 70°C) mit Hybridisierungspuffer wurden die Embryonen über Nacht bei 65°C (oder 70°C) in Hybridisierungspuffer mit der

Digoxigenin-markierten Gensonde und t-RNS hybridisiert. Die Riboprobe war zuvor für 3 min bei 80°C denaturiert worden.

Zum Entfernen der Riboprobe und zur Antikörperinkubation wurden die Embryonen für 2 x 30 min in Hybridisierungspuffer bei 65°C gewaschen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurden sie für 5 min in Hybridisierungspuffer/RNase-Lösung (1:1) bei RT gewaschen, um anschließend 2 x 30 min in RNase-Lösung mit 100 µL/mL RNase A bei 37°C inkubiert zu werden. Anschließend erfolgte die Inkubation für 5 min mit RNase-Lösung/SSC/FA/Tween20 (1:1) bei RT. Die Embryonen wurden auf 65°C in SSC/FA/Tween20 erwärmt und bei 65°C mit SSC/FA/Tween20 gewaschen (zuerst 2 x 5 min, dann 3 x 10 min, dann 1 x 30 min und abschließend 5 x 60 min). Danach wurden sie wieder auf RT abgekühlt und kurz in SSC/FA/Tween20/TBST (1:1) gewaschen. Weitere Waschvorgänge für 2 x 10 min bei RT mit TBST und 2 x 10 min bei RT mit MABT fanden statt, um anschließend die Embryonen für 1 h bei RT mit 10% blocking-Lösung/MABT zu inkubieren.

Zeitgleich wurde ein Ansatz einer 1:5000-fachen Verdünnung von Dig-Antikörpern in 1% blocking-Lösung/MABT (bei 4°C 1 h lagern) hergestellt. Dieses Gemisch wurde vor Benutzung zentrifugiert, das Pellet wurde verworfen. Über Nacht wurden die Embryonen in dieser Antikörperlösung bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Zum Entfernen der ungebundenen Antikörper wurden die Embryonen für 3 x 5 min bei RT mit TBST und für 8 x 60 min bei RT mit TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C in TBST geschüttelt. Dieser TBST Waschvorgang wurde teilweise über mehrere Tage fortgesetzt um eine vollständige Entfernung der Antikörper zu erreichen.

Zur Färbung wurden die Embryonen 3 x 20 min mit alkalischem Phosphatase Puffer gewaschen und für eine Stunde bis mehrere Tage in Färbelösung inkubiert. Zum Abstoppen der Färbung wurden sie 3 x 10 min mit alkalischem Phosphatase Puffer gewaschen und über Nacht mit 4% PFA/PBS fixiert. Das Lagern der gefärbten Embryonen war in PBS möglich.

3.4.3 Einbettung von Embryonen

Zur Einbettung in Gefriermedium wurden die in 4% PFA/PBS fixierten Embryonen über Nacht oder ggf. länger in einer 30% Saccharose/PBS-Lösung inkubiert. Die Embryonen mussten auf den Boden des Gefäßes abgesunken sein, bevor sie weiterverarbeitet werden konnten. In diesem Stadium konnten sie für die makroskopische Auswertung fotografiert werden. Das Einbetten der Embryonen in Gefriermedium in einem geeigneten Gefäß erfolgte auf Trockeneis. Der Block wurde über Nacht bei -20°C gelagert und danach am Kryotom geschnitten.

Zur Einbettung in Paraffin wurden die in 4% PFA/PBS fixierten Embryonen mittels aufsteigender Ethanolreihe (70%, 90%, 95%, 100%, 100%) je 1 h bei 4°C dehydriert. Danach wurden sie zweimal je 1 h bei RT in Xylol, dann 1 h in Xylol/Paraffin (1:1) bei 60°C und anschließend zweimal je 1 h in Paraffin bei 60°C gewaschen. Die Embryonen wurden in das Plastikgefäß gelegt und mit Paraffin übergossen. Um die Embryonen in die gewünschte Position zu bringen, wurde das Paraffin nochmals bei 60°C geschmolzen, im Anschluss bei RT ausgekühlt und bei 4°C über Nacht weiter ausgehärtet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Die Blöcke wurden am Rotationsmikrotom RM 2145 (Leica) geschnitten.

3.4.4 Eosin-Färbung

Das Waschen der Objektträger erfolgte in Glasküvetten. Bevor die Paraffinschnitte gefärbt werden konnten, mussten sie mittels einer Ethanolreihe (Xylol, Xylol, 100%, 96%, 90%, 70%, 50%, 30% Ethanol je 5 min) rehydriert werden. Die Färbung mit Eosin fand bei den in Paraffin eingebetteten Schnitten für 1 h in 1% Lösung statt.

Die Präparate, die in Gefriermedium eingebettet waren, wurden 2 x 2 min in Wasser gewaschen und für 10 min in 0,5% Eosin Lösung gefärbt.

Die Aufarbeitung zum Eindeckeln war für beide Varianten der Einbettung gleich. Dazu wurden die Objektträger kurz in Wasser gewaschen und dann in einer Ethanolreihe dehydriert (50%, 70%, 90%, 96%, 100% je 2 min und dann 2 x 5 min in Xylol). Das Eindeckeln erfolgte mit Entellan und die Präparate durften vor dem Eindeckeln nicht ausgetrocknet sein.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung des cBMP-10 Virus

Zur Herstellung eines Virus mit dem Gen cBMP-10 (chicken BMP-10) musste zunächst das Gen amplifiziert werden. Dies geschah mittels PCR. Zu diesem Zweck wurden zwei entsprechend synthetisierte Primer für den Bereich vor der Proregion und für den Bereich nach dem Stoppcodon erworben. Das PCR-Fragment, welches das cBMP-10 Gen enthielt, wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 hineinkloniert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Amplifikation und Transformation wurde das Gen in diesem Vektor sequenziert. Nur bei einem der vier komplett sequenzierten Klone wies die Sequenz keine Störung im offenen Leserasters auf. Diese Sequenz (siehe Anhang 8.2) enthielt jedoch einen Nukleotidaustausch an der Position 574. Hier wurde anstelle eines Adenosins ein Guanosin amplifiziert, so dass die Translation der Aminosäure Valin anstelle von Isoleucin erfolgte. Dies ist jedoch für den räumlichen Aufbau und die Funktionsweise des Proteins nicht entscheidend, weil beide Aminosäuren apolare Seitenketten enthalten und sich in Aufbau und Größe ähneln.

Zur Klonierung des Gens in das Hühnervirus RCAS war es notwendig, dieses zuvor in einen weiteren Klonierungsvektor zu übertragen, um die Schnittstellen am Ende der DNS für den Einbau in das RCAS-Virus zu optimieren. Die Viren wurden in embryonalen Hühnerfibroblasten (CEF-Zellen) vermehrt, wobei diese die neu gebildeten Viren ins Nährmedium abgaben. Zur Weiterverarbeitung der Viren wurde das Medium entnommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Viren im Restmedium resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.2 Kontrolle der Virusaktivität

Um festzustellen, ob das verarbeitete Medium tatsächlich infektiöse Partikel enthielt, wurden Kontrollen an CEF-Zellen durchgeführt. Dies diente außerdem der Bestimmung der Konzentration der infektiösen Partikel in der hergestellten Viruspräparation.

Dazu wurden die CEF-Zellen auf Objektträgern mit einer Konzentration von etwa 3×10^5 Zellen pro Objektträger ausgesät. Nach einem Tag wurden sie mit einem Medium, welches das Virus in unterschiedlichen Verdünnungen enthielt, für 70 Stunden inkubiert. Es erfolgte ein Befall der Zellen durch infektiöse Viren. Zur Darstellung dieser Infektion wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Der primäre Antikörper 2C3, ein IgG, richtete sich gegen das Hüllprotein des RCAS-Virus. Der sekundäre Antikörper, AlexaFluor 594 (Goat Anti Mouse IgG), diente der

Markierung des primären IgG-Antikörpers. Der gebundene Zweitantikörper konnte nach Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 590$ nm durch ein Fluoreszenzsignal im roten Wellenlängenbereich nachgewiesen werden. Zur Kontrolle dienten Zellen ohne Virusinfektion. Dabei konnte dieses rote Signal nicht gesehen werden.

Zur Darstellung der Zellen wurde deren DNS mit DAPI-Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Unter dem Immunfluoreszenzmikroskop konnten nun die Zellkerne durch Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 365$ nm) und entsprechendem Filter in blauer Farbe dargestellt werden. Durch die Belichtung beim Fotografieren erschienen die Zellkerne jedoch teilweise weiß.

Die Zellen auf den Objektträgern wurden mit beiden beschriebenen Verfahren angefärbt. Von jeweils einem Ort auf den verschiedenen Objektträgern wurden unter den beiden genannten Bedingungen Fotoaufnahmen gemacht, welche im Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop) übereinander gelegt wurden (siehe Abb. 7 und 8). Aus diesen Darstellungen konnte die Anzahl der infizierten Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl bestimmt werden. Bei der Auswertung zeigte sich, dass bei einer Virusverdünnung von 1×10^{-8} durchschnittlich jede vierte bis zehnte Zelle infiziert war. Bei den verschiedenen Virusernten ergaben sich Konzentrationen zwischen 4×10^{12} und 3×10^{14} infektiösen Partikeln pro Mikroliter. Das entspricht 4×10^{15} und 3×10^{17} IU/mL (infectious units per milliliter). Die Unterschiede entstanden durch den Ansatz zweier verschiedener Zellkulturen zur Virusherstellung und deren unterschiedlicher Konfluenz an den verschiedenen Erntetagen.

Beispiele für Zellen mit und ohne Virusinfektion:

Beide Proben wurden mit DAPI- und Antikörper-Immunfluoreszenzfarbstoff behandelt. Die jeweilige Färbung wurde unter den im Text genannten Bedingungen einzeln fotografiert und die Fotos im Anschluss mit einem Bildbearbeitungsprogramm übereinander gelegt.

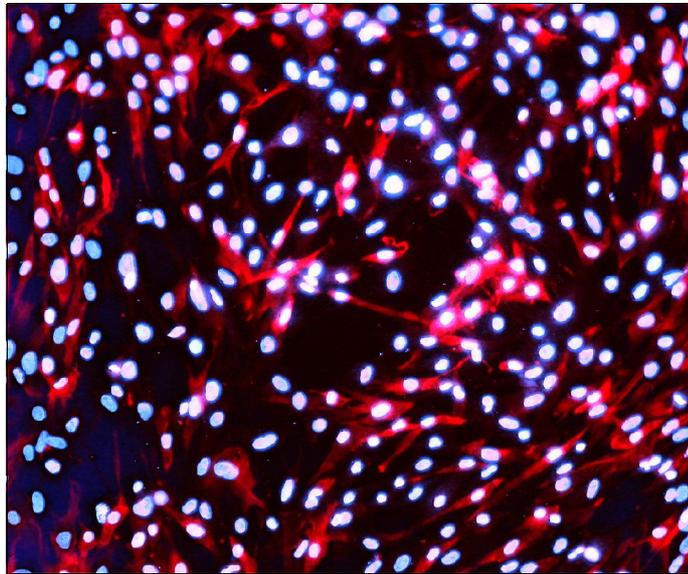


Abbildung 7: Infizierte Zellen.

Die Zellkörper der infizierten Zellen fluoreszierten rot durch die Markierung der Hüllproteine des RCAS-Virus. Nicht jede Zelle ist von der Infektion betroffen. Nicht-infizierte Zellkörper können nicht dargestellt werden. Die Zellkerne aller vorhandenen Zellen fluoreszieren hellblau bzw. weiß.

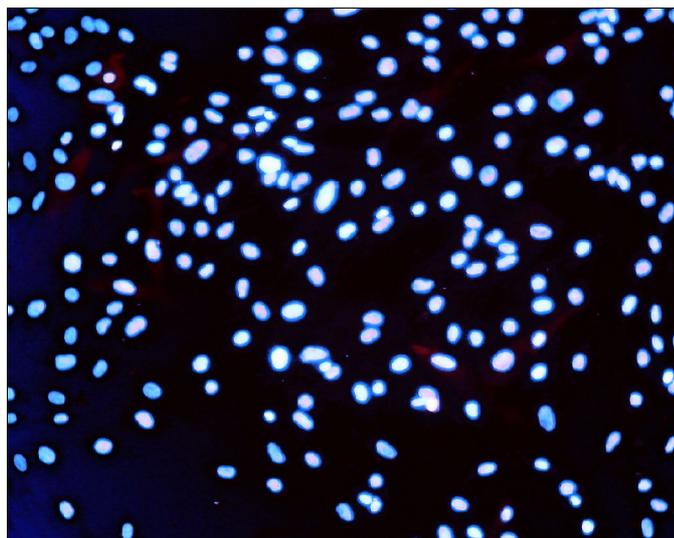


Abbildung 8: Nicht-infizierte Zellen.

Die Zellkerne, hellblau bzw. weiß dargestellt, zeigen jeweils eine Zelle an. Die Zellkörper konnten nicht dargestellt werden, da sie keine Viren enthalten. Rotfärbungen sind in dieser Darstellung nur Hintergrund ohne Zellzugehörigkeit.

4.3 Infizieren der Hühnchenembryonen

Um die Auswirkungen der Überexpression von cBMP-10 im Herzen zu untersuchen, wurden befruchtete Hühnereier 2 bis 2,5 Tage lang bei 38°C bebrütet und anschließend mit Viruslösung infiziert. Ihr Entwicklungsstadium entsprach zum Zeitpunkt der Infektion dem HH-Stadium 12 bis 14. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da sich nun der Embryo in seiner Entwicklung zur Seite dreht und der Herzschlauch gut zur Manipulation zu erreichen ist. Außerdem beginnt die Expression von cBMP-10 RNS. Zur Manipulation wurden die Eier eröffnet und die hergestellten Hühnchenviren wurden unter denen in Kapitel 3.3 beschriebenen Bedingungen dem Embryo ins Herz injiziert. Nach der Injektion wurden die Eier mit Klebeband verschlossen und für weitere 2 bis 3 Tage bei 38°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die lebenden Embryonen entnommen und fixiert. Verstorbene Embryonen wurden nicht weiter untersucht, da bei den meisten keine Weiterentwicklung und damit auch keine Genüberexpression stattgefunden hat. Die überlebenden Embryonen befanden sich im HH-Stadium 24 bis 26. Zum Vergleich und zur Bestimmung der endogenen BMP-10 Expression wurden Embryonen ohne Manipulation für 5 Tage bei 38°C inkubiert.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Anzahl der bearbeiteten Eier wieder. Nicht alle bebrüteten Eiern wurden auch weiter verarbeitet, da die Eier zum Teil instabil oder nicht befruchtet waren oder die Embryonen nicht weiterwuchsen.

Tabelle 3: Übersicht über die Gesamtzahl der bearbeiteten Eier und Embryonen.

| | |
|--|-----|
| Gesamtzahl der bebrüteten Eier | 297 |
| Gesamtzahl der bearbeiteten Eier | 219 |
| Gesamtzahl der infizierten Embryonen | 120 |
| davon überlebende Embryonen | 46 |
| davon verstorbene Embryonen | 74 |
| Gesamtzahl der nicht-infizierten Embryonen | 99 |
| davon überlebende Embryonen | 47 |
| davon verstorbene Embryonen | 52 |

Eine in-situ-Hybridisierung aller Embryonen diente der Kontrolle, ob cBMP-10 RNS vorhanden war. Zur Markierung wurde eine Gensonde hergestellt, die spezifisch an der RNS des cBMP-10 bindet. Insgesamt wurden 61 infizierte, sowohl überlebende wie auch einzelne der verstorbenen, und 41 nicht-infizierte Embryonen mittels in-situ-Hybridisierung gefärbt. Ausgewertet wurden nur Embryonen mit eindeutiger Färbung BMP-10-reicher Regionen bei vollständiger Entfärbung der Umgebung und einwandfreier Schnittfläche bei der mikroskopischen Auswertung, sodass 11 infizierte und 8 nicht-infizierte Embryonen in die Auswertung einbezogen wurden.

Die Embryonen hatten zum Zeitpunkt der Auswertung ein Alter von 4,5 bis 5 Tagen (HH 24 bis HH 26) erreicht. In Abbildung 11 und 12 ist erkennbar, dass sich die Herzanlagen der verschiedenen Embryonen im äußeren anatomischen Aufbau nur wenig unterscheiden. Im Bereich der Herzanlage konnte bei allen Embryonen eine verstärkte Färbung festgestellt werden, was auf eine BMP-10 Expression in diesem Bereich hinweist.

In den nicht-manipulierten Embryonen war neben einer heller gefärbten Ventrikelanlage ein stärker angefärbter primitiver Vorhof sowie eine minimal markierte Leberanlage erkennbar. Die Färbungen sind in den Abbildungen 9 und 10 nachvollziehbar.

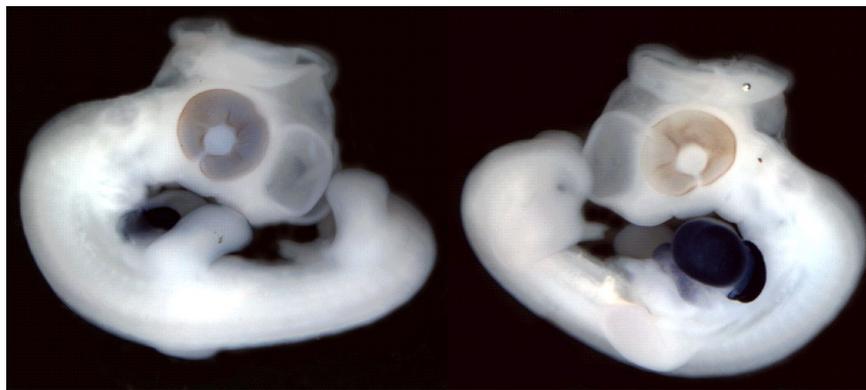


Abbildung 9: Embryo im HH-Stadium 25 ohne Virusinfektion.

Der Embryo ist von rechts und von links dargestellt. Man sieht die Herzanlage stark blau angefärbt. Darunter ist die leicht hellblau gefärbte Leberanlage zu sehen.



Abbildung 10: Herzanlage eines nicht-infizierten Embryos.

Man sieht eine hervorstehende Ventrikelanlage V und einen stärker angefärbten zukünftig linken Vorhof, zurzeit das primitive Atrium A. Darunter erkennt man ein schwach angefärbtes Bauchorgan, die Leberanlage L.

Bei den infizierten Embryonen haben sich zusätzlich weitere Bereiche angefärbt (siehe Abb. 11 und 12). Im Bereich der Herzanlage war der prominenteste Unterschied zur Kontrollgruppe die Intensität der Färbung. Dies ließ jedoch keine genaue Angabe zur Konzentration der BMP-10 RNS zu. Bei den Embryonen, bei denen das Virus erfolgreich die Herzanlage infiziert hatte, war eine stärkere Färbung der Herzscheife sichtbar, weil durch den zusätzlichen Einbau des BMP-10 Gens mehr RNS gebildet und farblich markiert werden konnte. In allen Fällen glich die Herzanlage anatomisch den Embryonen der Kontrollgruppe.

Drei infizierte Embryonen waren besonders stark angefärbt. Sie zeigten eine unregelmäßige, starke Färbung im Bereich des Bauches, der Extremitäten und des Kopfes. Nacken und Rücken wiesen hier punktförmige Muster auf. Die Herzanlagen waren vollständig BMP-10 positiv mit zusätzlicher dunkelblauer Tüpfelung (siehe Abb. 11). Die restlichen acht infizierten Embryonen zeigten im Bereich des Herzschlauchs (in 8 von 8 Fällen) und des Bauches (in 7 von 8 Fällen) eine homogene BMP-10 Expression. Die Flügelanlagen wiesen in 5 der 8 Fälle fleckige Expressionsmuster auf. Seltener waren Kopf (bei 4 von 8 Fällen) und Fußanlagen (bei 3 von 8 Fällen) und bei keinem dieser acht Embryonen Rücken oder Nacken von der Färbung betroffen. Ein Beispiel wird in Abbildung 12 dargestellt. Gemeinsam war allen infizierten Embryonen also die BMP-10 Expression am Herzen und am Bauch (Leberanlage). Weitere Übereinstimmungen der Expressionsmuster waren nicht zu finden.

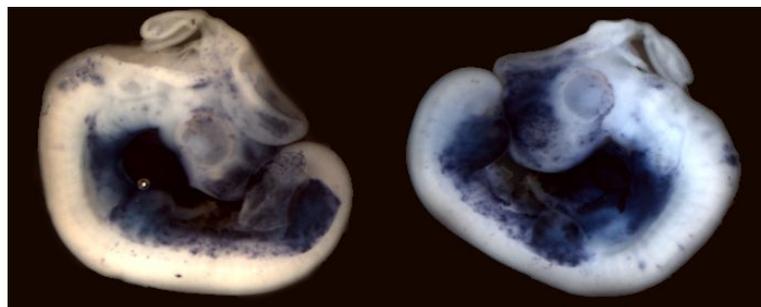


Abbildung 11: Embryo im HH-Stadium 24 mit Virusinfektion.

Der Embryo ist von rechts und von links dargestellt. Man sieht eine Färbung der gesamten anterioren Körperregion und eine Tüpfelung am Rücken.

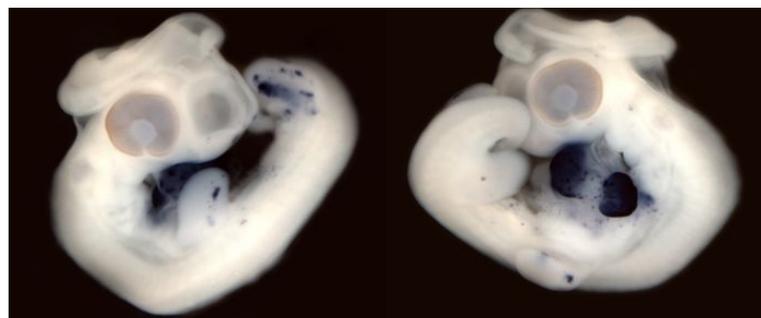


Abbildung 12: Embryo im HH-Stadium 25 mit Virusinfektion.

Der Embryo ist von rechts und von links dargestellt. Man erkennt eine prominent gefärbte Herzanlage und zusätzlich punktuelle Färbungen der Fuß- und Flügelanlagen.

4.4 Auswertung mittels Mikroskop

Um mikroskopisch bewerten zu können, in welchen Körperregionen der Embryonen cBMP-10 RNS vorkommt, wurden diese in Polyfreeze tissue medium bzw. Paraffin eingebettet. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Bearbeitung der Embryonen wieder.

Tabelle 4: Übersicht über die Medien und die darin eingebetteten Embryonen.

| | Infizierte Embryonen | Nicht-infizierte Embryonen |
|--|----------------------|----------------------------|
| Einbettung in Polyfreeze Tissue Medium | 22 | 7 |
| Einbettung in Paraffin | 9 | 5 |

Die in-situ-hybridisierten Zellen zeigten eine deutliche blaue Färbung. Um die anderen nicht markierten Zellen kenntlich zu machen, wurden die Proben zusätzlich mit Eosin gefärbt. Die Herzanlagen wurden jeweils unter dem Mikroskop untersucht und fotografiert. Die Auswertung der Objektträger erfolgte mikroskopisch bei 10- bzw. 20-facher Vergrößerung. Die Paraffin-Präparation stellte sich kontrastreicher da, weshalb nur Embryonen, welche in diesem Medium eingebettet waren, verglichen wurden.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse zum Vorkommens von cBMP-10 RNS erläutert. Die nicht-infizierten Embryonen dienen hierbei als Referenz, da sie das endogene Vorkommen der cBMP-10 RNS aufzeigen. Um die Auswertung übersichtlicher zu gestalten, wurden folgende Herzregionen untersucht und miteinander verglichen:

- der Übergang vom Sinus venosus in das Atrium,
- das primitive Atrium,
- der Übergang vom Atrium in den Ventrikel,
- der primitive Ventrikel,
- der Übergang vom Ventrikel in den Truncus arteriosus und
- der Truncus arteriosus.

Eine Übersicht über die Anzahl der Embryonen, bei denen die entsprechenden Regionen auswertbar waren, ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht über die Anzahl der auswertbaren Embryonen pro Herzregion.

| Region | Anzahl der infizierten Embryonen | Anzahl der nicht-infizierten Embryonen |
|---|----------------------------------|--|
| Übergang Sinus venosus - Atrium | 4 | 4 |
| Atrium | 7 | 5 |
| Übergang Atrium - Ventrikel | 7 | 4 |
| Ventrikel | 7 | 4 |
| Übergang Ventrikel - Truncus arteriosus | 7 | 4 |
| Truncus arteriosus | 6 | 4 |

4.4.1 Endogenes Vorkommen von BMP-10 RNS in der Herzanlage

Grundsätzlich zeigten alle untersuchten nicht-infizierten Embryonen in allen Bereichen der Herzanlage das gleiche endogene Verteilungsmuster von cBMP-10.

Im Bereich des Sinus venosus war kein BMP-10 exprimiert und die Weite des Sinus erschien bei allen Embryonen ähnlich. Im Übergang zum Atrium stieg das RNS Vorkommen kontinuierlich an. Die Wanddicke des Übergangsbereichs betrug 1 bis 3 Erythrozytendurchmesser. Dies entspricht 7 bis 21 μm . Ein Beispiel des Übergangsbereichs vom Sinus venosus in das primitive Atrium ist in Abbildung 13 dargestellt.

Im primitiven Atrium konnte bei den älteren Embryonen (im HH-Stadium 26) eine beginnende Teilung festgestellt werden. Es waren dort zwei noch nicht vollständig voneinander abgegrenzte Kavernen und ein Endokardpolster, das aus dem Ventrikel in Richtung Vorhof hervorwuchs, zu erkennen. Im zukünftigen linken Vorhof schien BMP-10 stärker exprimiert zu sein als im rechten Vorhof. Das einwachsende Endokardpolster, welches das zukünftige Vorhofseptum bildet, zeigte keine BMP-10 Expression. Die Atriumwand war gleichmäßig dick, im Bereich der äußeren Krümmung zwischen 7 und 14 μm breit, homogen strukturiert und nach innen und außen glatt begrenzt. Sie wies im gesamten Bereich eine BMP-10 Expression auf. Dabei schien BMP-10 an der Außenseite der Wand stärker exprimiert zu sein als auf der Innenseite (siehe Abb. 14).

Im Übergang vom Atrium zum Ventrikel nahm die Stärke der BMP-10 Expression allmählich ab um dann zum wieder anzusteigen. In der Mitte dieses Übergangsbereichs befand sich ein kleiner Bereich ohne BMP-10 Expression. In diesem Bereich veränderte sich der Wandaufbau von der kompakten Wandstruktur des Vorhofs zu einem in Schichten aufgebauten Ventrikel. Besonders die mittlere Wandschicht wurde zum Ventrikel hin dicker. Die Endokardpolster, die bei einigen Embryonen in diesem Bereich zu sehen waren, zeigten keine BMP-10 Expression.

Sie bestanden aus wenigen, locker angeordneten Zellen mit großen Abständen zueinander und wenigen Zell-Zellkontakten. Die Struktur der Endokardpolster wirkte dadurch spongiös. Nur die Begrenzung zum Lumen hin zeichnete sich durch eine dichte Zellschicht, das Endothel, aus. Der Übergangsbereich ist in Abbildung 16 dargestellt.

Das Myokard des primitiven Ventrikels war von außen durch Epikard begrenzt und auf der Innenseite von einer dünnen Endothelschicht überzogen, die im Lumen auch die dort vorkommenden Endokardpolster begrenzte. Der primitive Ventrikel war anatomisch nach außen glatt begrenzt und wies im Apexbereich Trabekelstrukturen auf, die im Anschnitt fingerförmig oder zottenartig wirkten. Die Dreischichtigkeit der Ventrikelwand im Eingangsbereich des Ventrikels war im Trabekelbereich nicht mehr zu erkennen. Der Durchmesser des Ventrikellumens betrug weniger als 40% des Gesamtdurchmessers des Ventrikels. Im Inneren ließen sich Endokardpolster (siehe oben) abgrenzen, welche auch hier spongiös strukturiert und frei von BMP-10 RNS waren. Das Trabekelwerk erschien locker aufgebaut und enthielt schmale Trabekel (ca. 7 μm breit) mit großen Abständen (14-35 μm) zueinander. Bei allen Embryonen war BMP-10 im Bereich der Ventrikelwand exprimiert. Besonders das Epikard, die äußeren Anteile des Myokards der Ventrikelwand und die angrenzenden Trabekel wiesen ein hohes Expressionslevel auf. Im Ventrikelinneren zeigten die Trabekelstrukturen ein weniger intensives Vorkommen von BMP-10 RNS. Die Endothel-Schicht exprimierte kein BMP-10 (siehe Abb. 17). Bei den älteren Embryonen (ab HH-Stadium 26) war der rechte Ventrikel erkennbar, der sich in dieser Entwicklungsphase langsam herausbildete. Das Endokardpolster, welches in das Lumen zwischen Ventrikel und Truncus arteriosus hineinwuchs, und eine Ausbuchtung vor dem Truncus arteriosus bildeten die Begrenzung des zukünftigen rechten Ventrikels.

Im Übergangsbereich zwischen dem BMP-10 exprimierenden Ventrikel und dem BMP-10-freien Truncus arteriosus war die Konzentrationsveränderung auf der einen Seite fließend. Auf der anderen Seite lag die Truncusaußenwand direkt an der Ventrikelwand an. Dort endete die BMP-10 Expression im Übergangsbereich abrupt. Außerdem war im Übergangsbereich eine Dickenänderung der Wandschichten zu erkennen. Die Wandschicht unter dem Epithel war im Ausgangsbereich des Ventrikels schmal. Ihre Dicke nahm jedoch zum Truncus arteriosus hin schnell zu und engte so das Truncuslumen ein. Die Stärke der äußeren Wandschicht nahm in diesem Gebiet dagegen ab (siehe Abb. 19).

Der Truncus arteriosus zeigte keine BMP-10 Aktivität. Er besaß eine dicke Wand und ein enges Lumen (30% des Gesamtdurchmessers). Die Wand bestand aus einem äußeren, zelldichten Anteil, durchschnittlich 14 μm breit, und einem mittleren Bereich, der in Zelldichte und Zellverteilung den Endokardpolstern ähnelte. Zum Lumen hin wurde diese Mittelschicht, die

aus Mesenchymzellen bestand, durch eine dichte Epithel-Zellschicht abgegrenzt. Die Endokardpolster im Bereich des Ausflusstraktes verwachsen im Verlauf der Entwicklung miteinander und trennen so den Trakt in zwei Teile. Der Truncus arteriosus ist in Abbildung 20 dargestellt.

4.4.2 Kardiale Veränderungen durch BMP-10 Überexpression

Die infizierten Embryonen zeigten im Vergleich zu den nicht-infizierten Embryonen Unterschiede in der Stärke der Anfärbung und anatomische Veränderungen in der Herzanlage. Eine verstärkte Färbung wies auf ein erhöhtes Vorkommen von mRNA für das Protein BMP-10 hin. Bei anatomischen Veränderungen konnte man davon ausgehen, dass auch Rezeptoren für das Protein vorhanden waren und die Aktivierung der Signalkaskade für einen Strukturwandel sorgte.

Im Folgenden werden die beobachteten Veränderungen in den einzelnen anatomischen Bereichen näher betrachtet. Der Übergang vom Sinus venosus in das primitive Atrium zeigte bei den infizierten und den nicht-infizierten Embryonen die gleiche Charakteristik. Auch im Bereich des Vorhofs, des Vorhofseptums und der einwachsenden Endokardpolster stimmte die Verteilung und Intensität der BMP-10 Expression mit der der nicht-infizierten Embryonen überein. Im Wandaufbau wurden ebenfalls keine Unterschiede gefunden (siehe Abb. 13).

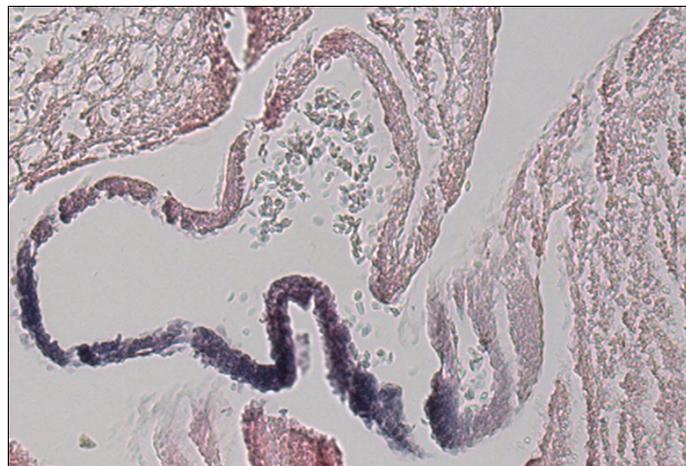


Abbildung 13: Übergangsbereich Sinus venosus - Atrium.

Der Sinus venosus führt von rechts oben in das Atrium, welches sich im Teilungsprozess in ein rechtes und linkes Atrium befindet. In der Darstellung sind die aufeinanderzuwachsenden Atriumwände zu erkennen. Der linke Vorhof entsteht in einem Bereich, der im Bild unten rechts dargestellt ist. Der rechte Vorhof entwickelt sich in der mittig nach oben weisenden Ausbuchtung. Die Teilung erfolgt durch das Einwachsen des Endokardpolsters. Im Sinus und im Übergangsbereich ist im Gegensatz zum Vorhof keine BMP-10 Expression zu erkennen. Der Übergangsbereich zeigt bei infizierten und nicht-infizierten Embryonen die gleiche Charakteristik. Hier ist ein Embryo der Kontrollgruppe dargestellt.

Differenzen ergaben sich jedoch in der Wanddicke des primitiven Atriums. Hierbei war die Atriumwand der infizierten Embryonen, vor allem im Bereich der äußeren Krümmung, dicker als bei nicht-infizierten Embryonen (14 μm bis 28 μm im Gegensatz zu 7 μm bis 14 μm). Entsprechende Beispieldarstellungen finden sich in den Abbildungen 14 und 15.

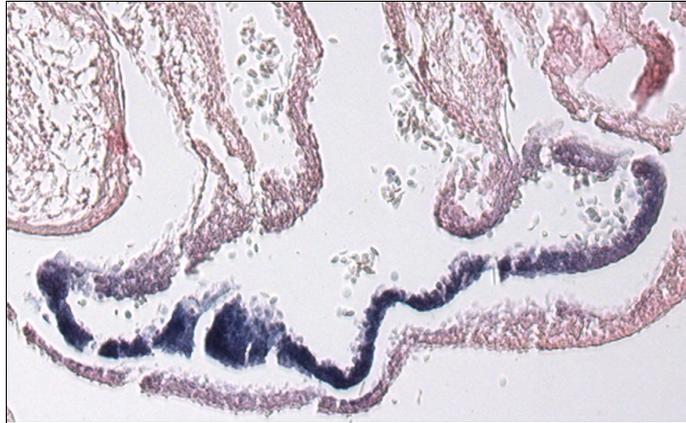


Abbildung 14: Atrium eines nicht-infizierten Embryos.

Die Vorhofwand hat eine maximale Dicke von 1 bis 2 Erythrozytendurchmessern. Sie ist homogen, glatt begrenzt und weist eine gleichmäßige BMP-10 Expression auf.



Abbildung 15: Atrium eines infizierten Embryos.

Hier beträgt die Vorhofwandstärke mehr als 2 Erythrozytendurchmesser. Durch den tangentialen Anschnitt erscheint die untere Wand in dieser Darstellung noch dicker. Die Wandstruktur gleicht anatomisch derjenigen der nicht-infizierten Embryonen. Sie ist homogen, glatt begrenzt und zeigt eine gleichmäßige BMP-10 Expression.

Die BMP-10 Expression im Übergangsbereich vom Atrium zum Ventrikel ähnelte sich bei den infizierten Embryonen und der Kontrollgruppe (Abb. 16). Die Ausnahme bildeten die besonders stark angefärbten infizierten Embryonen (2 von insgesamt 7 Stück). Dort wies auch die äußerste Zellschicht des Übergangsbereichs eine BMP-10 Expression auf.

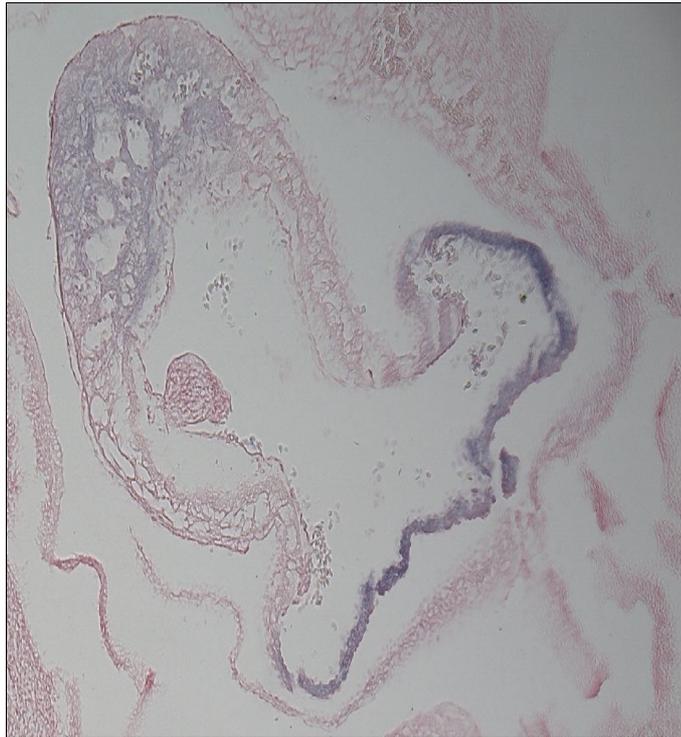


Abbildung 16: Übergangsbereich Ventrikel - Atrium.

Der Ventrikel weist in dieser Darstellung nach oben und von unten in die rechte Bildmitte strebend ist der Vorhof zu erkennen. Beide weisen eine BMP-10 Expression auf. Der Übergangsbereich, die Engstelle zwischen Ventrikel und Atrium, ist frei von BMP-10 RNS. Der Beginn eines Endokardpolsters ist im Ventrikel sichtbar (in der Mitte der linken Bildseite). Dieses zeigt ebenfalls keine BMP-10 Expression. Der Übergangsbereich ist bei infizierten und nicht-infizierten Embryonen gleich. Hier ist ein Embryo der Kontrollgruppe dargestellt.

Im Ventrikel waren Unterschiede zwischen den infizierten und nicht-infizierten Embryonen erkennbar. Die infizierten Embryonen wiesen eine höhere BMP-10 Expression im Bereich der äußeren Ventrikelwand auf, während die lumennahen Trabekelstrukturen kaum Expressionsmuster zeigten. Zwei der sieben auswertbaren infizierten Embryonen fielen durch eine sehr hohe BMP-10 Expression in den Wandschichten und Trabekeln auf. Die Trabekel der gesamten infizierten Gruppe waren dicker ($14\ \mu\text{m}$ statt $7\ \mu\text{m}$) und die Abstände zwischen ihnen geringer ($14\ \mu\text{m}$ statt $14\text{-}35\ \mu\text{m}$). Die Ventrikelwand und die inneren Zellstrukturen erschienen dadurch kompakter. Die Anzahl der Trabekel war im Vergleich zu den nicht-infizierten Embryonen unverändert. So entstand vor allem im Bereich der Trabekel der Eindruck, die Ventrikelwand der infizierten Embryonen wäre dünner. Der Unterschied wird in den Abbildungen 17 und 18 deutlich.

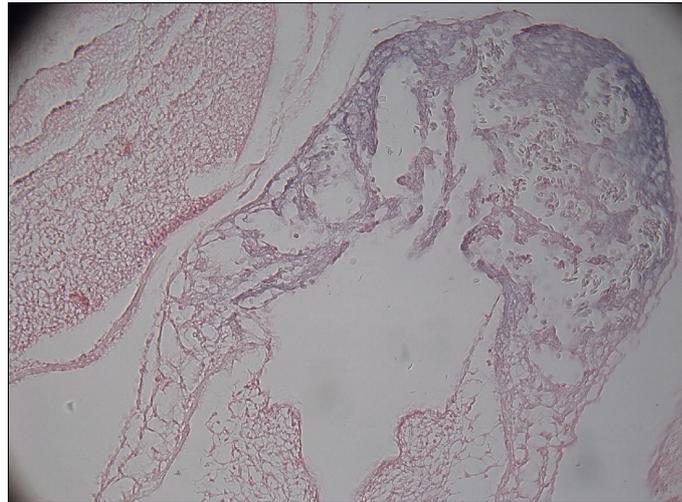


Abbildung 17: Ventrikel eines nicht-infizierten Embryos.

Die Intensität der BMP-10 Expression der Ventrikelwand nimmt von außen nach innen ab. Am unteren Bildrand sind Anteile der Endokardpolster sichtbar. Diese zeigen keine BMP-10 Expression. Die angeschnittenen Trabekel wirken schlank und sind locker verteilt. Die Ventrikelwand scheint relativ dick zu sein.



Abbildung 18: Ventrikel eines infizierten Embryos.

Hier ist deutlich die BMP-10 Expression in der Ventrikelaußenwand und in den Trabekeln erkennbar. Im Inneren des Ventrikels zeigt sich unten links ein Endokardpolster, das langsam in Richtung der Gegenseite wächst.

Die Trabekel wirken plumper als bei den nicht-infizierten Embryonen und stehen dicht beieinander. Der kompaktere Wandaufbau im Bereich des Trabekelwerks lässt die Ventrikelwand schmäler als bei den nicht-infizierten Embryonen erscheinen.

Der Übergangsbereich vom Ventrikel in den Truncus arteriosus der infizierten Embryonen glich dem der nicht-infizierten Embryonen (Abb. 19). Es gab nur einen Ausnahmefall, bei dem ein infizierter Embryo eine BMP-10 Expression im Bereich der Außenwand im Übergangsbereich und am Truncus aufwies.

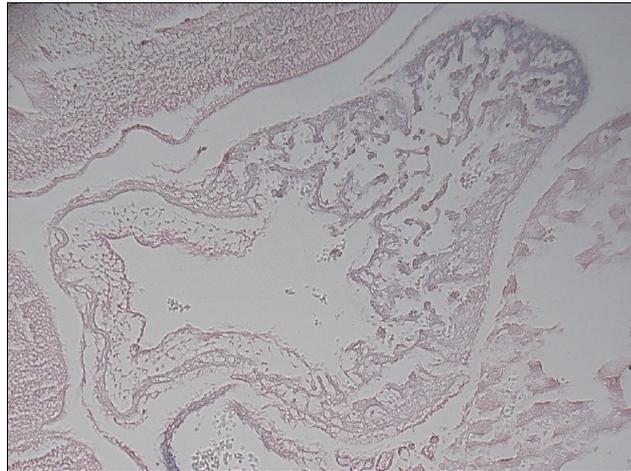


Abbildung 19: Übergangsbereich Ventrikel - Truncus arteriosus.

Oben rechts im Bild ist der angefärbte Ventrikel zu erkennen, der in den Truncus arteriosus übergeht. Der Truncus (Bildmitte links) weist eine zelldichte Außenwand auf. Auf der Innenseite befinden sich locker angeordnete Zellen, die zum Lumen hin durch eine durchgängige Endothelschicht begrenzt werden. Im Übergangsbereich zwischen Ventrikel und Truncus lässt die BMP-10 Expression kontinuierlich nach. Dieser Bereich ist bei infizierten und nicht-infizierten Embryonen gleich. Hier ist ein Embryo der Kontrollgruppe dargestellt.

Es bestand ein Unterschied im anatomischen Wandaufbau des Truncus arteriosus. Die mittlere Wandschicht des Truncus wies bei den infizierten Embryonen eine geringere Zelldichte auf als in der Kontrollgruppe. Auch die Dicke dieser Schicht war hier geringer, sodass das innere Lumen größer wirkte (siehe Abb. 20 und 21). Eine BMP-10 Expression war weder bei den infizierten noch bei den nicht-infizierten Embryonen vorhanden.



Abbildung 20: Truncus arteriosus eines nicht-infizierten Embryos.

Der Truncus zeigt keine BMP-10 Expression. Die Zelldichte der mittleren Wandschicht ist sehr hoch. Es sind im Vergleich zu den infizierten Embryonen eine deutlich breitere mittlere Wandschicht und ein schmaleres Lumen des Truncus arteriosus zu erkennen.

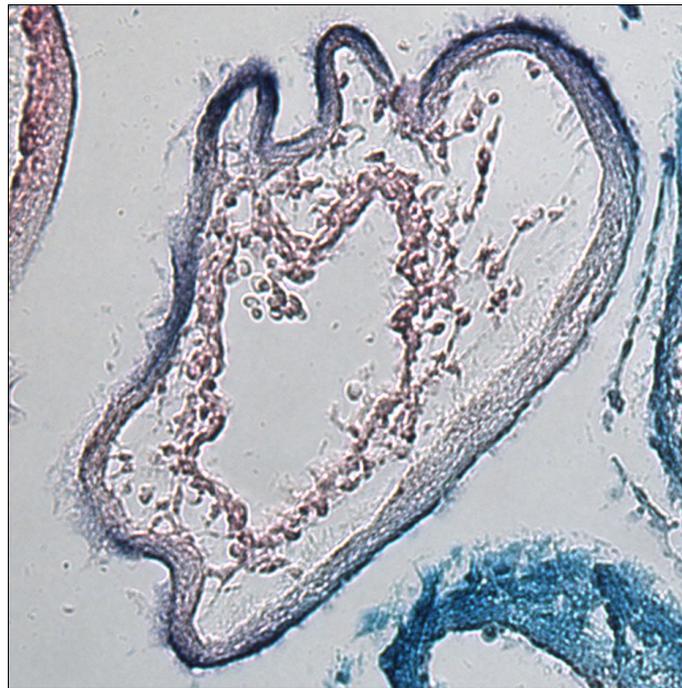


Abbildung 21: Truncus arteriosus eines infizierten Embryos.

In diesem Ausnahmefall ist im Gegensatz zu allen anderen infizierten Embryonen in der äußeren Wandschicht am Truncus arteriosus BMP-10 RNS nachweisbar. Generell sind in der Mittelschicht des Truncus der infizierten Embryonen weniger Zellen zu finden als bei den nicht-infizierten Embryonen. Es erscheint bei ihnen das Lumen des Truncus im Vergleich zum Gesamtdurchmesser deutlich größer.

4.4.3 BMP-10 Expression in extrakardialen Organen

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der BMP-10 Expression in extrakardialen Organen und den Extremitäten der infizierten Embryonen. Die Infektion der Zellen wurde durch Viren verursacht, die nach der Injektion des Virus in den Herzschlauch aus diesem wieder herausgetreten bzw. über den Blutstrom verteilt worden sind.

Bei allen Embryonen wies die Leberanlage Expressionsmuster auf. In den nicht-infizierten Embryonen war die BMP-10 Expression auf den Randbereich der Leber begrenzt. Die Leberanlage der infizierten Embryonen wies jedoch eine durchgängige BMP-10 Expression auf, die im Randbereich kräftiger und zentral schwächer war. Die anatomischen Strukturen glichen sich bei infizierten und nicht-infizierten Embryonen. Der Unterschied im Expressionsmuster wird in den Abbildungen 22 und 23 verdeutlicht.

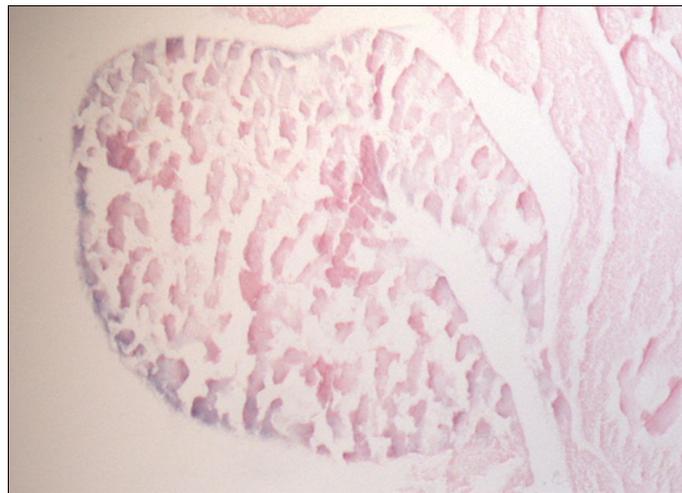


Abbildung 22: Leberanlage eines nicht-infizierten Embryos.

Hier ist deutlich am Randsaum die BMP-10 Expression und zentral die Eosin-Färbung der Leberanlage zu erkennen. Der Gang, der von der Bildmitte nach unten rechts führt, ist die Verbindung zum Vorhof.

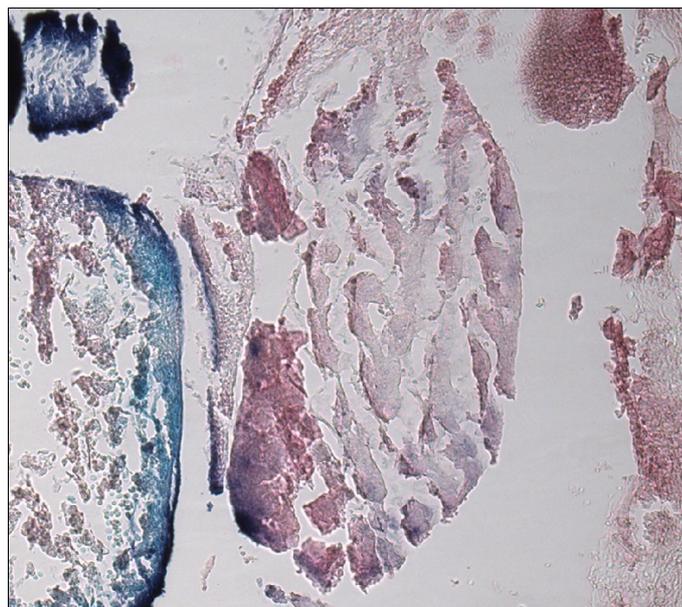


Abbildung 23: Leberanlage eines infizierten Embryos.

Infizierte Embryonen zeigen eine durchgängige BMP-10 Expression in der Leberanlage. In manchen Fällen ist eine besonders starke Expression am Randsaum zu sehen.

Um Artefakten durch Ansammlung von Färbelösung im Vesikel vorzubeugen, wurden vor der in-situ-Hybridisierung die großen Hirnbläschen der Embryonen aufgestochen. Wie bereits erwähnt, war trotzdem bei sieben infizierten Embryonen makroskopisch eine Färbung am Kopf zu erkennen (siehe Abb. 24). Für die mikroskopische Untersuchung wurden zwei der betreffenden Embryonen präpariert. Im Parenchym des Kopfes waren Zellansammlungen mit BMP-10 Expression nachweisbar. Diese Zellen lagen neben den Anlagen für Mesencephalon, Diencephalon

und Telencephalon und wurden während des Wachstums der einzelnen Gehirnanteile zur Seite gedrängt. Morphologisch unterschieden sich die Zellen mit BMP-10 Expression nicht von den Zellen in der Umgebung (siehe Abb. 25). Im Vergleich zu den Kontrollembryonen waren auch keine Veränderungen der Hirnparenchymzellen festzustellen.

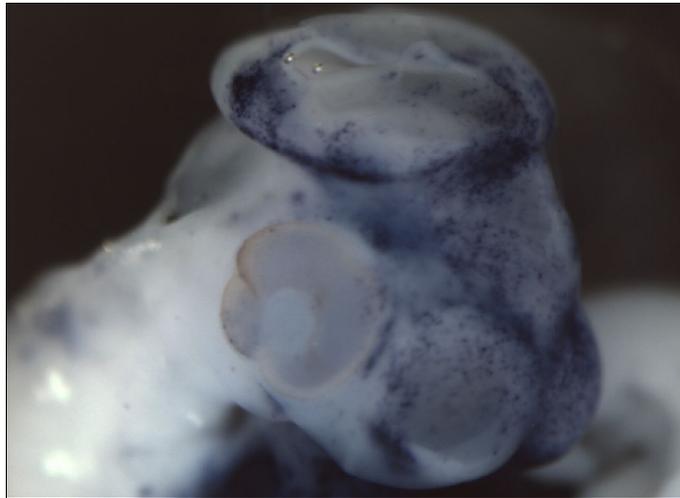


Abbildung 24: Färbung im Bereich des Kopfes beim infizierten Embryo (makroskopisch). Zu sehen sind hier die Anlage des Mesencephalon (oben mittig im Bild) darunter die Anlage des Diencephalon (anatomisch genau über dem Augenbläschen) und als zwei hervortretende Beulen das zukünftige Telencephalon (unten im Bild mittig bis rechts). Um diese Anlagen herum ist eine BMP-10 Expression erkennbar.

Die beiden besonders stark markierten infizierten Embryonen zeigten einmalige zusätzliche Expressionsmuster in besonderen Bereichen. Einer der beiden Embryonen wies eine BMP-10 Expression im Bauchbereich und an der unteren Extremität auf, die mikroskopisch gut sichtbar war. Neben der Leberanlage waren zwei weitere Bereiche markiert, deren anatomische Zugehörigkeit nicht eindeutig ist. Der andere stark gefärbte Embryo zeigte eine Expression in einem Bereich des Rückens, dessen anatomische Zugehörigkeit ebensowenig eindeutig geklärt werden kann. Die Abbildungen 27 und 28 zeigen die Schnittbilder der beiden besonders stark gefärbten Embryonen. In Abbildung 26 ist die makroskopische Aufnahme des Embryos zu sehen, dessen mikroskopische Aufnahme in Abbildung 27 dargestellt ist.

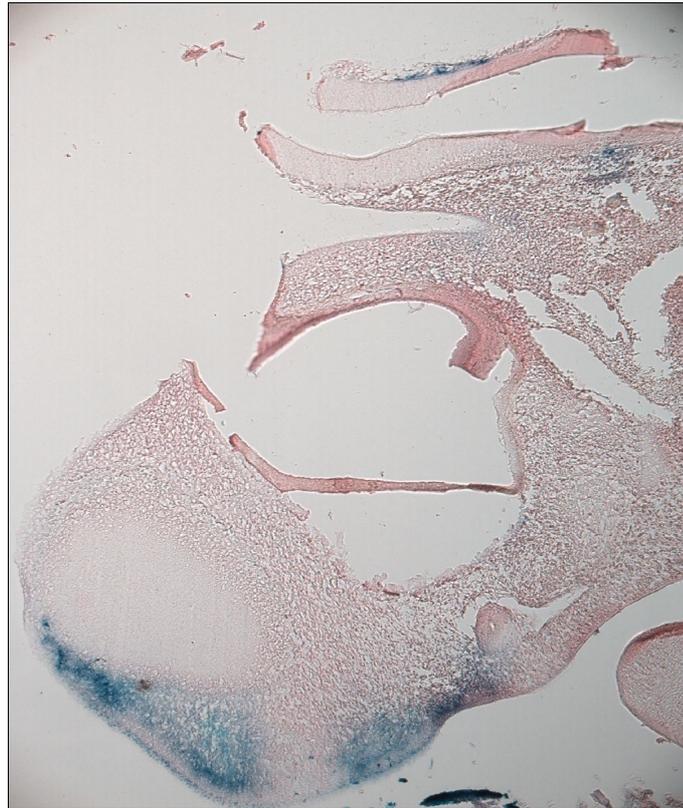


Abbildung 25: Färbung des Hirnparenchyms beim infizierten Embryo.

In der Bildmitte ist das Augenbläschen zu sehen. Darüber befindet sich die unvollständige Anlage für das Diencephalon. Vor dem Augenbläschen zeigt sich eine aufgehellte Struktur, gebildet durch die Zellen des Telencephalon. Die Zellen mit BMP-10 Expression befinden sich im Hirnparenchym und wurden durch die Zellen der Hirnanlagen zusammengedrängt.

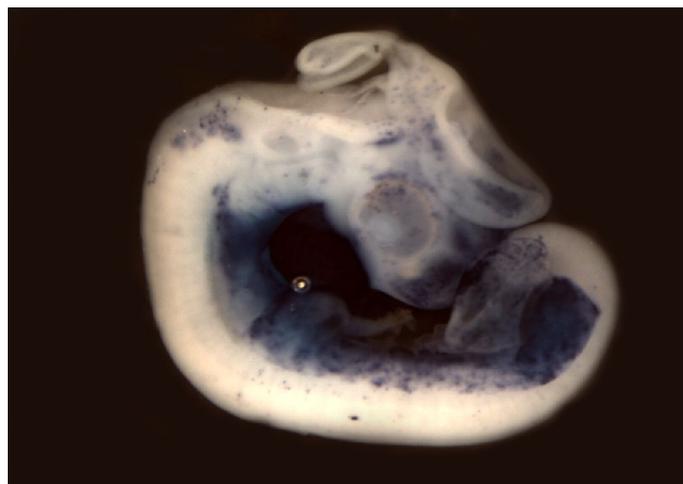


Abbildung 26: Makroskopische Aufnahme eines stark angefärbten, infizierten Embryos.

Dieser Embryo zeigt an der ventralen Körperseite eine kontinuierliche BMP-10 Expression, während der dorsale Anteil nur punktförmige Markierungen enthält.

Eine mikroskopische Aufnahme dieses Embryos wird in Abbildung 27 gezeigt.

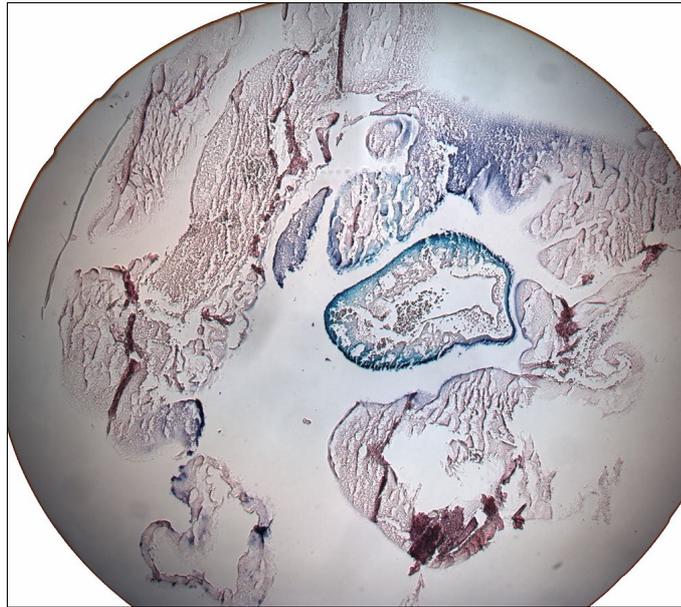


Abbildung 27: Stark angefärbter, infizierter Embryo in mikroskopischer Darstellung.

Dieses Übersichtsbild wurde in 5-facher Vergrößerung aufgenommen. Der gekrümmte Embryo ist deutlich erkennbar. Sein Kopf befindet sich im Bild unten rechts. Im Zentrum des Bildes ist der Ventrikel zu sehen. Oberhalb des Ventrikels lässt sich die Leberanlage abgrenzen. Links neben und rechts oberhalb der Leberanlage befinden sich zwei weitere Bauchorgane, deren anatomische Zugehörigkeit unklar ist.

Am caudalen Ende des Embryos ist eine BMP-10 Expression im Bereich der Fußanlage sichtbar. Der Gang mit dem kleblattförmigen Lumen unterhalb der Fußanlage könnte der Allantois-Gang sein. Seine Wand weist punktuell BMP-10 RNS auf.

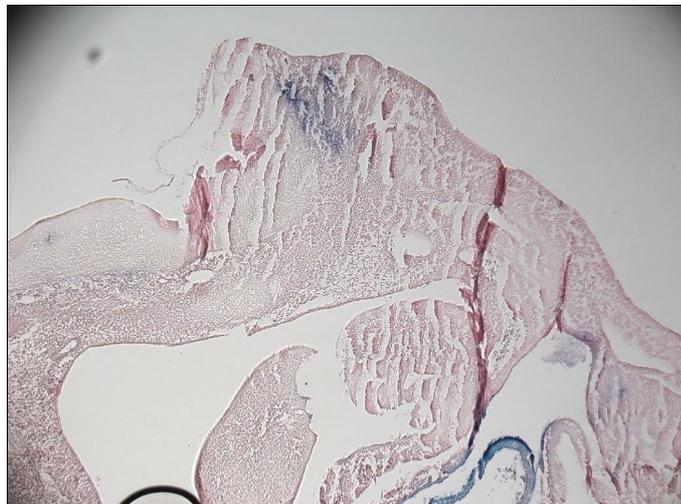


Abbildung 28: Stark angefärbter, infizierter Embryo.

Hier ist in der Mitte des oberen Bildrandes eine BMP-10 reiche Region sichtbar. Diese ist Teil des Rückens des Embryos.

5 Diskussion

Das Protein BMP-10 aus der Gruppe der Bone Morphogenetic Proteins ist wesentlich bei der Herzentwicklung beteiligt. Es reguliert die Trabekelentstehung und hat Einfluss auf die Entwicklung der Herzkammern (Semir Somi et al. 2004). Es bewirkt im Entwicklungsverlauf die Weiterentwicklung der Trabekel und der Ventrikelwand. BMP-10 ist außerdem verantwortlich für die Aufrechterhaltung der physiologischen Konzentrationen von weiteren Schlüsselfaktoren der Herzentwicklung, wie z. B. Nkx 2.5 und MEF2C, wobei Nkx 2.5 einen negativen Feedback Mechanismus zu BMP-10 besitzt (Hanying Chen et al. 2004). Weiterhin reguliert das Protein BMP-10 die Formung des Erregungsleitungssystems während der Kammerreifung (Mohammad Pashmforoush et al. 2004). Aufgaben außerhalb des Herzens wurden für BMP-10 bisher noch nicht beschrieben, obwohl BMP-10 RNS außer im Herzen auch in geringen Konzentrationen in Lunge und Leber von adulten Mäusen gefunden wurde (Herbert Neuhaus et al. 1999).

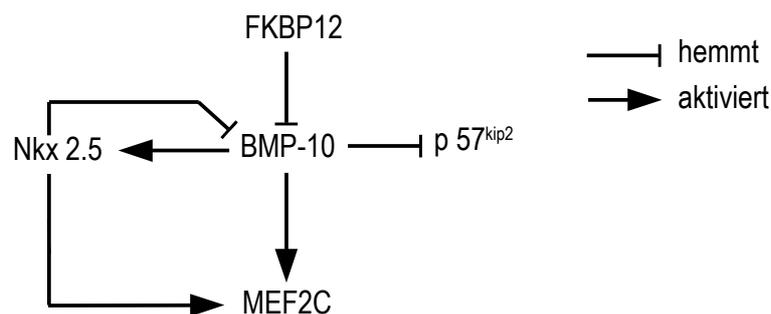


Abbildung 29: Regulation durch BMP-10.

Ein Modell zur Darstellung des Einflusses von BMP-10 auf Transkriptionsfaktoren und Zellregulatoren während der Herzentwicklung. Nkx 2.5 reguliert durch Induktion von MEF2C die Entstehung der Atria, der Ventrikel und der Zellen des Erregungsleitungssystems. p 57^{kip2} ist ein Negativregulator im Zellzyklus der Kardiomyozyten. FKBP12 ist ein Negativregulator in der frühen Phase der Herzentwicklung.

Bild frei übernommen aus Hanying Chen et al. 2004

In der Literatur wurde bisher das endogene Vorkommen der BMP-10 RNS während der Embryonalentwicklung von Mäusen und Hühnchen beschrieben. Bei Mäusen wurden außerdem die Folgen eines BMP-10 Knockout und eines Nkx 2.5 Knockout erörtert, wobei als Resultat des Nkx 2.5 Knockout eine Erhöhung der BMP-10 Konzentration folgte (siehe Abb. 29). Daraus resultierten eine verstärkte Trabekelbildung und der intrauterine Tod des Embryos durch Herzinsuffizienz (Mohammad Pashmforoush et al. 2004).

Ziel meiner Arbeit war es, ein BMP-10 Überexpressionskonstrukt beim Hühnchen zu schaffen und die Folgen einer Überexpression des Gens zu erörtern. Zum Einen sollte der Nachweis von

BMP-10 RNS dazu dienen, die Körperregionen, in denen BMP-10 exprimiert wird, zu markieren und zum Anderen sollten anatomische Veränderungen in diesen Gebieten dargestellt werden. Dazu wurde auch die endogene Konzentration von BMP-10 RNS im Hühnchenembryo untersucht und als Grundlage für Vergleiche mit den genetisch veränderten Embryonen herangezogen. Die BMP-10 Überexpression wurde durch den zusätzlichen Einbau des Gens BMP-10 mit Hilfe eines Retrovirus in das Genom der primitiven Herzzellen erreicht.

5.1 Herstellung des cBMP-10 Virus

Um das Genom des Hühnerembryos zu verändern wurden Retroviren hergestellt, die das Gen cBMP-10 (chicken BMP-10) enthalten. Die Hühnerembryonen wurden mit den Viren infiziert und das Gen wurde in das Hühnchengenom eingebaut. Dafür ist das RCAS-Virus besonders geeignet, da es sich hierbei um ein modifiziertes Vogelvirus (ASLV = avian sarcoma leucosis virus) handelt.

Zunächst erfolgte die Amplifizierung des Gens cBMP-10 mittels PCR-Technik in mehreren Versuchen mit verschiedenen Primern. Ein Großteil der so hergestellten Klone war für die Virusherstellung nicht verwendbar, da das Gen durch die verwendete Polymerase fehlerhaft amplifiziert wurde. Nur bei einem der analysierten Klone war die amplifizierte Sequenz bis auf einen Nukleotidaustausch an der Position 574 fehlerfrei. Infolge dieses Austauschs wurde anstelle eines Isoleucins die Aminosäure Valin translatiert. Da beide Aminosäuren aus der Gruppe der aliphatischen Aminosäuren stammen und die funktionelle Gruppe von Isoleucin nur um eine Methylengruppe länger ist als die von Valin (siehe Abb. 30), sind für den räumlichen Aufbau und die Funktionsweise des Proteins nur unwesentliche Veränderungen durch den Nukleotidaustausch zu erwarten. Die Eigenschaften beider Aminosäuren sind ähnlich. Sie sind gut wasserlöslich und polar. Ein Zeichen dafür, dass der Aminosäureaustausch bei dem Protein keinen Funktionsverlust verursacht hat, ist das Ergebnis des Überexpressionsversuchs. Es wurde vermehrt RNS synthetisiert und anatomische Veränderungen fanden statt.

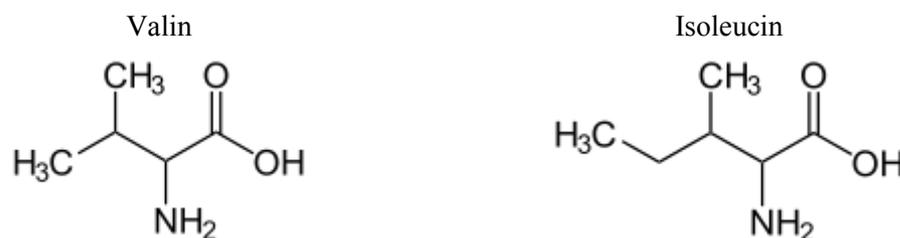


Abbildung 30: Aufbau der Aminosäuren Valin und Isoleucin im Vergleich.

Das amplifizierte Gen wurde in den Klonierungsvektor pCR 2.1 eingebracht. Zur Anpassung der Schnittstellen musste das Gen zunächst in einen weiteren Vektor (SLAX) kloniert werden um es im nächsten Schritt mit passenden Schnittstellen in den RCAS-Vektor zu klonieren. Durch diesen Vorgang verlängerte sich das Fragment, in dem das Gen enthalten war, unwesentlich im Bezug auf die Weiterverarbeitung und die Genfunktion. Die Endlänge des Fragments betrug etwa 1,3 kbp. Der Einbau des Fragments in die Viren und die Virusvermehrung erfolgte ohne Schwierigkeiten. Die Vermehrung fand in embryonalen Hühnerfibroblasten (CEF-Zellen) statt.

5.2 Kontrolle der Virusaktivität

Wie unter 3.2.5 beschrieben wurden auf Objektträgern eine bestimmte Anzahl CEF-Zellen ausgesät und mit der Viruslösung in bekannter Verdünnung beimpft. Zur Bestimmung der Infektiösität der Viren wurden Hüllproteine des RCAS-Virus durch Immunfluoreszenzfarbstoff rot markiert. Dadurch ließen sich diejenigen Zellkörper nachweisen, die vom Virus befallen worden waren. Außerdem wurden alle Zellen durch DAPI-Färbung ihrer Zellkerne dargestellt. Nicht befallene Zellen stellten sich also auf den Fotografien durch einen sichtbaren Zellkern ohne gefärbten Zellkörper dar.

Die aktiven Viren infizierten die CEF-Zellen, für die Berechnung geht man pro Zelle von einem infektiösen Partikel aus. Durch die Bestimmung des Anteils gefärbter Zellkörper an der Gesamtzahl der Zellen ergab sich der Anteil infektiöser Partikel in der aufgebrauchten Lösung. Dieser Anteil war nur bei hoher Verdünnung der Ausgangslösung gut zu bestimmen, da der Virustiter der Ausgangslösung sehr hoch war und sich die einzelnen infizierten Zellkörper nur bei hoher Verdünnung gut von einander unterscheiden ließen. Damit waren die hergestellten virushaltigen Lösungen mit Konzentrationen von bis zu 3×10^{17} IU/mL gut für die geplanten Experimente geeignet. Die Unterschiede in der Konzentration der einzelnen Aliquods ergaben sich durch die verschiedenen Zellkulturen, die Konfluenz der Zellen bei der Virusvermehrung und die getrennte Auswertung der einzelnen Chargen.

Zur Kontrolle der Methode dienten CEF-Zellen, die nicht infiziert wurden. Die Dichte der unbehandelten Zellen entsprach der Dichte der Zellen auf den behandelten Objektträgern. Die unbehandelten Kontrollzellen wiesen auf den Fotografien teilweise rote Flecken auf, deren Formen nicht dem Aufbau von Fibroblasten entsprachen bzw. keine Zellzugehörigkeit besaßen. Diese Färbungen waren Artefakte.

5.3 Infektion der Hühnchenembryonen

Das Hühnchenembryo diente als Modell für die Herzentwicklung. Um die Zellen des Herzschlauchs genetisch zu verändern, wurden mit Hilfe des Retrovirus RCAS das hühncheneigene Gen cBMP-10 künstlich in die Zielzellen eingebaut. Zur Injektion des Virus in die 2 bis 2,5 Tage alten Embryonen (HH-Stadium 12 bis 14) wurden diese, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, vorbereitet. Dieser Zeitpunkt wurde zur Injektion ausgewählt, da ab dem HH-Stadium 10 die BMP-10 Expression beginnt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde der Herzschlauch angestochen und das Virus mechanisch injiziert. Dabei konnte es vorkommen, dass das Virus in die Umgebung abgegeben wurde und die Infektion der Herzzellen unzureichend war. Um diesen Verlust auszugleichen, wurden mehrere Injektionen durchgeführt. Demzufolge kam es zu einer erhöhten Virus-Konzentration im Embryo, was zu einer weiteren Verbreitung des Virus geführt haben könnte, die über die Herzregion hinausreichte. Mehrere Injektionen minderten jedoch auch die Überlebenschancen des Embryos. Durch Kontraktion des Herzschlauchs konnte das Virus auch direkt nach der Injektion in den Körperkreislauf gepumpt worden sein. Wurden weitere Zellen außerhalb des Herzens infiziert, so fand auch dort eine Überexpression des BMP-10 Gens statt. So könnte die extrakardiale BMP-10 Expression erklärt werden.

Zur Vermeidung von Bakterieninfektionen wurden die Embryonen nach der Injektion des Virus mit Antibiotika behandelt. Eine bakterielle Superinfektion als Todesursache für die behandelten Embryonen wurde damit erfolgreich verhindert. Einige Embryonen haben sich nach der Injektion dennoch nicht bis zum Tag 5 weiterentwickelt. Bei ihnen kann man davon ausgehen, dass keine relevante BMP-10 Expression stattgefunden hat. Daher wurden solche Embryonen, nach einer stichprobenartigen Kontrolle, von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Die manipulierten Embryonen und die Kontrollgruppe wurden bis zu einem Alter von 4,5 bis 5 Tagen (HH-Stadium 24 bis 26) bei 38°C inkubiert. Dieser Tag wurde zum Abbruch der Entwicklung gewählt, weil danach die BMP-10 Expression rückläufig ist. Nach der Inkubation wurden die lebenden Tiere präpariert und fixiert. Die mRNA des cBMP-10 Gens wurde mit Hilfe der in-situ-Hybridisierung dargestellt, mit dem Ziel in der makroskopischen und mikroskopischen Darstellung der Embryonen die Gebiete mit BMP-10 Expression zu markieren. Um Artefakte zu vermeiden, wurden große Hohlräume wie die Hirnbläschen aufgestochen. Trotzdem entstandene Artefakte wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Die Färbung nach der Hybridisierung deutete auf das Vorkommen von BMP-10 mRNA hin. Anatomische Veränderungen entstanden nur, wenn die Zielzellen mit entsprechenden

Rezeptoren für BMP-10 ausgestattet sind und eine Signalkaskade ausgelöst werden kann, die eine Zellproliferation aktiviert oder inhibiert.

Die Infektion war bei allen Embryonen erfolgreich. Die probeweise in-situ-hybridisierten verstorbenen Embryonen zeigten eine diffuse BMP-10 Expression am gesamten Körper. Der häufigste Grund für den Tod eines Embryos war die mechanische Manipulation, die sowohl bei den infizierten wie auch bei einem Teil der nicht-infizierten Embryonen stattfand. Dies war daraus ersichtlich, dass Entwicklung kurz nach den HH-Stadien 10 bis 14 sistierte.

5.4 Auswertung der makroskopischen Beobachtungen

Wie in der Literatur beschrieben, ist die Konzentration von BMP-10 RNS im trabekelbildenden Anteil von Ventrikel und Atrium, v.a. bei Hühnchenembryonen im HH-Stadium 21 bis 32, besonders hoch (Semir Somi et al. 2004, Ulrike Teichman et al. 2004). Die makroskopisch nach der in-situ-Hybridisierung feststellbare Färbung der Herzscheife der Embryonen in der Kontrollgruppe entspricht den in der Literatur angegebenen Regionen des BMP-10-Vorkommens. Wie erwartet haben sich der primitive Vorhof und der primitive Ventrikel angefärbt. Auch die Leberanlage weist eine geringe, makroskopisch nachweisbare BMP-10-Expression auf. In der Literatur wird die Expression in den Lebersinusoiden ab dem HH-Stadium 22 beschrieben (Semir Somi et al., 2004). Dies wurde durch die Ergebnisse meiner Arbeit bestätigt.

Die infizierten Embryonen zeigten makroskopisch neben eben genannten angefärbten Organen noch weitere Anfärbungen, wonach sie sich in eine Gruppe sehr stark gefärbter Tiere und eine Gruppe mit punktuellen Markierungen unterteilen ließen. Die Embryonen in der stark gefärbten Gruppe wiesen an Bauch, Extremitäten und Kopf inhomogene großflächige BMP-10 Expressionen auf. Die andere Gruppe dagegen zeigte in diesen Regionen nur vereinzelt punktuelle Veränderungen.

Ob und inwiefern in den verschiedenen Regionen das Proteine BMP-10 gebildet wurde und ob anatomische Veränderungen entstanden sind, konnte durch die makroskopische Auswertung nicht beurteilt werden. Eine Anti-BMP-10 Färbung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da die dafür benötigten, synthetisch hergestellten Antikörper in Vorversuchen keine befriedigenden Resultate brachten.

5.5 Auswertung der Anschnitte unter dem Mikroskop

Zur mikroskopischen Auswertung wurde ein Teil der mittels in-situ-Hybridisierung angefärbten Embryonen in Paraffin eingebettet, geschnitten und zur Steigerung der Kontraste mit Eosin gefärbt.

Um die Auswertung zu systematisieren, wurden die Beobachtungen für die einzelnen Abschnitte der Herzscheife miteinander verglichen. Dabei wurde auf Intensität der Färbung, Verbreitung der angefärbten Zellen und Strukturunterschiede im Aufbau der einzelnen Abschnitte geachtet. Die Befunde zu den einzelnen Regionen wurden im Kapitel 4.4 beschrieben. An dieser Stelle soll nun im Besonderen auf die Unterschiede zwischen den infizierten und nicht-infizierten Embryonen eingegangen werden.

5.5.1 Endogenes Vorkommen von BMP-10 RNS

Das endogene Vorkommen von BMP-10 RNS stellt das natürliche Vorkommen im Hühnerembryo zum Zeitpunkt der Auswertung (HH-Stadium 24 bis 26) dar. Das Ergebnis der Auswertung dieses Vorkommens wird als Vergleichsstandard zur Beurteilung des Vorkommens bei Genüberexpression (siehe Kapitel 4.4.2 bzw. 5.5.2) genutzt. Da das endogene Vorkommen der BMP-10 RNS ebenso wie die Entwicklung der Embryonen reproduzierbar war, können die Ergebnisse zur Genexpression in den einzelnen Regionen der Herzscheife bei nicht-infizierten Embryonen gut mit denen für die infizierten Embryonen verglichen werden. Im Folgenden werden die Beobachtungen zur Genexpression von BMP-10 für die nicht-infizierten Embryonen zusammengefasst.

Bei allen Embryonen ließ sich im primitiven Vorhof BMP-10 RNS in der gesamten Vorhofwand eindeutig nachweisen. Im primitiven Ventrikel zeigte vor allem die äußere Wandschicht eine hohe BMP-10 Expression. Luminal war die Expression eher schwach und im Bereich der Endokardpolster fehlte sie ganz. Die Konzentration von BMP-10 RNS nahm über die Ventrikelwand von außen nach innen ab. Die zahlreichen Trabekel waren schmal und locker angeordnet. Dies stellt einen anatomischen Unterschied im Vergleich zu den infizierten Embryonen dar. Der Einflusstrakt und die Übergangsbereiche zwischen Vorhof und Ventrikel bzw. zwischen Ventrikel und Ausflusstrakt zeigten keine BMP-10 Expression.

In der Literatur (Ulrike Teichmann et al., 2004) gibt es Hinweise darauf, dass die Herzregionen beim Hühnchen, die keine trabekulären Anteile besitzen und aus dem Ausflusstrakt entstanden sind, keine BMP-10 RNS enthalten. Zu diesen Regionen gehören der glattwandige Teil des rechten Vorhofs und der AV-Kanal mit den AV-Klappen, welche aus den Endokardpolstern entstehen. Dementsprechend ist der Ausflusstrakt genau wie das ventrikuläre und das atriale Sep-

tum frei von BMP-10 RNS. Auch in meiner Arbeit konnte ich nachweisen, dass Teile des primitiven Vorhofs und der Ausflusstrakt ebenso wie die Endokardpolster als Anlage für die AV-Klappen, das atriale und das ventrikuläre Septum BMP-10-frei waren. In der zitierten Studie wird weiterhin beschrieben, dass im HH-Stadium 15 an der Außenseite des primitiven Myokards und des Endokards kein BMP-10 exprimiert wird. Dies konnte in meiner Arbeit (zumindest für spätere Entwicklungsstadien) nicht bestätigt werden. Die Außenwand des Ventrikels enthielt in den HH-Stadien 24 bis 26 in jedem Fall Hinweise auf BMP-10 RNS, sowohl bei den nicht-infizierten wie auch bei den infizierten Embryonen. Im Endokard ist vor allem bei den nicht-infizierten Embryonen ein BMP-10 RNS Signal zu erkennen. Diese Ergebnisse gleichen denen aus der Veröffentlichung von Semir Somi et al. (2004). Dort wird die physiologische BMP-10 Expression im Hühnerembryo untersucht. Die Autoren finden im HH-Stadium 16 BMP-10 mRNA in der gesamten Ventrikelwand. Sie weisen ebenfalls auf die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Teichmann et al. hin. Semir Somi et al. (2004) geben in ihrer Veröffentlichung folgende Verteilung von BMP-10 mRNA in Abhängigkeit von den Entwicklungsstadien an:

- ab HH 10 • Expression im Myokard des Herzschlauches am Atrium Pol anterior zur interventrikulären Rinne
- HH 14 bis 22 • Expression im Ausflusstrakt, im distalen Anteil des Einflusstrakts und im trabekelbildenden Teil des primitiven Ventrikels und der Atria
- ab HH 22 • sinkende Konzentration von BMP-10 RNS im Ein- und Ausflusstrakt,
 • Expression im Bereich der Trabekelstrukturen im Ventrikel und der Atria,
 • Expression in den Lebersinusoiden
- HH 26 • transmuraler Gradient mit luminal hoher und nach außen zum kompakten Myokard der Ventrikelaußenwand bzw. zum Ventrikelseptum hin sinkender Konzentrationen
- HH 31 • Expressionsrückgang zuerst im kompakten Myokard und dann in den Spitzen der Trabekel
- HH 44 • Vorkommen nur noch im trabekulären Myokard der Atrien, im Septum und im Endokard der Ventrikel

Die im Laufe meiner Arbeit gewonnenen Ergebnisse stimmen mit den Angaben der Arbeitsgruppe von Somi überein. Die Ausnahme bilden die Ergebnisse zum transmuralen Gradienten. Dieser konnte hier nicht bestätigt werden. Stattdessen wurden im HH-Stadium 24 und 25 Konzentrationen der BMP-10 RNS nachgewiesen, die im äußeren Anteil des Ventrikelmyokards höher waren als luminal.

5.5.2 Vorkommen von BMP-10 RNS bei Genüberexpression

Durch Infektion mit dem BMP-10 RCAS Virus konnten deutliche Veränderungen im Expressionsmuster des BMP-10 Gens im Bereich des primitiven Atriums, des primitiven Ventrikels sowie in der Leberanlage und in Hirnstrukturen erreicht werden. Im Ventrikel und im Truncus arteriosus ließen sich auch Strukturunterschiede erkennen.

Die Außenwand des Ventrikels der manipulierten Embryonen zeigte eine stärkere BMP-10 Expression als die der Kontrollgruppe. Eine quantitative Aussage ließ sich diesbezüglich aber nicht treffen. Zum Ventrikelinneren hin sank die Intensität der Expression, sie verschwand jedoch nicht vollständig, wie es bei den nicht-infizierten Embryonen der Fall war. Der Aufbau der Trabekel im Ventrikel infizierter Embryonen unterschied sich von dem der Kontrollgruppe. Die Trabekel waren dicker und lagen näher beieinander. Durch die kleineren Zwischenräume wirkte die Wand des Ventrikels kompakter und schmaler als bei den nicht-infizierten Embryonen. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass neben der RNS für BMP-10 in diesem Gebiet auch Zielzellen mit Rezeptoren für das BMP-10 Protein vorhanden waren, welche mit einer Proliferation auf das vermehrte Signal reagiert hatten.

Der Truncus arteriosus nicht-infizierter Embryonen zeigte keine Anzeichen für das Vorhandensein von BMP-10 RNS. Auch bei den infizierten Embryonen konnte nur bei einem einzigen, sehr stark exprimierenden Embryo eine BMP-10 Expression in der Truncusaußenwand nachgewiesen werden. Dennoch ließen sich in diesem Bereich bei allen infizierten Embryonen Unterschiede zur Kontrollgruppe beobachten, die vor allem im Aufbau des Truncus zu finden waren. Die mittlere Wandschicht des Truncus besaß bei den infizierten Embryonen eine geringere Zelldichte. Im Gegensatz dazu war der entsprechende Wandteil bei den nicht-infizierten Embryonen deutlich dicker und dichter mit Zellen besetzt, sodass deren Ausflusstraktlumen kleiner war. Die beschriebene strukturelle Veränderung wurde vermutlich durch die Überexpression des BMP-10 Proteins im Ventrikel hervorgerufen. Dabei beeinflusste BMP-10 entweder die Proliferation der Truncuszellen direkt oder es inhibierte Faktoren, die die Zellproliferation im Truncus regulieren. Der Truncus arteriosus war die einzige Region in der eine anatomische Veränderung festgestellt werden konnte ohne gleichzeitige BMP-10 Expression.

Im Bereich der gesamten Vorhofwand konnte bei den manipulierten Embryonen BMP-10 RNS nachgewiesen werden. Hier waren jedoch keine Unterschiede in der Expression und in der Anatomie im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. Das Gleiche gilt für die Leberanlage.

Der Einflusstrakt, die Übergangsbereiche zwischen Vorhof und Ventrikel bzw. zwischen Ventrikel und Ausflusstrakt und die Endokardpolster in allen Herzregionen waren frei von BMP-10 und glichen im anatomischen Aufbau der Kontrollgruppe.

Eine weitere Region in der BMP-10 RNS nachgewiesen werden konnte, war das Parenchym des Kopfes. Die Anlagen der Hirnbläschen waren nicht betroffen, wohl aber die Zellen um sie herum. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass bei der Injektion das Virus mit dem Blutstrom in den Kopf transportiert und dort in die Zellen aufgenommen wurde. Es ist eher unwahrscheinlich, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um ein Artefakt handelt, da die gefärbten Zellansammlungen regional begrenzt sind und sich in ihrer Lokalisation bei den diesbezüglich untersuchten, infizierten Embryonen gleichen.

Die mikroskopischen Untersuchungen bestätigten die makroskopischen Beobachtungen.

Auch bei der Maus kommt es wie beim Hühnchen aufgrund von Konzentrationsveränderungen von BMP-10 RNS während der Embryonalentwicklung zu Entwicklungsstörungen. Mohammad Pashmforoush et al. (2004) untersuchten Mäuse mit einer Nkx 2.5 Mutation genauer. Der Zeitraum während der Entwicklung der Maus, in dem BMP-10 im Ventrikel exprimiert wird, liegt zwischen dem Neunten und dem 15,5-ten Entwicklungstag. Der Ausfall von Nkx 2.5 hatte eine fehlende Regulation der BMP-10 Expression und damit eine erhöhte pränatale BMP-10 RNS Konzentrationen zur Folge. Aufgrund der Konzentrationserhöhung wurde auch bei der Maus ein erhöhtes Wachstum des Myokards und eine übermäßige Trabekelbildung festgestellt.

Dies entspricht einem Teil der Ergebnisse meiner Arbeit über eine BMP-10 Überexpression beim Hühnchenembryo. Auch ich konnte eine vermehrte Trabekelbildung im primitiven Ventrikel beobachten. Eine weitere Strukturveränderung, die in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde, war im Bereich des Truncus arteriosus (jedoch ohne BMP-10 Expression) zu sehen. Die Zelldichte in der Wand des Truncus war geringer als bei der Kontrollgruppe. Trotz intensiver BMP-10 Expression im Bereich des Vorhofs und der Leberanlage konnten in diesen Regionen keine weiteren anatomischen Veränderungen gefunden werden. Die Expressionsmuster bei einzelnen Tieren im Hirnparenchym, im Rücken und anderen Bauchorganen bleiben fraglich.

5.6 Perspektiven

Als Weiterführung dieser Arbeit wäre es sinnvoll, die Versuche an adulten und geschädigten (z. B. BMP-10 Knockout) Hühnchenherzen durchzuführen, um zu sehen, ob der zusätzliche Einbau des BMP-10 Gens ein Sterben des Embryos aufgrund einer Herzinsuffizienz verhindern kann. Weiterhin wäre die Frage zu klären, ob das Einbringen des entsprechenden Gens bei bekanntem Gendefekt in den Kreislauf des Embryos notwendig ist, oder ob eine Zugabe des Proteins in den Dottersack ausreichend wäre. Die Entwicklung einer Methode zur intrauterinen Manipulation von Embryonen wäre hilfreich, um entsprechende Versuche auch an Säugetieren durchführen zu können.

So beschreiben Hanying Chen et al. (2004) in ihrer Veröffentlichung einen Versuch, in dem sie *in vitro* Herzen von Mäusen mit einem BMP-10 Knockout kultivieren. Die Herzen wurden mit Wildtyp Herzen anhand ihrer ³H-Thymidin Konzentration, Größe und Kontraktionsfrequenz verglichen. Nach 48 Stunden war bei den Knockout-Herzen eine Verschlechterung der genannten Parameter nachweisbar. Durch Zugabe von Medium, welches das Protein BMP-10 enthielt, konnten diese Parameter wieder verbessert werden. In der genannten Arbeit wird deutlich, dass Defekte, die durch fehlende Gene bzw. entsprechende Proteine entstehen, durch Zugabe des Proteins zumindest zum Teil behoben werden können. Der vorhandene Gendefekt könnte auch durch die in meiner Arbeit angewandte Methode zur Genüberexpression behoben werden, wobei zusätzliche zum defekten Gen ein fehlerfreies Gen in das Genom der Zellen eingebaut wird. Die Voraussetzung wäre ein rechtzeitiges Erkennen des Gendefekts und eine intrauterine Anwendung der hier beschriebenen Mikroinjektion.

6 Zusammenfassung

Das BMP-10 aus der Gruppe der Bone Morphogenetic Proteins ist wesentlich an der Herzentwicklung beteiligt. Es reguliert unter anderem die Trabekelentstehung. In der Literatur wurde bisher beim Hühnchen nur das endogene Vorkommen der RNS von BMP-10 beschrieben. In dieser Arbeit wurde cBMP-10 beim Hühnchen zur genaueren funktionellen Charakterisierung auf sein endogenes Vorkommen und zusätzlich die Veränderungen bei Überexpression untersucht. Der Einbau des BMP-10 Gens in das Genom des Embryos erfolgte mit Hilfe des Retrovirus RCAS. Das Hühnchenembryo eignete sich gut als Modellorganismus für die Herzentwicklung, da diese bei Menschen und Vögeln ähnlich verläuft.

Die Amplifizierung des BMP-10 Gens erfolgte nicht fehlerfrei. Durch einen Nukleotid-austausch an der Position 574 wurde anstelle eines Adenosins ein Guanosin amplifiziert. Die Folge war ein Aminosäureaustausch (Valin anstelle von Isoleucin), der für den räumlichen Aufbau und die Funktion des Proteins jedoch keine Einschränkungen mit sich brachte. Die anschließende Virusherstellung und -vermehrung erfolgte mit Hilfe von embryonalen Hühnchenfibroblasten.

Das erzeugte RCAS-Virus mit dem eingebauten cBMP-10 Gen wurde in den Herzschlauch von 2 bis 2,5 Tage alten Embryonen injiziert. Im Alter von 4,5 bis 5 Tagen wurden die Embryonen präpariert und die BMP-10 RNS spezifisch mittels in-situ-Hybridisierung markiert. Die Präparate wurden sowohl makroskopisch wie auch mikroskopisch ausgewertet.

Makroskopisch konnte bei den nicht-infizierten Kontrollembryonen die erwartete endogene BMP-10 Expression im primitiven Vorhof und primitiven Ventrikel festgestellt werden. Außerdem war eine geringe BMP-10 Expression in der Leberanlage zu sehen. Auch diese stimmt mit Beschreibungen in der Literatur überein. Die Kontrollembryonen dienten in der Arbeit als Vergleichsstandard. Die infizierten Embryonen wiesen im Bereich der Herzschleife eine deutlich intensivere BMP-10 Expression auf. Zusätzlich zeigten neben der Leberanlage (bei 7 von 8 infizierten Embryonen) auch bei 5 von 8 Embryonen die Flügelanlagen, bei 4 von 8 Embryonen der Kopf und bei 3 von 8 Embryonen die Fußanlagen punktuell eine BMP-10 Expression.

Mikroskopisch war bei den Kontrollembryonen eindeutig in der Vorhofwand und in der Trabekelregion des Ventrikels eine BMP-10 Expression zu sehen. Die Leberanlage wies nur am Rand Bereiche mit BMP-10 Expression auf.

Die BMP-10 RNS-haltigen Bereiche im Vorhof und Ventrikel der infizierten Embryonen glichen denen der Kontrollgruppe. In der Struktur der Trabekel zeigten sich allerdings Unterschiede. Die Trabekel der infizierten Embryonen waren deutlich dicker als die der Kontrollgruppe. Außerdem standen sie dichter beieinander, sodass die Ventrikelwand kompakter wirkte. Die mittlere Wandschicht des Ausflusstrakts der infizierten Embryonen zeigte eine geringere Zelldichte als die der Kontrollgruppe. In beiden Gruppen war in diesem Bereich keine BMP-10 Expression zu verzeichnen. Die infizierten Embryonen zeigten Vorkommen von BMP-10 RNS in der Leberanlage. Die BMP-10 Expression im Kopfbereich bei zwei Embryonen beschränkte sich auf das Parenchym zwischen den Anlagen für Diencephalon, Mesencephalon und Telencephalon. Punktuelle BMP-10 Expressionen innerhalb von Zellansammlungen im Bereich des Rückens oder der Extremitäten waren nur in jeweils einem Fall zu finden.

Die gewonnenen Ergebnisse bestätigten die aus der Literatur bekannte Tatsache, dass BMP-10 für die Trabekelbildung im Herzen verantwortlich ist. Die erwarteten endogenen Vorkommen in Atrium und Ventrikel konnten nachgewiesen werden. Die für Mäuseembryonen von Mohammad Pashmforoush et al. (2004) aufgestellte These, dass bei einer erhöhten Konzentration der BMP-10 RNS, ein verändertes Trabekelwachstum stattfindet, konnte in dieser Arbeit für Hühnchen bestätigt werden. Die Trabekel im Ventrikel waren bei BMP-10 Überexpression hypertroph. Eine Hypertrophie anderer Wandbereiche konnte nicht festgestellt werden. Die Wand des Ausflusstraktes hingegen war sogar zellärmer als bei der Kontrollgruppe. Dies wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Vermutlich kommt es aufgrund der erhöhten BMP-10 Expression im Ventrikel zur Reduktion des Zellwachstums im angrenzenden Truncus arteriosus.

Das Wissen zum Einfluss von BMP-10 auf die Herzentwicklung ist noch unvollständig und weitere Forschung ist notwendig. Erste erfolgreiche in vitro Versuche durch Hanying Chen et al. (2004) zeigen, dass fehlendes BMP-10 Protein während der Herzentwicklung durch externe Zugabe ersetzt werden kann. Inwiefern ein solcher Ersatz auch mit Hilfe der hier angewandten Genüberexpression erfolgen könnte, bleibt noch zu erörtern.

7 Literaturverzeichnis

Bellairs R, Osmond M: The Atlas of Chick Development; Academic Press San Diego, London, Boston usw. 1998

Brand T: Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis, *Developmental Biology* 258 (2003) 1–19

Buggisch M: Mechanismen der Proliferation von Kardiomyozyten differenziert aus embryonalen Stammzellen der Maus, 1. Auflage; VVB Laufersweiler Verlag Giessen, 2007

Chen H, Shi S, Acosta L, Li W, Lu J, Bao S, Chen Z, Yang Z, Schneider M D, Chien K R, Conway S J, Yoder M C, Haneline L S, Franco D, Shou W: BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis, *Development* 131 (9) (2004) 2219 – 2231

Christoffels V M, Burch J B E, Moorman A F M: Architectural Plan for the Heart: Early Patterning and Delineation of the Chambers and the Nodes, *TCM* 14 No 8 (2004) 301 – 307

David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige J J, Bailly S: Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells, *blood* 109 (2007) 1953-1961

Dentice M, Luongo C, Elefante A, Romino R, Ambrosio R, Vitale M, Rossi G, Fenzi G, Salvatore D: Transkription Faktor Nkx-2.5 Induces Sodium/Iodide Symporter Gene Expression and Participates in Retinoic Acid- and Lactation-Induced Transcription in Mammary Cells, *Molecular and Cellular Biology* 24 No 18 (2004) 7863 – 7877

Hamburger V, Hamilton H L: A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo, *J Morph* 88 No 1 (1951) 49 – 92

Hogan B L M, Blessing M, Winnier G E, Suzuki N, Jones C M: Growth factors in development: the role of TGF- β related polypeptide signalling molecules in embryogenesis, *Development Supplement* (1994) 53 – 60

Lopez-Coviella I, Follettie M T, Mellott T J, Kovacheva V P, Slack B E, Diesl V, Berse B, Thies R S, Blusztajn J K: Bone morphogenetic protein 9 induces the transcriptome of basal forebrain cholinergic neurons, *PNAS* 102 No 19 (2005) 6984–6989

Martinsen B J: Reference Guide to the Stages of Chick Heart Embryology, *Developmental Dynamics* 233 (2005) 1217 - 1237

- Massagué J, Attisano L, Wrana J L: The TGF- β family and its composite receptors, Trends Cell Biol 4 (1994) 173 - 178
- Massagué J, Chen Y G: Controlling TGF- β signaling, Genes Dev 14 (2000) 627 – 644
- McCaffrey T A: TGF- β s and TGF- β receptors in atherosclerosis, Cytokine & Growth Factor Reviews 11 (2000) 103 -114
- Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, Kudoh S, Oka T, Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Habara-Ohkubo A, Nakaoka T, Fujita T, Yazaki Y, Komuro I: Bone Morphogenetic Proteins Induce Cardiomyocyte Differentiation through the Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase TAK1 and Cardiac Transcription Factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4, Molecular and Cellular Biology 19 No 10 (1999) 7096 – 7105
- Moorman A F M, Christoffels V M: Cardiac Chamber Formation, Pysiol Rev 83 (2003) 1223 – 1267
- Neuhaus H, Rosen V, Thies R S : Heart Specific Expression of Mouse BMP-10 a Novel Member of the TGF- β Superfamily, Mech Dev 80 (1999) 181 – 184
- Ohne Autor, The RCAS System. Letzter Aufruf am 17.07.2010. WWW:
<http://home.ncifcrf.gov/hivdrp/RCAS/overview.html>
- Pashmforoush M, Lu J T, Chen H, Amand T S, Kondo R, Pradervand S, Evans S M, Clark B, Feramisco J R, Giles W, Ho S Y, Benson D W, Silberbach M, Shou W, Chien K R: Nkx2-5 Pathways and Congenital Heart Disease: Loss of Ventricular Myocyte Lineage Specification Leads to Progressive Cardiomyopathy and Complete Heart Block, Cell 117 (2004) 373 – 386
- Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch, 259. Auflage; de Gruyter Berlin New York 2002
- Rosenzweig B L, Imamura T, Okadome T, Cox G N, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin C H, Miyazono K : Cloning and Charakterization of a Human Type II Receptor for Bone Morphogenetic Proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol 92 (1995) 7632 – 7636
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proceedings of the National Academy of Sciences 74 (1977) 5463 - 5467
- Schiebler T H , Schmidt W (Hrsg): Anatomie, 8. Auflage; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York usw., 1999 Nachdr. 2002
- Schultheiss T M, Burch J B E, Lassar A B: A role for bone morphognetic proteins in the induction of cardiac myogenesis, Genes Dev 11 (1997) 451 – 462

- Shi Y, Massagué J: Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus, *Cell* 113 (2003) 685 – 700
- Solloway M J, Harvey R P: Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective, *Cardiovascular Research* 58 (2003) 264 – 277
- Somi S, Buffing A A M, Moorman A F M, van den Hoff M J B: Expression of Bone Morphogenetic Protein-10 mRNA During Chicken Heart Development, *The Anatomical Record Part A* 279 A (2004) 579 – 582
- Song J J, Celeste A J, Kong F M, Jirtle R L, Rosen V, Thies R S: Bone Morphogenetic Protein-9 Binds to Liver Cells and Stimulates Proliferation, *Endocrinology* Vol 136 No 10 (1995) 4293 – 4287
- Teichmann U, Kessel M: Highly Restricted BMP10 Expression in the Trabeculating Myocardium of the Chick Embryo, *Dev Genes Evol* 214 (2004) 96 – 98
- ten Dijke P, Fu J, Schaap P, Roelen B A J: Signal Transduction of Bone morphogenetic Proteins in Osteoblast Differentiation, *J Bone Joint Surg Am* 85 (2003) 34-38
- ten Dijke P, Heldin C H: An anchor for activation, *Nature* 397 (1999) 109 – 111
- ten Dijke P, Piek E, Heldin C H: Bone Morphogenetic Proteins and their Receptors, *Encyclopedia of life sciences*; (2001) 1 – 7
- Tufan A C, Akdogan I, Adiguzel E: Shell-less culture of the chick embryo as a model system in the study of developmental neurobiology, *Neuroanatomy* 3 (2004) 8–11
- Yamagishi T, Nakajima Y, Nishimatsu S-I, Nohno T, Ando K, Nakamura H: Expression of Bone Morphogenetic Protein-5 Gene During Chick Heart Development: Possible Roles in Valvuloseptal Endocardial Cushion Formation, *Anat Rec* 264 (2001) 313-316
- Yamashita H, tenDijke P, Heldin C H, Miyazono K: Bone Morphogenetic Protein Receptors, *Bone* 19 No 6 (1996) 569-574

8 Anlagen

8.1 Die Entwicklung von Hühnchenembryonen - Stadieneinteilung nach Hamburger und Hamilton (HH-Stadien)

| HH-Stadien | Alter | Identifizierungsmerkmal des Stadiums |
|-------------------|-------------|--|
| Vor der Eiablage | | |
| Frühe Teilung | 3,5-4,5 h | Membran der Eierschale wird im Isthmus des Eileiters gebildet |
| Späte Teilung | 4,5-24 h | Eierschale wird im Uterus gebildet |
| Nach der Eiablage | | |
| 1 | | Pre-Primitivstreifen (embryonic shield) |
| 2 | 6-7 h | Initialer Primitivstreifen, 0,3-0,5 mm lang |
| 3 | 12-13 h | Intermediärer Primitivstreifen |
| 4 | 18-19 h | Definitiver Primitivstreifen, ±1,88 mm lang |
| 5 | 19-22 h | Kopfentwicklung (Wirbelsäule) |
| 6 | 23-25 h | Abfaltung des Kopfes |
| 7 | 23-26 h | 1 Somite; Neuralfalte |
| 7 bis 8- | ca. 23-26 h | 1-3 Somiten; intraembryonales Zölon |
| 8 | 26-29 h | 4 Somiten; Blutinseln |
| 9 | 29-33 h | 7 Somiten; primäres Augenbläschen |
| 9+ bis 10- | ca. 33 h | 8-9 Somiten; kraniale Abfaltung des Embryos |
| 10 | 33-38 h | 10 Somiten; 3 primäre Hirnbläschen |
| 11 | 40-45 h | 13 Somiten; 5 Neuromere des Hinterhirns |
| 12 | 45-49 h | 16 Somiten; Telencephalon |
| 13 | 48-52 h | 19 Somiten; Atrioventrikularkanal |
| 13+ bis 14- | ca. 50-52 h | 20-21 Somiten; Schwanzknospe |
| 14 | 50-53 h | 22 Somiten; Rumpfkrümmung; Kiemenbögen I und II, Kiemenspalte 1 und 2 |
| 14+ bis 15- | ca. 50-54 h | 23 Somiten; Mundhöhle |
| 15 | 50-55 h | 24-27 Somiten; Kiemenbogen III, Kiemenspalte 3 |
| 16 | 51-56 h | 26-28 Somiten; vordere Extremitätenknospe; kaudale Abfaltung des Embryos |
| 17 | 52-64 h | 29-32 Somiten; hintere Extremitätenknospe; Epiphyse |
| 18 | 3 d | 30-36 Somiten hinter der hinteren Extremitätenknospe; Allantois |
| 19 | 3-3,5 d | 37- 40 Somiten bis in den Schwanz; Maxillaentstehung |
| 20 | 3-3,5 d | 40-43 Somiten; Rotation beendet; Pigmentierung des Auges |
| 21 | 3,5 d | 43-44 Somiten; Kiemenbogen IV, Kiemenspalte 4 |
| 22 | 3,5-4 d | Somiten bis zur Schwanzspitze |
| 23 | 4 d | Dorsale Kontur (vom Hinterhirn bis zum Schwanz) ist eine gebogene Linie |
| 24 | 4,5 d | Anlage der Zehen |
| 25 | 4,5-5 d | Ellbogen- und Kniegelenk |
| 26 | 5 d | Ersten 3 Zehen |
| 27 | 5-5,5 d | Schnabel |
| 28 | 5,5-6 d | 3 Finger, 4 Zehen |
| ... | ... | ... |
| 46 | 20-21 d | Geschlüpftes Küken |

Tabelle übernommen von <http://embryology.med.unsw.edu.au>

8.2 Amplifiziertes cBMP-10 Fragment

Die markierte Stelle zeigt den Nukleotidaustausch: Guanosin anstelle eines Adenosins.

```

ATGGATTCCATAGTCCTCCAGCTGTGGGCTGGCCTCTGCCTCTTGGTTACCTTGCCACTTGCAGTCCCA
TCCTGAGCTTGGAGCACTCTTCCTTAGAGGAAGGCGAGCCTCTTTTCGATGAATTCCTGTCCGAGCAGGA
TGGTGTGATTTC AACACATTGCTTCAGAATATGAAGAACGAGTTCCTGAAGACGTTGAACCTCTCCGAC
ATTCCTCTGCACGAGTCGGCCAAAGTGGACCCACCAGAGTACATGTTAGAGCTGTACAACAAGTTTGCCA
CTGACAGGACATCTATGCCATCTGCAAATATCATTAGGAGCTTCAAAAATGAAGACCTTGCTTCCCACCC
TGTTGGCGTCATAGGAGTTCGGAAATACCCCCTTCTGTTCAATGTCTCCATCCCTCATCATGAAGAAATC
ACCATGGCGGAGCTGAGACTCTACACCTTGGTGGAGAGGGACCAAATGCTTTATGAAGGGCTCGACCGAA
AGGTCACCATTTTTGAAGTGTGGAAAATGACCATATGGGGGTAGGAGAAGAAAGAAAGATCGTGGCGCT
GGCATCCAGACAGTCTATGGCACAAGCAGTGAGTGGGAGAGCTTCGAGGTGACCGAAGCCATCAGGCGT
TGGCGAAGGGCAGGGCTGACCACGCACCGGCTGGAGGTTACATTGAGAGCAGAGAAGGGGAGGAGCAGA
ATGGAGAGGGGAAACTCGATATCGACATCAACTCTGAGGCTAAGCACGTGCCCTGTTGATTGTGTTCTC
TGATGACCAAAGCAATGATCAGAAAGAGGAGAAGCAAGAGCTGAACGAAATGATAGACCATGAGCAGCTC
CTGGACTTGGAGAACCCTGGAAGTTGGCAATTTCCATGGACACCCTGGTGGAGAGGCTCTGCTCCAGATGC
GTTCTAACATCATTATGACTCTACTGCTCGAATCCGAAGGAACGAAAAGGCAACTACTGCAAAAAGAC
TCCACTCTACATAGATTTCAAGGAGATTGGCTGGGATTCTGGATCATCGCTCCAGCAGGATATGAAGCT
TATGAGTGCCATGGAGTATGCGCCTACCCCTAACAGAGCACGTCACCCCAACAAAACATGCCATTGTCC
AGACTTGGTTCACTTGAAGAATCCCCAGAAAGCCTCCAAGGCCTGCTGCGTGCCCAACAAACTCGATCC
TATCTCAATTTCTACATGGATGCAGGGGTGGTACCTACAAGTTCAAATATGAAGGCATGGTGGTATCA
GAGTGTGGCTGCAGATAGTAGCAGGGAAGACATGCACAGGGGAGTGACAAGGGGAAGTATTTAATGATTCA
AGTCTGTAAATTTGTACATTTTCGGATTTCTATTTAATAAGGTTATTTAATGAGGCATGTACAGATAATT
GTATGTTTCCTGTACGGGGAATGGGCAAGTCATATGACCGTAGGGAATGTATATTTTGTTCATTGCTT
GCTTCTTGCTATTCTGTTCAAATTTATGTCTGTCTCTTTCATACCTGAGCATAGAGCACATCACTGGATT
GTTTGGGTGGGCTTTCATGCTAGAAGGAGCACATTTCAAATTCACAGGAATAAAGGCATCTTTTTGTGCT
TTGTAAATGGTGATTGGCATCTGTAGGGATTTCCAGAGTGAATATAGCTATGGGCAATACGTGCCAGAT
TGTTTCAGTTGTGTGTAATAATCTTTATAAAGATCTTTACATACTCAGATATTTTGAATAATTTATCTCTGTA
GCTCTTAAATCTCAACAAAAGGTTTGAATGGTACCAGTTTACACCAGCTCAGAATCTGGTCCCCCCCCAA
CCAGTCCAGTAAGCTACATGCCATACATCCACGTAACCCAATTCAGATGGCCGAATAGTATTGCATTTAG
TCTGCATAGAAATAGACAGAAAAGGAACCCCCATTGTGCCAGCTAGATAGAGAGGATCTTTCCTTTATGT
ATGTGCTGAAGTTGTCAATTCATAAAGGTAAGTGTGCCCCCTTACATGATATATGATGGAGTCACATGCCA
TGTTTTCCGCCACTCTTCTGCAACAAATCGCAGTGATAAGAAGGTGTGGGAGCTGAGAAACAATAGACCCG
TCACTTTATTTATACTAAGCTGCAAATTTGTGAGATTCTTGGGAAAGTGTAAAGTGACACTGACTCTTTTA
GCCTGTACCAGAGCCTACTGTACTGTCCCTGCATCTGTTTTACTTTTAAAGGGAAAGTTATCTTCACTG
GAAGTGATAAGGGCCTTTGAAAGAATCACTCTAACACTTCATGGGATTGAACACTTTATCATGCACCAAC
TAAAACCAGTCTCACCTATTTTACACATACTCTTCTGTGCTTCCCATAATTTATTGATCTATTTATTGA
CTGCCTGCCTCTGTAATATAATGTAGAATACAGAACGTTTTATTTTTGTGCTTGTATGTAACCCCACTTG
GATAAACCTTGTACCGAC

```

9 Thesen der Dissertation

1. Ziel der Arbeit war die genauere funktionelle Charakterisierung des BMP-10 Gens durch Überexpression des Gens in Hühnchenembryonen.
2. Zur Überexpression wurde in ein Vogelvirus (RCAS) das hühncheneigene BMP-10 Gen eingebracht.
3. Die Injektion der Viren ins embryonale Hühnchenherz führte zu einer nachweisbaren Überexpression des BMP-10 Gens.
4. Überexpression des BMP-10 Gens ließ sich vor allem im primitiven Atrium, im primitiven Ventrikel, aber auch in der Leberanlage und in Hirnstrukturen nachweisen.
5. Die endogene Expression des BMP-10 Gens wurde, soweit dies festgestellt werden konnte, nicht verändert.
6. Überexpression von BMP-10 in Regionen des Herzen, die normalerweise kein BMP-10 exprimieren, führten im Truncus arteriosus zu einer Veränderung im Wandaufbau: Die Zelldichte war geringer und das Lumen weiter.
7. Überexpression von BMP-10 in trabekulierten Regionen der embryonalen Herzventrikel, in denen auch endogen BMP-10 exprimiert wird, führten zu einer nachweisbaren Veränderung der Morphologie der Ventrikelwand:
 - Die einzelnen Trabekel wurden dicker und erschienen kompakter.
 - Die Trabekel-Zwischenräume wurden schmaler.
8. Die beobachteten Veränderungen bei der Trabekelbildung könnten durch eine gesteigerte Proliferation der Ventrikelzellen erklärt werden.
9. Eine Steigerung der Proliferation von Ventrikelzellen im embryonalen Herzen könnte unter bestimmten Bedingungen auch von therapeutischem Nutzen sein.

Tabellarischer Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

| | |
|-----------------------------------|---------------------|
| Name, Vorname: | Johannemann, Diana |
| Straße: | Neue Werderstr. 40d |
| PLZ/Wohnort: | 18057 Rostock |
| Geburtsdatum: | 10.09.1982 |
| Geburtsort: | Halle/Saale |
| Nationalität/Staatsangehörigkeit: | deutsch |

SCHULAUSBILDUNG

- 1993-1999 Thomas Müntzer Gymnasium in Halle/Saale,
- 1999-2000 Lakeland High School in Suffolk, Virginia, USA,
- 2000-2002 Thomas Müntzer Gymnasium in Halle/Saale, Abschluss Abitur

STUDIUM

- seit Okt. 2002 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- seit Sept. 2004 Dissertation am Institut für Physiologische Chemie der Universität Halle-Wittenberg
- März 2005 Ärztliche Vorprüfung
- Feb. 2008 Beginn Praktisches Jahr
- Juni 2009 Staatsexamen Humanmedizin
- seit Sept. 2009 Assistenzärztin für Dermatologie, Ostseeklinik Kühlungsborn

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Diana Johannemann

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Dies ist mein erstes Promotionsverfahren und ich habe auch vorher noch keine Promotionsversuche unternommen.

Diana Johannemann

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich recht herzlich bei dem derzeitigen kommissarischen Leiter Prof. Dr. Hollemann und dem ehemaligen Leiter des Institutes für physiologische Chemie Prof. Dr. Dr. Braun für die Bereitstellung meiner Doktorandenstelle.

Mein Dank gilt Dr. Herbert Neuhaus für die Bereitstellung des Themas, die gute Betreuung und die unendliche Geduld während meiner Arbeit.

Außerdem danke ich Nicole, Annelies, Dr. Petra Neuhaus, Undine, Annett und Cirko für die guten Ratschläge und lustigen Stunden im Labor.

Vielen Dank auch an Kerstin und Romy für die Versuche meiner Grammatik Gutes zu tun und meinen Sätzen klaren Sinn zu geben, an Johannes für die Einstellungen an meinem Rechner und an Susann und Ingolf für die Erklärungen zu den Programmen.

Bei meinen Eltern, Schwestern und Großeltern bedanke ich mich dafür, dass sie mich immer wieder ermuntert haben, weiter zu machen und mich dabei moralisch und finanziell unterstützt haben.