

**Kardiale Ziliopathie als Ursache
perimembranöser ventrikulärer
Septumdefekte**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christoph Gerhardt

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Juni 2010

**Aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der
Tiere der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Referent: Univ.-Prof. Dr. U. Rüter

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. T. Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Entwicklungsbiologische Grundlagen	6
1.2	Das Herz	10
1.2.1	Funktion und Aufbau des Herzens	10
1.2.2	Herzentwicklung	12
1.2.3	Der ventrikuläre Septumdefekt	19
1.3	Die <i>Ftm</i> -Mausmutante	21
1.4	Die Zilie	22
1.4.1	Entdeckung und Aufbau der Zilie	22
1.4.2	Die Funktion der Zilie	26
1.4.3	Der intraflagellare Transport (IFT)	26
1.5	Zilien-assoziierte Signalwege	29
1.5.1	Der Sonic Hedgehog- (Shh-) Signalweg	30
1.5.2	Der Wnt-Signalweg	35
1.5.3	Der „Platelet-derived growth factor“ Rezeptor α - (Pdgfr α -) Signalweg	39
1.6	Ziel dieser Arbeit	42
2	MATERIAL & METHODEN	43
2.1	Maushaltung und Isolation definierter Embryonalstadien	43
2.2	Chemikalien, Standardlösungen und Nährmedien	43
2.3	Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren	44
2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA	44
2.3.1.1	Plasmid-Mini-Isolation	44
2.3.1.2	Plasmid-Midi/Maxi-Isolation	46
2.3.2	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus embryonalen Mausmembranen	47
2.3.3	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Schwänzen von Mausembryonen	49
2.3.4	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Schwanzspitzen adulter Mäuse	49
2.3.5	Phenol-Chloroform-Extraktion mit nachfolgender Ethanol-Fällung	50
2.3.6	RNA-Isolierung aus embryonalen Mausherzen	51
2.3.7	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	52
2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
2.4.1	PCR-Amplifikationen	54
2.4.2	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	55
2.4.3	Reverse Transkription	56

2.4.4	„Real-Time“-PCR-Untersuchungen.....	56
2.5	Klonierung.....	59
2.5.1	Sequenzspezifische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	59
2.5.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	59
2.5.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	60
2.5.4	Ligation von DNA-Fragmenten	62
2.5.5	Transformation von Plasmiden in <i>Escherichia coli</i>	62
2.5.5.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	62
2.5.5.2	Transformation	63
2.6	Histologische Techniken	64
2.6.1	Paraffindünnschnitte	64
2.6.2	Gefrierdünnschnitte.....	65
2.6.3	Hämalaun/Eosin-Färbung.....	65
2.7	<i>In situ</i>-Hybridisierung	66
2.7.1	Synthese von RNA-Sonden.....	67
2.7.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Paraffindünnschnitten	68
2.8	Antikörperfärbung auf Gefrierdünnschnitten.....	70
2.9	BrdU-Analysen	72
2.10	TUNEL-Analysen	73
2.11	Fotodokumentation und Statistik	75
2.11.1	Fotodokumentation	75
2.11.2	Statistik.....	75
2.12	Proteinbiochemie	76
2.12.1	Extraktion von Proteinen.....	76
2.12.2	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	77
2.12.3	Western-Blot	79
2.12.4	Immunnachweis von Proteinen.....	80
2.12.5	Quantifizierung der Proteindaten	81
2.13	Rasterelektronenmikroskopie.....	81
3	ERGEBNISSE.....	82
3.1	<i>Ftm</i>-defiziente Mausembryonen zeigen einen perimembranösen VSD.....	82
3.2	Normale Morphologie und Entwicklung endokardialer Kissen in <i>Ftm</i>-negativen Herzen.....	84
3.3	Detektion sensorischer Monozilien in murinen Herzen	85
3.4	Kardiale Zilien zeigen eine reduzierte Länge in <i>Ftm</i>-homozygot mutanten Mausembryonen	88

3.5	Reduktion der Proliferation in Zilienregionen <i>Ftm</i> -defizienter Herzen führt zu einer Verminderung der Wanddicke in Atrien und Ventrikeln.....	92
3.6	Zilien-vermittelte Shh-, nicht-kanonische Wnt- und Pdgfr α -Signale sind in <i>Ftm</i> -defizienten Herzen herunterreguliert.....	98
3.7	Shh-Signale sind dem Pdgfr α -Signalweg in kardialen Zilien vorgeschaltet.....	102
3.8	Der Shh-Signalweg ist aufgrund eines Gli3-Prozessierungsdefekts in <i>Ftm</i> -defizienten Maus Herzen gestört.....	104
4	DISKUSSION.....	108
4.1	Monozilien muriner Herzen üben eine sensorische Funktion aus.....	108
4.2	Kardiale Zilien kontrollieren das Auswachsen des VS durch Proliferationsregulation	109
4.3	Zilien-gesteuerte Proliferation beeinflusst die Dicke atrialer und ventrikulärer Wände	110
4.4	Kardiale Zilien vermitteln proliferative Signale.....	111
4.5	Die Prozessierung von Gli3 ist in <i>Ftm</i> -negativen Herzen gestört	113
4.6	Die ziliäre Dysfunktion in <i>Ftm</i> -defizienten Herzen könnte auf einem defekten IFT beruhen.....	114
4.7	Neben Zilien gibt es weitere Faktoren, die für die Entwicklung des VS verantwortlich sind	115
4.8	Modell der VS-Entstehung.....	116
4.9	Ausblick.....	119
4.9.1	Analyse des IFT in <i>Ftm</i> -defizienten, kardialen Zilien	119
4.9.2	Nachweis der Gli3-Aktivatorform	119
4.9.3	Mediation weiterer Signalwege durch kardiale Zilien.....	120
4.9.4	Die Rolle von <i>Ftm</i> in kardialen Zilien	121
4.9.5	Klinische Aspekte der Ergebnisse dieser Arbeit	122
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	123
6	ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN	125
7	LITERATUR.....	129
8	DANKSAGUNG	151
9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	152

1 Einleitung

1.1 Entwicklungsbiologische Grundlagen

Die Entwicklung eines Organismus reicht von der Zygote bis zum Tod und wird als Ontogenese bezeichnet. Während der Ontogenese kommt es zunächst zur Ausbildung eines komplexen, multizellulären Lebewesens aus einer einzigen Zelle – der befruchteten Eizelle. Die Entstehung und Erhaltung eines solchen Individuums beruht auf der distinkten Kontrolle und Koordination von essentiellen Prozessen in Billionen von Zellen. Zu diesen Prozessen gehören beispielsweise Proliferation, Apoptose, Migration, Differenzierung, Spezifizierung etc. Somit können innerhalb eines Organismus viele verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen entstehen. Dabei differieren Zellen weniger durch den Besitz verschiedenartiger genetischer Information, sondern vielmehr durch die Auswahl an Genen, die sie dann tatsächlich exprimieren. Dieser Vorgang wird differentielle Genexpression genannt und auf verschiedenen Ebenen kontrolliert. Die erste Ebene stellt die Lage des Gens auf dem Chromosom dar. Der Genlokus ist in der Regel nicht direkt zugänglich, da DNA im Zellkern gefaltet vorliegt und somit bestimmte DNA-Abschnitte für die Genexpression verborgen bleiben. Die zweite Ebene der differentiellen Genexpression wird Transkription genannt und umfasst die Synthese von RNA aus DNA. Die meisten Gene werden durch die Steuerung der Transkription reguliert. Proteine binden als sogenannte Transkriptionsfaktoren dynamisch an DNA und können die Aktivität eines Gens unterdrücken oder verstärken.

Proteine verantworten außerdem die Ausführung des in den Genen festgelegten Programms. Auch auf dieser Ebene ist es noch möglich, die Wirkung eines Gens zu beeinflussen. Dabei stellt die Kontrolle der Translation, also die Regulation der Synthese von Proteinen mit einer messenger RNA (mRNA) als Matrize, einen entscheidenden Schritt dar. So wird die Abbaurate bestimmter eukaryotischer mRNAs reguliert, was wiederum einen Einfluss auf die Konzentration dieser mRNAs erlaubt. Weiterhin kann die Translation einiger mRNAs durch spezifische RNA-Bindungsproteine gesteuert werden. Sogar posttranslational kann durch

Proteinmodifikationen noch Einfluß auf die Aktivität eines Gens bzw. seines Proteins genommen werden. Man unterscheidet prinzipiell zwischen chemischen und proteolytischen Modifikationen. Chemische Modifikationen umfassen Substitutionen von Amino- oder Carboxylgruppen der Aminosäureseitenketten (z.B. Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Serin, Threonin oder Tyrosin) (Yang und Seto, 2008). Bei proteolytischen Modifikationen kommt es zur Prozessierung von Proteinen, d.h. bestimmte Peptidabschnitte werden proteolytisch entfernt (Finley, 2009; Piwko und Jentsch, 2006). Mit Hilfe solcher Proteinmodifikationen können die Halbwertszeit, die Aktivität, die Funktion und die Lokalisation der modifizierten Proteine bestimmt werden.

Viele verschiedene Arten von Proteinen wirken kontrolliert zusammen, um zelluläre Prozesse und Funktionen umzusetzen (Stein et al., 2009). Sie geben der Zelle ihre jeweilige Gestalt, regulieren den Zellmetabolismus, dienen als molekulare Schalter, Rezeptoren, Liganden und Mediatoren, ermöglichen Bewegungsprozesse, steuern die Membranpermeabilität und kontrollieren Genexpressionen. Die Funktion fast aller Proteine beruht auf ihrer Fähigkeit, andere Moleküle binden zu können. Dabei sind die Ligandenbindungsstellen der Proteine und die jeweiligen Liganden chemisch und topologisch komplementär.

Bei der Entwicklung vielzelliger Organismen ermöglichen und kontrollieren Gene und Proteine somit die Bildung hunderter unterschiedlicher Zelltypen, welche nicht nur in der korrekten Anzahl, sondern auch am richtigen Ort des sich entwickelnden Embryos vorliegen müssen. Die Koordination der Zellen führt zur Entstehung von Geweben und schließlich zur Genese komplexer Organe. Die Bildung von Geweben beginnt zunächst mit der Proliferation von Zellen. Einfache vielzellige Organismen bestehen aus Einzelzellen, die sich in Gruppen in einem Netzwerk aus Proteinen und Polysacchariden befinden. Dieses Netzwerk wird extrazelluläre Matrix genannt. Höhere vielzellige Organismen dagegen benötigen sogenannte Adhäsionsmoleküle (engl.: cell adhesion molecules; CAMs). Dies sind Proteine, die sich auf den Zelloberflächen befinden und eine enge Verbindung von Zelle zu Zelle oder von Zelle an extrazelluläre Matrix bewirken. Die so entstandenen Gewebe beherbergen differenzierte Zellen, die eine spezialisierte gemeinsame Funktion erfüllen und daher als Gewebezellen bezeichnet werden. Diese Gewebe wiederum sind essentielle Komponenten der Organe und müssen strikt angeordnet vorliegen. Die Funktion eines Organs wird daher von den spezifischen

Eigenschaften der einzelnen Gewebestandteile bzw. von einer Kombination dieser bestimmt.

Die Funktion sowie die Entwicklung von Geweben und Organen beruht auf interzellulärer Kommunikation, welche hauptsächlich durch extrazelluläre Signalmoleküle realisiert wird. Man unterscheidet zwei Gruppen von Signalmolekülen hinsichtlich der Reichweite ihres Einflusses: Die juxtakrinen Faktoren agieren als Vermittler von kontaktabhängiger Signalübertragung, d.h. die interagierenden Zellen stehen in direktem Membran/Membran-Kontakt zueinander, während die parakrinen Mediatoren über eine räumliche Distanz wirken. Diese parakrinen Induktoren werden von Zellen sezerniert, binden an ein Rezeptorprotein, das zumeist in der Plasmamembran einer Nachbarzelle lokalisiert ist, und aktivieren so einen intrazellulären Signalweg. Die so aktivierte Signalkaskade umfasst eine Reihe von Signalproteinen, von denen schließlich ein oder mehrere Signalproteine auf ein Zielprotein derartig Einfluss nehmen, dass dessen Wirken das Zellverhalten verändert. Es existiert mehr als ein halbes Dutzend von Signalwegen, die bei der interzellulären Kommunikation in einem Embryo eine Rolle spielen. Dazu gehören der TGF- β -/BMP-, der Rezeptor-Tyrosinkinase-, der Kernrezeptor-, der Jak/STAT-, der Notch-, der Hedgehog- und der Wnt-Signaltransduktionsweg (Gerhart, 1999).

Die Entwicklung der Organe hängt allerdings nicht nur von lokalen Wechselwirkungen der Gewebezellen ab, sondern auch von dem Programm der Gene, die die Struktur des Körpers festlegen. Diese Musterbildungsgene legen die allgemeine Organisation eines Organismus fest. So führen sie zur Determination der drei Körperachsen: Die antero-posteriore Achse (A/P-Achse) erstreckt sich vom Kopfende zum Schwanzende, die dorso-ventrale Achse (D/V-Achse) verläuft von der Rückseite (Rücken) zur Vorderseite (Bauch) und die Links-Rechts-Achse (L/R-Achse) definiert die linke und rechte Körperhälfte entlang der A/P-Achse. Die Bildung dieser Körperachsen ist für nahezu alle Tiere unabhängig von ihrer evolutionären Entwicklungsstufe essentiell, weshalb Musterbildungsgene in Genomen hochkonserviert vorliegen. Die Notwendigkeit der äußerst distinkten Kontrolle der Musterbildung wird deutlich, wenn man bedenkt, dass beispielsweise der menschliche Körper aus rund 220 verschiedenen Zell- und Gewebetypen besteht und 32 unterschiedliche Organe beinhaltet, die allesamt zum richtigen Zeitpunkt an der korrekten Position innerhalb des Körpers gebildet werden

müssen.

Für die Organisation des gesamten Körpers und die Bildung einzelner Organe eines Lebewesens ist also das Zusammenspiel vieler Gene und Proteine von entscheidender Bedeutung. Um die Funktionen einzelner Gene entschlüsseln zu können, werden verschiedene Tiermodelle verwendet. In der Entwicklungsbiologie gehören die Taufliege (*Drosophila melanogaster*), der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), der Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), der Zebrafisch (*Brachydanio rerio*), das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) und die Hausmaus (*Mus musculus*) zu den gängigsten tierischen Modellen. Welches Tier jeweils als Modell auserwählt wird, hängt von den Fragestellungen und den dazugehörigen Experimenten ab, die beantwortet bzw. durchgeführt werden sollen. Von diesen Tiermodellen stellt die Maus dasjenige dar, welches dem Menschen anatomisch und physiologisch am ehesten vergleichbar ist und evolutionär am nächsten steht. Aus diesem Grund werden viele Untersuchungen zu menschlichen Fehlbildungen und (angeborenen) Krankheiten mit Hilfe der Maus realisiert. Eine große Rolle bei der Analyse einer Genfunktion spielen Geninaktivierungen und Genüberexpressionen. Geninaktivierungen in der Maus werden hauptsächlich durch das sogenannte „gene targeting“ erzielt, eine Methode, die es ermöglicht, eine stabile Mutation in das Mausgenom zu integrieren. Durch die sogenannte „homologe Rekombination“ wird die Generierung eines „targeting“-Vektors ermöglicht, indem zwei DNA-Moleküle an einer bestimmten Stelle, an denen sich ihre Sequenz ähnelt, rekombiniert werden (Doetschman et al., 1988; Thomas et al., 1986). Dabei trägt der „targeting-Vektor“ einen positiven Selektionsmarker wie beispielsweise das Neomycin-Resistenzgen. Die Selektion selbst wird in embryonalen Stammzellen der Maus durchgeführt (Evans und Kaufman, 1981; Robertson et al., 1986), die anschließend in isolierte murine Blastozysten injiziert werden. Schließlich folgt das Einbringen der manipulierten Blastozysten in ein Mausweibchen, wodurch das inaktivierte Gen in die Keimbahn dieser Mäuse gelangen kann, so dass eine für diese Mutation stabile Mauslinie entsteht. Somit kann ein Gen gezielt mutiert und inaktiviert werden. Genüberexpressionen in Mäusen werden auf ähnliche Art und Weise erreicht. Da jedoch hierbei kein Gen mutiert werden muss, entfällt die Notwendigkeit homologer Rekombination und Selektion der erfolgreich mutierten Gene vor der Injektion. Aus diesem Grund kann der Vektor mit dem zu überexprimierenden Gen direkt in befruchtete Eizellen

injiziert werden. Ist das zu untersuchende Gen inaktiv oder überexprimiert, so kann man durch die Analyse des mutanten Phänotyps – je nachdem wie essentiell sich die Funktion des jeweiligen Gens für den Organismus darstellt – Rückschlüsse auf die Aufgaben ziehen, die das Gen innerhalb der Entwicklung eines Lebewesens übernimmt. Auf diese Art und Weise konnten bereits die Funktionen zahlreicher Gene näher charakterisiert und viele humane Krankheitsbilder in generierten Mausmutanten widergespiegelt werden (Gondo et al., 2009; Herman, 2002; Richardson und Burns, 2002).

1.2 Das Herz

1.2.1 Funktion und Aufbau des Herzens

Das Herz (griech.: καρδια = kardia) ist bei Säugetieren, Vögeln, Amphibien und Fischen das erste Organ, das in ihrer Embryonalentwicklung angelegt wird. Es hat eine essentielle Bedeutung für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung später gebildeter Organe und erfüllt diese Aufgabe, indem es als muskuläres Hohlorgan den Blutstrom mit Hilfe wechselnder Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole) in den Gefäßen und somit auch Organen in Bewegung hält. Dabei arbeitet das Herz wie eine Pumpe, denn es zieht das Blut ventilgesteuert aus den Hohl- und Lungenvenen an und gibt es via Ausflusstrakt über den Truncus pulmonalis bzw. die Aorta wieder in den Kreislauf ab. Aufgrund dieser Funktion setzt sich das Herz in Säugetieren und Vögeln aus zwei Teilen zusammen. Die rechte Herzhälfte befördert das Blut in den Lungenkreislauf („kleiner Kreislauf“), während die linke Hälfte den Blutstrom im Körperkreislauf („großer Kreislauf“) antreibt. Beide Herzteile bestehen jeweils aus einem Vorhof (Atrium) und einer Kammer (Ventrikel), die durch Herzscheidewände (Septen) voneinander getrennt werden (Abbildung 1.1 A). Die Atrien werden durch das Septum interatriale oder kurz das „atriale Septum“ getrennt, währenddessen das Septum interventriculare, auch „ventrikuläres Septum“ genannt, die Ventrikel der beiden Herzhälften voneinander trennt. Da der Körperkreislauf einen fünfmal größeren Gesamtgefäßwiderstand aufweist als der Lungenkreislauf, muss die linke Herzhälfte eine vielfach größere Leistung vollbringen als die rechte. Daher ist die Wanddicke des linken Ventrikels etwa dreimal stärker als die des rechten

Ventrikels. Die Wände des Herzens bestehen aus drei Schichten – der Herzinnenwand (Endokard), der Mittelschicht bzw. Herzmuskelschicht (Myokard) und der Herzaußenhaut (Epikard). Das Endokard ist ein dünnes, glattes Epithel und kleidet den Innenraum der Atrien und Ventrikel aus. Diese Gewebeschicht stellt durch ihre Ebenheit sicher, dass der Blutfluß nahezu ohne Reibungswiderstand durch das Herz gelangt, wodurch die Bildung eines Gerinnsels (Thrombus) durch Anlagerung von Blutplättchen verhindert werden soll. Die dickste der drei Herzwandschichten stellt das Myokard dar, da es für die eigentliche Pumpleistung des Organs verantwortlich ist. Man findet Myokard sowohl in den Wänden der Atrien wie auch der Ventrikel, wobei sich die Dicke der Myokardschicht abhängig von der aufzubringenden Arbeitskraft unterscheidet. Daher weist der linke Ventrikel die dickste Schicht auf. Das Epikard ist ähnlich dünn wie das Endokard und liegt dem Myokard unmittelbar auf. Die Tatsache, dass das Epikard gleichzeitig das innere Blatt des Herzbeutels ist, führt dazu, dass es das Herz gleitfähig gegenüber seiner Umgebung macht, so dass die Pumpfunktion durch den Kontakt zum Herzbeutel nicht negativ beeinträchtigt wird.

Dass das Blut nur in eine Richtung fließen kann, wird durch die sogenannten „Herzklappen“ gesichert, die keine muskulären Gewebeanteile besitzen, sondern komplett aus Endokard bestehen. Diese befinden sich zwischen den Atrien und Ventrikeln sowie zwischen den Ventrikeln und den sich anschließenden Gefäßen. Sie arbeiten wie Rückschlagventile, denn sie sperren den Durchgang des Blutes in einer Strömungsrichtung selbsttätig. Jede Herzhälfte beinhaltet eine Segelklappe (Atrioventrikularklappe) und eine Taschenklappe (Semilunarklappe). Zwischen Atrien und Ventrikeln liegen die Segelklappen, wobei die der linken Herzhälfte Mitralklappe und die der rechten Hälfte Trikuspidalklappe genannt werden (Abbildung 1.1 A). Die Taschenklappen hingegen befinden sich zwischen den Ventrikeln und dem jeweiligen Ausstromgefäß. Im linken Herzteil heißt die Taschenklappe Aortenklappe, in der rechten Herzhälfte Pulmonalklappe. Das Septen- und Klappensystem ermöglicht ein synchronisiertes Pumpen des Blutflusses durch die verschiedenen Herzkammern.

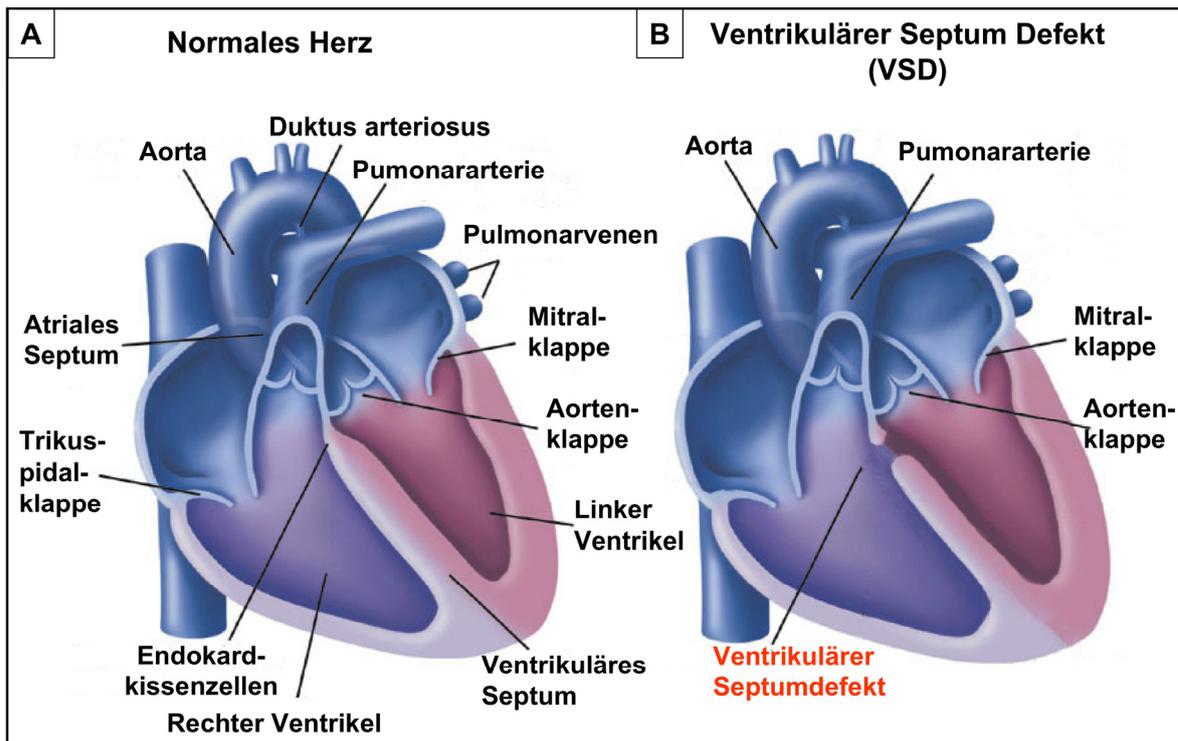


Abbildung 1.1: Aufbau eines Säugetierherzens und Darstellung eines ventrikulären Septumdefekts.

(A) Schematische Illustration eines Herzquerschnitts und (B) eines ventrikulären Septumdefekts (perimembranöser Typ). Modifiziert nach B.G. Bruneau (Bruneau, 2008).

1.2.2 Herzentwicklung

In Säugetieren und Vögeln kann die Entwicklung des Herzens in verschiedene Schritte unterteilt werden: 1) die Bildung der primitiven Herzhöhre, 2) die Drehung der Herzhöhre, 3) die Entstehung und Septierung der Herzkammern und 4) die Genese der Herzklappen (Pexieder, 1975; Vuillemin und Pexieder, 1989a; Vuillemin und Pexieder, 1989b).

1) Die Bildung der primitiven Herzhöhre

Die Formation des Herzens beginnt mit der Bildung des kardiogenen Mesoderms während der Gastrulation (Colas et al., 2000; Redkar et al., 2001). Aus diesen Mesodermzellen entstehen die atriale und ventrikuläre Muskulatur, die endokardialen Kissenzellen, die Purkinje-Fasern und die endotheliale Säumung des Herzens (Mikawa, 1999). Untersuchungen an Vogelembryonen ergaben, dass das kardiogene Mesoderm zunächst in zwei Gruppen vorliegt, die sich links und rechts auf Höhe des menschlichen Knotens befinden. Diese kardialen

Vorläuferzellen migrieren anterior zwischen das Ektoderm und Endoderm zur Mitte des Embryos hin (Linask und Lash, 1986), bis sie die lateralen Wände der anterioren Darmröhre erreichen. Dort stoppt die Zellwanderung und es kommt zur Kondensation der mesodermalen Zellen, wodurch sich zwei primitive, dünnwandige Herzschläuche formieren. Durch die Bildung des embryonalen Darmrohrs werden beide Herzschläuche zusammengeführt und verschmelzen in der Maus an E8.0 zu einer primitiven Herzröhre, die aus einem Innensaum endokardialer Zellen und einer Außenschicht myokardialer Zellen besteht (Srivastava, 2006). Beide Schichten sind durch eine vom Myokard gebildete, extrazelluläre Matrix, die Herzgallerte, voneinander getrennt. Bereits zu diesem Zeitpunkt führt die Herzröhre peristaltische Kontraktionen aus, wodurch das Blut vom Einflußpol (venöses bzw. posteriores Ende) zum Ausflußpol (arterielles bzw. anteriores Ende) gepumpt wird (Kirby, 2006).

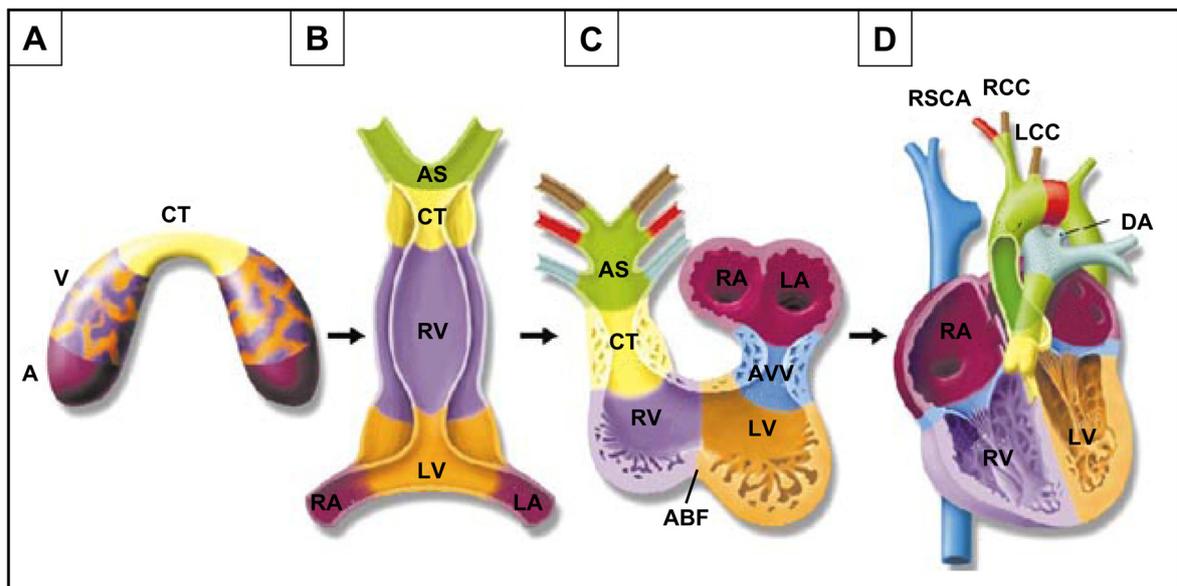


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der kardialen Morphogenese.

(A-D) Die Abbildung zeigt die Entwicklung des Herzens von einem einkanäligen zu einem vierkammrigen Organ. Die Farbkodierung bezieht sich jeweils auf morphologisch verwandte Bereiche. (A) Das zunächst halbmondförmige Herz ist spezifiziert zur Bildung aller Segmente der linearen Herzröhre (B), die entlang der anterior-posterioren Achse gemustert ist, um die verschiedenen Regionen und Kammern des gedrehten (C) und ausgereiften Herzens (D) entstehen zu lassen. A, Atrium; ABF, anteriore bulboventrikuläre Furche; AVV, atrioventrikuläre Klappe; CT, Konotrunkus; DA, Duktus arteriosus; LA, linkes Atrium; LCC, linke Karotidarterie; LV, linker Ventrikel; PA, Pulmonararterie; RA, rechtes Atrium; RCC, rechte Karotidarterie; RSCA, rechte Arterie unter dem Schlüsselbein; RV, rechter Ventrikel; V, Ventrikel. Modifiziert nach D. Srivastava und E.N. Olson (Srivastava und Olson, 2000).

2) Die Drehung der Herzröhre

Mit der sich anschließenden Drehung des Herzens beginnt die Umgestaltung des einkanäligen, peristaltischen Organs in eine vierkammrige, synchron kontrahierende Zweikanal-Pumpe (Abbildung 1.2 B, C, D). Ursprünglich wurde vermutet, dass die Herzdrehung aufgrund räumlicher Limitierung geschieht (Pensky, 1982). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sich auch ein vom Körper isoliertes Herz in gleicher Art und Weise dreht (Kirby und Waldo, 1990; Van Mierop, 1979) und es wird postuliert, dass die Herzdrehung Teil des myokardialen genetischen Programms ist (Van Mierop, 1979). Die Drehung ist der erste Prozess, der die Links-Rechts Asymmetrie eines embryonalen Organs verdeutlicht (Moorman et al., 2003), und resultiert in der vierkammrigen Anordnung des Herzens, die die Voraussetzung für die darauffolgende Septierung liefert. Dabei dreht sich das venöse Ende der Herzröhre zunächst in ventrale und caudale Richtung, um danach eine rechtswärtige, S-förmige Bewegung zu vollziehen. Das Produkt ist eine U-förmige Herzröhre, deren rechter Arm als Bulbus cordis und deren linker Arm als primitiver Ventrikel beschrieben wird. Das weitere Fortschreiten der Herzdrehung führt dazu, dass die paarigen Atrien zu einer Einheit verschmelzen, die eine dorsalere und kranialere Position als zuvor die paarigen Atrien einnimmt (Abbildung 1.2 C, D). In diesem Zuge entsteht der sogenannte „atrioventrikuläre Kanal“ (Abbildung 1.3 B), der die linke Seite der atrialen Einheit mit dem primitiven Ventrikel verbindet. Das primitive Ventrikel gestaltet sich schließlich zum linken Ventrikel aus und der proximale Teil des Bulbus cordis wird zum rechten Ventrikel (Abbildung 1.2 C, D). Der distale Teil des Bulbus cordis hingegen bildet letztlich den Ausflusstrakt beider Kammern.

3) Die Entstehung und Septierung der Herzkammern

Sowohl die Ventrikel als auch die Atrien expandieren durch einen als „ballooning“ (engl. für Anschwellen) bezeichneten Prozess, bei dem die Proliferation der ventrikulären und atrialen Zellen im Vordergrund steht (Christoffels et al., 2000). Nach dem Anschwellen vergrößern sich die Ventrikel noch weiter, da sie der wachsenden hämodynamischen Kraft der Blutzirkulation ausgesetzt sind (Risebro und Riley, 2006). Gleichzeitig bildet die myokardiale Schicht ein bälkchenartiges Netzwerk von Herzmuskelfasersträngen im Inneren der Ventrikel und Atrien aus, die sogenannten Trabekel (lat. trabecula = kleiner Balken). Die Trabekulierung des

proximalen Bereichs des Bulbus cordis ist entscheidend für die Bildung des rechten Ventrikels (Moorman und Christoffels, 2003). Das Trabekelnetzwerk liefert eine große Oberfläche, die in Kontakt mit dem durch das Herz strömende Blut steht und somit die anwachsende ventrikuläre Masse metabolisch versorgt, noch bevor das koronare vaskuläre System gebildet wird. Desweiteren tragen Trabekel zum Aufbringen der kontraktilen Kraft bei, um den größer werdenden hämodynamischen Stress, der durch die rasche Entwicklung der peripheren Blutgefäße auf das Herz ausgeübt wird, kompensieren zu können (Risebro und Riley, 2006). Obwohl das Myokard des rechten Ventrikels erst zum Zeitpunkt der Herzdrehung entsteht und der linke Ventrikel zu diesem Zeitpunkt schon anschwillt, verlaufen Wachstum und Trabekulierung des linken und rechten Ventrikels größtenteils gleichzeitig (Moon, 2008). Das Wachstum der atrialen Einheit der primären Herzhöhle beginnt an E9.0 mit Bildung der Trabekel, wobei der Einbau atrialen Myokards nach und nach in verschiedenen Entwicklungsphasen vom atrioventrikulären Kanal aus erfolgt (Franco et al., 2000; Kirby, 2006).

Weiterhin kommt es bei der Drehung des Herzens zu einer Akkumulation der Herzgallerte im atrioventrikulären Kanal (Wessels und Sedmera, 2003), wodurch das sogenannte „endokardiale Kissengewebe“ entsteht (Abbildung 1.3 A, B). Diese Endokardkissen verhindern einen retrograden Blutfluß während der peristaltischen Kontraktion der Herzhöhle (Moon, 2008). An E8.5 empfangen die, an die Endokardkissen angrenzenden, endokardial-epithelialen Zellen Signale vom darüberliegenden Myokard und werden dadurch zum Proliferieren und Transformieren veranlasst. Dabei bekommen diese Zellen einen mesenchymalen Charakter, was als epitheliale-mesenchymale Transformation (EMT) bezeichnet wird. Sie migrieren währenddessen in das Kissengewebe, wo sie ihre Differenzierung zu mesenchymalen Zellen finalisieren (Armstrong und Bischoff, 2004; Gitler et al., 2003; Person et al., 2005). Die beiden so entstandenen Endokardkissenpopulationen des atrioventrikulären Kanals wachsen fortschreiten aufeinander zu, bis es zur Fusion kommt, wodurch der atrioventrikulären Kanal in eine rechte und eine linke Komponente unterteilt wird (Anderson et al., 2003; Zhao und Rivkees, 2000). Nach dieser Fusion erstrecken sich die atrioventrikulären Kissen von der posterioren Wand des atrioventrikulären Kanals bis zur anterioren Wand des Herzens (Wessels et al., 2000).

Nachdem die Herzdrehung vollzogen wurde, ist die räumliche Anordnung des Herzens bereits soweit fortgeschritten, dass die vierkammerige Konformation nebst vaskulären Verbindungen besteht. Um jedoch den Blutfluß durch zwei getrennte Kanäle – den Lungenkreislauf und den Körperkreislauf – pumpen zu können, bedarf das Herz einer Trennung der Kammern in eine linke und eine rechte Herzhälfte. Dieser Vorgang wird als Septierung bezeichnet.

Die Septierung der Atrien beginnt mit der Ausbildung des primären (inter-) atrialen Septums (Abbildung 1.3 A). Dieses erscheint anfangs als sichelförmige, muskuläre Struktur im sogenannten „atrialen Dach“, dem dorsalsten Teil der atrialen Einheit. Während des anschließenden Einwachsens in das atriale Lumen trägt das primäre atriale Septum eine mesenchymale „Kappe“ an seinem auf die endokardialen Kissen zuwandernden Rand. Der Raum zwischen der mesenchymalen Kappe und den Endokardkissen wird primäres atriales Foramen (Ostium primum) genannt. Schließlich fusioniert die mesenchymale „Kappe“ des primären atrialen Septums mit den atrioventrikulären endokardialen Kissenzellen, was dazu führt, dass das primäre atriale Foramen geschlossen und die Basis der feinfaserigen, septalen Strukturen des Herzens, wie z.B. der Taschen- und Segelklappen, geschaffen wird (Anderson et al., 2002). Noch vor dem Schließen des primären atrialen Foramens bricht das primäre atriale Septum nahe seines Entstehungsortes auf, wodurch das sekundäre atriale Foramen (Ostium secundum) entsteht (Abbildung 1.3 C). Dies bewirkt einen sauerstoffreichen Blutfluß vom rechten ins linke Atrium auch nach dem Schließen des primären atrialen Septums (Moon, 2008). Die Generierung des sekundären atrialen Foramens beruht wahrscheinlich auf Apoptose der primären atrialen Septumzellen in dieser Region (Sadler, 2004). Im Anschluss bildet sich noch ein weiteres atrienunterteilendes Septum – das sekundäre atriale Septum. Dieses formt sich rechtsseitig des primären atrialen Septums und zeigt ebenfalls eine Öffnung, das sogenannte „Foramen ovale“. Somit strömt der sauerstoffreiche, venöse Blutfluß kurz vor der Geburt vom rechten Atrium durch das Foramen ovale und das Ostium secundum in das linke Atrium und von dort weiter durch den linken Ventrikel in den Körperkreislauf. Die zwei atrialen Septen bilden eine Klappe, die funktionell schließt, wenn der linksatriale Druck den rechtsatrialen Druck nach der Geburt übertrifft, so dass das Blut nicht mehr direkt vom rechten Atrium ins linke gelangen kann, sondern zunächst durch den rechten Ventrikel und die Lunge gepumpt wird

und danach erst ins linke Atrium fließt.

Über den entwicklungsbiologischen Ursprung und die Bildung des (inter-)ventrikulären Septums wird seit den 1960iger Jahren kontrovers diskutiert. Es bestand zwar die einheitliche Meinung, dass das ventrikuläre Septum als uniforme Struktur auswächst, aber der Ursprungsort war umstritten. Während Waterston postulierte, dass die Anlage des ventrikulären Septums die anteriore bulboventrikuläre Furche sei (Waterston, 1918), identifizierte Frazer die atrioventrikulären endokardialen Kissenzellen als Entstehungsort des ventrikulären Septums (Frazer, 1940). Analysen angeborener Herzfehler führten zu der Erkenntnis, dass das ventrikuläre Septum nicht nur aus einer Komponente besteht (Goor et al., 1970a; Wenink, 1978; Wenink et al., 1979), sondern aus mehreren verschiedenen Strukturen aufgebaut ist (Goor et al., 1970b). Es existiert ein muskulärer Teil des ventrikulären Septums, der aus der anterioren bulboventrikulären Furche auswächst, sowie ein membranöser Part, dessen Ausgangspunkt die atrioventrikulären endokardialen Kissenzellen darstellen (Eisenberg und Markwald, 1995). Der muskuläre Bestandteil des ventrikulären Septums beinhaltet bereits zwei unterschiedliche Segmente – das primäre Septum und das Einlass-Septum („inlet“-Septum). Die Bildung des primären Septums beruht auf der Proliferation der Zellen in den ventrikulären Wänden und geht somit mit dem Wachstum der beiden Ventrikel einher (Franco et al., 2006; Steding und Seidl, 1980). Die Formation des primären Septums initiiert die Entwicklung des muskulären ventrikulären Septums. Während das primäre Septum bereits wächst, beginnt wenig später die Entstehung des Einlass-Septums (Lamers und Moorman, 2002). Das Einlass-Septum ist ein Produkt der Fusion der Trabekel in der Einlass-Region der Ventrikel (Ben-Shachar et al., 1985; Contreras-Ramos et al., 2008). Da diese Trabekel auch von den Myokardzellen der ventrikulären Wände abstammen (Goor und Lillehei, 1975; Hochstetter, 1906; Patten, 1951), spielt die Proliferation der ventrikulären Wandzellen auch für die Generierung des Einlass-Septums eine entscheidende Rolle. Nach dem Auswachsen beider Komponenten fusionieren sie und bilden somit den Hauptteil des muskulären ventrikulären Septums (Anderson et al., 1976; Wenink, 1981; Wenink und Gittenberger-de Groot, 1982). Ist das muskuläre ventrikuläre Septum ausgewachsen, so kommt es zu einer Interaktion dieses Septumparts mit den atrioventrikulären endokardialen Kissen (Meredith et al., 1979). Die Art und Weise der Interaktion ist allerdings bis heute ungeklärt

(Sakata et al., 2002). Bekannt hingegen ist, dass aufgrund dieser Interaktion die Formierung des membranösen ventrikulären Septums durch die endokardialen Kissenzellen erfolgt (Eisenberg und Markwald, 1995; Meredith et al., 1979). Das membranöse ventrikuläre Septum wächst dann von den Endokardkissen auf das muskuläre ventrikuläre Septum zu, beide verschmelzen und schließen somit die Entwicklung des ventrikulären Septums ab (Meredith et al., 1979).

4) Die Entwicklung der Herzklappen

Wie schon bei der Generierung des membranösen Anteils des ventrikulären Septums sind die endokardialen Kissenzellen auch bei der Formation der Herzklappen von entscheidender Bedeutung. Die atrioventrikulären Klappen stammen gänzlich vom endokardialen Kissengewebe ab, während die Aorten- und Pulmonar-Semilunarklappen auch Zellen beinhalten, die aus der Neuralleiste bzw. dem sekundären Herzfeld hervorgegangen sind (Moon, 2008). Welche molekularen und zellulären Prozesse der Herzklappenentwicklung aus den Endokardkissen zugrunde liegen, ist bislang noch ungenügend verstanden (Armstrong und Bischoff, 2004; Schroeder et al., 2003). Bekannt ist allerdings, dass die Entstehung der atrioventrikulären Klappen bereits mit der Fusion der Endokardkissengewebe im atrioventrikulären Kanal beginnt.

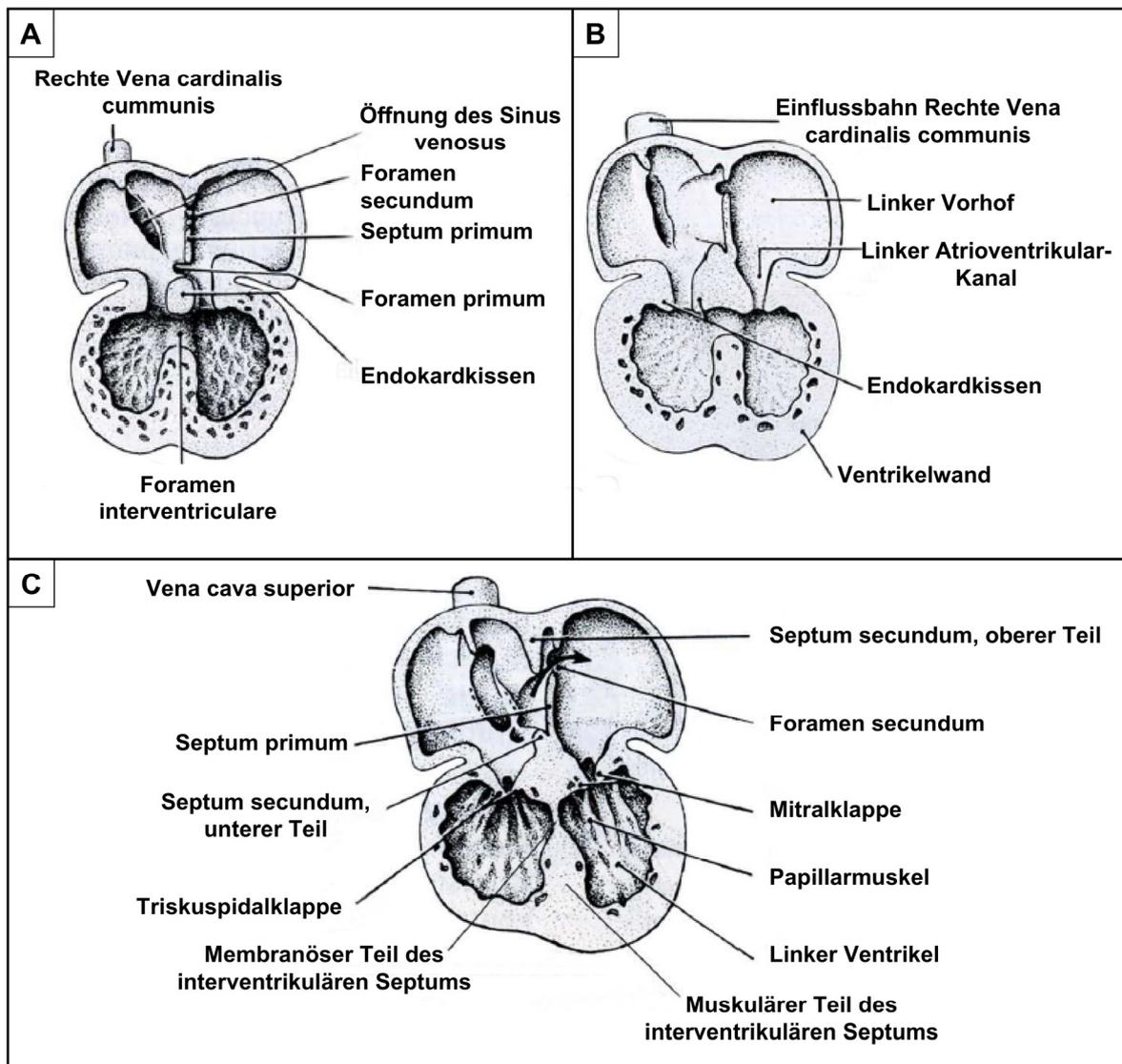


Abbildung 1.3: Die Entwicklung der kardialen Septen.

(A-C) Schematische Darstellungen eines Querschnitts embryonaler Herzen. (A) In den Atrien wird zunächst ein primäres Septum, ausgehend vom dorsalsten Teil der Atrien, gebildet. Der Raum zwischen der Spitze dieses Septums und den atrioventrikulären Endokardkissen wird Foramen primum genannt. In den Ventrikeln wächst zu dieser Zeit das muskuläre Septum aufgrund von Zellproliferation in den ventrikulären Wänden aus. (B) Das primäre atriale Septum fusioniert mit den Endokardkissen, während das muskuläre ventrikuläre Septum auf die Endokardkissen zuwächst. (C) Schließlich besteht das atriale Septum aus dem Septum primum und dem Septum secundum und das ventrikuläre Septum aus einem muskulären und einem membranösen Teil. Modifiziert nach K.L. Moore und T.V.N. Persaud (Moore und Persaud, 1996).

1.2.3 Der ventrikuläre Septumdefekt

Beim Menschen leiden 1 % aller Neugeborenen an einer angeborenen Herzkrankheit (Hoffman und Kaplan, 2002). Auch wenn diese kardialen

Erkrankungen nicht immer tödlich verlaufen, so leiden Betroffene häufig ihr Leben lang (Srivastava, 2004) und sterben nicht selten an den Spätfolgen solcher Herzleiden. Untersuchungen ergaben, dass kardiale Erkrankungen in den USA die Haupttodesursache im Erwachsenenalter darstellen (Thom et al., 2006). Ventrikuläre Septumdefekte (VSD) sind die am häufigsten vorkommenden angeborenen Herzfehler beim Menschen (Lloyd-Jones et al., 2009), wobei der perimembranöse VSD den vorwiegend auftretenden VSD-Subtyp darstellt. Er tritt in 75% aller VSD-Patienten zutage (Apitz et al., 2010) und ist durch eine Entwicklungsstörung des muskulären Anteils sowie den Verlust des membranösen Anteils des ventrikulären Septums (VS) gekennzeichnet (Abbildung 1.1 B). Das membranöse VS wird von den endokardialen Kissen gebildet (Komatsu et al., 2007; Lamers und Moorman, 2002), wobei die Initiierung seiner Entwicklung vermutlich auf eine molekulare Interaktion zwischen den Endokardkissen und dem muskulären Anteil des VS zurückgeführt wird (Kaufman, 1994; Meredith et al., 1979). Wie dies geschieht, ist noch unbekannt. Ebenfalls weitestgehend unbekannt ist der molekulare Hintergrund der Entwicklung des muskulären VS (Franco et al., 2006; Sakata et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass die Bildung des muskulären VS auf der Proliferation von Zellen in bestimmten Regionen des linken sowie rechten Ventrikels beruht (Goor et al., 1970a; Rychter et al., 1979; Steding und Seidl, 1980; Van Mierop und Kutsche, 1985), so dass das muskuläre VS aus einer Zusammensetzung von Kardiomyozyten besteht, die links- und rechtsventrikuläre Identitäten besitzen (Franco et al., 2006).

Die Auswirkungen eines VSD können für den gesamten Blutkreislauf beträchtlich sein. Dabei spielt weniger der VSD-Subtyp als vielmehr die Größe des fehlenden VS-Gewebes eine Rolle. Je nach Größe des fehlenden Teilstücks kommt es zu einer Änderung der Hämodynamik, wobei durch den VSD ein sogenannter „Links-Rechts-Shunt“ entsteht. Dabei fließt oxygeniertes Blut aus dem linken in den rechten Ventrikel, wodurch sauerstoffreiches und sauerstoffarmes Blut im rechten Ventrikel miteinander vermischt werden. Von dort aus gelangt das Mischblut in die Pulmonararterie, so dass der Blutfluß zu den Lungen und anschließend in den linken Ventrikel erhöht wird. Dies führt zu Pulmonarödemen und bewirkt eine Vergrößerung des Volumens des linken Ventrikels und somit eine Dilatation und Hypertrophy des linken Ventrikels (Ferreira et al., 2009; Selicorni et al., 2009; Stewart et al., 1995). Weiterhin wird der Blutfluß aus dem Herzen hin zu anderen

Organen des Körpers aufgrund des Links-Rechts-Shunts reduziert, so dass deren Versorgung nicht mehr in vollem Maße gewährleistet ist.

Um die Entstehung des VS zu analysieren, die Ursachen für das Auftreten eines VSD zu verstehen und somit die Möglichkeit zu schaffen, VSD bereits pränatal therapieren zu können, bedient man sich Modellorganismen wie z.B. der Maus (*Mus musculus*), die dem Menschen – evolutionär gesehen – recht nahe stehen. Mausembryonen, in welchen das Gen *Fantom* inaktiviert ist, zeigen einen VSD (Vierkotten, 2006) und eignen sich daher zur Untersuchung dieser angeborenen Fehlbildung.

1.3 Die *Ftm*-Mausmutante

Fantom (*Ftm*; *Rpgrip1l*) wurde erstmals 2002 als eines von sechs Genen beschrieben, die in der sogenannten *Ft* („*Fused toes*“)-Mausmutante deletiert sind (Peters et al., 2002). Es handelt sich um ein evolutionär hochkonserviertes Gen (Vierkotten et al., 2007), welches in der Maus für ein Protein mit einer Länge von 1264 Aminosäuren und im Menschen für ein Protein aus 1315 Aminosäuren kodiert (Arts et al., 2007; Delous et al., 2007; Vierkotten et al., 2007). Murines *Ftm* enthält verschiedene Protein-Protein-Interaktionsdomänen (Vierkotten, 2006; Vierkotten et al., 2007): Drei „coiled-coil“-Domänen, die möglicherweise in Homopolymer-Bildung involviert sind (Zhao et al., 2003), eine C2-Domäne, die putativ eine Bindung an Intermediärfilamente ermöglicht (Gallicano et al., 1998) und eine sogenannte RID-Domäne, die im *Ftm*-verwandten Protein RPGRIP1 (retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1) charakterisiert wurde (Boylan und Wright, 2000; Hong et al., 2001). Mutationen des *FTM*-Gens führen zu schweren, angeborenen, humanen Krankheiten wie dem Joubert Syndrom, dem Meckel-Gruber Syndrom, und Nephronophthise (Arts et al., 2007; Delous et al., 2007; Wolf et al., 2007).

In Mensch und Maus weist *Ftm* eine Lokalisation am Zentrosom auf, ein Zellorganell, das an der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts beteiligt ist und somit auch eine wichtige Rolle in Zellteilungsprozessen spielt (Boveri, 1888). Zusätzlich ist *Ftm* auch am proximalsten Teil von Zilien, dem sogenannten Basalkörper, aufzufinden (Vierkotten et al., 2007). In *Ftm*-defizienten Mausembryonen wurde eine Störung des Shh-Signalwegs nachgewiesen

(Vierkotten et al., 2007), ein Signalweg, der über Zilien vermittelt wird (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007). Somit liegt bei *Ftm*-Verlust in Mausembryonen eine Ziliopathie vor. Betroffene Mäuse zeigen einen pleiotropen, mutanten Phänotyp mit Defekten in der Links-Rechts-Asymmetrie, kraniofazialen Defekten, Lungendefekten, Leberdefekten, Nierenzysten, Exenzephalie, Mißbildungen der dorsomedialen und telenzephalischen Strukturen, Verlust des Corpus callosum, Verlust der Rathke-Tasche (Vorläuferstruktur der Hypophyse), Mikrophtalmie bzw. Verlust der Augen, einer Polydaktylie der Vorder- und Hintergliedmaßen sowie kardialen Defekten, insbesondere ventrikulären Septumdefekten (Delous et al., 2007; Gerhardt, 2006; Vierkotten, 2006; Vierkotten et al., 2007). Dieser mutante Phänotyp zeigt eine hohe Varianz in der Ausprägung der Fehlbildungen, so dass nicht jeder *Ftm*-defiziente Embryo sämtliche mutanten Merkmale aufweist. *Ftm*-homozygot mutante Mausembryonen sterben spätestens direkt nach der Geburt.

1.4 Die Zilie

1.4.1 Entdeckung und Aufbau der Zilie

Im Jahre 1835 publizierten Jan Evangelista Purkinje und Gabriel Gustav Valentin, dass Flimmerbewegungen im Tierreich eine allgemeine Erscheinung sind und durch Flimmerhärchen, heute besser bekannt als Zilien, verursacht werden (Purkinje und Valentin, 1835). Zilien findet man im gesamten Tierreich, unabhängig vom phylogenetischen Entwicklungsgrad und der Komplexität der Organismen. Seit Björn Arvid Afzelius einen Ziliendefekt als Ursache einer menschlichen Erbkrankheit identifizierte (Afzelius, 1976), wurde der Medizin die Bedeutung von Zilien auch für den menschlichen Organismus langsam bewusst. Heute weiß man, dass Zilien eine zentrale Rolle im gesamten Leben eines Organismus einnehmen. Bereits in der Embryonalentwicklung sind sie für die Positionierung und Bildung der Organe essentiell und in adulten Lebewesen ermöglichen Zilien beispielsweise das Sehen, Hören, Riechen, Schmecken, Atmen etc. Diese lebenswichtige Bedeutungspalette rückte die Zilie in den letzten Jahren immer stärker in den Fokus der Forschung.

Zilien sind Zytoplasmafortsätze eukaryotischer Zellen, die eine Länge von 5-10 µm und einen Durchmesser von ca. 250 nm erreichen. Dabei hängt die Länge einer

Zilie nicht zuletzt von dem Organ ab, in dem sie sich befindet. Man findet Zilien auf den meisten Zelltypen von Vertebraten (Singla und Reiter, 2006). Allerdings geschieht dies nur, wenn die jeweilige Zelle ihren regulären Zellzyklus, bestehend aus M-, G₁-, S- und G₂-Phase, verlassen hat und sich in einem sogenannten „Zellzyklusarrest“, auch G₀-Phase genannt, befindet. Bei der Bildung einer Zilie spielen die beiden Zentriolen, Mutter- und Tochterzentriole, eine zentrale Rolle. Während das Axonem der Zilie generiert und degradiert werden kann, bleiben die Zentriolen stets bestehen, d.h. sie sind während des gesamten Zellzyklus in der Zelle präsent. Dies ist für die Zelle eine Notwendigkeit, da die Zentriolen im Verlaufe der Mitose die Spindelpole darstellen und unabdingbar für die Chromosomenaggregation sind (Nigg und Raff, 2009). Die distale der beiden Zentriolen (Mutterzentriole) stellt dabei die Basis für die Entstehung einer Zilie (Ziliogenese) dar (Abbildung 1.4). Die Ziliogenese kann in vier verschiedene Stadien unterteilt werden (Pedersen et al., 2008; Sorokin, 1962). Zunächst bildet der Golgi-Apparat ein sogenanntes zentrioläres Vesikel aus, das sich an das distale Ende der Mutterzentriole anlagert. Während der Migration der Zentriolen in Richtung der Plasmamembran der Zelle beginnt das Auswachsen des Axonems, indem immer weitere Vesikel mit der späteren Zilienmembran verschmelzen. Schließlich erreicht das Membran-umschlossene Axonem die Zelloberfläche und die ziliäre Membran fusioniert mit der Plasmamembran der Zelle. Nun ist die Mutterzentriole, die zu diesem Zeitpunkt als Basalkörper bezeichnet wird, so angeordnet, dass sich das Zilium voll ausbilden kann.

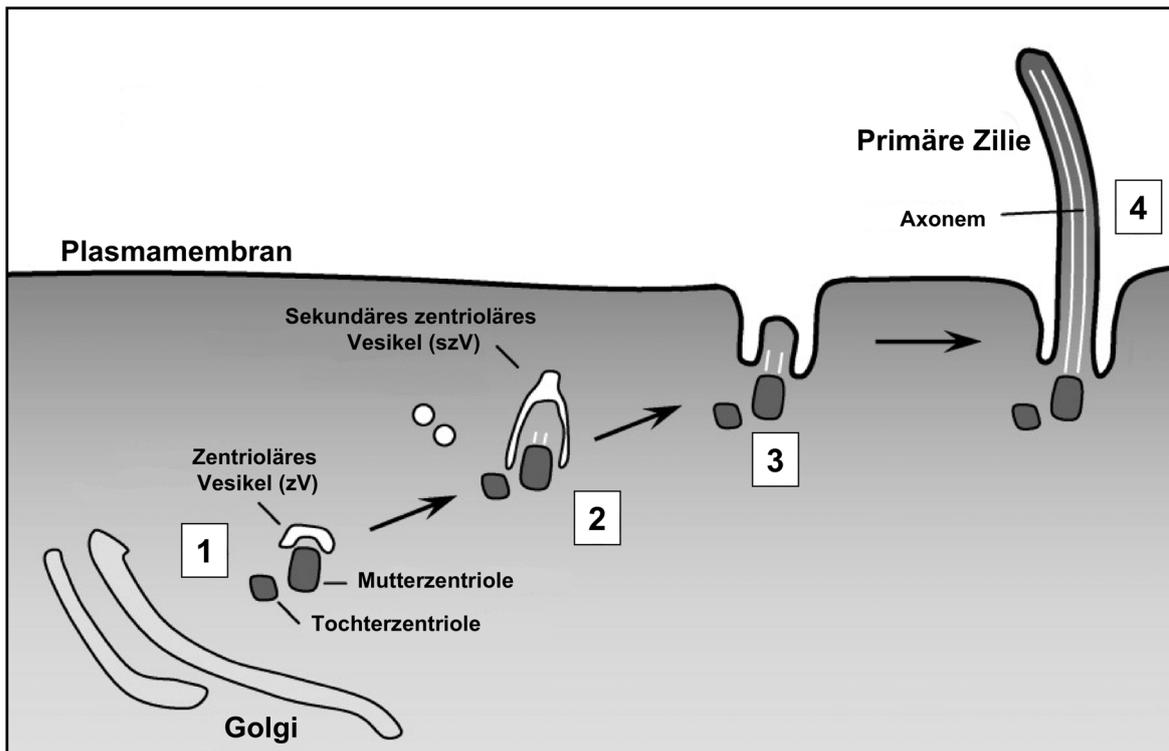


Abbildung 1.4: Die vier Stadien der Ziliogenese.

Stadium 1: Der Golgi-Apparat formt ein zentrioläres Vesikel, welches sich an das distale Ende der Mutterzentriole anlagert. Stadium 2: Die Zentriolen wandern in Richtung Plasmamembran der Zelle und die Bildung des Axonems beginnt (umschlossen vom nun sekundären zentriolären Vesikel). Stadium 3: Das sekundäre zentrioläre Vesikel fusioniert mit der Plasmamembran der Zelle. Stadium 4: Die Zilie bildet sich aus. Modifiziert nach L. Pedersen et al. (Pedersen et al., 2008).

Der Basalkörper besteht aus neun im Kreis angeordneten Mikrotubuli-Tripletts (Abbildung 1.5) und von jedem dieser Mikrotubuli-Tripletts führen sogenannte Transitionsfibrillen („transitional fibres“) zur Apikalmembran. Dort, wo diese Fasern mit der Apikalmembran verankert sind, befindet sich die Grenze zwischen der Plasmamembran der Zelle und der ziliären Membran, wodurch Zytosol und Zilie in zwei unterschiedliche Kompartimente separiert werden. Funktionell dient dieser Bereich, der auch als „Terminale Platte“ bezeichnet wird, als „molekulares Sieb“, das sich aus den Transitionsfibrillen und an diesen angelagerten Proteinen zusammensetzt. Dieser „Flagellar-Poren-Komplex“ stellt sicher, dass nur Proteine passieren, die in die Zilie gelangen sollen (Deane et al., 2001; Gilula und Satir, 1972). Per freier Diffusion können diesen ziliären Porenkomplex ausschließlich Proteine mit einem Molekulargewicht von <10 kDa überwinden (Jensen et al., 2004). Um in die Zilie zu gelangen, werden Proteine, die ≥ 10 kDa sind, an spezielle Transportproteine gebunden (Rosenbaum und Witman, 2002). Dieser

Grenzbereich zwischen Zytosol und Zilie wird auch Transitionszone (= Übergangszone) genannt (Dute und Kung, 1978), da hier der Übergang der zentriolären Triplett-Mikrotubuli-Struktur zur ziliären Duplett-Mikrotubuli-Konformation zu erkennen ist (Abbildung 1.5 A). Das Mikrotubuli-Gerüst der Zilie, das sogenannte Axonem, weist daher einen Ring aus neun Duplett-Mikrotubuli auf, der oftmals noch ein zentrales Mikrotubuli-Paar umschließt. Die Mikrotubuli-Dupletts bestehen aus einem A- und einem B-Mikrotubulus; bei Mikrotubuli-Tripletts wird noch ein C-Mikrotubulus angelagert. Ein Mikrotubulus setzt sich aus 13 Protofilamenten zusammen, die wiederum aus dimeren Tubulinuntereinheiten von acetylierten α - und β -Tubulinmonomeren aufgebaut sind (Nogales et al., 1998; Song und Mandelkow, 1993). Da das zentrale Mikrotubuli-Paar nicht in jeder Zilie existiert, unterscheidet man zwei verschiedene Mikrotubuli-Konformationen, die das Axonem der Zilie darstellen (Abbildung 1.5 B). Die „9+2“-Konformation mit zentralem Mikrotubuli-Paar und Dyneinarmen zwischen den neun äußeren, radiärsymmetrischen Duplett-Mikrotubuli findet man in der Regel in motilen Zilien vor, während die „9+0“-Konformation ohne zentrales Mikrotubuli-Paar hauptsächlich in immotilen Zilien auftritt (De Robertis, 1956).

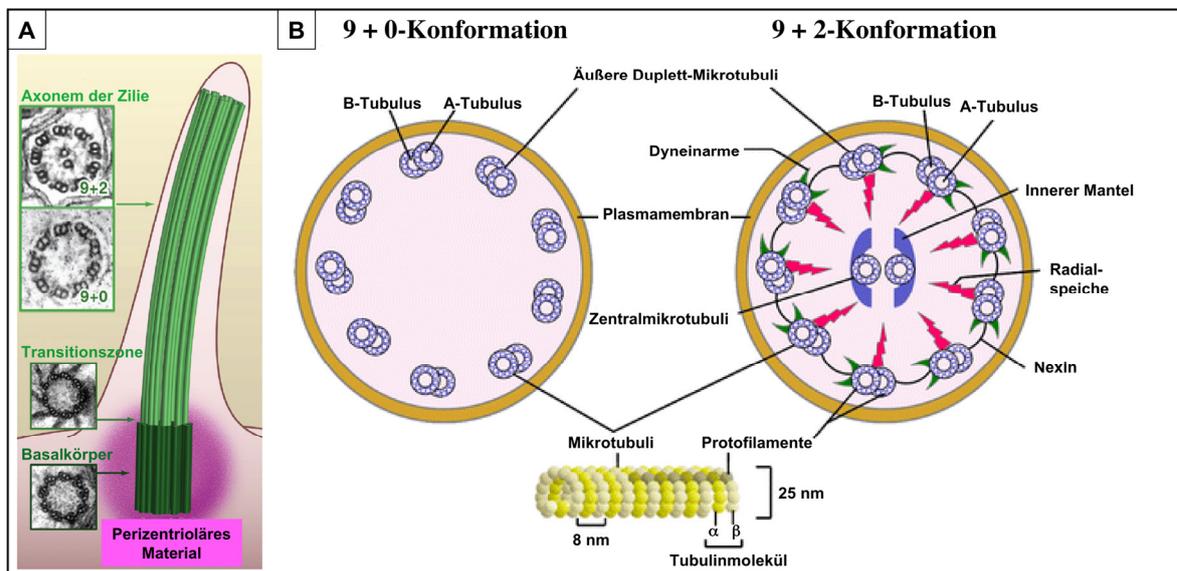


Abbildung 1.5: Struktur einer Zilie.

(A, B) Schematische Illustration einer Zilie und deren Mikrotubuli-Konformationen. (A) Zilien bestehen aus einem in der Zelle verankerten Basalkörper, einer Transitionszone und einem Axonem. (B) Das Zilienaxonem kann eine „9+0“- oder „9+2“-Mikrotubuli-Konformation aufweisen. Im Gegensatz zur „9+0“-Konformation beinhaltet die „9+2“-Konformation noch ein Mikrotubuli-Paar im Zentrum des Rings aus 9 Duplettmikrotubuli. Die Mikrotubuli sind aus α - und β -Tubulinmolekülen aufgebaut. Modifiziert nach J.M. Gerdes (Gerdes et al., 2009) bzw. L. Rodat-Despoix und P. Delmas (Rodat-Despoix und Delmas, 2009).

1.4.2 Die Funktion der Zilie

Die Funktion motiler Zilien ist seit über 100 Jahren bekannt (Zimmerman, 1898). Sie dienen als „Propeller“, die den Transport bestimmter Substanzen innerhalb von Organismen antreiben und lenken. Beispielsweise wird in Vertebraten auf diese Art und Weise der Mukus durch die Trachea geschleust und die Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis) durch das zentrale Nervensystem transportiert. Immotile Zilien werden auch als primäre Zilien bezeichnet. Lange nahm man an, dass diese Zilien im Laufe der Zeit funktionslos geworden seien, doch in den 1990iger Jahren manifestierte sich die Meinung, dass primäre Zilien keine Rudimente, sondern wichtige Kompartimente von Zellen darstellen. Diese Zilien fungieren als „Antennen“ auf Zellen, die Signale aus dem extrazellulären Raum empfangen, weitervermitteln und Zellen so anweisen, bestimmte zelluläre Prozesse durchzuführen, wie z.B. Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Migration oder Zellzyklus-Regulation (Al-Bhalal und Akhtar, 2005; Pazour und Witman, 2003; Quarmby und Parker, 2005; Singla und Reiter, 2006). Dies erklärt die Verwicklung defekter primärer Zilien als Auslöser schwerer, humaner Erkrankungen wie Krebs, Kartagener Syndrom, polyzystische Nierenerkrankung, retinale Degeneration, Bardet-Biedl Syndrom und Fettleibigkeit (Pazour und Rosenbaum, 2002; Plotnikova et al., 2008; Satir, 2007; Singla und Reiter, 2006; Zariwala et al., 2007). Missgebildete oder fehlende Zilien beispielsweise in der Niere führen zu Nierenzysten, die im Verlust der Regulation der Proliferation begründet liegen (Vogel, 2005; Wagner, 2008). Morphologisch defekte bzw. fehlende Zilien sind scheinbar immer auf eine Störung des sogenannten intraflagellaren Transports zurückzuführen.

1.4.3 Der intraflagellare Transport (IFT)

IFT bezeichnet den bidirektionalen Transport von Partikeln bzw. Molekülen innerhalb der Zilie (Abbildung 1.6), der unter anderem dazu führt, dass ein Zilium entsteht (Pedersen et al., 2008; Rosenbaum und Witman, 2002). Dabei werden elektronendichte, multimere Proteinkomplexe, sogenannte IFT-Partikel, mit Hilfe von Kinesin-Motoren (heterotrimeres Kinesin-2) vom Basalkörper zur Spitze der Zilie (anterograder Transport) und durch Dynein-Motoren (zytoplasmatisches

Dynein 1b) wieder zurück zum proximalen Zilienende gebracht (retrograder Transport) (Cole, 2003; Hou et al., 2004). Die Motor-Proteinkomplexe, die den anterograden bzw. den retrograden Transport realisieren, bewegen sich auf den äußeren Mikrotubuli-Dupletts entlang des Axonems und wurden in der Grünalge *Chlamydomonas* näher analysiert (Cole, 2003). Heterotrimeres Kinesin-2 besteht aus zwei heterodimerisierten, Kinesin-verwandten Motor-Untereinheiten (Kif3a und Kif3b) und einer zusätzlichen Untereinheit, die Kinesin-2-assoziiertes Protein (Kap) genannt wird (Cole et al., 1993; Wedaman et al., 1996). Dabei fungiert die Kap-Untereinheit höchstwahrscheinlich als Regulator der Motoraktivität, indem sie die Kontrolle über das Anheften des Kinesin-Motors an die Zilie, über das Andocken des Motors an IFT-Partikel und über die eigentliche Aktivität des Motors innehat. Kif3a und Kif3b dimerisieren auch in Abwesenheit von Kap, wobei Kif3b auch *in vitro* Motoraktivität besitzt (Yamazaki et al., 1995). Um die Funktionen der Kinesin-Untereinheiten Kif3a und Kif3b getrennt voneinander untersuchen zu können, wurden Experimente mit Kif3a/a- und Kif3b/b-Homodimeren durchgeführt. Kif3a/a bewegt sich fünffach langsamer als das Kif3a/b-Heterodimer, während die Geschwindigkeit von Kif3b/b zweifach schneller ist als beim Heterodimer. Allerdings zeigen Kif3b/b-Homodimere eine geringere Prozessivität, d.h. sie haften nicht so lang an den Mikrotubuli an und fallen somit schneller ab, als Kif3a/b. Zusammengefaßt bedeutet dies, dass Kif3a und Kif3b gemeinsam die Transportgeschwindigkeit regulieren, wobei Kif3a den entscheidenden Faktor der Prozessivität darstellt (Zhang und Hancock, 2004).

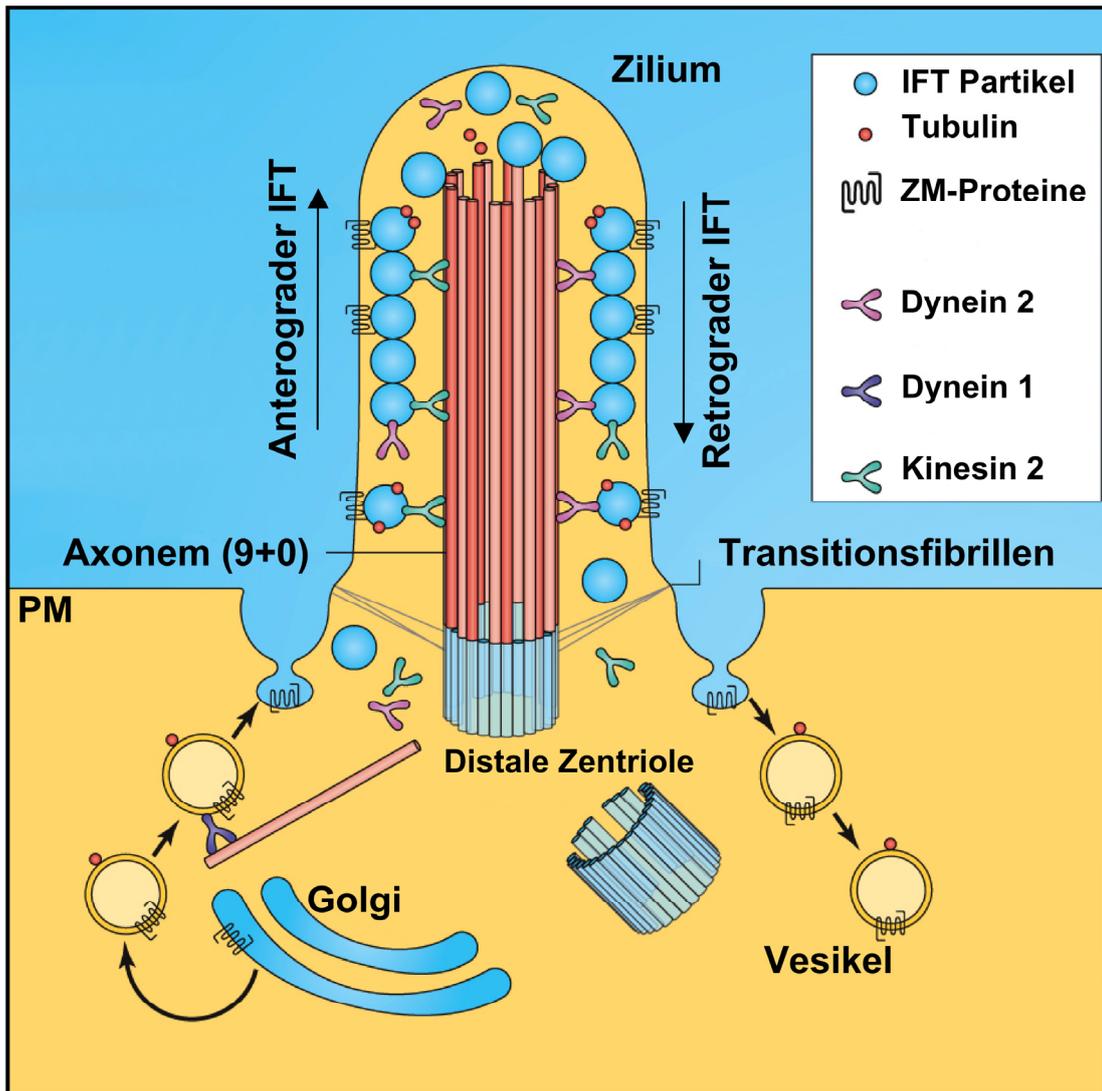


Abbildung 1.6: Intraflagellarer Transport (IFT).

Der IFT ist verantwortlich für das Schleusen von Proteinen durch die Zilie. Dies geschieht mittels eines anterograden Transports, der zum distalen Ende der Zilie führt, und eines retrograden Transports, der in Richtung Basalkörper verläuft. Dieser Transport wird mit Hilfe von Motorproteinen realisiert. Dabei stellt Kinesin 2 den Motor des anterograden Transport dar, während Dynein 2 den retrograden Transport ausführt. Sogenannte IFT-Proteine werden als „Ladeflächen“ gebraucht. Sie binden an Motorproteine und dienen ihrerseits als Bindungspartner für Proteine, die durch die Zilie transportiert werden sollen. Modifiziert nach Satir et al. (Satir et al., 2010).

Das zytoplasmatische Dynein 1b umfasst die schwere Dynein-Kette DHC1b und die leichte intermediäre Kette D1bLIC. Während D1bLIC zur Stabilisierung des retrograden Motors dient und verantwortlich für die Bindung von IFT-Partikeln an den Motor ist, scheint DHC1b die eigentliche Motoraktivität aufzubringen (Hou et al., 2004). Proteine, die in der Zilie transportiert werden sollen, müssen zunächst

zur Zilie hin gelangen. Dazu werden sie in membranösen Vesikeln vom Golgi-Apparat zum Basalkörper der Zilie gebracht (Abbildung 1.6). Als Motor dieser Überführung dient vermutlich zytoplasmatisches Dynein1. Am Basalkörper angekommen, werden die Proteine an IFT-Partikel gebunden und in die Zilie befördert (Bouck, 1971; Deretic und Papermaster, 1991; Pazour und Rosenbaum, 2002). Die IFT-Partikel bestehen aus zwei Subkomplexen, IFTA und IFTB, welche zahlreiche Bindestellen besitzen, um mit einer großen Anzahl von Axonem-, Matrix- und Membranproteinen assoziieren zu können (Cole et al., 1998; Piperno et al., 1998). Der IFTA-Subkomplex wird für den retrograden Transport verwendet, der IFTB-Komplex für den anterograden Transport (Iomini et al., 2001; Lucker et al., 2005; Scholey, 2008). Ursprünglich wurden im Nematoden *Caenorhabditis elegans* IFT-Mutanten morphologisch als Komplex A- bzw. Komplex B-Mutanten klassifiziert (Perkins et al., 1986). Komplex A-Mutanten besitzen verkürzte Zilien mit blasenartigen Strukturen an den distalen Spitzen, während Komplex B-Mutanten verkürzte bzw. weniger Zilien aufweisen. Der Komplex A-Zilienphänotyp beruht auf einem defekten retrograden IFT, die Komplex B-Ziliendefekte auf einem gestörten anterograden IFT. Doch der IFT ist nicht nur für den Transport von ziliären Komponenten verantwortlich, die wichtig für den Aufbau, die Aufrechterhaltung und die Kontrolle der Zilienlänge sind, sondern auch für die Vermittlung von molekularen Zilien-vermittelten Signalen, welche die Zellfunktion, die Zellproliferation, die Genexpression und somit auch die Entwicklung von Lebewesen kontrollieren (Pan und Snell, 2007; Scholey und Anderson, 2006; Wemmer und Marshall, 2007). Daher kann eine IFT-Fehlfunktion den Ursprung einer menschlichen Krankheit darstellen (Bisgrove und Yost, 2006; Pazour und Rosenbaum, 2002), denn Zilien, in denen der IFT fehlerhaft abläuft, vermitteln molekulare Signale nicht mehr in dem Maße wie wildtypisch funktionierende Zilien (Haycraft et al., 2005; Haycraft et al., 2007; Huangfu und Anderson, 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005).

1.5 Zilien-assoziierte Signalwege

Bekannte Signalwege, die mit sensorischen Zilien assoziiert werden, sind der Hedgehog-, der Pdgfr α - sowie der kanonische und der nicht-kanonische Wnt-

Signalweg (Corbit et al., 2005; He, 2008; Ocbina et al., 2009; Rohatgi et al., 2007; Schneider et al., 2005). Interessanterweise wurden diese Transduktionskaskaden außerdem als essentielle Koordinatoren in der Kardiogenese beschrieben (Goddeeris et al., 2008; Hirata et al., 2007; Kwon et al., 2008; Washington Smoak et al., 2005), was eine Verbindung von Herzentwicklung und Funktion sensorischer Zilien in der Vermittlung bestimmter Signalwege herstellt. Die Transduktion der Signalwege, die mit Hilfe der Zilien vermittelt werden, läuft immer nach dem gleichen Muster ab. Der jeweilige Ligand bindet an einen spezifischen Transmembranrezeptor, der in der ziliären Membran verankert vorliegt, und aktiviert diesen. Der aktivierte Rezeptor wiederum induziert Signalwegkomponenten, die aus der Zilie gelangen und schließlich durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Expression der für den jeweiligen Signalweg spezifischen Zielgene führen. Alle bislang identifizierten und über Zilien vermittelten Signalwege besitzen das Potential, die Zelle aus dem Zellzyklusarrest zurück in die Mitose zu überführen.

1.5.1 Der Sonic Hedgehog- (Shh-) Signalweg

Der Hedgehog (Hh)-Signalweg wurde ursprünglich in der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo er in der frühen Entwicklung bereits von entscheidender Bedeutung ist (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). In Vertebraten ist dieser Signalweg konserviert und spielt in der gesamten Embryogenese eine Schlüsselrolle. So ist er beispielsweise an der Etablierung der Links-Rechts- und der dorsoventralen Achse (Meyer und Roelink, 2003; Pagán-Westphal und Tabin, 1998; Schilling et al., 1999; Watanabe und Nakamura, 2000), der Vaskulogenese (Astorga und Carlsson, 2007; Zhang et al., 2001), dem Knochenwachstum (St-Jacques et al., 1999) und der Entwicklung des Zentralen Nervensystems (Astorga und Carlsson, 2007; Chiang et al., 1996; Ericson et al., 1997; Hatton et al., 2006; Sillitoe und Joyner, 2007; Treier et al., 1998), der Gliedmaßen (Ahn und Joyner, 2004) sowie des Herzens (Goddeeris et al., 2008) beteiligt. Dabei ist der Hh-Signalweg für die axiale Musterbildung, die Zellproliferation und das Überleben sowie Wachsen von Zellen essentiell (Britto et al., 2000; Varjosalo und Taipale, 2008).

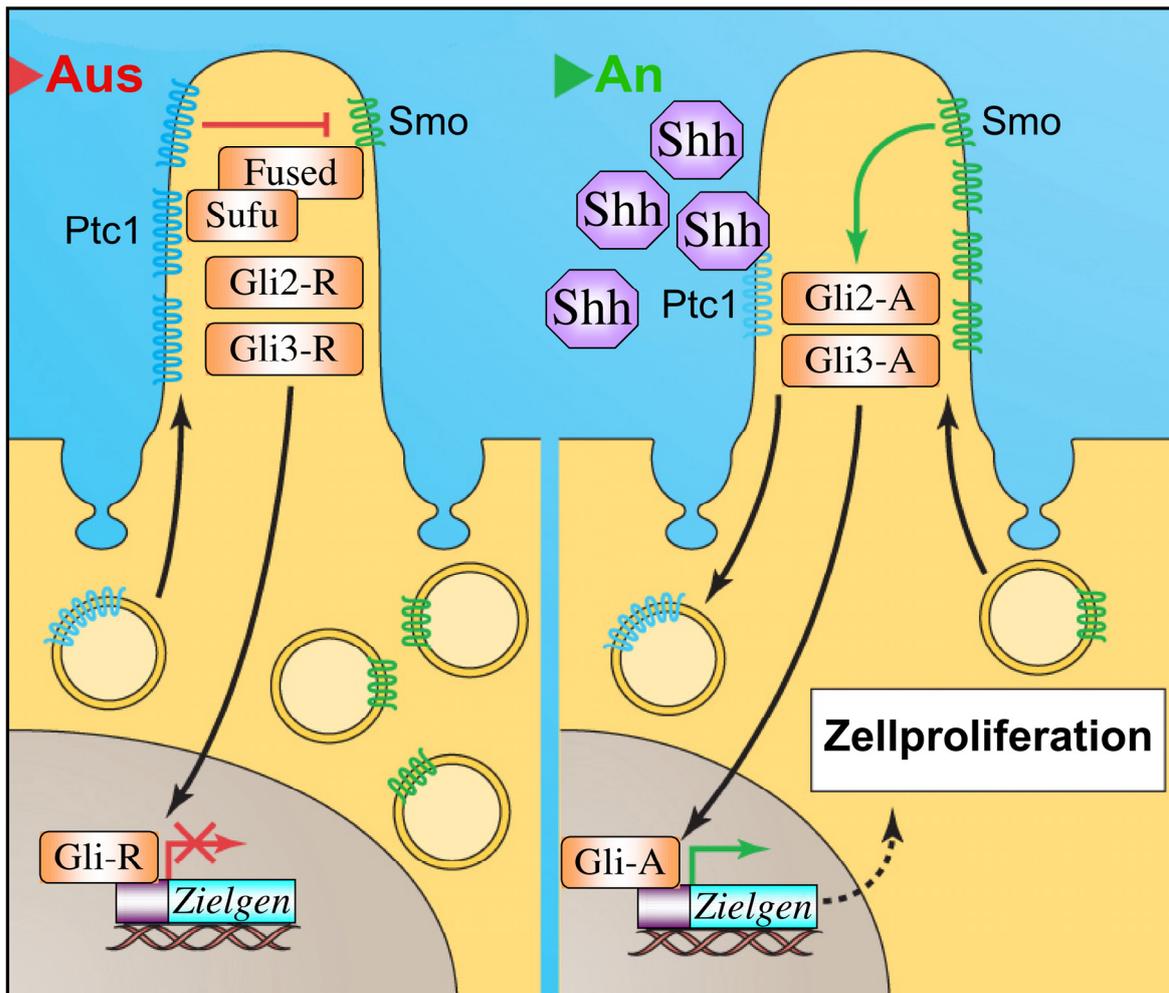


Abbildung 1.7: Der Zilien-vermittelte Shh-Signalweg.

In Abwesenheit des Shh-Liganden wird Smo durch den, in der Zilienmembran lokalisierten, Rezeptor Ptc1 inhibiert und Gli2 sowie Gli3 werden mit Hilfe von Fused und Sufu proteolytisch zu ihrer Repressorform prozessiert. Die Gli-Repressorformen verhindern anschließend die Aktivierung der Expression von Shh-Zielgenen. Ist Shh anwesend, so bindet es an Ptc1. Dieses wiederum kann Smo nicht länger inhibieren und Smo bewirkt die Freisetzung der Gli-Proteine von Fused und Sufu. Daraufhin werden Gli2 und Gli3 in ihre jeweilige Aktivatorform transformiert und aktivieren Zielgene des Shh-Signaltransduktionswegs. Prozessierung und Aktivator-Transformation von Gli2 und Gli3 sind Zilien-abhängig. Modifiziert nach Satir et al. (Satir et al., 2010).

In Vertebraten existieren drei verschiedene Hh-Proteine: Sonic hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh) (Echelard et al., 1993). Eine Bedeutung für die Embryonalentwicklung wurde bisher nur für Shh und Ihh nachgewiesen (Chiang et al., 1996; St-Jacques et al., 1999; Zhang et al., 2001), wobei speziell Shh an einer Vielzahl von entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt ist (Ingham und McMahon, 2001) und daher unter den Hh-Liganden der Vertebraten die bedeutendste Stellung einnimmt. Der jeweilige Hh-Ligand wird von

einer Zelle sekretiert und bindet an Patched1 (Ptc1), ein Membranprotein mit 12 Transmembran-Domänen (Abbildung 1.7). Ohne den Liganden reguliert Ptc1 den Hh-Signalweg negativ, indem es auf noch ungeklärte Weise ein weiteres Transmembran-Protein namens Smoothened (Smo) inhibiert. Nachdem der extrazelluläre Hh-Ligand Ptc1 gebunden hat, wird die Funktion von Smo nicht mehr unterdrückt, da sich der Hh/Ptc1-Komplex aus der Plasmamembran der Zilie entfernt. Smo wiederum transloziert in die Zilie und aktiviert dort die sogenannten Gli-Proteine (Abbildung 1.7). Der Name dieser Proteine leitet sich von Glioblastoma ab, der Bezeichnung menschlicher Hirntumore, aus deren Zellen Gli1 erstmalig kloniert wurde (Kinzler et al., 1987). Die drei Gli-Proteine der Vertebraten, Gli1, 2, und 3, liegen zusammen mit Suppressor of fused (Sufu) sowie höchstwahrscheinlich mit Homologen der *Drosophila*-Proteine Costal-2 (Cos2) und Fused (Fu) in einem Mikrotubuli-assoziierten Komplex vor. In Abwesenheit des Hh-Liganden werden Gli2 und Gli3 mit Hilfe dieses Komplexes proteolytisch in ihre jeweilige Repressorform prozessiert und somit die Transkription der Hh-Zielgene reprimiert. Die Aktivierung dieser Zielgene geschieht, wenn aktives Smo die Gli-Proteine aus dem Mikrotubuli-assoziierten Komplex freisetzt und somit gleichzeitig die Prozessierung von Gli2 und Gli3 verhindert, so dass alle Gli-Proteine als Transkriptionsaktivatoren fungieren können. Gli2 und Gli3 fungieren also als Transkriptionsfaktoren, indem sie die Transkription von Hh-Zielgenen aktivieren oder reprimieren. Als Transkriptionsaktivatoren dienen jeweils die Volllängen-Proteine (Gli2: 185 kDa; Gli3: 190 kDa), während sie proteolytisch prozessiert werden müssen (Gli2: 78 kDa; Gli3: 83 kDa), um ihre reprimierende Wirkung zu erhalten (Sasaki et al., 1999). Dabei scheint Gli2 ein stärkerer Genaktivator als Gli3 zu sein, Gli3 hingegen ein potenterer Genrepressor (Bai et al., 2004; Buttitta et al., 2003; Lei et al., 2004; McDermott et al., 2005; Motoyama et al., 2003). Sowohl die sehr ineffektive Prozessierung von Gli2-185 zur potentiell als Repressor fungierenden 78 kDa-Isoform (Pan et al., 2006), als auch der mutante Phänotyp, der auf eine Reduktion der Hh-Signale hindeutet (Ding et al., 1998; Matisse et al., 1998), sprechen für eine eher aktivierende Funktion dieses Proteins (Pan et al., 2006). Die Repressorfunktion der prozessierten, kurzen Isoform des Gli3-Proteins konnte in Zellkulturexperimenten eindeutig belegt werden, wobei die Prozessierung von Gli3-190 zu Gli3-83 eine hohe Effektivität besitzt (Litingtung et al., 2002; te

Welscher et al., 2002a; te Welscher et al., 2002b; Wang et al., 2000). Im Gegensatz zu Gli2 und Gli3 führt Gli1 keine duale Rolle in der Transkriptionsregulation aus, denn es kann nicht proteolytisch prozessiert werden und wirkt somit ausschließlich als Transkriptionsaktivator. In der Regel ist das Wirken von Gli1 dem von Gli2 und/oder Gli3 nachgeschaltet, so dass Gli1 die Transkriptionsaktivierung verstärkt. Murine *Gli2^{-/-}/Gli3^{-/-}*-Doppelmutanten exprimieren Gli1 daher nicht (Bai et al., 2004). Weiterhin wird Gli1 für die murine Embryonalentwicklung nicht benötigt, da sich Gli1-negative Embryonen wildtypisch entwickeln (Bai et al., 2002).

Die Vermutung, dass Shh-Signale in Vertebraten über Zilien vermittelt werden, entstand, als für zwei ziliopathogene Mausmutanten – *wimple* (*wim*) und *flexo* (*fxo*) – gezeigt werden konnte, dass diese charakteristische Shh-Defekte aufweisen. So beobachtet man Defekte beim Neuralrohrschluß, anormale Gehirnmorphologie und präaxiale Polydaktylie (Huangfu et al., 2003). Die verantwortlichen Mutationen wurden auf zwei IFT-Gene, *Ift172* (*wim*) und *Ift88* (*fxo*), kartiert. Zudem offenbaren Mausembryonen, denen *Kif3a* fehlt und die somit einen gestörten anterograden Transport in der Zilie zeigen, Defekte in der Spezifizierung der Bodenplatte des Neuralrohrs. All diese IFT-Mutanten lassen eine Reduzierung der Shh-Signale erkennen. Kurze Zeit später gelang es, Komponenten des Shh-Signaltransduktionswegs direkt in der Zilie nachzuweisen. In den Zilien des Knotens von Mausembryonen konnte Smo nachgewiesen werden (Corbit et al., 2005), Gli2 sowie Gli3 lokalisieren in primären Zilien von mesenchymalen und ektodermalen Zellen der sich entwickelnden Gliedmaßenknospe (Haycraft et al., 2005) und nach Stimulation mit Shh wird Smo in die Zilie hineinrekrutiert, während Ptc1 aus der Zilie hinausgelangt (Rohatgi et al., 2007). Die Bedeutung des primären Ziliums für die Prozessierung von Gli2 und Gli3 wird z.Zt. kontrovers diskutiert. Mausembryonen mit Mutationen in IFT-Komplex B-Genen (*Ift52*, *Ift88* und *Ift172*) ähneln Shh-Verlustmutanten, was für eine Rolle des anterograden Transports im Shh-Signalweg (möglicherweise für die korrekte Smo/Ptc1-Lokalisation) spricht. *Ift88*- bzw. *Ift172*-negative Mausembryonen zeigen eine starke Reduktion der prozessierten Proteine von Gli2 und Gli3, wogegen die Vollängen-Proteine in erhöhter Menge vorhanden sind, aber scheinbar keine Aktivator-Funktion mehr ausüben (Haycraft et al., 2005; Huangfu und Anderson, 2005; Huangfu et al., 2003; Liu et al., 2005; May et al., 2005). Daher wird

postuliert, dass IFT-Komplex B-Proteine entscheidend zur Prozessierung der Gli2- und Gli3-Proteine beitragen und zudem für die Transformation der Volllängen-Proteine in Aktivator-Proteine unerlässlich sind. Folglich wird die Aktivierung von Shh-Zielgenen in Abwesenheit der IFT-Komplex B-Proteine, also durch eine Störung des anterograden Transports, blockiert. Dies wird zusätzlich durch Analysen zur Prozessierung von Gli3 in *Kif3a*-negativen Mausembryonen bestätigt. *Kif3a* fungiert als Komponente des anterograden IFT und die Abwesenheit dieses Proteins resultiert ebenfalls in einer Anhäufung von Gli3-190 und in einer Reduktion von Gli3-83. Im Gegensatz zu *Kif3a*- und IFT-Komplex B-Mutanten lassen *hennin* (*hnn*)-mutante Mausembryonen eine andere Vermutung zu. Diese Embryonen tragen eine Mutation im *Ar13b*-Gen, welches für eine GTPase kodiert, die in der Zilie entlang des Axonems lokalisiert ist. Diese Mutation führt zu verkürzten Zilien, die keine blasenartigen, proteingefüllten Verdickungen an ihrer distalen Spitze offenbaren, und einem defekten Axonem. Da diese Zilien-Morphologie auf einen gestörten anterograden Transport hindeutet, würde man einen Defekt in der Prozessierung von Gli2 und Gli3 erwarten. Allerdings stellt sich die Gli3-Repressormenge und –aktivität in diesen Mutanten unverändert dar und Gli2 sowie möglicherweise auch Gli3 sind ektopisch aktiv. Doch nicht nur dem anterograden, sondern auch dem retrograden IFT konnte eine Rolle in der Prozessierung von Gli3 zugeschrieben werden. So zeigen *alien* (*aln*)-Mausembryonen, die eine Null-Mutation des retrograden Transportproteins *Ttc21b/lft139* aufweisen, eine starke Erhöhung von Gli3-190 und eine relativ schwache Erhöhung von Gli3-83 sowie Anzeichen verstärkter Shh-Signale (Tran et al., 2008). Außerdem wurde in Mausmutanten, denen der retrograde IFT-Motor fehlt, nachgewiesen, dass diese, wie auch *Kif3a*- oder IFT-Komplex B-Mutanten, Gli3-190 nur minimal zu Gli3-83 prozessieren, so dass eine Akkumulierung des Gli3-190-Proteins auf Kosten des Gli3-83-Proteins stattfindet (May et al., 2005). Also scheinen der anterograde und der retrograde IFT in ähnlicher Art und Weise Einfluß auf die Prozessierung von Gli3 zu nehmen und essentiell für diesen Vorgang zu sein. Somit besitzt die Zilie in Vertebraten eine scheinbar unerlässliche Bedeutung für die Hh-Signaltransduktion, denn mit *Ptc1*, *Smo* und der Gli3-Prozessierung sind mehrere Komponenten und der Kernprozess dieses Signalwegs abhängig von der Anwesenheit und Funktionalität der Zilie.

1.5.2 Der Wnt-Signalweg

Die Bezeichnung „Wnt“ setzt sich zusammen aus Wg (wingless) und Int (integrator). Das Gen *wingless* wurde ursprünglich in *Drosophila melanogaster* entdeckt (Sharma und Chopra, 1976). Es handelt sich um ein Segmentpolaritätsgen (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980), welches eine große Bedeutung während der Embryogenese von *Drosophila melanogaster*, insbesondere bei der Entwicklung der Flügel (engl.: wings) und der Schwingkölbchen (Haltere) innehat. Wnts stellen eine große Familie sekretierter Zystein-reicher Glykoproteine dar (Cadigan und Liu, 2006), die die Entwicklung von Zellen und Geweben koordinieren und somit die Musterbildung von Organen nicht nur in *Drosophila*, sondern auch in Vertebraten kontrollieren. Daher führt eine Störung der Wnt-Signale zu humanen Krankheiten wie Gliedmaßenfehlbildungen, Knochenabnormalitäten und Krebs (Logan und Nusse, 2004). Man unterscheidet grundsätzlich zwischen β -Catenin-abhängigem oder kanonischem Wnt-Signalweg und β -Catenin-unabhängiger oder nicht-kanonischer Wnt-Transduktion (Simons et al., 2005).

Das Modell des kanonischen Wnt-Signalwegs wurde aufgrund zahlreicher Studien an *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* in den 1990iger Jahren entworfen (Bhanot et al., 1996; Yang-Snyder J, 1996; Yost et al., 1996) und scheint in Vertebraten und Invertebraten gleichermaßen hochkonserviert zu sein (Chien et al., 2009). Die Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionswegs wird durch die Bindung eines extrazellulären Wnt-Liganden an einen Sieben-Transmembran-Rezeptor der Frizzled (Frz)-Familie auf der Zelloberfläche realisiert (Cadigan et al., 1998; Strigini und Cohen, 2000; Zecca et al., 1996). Zum heutigen Zeitpunkt sind 19 Wnt-Isoformen bekannt (Chien et al., 2009; Flaherty und Dawn, 2008). Neben den Frz-Rezeptoren übernehmen LDL-verwandte Proteine (LRPs; low density lipoprotein-related proteins) als Ko-Rezeptoren eine essentielle Bedeutung für einen funktionierenden Wnt-Signalweg, denn die Wnt-Liganden bilden einen trimeren Komplex mit Frz und LRP5/6 (Schweizer und Varmus, 2003). Durch die Bindung eines Wnt-Liganden an eine Zystein-reiche Domäne eines Wnt-Rezeptors (Cadigan und Liu, 2006) wird Dishevelled (Dvl) mittels Phosphorylierung aktiviert (Yanagawa et al., 1995). Wie diese Aktivierung auf molekularer Ebene abläuft, ist bislang erst unvollständig verstanden (Chien et al.,

2009). Durch diese Modifikation wird das Signal an einen Proteinkomplex aus Glykogen-Synthase Kinase-3 β (GSK3 β), Axin, Adenomatous Polyposis Coli (APC) und dem transkriptionellen Regulator β -Catenin weitergeleitet. Die Weiterleitung verhindert die Phosphorylierung von β -Catenin, so dass dieses in den Zellkern gelangt und mit nukleären Proteinen interagiert bzw. die Transkription der Zielgene des kanonischen Wnt-Signalwegs aktiviert (Abbildung 1.8). Ist der Wnt-Signaltransduktionsweg inaktiv, so wird β -Catenin durch GSK-3 β phosphoryliert. Dabei wirken Axin und APC als sterische Proteine, welche die Interaktion von β -Catenin und GSK-3 β stabilisieren (Hart et al., 1998; Kishida et al., 1998). Das phosphorylierte β -Catenin wird anschließend ubiquitiniert und durch das Proteasom degradiert.

Im Vergleich zum kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg ist über den Ablauf und die Komponenten sowie deren Wechselwirkungen der nicht-kanonischen Wnt-Transduktion wenig bekannt. So weiß man bisher nicht, ob β -Catenin-unabhängige Wnt-Signalwege als unterschiedliche, distinkte Kaskaden fungieren oder ob sie Teil eines großen Signalnetzwerks sind (Lai et al., 2009). Wie der kanonische Wnt-Signalweg startet der nicht-kanonische mit der Assoziation eines Wnt-Liganden an einen Frz-Rezeptor, wobei für diese Bindung kein LRP-Ko-Rezeptor benötigt wird. Mit dem Protein Van gogh like 2 (Vangl2) existiert außerdem noch ein Rezeptor des β -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalwegs, der nicht zur Frz-Familie gehört (Montcouquiol et al., 2003). Nicht-kanonische Wnt-Signale werden über intrazelluläre Ca²⁺-Mengen und durch die Arbeit von RhoA, Rock und der Jnk-Kinase vermittelt. Diese Faktoren sind von großer Bedeutung für die Regulation sowie das Modellieren des Zytoskeletts und involviert in die Kontrolle der planaren Zellpolarität (planar cell polarity, PCP). Die PCP wird durch interzelluläre Kommunikation etabliert, die die Anordnung der Zelle reguliert, wodurch Strukturen innerhalb einer Gewebeebene polarisiert werden. Ein Beispiel für diesen Prozess stellt die Orientierung von Stereozilien-Bündeln im Innenohr dar (Jones und Chen, 2008). Nicht-kanonische Wnt-Signale regulieren außer der Organisation des Zytoskeletts noch die Zellproliferation und -migration (Cheng et al., 2008).

Sowohl der kanonische wie auch der nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg weisen eine Assoziation zu Zilien auf, jedoch scheint der

kanonische Wnt-Signalweg durch Zilien negativ und der nicht-kanonische Wnt-Signalweg durch Zilien positiv reguliert zu werden (Abbildung 1.8). Dabei ist die Restriktion kanonischer Wnt-Signale durch Zilien offensichtlicher als die ziliäre Vermittlung der nicht-kanonischen Wnt-Signale. Denn während Dvl in *Kif3a*-negativen Mausembryonen, die keine Zilien bilden können, konstitutiv phosphoryliert wird (Corbit et al., 2008), was die ziliäre, negative Regulation der kanonischen Wnt-Signale verdeutlicht, wird die Verbindung von Zilien und nicht-kanonischen Wnt-Signalen kontrovers diskutiert (Bacallao und McNeill, 2009; Berbari et al., 2009). Mit Vangl2 wurde bereits ein wichtiger Rezeptor des β -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalwegs in Zilien nachgewiesen (Ross et al., 2005) und auch das Protein Inversin (Inv), welches mit Dvl interagiert und dessen zytoplasmatischen Teil markiert, so dass es degradiert wird (Simons et al., 2005), zeigt eine ziliäre Lokalisation (Shiba et al., 2009). Die Inaktivierung von *Inversin* in *Xenopus laevis* führt zu konvergenter Extension und lässt den Schluß zu, dass Inversin als molekularer Schalter fungiert, der benötigt wird, um kanonische Wnt-Signale zu unterdrücken und nicht-kanonische Wnt-Signale zu fördern (Simons et al., 2005). Die positive Regulation des PCP-Signalwegs konnte mittels Analysen von Mausmutanten, denen sogenannte Bardet-Biedl Syndrom- (BBS) Proteine fehlen, bestätigt werden. BBS-Proteine weisen eine spezifische Lokalisation am Basalkörper von Zilien auf und *Bbs*-negative Mausembryonen zeigen typische Merkmale eines gestörten PCP-Signalwegs (Gerdes et al., 2007; Ross et al., 2005). Diese Untersuchungen implizieren eine Beteiligung von Proteinen des Basalkörpers an der PCP-Signalweiterleitung. Dass die Zilie als Zellkompartiment eine enorme Bedeutung für den PCP-Signalweg besitzt, macht eine gezielte Inaktivierung von *Ift88* in der Cochlea (Hörschnecke) des Innenohrs von Mäusen deutlich. In diesen beobachtet man eine Fehlorientierung der kinoziliären Basalkörper und somit der stereoziliären Bündel, wobei allerdings wichtige PCP-Proteine eine normale Lokalisation verzeichnen (Jones und Chen, 2008). Daher scheinen ziliäre Proteine benötigt zu werden, um den Basalkörper zu positionieren und morphologische Polarität während der PCP-Regulation zu etablieren.

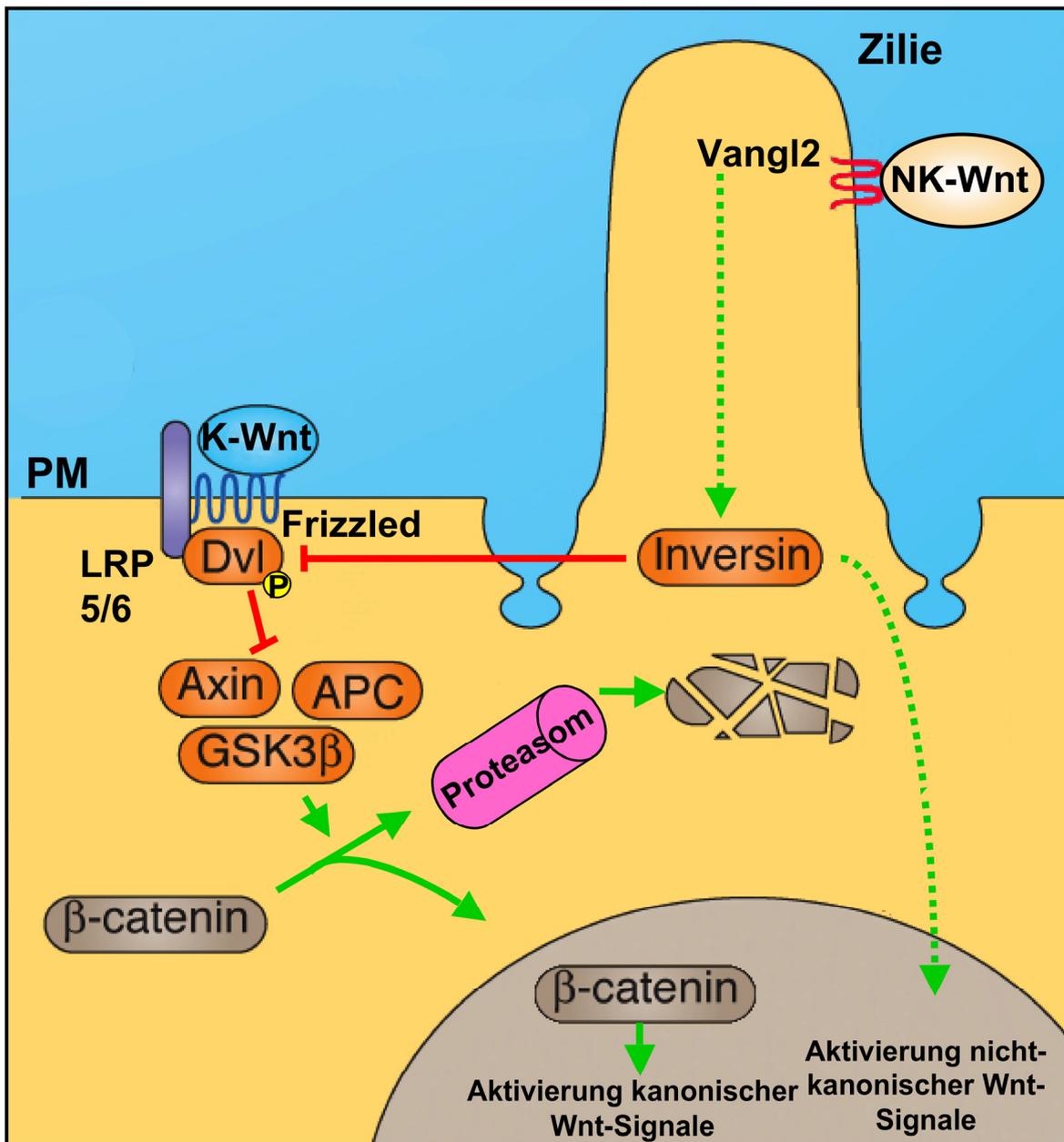


Abbildung 1.8: Die Zilien-assoziierten Wnt-Signalwege.

Die Bindung eines kanonischen Wnt-Liganden an einen Frizzled-Rezeptor bewirkt die Phosphorylierung von Dvl, welches dadurch verhindert, dass β -Catenin mit Hilfe eines Proteinkomplexes aus Axin, APC und GSK3 β abgebaut wird. Dies ermöglicht β -Catenin, Zielgene des kanonischen Wnt-Signalwegs zu aktivieren. Bindet ein nicht-kanonischer Wnt-Rezeptor an den ziliären Rezeptor Vangl2, so wird die Expression nicht-kanonischer Wnt-Zielgene mittels Inversin angeschaltet. Desweiteren wird Dvl durch Inversin inhibiert und kann die Freisetzung von β -Catenin aus dem Axin/APC/GSK3 β -Komplex nicht mehr realisieren. Somit wird β -Catenin durch Proteasomen abgebaut. Also reguliert die Zilie den kanonischen Wnt-Signalweg negativ und die nicht-kanonische Wnt-Transduktion positiv. Modifiziert nach Satir et al. (Satir et al., 2010).

1.5.3 Der „Platelet-derived growth factor“ Rezeptor α - (Pdgfr α -) Signalweg

Der „Platelet-derived growth factor“ (Pdgf) wurde 1974 entdeckt (Ross et al., 1974). Wie der Name schon suggeriert, stammt dieser Faktor von Blutplättchen ab. Desweiteren ist bekannt, dass dieses Protein die Proliferation mesenchymaler Zellen fördert (Antoniades et al., 1979) und dass fünf verschiedene Pdgf-Isoformen existieren: Pdgf-AA, Pdgf-AB, Pdgf-BB, Pdgf-CC sowie Pdgf-DD. Diese, als Mitogen auf Zellen wirkenden, Wachstumsfaktoren fungieren als Dimere (Homodimere bei Pdgf-AA, Pdgf-BB, Pdgf-CC und Pdgf-DD; Heterodimere bei Pdgf-AB), die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Diese Liganden haben die Möglichkeit drei verschiedene Rezeptoren zu aktivieren: Pdgfr $\alpha\alpha$ (Platelet-derived growth factor receptor $\alpha\alpha$), Pdgfr $\alpha\beta$ (Platelet-derived growth factor receptor $\alpha\beta$) und Pdgfr $\beta\beta$ (Platelet-derived growth factor receptor $\beta\beta$).

Ein Pdgf-Rezeptor besteht extrazellulär aus fünf immunglobulinartigen Domänen und intrazellulär aus einer Tyrosinkinase-Domäne (Matsui et al., 1989). Da die Pdgf-Liganden als Dimere fungieren, führen sie zur Vereinigung von zwei Rezeptoren (Abbildung 1.9). Dabei binden die Pdgf-Dimere an die ligandenbindenden Domänen der äußersten drei Ig-artigen Domänen (Heidaran et al., 1990). Die Ig-Domäne 4 dient der Stabilisierung des Rezeptorkomplexes nach der Bindung durch den Liganden (Lokker et al., 1997; Omura et al., 1997). Durch die ligandenvermittelte Assoziation der Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinase und somit zur Autophosphorylierung des dimerisierten Rezeptors (Kazlauskas et al., 1991), wodurch die Kinaseaktivität noch erhöht wird. Dies führt zur Induktion von zwei verschiedenen Signaltransduktionskaskaden, dem PI3K (phosphoinositide-3-kinase) / Akt- und dem Mek1/2 (MAPK/Erk kinase 1/2) / Erk1/2- (extracellular-signal regulated kinase 1/2) Signalsystem (Veland et al., 2009).

Im Falle der PI3K-Signale bindet die PI3Kinase an den dimerisierten und phosphorylierten Pdgf-Rezeptor und es erfolgt eine Translokation des Proteins zur Plasmamembran. Den Grad höchster Aktivierung erfährt die PI3K durch Bindung von aktivem Ras (rat sarcoma) an ihre katalytische Untereinheit (Schlessinger, 1993). Die so aktivierte PI3K führt dann durch Umsetzung ihres Substrats Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat zu Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphat die Signalkaskade fort. Diese umgesetzten Substrate rekrutieren Akt/PKB (protein

kinase B) und PDK (phosphoinositide-dependent kinase) zur Plasmamembran, wo Akt/PKB dann von PDK phosphoryliert und somit aktiviert wird. Akt/PKB phosphoryliert anschließend zahlreiche Proteine an deren Serin- und Threoninresten, so dass schließlich PI3K-spezifische Zielgene, wie z.B. *Hif1 α* (*hypoxia-inducible factor 1, α subunit*) oder *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*) aktiviert werden (Yang et al., 2009). Diese wiederum regulieren Prozesse wie Aktin-Reorganisation, Glucose-Metabolismus, Chemotaxis, Zellwachstum, Antiapoptose und Zellproliferation (Schild et al., 2009; Yun et al., 2009).

Die Mek1/2/Erk1/2-Signalkaskade beginnt mit der Rekrutierung der Adapterproteine Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2) und Shc (SRC homology 2 domain containing transforming protein) an die Plasmamembran, wodurch der Nukleotid-Austausch-Faktor Sos (son of sevenless) die Phosphorylierung von Ras-GDP zu Ras-GTP katalysiert und Ras somit aktiviert. Sos wird durch Grb2 zur Plasmamembran transportiert, wo es die Tyrosinphosphat-Bindestellen sowohl auf den Pdgf-Rezeptoren als auch auf den Rezeptor-Substratproteinen erkennt (McCormick, 1993). Das aktivierte Ras wirkt als Adapter, der Raf- (rat fibrosarcoma) Kinasen mit hoher Affinität bindet und ihre Translokation zur Zellmembran verursacht. Dort wird die Serin/Threonin-Kinase Raf aktiviert (Moodie und Wolfman, 1994), die ihrerseits dann zwei Serinreste von Mek1/2 phosphoryliert (Schaeffer und Weber, 1999). Das so aktivierte Mek1/2 realisiert die Aktivierung von Erk1/2 durch Phosphorylierung eines -Thr-Glu-Thr-Motifs. Die Serin/Threonin-Kinasen Erk1/2 besitzt mit über 50 Proteinen eine große Anzahl von Substraten (Lewis et al., 1998) und führt schließlich zur Zielgenaktivierung des Ras-Signalwegs. Ras-Signale beeinflussen das Zellwachstum, die Zellmigration und auch die Zelldifferenzierung.

Pdgf-Signale spielen nicht nur in adulten Säugetieren (z.B. bei der Wundheilung, der Angiogenese oder der Regulation des interstitiellen Gewebedrucks) eine bedeutende Rolle, sondern auch in der Embryonalentwicklung (Li und Eriksson, 2003). In murinen, sensorischen Zilien wurde bisher lediglich der Platelet-derived growth factor receptor α (Pdgfr α) gefunden, jedoch kein anderer Pdgf-Rezeptor, so dass davon ausgegangen werden kann, dass über Zilien ausschließlich Pdgfr- $\alpha\alpha$ -Signale vermittelt werden. Ferner haben Untersuchungen in Zellkultur gezeigt, dass die Aktivierung von Pdgfr $\alpha\alpha$ durch dessen spezifischen Liganden, Pdgf-AA, in embryonalen Mausfibroblasten (mouse embryonic fibroblasts; MEF)

ausschließlich von der Anwesenheit primärer Zilien abhängt. Eine Stimulation von $Pdgfr\alpha$ findet in mutanten Fibroblasten, die keine Zilien ausbilden, nicht statt (Schneider et al., 2005).

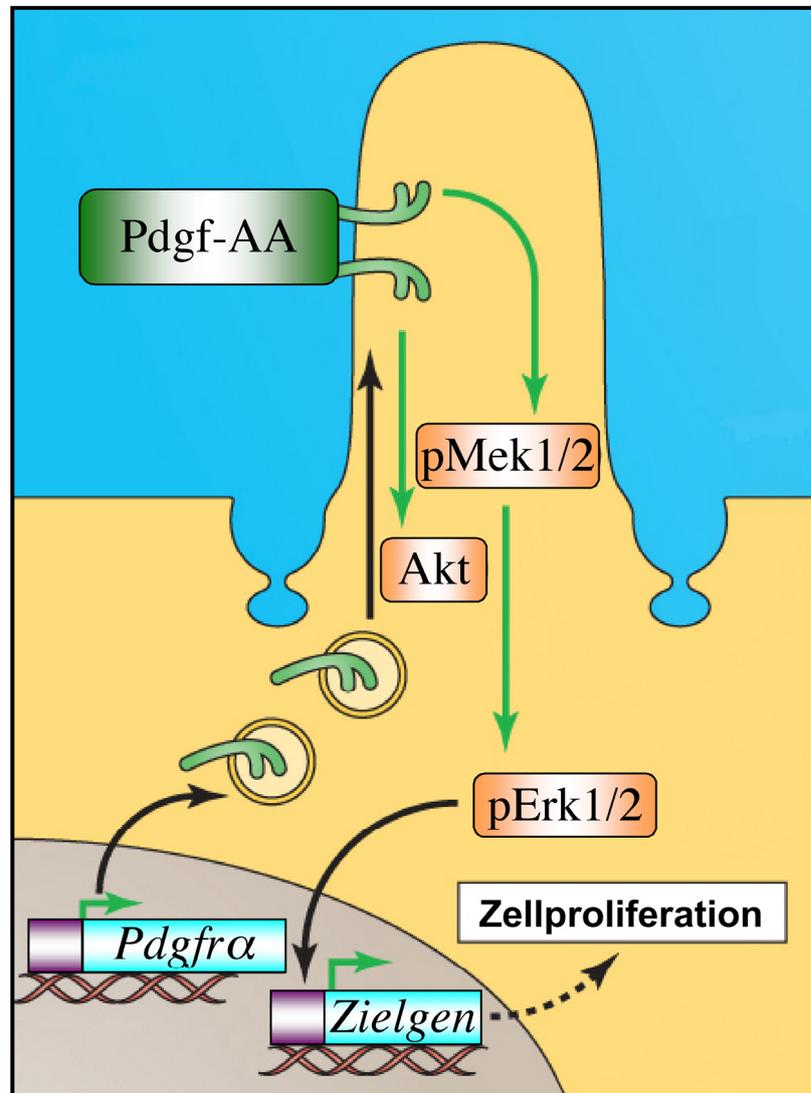


Abbildung 1.9: Der Zilien-vermittelte $Pdgfr\alpha$ -Signalweg.

Der PdGF-AA-Ligand bindet an den homodimeren, ziliären $Pdgfr\alpha$ -Rezeptor und dieser Rezeptor phosphoryliert bzw. aktiviert Mek1/2 und Akt. pMek1/2 führt zur Phosphorylierung von Erk1/2. Dieses wiederum schaltet die Expression der Zielgene des $Pdgfr\alpha$ -Signaltransduktionswegs an. Modifiziert nach Satir et al. (Satir et al., 2010).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Ftm-negative Mausembryonen zeigen einen ventrikulären Septumdefekt (Vierkotten, 2006). Dieser Defekt stellt den häufigsten angeborenen Herzfehler beim Menschen dar (Lloyd-Jones et al., 2009) und tritt als Symptom verschiedenster Krankheiten in Erscheinung, so z.B. bei Trisomie 13 (Balci et al., 2008), bei Trisomie 18 (Edwards Syndrom) (Kobayashi et al., 2010), bei Trisomie 21 (Al-Jarallah, 2009) und beim DiGeorge Syndrom (Jiang et al., 2005). Dennoch ist über die Ursache dieser kardialen Fehlbildung auf molekularer Ebene wenig bekannt (Franco et al., 2006; Sakata et al., 2002). Da *Ftm*-defiziente murine Embryonen unter einer Ziliopathie leiden (Vierkotten et al., 2007), zielt die vorliegende Arbeit darauf ab, die Rolle von Zilien in der Entwicklung des Herzens, insbesondere des ventrikulären Septums, zu analysieren.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Maushaltung und Isolation definierter Embryonalstadien

Die für diese Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der Tierversuchsanlage der medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten und gezüchtet.

Die Verpaarung der Mäuse erfolgte durch das Zusammensetzen von ein bis zwei geschlechtsreifen Weibchen mit jeweils einem Männchen. Am Vormittag darauf wurden die Weibchen auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfens untersucht, der bei erfolgter Befruchtung entsteht. War ein derartiger Pfropfen präsent, so wurden die Weibchen von dem Männchen isoliert und der Zeitpunkt 12 Uhr am Mittag dieses Tages als Embryonaltag (E) 0.5 determiniert. Beim Erreichen des gewünschten Embryonalstadiums wurden die Weibchen mittels zervikaler Dislokation getötet, die Uteri präpariert sowie die Embryonen unter einem Stereomikroskop in eiskaltem PBS isoliert. Zur Ermittlung des jeweiligen Genotyps der einzelnen Embryonen dienten von den Embryonen abgetrennte Membranen oder Schwänze.

Verwendete Lösungen:

PBS 4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 16 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 150 mM NaCl
 pH 7,3
 autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.

2.2 Chemikalien, Standardlösungen und Nährmedien

In der vorliegenden Arbeit wurden, soweit nicht speziell erwähnt, Enzyme und Chemikalien der Firmen Applichem GmbH (Darmstadt, Deutschland), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (NEB) (Schwalbach, Deutschland), Promega (Heidelberg, Deutschland), Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland), Riedel de

Haen (Seelze, Deutschland), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) verwendet. Die einzelnen Methoden enthalten eine detaillierte Aufführung der jeweils benötigten Materialien. Für die folgenden molekularbiologischen Arbeiten wurden die notwendigen Lösungen mit Hilfe von hochreinem Wasser aus einer Millipore-MilliQ-Anlage nach Sambrook et al. (1989) angesetzt. Soweit erforderlich wurden die verwendeten Lösungen, Gefäße und Verbrauchsmaterialien durch Autoklavieren bei 121°C, 2 bar für 30 min. oder durch Filtrieren sterilisiert. Bei den in den folgend beschriebenen Experimenten genutzten Geräten und Verbrauchsmaterialien, die in diesem Kapitel nicht genannt werden, handelt es sich um in einem molekularbiologischen Labor übliche Utensilien.

2.3 Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Der Begriff „Nukleinsäuren“ umfasst sowohl Ribonukleinsäuren (RNA), als auch Desoxyribonukleinsäuren (DNA). Besonders die Arbeiten mit RNA erfordern ein erhöhtes Maß an Geschwindigkeit bei möglichst niedrigen Temperaturen (um etwa 4°C), denn die Degradation von RNA geschieht durch sogenannte RNAsen, die beispielsweise in hoher Zahl als Teil unseres Immunsystems auf menschlicher Haut zu finden sind und die höchste Aktivität bei einer Temperatur von 37°C zeigen.

2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die folgenden beschriebenen Methoden stellen Modifikationen der Methode der alkalischen Lyse dar (Birnboim, 1983; Birnboim und Doly, 1979).

2.3.1.1 Plasmid-Mini-Isolation

Auf Selektionsplatten gewachsene Kolonien wurden mit autoklavierten Pipettenspitzen gepickt und in jeweils 5 ml Selektionsmedium gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler. Zur Plasmid-DNA-Isolierung aus den Bakterienzellen wurde das Plasmid-Mini-Kit der Qiagen GmbH

genutzt. 2 ml der Bakterienkulturen wurden in Reaktionsgefäße überführt und 3 min. bei 6000 Upm zentrifugiert (Eppendorf 5415D). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in 100 µl eiskaltem Puffer P1 durch Vortexen vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer P2 erfolgte eine Invertierung, so dass die Bakterienzellen alkalisch lysiert werden konnten. Daraufhin wurden die Proben durch Zugabe von 150 µl eiskaltem Puffer P3, durch anschließendes Vortexen und durch Kühlen auf Eis (10 min.) neutralisiert. Die entstandenen Niederschläge wurden sedimentiert (10 min.; 13000 Upm; Eppendorf 5415D) und die klaren, plasmidhaltigen Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 0,7-fachem Volumen (350 µl) Isopropanol. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 Upm für 10 min. (Eppendorf 5415D) wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, der Niederschlag mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und wiederholt zentrifugiert (5 min.; 13000 Upm, Eppendorf 5415D). Schließlich wurde der Überstand vollständig abgesaugt, das Sediment kurz an der Luft getrocknet und in 25 µl TE-Puffer aufgenommen.

2 µl der resuspendierten DNA wurden zur Kontrolle für die restriktionsenzymatische Spaltung (siehe 2.5.1) eingesetzt und die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5.2). Bei positivem Ergebnis der Auftrennung wurde die Bakterienkultur, von welcher die Mini-Präparation angefertigt worden war, zur Animpfung einer Kultur für eine anschließende Midi- oder Maxi-Präparation (siehe 2.3.1.2) verwendet.

Verwendete Lösungen:

70% EtOH	70% (v/v) EtOH in ddH ₂ O	
Isopropanol	abs.	
LB-Medium	1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt in H ₂ O autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.	Applichem #A1553 Applichem #A1552
Puffer P1	50 mM Glucose 25 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8.0	
Puffer P2	0,2 N NaOH 1% (w/v) SDS	
Puffer P3	3 M Kaliumacetat pH 4,8 mit Eisessig	

Volumen, also 10,5 ml („Maxi“) bzw. 3,5 ml („Midi“), an Isopropanol zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurde 30 min. bei 6000 Upm und 4°C zentrifugiert (Heraeus, Megafuge 1.0R) und anschließend der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 10 ml („Maxi“) bzw. 5 ml („Midi“) 70%igem Ethanol gewaschen und 10 min. bei 6000 Upm und 4°C zentrifugiert (Heraeus, Megafuge 1.0R). Desweiteren wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet für 10 min. bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und die DNA-Konzentration spektralphotometrisch (siehe 2.3.7) bestimmt. Die Qualität der DNA wurde restriktionsenzymatisch (siehe 2.5.1) und gelelektrophoretisch (siehe 2.5.2) analysiert.

Verwendete Lösungen:

LB-Medium	1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt in H ₂ O autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.	Applichem #A1553 Applichem #A1552
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0	

2.3.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus embryonalen Mausmembranen

Hierzu wurden die Membranen der zu analysierenden Embryonen mit 200 µl Dottersack-Puffer und 10 µl Proteinase K versetzt und über Nacht bei 56°C in einem Wärmebad (Memmert) inkubiert. Nach vollzogener Über-Nacht-Inkubation wurden die Proben durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Salzfällung aufgereinigt, um das im Dottersack-Puffer enthaltene EDTA und SDS zu entfernen. Würde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. Abk. für polymerase chain reaction) mit Proben, die EDTA und SDS beinhalten, durchgeführt, wäre die DNA-Polymerase in ihrer Arbeitsweise derartig behindert, dass die PCR fehlschlagen würde.

Die Phenol-Chloroform-Extraktion begann mit der Zugabe von einem Volumen Phenol (1:1-Gemisch). Daraufhin wurde so lange invertiert, bis sich das Phenol mit der DNA-Lösung vollständig vermischt hatte und als einheitliche Phase erschien. Nach einer Zentrifugation von 5 min. bei 13000 Upm (Eppendorf 5415D) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die organische

sowie die intermediäre Phase dem Phenol-Chloroform-Abfall zugeführt. Im Folgenden wurde zu dieser abgenommenen, wässrigen Phase ein Volumen Phenol/Chloroform, welches im Verhältnis 1:1 eingesetzt wurde, hinzugefügt. Erneut fand eine Invertierung bis zur Ausbildung einer einheitlichen Phase und eine Zentrifugation (5 min. bei 13000 Upm; Eppendorf 5415D) statt. Auch hiernach wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde die wässrige Phase mit einem Volumen Chloroform versetzt und die Lösung 2 min. invertiert. Nach einer weiteren Zentrifugation von 5 min. bei 13000 Upm (Eppendorf 5415D) wurde die wässrige Phase wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der DNA wurden 0,1 Volumen Natriumacetat und 3 Volumen Ethanol (abs.) hinzugefügt. Nach darauf folgendem Schütteln schloss sich eine Zentrifugation von 5 min. bei 13000 Upm (Eppendorf 5415D) an, um die DNA zu pelletieren. Weiterhin wurde so viel Ethanol wie möglich entfernt und das DNA-Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, um eventuell noch vorhandene Spuren von SDS und Phenol zu entfernen. Die Lösung wurde gevortext und zentrifugiert (1 min. bei 13000 Upm; Eppendorf 5415D). Wiederum wurde so viel Ethanol wie möglich entfernt und der Niederschlag an der Luft getrocknet. Schließlich wurde die pelletierte DNA in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Ein Teil dieser Lösung wurde in einen PCR-Ansatz zum Zweck der Genotypisierung eingesetzt (siehe 2.4), der Rest der Lösung bei 4°C gekühlt aufbewahrt.

Verwendete Lösungen:

70% EtOH 70% (v/v) EtOH in ddH₂O

Chloroform

Dottersack-Puffer 100 mM NaCl
 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 1 mM EDTA, pH 8,0
 1% SDS

EtOH abs.

Natriumacetat 3 M; pH 6

Phenol

Phenol/Chloroform 1:1

Proteinase K

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 1 mM EDTA, pH 8,0

2.3.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Schwänzen von Mausembryonen

Alternativ zur DNA-Isolierung aus Dottersäcken wurde eine Isolierung der DNA aus murinen, embryonalen Schwänzen durchgeführt, um sicherzustellen, dass eine Kontamination der embryonalen DNA mit der mütterlichen DNA unwahrscheinlicher wird. Dabei wurden die Schwänze der Mausembryonen in 200 µl Dottersack-Puffer und 10 µl Proteinase K über Nacht bei 56°C in einem Wärmebad (Memmert) inkubiert. Die anschließende Durchführung der Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Salzfällung wurde bereits in 2.3.2 beschrieben.

Verwendete Lösungen:

70% EtOH 70% (v/v) EtOH in ddH₂O

Chloroform

Dottersack-Puffer 100 mM NaCl
 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 1 mM EDTA, pH 8,0
 1% SDS

EtOH abs.

Natriumacetat 3 M; pH 6

Phenol

Phenol/Chloroform 3:1

Proteinase K

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 1 mM EDTA, pH 8,0

2.3.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Schwanzspitzen adulter Mäuse

Die Isolierung von DNA aus Schwanzspitzen adulter Mäuse wurde mit der Zugabe von 450 µl Schwanz-Puffer und 50 µl Proteinase K realisiert. Dieser 500 µl-Ansatz bestehend aus einer Schwanzspitze, Schwanzpuffer und Proteinase K wurde über Nacht bei 56°C inkubiert. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Salzfällung (siehe 2.3.2). Die schließlich erhaltene Lösung aus TE-Puffer und DNA wurde zum einen für eine PCR zur Genotypisierung (siehe 2.4), zum anderen zur Aufbewahrung bei 4°C verwendet.

Verwendete Lösungen:

70% EtOH 70% (v/v) EtOH in ddH₂O

Chloroform

EtOH abs.

Natriumacetat 3 M; pH 6

Phenol

Phenol/Chloroform 1:1

Proteinase K

Schwanz-Puffer 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 mM EDTA, pH 8,0
100 mM NaCl
1% SDS

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA, pH 8,0

2.3.5 Phenol-Chloroform-Extraktion mit nachfolgender Ethanol-Fällung

Nachdem ein bestimmtes Plasmid spezifisch linearisiert worden war, wurde der 30 µl Ansatz mit 100 µl autoklaviertem Wasser und 130 µl Phenol/Chloroform (Verhältnis: 3:1) versetzt. Dieser Ansatz wurde gründlich gemischt und zur Trennung der Phasen 7 min. bei 13000 Upm (Eppendorf 5415D) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, während die Interphase und die organische Phase verworfen wurden. Nach Zugabe von 1 ml Ethanol (abs.) und darauf folgendem Mischen wurde die Probe zum Ausfällen in -20°C für 30 min. verwahrt. Anschließend wurde die Probe für 10 min. bei 13000 Upm (Eppendorf 5415D) zentrifugiert und das Ethanol abgegossen. Daraufhin wurde das entstandene Sediment mit Ethanol (70%) gewaschen, für 3 min. bei 13000 Upm (Eppendorf 5415D) zentrifugiert und nach Verwerfen des Ethanols 10 min. offen stehend trocknen gelassen. Schließlich erfolgte eine Resuspension des Sediments in 35 µl bidestilliertem Wasser.

Verwendete Lösungen:

70% EtOH 70% (v/v) EtOH in ddH₂O

EtOH abs.

Phenol/Chloroform	3:1
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0

2.3.6 RNA-Isolierung aus embryonalen Mausherzen

Die Isolierung der kardialen RNA aus Mausembryonen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Kits der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Embryonale Herzen wurden präpariert und in 300 µl RLT-Puffer homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 3 min. bei 13000 Upm (Eppendorf 5415D) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 350 µl 70% EtOH versetzt und gründlich gemischt. Anschließend wurden 700 µl dieses Gemisches auf eine Säule gegeben, 15 sec. bei 10000 Upm (Eppendorf 5415D) zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Dieser Schritt wurde mit einem eventuellen Rest des Gemisches wiederholt. Um eine Verunreinigung der isolierten RNA mit genomischer DNA zu verhindern, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben, diese für 15 sec. bei 10000 Upm (Eppendorf 5415D) zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Danach erfolgte eine Inkubation der Säule mit 80 µl eines DNaseI-Gemisches (hergestellt nach Angaben der Produktionsfirma) für 15 min. bei 20-30°C. Weiterhin wurde die Säule erst mit 350 µl und dann mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen und jeweils 15 sec. bei 10000 Upm (Eppendorf 5415D) zentrifugiert. Desweiteren wurde die Säule 2mal mit 500 µl RPE versetzt und jeweils 15 sec. bei 10000 Upm (Eppendorf 5415D) zentrifugiert. Es folgte daraufhin noch ein Zentrifugationsschritt für 1 min. bei 10000 Upm (Eppendorf 5415D). Bis hierhin wurden alle Durchflüsse verworfen. Schließlich wurde die Säule 2mal mit 15 µl RNase freiem Wasser benetzt, jeweils 1 min. bei 10000 Upm (Eppendorf 5415D) zentrifugiert und der Durchfluß bei beiden Zentrifugationsschritten aufgefangen. Die so gewonnene RNA wurde dann mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA (engl.: complementary DNA, Abk.: cDNA) konvertiert (siehe 2.4.3) und konnte nachfolgend in eine PCR-Reaktion eingesetzt werden (siehe 2.4).

Verwendete Lösungen:

70% EtOH 70% (v/v) EtOH in ddH₂O

RNase-Free DNase Set (50)

Qiagen #79254

RNeasy Kit

Qiagen #74104

2.3.7 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe eines Spektralphotometers (Pharmacia; Ultrospec2000) wurde die quantitative Analyse der Nukleinsäuren durchgeführt. Dabei erfolgten die Messungen mit einer Verdünnungsreihe der betreffenden Nukleinsäuren (1:100; 1:200; 1:500) in einer Quarzglaszuvette (Japan Spectroscopic Co.) mit einer Schichtdicke von 1 cm. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren beträgt 260 nm. Ein gemessener Absorptionswert von 1 bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm entspricht nach Abzug des Referenzwertes für das verwendete Lösungsmittel einer Konzentration von ungefähr:

$$\begin{aligned} E_{260} \text{ dsDNA} &= 50 \mu\text{g/ml} \\ E_{260} \text{ RNA} &= 25 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

Zur Bestimmung des Verunreinigungsgrades der Nukleinsäurepräparationen wurde der Quotient der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionskoeffizienten festgestellt. Schwach verunreinigte Proben sollten Werte zwischen 1,8 und 2,0 aufweisen.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. Abk. für polymerase chain reaction; Saiki et al. 1988) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Sie dient dazu, Nukleinsäuren enzymatisch in vitro zu amplifizieren. Die entscheidende Komponente dieser Methode ist die sogenannte DNA-Polymerase. DNA-Polymerasen gehören zur Gruppe der Replikasen und spielen eine wichtige Rolle bei der Replikation von DNA. Sie wandern nach der Aufspaltung des DNA-Doppelstrangs an den DNA-Einzelsträngen entlang, wobei die Polymerasen die Verknüpfung der Nucleotidtriphosphate unter Abspaltung von Diphosphaten katalysieren. Dabei zeigen sich die DNA-Polymerasen gleichzeitig für die richtige Basensequenz des neuen Strangs mitverantwortlich, d.h., sie wählen das jeweils

zu der am Strang vorliegenden Base komplementäre Nucleotid aus. So entstehen an den beiden ursprünglichen Strängen neue DNA-Fäden, deren Basensequenz komplementär zu ihrer eigenen Sequenz ist.

Bei einer PCR wird ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende künstlich geschaffen, indem man dem Reaktionsansatz DNA-Fragmente von ca. 20 Nukleotiden Länge, sogenannte Oligonukleotide oder Primer, hinzufügt. Diese binden sequenzspezifisch an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang (Template) – dieser Vorgang wird als „Annealing“ bezeichnet - und können anschließend von der DNA-Polymerase verlängert werden. Im Folgenden denaturiert man die neu synthetisierte doppelsträngige DNA durch eine Temperaturerhöhung in deren Einzelstränge, wodurch neue Primermoleküle binden können. Somit beginnt der Zyklus erneut. Gibt man in einen PCR-Ansatz ein Primerpaar, wobei ein Primer an dem einen Strang bindet, während sich der andere Primer an den Gegenstrang heftet, so erhält man mit jedem Zyklus von Neusynthese und Denaturierung eine Verdoppelung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts. Die PCR bietet somit die Möglichkeit einer exponentiellen Amplifikation, da auch die neu gebildeten Stränge als Matrize zur Verfügung stehen. Zusammengefasst lässt sich die PCR in folgende drei Phasen einteilen:

- I) Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge
- II) Primer-Annealing: Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA
- III) Primer-Elongation: Verlängerung der Primer durch die DNA-Polymerase

Um eine automatisierte und ununterbrochene Durchführung der PCR zu ermöglichen, sind alle heutzutage eingesetzten DNA-Polymerasen hitzestabil. Für die hier vorliegende Arbeit wurde ausschließlich die sogenannte *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Sie besitzt ein Temperaturoptimum von 75°C und eine Halbwertszeit von 5 min bei 100°C. Dieser DNA-Polymerase fehlt eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität. Die *Taq*-Polymerase hängt ein überstehendes Adenosin an das 3'-Ende der Produktstränge an, sodass die entstehenden PCR-Produkte effektiv in TA- oder UA-Vektoren kloniert werden können.

2.4.1 PCR-Amplifikationen

Alle PCR-Reaktionen wurden in dünnwandigen 0,2 ml-Reaktionsgefäßen angesetzt und in Eppendorf- (Mastercycle Gradient) oder MWG- (Primus 25) Maschinen durchgeführt. Für alle Reaktionen wurden die GoTaq-Polymerase mit dem dazugehörigem Puffersystem (Promega #M830B) oder die P-Taq-Polymerase (im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf nach dem Protokoll von Pluthero et al., 1993 hergestellt) verwendet.

Es wurden Standardansätze mit einem Volumen von 20 µl bzw. 50 µl eingesetzt:

Tabelle 2.1: PCR-Ansätze

	20 µl Ansatz	50 µl Ansatz
DNA (Template)	1 µl	3 µl
PCR-Puffer (10x)	4 µl	5 µl
dNTP (je 10 mM)	0,4 µl	1 µl
Primer1 (10 pmol/µl)	1 µl	3 µl
Primer2 (10 pmol/µl)	1 µl	3 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl	0,25 µl
H ₂ O (autoklav.)	12,5 µl	34,75 µl

Im Allgemeinen wurden für eine Standard-PCR folgende Reaktionsbedingungen festgelegt:

Tabelle 2.2: PCR-Reaktionsbedingungen

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Zeit
1) Initiale Denaturierung	1x	95°C	2 min.
2) Denaturierung	} 35x	94°C	30 sec.
3) Primer-Hybridisierung		56-72°C (Primer-abhängig)	30 sec.
4) Polymerisation		72°C	45 sec.
5) Abschließende Polymerisation	1x	72°C	7 min.

Die PCR-Reaktionen konnten anschließend bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei 4°C gelagert werden.

Verwendete Lösungen:

dNTP-Gemisch	10 mM dATP	Roche #1969064
	10 mM dCTP	
	10 mM dGTP	

	10 mM dTTP	
H ₂ O	autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.	
Oligonukleotide	100 pmol/μl in H ₂ O	MWG Biotech
Taq-Polymerase	5 U/μl	
PCR-Puffer	10x	

2.4.2 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Für Genotypisierungen wurden folgende Primer verwendet:

Tabelle 2.3: Sequenzen der Genotypisierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')	Referenz
KO2f	GGCCTCCCCTTTGTCAT	Jeanette Vierkotten
KONEOf	ACGAGTTCTTCTGAGGGGATC	Jeanette Vierkotten
KO2r	CAGCTTTCCTTGTGTCTCTACTT	Jeanette Vierkotten
Gli3_int13_for	GGCCCAAACATCTACCAACACATA	Patrick Hill
Gli3_int14_rev	CTGGCCCACTGAAAGGAAAAGAA	Patrick Hill
XtJ-580-for	TACCCAGCAGGAGACTCAGATTAG	Patrick Hill
XtJ-580-rev	AAACCCGTGGCTCAGGACAAG	Patrick Hill

Tabelle 2.4: Allel-Primerpaar-Relation

nachzuweisendes Allel	verwendetes Primerpaar
<i>Ftm</i> ⁺ -Allel	KO2f – KO2r
<i>Ftm</i> ⁻ -Allel	KONEOf – KO2r
<i>Gli3</i> ⁺ -Allel	Gli3_int13_for – Gli3_int14_rev
<i>Gli3</i> ⁻ -Allel	XtJ-580-for – XtJ-580-rev

Für semiquantitative PCR-Analysen waren nachstehende Primer in Gebrauch:

Tabelle 2.5: Primersequenzen für semiquantitative PCR-Analysen

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')
Hprt_for	CACAGGACTAGAACACCTGC
Hprt_rev	GCTGGTGAAAAGGACCTCT
Cyclin E_for	CTGGCTGAATGTTTATGTCC
Cyclin E_rev	TCTTTGCTTGGGCTTTGTCC
p27_for	AACCTCTTCGGCCCGGTGGACCAC
p27_rev	GTCTGCTCCACAGAACCGGCATTT

2.4.3 Reverse Transkription

Mit Hilfe reverser Transkription (Kogan et al., 1987) erfolgt die Synthetisierung von komplementärer DNA (complementary DNA, Abk.: cDNA) aus RNA. Die Durchführung der reversen Transkription wurde durch die Verwendung des „Expand Reverse Transcriptase“-Systems (Roche #11785826001) realisiert. Es wurden 100ng bis 2µg Total-Herz-RNA und 25pmol Oligo(dT)-Oligonukleotide (Sequenz: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT T-3') eingesetzt. Die Analyse wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Alle in diesem Verfahren benötigten Inkubationsschritte erfolgten in Thermocyclern (Eppendorf Mastercycler Gradient oder MWG-Primus25).

Verwendete Lösungen:

Expand Reverse Transcriptase

Roche #11785826001

Oligo(dT)-Oligonukleotide

MWG

2.4.4 „Real-Time“-PCR-Untersuchungen

Die sogenannte „Real-Time“- (engl. für „Echtzeit“-) PCR basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (siehe 2.4) und ermöglicht die Quantifizierung der gewonnenen DNA in der exponentiellen Phase von Zyklus zu Zyklus. Daher unterscheidet sich diese PCR-Methode von anderen quantitativen PCR-Methoden,

bei welchen eine quantitative Auswertung erst nach Ablauf der PCR-Reaktion via gelelektrophoretischer Auftrennung (siehe 2.5.2) erfolgt. Die Quantifizierung bei der „Real-Time“-PCR geschieht durch Fluoreszenz-Messungen, die am Ende der Elongation in jedem Zyklus stattfinden. Dabei nimmt die Fluoreszenz mit der Menge der PCR-Produkte zu, denn die neu synthetisierte DNA wird fluoreszierend markiert. Um diese Markierung zu erreichen, werden verschiedene Methoden, Farbstoffe und Sonden verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden sogenannte TaqMan-Sonden (auch bekannt als Hydrolyse-Sonden) gebraucht, die eine Fluoreszenzmessung aufgrund eines „Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) ermöglichen. Dabei wird ein Donor-Fluorochrom (im Falle der TaqMan-Sonden als „Reporter“ bezeichnet) durch eine Lichtquelle angeregt und gibt daher einen Teil seiner Energie an ein in der Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (bei TaqMan-Sonden „Quencher“ genannt) ab. Wird der Abstand zwischen Donor und Akzeptor größer, so nimmt FRET bzw. das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, das des Donors jedoch zu. Der Vorteil von FRET ist die hohe Spezifität des Assays. Eine TaqMan-Sonde besitzt an einem Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff, am anderen Ende einen Quencher. Wenn die Taq-Polymerase, die außer ihrer Polymeraseaktivität noch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität aufweist, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, kommt es zu einer immer größer werdenden Distanz zwischen Quencher und Fluorophor. Dies führt zur Messung einer steigenden Reporter-Fluoreszenz.

Als Template der, in dieser Arbeit durchgeführten, „Real-Time“-PCR-Analysen diente jeweils aus murinen Embryoherzen (E11.5) gewonnene cDNA. Um die RNA zu isolieren, die dann durch reverse Transkription (siehe 2.4.3) in cDNA konvertiert wurde, wurden Embryonen präpariert (siehe 2.1) und deren Herzen isoliert. Es erfolgte eine Auftrennung dieser Herzen in je einen ventrikulären und einen atrialen Teil, sowie eine Isolierung der RNA aus diesen Herzteilen (siehe 2.3.6). 50 ng ventrikuläre oder atriale cDNA wurde in ein Gemisch bestehend aus TaqMan Universal PCR Master Mix, TaqMan Assay (Gen-spezifische Primer + Sonde) und H₂O gegeben.

Ein Standard-Ansatz hatte dabei folgendes Format:

- 3 µl cDNA
- 6 µl H₂O

- 10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix
- 1 µl TaqMan Assay (Gen-spezifischer Primer + Sonde)

Folgende TaqMan Assays wurden verwendet:

Tabelle 2.6: Bestellnummern der verwendeten TaqMan Assays:

Name des Gens	Hersteller	Bestellnummer des TaqMan Assays
<i>Gapdh</i>	Applied Biosystems	Mm99999915_g1
<i>Ptc1</i>	Applied Biosystems	Mm00970977_m1
<i>Isl1</i>	Applied Biosystems	Mm00627860_m1
<i>Postn</i>	Applied Biosystems	Mm01289595_m1
<i>Hif1α</i>	Applied Biosystems	Mm00468878_m1

Die „Real-Time“-PCR erfolgte im „StepOne Real-Time PCR System Thermal Cycling Block“ (Applied Biosystems #4376357). Alle Proben wurden dabei als Triplikate gemessen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen und die Resultate somit zu verifizieren. Die Messwerte wurden als sogenannte Ct-Werte (Cycle Threshold, zu deutsch: Schwellenwert-Zyklus) angegeben, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Die Quantifizierung der „Real-Time“-PCR-Daten wurde relativ realisiert. Dabei erfolgte die Berechnung mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, bei welcher eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktionen die entscheidende Rolle spielt. Die Ct-Werte werden bei dieser Methode voneinander subtrahiert. Die sich dabei ergebenden ΔCt -Werte der einzelnen Gruppen (wildtypisches oder *Ftm*-negatives Mausherz) werden anschließend erneut voneinander abgezogen, wodurch der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert ermittelt wird. Dieser wird in die Gleichung „n-fache Expression (wildtypisches Herz zu *Ftm*-defizientem Herz) = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ “ eingesetzt.

Verwendete Lösungen:

TaqMan Universal PCR Master Mix

Applichem #A1091

2.5 Klonierung

2.5.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) werden aus Bakterien gereinigt und hydrolysieren die DNA-Doppelhelix an spezifischen Stellen, die durch die lokale Nucleotidsequenz definiert werden. Dies ermöglicht es, ein langes, doppelsträngiges DNA-Molekül in Fragmente von genau definierter Länge zu zerlegen. Dabei zeigen unterschiedliche Restriktionsendonukleasen verschiedene Sequenzspezifitäten.

In dieser Arbeit wurden die zur Spaltung der DNA verwendeten Restriktionsenzyme i.d.R. von Roche oder NEB bezogen und zusammen mit dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Pro μg DNA wurden 1-10 U Enzym in 1x Enzympuffer verwendet. Die Inkubationsdauer lag je nach Enzym zwischen 2 und 15 Stunden und die Inkubationstemperatur bei 37°. Für einige Enzyme war eine andere Inkubationstemperatur zu wählen, die den Angaben des Herstellers entnommen wurde. Anschließend wurde der Restriktionsansatz in der Regel gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5.2). Die sequenzspezifischen Spaltungen durch Restriktionsendonukleasen wurden durchgeführt, um 1) Plasmide für die *in situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitten (siehe 2.7) zu linearisieren, 2) die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide zu ermöglichen (siehe 2.5.4) und 3) eine analytische Spaltung zur Kontrolle der Richtigkeit bestimmter Vorgänge wie z.B. von Plasmid-Mini-Isolation (siehe 2.3.1.1), Plasmid-Maxi-Isolation (siehe 2.3.1.2) usw. zu bewerkstelligen.

2.5.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA (engl. Abk. für Desoxyribonukleinsäure)-Molekülen (PCR-Produkten, linearisierten Plasmiden, RNA-Sonden) erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Bei diesem Verfahren werden die DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Aufgrund der negativen Ladung von DNA-Molekülen, wandern diese in Richtung Anode (positiv geladener Pol). Die Laufgeschwindigkeit der DNA-Moleküle ist dabei unter anderem von ihrer Größe abhängig. Dies bedeutet, dass kleinere Moleküle schneller zur Anode wandern als größere. Es

wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8 bis 2% (w/v) (jeweils abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente) in TAE-Puffer verwendet. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE-Puffer. Der aufgekochten Agaroselösung wurden 0,5µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und die zu analysierenden Proben vor Beladung des Gels mit 0,2 Volumen DNA-Auftragspuffer vermischt. Zur späteren Größen- und Mengenabschätzung der DNA-Fragmente wurde außerdem folgende, ebenfalls mit DNA-Auftragspuffer vermischte und restriktionsenzymatisch gespaltene, DNA als Längenstandard aufgetragen:

1kb-DNA-Leiter: 12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506; 517; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp (GibcoBRL #15615-024)

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte schließlich bei einer konstant gehaltenen Spannung von 5 Volt/cm bei Raumtemperatur. Die DNA-Fragmente wurden im Anschluss durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht (254nm) sichtbar gemacht und mit einer PC-gestützten Videodokumentationsanlage fotografiert.

Im Falle einer Verwendung der DNA-Moleküle für eine Ligation (siehe 2.5.4), wurde die DNA-Bande mit energieärmerem UV-Licht aus einer Hand-UV-Lampe (Konrad Benda) bei 366 nm detektiert, um Veränderungen der DNA-Sequenz zu verhindern, und aus dem Agarosegel herausgeschnitten (siehe 2.5.3).

Verwendete Lösungen:

Agarose		Applichem #A1091
Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerin 2% (w/v) Orange G in TAE	Merck #14277
Ethidiumbromid	10 mg/ml	Applichem #A1152
TAE	40 mM Tris/Acetat 2 mM EDTA, pH 8.2	

2.5.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierenden DNA-Fragmente konnten durch das interkalierte

Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Hand-UV-Lampe, 366 nm) und wurden möglichst exakt mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Glasmilch-Methode (Vogelstein und Gillespie, 1979). Es wurde dazu das JetSorb Gel Extraction Kit/600 der Genomed GmbH verwendet. Die ausgeschnittenen, sich nun in einem Eppendorf-Gefäß (2 ml) befindenden, Gelstücke wurden gewogen und mit 300 µl Puffer A1 pro 0,1 mg Agarosegel versetzt. Anschließend wurden 15 µl der JetSorb-Suspension (Glasmilch-Suspension) zugefügt und der gesamte Ansatz bei 56°C für 10 min. bei 1400 Upm auf dem Schüttler (Eppendorf Thermomixer compact) inkubiert. Im Folgenden wurde der Ansatz für 15 sec. bei 13000 Upm zentrifugiert (Eppendorf 5415D). Die an den Glaskügelchen gebundene DNA befand sich nach der Zentrifugation im Sediment. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das Sediment mit 500 µl Puffer A1 gewaschen. Das Pellet wurde im Puffer durch langsames Auf- und Abpipettieren resuspendiert und daraufhin erneut für 15 sec. bei 13000 Upm zentrifugiert (Eppendorf 5415D). Der Überstand wurde zum wiederholten Mal mit einer Pipette abgesaugt. Es folgten weitere zwei Waschschriffe mit 500 µl Puffer A2 und jeweils 15 sec. Zentrifugation bei 13000 Upm (Eppendorf 5415D). Das JetSorb-Pellet wurde anschließend getrocknet, indem das Eppendorf-Gefäß geöffnet für 1 min. bei 56°C in einen Heizblock (Eppendorf Thermomixer compact) gestellt wurde. Schließlich wurde das Pellet in 20 µl TE-Puffer resuspendiert und für 5-10 min. bei 56°C und 1400 Upm inkubiert (Eppendorf Thermomixer compact). Der Ansatz wurde dann 15 sec. lang bei 13000 Upm zentrifugiert (Eppendorf 5415D). Die im Überstand gelöste DNA wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Überprüfung der Qualität und Konzentration der isolierten DNA wurde eine Gelelektrophorese (siehe 2.5.2) durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

JetSorb Gel Extraction Kit/600

Genomed GmbH #110600

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA, pH 8,0

2.5.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA erfolgte durch die T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym ist in der Lage, unter ATP-Verbrauch, die Bindung einer 3'-OH-Gruppe mit einer 5'-Phosphatgruppe an den Enden eines jeweiligen DNA-Stranges zu katalysieren, so dass eine Phosphodiesterbindung zwischen den beiden Enden entsteht. Für die Ligation von durch die *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-DNA-Fragmenten, wurde das pGEM-T Vektorsystem (Promega #A3600) genutzt. Dieser Vektor liegt bereits in linearer Form vor und besitzt an beiden Enden einen 3'-Thymidin-Überhang. Da die mittels der *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Fragmente einen 5'-Adenin-Überhang aufweisen, ist eine Ligation mit dem T-Vektor unverzüglich möglich. Für einen 20 µl-Ansatz wurden 1 µl (3 U) T4-Ligase, 10 µl 2x Rapid Ligation Buffer (Promega) und 1 µl T-Vektor (50 ng) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 13 Stunden bei 14°C. Im Anschluss wurde die Hälfte des Ligationsansatzes für die Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt. Der Rest wurde bei -20°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

H₂O autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.

pGEM-T Vektorsystem Promega #A3600

2.5.5 Transformation von Plasmiden in *Escherichia coli*

2.5.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Als Wirt wurde der *Escherichia coli* Stamm JM109 (recA1, lacZΔM15) verwendet. Die Herstellung der transformationskompetenten Bakterien erfolgte nach dem Protokoll von Inoue, H. et al. (1990). Zu Beginn wurde eine Vorkultur durch Zugabe einer Einzelkolonie in 20 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln auf einem Plattformschüttler (120 Upm) inkubiert. Diese diente als Inokulum für eine 250 ml-Hauptkultur in SOB-Medium. Die Inkubation dieser Kultur fand bei Raumtemperatur statt, bis eine OD₆₀₀ = 0,93 erreicht wurde. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 min. auf Eis gekühlt. Es folgte eine Zentrifugation von 10 min. bei 2500 x g (Heraeus, Megafuge 1.0R) und 4 °C. Das erhaltene Bakteriensediment wurde daraufhin in 80 ml eiskaltem TB-Puffer

resuspendiert und in gleicher Art und Weise wie zuvor zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension in 20 ml eiskaltem TB-Puffer und Zugabe von DMSO zu einer Endkonzentration von 7% (v/v), wurden die Bakterienzellen für 10 min. auf Eis inkubiert. Schließlich erfolgte die Schockgefrierung der Zellen als 200 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff und die Lagerung bei –80°C.

Verwendete Lösungen:

LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
	1% (w/v) Trypton	Applichem #A1553
	0,5% (w/v) Hefe-Extrakt in H ₂ O	Applichem #A1552
	autoklav., 121°C, 2 bar, 30 min.	
SOB-Medium	2% (w/v) Trypton	Applichem #A1553
	0.5% Hefe-Extrakt	Applichem #A1552
	10 mM NaCl	
	2.5 mM KCl	
	10 mM MgCl ₂	
	10 mM MgSO ₄ pH 6.7-7	
TB-Puffer	10 mM PIPES	
	55 mM MnCl ₂	
	15 mM CaCl ₂	
	250 mM KCl	
	pH 6.7	

2.5.5.2 Transformation

Zur Transformation wurden die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der Plasmid-DNA (20-100 ng) für 13 min. auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien einem kurzem Hitzeschock (45 sec. bei 42°C) unterzogen und für 3 min. erneut auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium erfolgte eine Inkubation der Bakterienzellen für 30-45 min. bei 37°C unter leichtem Schütteln (1400 Upm) und anschließend eine Zentrifugation bei 6000 Upm (3min.; Eppendorf 5415D). Der daraufhin entstandene Überstand wurde bis auf ca. 100 µl abgenommen und die sedimentierten Bakterienzellen in den verbleibenden 100 µl Überstand resuspendiert. Diese Resuspension wurde auf antibiotikahaltigen Selektivnährböden ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die herangewachsenen Bakterienkolonien transformierter Zellklone wurden für das Animpfen von Flüssigkulturen verwendet (siehe 2.3.1.1), welche in erster Linie der Analyse der Klone dienten und die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA ermöglichten.

Verwendete Lösungen:

LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
	1% (w/v) Trypton	Applichem #A1553
	0,5% (w/v) Hefe-Extrakt	Applichem #A1552
	in H ₂ O autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.	
Nährböden	1.5% (w/v) Bacto-Agar	Applichem #A0949
	50 µg/µl Ampicillin	Applichem #A0839
	in LB-Medium	

2.6 Histologische Techniken

2.6.1 Paraffindünnschnitte

Nach Präparation der Embryonen (siehe 2.1) wurden diese über Nacht bei 4°C (leicht schüttelnd) in 4% PFA fixiert und anschließend durch Inkubation für jeweils 1,5 Stunden in 70%, 80%, 90% und 100% Ethanol unter leichtem Schütteln entwässert. Danach wurden sie in 1-Butanol überführt und nach Inkubation über Nacht zunächst für mindestens 4 Stunden in flüssigem Paraplast (Paraplast Plus; Roth #X881.2) inkubiert. In dem Inkubationsbehälter wurde dann ein Vakuum erzeugt und weitere 2 Stunden inkubiert. Im Anschluss konnten die Präparate ausgerichtet und eingebettet werden. Nach Aushärtung über Nacht wurden an einem Mikrotom (Leica RM 2035) 12-14 µm dicke Paraffindünnschnitte hergestellt. Diese wurden zur Streckung in ein Wasserbad (45°C, GFL 1052) überführt und auf Objektträger gebracht (SuperFrost Plus, Menzel Gläser; Roth #H867.1 oder Super Frost Grün; Roth #2109). Zur vollständigen Streckung und Antrocknung auf dem Objektträger erfolgte eine Inkubation auf einer Streckbank (30-60 min. 45°C; OMNILAB Jürgens) und eine Trocknung für 2 Stunden bei 37°C. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Objektträger bei Raumtemperatur (Hämalaun-Eosin-Färbung; siehe 2.6.3) oder bei 4°C (*in situ*-Hybridisierung auf Paraffindünnschnitten; siehe 2.7) gelagert werden.

Verwendete Lösungen:

1-Butanol

70% EtOH 70% (v/v) EtOH in ddH₂O

80% EtOH 80% (v/v) EtOH in ddH₂O

90% EtOH	90% (v/v) EtOH in ddH ₂ O
96% EtOH	96% (v/v) EtOH in ddH ₂ O
100% EtOH	100% (v/v) EtOH in ddH ₂ O
ddH₂O	
Paraformaldehyd	4% (w/v) PFA in PBS

2.6.2 Gefrierdünnschnitte

Nach Präparation der Embryonen (siehe 2.1) wurden diese 90 min. bei 4°C (leicht schüttelnd) in 4% PFA fixiert und anschließend über Nacht bei 4°C (leicht schüttelnd) in 30 % Sucrose/PBS inkubiert. Am nachfolgenden Tag erfolgte die Einbettung der Embryonen in O.C.T.. Die eingebetteten Embryonen wurden dann auf Trockeneis gefroren, so dass das O.C.T. aus dem zuvor flüssigem in den festen Aggregatzustand gelangte. Die Versuchsobjekte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Anfertigung der 7µm dicken Gefrierdünnschnitte erfolgte mit Hilfe eines Kryostats (Leica CM 3050S). Die Kryostatschnitte wurden mittels Objektträgern (SuperFrost Plus, Menzel Gläser; Roth #H867.1) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

O.C.T.	Sakura Finetechnical #4583
Paraformaldehyd	4% (w/v) PFA in PBS

2.6.3 Hämalaun/Eosin-Färbung

Die sogenannte Hämalaun/Eosin-Färbung (HE-Färbung) stellt eine histologische Färbung dar, die Zellkerne blau, Cytoplasma blass rot, kollagene Bindegewebefasern rot, elastische Bindegewebefasern blass rosa-rot, Muskelgewebe rot und Erythrozyten rot-orange färbt. Hämalaun ist dabei der positiv geladene Farbstoff, der negativ geladene Strukturen eine blaue Färbung verleiht, während Eosin eine negative Ladung aufweist und zur Gegenfärbung alle übrigen Strukturen in verschiedenen Rot-Tönen färbt.

Die sich auf einem Objektträger (Super Frost Grün; Roth #2109) befindlichen Paraffindünnchnitte wurden zunächst zweimal 4 min. in Xylol, einmal 3min. in

Ethanol (abs.) und je 2 min. in 90%, 70%, 50% und ddH₂O entparaffiniert. Anschließend erfolgte die Färbung durch Hämalaun (2 min.) und ein Waschschrift unter fließendem Leitungswasser (ca. 10 min.). Desweiteren wurden die Schnitte kurz in ddH₂O eingetaucht, 20 sec. in Eosin gegengefärbt und erneut kurz in ddH₂O gebracht. Ferner wurden die Schnitte in 70%, 90% und 100% EtOH entwässert (jeweils 2 min.) sowie 3 min. in Xylol inkubiert. Schließlich erfolgte die Eindeckelung mit Hilfe von Entellan. Dazu wurden die Objektträger dem Xylol entnommen, mit Entellan-Eindeckelmedium versehen und mit Deckgläschen (24x60mm; Menzel-Gläser #1) bedeckt. Zum Trocknen wurden die Objektträger auf einen ebenen Untergrund gelegt.

Verwendete Lösungen:

50% EtOH	50% (v/v) EtOH in ddH ₂ O	
70% EtOH	70% (v/v) EtOH in ddH ₂ O	
90% EtOH	90% (v/v) EtOH in ddH ₂ O	
ddH₂O		
Entellan		Merck #1.07961.0500
Eosin	96% (v/v) Ethanol 2% (w/v) Eosin G 1% (v/v) Essigsäure nach dem Lösen filtriert	Merck #1.15935.0100
EtOH	abs.	
Hämalaun	Mayers Hämalaun Lösung (1:4)	Merck #1.09249.2500
Xylol		

2.7 In situ-Hybridisierung

Mit Hilfe der sogenannten *In situ*-Hybridisierung ist die Detektion von Transkripten an ihrem Syntheseort im Gewebe möglich, indem die Hybridisierung mit einer markierten, komplementären RNA-Sonde durchgeführt wird. Der Nachweis dieser Sonde wird mittels spezifischer, Enzym-gekoppelter Antikörper und einer nachfolgenden Farbreaktion bewerkstelligt.

2.7.1 Synthese von RNA-Sonden

Für die hier beschriebene *In situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitten wurden Komplementär-RNA-Sonden synthetisiert. Zu diesem Zweck wurde ein 20 µl Ansatz gewählt, der aus ca. 1 µg des zuvor linearisierten Plasmids, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 2 µl 10x DIG-Nukleotid-Mix (für die Synthese von Digoxigenin markierten Sonden), 1 µl RNase Block, 2 µl RNA-Polymerase (T3: Roche #1031163; T7: Roche #881767; SP6: Roche #810274) und DEPC-H₂O bestand und für eine Dauer von zwei Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde der Ansatz mit 2,5 µl LiCl (4 M), 2 µl EDTA (0,5 M; pH 8,0) und 75 µl Ethanol (abs.) zur Fällung der RNA versetzt, durchgemischt und für mindestens 30 min. bei -20°C belassen. Es folgte eine Zentrifugation des Ansatzes für 10 min. bei 13000 Upm und 4°C (Heraeus Biofuge 13). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte dabei eine erneute Zentrifugation (Heraeus Biofuge 13), um die RNA zu pelletieren. Schließlich wurde die RNA kurz auf Eis an der Luft getrocknet und in 60 µl 50%igem Formamid resuspendiert. Ein Aliquot der RNA-Sonde (~ 2 µl) wurde gelelektrophoretisch (siehe 2.1) überprüft, während die restliche Sonde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde.

Verwendete Lösungen:

50% Formamid	50% (v/v) Formamid 50% (v/v) DEPC-H ₂ O	
DEPC-H₂O	H ₂ O + 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht gelöst; autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	Sigma #D-5758
EDTA	0,5 M; pH 8,0	
LiCl	4M	
EtOH	abs.	
70% EtOH	70% (v/v) EtOH in DEPC-H ₂ O	
Transkriptionspuffer	10x	Roche #1465384
DIG-Nukleotid-Mix		Roche #1277073
RNase Block		Stratagene #300152-51
Sp6 RNA-Polymerase		Roche #810274

T3 RNA-Polymerase

Roche #1031163

T7 RNA-Polymerase

Roche #881767

2.7.2 *In situ*-Hybridisierung auf Paraffindünnschnitten

Die *in situ*-Hybridisierung auf Paraffindünnschnitten ermöglicht es, Transkripte in Geweben oder Organen auf zuvor angefertigten Paraffindünnschnitten nachzuweisen. Nach der Herstellung der Paraffindünnschnitte (siehe 2.6.1) wurde zunächst das Paraffin von den Präparaten entfernt. Dies geschah durch folgende Inkubationschritte:

3 x 7 min.	Xylol
2 min.	Xylol/Ethanol
2 x 2 min.	Ethanol (abs.)
je 1 min.	96%, 90%, 70%, 50% Ethanol
5 min.	PBS

Zur Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurde nochmals 5 min. in PBS gewaschen und für 13-15 min. bei 37°C in Proteinase K inkubiert. Im Anschluss wurde die Proteinase K genau 5 min. in Glycin inaktiviert. Es folgten zwei Waschschriffe für jeweils 5 min. in PBS und eine Nachfixierung der Präparate für 20 min. bei Raumtemperatur in PFA/Glutaraldehyd. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min. in PBS wurden die Gewebeschnitte auf dem Objektträger (SuperFrost Plus; Roth #H867.1) möglichst nah mit einem Fettstift (ImmEdge Pen; Vektor Laboratories Inc. #H-4000) umrandet und in eine H₂O-gesättigte Kammer gelegt. Danach wurde jeder Gewebeschnitt mit Hybridisierungsmix bedeckt und mindestens zwei Stunden bei 70°C vorhybridisiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch den RNA-Sonde-haltigen (~1ng/μl) Hybridisierungsmix ersetzt und über Nacht bei 70°C inkubiert.

Um unspezifisch gebundene RNA-Sonde zu entfernen, wurden die Präparate am nächsten Tag kurz mit 2x SSC ab gespült und im Anschluss jeweils einmal für 30 min. in 50% Formamid/2x SSC (bei 65°C) bzw. PBT (bei Raumtemperatur) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine mindestens einstündige Inkubation mit B-Block-Lösung, die anschließend gegen den AP-gekoppelten anti-DIG Antikörper (1:1000 in B-Blocklösung) getauscht wurde. Die Antikörperinkubation erfolgte für 2 Stunden bei 37°C. Zum Entfernen unspezifisch gebundenen Antikörpers

wurden die Schnitte dreimal für 5 min. schüttelnd mit PBT gewaschen. Weiterhin wurde zweimal für 5 min. in NTM inkubiert und schließlich die Färbelösung zur Detektion des Antikörpers auf die Schnitte gegeben. Nachdem die Färbung das gewünschte Ausmaß angenommen hatte, wurde die Farbreaktion mit Hilfe von ddH₂O gestoppt. Zum Eindeckeln wurden die Objektträger (SuperFrost Plus; Roth #H867.1) mit dem Eindeckelmedium Aquatex versehen und mit einem Deckgläschen (24x60mm; Menzel-Gläser #1) bedeckt. Zum Trocknen wurden sie auf einen ebenen Untergrund gelegt.

Verwendete Lösungen:

50% EtOH	50% (v/v) EtOH in ddH ₂ O	
50%Formamid/ 2x SSC	50% (v/v) Formamid 2x SSC, pH 4,5 in ddH ₂ O	
70% EtOH	70% (v/v) EtOH in ddH ₂ O	
90% EtOH	90% (v/v) EtOH in ddH ₂ O	
96% EtOH	96% (v/v) EtOH in ddH ₂ O	
AP-gekoppelter anti-DIG Antikörper		Roche #1093274
Aquatex		Merck #1.08562.0050
B-Block-Lösung	2% Blockreagenz 10% Ziegen Serum in PBT	Roche #1096176
EtOH	abs.	
Färbelösung	2% (v/v) NBT/BCIP in NTMT	Roche #1681451
Glycin	0,2% (w/v) Glycin in PBS	
Hybridisierungsmix	2,5 ml Formamid 1,25 ml 20x SSC 50 mg Blockreagenz 295 ml bidestilliertes Wasser bei 65°C lösen 50 µl 0,5 M EDTA 5 µl Tween-20 50 µl CHAPS (10%) 100 µl Heparin (1 mg/ml) 500 µl Hefe – tRNA (10 mg/ml)	Roche #1096176
NTM	100 mM Tris pH 9.5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂	
NTMT	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 9.5 50 mM MgCl ₂	

	0,5% (v/v) Tween-20 0,2 mg/ml Levamisole	Sigma #L9756
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7.3 autoklav., 121°C, 2bar; 30 min.	
PFA/Glutaraldehyd	4% (w/v) PFA 0,2% (v/v) Glutaraldehyd in PBS	
Proteinase K	20 µg/ml in PBS	
SSC	2x, pH 4,5	
Xylol		
Xylol/EtOH	50% (v/v) Ethanol abs. 50% (v/v) Xylol	

2.8 Antikörperfärbung auf Gefrierdünnschnitten

Nachdem das Mausweibchen durch Strecken getötet und die Embryonen isoliert worden waren (siehe 2.1), wurden die Embryonen in O.C.T. (Sakura Finetechnical #4583) eingebettet und am Kryostat (Leica CM 3050S) geschnitten (siehe 2.6.2). Die Antikörperfärbung begann mit dem Umranden der Schnitte mit Hilfe eines Fettstifts (ImmEdge Pen; Vektor Laboratories Inc. #H-4000). Die Kryostatschnitte wurden weiterhin zweimal 15 min. (wippend) in PBT inkubiert und 30 min. in 10% fötalem Kälberserum (engl. Abk.: FCS) (in PBT) blockiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht im jeweiligen Primärantikörper (siehe Tabelle 2.7) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kryostatschnitte dreimal 15 min. in PBT gewaschen und nachfolgend 2-2,5h im Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2.8) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zwei abschließenden, 10minütigen Waschsritten in PBT (ebenfalls im Dunkeln) erfolgte die Eindeckelung der Kryostatschnitte mittels Mowiol. Zur Anfärbung der Zellkerne enthielt das Mowiol 4', 6-diamidino-2-phenylindol, Dihydrochlorid (DAPI). Schließlich härtete das Mowiol über Nacht aus und die Objektträger (SuperFrost Plus; Roth #H867.1) wurden im Dunkeln bei -20°C gelagert.

Die folgenden Erstantikörper wurden in Immunofluoreszenz-Analysen gebraucht:

Tabelle 2.7: Verwendete Primärantikörper

Name	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
anti-acetyliertes α -Tubulin	1:2000	Sigma	T-6793
anti-DDR2	1:200	Edie C. Goldsmith	-
anti-ErbB3	1:50	Santa Cruz	sc-285
anti-Ftm	1:200	EMT*	-
anti-Gli3-190	1:200	EMT*	-
anti-IFT88	1:100	Gregory Pazour	-
anti-Kif3a	1:100	Santa Cruz	sc-50457
anti-LRD	1:200	Martina Brueckner	-
anti-Pdgfr α	1:20	Santa Cruz	sc-338
anti-pMEK1/2	1:200	Cell Signaling Tech.	9121
anti-Tropomyosin	1:200	AbD SeroTec	9200-0504
anti- γ -Tubulin	1:2000	Sigma	T-6557
anti-Vangl2	1:100	Santa Cruz	sc-67136

* Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Diese Sekundärantikörper wurden in den Immunfluoreszenz-Analysen verwendet:

Tabelle 2.8: Verwendete Sekundärantikörper

Name	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Cy TM 2-konjugiert Esel anti-Maus IgG	1:200	Dianova	715-225-151
Cy TM 3-konjugiert Esel anti-Kaninchen IgG	1:200	Dianova	711-165-152
Cy TM 3-konjugiert Esel anti-Ziege IgG	1:200	Dianova	705-165-147

Verwendete Lösungen:

DAPI	DAPI-Reagenz in PBS (0,1 μ g/ml)	Merck #1.24653
Fötiales Kälberserum (FCS)	10% (v/v) in PBS	
Mowiol	5g Mowiol in 20 ml PBS lösen 10 ml Glycerin 15 min. bei 12000 Upm zentrifugieren	
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.	
PBS-T	PBS +1% (v/v) Triton-X-100	Sigma #234729

2.9 BrdU-Analysen

Bromodeoxyuridin (BrdU) stellt ein chemisches Analog zu Thymidin bzw. Desoxyuridin dar und wird während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Eingebautes BrdU kann immunologisch durch den Gebrauch spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Somit ist die BrdU-Analyse eine Methode, die es erlaubt, eine stattgefundene DNA-Synthese, also Zellproliferation, immunhistochemisch zu detektieren.

Es wurden 0,01 g BrdU abgewogen und in 1 ml BrdU-Injektionslösung gelöst. 10 µl der Lösung pro g Körpergewicht wurden einer trächtigen Maus intraperitoneal injiziert. 2 Stunden nach der Injektion wurde das Mausweibchen durch Strecken getötet und die Embryonen isoliert (siehe 2.1). Die Embryonen wurden in O.C.T. (Sakura Finetechnical #4583) eingebettet und am Kryostat (Leica CM 3050S) geschnitten (siehe 2.6.2).

Zunächst erfolgte die Umrandung der Schnitte mit Hilfe eines Fettstifts (ImmEdge Pen; Vektor Laboratories Inc. #H-4000). Die Kryostatschnitte wurden zweimal 15 min. (wippend) in PBT, dann 10 min. in 2N HCl bei 37°C und schließlich 45 min. in 50% Formamid/2xSSC bei 65°C inkubiert. Das Blockieren unspezifischer Bindestellen erfolgte mit Hilfe einer mindestens 30minütigen Inkubation in 10% FCS (in PBT). Anschließend wurden die Schnitte über Nacht im anti-BrdU-Primärantikörper (1:200 verdünnt in Blockierlösung) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kryostatschnitte dreimal 15 min. in PBT gewaschen und nachfolgend 2-2,5h im Sekundärantikörper (1:200 verdünnt in Blockierlösung) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zwei abschließenden, 10minütigen Waschschritten in PBT (ebenfalls im Dunkeln) erfolgte die Eindeckelung der Kryostatschnitte mittels Mowiol. Zur Anfärbung der Zellkerne enthielt dieses Mowiol DAPI. Dieses härtete über Nacht aus und die Objektträger wurden im Dunkeln bei -20°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

**50%Formamid/
2x SSC**

50% (v/v) Formamid
2x SSC, pH 4,5
in ddH₂O

anti-BrdU (Primärantikörper)

1:10 verdünnt in PBS

Developmental Studies
Hybridoma Bank
University of Iowa
#G3G4

BrdU-Injektionslg.	0,9% (w/v) NaCl in ddH ₂ O 0,028% (w/v) NaOH in ddH ₂ O	
BrdU		Sigma #B5002-1
CyTM3-konjugiert Esel anti-Maus (Sekundärantikörper)	1:200 verdünnt in PBS	Vector Laboratories #BA-9200
DAPI	DAPI-Reagenz in PBS (0,1 µg/ml)	Merck #1.24653
Fötales Kälberserum (FCS)	10% (v/v) in PBS	
HCl	2 N	
Mowiol	5g Mowiol in 20 ml PBS lösen	
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.	

2.10 TUNEL-Analysen

Die TUNEL- (Abk. für „TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“) Analyse wurde 1992 erstmals veröffentlicht (Gavrieli et al., 1992) und ermöglicht die Detektion von Zellkernen apoptotischer Zellen. Diese Methode basiert auf der Markierung des DNA-Abbaus in apoptotischen Zellen, denn im Verlaufe der Apoptose wird die DNA des Zellkerns durch die Aktivität von Endonukleasen fragmentiert. An den jeweiligen Bruchstellen der DNA werden Hydroxylgruppen exponiert, die durch das Enzym TdT (Abk. für „terminal desoxynucleotidyl transferase“) mit markierten Nukleotiden versehen werden. Diese Markierung der angefügten Nukleotide ermöglicht schließlich die Visualisierung der Zellkerne apoptotischer Zellen.

Die Durchführung der Apoptose-Analysen erfolgte mit Hilfe des „Apop Taq Plus Peroxidase *in situ* Apoptosis Kits“ von Millipore. Diese Untersuchungen wurden auf Paraffinschnitten realisiert. Zunächst wurden die Schnitte 3mal 5 min. in Xylol entparaffiniert und anschließend mittels einer absteigenden Ethanol-Reihe hydratisiert. Nach einem Waschschrift in PBS (5 min.) wurden die Schnitte 15 min. bei Raumtemperatur in Proteinase K inkubiert und in ddH₂O gewaschen. Im Anschluss an eine 5minütige Inkubation in 3% H₂O₂/PBS bei Raumtemperatur

2.11 Fotodokumentation und Statistik

2.11.1 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation der Hämalaun/Eosin-Färbung, der *In situ*-Hybridisierungsdaten und der Fluoreszenzanalysen (dazu gehört auch die BrdU-Untersuchung) wurde mittels eines Durchlichtmikroskops (Axioskop2, Zeiss) durchgeführt. Die geschossenen, digitalen Aufnahmen wurden später mit der Software „Photoshop 7.0“ bzw. „Photoshop CS4“ (beide von Adobe) bearbeitet.

2.11.2 Statistik

Um die Prozentzahl proliferierender und apoptotischer Zellen jeweils in wildtypischen und *Ftm*-mutanten Herzen vergleichen zu können, wurde die Anzahl BrdU- bzw. TUNEL-markierter Zellen und die Gesamtzellzahl (DAPI-Markierung) in bestimmten Bereichen auf zehn verschiedenen, transversen Gewebeschnitten pro Herz bestimmt. Ferner wurden die Mittelwerte der Zählungen pro Herz ermittelt und die Werte in Relation zueinander gesetzt. Sämtliche Herzkammern konnten auf jedem einzelnen Schnitt analysiert werden. Es wurde zwischen ziliären, früheren ziliären und nicht-ziliären Regionen differenziert.

Um die Zilienlänge von *Ftm*^{+/+}- und *Ftm*^{-/-}-Herzen gegenüberstellen zu können, wurde die Länge von 50 Zilien pro Genotyp auf transversen Schnitten verschiedener Herzen (*Ftm*^{+/+}: n = 5 Herzen; *Ftm*^{-/-}: n = 8) gemessen.

Um einen Vergleich zwischen kardialer, wildtypischer und *Ftm*-negativer Wanddicke anstellen zu können, wurden die Messungen der Wanddicke an verschiedenen Stellen auf zehn unterschiedlichen, transversen Gewebeschnitten pro Herz durchgeführt. Alle vier Herzkammern konnten auf jedem einzelnen Schnitt untersucht werden. Der Durchschnitt der Messdaten pro Herz wurde errechnet und die wildtypischen mit den *Ftm*-defizienten Daten verglichen.

Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts präsentiert. Die Prüfung auf Signifikanz der Zilienlänge, der Prozentzahl proliferierender Zellen, der kardialen Wanddicke, der RNA-Expressionslevel und der Prozentzahl apoptotischer Zellen zwischen wildtypischen und *Ftm*-mutanten Herzen wurde mit Hilfe der studentschen t-Verteilung realisiert. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant (ein Sternchen), ein p-Wert von <0,01

als statistisch sehr signifikant (zwei Sternchen) und ein p-Wert von <0,001 als statistisch hochsignifikant (drei Sternchen) angesehen.

2.12 Proteinbiochemie

Die Proteinbiochemie beschäftigt sich mit der Entschlüsselung und Charakterisierung von Proteinfunktionen, Proteinlokalisationen, Proteinmengen und Aminosäuresequenzen von Proteinen. Proteine verleihen Zellen Struktur, transportieren Stoffe, katalysieren chemische Reaktionen, pumpen Ionen und fungieren als Komponenten von Signalkaskaden. Bei der Arbeit mit Proteinen ist es essentiell bei 4°C oder auf Eis zu arbeiten, da der Abbau der Proteine durch Proteasen bei wärmeren Temperaturen rasch geschieht.

2.12.1 Extraktion von Proteinen

Nach der Präparation der Embryonen an E11.5 (siehe 2.1) wurden deren Herzen isoliert und diese mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend folgte die Überführung der Herzen in Lysispuffer und ihre Homogenisierung mittels eines Sonifizierungsstabs (PCV Kinematica Status Homogenizator, Littau-Luzern; Bronson sonifier 450, Danburg, CT, USA #102C). Nachfolgend wurde das Proteinlysate entweder in eine Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

Lysispuffer	50 mM HEPES pH 7,3 150 mM KCl 4 mM MgCl ₂ Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette pro 10 ml Lösung)	Roche #11836153001
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.	

2.12.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde die vertikale Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) verwendet (Laemmli, 1970). Diese sogenannte SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird mit Hilfe eines Sammelgels und eines Trenngels realisiert. Das Sammelgel dient der Konzentration der Proteine an der Front des Trenngels, während sich das Trenngel für die Differenzierung der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts verantwortlich zeigt. Je höherprozentig und somit dichtmaschiger das Trenngel ist, desto besser werden Proteine mit kleinem Molekulargewicht aufgetrennt. Proteine mit großem Molekulargewicht hingegen können mit einem niedrigprozentigen Trenngel optimal dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde mit 10%igen Trenngelen gearbeitet, da das aufzutrennende Proteine (Gli3) in zwei verschiedenen Isoformen auftritt. Eine dieser Formen besitzt ein hohes Molekulargewicht (190 kDa), die andere jedoch ein wesentlich niedrigeres (83 kDa).

Bei der Herstellung eines SDS-Polyacrylamid-Gels wurden zunächst die Komponenten des Trenngels vermischt. Die Aushärtung des Gels geschieht aufgrund radikalischer Polymerisation aus den Stoffen Acrylamid und N, N'-Methylenbisacrylamid (im Verhältnis 37,5:1), wobei das Letztere für die Quervernetzung der ansonsten linearen Polyacrylamid-Ketten verantwortlich ist. In das Trenngel-Gemisch wurde der Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und der Polymerisierungskatalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED) gegeben und die Gesamtmischung wurde zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen, die mittels eines Abstandhalters (engl.: Spacer) in einem definierten Abstand voneinander getrennt sind. Schließlich wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um einerseits eine gerade Gelkante zu erhalten und andererseits den Kontakt mit Sauerstoff zu verhindern, denn der Sauerstoff würde die zur Polymerisation notwendigen Radikale abfangen und daher die Polymerisation des Trenngels stören. Nach der Auspolymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das zuvor fertiggestellte Sammelgel-Gemisch mit APS und TEMED versetzt. Die Aussparungen des Sammelgels, die später als Taschen dienen, in welche die Proben pipettiert wurden, wurden mit Hilfe eines speziellen Kammes erzeugt. Die Mechanismen der Polymerisation sind mit denen des Trenngels identisch.

Zusammensetzung für jeweils 2 SDS-Polyacrylamid-Gele:

Tabelle 2.9: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
ddH₂O	1,9 ml	3,5 ml
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	0,6 ml
1 M Tris/HCl pH 8,8	5,6 ml	-
20% SDS	60 µl	25 µl
Acrylamid	3,8 ml	0,8 ml
TEMED	7,5 µl	5 µl
10% APS	60 µl	25 µl

Nachdem das SDS-Polyacrylamid-Gel auspolymerisiert war, wurde es in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und die mit Bromphenolblau (negativ geladener Farbstoff) versetzten Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Als Referenz wurde zudem ein Proteinstandard von Sigma verwendet, der mehrere Proteine bekannter Größe beinhaltet.

Verwendete Lösungen:

10% APS	10% Ammoniumpersulfat in ddH ₂ O	
20% SDS	20% SDS in ddH ₂ O	
Acrylamidlösung		Applichem #A0856
Proteinstandard High Molecular Weight Standard Mixture		Sigma #SDS6H2
TEMED		Merck #1.10732
Tris/HCl pH 6,8	Tris/HCl (1 M) in ddH ₂ O pH 6,8	
Tris/HCl pH 8,8	Tris/HCl (1 M) in ddH ₂ O pH 8,8	

2.12.3 Western-Blot

Als Western Blot bezeichnet man den gerichteten, elektrophoretischen Transfer von zuvor in einer Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran. Der Name dieses Verfahrens rührt vom englischen Wort „blot“ her, was „Fleck“ bedeutet. Die Blotting-Methode wurde 1975 von Edwin Southern erfunden, der diese Technik zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit anschließender Hybridisierung nutzte. Daher wird dieses Verfahren Southern-Blot genannt. Da Edwin Southern im Süden der USA arbeitete, bezeichnete man den Blot von RNA-Fragmenten, der im Norden der USA entwickelt wurde, als Northern-Blot und den Blot von Proteinen, der im Westen der USA erfunden wurde, als Western-Blot (Burnette, 1981).

Beim Western-Blot wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Übertragung der Proteine von einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran. Diese Membran musste vor dem Blotten mit Hilfe von 100%igem Methanol aktiviert werden. Weiterhin wurden Whatmanpapiere mit verschiedenen Pufferlösungen durchtränkt (jeweils 3 Lagen Whatmanpapier mit Anodenpuffer 1, mit Anodenpuffer 2 und mit Kathodenpuffer). Anschließend wurde das Acrylamid-Gel auf die PVDF-Membran gelegt und beide zwischen Lagen aus Whatman-Papier (VWR #732-0591) in eine Blotapparatur platziert. Dabei befanden sich 6 Lagen Whatmanpapier aus den Anodenpuffern unter der PVDF-Membran und 3 Lagen Whatmanpapier aus dem Kathodenpuffer über dem Gel. Durch diese Verteilung des Whatmanpapiers ist eine optimale Leitung des Stroms und daher ein bestmöglicher Transfer der Proteine gewährleistet. Der „Blotting“-Vorgang wurde bei 120 mA (Bio-Rad Power Supply) in einer Stunde realisiert. Die Kontrolle, ob der Western-Blot erfolgreich war, erfolgte durch eine Anfärbung der geblotteten Proteine mittels einer Ponceau-S-Färbung.

Verwendete Lösungen:

Anodenpuffer 1	0,3 M Tris-Base 20% Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer 2	25 mM Tris-Base 20% Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base 20% Methanol, pH 9,4 40 mM Aminokapronsäure

PBT 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 150 mM NaCl
 0,05% Tween 20

2.12.5 Quantifizierung der Proteindaten

Die Quantifizierung der Proteinmengen wurde mit Hilfe der Software „Multi Gauge Version 3.2“ von Fujifilm durchgeführt.

2.13 Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Rüdiger Riehl, Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nach Angaben von Sulik et al. (1994) angefertigt (Sulik et al., 1994). Allerdings wurden in dieser Arbeit nicht vollständige Mausembryonen, sondern ausschließlich murine Herzen (E11.5) verwendet. Um Zugang zu kardialen Zilien zu erhalten, wurden diese Herzen mid-transversal aufgeschnitten, so dass das Innere aller vier Herzkammern zu sehen war.

3 Ergebnisse

3.1 **Ftm-defiziente Mausembryonen zeigen einen perimembranösen VSD**

Ftm-negative Mausembryonen zeigen einen ventrikulären Septumdefekt (Abbildung 3.1 B). Etwa 30 % aller *Ftm*-homozygot mutanten Embryonen weisen diesen Herzdefekt auf, währenddessen die Herzen *Ftm*-heterozygot mutanter Embryonen normal entwickelt erscheinen (Abbildung 3.1 C). Somit reichen 50% des *Ftm*-Proteins aus, um in jedem murinen Herzen eine vollständige Bildung des VS zu erreichen. Der VSD *Ftm*-defizienter Herzen ist charakterisiert durch den Verlust des membranösen Teils des VS (siehe Sternchen in Abbildung 3.1 B). Um diesen VSD kategorisieren und somit detaillierter benennen zu können, wurde zudem die Dicke des muskulären VS gemessen. Bei dieser Analyse konnte eine Reduzierung der Dicke des muskulären VS detektiert werden (Abbildung 3.1 D). Eine Kombination aus Fehlbildungen des muskulären und des membranösen VS wird als perimembranöser VSD bezeichnet. Weitere Analysen der Länge und der Dicke *Ftm*-homozygot mutanter atrialer Septen führten zu dem Ergebnis, dass diese keinen Defekt aufweisen (Abbildung 3.1 D), so dass ein atrioventrikulärer VSD in *Ftm*^{-/-}-Herzen ausgeschlossen werden kann.

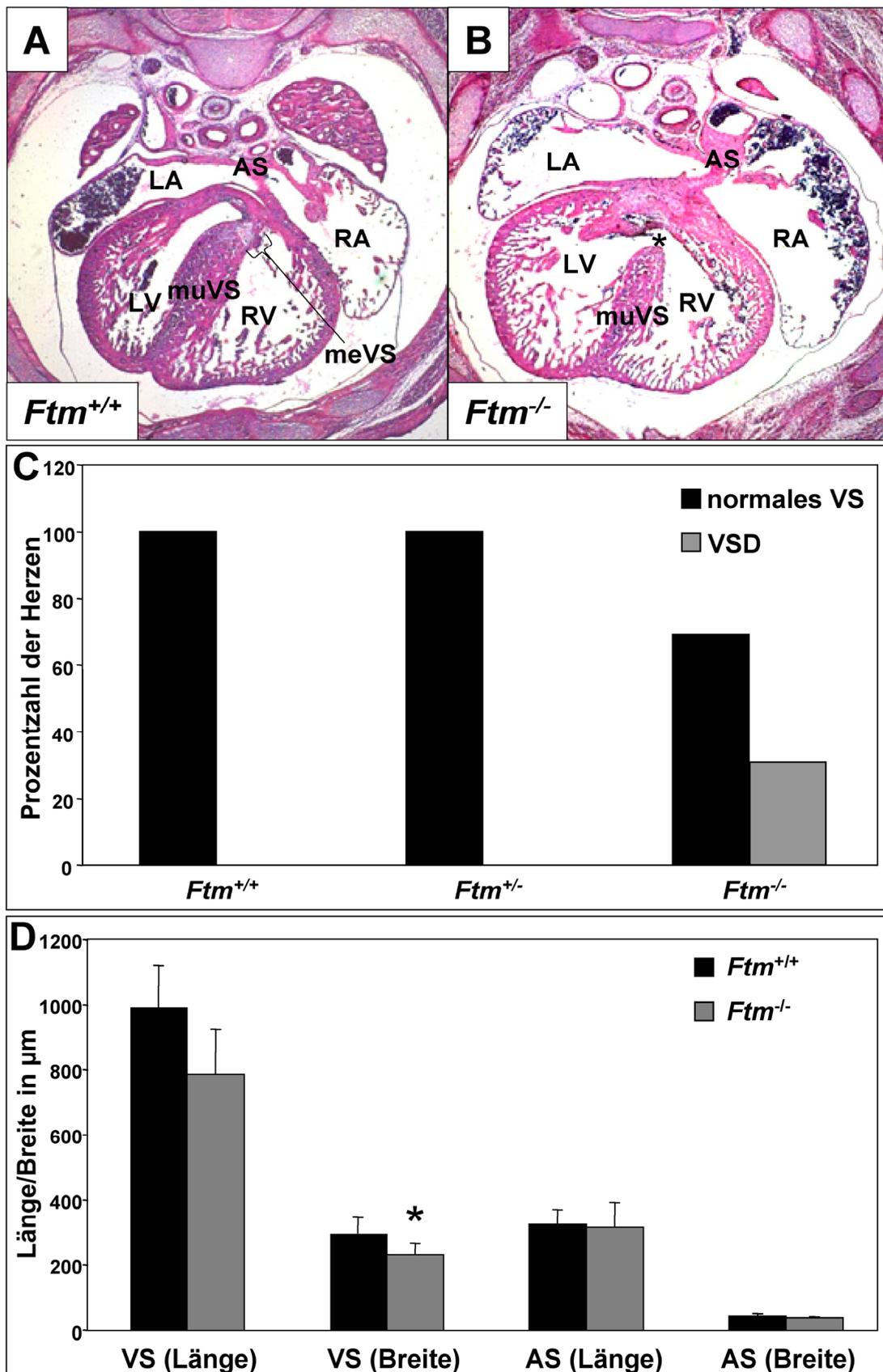


Abbildung 3.1: 30% aller *Ftm*-negativen Mausembryonen weisen einen perimembranösen ventrikulären Septumdefekt (VSD) auf.

(A, B, D) AS, atriales Septum; LA, linkes Atrium; LV, linker Ventrikel; RA, rechtes Atrium; RV,

rechter Ventrikel; meVS, membranöses ventrikuläres Septum; muVS, muskuläres ventrikuläres Septum. (A, B) Hämalaun/Eosin-Färbungen von transversalen Herzschnitten an E14.5. (A) In wildtypischen Mausembryonen besteht das Herz aus vier Kammern, zwei Atrien (LA und RA) und zwei Ventrikel (LV und RV). Die Teilung des linken Atriums vom rechten sowie des linken Ventrikels vom rechten wird durch das atriale Septum (AS) bzw. das ventrikuläre Septum (VS) bewerkstelligt. Das ventrikuläre Septum wird unterteilt in einen muskulären Teil (muVS) und einen membranösen Teil (meVS). (B) In *Ftm*^{-/-}-Embryonen wächst das VS nicht vollständig aus, so dass das membranöse VS nicht detektiert werden kann. (C) Während sich das Herz in *Ftm*^{+/+}- (n = 10) und *Ftm*^{+/-}- (n = 21) Mäusen normal entwickelt, zeigen 30,77% der *Ftm*^{-/-}-Embryonen (n = 13) einen perimembranösen VSD. (D) Messungen von Länge und Breite der Septen in wildtypischen und *Ftm*-defizienten murinen Herzen (n = jeweils 6). Das AS *Ftm*-homozygot mutanter Embryonen ist im Vergleich zum Wildtyp in Länge und Breite unverändert. Dementgegen ist das VS *Ftm*-negativer Embryonen signifikant schmaler als das wildtypischer Embryonen. Auch die Länge des VS in *Ftm*^{-/-}-Herzen zeigt eine deutliche Reduktion. Allerdings ist diese Reduktion nicht signifikant, da sie nur in 30% aller *Ftm*-defizienten Herzen beobachtet wird.

3.2 Normale Morphologie und Entwicklung endokardialer Kissen in *Ftm*-negativen Herzen

Zwar ist über die Entwicklung des VS noch vieles unbekannt, jedoch wird vermutet, da der membranöse Teil dieses Septums von den endokardialen Kissenzellen gebildet wird, dass eine molekulare Interaktion des muskulären VS mit den Endokardkissen zur Initiation der Bildung des membranösen VS führt (Meredith et al., 1979). Da die endokardialen Kissenzellen *Ftm*-defizienter Embryoherzen morphologisch normal ausgebildet erscheinen (Abbildung 3.2 B), sollte durch weitere Untersuchungen geklärt werden, ob ein Endokardkissen-Defekt vorliegt, der eventuell die Interaktion der endokardialen Kissen mit dem muskulären Teil des VS verhindert. Die Expression des Endokardmarkergens *Msh homeobox 1-like protein (Msx1)* zeigte in *Ftm*-defizienten Herzen keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtypen (Abbildung 3.2 A, B). Auch die Proliferationsrate der endokardialen Kissenzellen wies keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Genotypen auf (Abbildung 3.2 C), woraus sich schließen lässt, dass die Entwicklung und das molekulare Potential der Endokardkissen durch den Verlust von *Ftm* nicht beeinträchtigt werden. Somit kommt ein Endokardkissen-Defekt als Ursache des perimembranösen VSD in *Ftm*-homozygot mutanten Herzen sehr wahrscheinlich nicht in Frage.

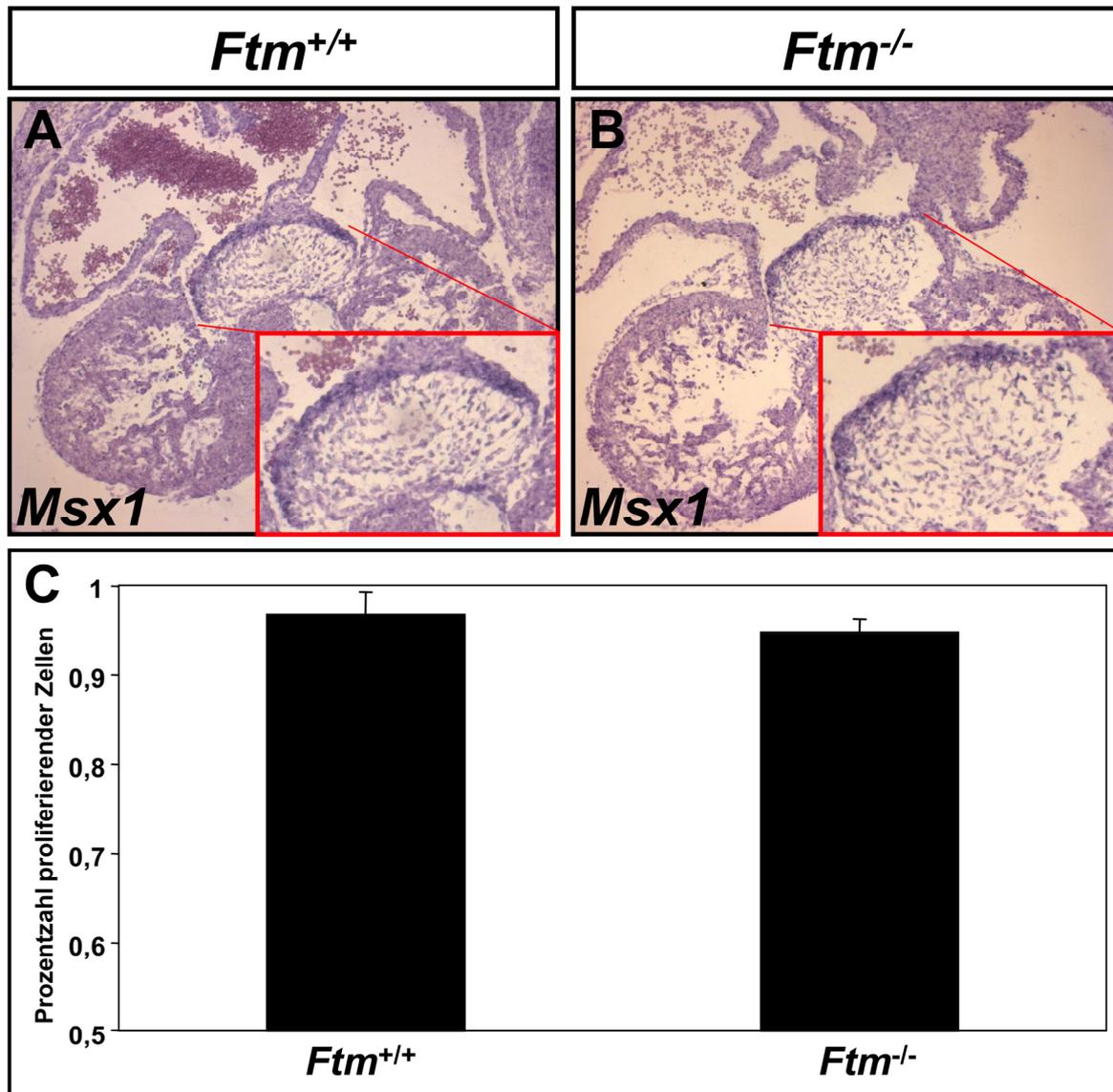


Abbildung 3.2: Die Entwicklung der endokardialen Kissenzellen *Ftm*-defizienter Mäuse verläuft normal.

(A, B) *In situ*-Hybridisierungen auf transversalen Herzschnitten an E11.5. Die Expression des Endokardkissen-Markers *Msx1* ist in *Ftm*^{-/-}-Herzen unverändert (B). (C) Prozentzahl proliferierender endokardialer Kissenzellen in wildtypischen und *Ftm*-negativen Herzen (n = jeweils 3) an E11.5. Die Proliferation der Endokardkissenzellen ist in *Ftm*-homozygot mutanten Herzen nicht betroffen.

3.3 Detektion sensorischer Monozilien in murinen Herzen

Da der Phänotyp *Ftm*-negativer Mäuse auf einer Ziliopathie beruht (Delous et al., 2007; Vierkotten et al., 2007), lag die Vermutung nahe, dass der perimembranöse VSD ebenfalls auf diesen Ziliendefekt zurückgeführt werden kann. In den letzten Jahren manifestierte sich die Erkenntnis, dass die überwiegende Mehrzahl aller

eukaryotischen Zellen Zilien trägt (Pan und Snell, 2005) und dass diese für die Entwicklung vieler Organe und Strukturen, wie z.B. der Niere (Kim und Walz, 2007) oder des Gehirns (Han et al., 2008; Spassky et al., 2008), essentiell sind. Dabei fand das Herz, trotzdem es das erste sich entwickelnde Organ des Körpers darstellt, bislang kaum Berücksichtigung. Zwar wurde die Existenz von Zilien in Hühnerherzen nachgewiesen und diesen eine sensorische Funktion bei der Messung von Scherkräften im Herzen eingeräumt (Van der Heiden et al., 2006), jedoch gibt es für Säugetiere lediglich zwei Untersuchungen, die die Präsenz von Zilien im Herzen beschreiben (Clement et al., 2009; Slough et al., 2008). In der ersten Studie wird allerdings weder auf die kardialen Zelltypen, die Zilien ausbilden, noch auf die Funktion der kardialen Zilien im sich entwickelnden Mausherz eingegangen (Slough et al., 2008). Die zweite Studie konzentriert sich ausschließlich auf die Rolle kardialer Zilien in der frühen Herzentwicklung in Verbindung mit der Vermittlung von Shh-Signalen, wobei der Großteil der Analysen in Zellkultur erfolgte (Clement et al., 2009). Da der Herzphänotyp *Ftm*-defizienter Embryonen suggeriert, dass Zilien eine Rolle in der Herzentwicklung spielen könnten, wurden embryonale Mausherzen in dieser Arbeit auf das Vorhandensein von Zilien untersucht. Dabei gelang es, Zilien in Herzen von Mausembryonen in einem Zeitraum von E10.5 bis E12.5 zu detektieren und eine räumliche Verteilung zu skizzieren (Abbildung 3.3). Untersuchungen zeigen, dass nicht jeder Herzzelltyp Zilien ausbildet und dass die Zelltypen, die Zilien tragen, dies nur an spezifischen Stellen des Herzens tun. Myokardzellen und Endokardzellen sind in der Lage, Zilien auswachsen zu lassen, jedoch ausschließlich in spezifischen Bereichen von Atrien und Ventrikeln (Abbildung 3.3 A, B und D). An kardialen Fibroblasten, für die postuliert wird, dass sie ein dreidimensionales Netzwerk um Myokardzellen bilden (Goldsmith et al., 2004), wurden keine Zilien nachgewiesen (Abbildung 3.3 C). Ähnlich wie in embryonalen Hühnerherzen zeigten sich in embryonalen Mausherzen nur Monozilien, die aufgrund ihrer geringen Anzahl keine motile, sondern wahrscheinlich eine sensorische Funktion ausüben. Bestätigt wird diese Vermutung durch immunohistochemische Analysen mit Hilfe eines Markers für motile Zilien, LRD (left-right dynein) genannt (McGrath et al., 2003). Während LRD in motilen Trachea-Zilienbüscheln am proximalen Ende lokalisiert ist (Abbildung 3.3 F), fehlt es gänzlich in den Zilien des Herzens (Abbildung 3.3 E). In wildtypischen,

embryonalen Mausherzen findet man also in bestimmten atrialen und ventrikulären Regionen Monozilien mit sensorischer Funktion an Myokard- und Endokardzellen in einem engen Zeitrahmen von E10.5 bis E12.5. Interessanterweise bilden die endokardialen Kissenzellen bzw. die Zellen des muskulären VS keine Zilien aus.

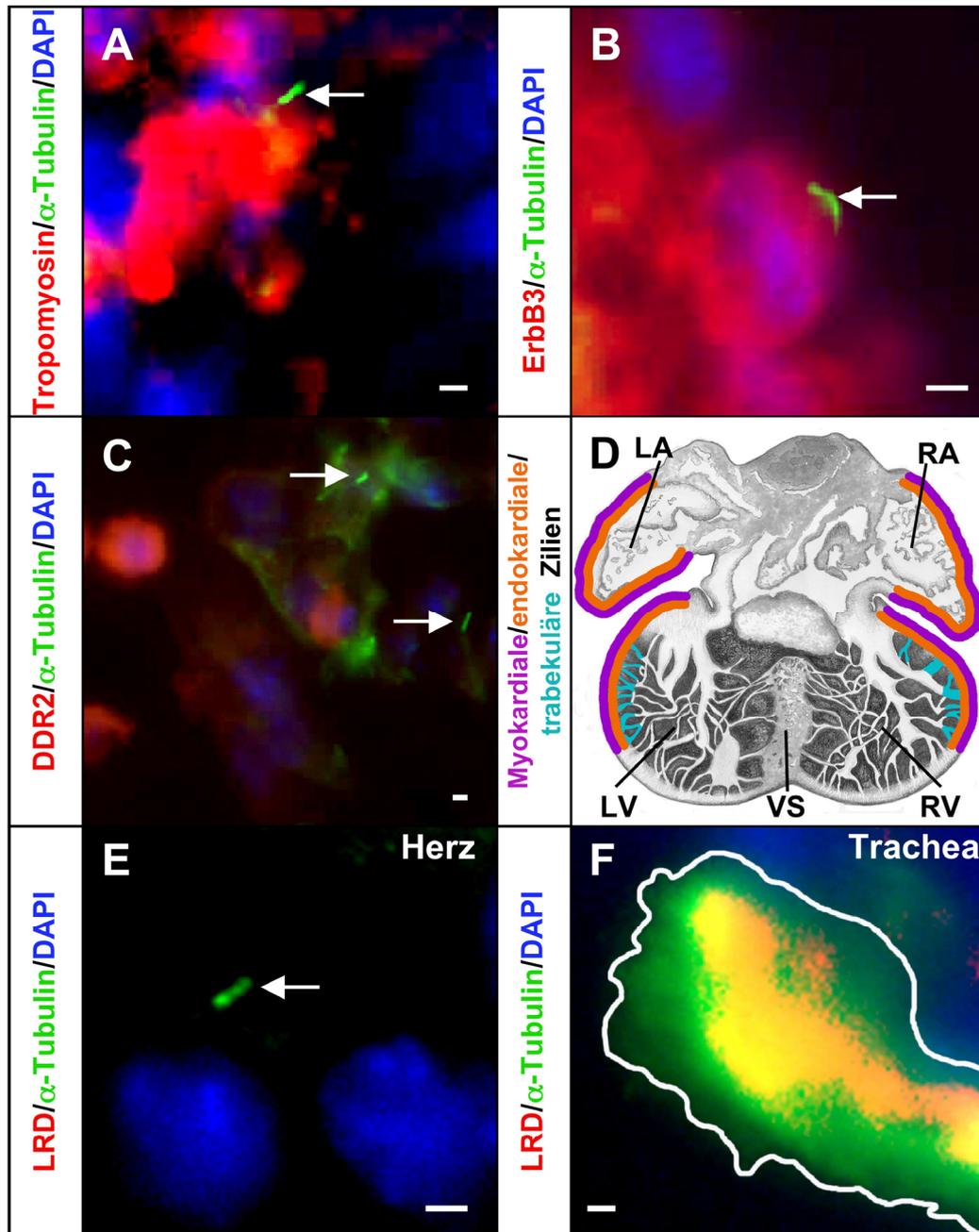


Abbildung 3.3: Verteilung primärer Zilien in embryonalen Mausherzen.

(A-C, E, F) Immunofluoreszenz auf transversen Herzschnitten an E11.5. Zilien werden durch acetyliertes α -Tubulin markiert (grüne Färbung) und Zellkerne sind mit Hilfe von DAPI blau angefärbt. Die Maßstabsbalken (in weiß) repräsentieren eine Länge von 2 μ m. (A-C, E) Weiße Pfeile zeigen auf Zilien. (F) Zilienbündel sind weiß umrandet. (A, B) Myokardiale Zellen (A; rote

Färbung; markiert durch Tropomyosin) und endokardiale Zellen (B; rote Färbung; markiert durch ErbB3) bilden Zilien aus. (C) Im Gegensatz zu diesen Zelltypen zeigen kardiale Fibroblasten (rote Färbung; markiert durch DDR2) keine Zilien. (D) Schematische Darstellung der Zilienverteilung in embryonalen Mausherzen. Zilien wurden von E10.5 bis E12.5 detektiert. Zilien myokardialer Zellen sind in violett, Zilien endokardialer Zellen in orange und Zilien auf Trabekeln in türkis dargestellt. (E, F) An der Basis kardialer Zilien wurde keine Färbung des motilen Zilienmarkers LRD nachgewiesen (E), während die als Kontrolle dienenden trachealen Zilien eine gelbe Färbung an ihrem proximalen Ende zeigen (F). Dies demonstriert, dass kardiale Zilien immotil und daher sensorisch sind.

3.4 Kardiale Zilien zeigen eine reduzierte Länge in *Ftm*-homozygot mutanten Mausembryonen

Bisherige Analysen muriner Zilien brachten die Erkenntnis, dass *Ftm* am Basalkörper sämtlicher untersuchter Zilien lokalisiert ist (Delous et al., 2007; Vierkotten, 2006; Vierkotten et al., 2007). Dies konnte auch im Fall kardialer Zilien bestätigt werden (Abbildung 3.4 A, C), wodurch die Frage aufgeworfen wurde, ob der Verlust von *Ftm* bereits eine Wirkung auf die Morphologie kardialer Zilien ausüben könnte.

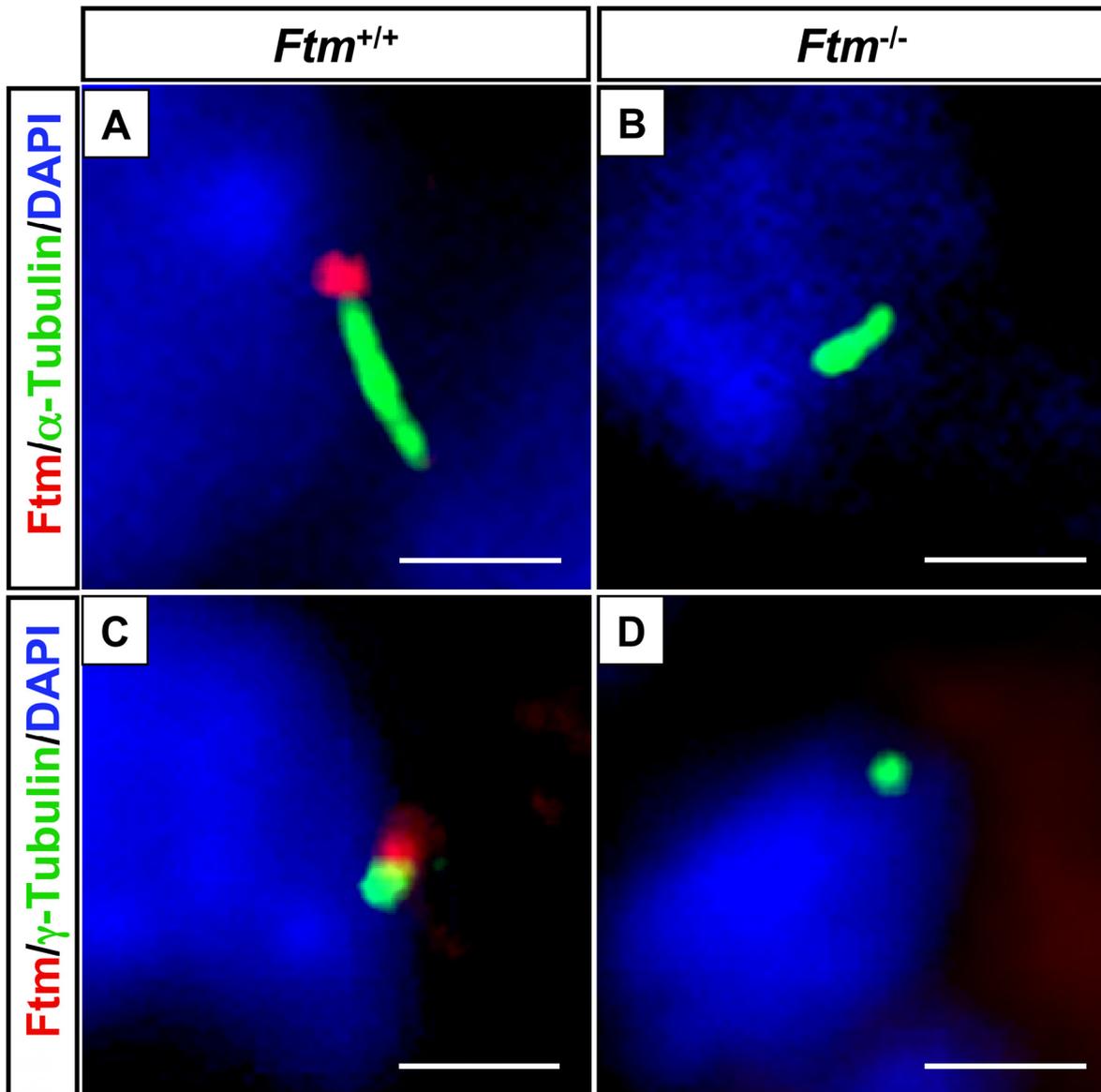


Abbildung 3.4: Ftm lokalisiert am Basalkörper wildtypischer, kardialer Zilien.

(A, B) Immunofluoreszenz auf transversen Herzschnitten an E11.5. Zilien sind durch acetyliertes α -Tubulin in grün angefärbt und Zellkerne durch DAPI in blau. (C,D) Immunofluoreszenz auf transversen Herzschnitten an E11.5. Zentrosomen/Basalkörper sind durch γ -Tubulin in grün angefärbt und Zellkerne durch DAPI in blau. (A-D) Maßstabsbalken (in weiß) repräsentieren eine Länge von 2 μm . Ftm (rote Färbung) ist in kardialen Zilien lokalisiert (A), fehlt jedoch in *Ftm*-negativen Zilien (B). Weiterhin ist Ftm (rote Färbung) an den Zentrosomen/Basalkörpern von Zilien zu detektieren (C). In *Ftm*-defizienten Herzen fehlt Ftm an den Zentrosomen/Basalkörpern von Zilien.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen *Ftm*-defizienter Zilien ließen eine deutliche Reduktion der Zilienlänge im Vergleich zu wildtypischen Zilien erkennen (Abbildung 3.5 A, B; Durchführung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Rüdiger Riehl aus dem Institut für

Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Dieses Resultat konnte durch das Ausmessen der Zilienlänge in wildtypischen und *Ftm*-negativen Herzen statistisch verifiziert werden und erwies sich als hochsignifikant (Abbildung 3.5 C). Zumeist sind Veränderungen der Zilienlänge durch einen gestörten IFT zu erklären (Rosenbaum und Witman, 2002), wobei eine verkürzte Zilie ohne blasenartige Strukturen an ihrem distalen Ende auf einen gestörten anterograden Transport hinweist (Perkins et al., 1986). Diese Situation wurde bei *Ftm*-negativen Zilien in embryonalen Mausherzen vorgefunden. Die Ursache eines defekten anterograden Transports kann eine Störung der Motoraktivität oder der Prozessivität darstellen, was in der Veränderung der Geschwindigkeit des anterograden Transports resultieren würde. Um diesen Kontext genauer zu untersuchen, wurde die ziliäre Lokalisation von Kif3a, einer Komponente des Kinesin-Motors, untersucht. Es zeigte sich, dass diese Untereinheit des Motorproteins sowohl in wildtypischen, als auch in *Ftm*-defizienten Herzen gleichmäßig entlang des Axonems verteilt vorliegt (Abbildung 3.5 D, E). Da dies allerdings nicht zwangsläufig bedeutet, dass sich die Geschwindigkeit des anterograden Transport normal darstellt, sollten Lokalisationsstudien des Proteins Ift88, eines Bestandteils des IFT-Komplexes B, weitere Aufschlüsse bringen. Während Ift88 ubiquitär verteilt in wildtypischen, kardialen Zilien detektiert wurde (Abbildung 3.5 F), lag es in 30 % (15 von 50 Zilien) der *Ftm*-negativen Zilien lediglich in Form zweier Ansammlungen am basalen und distalen Ende vor (Abbildung 3.5 G). Dieses Ergebnis deutet auf eine Beeinträchtigung des IFT hin, bei der möglicherweise der gesamte Transport stark verlangsamt sein könnte.

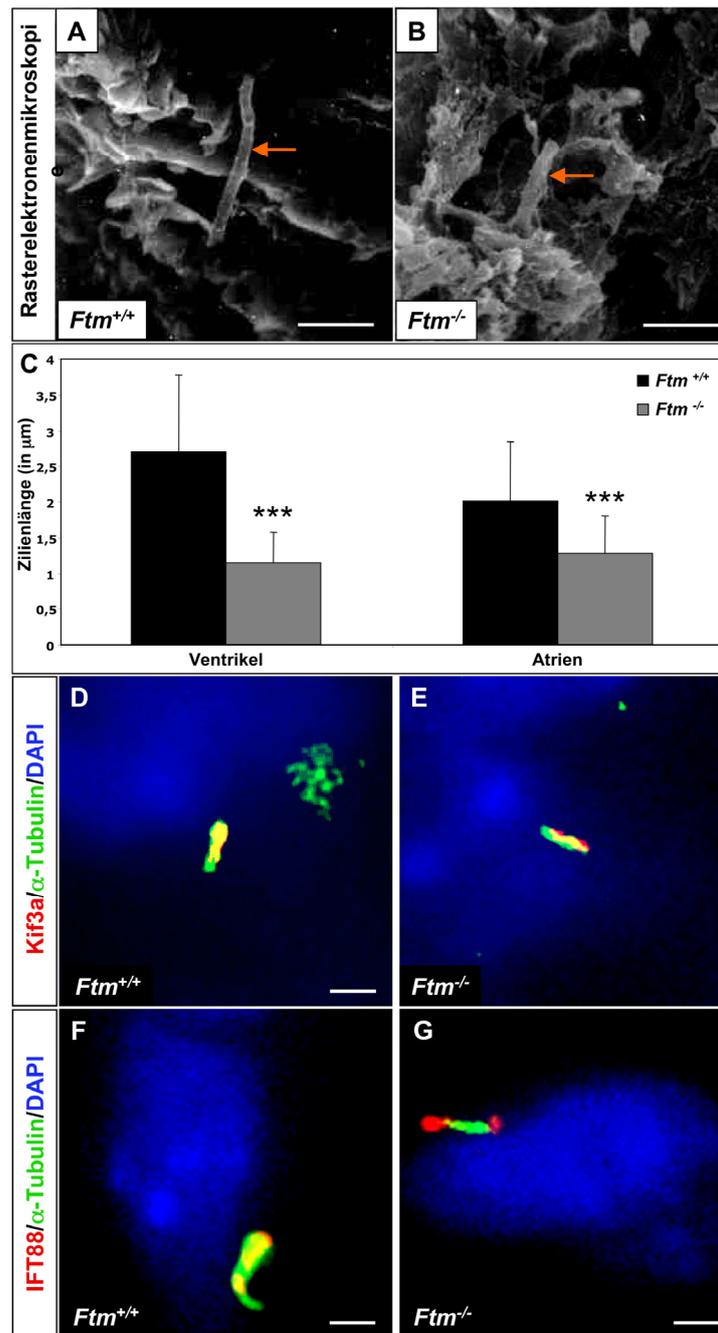


Abbildung 3.5: Der Verlust von *Ftm* führt zu einer Reduktion in der Zilienlänge und zu einem Defekt in der Verteilung des IFT88-Proteins.

(A, B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von E11.5-Herzen. Diese Analysen wurden unter Anleitung und freundlicher Mithilfe von Herrn Dr. Rüdiger Riehl aus dem Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Rote Pfeile deuten auf Zilien. (D-G) Immunfluoreszenz auf transversen Herzschnitten (E11.5). Zilien sind durch acetyliertes α -Tubulin in grün angefärbt und Zellkerne durch DAPI in blau. (A, B, D-G) Maßstabsbalken (in weiß) repräsentieren eine Länge von 2 μ m. Kardiale Zilien von *Ftm*-homozygot mutanten Embryonen (B) sind kürzer als jene von wildtypischen Mäusen (A). (C) Vergleich von wildtypischen und *Ftm*-defizienten Zilienlängen in Ventrikeln und Atrien (n = jeweils 50 Zilien). *Ftm*-negative Zilien sind signifikant kürzer in Ventrikeln ($p = 3,41E-12$)

und Atrien ($p = 2,79E-06$). Kif3a (rote Färbung) ist in wildtypischen (D) und *Ftm*-negativen (E) kardialen Zilien ubiquitär verteilt. (F) IFT88 (rote Färbung) zeigt eine durchgängige Verteilung in wildtypischen Zilien, während es in *Ftm*-defizienten an beiden Enden akkumuliert (G).

3.5 Reduktion der Proliferation in Zilienregionen *Ftm*-defizienter Herzen führt zu einer Verminderung der Wanddicke in Atrien und Ventrikeln

Die Tatsache, dass die ventrikulären Regionen des Embryoherzens, in denen Zilien nachgewiesen werden können, die kardialen Zellen beinhalten, deren Proliferation zum Auswachsen des VS führt, legt nahe, dass diese Zilien mit der Ausbildung des muskulären VS in Verbindung stehen. Zudem wiesen semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR-Untersuchungen darauf hin, dass die Proliferation in *Ftm*-negativen Herzen gestört ist, denn an E11.5 wurde eine Veränderung der Expression von Genen gefunden, die die G1/S-Phase-Transition im Zellzyklus kontrollieren. Dabei ist die Expression von *Cyclin E* in *Ftm*-homozygot mutanten Herzen herunterreguliert und die Expression von dessen Inhibitor *p27* hochreguliert (Abbildung 3.6), was auf einen verlangsamten Zellzyklus schließen lässt.

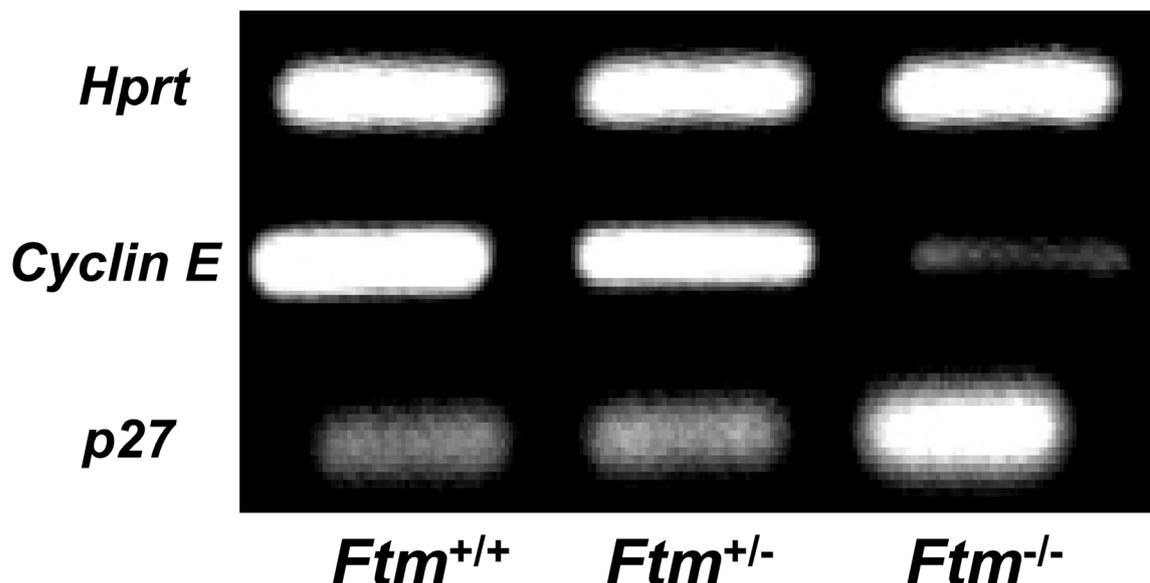


Abbildung 3.6: Veränderung der Genexpression in Zellzyklus- und Proliferation-kontrollierenden Genen.

Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR-Analyse an E11.5. *Hprt* fungiert als Ladungskontrolle. In *Ftm*-negativen Mäusen ist die Expression von *Cyclin E* herunter- und die von *p27* hochreguliert. Beide Veränderungen suggerieren eine Störung der Zellzyklus- und

Proliferationskontrolle.

Um diese Vermutungen zu verifizieren, wurde die Proliferationsrate mittels BrdU-Analysen in bestimmten Herzbereichen von wildtypischen, *Ftm*-heterozygot und *Ftm*-homozygot mutanten Embryonen an E11.5 ermittelt. Dabei wurde nicht nur zwischen ventrikulären und atrialen Herzregionen, sondern auch zwischen ziliären und nicht-ziliären Arealen unterschieden (Abbildung 3.7 A). Es zeigte sich, dass sich die Proliferationsraten der verschiedenen Genotypen in den nicht-ziliären Regionen, zu denen auch das muskuläre VS gehört, nicht signifikant unterscheiden (Abbildung 3.7 A). Unterdessen konnte eine signifikante Proliferationsreduktion in allen ziliären Bereichen der *Ftm*-negativen Herzen im Vergleich zu den wildtypischen bzw. *Ftm*-heterozygot mutanten Herzen beobachtet werden (Abbildung 3.7 A), was eine Erklärung für das unvollständige Auswachsen des muskulären VS wäre. Zilien wurden nur an E10.5 bis E12.5 in murinen Embryoherzen gefunden. Wären Zilien also tatsächlich für die Regulation der Proliferation verantwortlich, würde man erwarten, dass folglich nur in der Zilien-Zeitspanne ein Proliferationsdefekt zu detektieren sein dürfte.

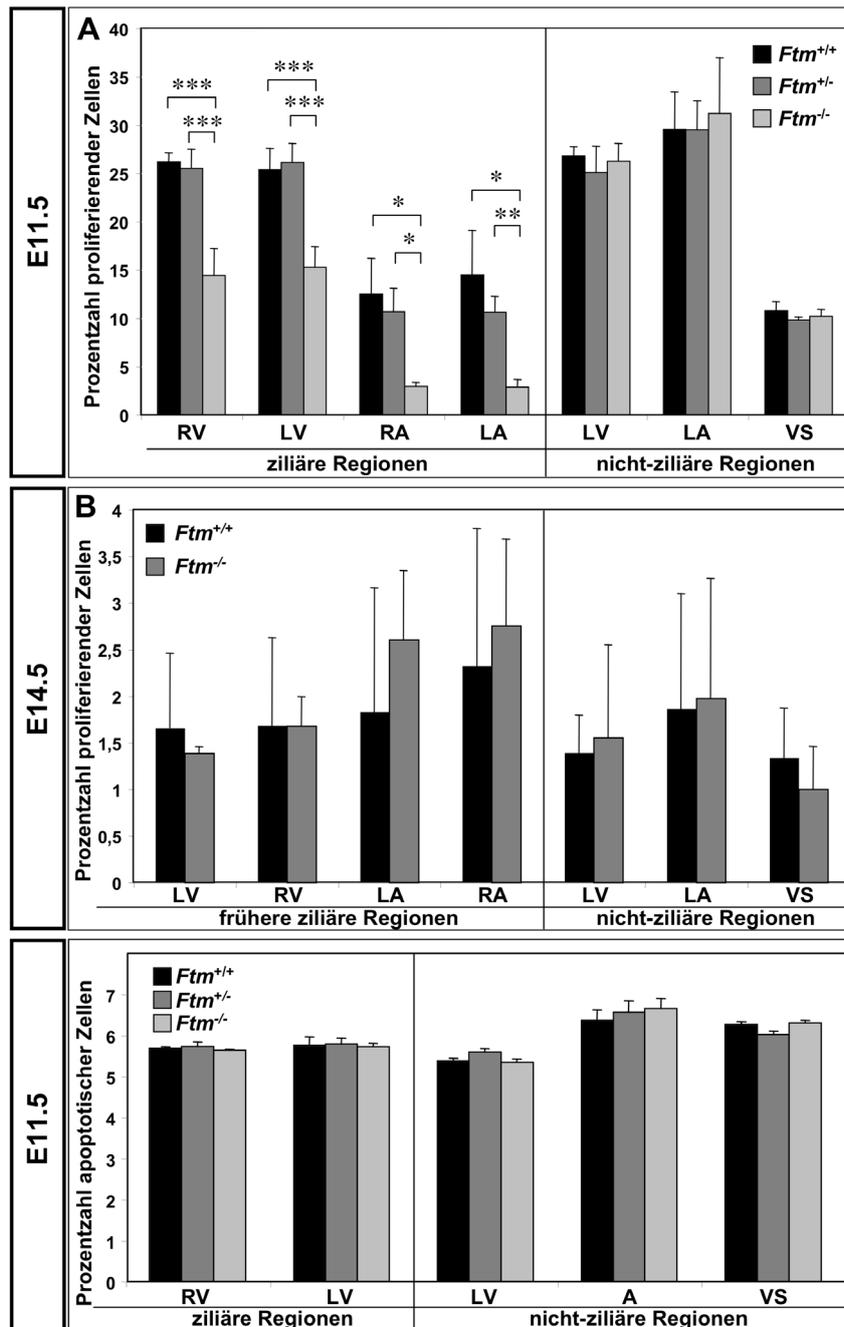


Abbildung 3.7: Reduktion der Proliferationsrate in ziliären Regionen von *Ftm*-defizienten murinen Herzen.

(A-C) A, Atrium; LA, linkes Atrium; LV, linker Ventrikel; RA, rechtes Atrium; VS, ventrikuläres Septum. (A, B) Die Berechnung der Proliferationsrate erfolgte aus dem Verhältnis proliferierender (BrdU-markierter) Zellen zur Zahl aller Zellen in den spezifischen Herzregionen an E11.5. ((A) *Ftm*^{+/+}: n = 6; *Ftm*^{+/-}: n = 11; *Ftm*^{-/-}: n = 5, (B) *Ftm*^{+/+}: n = 3; *Ftm*^{-/-}: n = 3). (A) Es gibt eine signifikant erniedrigte Proliferation in ziliären Regionen von Ventrikel und Atrien im Vergleich zu nicht-ziliären Regionen. (B) In keiner der untersuchten *Ftm*-negativen Herzregionen ist die Proliferation signifikant verändert. (C) Analyse der Apoptose durch TUNEL-Färbung in E11.5-Herzen. Es kann keine signifikante Veränderung der Apoptose in wildtypischen (n = 3), *Ftm*-heterozygot (n = 3) und *Ftm*-homozygot mutanten Herzregionen (n = 3) detektiert werden.

BrdU-Proliferationsanalysen in einer späteren Entwicklungsphase (E14.5) bestätigen diesen postulierten Zusammenhang, denn in diesem Stadium ist weder in den früheren ziliären, noch in den zilienlosen Regionen *Ftm*-negativer Herzen ein signifikanter Proliferationsunterschied sichtbar (Abbildung 3.7 B).

Weiterhin scheinen auch sämtliche atriale, ziliäre Regionen der *Ftm*-defizienten Herzen in E11.5 eine signifikant niedrigere Proliferationsrate aufzuweisen (Abbildung 3.7 A). Diese Bereiche beeinflussen jedoch nicht die Entwicklung des VS, so dass kardiale Zilien noch weitere Aufgaben zu erfüllen scheinen, als das Auswachsen des muskulären VS zu kontrollieren. Um auszuschließen, dass der perimembranöse VSD *Ftm*-negativer Mausembryonen aus einer Kombination gestörter Proliferation und fehlregulierter Apoptose resultiert, wurde ebenfalls die Apoptoserate von ziliären und nicht-ziliären Arealen der Atrien und Ventrikel in wildtypischen und *Ftm*-defizienten Mäusen mittels TUNEL-Analyse bestimmt. Da bei dieser Untersuchung sowohl in den ziliären, als auch in den nicht-ziliären Regionen kein signifikanter Unterschied ermittelt wurde (Abbildung 3.7 C), ist der perimembranöse VSD in *Ftm*-homozygot mutanten Herzen sehr wahrscheinlich auf einen Proliferationsdefekt zurückzuführen.

Dementsprechend regulieren ventrikuläre Zilien das korrekte Auswachsen des muskulären VS, indem sie die Zellproliferation in ventrikulären Wänden kontrollieren. Dies führt unweigerlich zu einer Verringerung der Zellanzahl in *Ftm*^{-/-}-Wänden, so dass die Anzahl der ventrikulären Wandzellen nicht mehr ausreicht, um ein vollständiges muskuläres VS zu bilden. Folglich müsste auch die ventrikuläre Wanddicke vermindert sein. Die Analyse dieser ergab, dass eine Abnahme der Wanddicke in all jenen Regionen *Ftm*-negativer Herzen an E14.5 zu verzeichnen ist, welche zum Zeitpunkt E11.5 Zilien aufwiesen (Abbildung 3.8 A). Ferner konnte allerdings ebenfalls eine signifikante Reduktion der ventrikulären Wanddicke an solchen Positionen nachgewiesen werden, die zu keinem Zeitpunkt Zilien detektieren ließen und sich zwischen den früheren Zilien-tragenden Bereichen und der Basis des VS befinden (Abbildung 3.8 A). Weiterhin konnte auch eine Verminderung atrialer Wanddicken in den *Ftm*-homozygot mutanten Herzregionen gemessen werden, in denen Zilien an E11.5 gefunden worden waren, jedoch nicht in den Regionen, die als zilienlos beschrieben wurden (Abbildung 3.8 A). Diese Resultate demonstrieren, dass die ziliäre Dysfunktion *Ftm*-negativer Embryonen zu einer Reduktion atrialer und ventrikulärer Wanddicke

in allen analysierten Herzen führt.

Eine Veränderung der kardialen Wanddicke korreliert, aufgrund von der Normalität abweichender kardialer Pumpleistung, häufig mit einer Änderung des Umfangs von Atrien oder Ventrikeln (Gaasch, 1979). Aus diesem Grund wurde der Umfang der Atrien aller drei Genotypen an E14.5 vermessen und verglichen. Jedoch konnten bei diesen Messungen keine signifikanten Unterschiede zwischen $Ftm^{+/+}$ -, $Ftm^{+/-}$ - und $Ftm^{-/-}$ -Herzen festgestellt werden (Abbildung 3.8 B). Obwohl also kardiale Zilien die Wanddicke in bestimmten Bereichen von Atrien und Ventrikeln regulieren, scheint der Umfang der Herzkammern nicht durch Zilienfunktion kontrolliert zu werden.

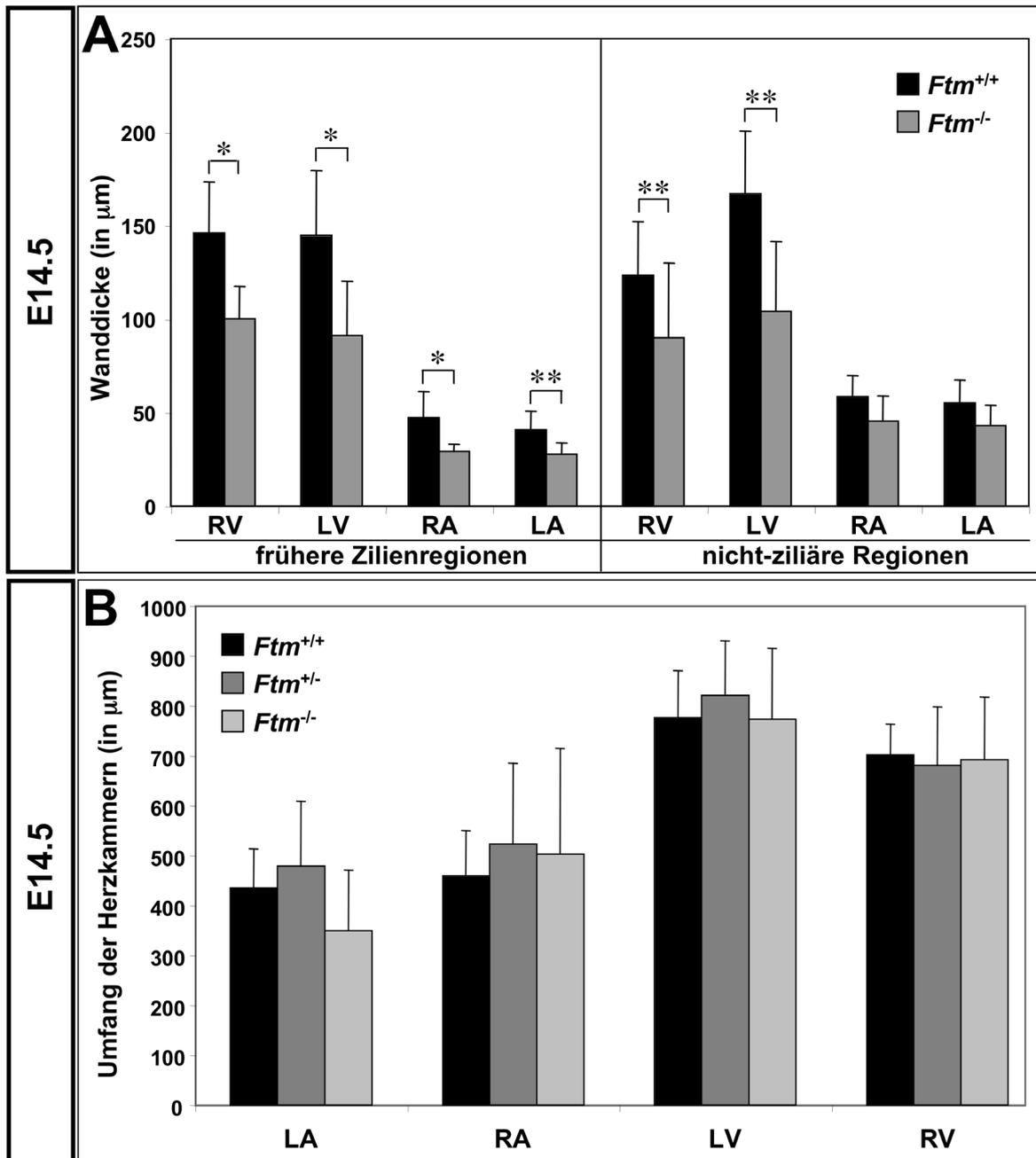


Abbildung 3.8: Reduktion der Wanddicke in *Ftm*-defizienten murinen Herzen.

(A, B) LA, linkes Atrium; LV, linker Ventrikel; RA, rechtes Atrium; RV, rechter Ventrikel; VS, ventrikuläres Septum. (A) Kardiale Wanddicke-Messungen von wildtypischen und *Ftm*-defizienten Atrien und Ventrikeln ($n =$ jeweils 6) in zukünftigen ziliären und nicht-ziliären Regionen an E14.5. Die Wände sind signifikant dünner in zukünftigen Zilienregionen. Zusätzlich zeigen auch ventrikuläre, nicht-ziliäre Regionen eine Reduktion in der Wanddicke, während atriale, nicht-ziliäre Bereiche keine signifikante Veränderung aufweisen. (B) Vergleich des atrialen und ventrikulären Herzkammerumfangs in wildtypischen ($n = 5$), *Ftm*-heterozygot mutanten ($n = 4$) und *Ftm*-homozygot mutanten ($n = 5$) Herzen an E14.5. Die verschiedenen Genotypen weisen keine signifikante Veränderung des Herzkammerumfangs, weder in den Atrien, noch in den Ventrikeln auf.

3.6 Zilien-vermittelte Shh-, nicht-kanonische Wnt- und Pdgfr α -Signale sind in *Ftm*-defizienten Herzen herunterreguliert

Studien konnten *in vivo* oder *in vitro* zeigen, dass hochkonservierte Signalwege zilienabhängig vermittelt werden (Corbit et al., 2005; Corbit et al., 2008; Gerdes et al., 2007; Haycraft et al., 2005; Rohatgi et al., 2007; Ross et al., 2005; Schneider et al., 2005). Ob die ziliäre Regulation der Proliferation auf der Mediation molekularer Signale über primäre, kardiale Zilien beruht, sollte in der vorliegenden Arbeit analysiert werden. Dazu wurden die Zielgenexpressionen des Shh-, des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt- sowie des Pdgfr α -Signalwegs in *Ftm*-defizienten Embryonen im Vergleich zum Wildtypen gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Expressionen von *Ptc1*, *Postn* und *Hif1 α* in *Ftm*-negativen Ventrikeln an E11.5 signifikant herunterreguliert sind, während die *Isl1*-Expression keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen aufwies (Abbildung 3.9 A). Da *Ptc1*, *Postn* und *Hif1 α* jeweils Zielgene vom Shh- (Hidalgo und Ingham, 1990; Marigo und Tabin, 1996), nicht-kanonischem Wnt- (Haertel-Wiesmann et al., 2000) und Pdgfr α -Signalweg (Yang et al., 2009) sind, bedeutet dies eine reduzierte Weiterleitung der genannten Transduktionskaskaden. Der kanonische Wnt-Signalweg dagegen (Zielgen: *Isl1*) (Qyang et al., 2007) erscheint unverändert. In *Ftm*-defizienten Atrien findet man lediglich die Expression von *Postn* erniedrigt vor, wogegen die Expressionen der anderen Zielgene in wildtypischem Maße vorhanden sind (Abbildung 3.9 C).

Führt man die gleichen Untersuchungen ergänzend zu einem späteren Zeitpunkt (E14.5) durch, an dem keine kardialen Zilien mehr vorhanden sind, so erhält man keine signifikanten Expressionsunterschiede der Zielgene *Ptc1*, *Isl1*, *Postn* und *Hif1 α* (Abbildung 3.9 B, D).

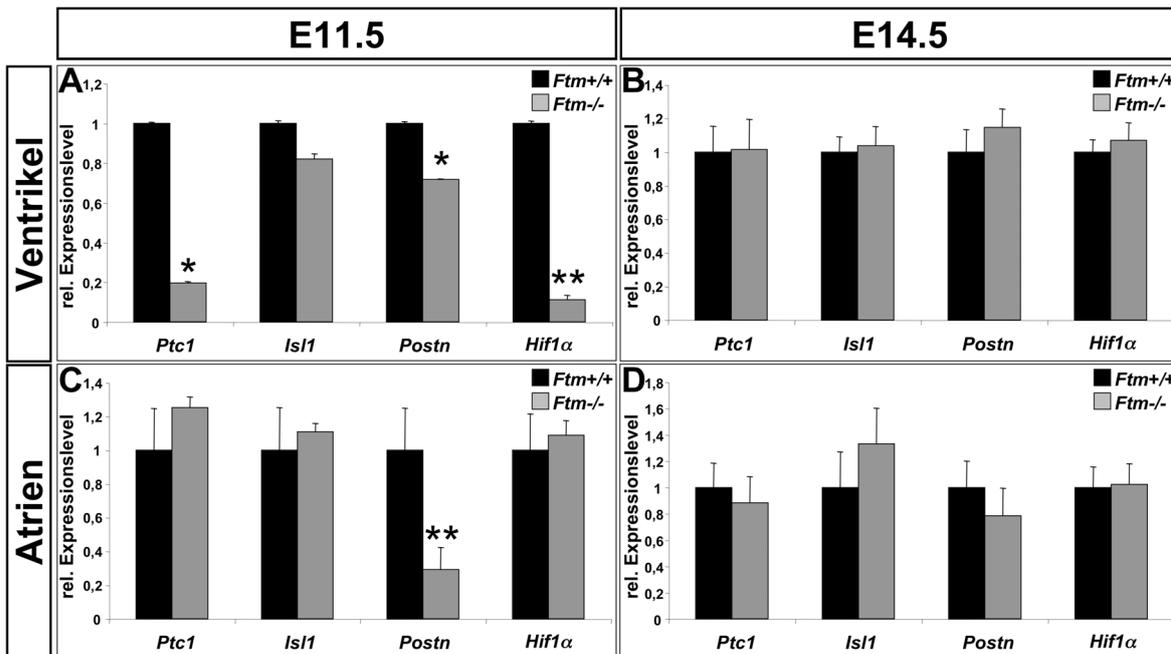


Abbildung 3.9: Zilien-vermittelte Shh-, nicht-kanonische Wnt- und Pdgfr α -Signale sind in *Ftm*-negativen, murinen Herzen herunterreguliert.

(A-D) Real-Time PCR-Analysen von wildtypischem und *Ftm*-defizientem ventrikulärem (A, B) und atrialem (C, D) Gewebe an E11.5 (A, C) und E14.5 (B, D). (A) Die Shh-Zielgenexpression von *Ptc1*, nicht-kanonische Wnt-Zielgenexpression von *Postn* und Pdgfr α -Zielgenexpression von *Hif1α* sind signifikant herunterreguliert in *Ftm*-defizienten Ventrikeln an E11.5 (n = jeweils 3; *Ptc1*: p = 0,013; *Postn*: p = 0,024; *Hif1α*: p = 0,005), während der kanonische Wnt-Signalweg (Zielgen: *Isl1*) zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant verändert ist (p = 0,656). (B) An E14.5 sind diese vier Signalwege in *Ftm*-negativen Ventrikeln (n = jeweils 6) unbeeinträchtigt. (C) In E11.5-Atrien (n = jeweils 6) ist ausschließlich der nicht-kanonische Wnt-Signalweg signifikant herunterreguliert, während keine der vier Transduktionskaskaden in E14.5-Atrien (n = jeweils 6) signifikant verändert ist (D).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem Shh-, dem nicht-kanonischen Wnt-, dem Pdgfr α -Signalweg und der Zilien-vermittelten Proliferation besteht. Allerdings muss zusätzlich gezeigt werden, dass der Shh-, der nicht-kanonische Wnt- und der Pdgfr α -Signalweg auch über kardiale Zilien in Mausembryonen vermittelt werden. Um dies zu testen, wurden Immunofluoreszenz-Studien durchgeführt, die es ermöglichen, Komponenten dieser Signalwege direkt an der Zilie sichtbar zu machen. Bei diesen Analysen wurde acetyliertes α -Tubulin zur Darstellung der Zilie verwendet, während γ -Tubulin den Basalkörper der Zilien markierte. Gli3-190, eine Komponente des Shh-Signalwegs, konnte am Basalkörper kardialer Zilien nachgewiesen werden (Abbildung 3.10 A; Abbildung 3.11 A), was offenbart, dass Shh-Signale über

kardiale Zilien vermittelt werden. Vangl2 gehört zur Gruppe der nicht-kanonischen Wnt-Rezeptoren und wurde bereits in Zilien von sowohl IMCD3-Zellen, als auch menschlichen, respiratorischen Epithelzellen nachgewiesen (Ross et al., 2005). In embryonalen Mausherzen liegt dieser Rezeptor entlang der gesamten Zilie vor (Abbildung 3.10 B). Einen Bestandteil des $\text{Pdgfr}\alpha$ -Signalwegs stellt Mek 1/2 dar. Ist dieses in phosphorylierter Form vorhanden, so ist der Signalweg aktiv. Auch phosphoryliertes Mek 1/2 konnte am Basalkörper kardialer Zilien gefunden werden (Abbildung 3.10 C; Abbildung 3.11 B). Der Rezeptor dieses Signalwegs, $\text{Pdgfr}\alpha$ selbst, konnte in der Zilie ubiquitär verteilt nachgewiesen werden (Abbildung 3.10 D). Folglich verlaufen auch der nicht-kanonische Wnt- und der $\text{Pdgfr}\alpha$ -Signalweg in murinen Herzen über Zilien. Daraus kann man schließen, dass diese drei Signalwege, der Shh-, der nicht-kanonische Wnt- und der $\text{Pdgfr}\alpha$ -Signalweg, die Zilien-regulierte Proliferation im Herzen steuern, indem sie über kardiale Zilien vermittelt werden. Somit spielen diese Signalwege eine essentielle Rolle bei der Entwicklung des VS.

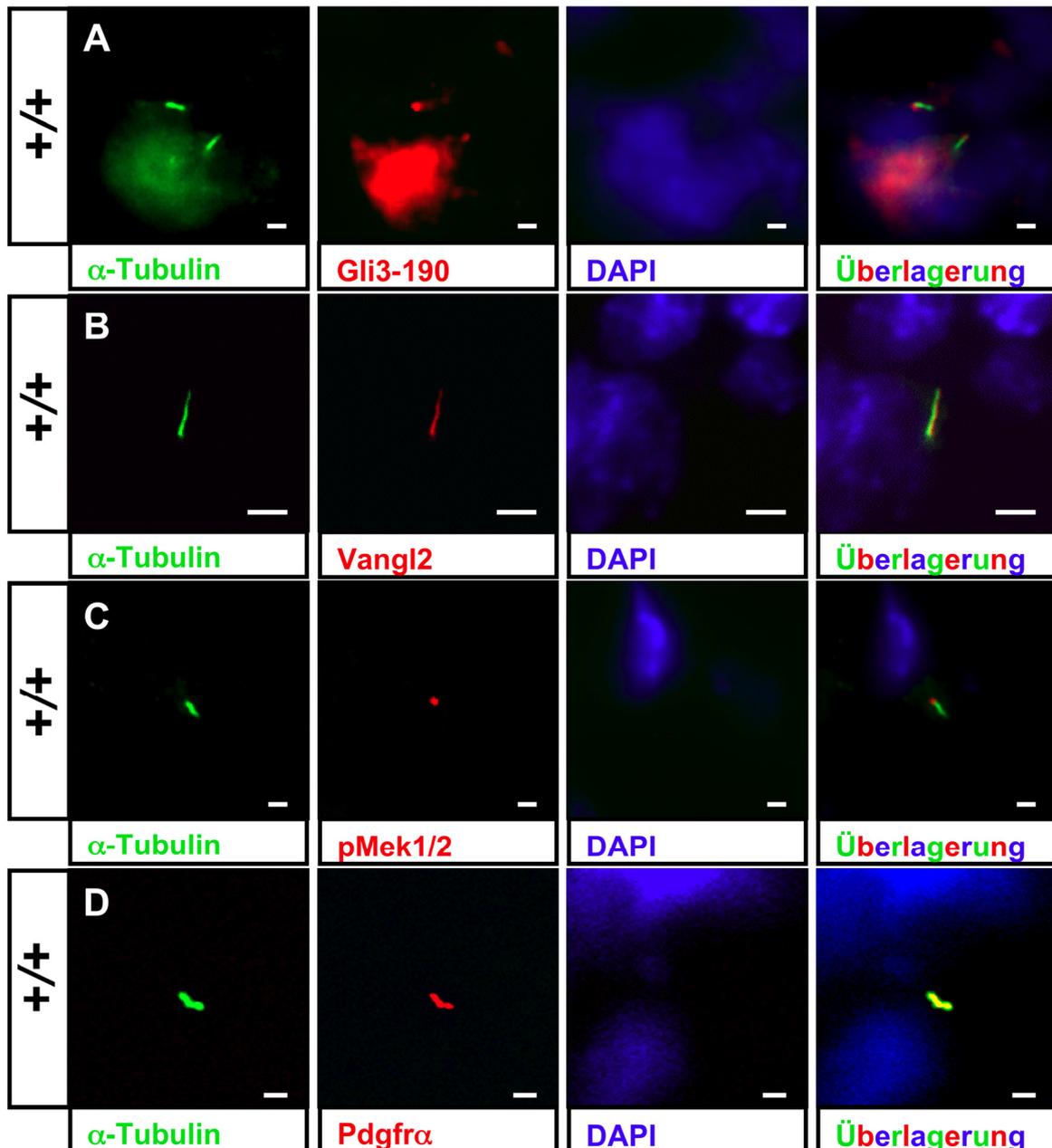


Abbildung 3.10: Shh-, nicht-kanonischer Wnt- und Pdgfr α -Signalwege werden über kardiale Zilien vermittelt.

(A-D) Immunofluoreszenz auf wildtypischen, transversen Herzschnitten an E11.5. Zilien sind durch acetyliertes α -Tubulin in grün angefärbt und Zellkerne durch DAPI in blau. (A-D) Maßstabsbalken (in weiß) repräsentieren eine Länge von 2 μ m. (A) Die ziliäre Gli3-190-Lokalisation (rote Färbung) in wildtypischen Herzen demonstriert die Transduktion des Shh-Signalwegs durch kardiale Zilien. (B) Vangl2 (rote Färbung) ist durchgängig in kardialen Zilien präsent. Dies zeigt die Vermittlung von nicht-kanonischen Wnt-Signalen durch Zilien im Herzen. (C) Da phosphoryliertes Mek1/2 (rote Färbung) in kardialen Zilien lokalisiert, muss der Pdgfr α -Signalweg in diesen aktiv sein. (D) Pdgfr α (rote Färbung) ist ubiquitär in kardialen wildtypischen Zilien verteilt.

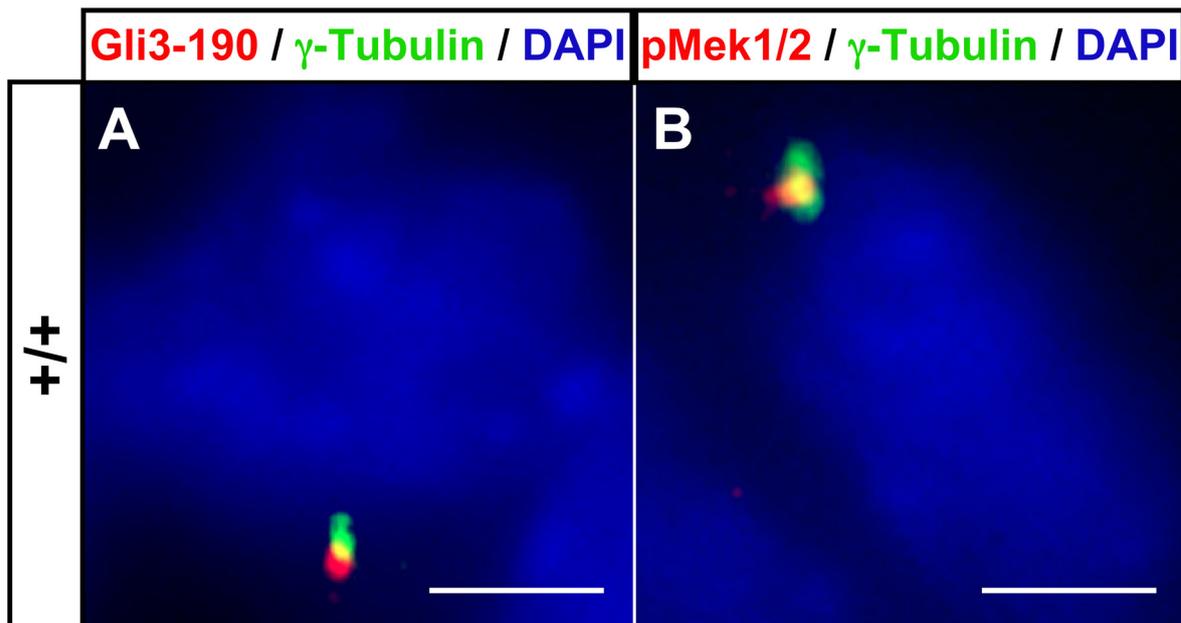


Abbildung 3.11: Kolokalisation von Gli3-190 und pMek1/2 mit dem γ -Tubulin-markierten Zentrosom/Basalkörper.

(A, B) Immunofluoreszenz auf transversen Herzschnitten an E11.5. Zentrosome/Basalkörper sind durch γ -Tubulin in grün markiert, Zellkerne in blau durch DAPI. Maßstabsbalken (in weiß) repräsentieren eine Länge von 2 μ m. (A) Gli3-190 (rote Färbung) ist am Zentrosom/Basalkörper von Zilien lokalisiert. (B) Phosphoryliertes Mek1/2 (rote Färbung) ist am Zentrosom/Basalkörper präsent.

3.7 Shh-Signale sind dem Pdgfr α -Signalweg in kardialen Zilien vorgeschaltet

Ob die oben beschriebenen Signalwege die Proliferationsregulation parallel realisieren oder ob ein Signalweg dem anderen vorgeschaltet ist, konnte mit weiteren Immunofluoreszenz-Analysen in *Ftm*- bzw. *Shh*-defizienten Embryonen aufgeklärt werden. Zunächst wurde die Lokalisation des Gli3-190-, des Vangl2- und des Pdgfr α -Proteins in *Ftm*-defizienten, kardialen Zilien detektiert. Während sich Gli3-190 und Vangl2 in wildtypischer Art und Weise verteilt zeigen (Abbildung 3.12 A, B), geht die ziliäre Präsenz von Pdgfr α in *Ftm*-negativen Herzen komplett verloren (Abbildung 3.12 C). Somit kann die Vermittlung des Pdgfr α -Signalwegs über die Zilie nicht mehr stattfinden. Dieses Resultat lässt vermuten, dass Pdgfr α -Signale stromabwärts des Shh- und/oder des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs agieren. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die Lokalisation der drei Signalweg-Komponenten in *Shh*-homozygot mutanten Herzen überprüft. Während

Gli3-190 und $Pdgfr\alpha$ in kardialen, Shh -negativen Zilien nicht vorhanden sind (Abbildung 3.12 D, F), konnte Vangl2 ubiquitär in diesen Zilien nachgewiesen werden (Abbildung 3.12 E).

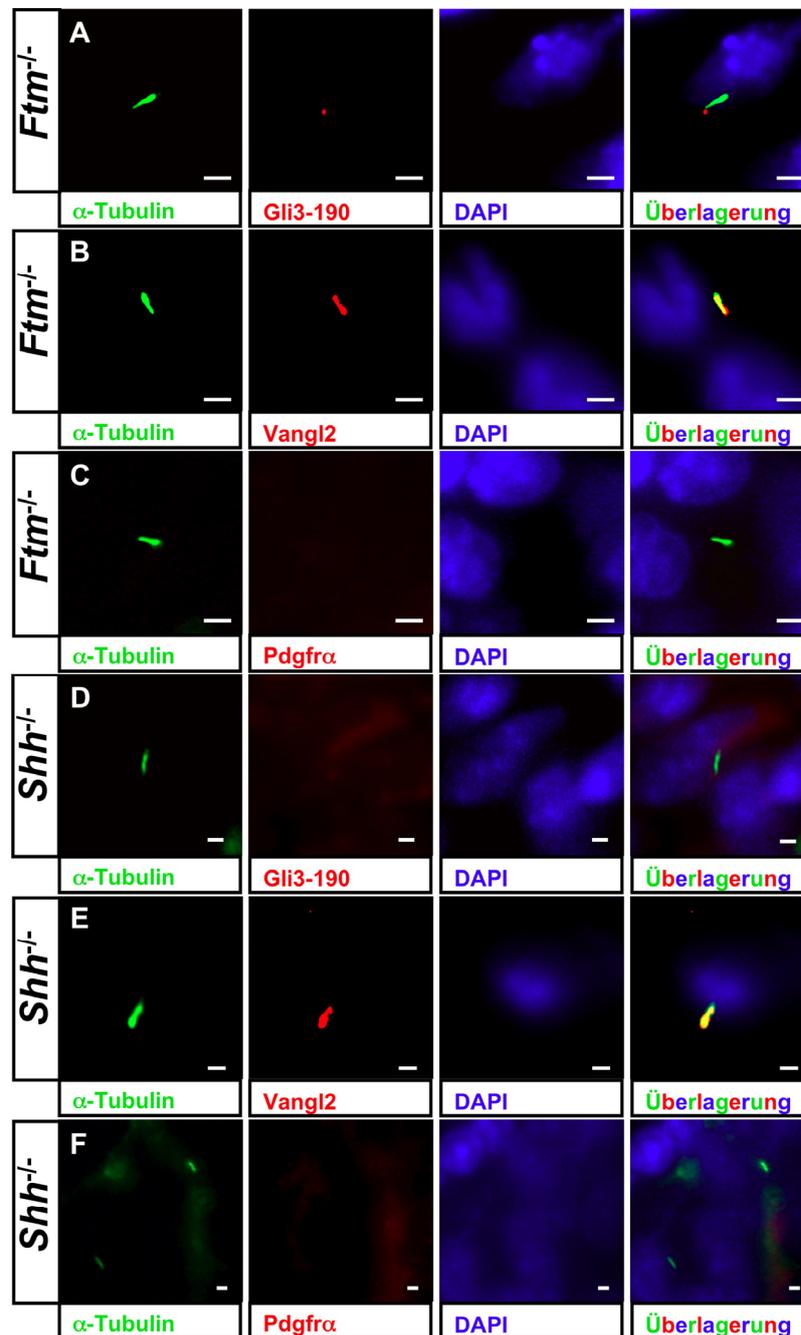


Abb 3.12: Shh-Signale wirken stromaufwärts von $Pdgfr\alpha$ -Signalwegen in kardialen Zilien.

(A-F) Immunofluoreszenz an E14.5. Zilien sind durch acetyliertes α -Tubulin in grün angefärbt und Zellkerne durch DAPI in blau. Maßstabsbalken (in weiß) repräsentieren eine Länge von 2 μ m. (a) Gli3-190 (rote Färbung) zeigt auch in kardialen $Ftm^{-/-}$ -Zilien eine ziliäre Lokalisation. (B) Vangl2 (rote Färbung) ist ubiquitär in kardialen Zilien in Ftm -negativen Herzen lokalisiert, während $Pdgfr\alpha$ in Zilien Ftm -defizienter Ventrikel abwesend ist (C). (D) Das Gli3-190 Protein wird nicht in $Shh^{-/-}$ -Herzzilien detektiert. (E) Vangl2 ist durchgängig in den kardialen Zilien Shh -negativer Herzen verteilt, wohingegen $Pdgfr\alpha$ nicht in $Shh^{-/-}$ defizienten Ventrikeln darstellbar ist.

Diese Untersuchungen zeigen, dass zunächst ziliäre Shh-Signale vermittelt werden und diese dann wiederum, entweder direkt oder indirekt, eine Pdgfr α -Lokalisation bzw. eine Transduktion von Pdgfr α -Signalen in der kardialen Zilie zulassen. Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg, hingegen, scheint dem Shh-Signalweg und somit auch dem Pdgfr α -Signalweg nicht nachgeschaltet zu sein, denn Vangl2 zeigt auch in *Shh*-negativen Herzen eine ubiquitär ziliäre Verteilung (Abbildung 3.12 E). Daher haben *Ftm* oder die durch den *Ftm*-Verlust gestörte Zilienfunktion zunächst Auswirkungen auf den Shh- und/oder den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg, und zwar noch bevor die Pdgfr α -Signaltransduktion angeschaltet wird. Da, wie bereits in der Einleitung beschrieben, über den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg bisher erst wenig bekannt ist, gestaltet sich die Analyse, an welcher Position *Ftm* dort eingreift, sehr schwierig. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktion von *Ftm* ausschließlich im kardial-ziliär vermittelten Shh-Signalweg näher beleuchtet.

3.8 Der Shh-Signalweg ist aufgrund eines Gli3-Prozessierungsdefekts in *Ftm*-defizienten Mausherzen gestört

Da sich der Phänotyp *Shh*-defizienter Herzen, die atrioventrikuläre Septendefekte aufweisen (Goddeeris et al., 2008), stärker verändert darstellt als jener *Ftm*-negativer Herzen, ist es offensichtlich, dass *Ftm* stromabwärts des Shh-Liganden im Shh-Signalweg wirkt. Die Phänotypen von *Ptc1*^{-/-} (Goodrich et al., 1997) und *Smo*^{-/-}-Mausembryonen (Tran et al., 2008) sind ebenfalls stärker verändert als der *Ftm*^{-/-}-Phänotyp, so dass es unwahrscheinlich ist, dass *Ftm* auf diesen Ebenen in der Shh-Transduktionskaskade eine Rolle spielt. An welcher Stelle der Signalweg in *Ftm*-negativen Embryoherzen beeinträchtigt ist, lässt sich mutmaßen, wenn man sich den Herz-Phänotyp *Gli3*-homozygot mutanter Embryonen anschaut. Diese zeigen eine linksventrikuläre Nicht-Kompaktion der Trabekel (Abbildung 3.13 B), was einen Defekt in der Formation des muskulären VS darstellt. Desweiteren wurde bereits das Verhältnis von Gli3-190 zu Gli3-83 im Gesamtlysat *Ftm*-negativer Embryonen an E11.5 analysiert und festgestellt, dass dieses im Vergleich zum Wildtyp verändert ist. Der Verlust des *Ftm*-Gens führt dort zu einer Anhäufung des Gli3-190-Proteins, wobei die Menge an Gli3-83

unverändert erscheint (Vierkotten et al., 2007). Um zu überprüfen, ob dies auch die Ursache der Störung des Shh-Signalwegs in *Ftm*-defizienten Ventrikeln darstellt, wurden die Proteinmengen von Gli3-190 und Gli3-83 herzspezifisch ermittelt. Diese Analysen wurden von Dipl.-Biol. Johanna Lier aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Das Ergebnis gestaltete sich jedoch anders als in den gesamtembryonalen Analysen: In *Ftm*-negativen, embryonalen Herzen wurde an E11.5 eine Erhöhung der Gli3-190-Proteinmenge gefunden, jedoch eine reduzierte Menge des Gli3-83-Proteins (Abbildung 3.13 C). Dabei ist das Verhältnis von Gli3-190 zu Gli3-83 in *Ftm*-homozygot mutanten Herzen um 1,61fach höher als in wildtypischen Herzen (Abbildung 3.13 D).

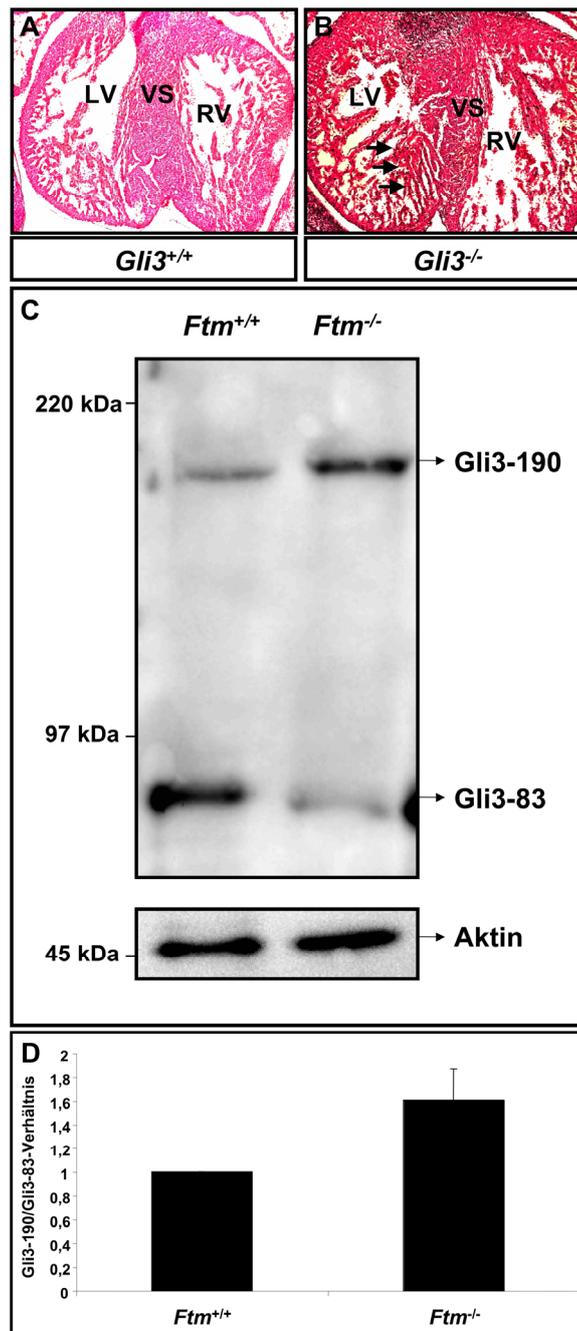


Abbildung 3.13: Gli3 ist in die Entwicklung des muskulären ventrikulären Septums involviert und *Ftm*-negative Herzen zeigen eine Störung in der Gli3-Prozessierung.

(A,B) Hämalaun/Eosin-Färbungen von transversalen Herzschnitten an E13.5. (B) *Gli3*-defiziente Herzen zeigen eine links-ventrikuläre Nicht-Kompaktion, da ein Teil der Trabekel im linken Ventrikel nicht fusioniert, um eine Funktion im muskulären VS auszuüben (angedeutet durch schwarze Pfeile). (C) Western Blot-Analysen von E11.5-Herzproteinlysaten. Diese Arbeiten wurden von Dipl.-Biol. Johanna Lier aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere durchgeführt. Aktin fungiert als Ladungskontrolle. Die Menge an Gli3-190 Protein ist höher in *Ftm*-defizienten als in wildtypischen Herzen (n = jeweils 12), während weniger Gli3-83 (in *Ftm*^{-/-}-Herzen) detektierbar ist. Dies deutet auf einen Prozessierungsdefekt in *Ftm*-negativen Herzen hin. (D) Graphische Darstellung des Gli3-190/Gli3-83-Verhältnisses in wildtypischen und *Ftm*-defizienten

Embryonen. Das Gli3-190/Gli3-83 Verhältnis ist um das 1,61fache in *Ftm*-homozygot mutanten Herzen erhöht. LV, linker Ventrikel; RV, rechter Ventrikel; VS, ventrikuläres Septum.

4 Diskussion

4.1 Monozilien muriner Herzen üben eine sensorische Funktion aus

Zilien findet man an der Oberfläche der meisten eukaryotischen Zellen (Pan und Snell, 2005), wo sie die Entwicklung eines Organismus maßgeblich steuern (Goetz und Anderson, 2010). Daher zeigen ziliopathogene Individuen multiple und mannigfaltige Fehlbildungen (Huangfu und Anderson, 2005; Liu et al., 2005). In ihnen ist die überwiegende Mehrheit aller Organe funktionsgemindert oder gar funktionsunfähig (Delous et al., 2007). Aus diesem Grund war es verwunderlich, dass für das Herz, welches im Verlaufe der Vertebraten-Entwicklung das erste Organ ist, das gebildet wird, lange Zeit nicht publiziert war, ob dessen Zellen Zilien tragen. Als die Untersuchungen dieser Dissertation begannen, war lediglich die Präsenz kardialer Zilien im Huhn bekannt (Van der Heiden et al., 2006). Mittlerweile wurden zwei Artikel veröffentlicht, die ebenfalls das Auftreten von Zilien in murinen Herzen beschreiben (Clement et al., 2009; Slough et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden Zilien in einer Zeitspanne von E10.5 bis E12.5 auf Endokard- und Myokardzellen in distinkten Bereichen des embryonalen Mausherzens gefunden (Abbildung 3.3). Um zu analysieren, ob diese kardialen Zilien eine motorische oder eine sensorische Funktion besitzen, wurden Immunofluoreszenz-Untersuchungen mit Hilfe des Markers LRD (left-right dynein) durchgeführt. In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass die Verwendung dieses Markers der Bestimmung der Mikrotubuli-Konformation per Transmissionselektronenmikroskopie vorzuziehen ist, da man nicht mit Bestimmtheit feststellen kann, dass eine „9+0“-Konformation lediglich bei immotilen Zilien und ein „9+2“-Konformation ausschließlich bei motilen Zilien vorliegt. Beispielsweise existieren „9+0“-Zilien auf murinen Knotenzellen (der Knoten ist ein frühes Organisationszentrum, das bei der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie eine bedeutende Rolle spielt), die motil sind (Nonaka et al., 2002), oder „9+2“-Zilien auf humanen, respiratorischen Epithelzellen bzw. auf dem Epithel des Säugetierovidukts, die eine sensorische Funktion ausüben (Ross et al., 2005; Teilmann und Christensen, 2005). LRD befindet sich an der Basis

motiler Zilien, während es bei immotilen Zilien nicht detektiert werden kann. Die Abwesenheit von LRD in murinen, kardialen Zilien führt daher zu der Erkenntnis, dass diese immotil und daher sensorisch sein müssen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde rasch deutlich, dass die Untersuchung der Zilien in murinen Herzen die Möglichkeit eröffnet, molekulare Prozesse kardialer Entwicklungsvorgänge näher zu charakterisieren. Da *Ftm*-defiziente Mausembryonen einen ziliopathogenen Phänotyp und deren Herzen einen perimembranösen VSD aufweisen, war es offensichtlich, dass kardiale Zilien Signale vermitteln, die zur Generierung des VS beitragen.

4.2 Kardiale Zilien kontrollieren das Auswachsen des VS durch Proliferationsregulation

Der VSD stellt den häufigsten angeborenen Herzfehler beim Menschen dar (Lloyd-Jones et al., 2009), dennoch ist die Ursache seines Auftretens auf molekularer Ebene noch größtenteils unbekannt (Franco et al., 2006; Sakata et al., 2002). Da kardiale Zilien und die VS-bildende Proliferation (Franco et al., 2006; Goor et al., 1970a; Rychter et al., 1979; Steding und Seidl, 1980; Van Mierop und Kutsche, 1985) zur gleichen Zeit am selben Ort in den Ventrikeln auftreten, war zu vermuten, dass das Auswachsen des muskulären VS und folglich auch die Bildung des membranösen VS auf der Funktion kardialer Zilien beruhen. In der Annahme, dass eine Interaktion des muskulären VS mit den endokardialen Kissenzellen in der Initiation der Entwicklung des membranösen VS resultiert, wird in dieser Arbeit postuliert, dass kardiale Zilien in Säugetieren die Bildung des muskulären VS beeinflussen, welches in irgendeiner Art und Weise mit den Endokardkissen interagiert. Es scheint so, als ob das Auswachsen des muskulären VS fertiggestellt sein muss, bevor die Generierung des membranösen VS startet. Diese Vermutung wird durch die Tatsachen bestätigt, dass ein perimembranöser VSD (Abbildung 3.1 B) und eine ziliäre Dysfunktion (Abbildung 3.5 B, C, G; Abbildung 3.7 A; Abbildung 3.8 A; Abbildung 3.9; Abbildung 3.12 C; Abbildung 3.13) in *Ftm*-defizienten Herzen vorliegen.

Die hier gezeigten Ergebnisse belegen, dass kardiale Zilien nicht die gesamte Proliferation im Herzen steuern, sondern speziell den Teil der Proliferation, der unter anderem notwendig für die Entwicklung des VS ist. Die ziliäre

Kontrolle erlaubt somit eine räumlich und zeitlich exakte Regulation dieses Prozesses. Desweiteren scheinen sich die Endokardkissen in *Ftm*-defizienten Herzen normal zu entwickeln (Abbildung 3.2), so dass diese Struktur nicht als Ursache des perimembranösen VSD in Frage kommt.

4.3 Zilien-gesteuerte Proliferation beeinflusst die Dicke atrialer und ventrikulärer Wände

Weiterhin wurde an E14.5 eine Abnahme der Dicke atrialer und ventrikulärer Herzwände in *Ftm*-defizienten Mausembryonen detektiert. Diese Reduktion trat an allen Stellen auf, die zuvor Zilien aufgewiesen hatten (Abbildung 3.8 A). In den Atrien konnte dabei eine deutliche Trennung früherer Zilienregionen und Regionen, in denen niemals Zilien gefunden wurden, beobachtet werden; Bereiche, die an E11.5 Zilien aufwiesen, zeigten eine Reduktion der Wanddicke, während in Arealen, die zu keinem Zeitpunkt Zilien erkennen ließen, eine normale Wanddicke gemessen wurde (Abbildung 3.8 A). Im Gegensatz zu den Atrien, wurde in den Ventrikeln bei sowohl früher ziliären, als auch nicht-ziliären Wänden eine Verringerung der Wanddicke detektiert (Abbildung 3.8 A). Entsprechend der Erkenntnis, dass Zilien-gesteuerte Proliferation essentiell für das vollständige Auswachsen des muskulären VS ist, kann man die Hypothese aufstellen, dass die Proliferation in ziliären Ventrikelregionen nicht nur zu einer Zunahme der Wanddicke beiträgt, sondern auch zu einem Verschieben von Zellen ziliärer Regionen in nicht-ziliäre Regionen und wiederum von Zellen nicht-ziliärer Bereiche zur Basis des muskulären VS führt (Abbildung 4.1 C). Somit kommt es ebenfalls zu einer ziliären Regulation der Wanddicke in den nicht-ziliären Arealen. Da der Verlust von *Ftm* in einer Proliferationsabnahme der Zilienregionen resultiert, ist die Anzahl der Zellen, die zur Basis des muskulären VS geschoben werden, reduziert. Dies führt zu einem verkürzten muskulären VS und auch zu dünneren Wänden in Bereichen, die nie Zilien detektieren ließen und zwischen ziliären Regionen und der Basis des muskulären VS lokalisieren. Daher ist die Reduktion der Wanddicke in ziliären und sogar in nicht-ziliären, ventrikulären Regionen eine Konsequenz der Dysfunktion kardialer Zilien.

Anders als ventrikuläre Zilien kontrollieren atriale Zilien nicht die Entwicklung des Septums, denn das atriale Septum wird in *Ftm*-negativen Herzen normal

ausgebildet. Allerdings steuern auch atriale Zilien die Dicke der Herzwände. Da die Zilien der Vorhöfe nur an bestimmten Stellen präsent sind und da die atriale, ziliäre Dysfunktion in *Ftm*^{-/-}-Herzen zu dünneren Wänden speziell in den Bereichen führt, wo Zilien vorkommen (Abbildung 3.8 A), kann man schlussfolgern, dass atriale Wandzellen nicht wie in den Ventrikeln durch Zilien-regulierte Proliferation in andere nicht-ziliäre Regionen geschoben werden, sondern an Ort und Stelle verharren, um dort die atrialen Wände zu verdicken. Warum in den Atrien nur bestimmte Bereiche existieren, wo Zilien Proliferation und folglich die Wanddicke steuern, muss in Zukunft weiter untersucht werden.

Obwohl eine verringerte Wanddicke aufgrund eines schwächeren Herzschlags in vielen Fällen mit vergrößerten Atrien und Ventrikeln assoziiert ist (Gaasch, 1979), wurde keine signifikante Veränderung des Umfangs der Atrien oder Ventrikel in *Ftm*-negativen Embryonen detektiert (Abbildung 3.8 B). Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass sämtliche Defekte *Ftm*-homozygot mutanter Mäuse ausschließlich in der Embryonalentwicklung zu beobachten sind, denn diese Mäuse sind postnatal nicht lebensfähig. Da der Herzschlag muriner Embryonen ungefähr an E8.0 einsetzt (Ji et al., 2003) und Zilien erst an E10.5 gefunden wurden, ist E14.5 eventuell zu früh, um Konsequenzen der reduzierten Wanddicke in *Ftm*-defizienten Herzen festzustellen. Außerdem wurde bereits publiziert, dass fötale und maternale Herzfrequenzen miteinander assoziiert sind (Van Leeuwen et al., 2003), was die Möglichkeit eröffnet, dass die Mutter ihrem Embryo hilft, eine potentiell verringerte Herzschlagrate zu kompensieren.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Proliferation aufgrund einer Dysfunktion kardialer Zilien (Abbildung 3.7 A) in verschiedenen Regionen *Ftm*-defizienter Herzen reduziert ist. Diese verminderte Proliferation wiederum verursacht eine geringere Wanddicke (Abbildung 3.8 A), aber verändert nicht den Umfang *Ftm*-negativer Herzkammern (Abbildung 3.8 B).

4.4 Kardiale Zilien vermitteln proliferative Signale

Die Analysen dieser Arbeit identifizierten drei Zilien-vermittelte Signaltransduktionswege, die für die VS-bildende Proliferation in den Ventrikeln verantwortlich sind. In den Atrien hingegen konnte nur ein Signalweg gefunden werden, der dort die Zilien-kontrollierte Proliferation steuert. Während sich in

atrialen Zilien *Ftm*-homozygot mutanter Herzen an E11.5 die nicht-kanonischen Wnt-Signale herunterreguliert darstellen (Abbildung 3.9 C), wurde in den ventrikulären *Ftm*-defizienten Zilien zur gleichen Zeit eine Reduktion der Shh-, nicht-kanonischen Wnt- und *Pdgfr α* -Signale nachgewiesen (Abbildung 3.9 A). Diese Daten deuten auf einen Unterschied in der Signaltransduktion ventrikulärer und atrialer Zellen hin. Bemerkenswert ist, dass der nicht-kanonische Wnt-Signalweg in Atrien und Ventrikeln *Ftm*-homozygot mutanter Embryonen verminderte Zielgenaktivierung zeigt. Durch den Nachweis der ubiquitären Verteilung von *Vangl2*, eines spezifischen Rezeptors für den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg (Keller, 2002), in kardialen Zilien (Abbildung 3.10 B) konnte der Beweis erbracht werden, dass nicht-kanonische Wnt-Signale in murinen Herzen über Zilien vermittelt werden. Ferner wurde offenkundig, dass nicht-kanonische Wnt-Signale dem Shh-Signalweg in kardialen Zilien nicht nachgeschaltet sind, denn die ziliäre Lokalisation von *Vangl2* ist auch in *Shh*-negativen Herzen vorhanden (Abbildung 3.12 E). Daher wurde spekuliert, ob der nicht-kanonische Wnt-Signalweg dem Shh-Signalweg vorgeschaltet ist oder ob beide Signalwege parallel agieren. Es ist bekannt, dass die Inaktivierung von *Wnt5a*, einem Ligand des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs, zu einem VSD führt (Schleiffarth et al., 2007). *Shh*-homozygot mutante Mäuse jedoch zeigen atrioventrikuläre Septendefekte (Goddeeris et al., 2008). Somit ist der Herzphänotyp *Shh*-negativer Mausembryonen stärker verändert als der von *Wnt5a*-defizienten Mäusen, was bedeutet, dass nicht-kanonische Wnt-Signale der Shh-Transduktion in murinen Ventrikeln tatsächlich nicht vorgeschaltet sind, sondern dass beide Signalwege Seite an Seite agieren.

In den vergangenen Jahren konnte dem Shh-Signalweg eine Rolle in der frühen Herzentwicklung zugeschrieben werden (Dyer und Kirby, 2009). Obwohl zuvor bereits atrioventrikuläre Septendefekte in *Shh*^{-/-}-Mäusen beschrieben worden waren (Goddeeris et al., 2008), wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Bedeutung des Shh-Signalwegs für die späte Herzentwicklung analysiert, nämlich für die Bildung des VS. Anders als der nicht-kanonische Wnt-Signalweg verläuft der *Pdgfr α* in ventrikulären Zilien nicht parallel zum Shh-Signalweg, sondern ist diesem nachgeschaltet. In wildtypischen Herzen weisen Komponenten des *Pdgfr α* -Signalwegs eine ziliäre Lokalisation auf (Abbildung 3.10 C, D), jedoch fehlt diese in *Shh*-defizienten Herzen (Abbildung 3.12 F). Der Verlust von

Pdgfr α allein hat bereits das Auftreten eines VSDs zur Folge (Richarte et al., 2007). Daher beeinträchtigt der Ziliendefekt *Ftm*-homozygot mutanter Ventrikel zuerst den Shh-Signalweg, bevor die Störung der Shh-Signale zu einem Defekt im *Pdgfr α* -Signalweg führt, so dass die Kontrolle der VS-generierenden Proliferation beeinträchtigt wird. Die Tatsache, dass in *Ftm*-defizienten Ventrikeln eine Restexpression der *Hif1 α* -Transkripte vorgefunden wurde (Abbildung 3.9 A), kann mit Hilfe einer Regulation von *Hif1 α* durch andere Faktoren als den *Pdgfr α* -Signalweg erklärt werden. Zu diesen Faktoren gehören das Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein (pVHL) (Toschi et al., 2008) und der vaskuläre, endotheliale Wachstumsfaktorrezeptor (VEGFR) (Nilsson et al., 2010).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen eine Reduktion des Zilienvermittelten Shh-, nicht-kanonischen Wnt- und *Pdgfr α* -Signaltransduktionsweg in *Ftm*-negativen Herzen an E11.5 auf (Abbildung 3.9 A). Dabei zeigt sich der nicht-kanonische Wnt-Signalweg in Atrien und Ventrikeln vermindert, während die Shh- und *Pdgfr α* -Signalwege ausschließlich in den Ventrikeln herunterreguliert sind. Zudem konnte eine Hierarchie dieser drei Signalwege in den Ventrikeln determiniert werden. Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg agiert parallel zum Shh-Signalweg, der *Pdgfr α* -Signalweg hingegen ist Shh-Signalen nachgeschaltet.

4.5 Die Prozessierung von Gli3 ist in *Ftm*-negativen Herzen gestört

Da die Störung der *Pdgfr α* -Signale in *Ftm*-homozygot mutanten Herzen eine Konsequenz des defekten Shh-Signalwegs darstellt, wurde nach der Komponente im Shh-Signaltransduktionsweg gesucht, die diesen Defekt durch den Verlust von *Ftm* verursacht. Die Herzphänotypen von *Shh*- (Goddeeris et al., 2008), *Ptc1*- (Goodrich et al., 1997) und *Smo*-defizienten Mausembryonen (Tran et al., 2008) suggerieren, dass die Störung stromabwärts von *Smo* geschieht, denn diese Phänotypen sind stärker verändert als der kardiale Phänotyp *Ftm*-negativer Embryonen. Da *Gli3*-homozygot mutante Embryonen Defekte in der Entwicklung des muskulären VS aufweisen (Abbildung 3.13 B) und da das Verhältnis von Gli3-190 zu Gli3-83 in *Ftm*-defizienten Herzen verändert ist (Abbildung 3.13 C), kann der Defekt im Shh-Signalweg auf die Ebene zurückgeführt werden, auf der Gli3

wirkt. Einerseits wird eine erhöhte Menge an Gli3-190 in *Ftm*-defizienten Herzen beobachtet, andererseits weniger Gli3-83-Protein in diesen Herzen detektiert. Dies resultiert in einem um 1,61fach erhöhten Verhältnis von Gli3-190 zu Gli3-83 (Abbildung 3.13 D). Das Ergebnis deutet auf einen Defekt der proteolytischen Prozessierung von Gli3 hin, da weniger Vollängen-Gli3 zur Repressorform gespalten wird, als dies in wildtypischen Herzen geschieht. Dementsprechend weisen *Ftm*-negative Herzen eine höhere Gli3-190-Menge auf (Abbildung 3.13 C). Dennoch sind Shh-Signale in *Ftm*-homozygot mutanten Ventrikeln reduziert (Abbildung 3.9 A). Eine Erklärung dieses Phänomens könnte eine Störung der Transformation von Vollängen-Gli3 in seine transkriptionale Aktivatorform sein, was zu einer verminderten Aktivierung der Shh-Zielgene führen würde.

4.6 Die ziliäre Dysfunktion in *Ftm*-defizienten Herzen könnte auf einem defekten IFT beruhen

Eng verbunden mit der proteolytischen Prozessierung des Gli3-Proteins scheint der IFT zu sein, denn es wurde gezeigt, dass IFT-Proteine essentiell für den korrekten Ablauf der Shh-Signaltransduktion sind. In diesem Zusammenhang erfüllen sie sowohl Aufgaben bei der Prozessierung der Gli-Transkriptionsfaktoren in deren Repressorform, als auch Funktionen bei der Transformation der Vollängen-Gli-Proteine in potente Transkriptionsaktivatoren (Chen et al., 2009a; Haycraft et al., 2005; Huangfu und Anderson, 2005; Huangfu et al., 2003; Liu et al., 2005). Defekte der Größe, Gestalt oder Anzahl von Zilien liegen oftmals in einer Beeinträchtigung des IFTs begründet, beispielsweise in der Änderung der Transportgeschwindigkeit. IFT-Mutanten des Nematoden *Caenorhabditis elegans* werden aufgrund ihrer Zilienmorphologie in Komplex A- und Komplex B-Mutanten klassifiziert (Perkins et al., 1986). Komplex A-Mutanten zeichnen sich durch verkürzte Zilien mit einer blasenartigen Struktur an ihren distalen Spitzen aus, die auf einem defekten retrograden IFT beruhen. Komplex B-Mutanten zeigen einen gestörten anterograden IFT, der in verkürzten und zahlenmäßig verminderten Zilien resultiert. Zilien, die einen beeinträchtigten IFT aufweisen, lassen eine gestörte Transduktion molekularer Signale erkennen (Haycraft et al., 2005; Haycraft et al., 2007; Huangfu und Anderson, 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Zilienlänge analysiert und

konnte in *Ftm*-defizienten Embryoherzen als hochsignifikant verkürzt befunden werden (Abbildung 3.5 C). Dies deutet auf einen IFT-Defekt hin. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit der kardialen *Ftm*^{-/-}-Zilien mit den Zilien der *C. elegans*-Komplex B-Mutanten lag die Vermutung nahe, dass ein defekter anterograder IFT zu der Verkürzung der *Ftm*-defizienten Zilien im Mausherzen führt. Eine Störung des retrograden IFT gilt als unwahrscheinlich, da blasenartige Strukturen am distalen Zilienende, ähnlich den Zilien in *C. elegans*-Komplex A-Mutanten, bei kardialen, *Ftm*-negativen Zilien nicht beobachtet wurden. Weder die ziliäre Lokalisation von Kif3a, einem Bestandteil des Kinesin-Motorproteins (siehe 1.4.3), noch von Ift88 konnte einen eindeutigen Aufschluss geben, ob der IFT in *Ftm*-defizienten Herzen tatsächlich gestört ist. Im Herz unterscheidet sich die Kif3a-Verteilung in *Ftm*-negativen Zilien nicht von der wildtypischer Zilien (Abbildung 3.5 E). Dementgegen präsentiert sich die Ift88-Lokalisation in 30% (15 von 50 Zilien) der kardialen, *Ftm*-homozygot mutanten Zilien verändert, denn im Gegensatz zu der ubiquitären Lokalisation in wildtypischen Zilien wurde in *Ftm*-negativen Zilien eine Ansammlung des Ift88-Proteins an beiden ziliären Enden beobachtet (Abbildung 3.5 G). Somit erscheint der IFT in einem Teil der kardialen, *Ftm*-defizienten Zilien in irgendeiner Weise beeinträchtigt. Möglicherweise führt diese IFT-Störung zu dem Gli3-Prozessierungsdefekt in *Ftm*^{-/-}-Herzen. Allerdings konnte bis jetzt niemand beweisen, dass Vollängen-Gli3 wirklich innerhalb von Zilien prozessiert wird, auch wenn Proteasomen bereits an der Zilie nachgewiesen wurden (Wigley et al., 1999).

4.7 Neben Zilien gibt es weitere Faktoren, die für die Entwicklung des VS verantwortlich sind

Kardiale Zilien können nicht die einzige Ursache für den perimembranösen VSD *Ftm*-negativer Herzen sein, denn obwohl 100% der *Ftm*-defizienten Mäuse eine defekte ventrikuläre Proliferation aufweisen, zeigen lediglich 30% der *Ftm*^{-/-}-Embryonen einen perimembranösen VSD. Daher scheint ein kombinatorischer Effekt der Zilien-regulierten Proliferation in den Ventrikeln und anderen Faktoren, die noch charakterisiert werden müssen, zu existieren. Einer dieser Faktoren könnte der Links-Rechts-Asymmetriedefekt *Ftm*-homozygot mutanter Embryonen sein (Vierkotten et al., 2007), der wie die ventrikuläre Proliferationsstörung

ebenfalls eine Folge der ziliären Dysfunktion darstellt. Dabei tritt in 19% der *Ftm*-negativen Mausembryonen eine fehlerhafte Drehung des Herzens auf (Vierkotten et al., 2007). Häufig wird ein VSD von einem Links-Rechts-Asymmetriedefekt begleitet, weshalb mehrere Publikationen über eine Rolle von Lateralitätsdefekten in der Ausbildung eines VSD diskutieren (Tan et al., 2007). Aber auch eine falschseitige Herzdrehung kann nicht als exklusiver Grund für das Auftreten eines VSD gelten, da nicht jedes Herz, das einen Lateralitätsdefekt aufweist, einen VSD beobachten lässt (Tan et al., 2007).

Der gesamte Phänotyp *Ftm*-defizienter Mäuse unterliegt einer hohen Variation. Diese reicht von schwer erkennbaren Defekten bis zu stark deformierten Embryonen, wobei allerdings alle Mäuse ohne das *Ftm*-Protein spätestens kurz nach ihrer Geburt sterben (Vierkotten et al., 2007). Die Ursache dieser breiten phänotypischen Varianz ist unbekannt, aber möglicherweise ist es die gleiche, die auch bedingt, dass nur 30% der *Ftm*^{-/-}-Herzen einen VSD zeigen. Möglicherweise spielt die Anzahl der Zilien eine entscheidende Rolle bei der phänotypischen Varianz. Angenommen der Schweregrad des mutanten Phänotyps ist abhängig von einem Schwellenwert, so könnte gelten: Je weniger Zilien vorhanden sind, desto weniger Signale werden vermittelt und desto stärker ist der mutante Phänotyp. Die Ergründung der Ursache für diese Phänotyp-Varianz könnte einen wichtigen Fortschritt bei der Entschlüsselung der Funktion von *Ftm* und von Zilien allgemein darstellen.

4.8 Modell der VS-Entstehung

Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben es, ein Modell der Entwicklung des VS aufzustellen und zu erklären, warum einige *Ftm*-negative Mausembryonen einen VSD ausbilden. Ventrikuläre Zellen in bestimmten Regionen des Herzens zeigen sensorische Monozilien (Abbildung 3.3 E). Diese kardialen Zilien präsentieren Rezeptoren für Shh-, nicht-kanonische Wnt- und *Pdgfr*α-Signale an ihrer Oberfläche, was es ihnen gestattet, diese Signale zu empfangen und zu vermitteln (Abbildung 3.10). Folglich werden Zielgene all dieser Signalwege in Zilien-tragenden, ventrikulären Zellen aktiviert, wobei bewiesen werden konnte, dass der *Pdgfr*α-Signalweg dem Shh-Signalweg in ventrikulären Zilien nachgeschaltet ist

(Abbildung 3.12 F). Schließlich stimuliert die Mediation dieser verschiedenen Signale die Zellen zu proliferieren und diese Proliferation führt wiederum zu einem Schieben der Zellen zur Basis des muskulären VS sowie zur Generation der Trabekel (Abbildung 4.1 C). Diese verschobenen Zellen und die Trabekel bilden das muskuläre VS aus, das seinerseits bis zu einer bestimmten Länge auswächst und anschließend molekular mit den endokardialen Kissenzellen interagiert. Aufgrund dieser Interaktion beginnen die Endokardkissen, das membranöse VS zu formen, welches dann in Richtung des muskulären VS wächst. Wenn sich muskuläres und membranöses VS treffen, fusionieren sie und die Entwicklung des VS ist abgeschlossen. Das ausgewachsene VS besteht also aus Zellen der linken und rechten ventrikulären Wände sowie der Trabekel (Abbildung 4.1 D).

In *Ftm*-defizienten Mausembryonen sind kardiale Zilien verkürzt und deren Signalvermittlung ist gestört (Abbildung 3.5 B, C, G; Abbildung 3.9; Abbildung 3.12 C; Abbildung 3.13 C, D). Aus diesem Grund können ventrikuläre Zilien Shh-, nicht-kanonische Wnt- und $Pdgfr\alpha$ -Signale nicht vermitteln, was in einer Reduktion der Aktivierung ihrer Zielgene resultiert (Abbildung 3.9 A). Diese Signalstörung bewirkt eine Verminderung der Proliferation in ziliären Bereichen (Abbildung 3.7 A), wodurch die kardialen Wände an diesen Stellen dünner sind als die des Wildtyps (Abbildung 3.8 A). Weniger Zellen werden nun zur Basis des muskulären VS geschoben. Dies bedingt auch dünnere Wände in nicht-ziliären Regionen, durch welche normalerweise Zellen hindurchgeschoben werden, um zur Basis des muskulären VS zu gelangen. Außerdem führt die geringere Anzahl der geschobenen Zellen zu einem Wachstumsdefekt des muskulären VS. Nachfolgend ist dieses verkürzte muskuläre VS nicht in der Lage, mit den endokardialen Kissenzellen zu interagieren, so dass die Endokardkissen das membranöse VS nicht ausbilden. Dies endet in dem perimembranösen VSD in 30% aller *Ftm*-negativer Herzen.

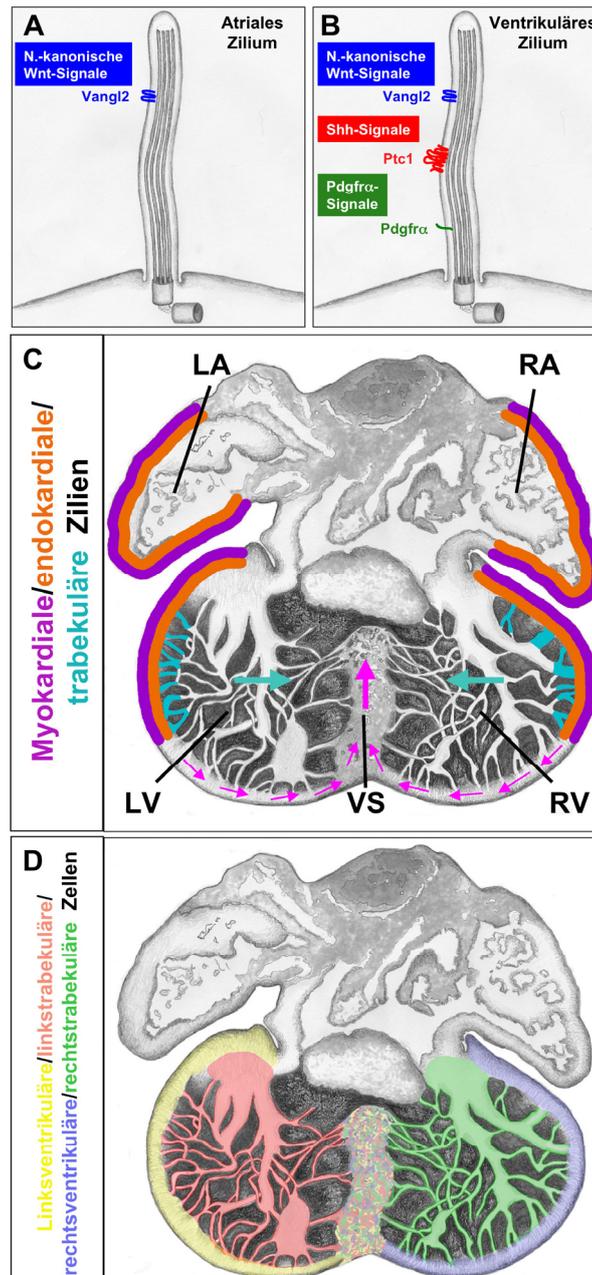


Abbildung 4.1: Modell der muskulären VS-Entwicklung

(A, B) Schematische Illustration kardialer Zilien und der Signalwege, die sie vermitteln. Atriale Zilien transduzieren nicht-kanonische Wnt-Signale, während ventrikuläre Zilien Shh-, nicht-kanonische Wnt- und Pdgfra-Transduktion realisieren. All diese Signalwege sind essentiell für einen Teil kardialer Proliferation, aber nicht für Proliferation in Mauserherzen generell. (C) Myokardiale (violette Färbung), endokardiale (orange Färbung) und wahrscheinlich auch trabekuläre Zilien (türkise Färbung) regulieren die Proliferation in distinkten atrialen und ventrikulären Bereichen. In den Ventrikeln resultiert die Proliferation in einem Schieben von Zellen in Richtung der Basis des muskulären ventrikulären Septums (angezeigt durch rosafarbene Pfeile). (D) Da diese Prozesse zum Auswachsen des muskulären Teils des ventrikulären Septums führen, besteht dieses aus Zellen linksventrikulärer (gelbe Färbung), rechtsventrikulärer (blaue Färbung),

linkstrabekulärer (rote Färbung) und rechtstrabekulärer (grüne Färbung) Regionen. LA, linkes Atrium; LV, linker Ventrikel; RA, rechtes Atrium; RV, rechter Ventrikel; VS, ventrikuläres Septum.

4.9 Ausblick

Nachdem der Fokus dieser Arbeit auf der Rolle von Zilien in der Entwicklung des murinen Herzens lag, werfen die durchgeführten Untersuchungen weitere und generellere Fragen auf, die insbesondere die Funktion von *Ftm* und die Wirkung dieses Proteins auf die Zilie betreffen. Der Verlust von *Ftm* führt zu einem Funktionsdefekt kardialer Zilien, was sich in einer Veränderung der Zilienmorphologie und der ziliären Signalweiterleitung äußert. Die folgenden Unterkapitel beschäftigen sich mit zukünftigen Analysen, die die aufgeworfenen Fragen adressieren.

4.9.1 Analyse des IFT in *Ftm*-defizienten, kardialen Zilien

In *Ftm*-negativen Herzen wurde eine Verkürzung der Zilien nachgewiesen, deren Ursache nicht eindeutig geklärt werden konnte. Zwar wird eine Störung des IFT vermutet, um dies aber zu beweisen, ist es vonnöten, die Geschwindigkeit des anterograden und des retrograden Transports durch kardiale Zilien zu messen. In einer anderen Mausmutante wurde eine derartige Analyse bereits erfolgreich durchgeführt, indem die Geschwindigkeit des ziliären Transports eines EYFP-fusionierten Ift88-Proteins untersucht wurde (Tran et al., 2008). Diese Analyse wäre auch in Zilien von isolierten Herzzellen *Ftm*-homozygot mutanter Mausembryonen angebracht und würde es nicht nur ermöglichen, einen beeinträchtigten IFT nachzuweisen, sondern auch die Art des betroffenen Transports zu identifizieren. Dies ließe weitere Schlüsse auf die Funktion von *Ftm* zu.

4.9.2 Nachweis der Gli3-Aktivatorform

Die Analysen dieser Arbeit enthüllten einen gestörten Shh-Signalweg aufgrund eines Gli3-Prozessierungsdefekts. Obwohl in *Ftm*-defizienten Herzen an E11.5 mehr Gli3-190 und weniger Gli3-Repressor (Gli3-83) vorhanden ist, kommt es zu einer Herunterregulierung des Shh-Signalwegs. Durch die Verringerung der

Proteinmenge des Gli3-Repressors würde man jedoch erwarten, dass die Shh-Signale verstärkt agieren. Da allerdings erst eine Zilien-abhängige Transformation des Vollängen-Gli3-Proteins in seine Aktivatorform erfolgen muss, bevor es Shh-Zielgene anschalten kann, besteht die Möglichkeit, dass *Ftm*-negative Herzen nicht nur weniger Gli3-Repressor, sondern auch weniger Gli3-Aktivator besitzen. Neue Studien zeigen, dass der Gli3-Aktivator im Gegensatz zur Vollängenform in Zellen phosphoryliert vorliegt. Der Nachweis dieser phosphorylierten Aktivatorform konnte bereits in Zellkulturexperimenten erbracht werden (Humke et al., 2010; Wen et al., 2010). Eine zukünftige Analyse stellt somit die Untersuchung der phosphorylierten Gli3-Aktivatorform in murinen, *Ftm*-defizienten Herzen dar. Dieser experimentelle Ansatz könnte dazu beitragen, den Grund für die Reduktion der Shh-Signaltransduktion in *Ftm*-negativen Mausherzen zu ermitteln. Der Nachweis der Gli3-Aktivatorform kann durch die Verwendung von SDS-Polyacrylamid-Gelen, die zusätzlich mit Agarose versetzt wurden, realisiert werden (Humke et al., 2010). Dieses Experiment konnte in Zellkulturexperimenten problemlos durchgeführt werden, müsste für Gewebelysate bzw. Herzlysate aber erst adaptiert werden. Sollte dies nicht gelingen, müssten auch für diese Analyse (wie auch für 4.9.1) Zellen aus Herzen isoliert werden. Sollte es gelingen Gli3-A nachweisen zu können, wäre zudem die Möglichkeit geschaffen, beweisen zu können, dass Gli3-Prozessierung und Gli3-Aktivatortransformation in *Ftm*^{-/-}-Herzen gestört sind.

4.9.3 Mediation weiterer Signalwege durch kardiale Zilien

Kardiale Zilien vermitteln Signale, die die empfangenden Zellen anweisen, zu proliferieren. In den Atrien sind dies nicht-kanonische Wnt-Signale, in den Ventrikeln hingegen Shh-, nicht-kanonische Wnt- und Pdgfr α -Signale. In dieser Arbeit wurden jedoch ausschließlich Signalwege untersucht, deren ziliäre Vermittlung zuvor schon einmal nachgewiesen wurde. Das bedeutet allerdings nicht, dass kardiale Zilien nicht auch noch die Mediation weiterer Signalwege realisieren. Beispielsweise ist bekannt, dass TGF- β -Signale und Fgf-Signale bei der Entwicklung des Herzens im Zeitraum E10.5 bis E12.5 eine Rolle spielen (Chen et al., 2009b; Mandel et al., 2010; Zhang et al., 2008). Daher wäre es sinnvoll, auch nach Komponenten dieser Signalwege in kardialen Zilien zu

suchen. Sollte ein weiterer Signalweg identifiziert werden, der über kardiale Zilien vermittelt wird, könnte die Aktivität dieses Signalwegs in *Ftm*^{-/-}-Herzen analysiert werden. Es ließe sich so feststellen, ob weitere Signalwege für die Ausprägung der Defekte in betroffenen Herzen eine Rolle spielen. Dies würde das Spektrum kardial-ziliär vermittelter Signale erweitern und es erlauben, die Untersuchungen zur Hierarchie der Signale innerhalb kardialer Zilien fortzusetzen, so dass möglicherweise erstmalig ein detailliert bekanntes Signalnetzwerk beschrieben werden könnte.

4.9.4 Die Rolle von Ftm in kardialen Zilien

Es wurde gezeigt, dass Ftm am Basalkörper von Zilien lokalisiert ist (Vierkotten et al., 2007). Bei genauerer Betrachtung konnte vermutet werden, dass es sich in der Transitionszone der Zilien befindet und dass es dort als eine Art „Torwächter“ fungiert, der entscheidet, welche Proteine in die Zilie gelangen und welche nicht (Lier, 2008). Desweiteren wurde postuliert, dass Ftm bei der Ziliogenese keine Rolle spielt (Vierkotten et al., 2007), was allerdings für kardiale Zilien nicht zutreffend erscheint, da diese Zilien verkürzt sind. Auch die Eingliederung von Ftm als Komponente des Shh-Signalwegs (Vierkotten et al., 2007) ist im Hinblick auf Herzzilien unvollständig, denn der Verlust von Ftm scheint alle Signalwege zu betreffen, die über kardiale Zilien vermittelt werden. Daher gilt es als wahrscheinlich, dass Ftm die Ziliogenese bzw. die Kontrolle der Zilienlänge und somit die Funktionalität kardialer Zilien beeinflusst. Auf welche Art und Weise Ftm diesen Einfluß ausübt, ist bislang unklar, allerdings könnte eine detaillierte Lokalisationsstudie weitere Aufschlüsse bringen.

Da bereits publiziert wurde, dass Ftm auch am Axonem mancher Zilienarten zu finden ist (Arts et al., 2007), wäre es sinnvoll, auch in kardialen Zilien die Lokalisation von Ftm exakt zu determinieren. Dies kann mit Hilfe einer Immunogold-Färbung und anschließender transmissionselektronenmikroskopischer Auswertung realisiert werden. Der Nachweis von Ftm am Axonem kardialer Zilien würde eine aktive Rolle bei der Kontrolle des IFT wahrscheinlich machen, so dass Ftm beispielweise die Leistung der Motorproteine beeinflusst. Der Befund, dass Ftm bei kardialen Zilien ausschließlich in der Transitionszone beobachtet werden könnte, würde bedeuten,

dass sich die „Torwächtertheorie“ erhärtet und das Ftm die Regulation der Zilienlänge durch die Selektion von Proteinen, die in die Zilie eintreten wollen, ausübt.

4.9.5 Klinische Aspekte der Ergebnisse dieser Arbeit

Beim Menschen sind die Konsequenzen, die die Herzdefekte *Ftm*-negativer Mäuse in sich bergen, schon seit mehreren Jahrzehnten bekannt. Während ein perimembranöser VSD pulmonare Hypertension auslöst (Reid et al., 1979), resultiert eine Reduktion der Wanddicke in systolischer, kardialer Insuffizienz (Spann et al., 1984). Diese beiden Erkrankungen sind weitverbreitete und häufige Todesursachen (Bursi et al., 2006; Simonneau et al., 2004). Die aktuelle Forschung beschäftigt sich zumeist mit Techniken, die einen VSD mechanisch verschließen können (Aboulhosn et al., 2010; Mongeon et al., 2010), aber nur wenige Publikationen tragen dazu bei, den molekularen Hintergrund der VS-Entwicklung zu ergründen (Franco et al., 2006; Sakata et al., 2002). Um einen VSD und andere kardiale Defekte, wie beispielsweise reduzierte Wanddicke, besser behandeln zu können, ist ein fundiertes Wissen über die genetischen Mechanismen und die zellulären Prozesse, die der Herzentwicklung zugrunde liegen, unverzichtbar. Zu diesem Wissen soll die vorliegende Arbeit einen Teil beitragen.

5 Zusammenfassung

Der ventrikuläre Septumdefekt (VSD) stellt den am häufigsten auftretenden angeborenen Herzfehler im Menschen dar. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, die dem Auftreten eines VSD zugrunde liegen, weitgehend unbekannt. Da *Ftm*^{-/-}-Mausembryonen einen perimembranösen VSD aufweisen, wurden sie als Tiermodell für die Analyse molekularer Prozesse verwendet, die zur Ausbildung des ventrikulären Septums (VS) bzw. eines VSD führen. Aufgrund der Tatsache, dass *Ftm*-defiziente Mausembryonen nicht nur unter einem perimembranösen VSD, sondern auch unter einer Ziliopathie leiden, stellte sich die Frage, ob der VSD *Ftm*-negativer Embryonen tatsächlich eine Folge einer ziliären Dysfunktion sei. Der Nachweis sensorischer Zilien an endokardialen und myokardialen Zellen in bestimmten atrialen und ventrikulären Regionen von E10.5 bis E12.5 und die Erkenntnis, dass diese Zilien in *Ftm*^{-/-}-Herzen, möglicherweise aufgrund eines gestörten intraflagellaren Transports (IFT), verkürzt und somit putativ dysfunktional sind, machten eine Assoziation des VSD und der Ziliopathie in *Ftm*^{-/-}-Embryonen wahrscheinlich. Die ziliäre Dysfunktion wurde offenkundig, als sich Zilien-vermittelte Signalwege in *Ftm*-defizienten Herzen herunterreguliert präsentierten. Nicht-kanonische Wnt-Signale liegen in *Ftm*^{-/-}-Atrien und Shh-, nicht-kanonische Wnt- sowie Pdgfr α -Signale in *Ftm*^{-/-}-Ventrikeln verringert vor. Desweiteren wurde enthüllt, dass der Shh-Signalweg dem Pdgfr α -Signalweg in ventrikulären Zilien vorgeschaltet ist und dass Shh- und nicht-kanonische Wnt-Signale in diesen Zilien parallel agieren. Als Konsequenz der ziliären Dysfunktion in *Ftm*^{-/-}-Herzen wurde eine Reduktion kardialer Proliferation an jenen Stellen gemessen, die Zilien aufweisen. Diese verringerte Proliferation wiederum resultiert in einer Verminderung der Wanddicke in allen Regionen, die durch die Ziliengesteuerte Proliferation beeinflusst werden, und in einer Verkürzung des muskulären VS. Aufgrund dieser Verkürzung kann das muskuläre VS nicht mit den endokardialen Kissenzellen interagieren, weshalb die Entwicklung des membranösen VS nicht beginnt. In *Ftm*^{-/-}-Herzen wird also die Bildung des membranösen VS erst gar nicht initiiert, so dass der Verlust von *Ftm* sowie die ziliäre Dysfunktion in diesen Herzen zu einem perimembranösen VSD führt.

Abstract

The ventricular septal defect (VSD) is the most common congenital heart defect in humans. However, the molecular mechanisms underlying the appearance of a VSD are widely unknown. Since *Ftm*^{-/-} mouse embryos display a perimembranous VSD, they are used as an animal model to analyse molecular processes leading to the formation of the ventricular septum (VS) and of a VSD, respectively. Due to the fact that *Ftm*-deficient murine embryos suffer not only from a perimembranous VSD, but also from a ciliopathy, the question arises, if the VSD of *Ftm*-negative embryos is really a consequence of a ciliary dysfunction. The detection of sensory cilia on the surface of endocardial and myocardial cells in distinct atrial and ventricular regions from E10.5 to E12.5 and the finding that these cilia in *Ftm*^{-/-} hearts are shorter and hence putatively dysfunctional, maybe by reason of a disturbed intraflagellar transport (IFT), make an association of the VSD and the ciliopathy in *Ftm*^{-/-} embryos likely. The ciliary dysfunction was obvious, when cilia-mediated signaling pathways are shown to be downregulated in *Ftm*-deficient hearts. Non-canonical Wnt signals are diminished in *Ftm*^{-/-} atria, while Shh, non-canonical Wnt and *Pdgfr*α signals are reduced in *Ftm*^{-/-} ventricles. Furthermore, it was revealed that the Shh signaling pathway functions upstream of the *Pdgfr*α signaling pathway in ventricular cilia and that Shh and non-canonical Wnt signaling act in parallel in those cilia. As a consequence of ciliary dysfunction in *Ftm*^{-/-} hearts a reduction of cardiac proliferation was measured at those positions, where cilia are present. In turn, this reduced proliferation results in a decrement of wall thickness in all areas that are influenced by the cilia-controlled proliferation and in a shortening of the muscular VS. Because of this shortening, the muscular VS cannot interact with the endocardial cushion cells and for that reason, the development of the membranous VS does not begin. Thus, the formation of the membranous VS is not initiated at all in *Ftm*^{-/-} hearts, so that the loss of *Ftm* and the ciliary dysfunction in those hearts lead to a perimembranous VSD.

6 Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen:

A/P-Achse	anteroposteriore Achse
abs.	absolut
APC	Adenomatous Polyposis Coli
Arl13b	ADP-ribosylation factor-like 13 B
BBS	Bardet-Biedl Syndrom
Bmp	Bone morphogenetic protein
Ca ²⁺	Kalzium
Ci	Cubitus interruptus
Cos2	Costal 2
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dvl	Dishevelled
E	Embryonaltag(e)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK1/2	extrazellulär-signalregulierte Kinasen
etc.	et cetera (deutsch: und so weiter)
Fgf	Fibroblast growth factor
Flx	Flexo
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
Ftm	Fantom
Fu	Fused
Gli	Glioma-associated oncogene homolog
Gli2	Gli-Krüppel family member 2
Gli3	Gli-Krüppel family member 3

Gli3-A	Gli3-Aktivatorisofom
Gli3-FL	Gli3-Vollängen-Isoform
Gli3-R	Gli3-Repressorisofom
GRB2	growth-factor-receptor-bound protein 2
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
HCl	Salzsäure
Hh	Hedgehog
Hif1 α	hypoxia-inducible factor 1, α subunit
hnn	hennin
i.d.R.	in der Regel
IFT	intraflagellarer Transport
Inv	Inversin
konz.	konzentriert
Kif	Kinesin family member
MEF	mouse embryonic fibroblast
MEK1/2	MAPK/ERK-Kinase 1/2
mRNA	messenger RNA
PBS	Phosphate-buffered saline
PCP	Planare Zell-Polarität
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PDK	phosphoinositide-dependent kinase
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinosid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
Ptc1	Patched 1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pVHL	phosphoryliertes von Hippel-Lindau-Protein
RAF	rat fibrosarcoma
RAS	rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
Rpgr	Retinitis pigmentosa GTPase regulator

Rpgrip1l	Rpgr-interacting protein 1-like protein
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHC	SRC homology 2 domain containing transforming protein
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothened
SOS	son of sevenless
Sufu	Suppressor of fused
Taq	Thermophilus aquatus
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amonimethan
Ttc21b	tetratricopeptide repeat domain 21B
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
USA	United States of America
Vangl2	Van gogh like 2
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wim	Wimble
z.B.	zum Beispiel

Einheiten:

bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
kD	Kilo-Dalton
l	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pH	H ⁺ -Ionenkonzentration
pmol	Pikomol
sec.	Sekunde(n)
U	Enzymeinheit (unit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen auf Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht auf Volumen

7 Literatur

- Aboulhosn, J., Levi, D., Sopher, M., Johnson, A., Child, J. und Laks, H.** (2010). Periventricular closure of a large ventricular septal defect in congenitally corrected transposition of the great arteries. *Congenit Heart Dis.* **5**, 60-5.
- Afzelius, B.** (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* **193**, 317-9.
- Ahn, S. und Joyner, A.** (2004). Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* **118**, 505-16.
- Al-Bhalal, L. und Akhtar, M.** (2005). Molecular basis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Anat Pathol.* **12**, 126-33.
- Al-Jarallah, A.** (2009). Down's syndrome and the pattern of congenital heart disease in a community with high parental consanguinity. *Med Sci Monit.* **15**, 409-12.
- Anderson, R., Becker, A., Wilkinson, J. und Gerlis, L.** (1976). Morphogenesis of univentricular hearts. *Br Heart J.* **48**, 558-572.
- Anderson, R., Brown, N. und Webb, S.** (2002). Development and structure of the atrial septum. *Heart* **88**, 104-10.
- Anderson, R., Webb, S., Brown, N., Lamers, W. und Moorman, A.** (2003). Development of the heart: (2) Septation of the atriums and ventricles. *Heart* **89**, 949-58.
- Antoniades, H., Scher, C. und Stiles, C.** (1979). Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1809-13.
- Apitz, C., Reyes, J., Holtby, H., Humpl, T. und Redington, A.** (2010). Pharmacokinetic and hemodynamic responses to oral sildenafil during invasive testing in children with pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* **55**, 1456-62.
- Armstrong, E. und Bischoff, J.** (2004). Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res.* **95**, 459-70.
- Arts, H., Doherty, D., van Beersum, S., Parisi, M., Letteboer, S., Gorden, N., Peters, T., Märker, T., Voeselek, K., Kartono, A. et al.** (2007). Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. *Nat Genet.* **39**, 882-8.
- Astorga, J. und Carlsson, P.** (2007). Hedgehog induction of murine

vasculogenesis is mediated by Foxf1 and Bmp4. *Development* **134**, 3753-61.

Bacallao, R. und McNeill, H. (2009). Cystic kidney diseases and planar cell polarity signaling. *Clin Genet.* **75**, 107-17.

Bai, C., Auerbach, W., Lee, J., Stephen, D. und Joyner, A. (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* **129**, 4753-61.

Bai, C., Stephen, D. und Joyner, A. (2004). All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev Cell.* **6**, 103-15.

Balci, S., Güçer, S., Orhan, D. und Karagöz, T. (2008). A well-documented trisomy 13 case presenting with a number of common and uncommon features of the syndrome. *Turk J Pediatr.* **50**, 595-9.

Ben-Shachar, G., Arcilla, R., Lucas, R. und Manasek, F. (1985). Ventricular trabeculations in the chick embryo heart and their contribution to ventricular and muscular septal development. *Circ Res.* **57**, 759-66.

Berbari, N., O'Connor, A., Haycraft, C. und Yoder, B. (2009). The primary cilium as a complex signaling center. *Curr Biol.* **19**, R526-35.

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C., Hsieh, J., Wang, Y., Macke, J., Andrew, D., Nathans, J. und Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**, 225-30.

Birnboim, H. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**, 243-55.

Birnboim, H. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-23.

Bisgrove, B. und Yost, H. (2006). The roles of cilia in developmental disorders and disease. *Development* **133**, 4131-43.

Bouck, G. (1971). The structure, origin, isolation, and composition of the tubular mastigonemes of the *Ochromas* flagellum. *J Cell Biol.* **50**, 362-84.

Boveri, T. (1888). Zellen-Studien II. Die Befruchtung und Teilung des Eies von *Ascaris megalocephala*. *Zeitschr. Med. Nat.* **22**, 685-882.

Boylan, J. und Wright, A. (2000). Identification of a novel protein interacting with RPGR. *Hum Mol Genet.* **9**.

Britto, J., Tannahill, D. und Keynes, R. (2000). Life, death and Sonic hedgehog. *Bioessays* **22**, 499-502.

- Bruneau, B.** (2008). The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* **451**, 943-948.
- Burnette, W.** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* **112**, 195-203.
- Bursi, F., Weston, S., Redfield, M., Jacobsen, S., Pakhomov, S., Nkomo, V., Meverden, R. und Roger, V.** (2006). Systolic and diastolic heart failure in the community. *JAMA* **296**, 2209-16.
- Buttitta, L., Mo, R., Hui, C. und Fan, C.** (2003). Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development* **130**, 6233-43.
- Cadigan, K., Fish, M., Rulifson, E. und Nusse, R.** (1998). Wingless repression of *Drosophila* frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. *Cell* **93**, 767-77.
- Cadigan, K. und Liu, Y.** (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci.* **119**, 395-402.
- Chen, M., Wilson, C., Li, Y., Law, K., Lu, C., Gacayan, R., Zhang, X., Hui, C. und Chuang, P.** (2009a). Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev.* **23**, 1910-28.
- Chen, Q., Chen, H., Zheng, D., Kuang, C., Fang, H., Zou, B., Zhu, W., Bu, G., Jin, T., Wang, Z. et al.** (2009b). Smad7 is required for the development and function of the heart. *J Biol Chem.* **284**, 292-300.
- Cheng, C., Yeh, J., Fan, T., Smith, S. und Charnock-Jones, D.** (2008). Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun.* **365**, 285-90.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E. und Young KE, C. J., Westphal H, Beachy PA.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-13.
- Chien, A., Conrad, W. und Moon, R.** (2009). A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J Invest Dermatol.* **129**, 1614-27.
- Christoffels, V., Habets, P., Franco, D., Campione, M., de Jong, F., Lamers, W., Bao, Z., Palmer, S., Biben, C., Harvey, R. et al.** (2000). Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* **223**, 266-78.

- Clement, C., Kristensen, S., Møllgård, K., Pazour, G., Yoder, B., Larsen, L. und Christensen, S.** (2009). The primary cilium coordinates early cardiogenesis and hedgehog signaling in cardiomyocyte differentiation. *J Cell Sci.* **122**, 3070-82.
- Colas, J., Lawson, A. und Schoenwolf, G.** (2000). Evidence that translation of smooth muscle alpha-actin mRNA is delayed in the chick promyocardium until fusion of the bilateral heart-forming regions. *Dev Dyn.* **218**, 316-30.
- Cole, D.** (2003). The intraflagellar transport machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic* **4**, 435-42.
- Cole, D., Chinn, S., Wedaman, K., Hall, K., Vuong, T. und Scholey, J.** (1993). Novel heterotrimeric kinesin-related protein purified from sea urchin eggs. *Nature* **366**, 268-70.
- Cole, D., Diener, D., Himelblau, A., Beech, P., Fuster, J. und Rosenbaum, J.** (1998). *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J Cell Biol.* **141**, 993-1008.
- Contreras-Ramos, A., Sánchez-Gómez, C., García-Romero, H. und Cimarosti, L.** (2008). Normal development of the muscular region of the interventricular septum--I. The significance of the ventricular trabeculations. *Anat Histol Embryol.* **37**, 344-51.
- Corbit, K., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A., Stainier, D. und Reiter, J.** (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* **437**, 1018-21.
- Corbit, K., Shyer, A., Dowdle, W., Gaulden, J., Singla, V., Chen, M., Chuang, P. und Reiter, J.** (2008). Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat Cell Biol.* **10**, 70-6.
- De Robertis, E.** (1956). Electron microscope observations on the submicroscopic organization of the retinal rods. *J Biophys Biochem Cytol.* **2**, 319-30.
- Deane, J., Cole, D., Seeley, E., Diener, D. und Rosenbaum, J.** (2001). Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr Biol.* **11**, 1586-90.
- Delous, M., Baala, L., Salomon, R., Laclef, C., Vierkotten, J., Tory, K., Golzio, C., Lacoste, T., Besse, L., Ozilou, C. et al.** (2007). The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat Genet.* **39**, 875-81.

- Deretic, D. und Papermaster, D.** (1991). Polarized sorting of rhodopsin on post-Golgi membranes in frog retinal photoreceptor cells. *J Cell Biol.* **113**, 1281-93.
- Ding, Q., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J. und Hui, C.** (1998). Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development* **125**, 2533-43.
- Doetschman, T., Maeda, N. und Smithies, O.** (1988). Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8583-7.
- Dute, R. und Kung, C.** (1978). Ultrastructure of the proximal region of somatic cilia in *Paramecium tetraurelia*. *J Cell Biol.* **78**, 451-64.
- Dyer, L. und Kirby, M.** (2009). Sonic hedgehog maintains proliferation in secondary heart field progenitors and is required for normal arterial pole formation. *Dev Biol.* **330**, 305-17.
- Echelard, Y., Epstein, D., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. und McMahon, A.** (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**, 1417-30.
- Eisenberg, L. und Markwald, R.** (1995). Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res.* **77**, 1-6.
- Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V. und Jessell, T.** (1997). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **62**, 451-66.
- Evans, M. und Kaufman, M.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
- Ferreira, A., Shenoy, V., Yamazato, Y., Sriramula, S., Francis, J., Yuan, L., Castellano, R., Ostrov, D., Oh, S., Katovich, M. et al.** (2009). Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* **179**, 1048-54.
- Finley, D.** (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem.* **78**, 477-513.
- Flaherty, M. und Dawn, B.** (2008). Noncanonical Wnt11 signaling and cardiomyogenic differentiation. *Trends Cardiovasc Med.* **18**, 260-8.
- Franco, D., Campione, M., Kelly, R., Zammit, P., Buckingham, M., Lamers, W. und Moorman, A.** (2000). Multiple transcriptional domains, with distinct left and right components, in the atrial chambers of the developing heart. *Circ Res.* **87**,

984-91.

Franco, D., Meilhac, S., Christoffels, V., Kispert, A., Buckingham, M. und Kelly, R. (2006). Left and right ventricular contributions to the formation of the interventricular septum in the mouse heart. *Dev Biol.* **294**, 366-75.

Frazer, J. (1940). A manual of embryology. Development of the heart, and vessels of the anterior part of the embryo. *Bailliere, Tindall and Cox, London 2nd edn*, 322-352.

Gaasch, W. (1979). Left ventricular radius to wall thickness ratio. *Am J Cardiol.* **43**, 1189-94.

Gallicano, G., Kouklis, P., Bauer, C., Yin, M., Vasioukhin, V., Degenstein, L. und Fuchs, E. (1998). Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *J Cell Biol.* **143**, 2009-22.

Gavrieli, Y., Sherman, Y. und Ben-Sasson, S. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* **119**, 493-501.

Gerdes, J., Davis, E. und Katsanis, N. (2009). The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* **137**, 32-45.

Gerdes, J., Liu, Y., Zaghloul, N., Leitch, C., Lawson, S., Kato, M., Beachy, P., Beales, P., DeMartino, G., Fisher, S. et al. (2007). Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat Genet.* **39**, 1350-60.

Gerhardt, C. (2006). Analyse der ZNS-Veränderungen in Ftm-negativen Mäusen. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gerhart, J. (1999). 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology.* **60**, 226-39.

Gilula, N. und Satir, P. (1972). The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J Cell Biol.* **53**, 494-509.

Gitler, A., Lu, M., Jiang, Y., Epstein, J. und Gruber, P. (2003). Molecular markers of cardiac endocardial cushion development. *Dev Dyn.* **228**, 643-50.

Goddeeris, M., Rho, S., Petiet, A., Davenport, C., Johnson, G., Meyers, E. und Klingensmith, J. (2008). Intracardiac septation requires hedgehog-dependent cellular contributions from outside the heart. *Development* **135**, 1887-95.

Goetz, S. und Anderson, K. (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet.* **11**, 331-44.

- Goldsmith, E., Hoffman, A., Morales, M., Potts, J., Price, R., McFadden, A., Rice, M. und TK., B.** (2004). Organization of fibroblasts in the heart. *Dev Dyn.* **230**, 787-94.
- Gondo, Y., Fukumura, R., Murata, T. und Makino, S.** (2009). Next-generation gene targeting in the mouse for functional genomics. *BMB Rep.* **42**, 315-23.
- Goodrich, L., Milenković, L., Higgins, K. und Scott, M.** (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277**, 1109-13.
- Goor, D., Edwards, J. und Lillehei, C.** (1970a). The development of the interventricular septum of the human heart; correlative morphogenetic study. *Chest.* **58**, 453-67.
- Goor, D. und Lillehei, C.** (1975). The embryology of the heart. *Congenital Malformations of the Heart Orlando, Florida, Grune & Stratton*, 38-88.
- Goor, D., Lillehei, C., Rees, R. und Edwards, J.** (1970b). Isolated ventricular septal defect. Development basis for various types and presentation of classification. *Chest* **58**, 468-82.
- Haertel-Wiesmann, M., Liang, Y., Fantl, W. und Williams, L.** (2000). Regulation of cyclooxygenase-2 and periostin by Wnt-3 in mouse mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* **275**, 32046-51.
- Han, Y., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S. und Alvarez-Buylla, A.** (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci.* **11**, 277-84.
- Hart, M., de los Santos, R., Albert, I., Rubinfeld, B. und Polakis, P.** (1998). Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol.* **8**, 573-81.
- Hatton, B., Knoepfler, P., Kenney, A., Rowitch, D., de Alborán, I., Olson, J. und Eisenman, R.** (2006). N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer Res.* **66**, 8655-61.
- Haycraft, C., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E. und Yoder, B.** (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* **1**, e53.
- Haycraft, C., Zhang, Q., Song, B., Jackson, W., Detloff, P., Serra, R. und Yoder, B.** (2007). Intraflagellar transport is essential for endochondral bone

formation. *Development* **134**, 307-16.

He, X. (2008). Cilia put a brake on Wnt signalling. *Nat Cell Biol.* **10**, 11-3.

Heidaran, M., Pierce, J., Jensen, R., Matsui, T. und Aaronson, S. (1990). Chimeric alpha- and beta-platelet-derived growth factor (PDGF) receptors define three immunoglobulin-like domains of the alpha-PDGF receptor that determine PDGF-AA binding specificity. *J Biol Chem.* **265**, 18741-4.

Herman, G. (2002). Mouse models of human disease: lessons learned and promises to come. *ILAR J.* **43**, 55-6.

Hidalgo, A. und Ingham, P. (1990). Cell patterning in the *Drosophila* segment: spatial regulation of the segment polarity gene *patched*. *Development* **110**, 291-301.

Hirata, H., Kawamata, S., Murakami, Y., Inoue, K., Nagahashi, A., Tosaka, M., Yoshimura, N., Miyamoto, Y., Iwasaki, H., Asahara, T. et al. (2007). Coexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha and fetal liver kinase 1 enhances cardiogenic potential in embryonic stem cell differentiation in vitro. *J Biosci Bioeng.* **103**, 412-9.

Hochstetter, F. (1906). Entwicklung des Venensystems. *Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere* **3**, Gustav Fischer, Jena, 141-145.

Hoffman, J. und Kaplan, S. (2002). The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* **39**, 1890-900.

Hong, D., Yue, G., Adamian, M. und Li, T. (2001). Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium. *J Biol Chem.* **276**, 12091-9.

Hou, Y., Pazour, G. und Witman, G. (2004). A dynein light intermediate chain, D1bLIC, is required for retrograde intraflagellar transport. *Mol Biol Cell.* **15**, 4382-94.

Huangfu, D. und Anderson, K. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 11325-30.

Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A., Murcia, N., Niswander, L. und Anderson, K. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* **426**, 83-7.

Humke, E., Dorn, K., Milenkovic, L., Scott, M. und Rohatgi, R. (2010). The

- output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* **24**, 670-82.
- Ingham, P. und McMahon, A.** (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**, 3059-87.
- Iomini, C., Babaev-Khaimov, V., Sassaroli, M. und Piperno, G.** (2001). Protein particles in Chlamydomonas flagella undergo a transport cycle consisting of four phases. *J Cell Biol.* **153**, 13-24.
- Jensen, C., Poole, C., McGlashan, S., Marko, M., Issa, Z., Vujcich, K. und Bowser, S.** (2004). Ultrastructural, tomographic and confocal imaging of the chondrocyte primary cilium in situ. *Cell Biol Int.* **28**, 101-10.
- Ji, R., Phoon, C., Aristizábal, O., McGrath, K., Palis, J. und Turnbull, D.** (2003). Onset of cardiac function during early mouse embryogenesis coincides with entry of primitive erythroblasts into the embryo proper. *Circ Res.* **92**, 133-5.
- Jiang, L., Duan, C., Chen, B., Hou, Z., Chen, Z., Li, Y., Huan, Y. und Wu, K.** (2005). Association of 22q11 deletion with isolated congenital heart disease in three Chinese ethnic groups. *Int J Cardiol.* **105**, 216-23.
- Jones, C. und Chen, P.** (2008). Primary cilia in planar cell polarity regulation of the inner ear. *Curr Top Dev Biol.* **85**, 197-224.
- Kaufman, M.** (1994). The Atlas of Mouse Development. *Second Printing, with Index.* London: Academic Press.
- Kazlauskas, A., Durden, D. und Cooper, J.** (1991). Functions of the major tyrosine phosphorylation site of the PDGF receptor beta subunit. *Cell Regul.* **2**, 413-25.
- Keller, R.** (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* **298**, 1950-4.
- Kim, E. und Walz, G.** (2007). Sensitive cilia set up the kidney. *Nat Med.* **13**, 1409-11.
- Kinzler, K., Bigner, S., Bigner, D., Trent, J., Law, M., O'Brien, S., Wong, A. und Vogelstein, B.** (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* **236**, 70-3.
- Kirby, M.** (2006). Cardiac Development. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Kirby, M. und Waldo, K.** (1990). Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation* **82**, 332-40.
- Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I., Koyama, S.**

- und Kikuchi, A.** (1998). Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem.* **273**, 10823-6.
- Kobayashi, J., Kaneko, Y., Yamamoto, Y., Yoda, H. und Tsuchiya, K.** (2010). Radical surgery for a ventricular septal defect associated with trisomy 18. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* **58**, 223-7.
- Kogan, S., Doherty, M. und Gitschier, J.** (1987). An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med.* **317**, 985-90.
- Komatsu, K., Wakatsuki, S., Yamada, S., Yamamura, K., Miyazaki, J. und Sehara-Fujisawa, A.** (2007). Meltrin beta expressed in cardiac neural crest cells is required for ventricular septum formation of the heart. *Dev Biol.* **303**, 82-92.
- Kwon, C., Cordes, K. und Srivastava, D.** (2008). Wnt/beta-catenin signaling acts at multiple developmental stages to promote mammalian cardiogenesis. *Cell Cycle* **7**, 3815-8.
- Laemmli, U.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lai, S., Chien, A. und Moon, R.** (2009). Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis. *Cell Res.* **19**, 532-45.
- Lamers, W. und Moorman, A.** (2002). Cardiac septation: a late contribution of the embryonic primary myocardium to heart morphogenesis. *Circ Res.* **91**, 93-103.
- Lei, Q., Zelman, A., Kuang, E., Li, S. und Matise, M.** (2004). Transduction of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord. *Development* **131**, 3593-604.
- Lewis, T., Shapiro, P. und Ahn, N.** (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* **74**, 49-139.
- Li, X. und Eriksson, U.** (2003). Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 91-8.
- Lier, J.** (2008). Charakterisierung von Ftm-Funktionen in Zellkultur und Tier. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Linask, K. und Lash, J.** (1986). Precardiac cell migration: fibronectin localization at mesoderm-endoderm interface during directional movement. *Dev Biol.* **114**, 87-101.
- Litingtung, Y., Dahn, R., Li, Y., Fallon, J. und Chiang, C.** (2002). Shh and Gli3

are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* **418**, 979-83.

Liu, A., Wang, B. und Niswander, L. (2005). Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development* **132**, 3103-11.

Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T., Flegal, K., Ford, E., Furie, K., Go, A., Greenlund, K. et al. (2009). Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **119**, 480-6.

Logan, C. und Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **20**, 781-810.

Lokker, N., O'Hare, J., Barsoumian, A., Tomlinson, J., Ramakrishnan, V., Fretto, L. und Giese, N. (1997). Functional importance of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor extracellular immunoglobulin-like domains. Identification of PDGF binding site and neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem.* **272**, 33037-44.

Lucker, B., Behal, R., Qin, H., Siron, L., Taggart, W., Rosenbaum, J. und Cole, D. (2005). Characterization of the intraflagellar transport complex B core: direct interaction of the IFT81 and IFT74/72 subunits. *J Biol Chem.* **280**, 27688-96.

Mandel, E., Kaltenbrun, E., Callis, T., Zeng, X., Marques, S., Yelon, D., Wang, D. und Conlon, F. (2010). The BMP pathway acts to directly regulate Tbx20 in the developing heart. *Development* **137**, 1919-29.

Marigo, V. und Tabin, C. (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 9346-51.

Matise, M., Epstein, D., Park, H., Platt, K. und Joyner, A. (1998). Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* **125**, 2759-70.

Matsui, T., Heidaran, M., Miki, T., Popescu, N., La Rochelle, W., Kraus, M., Pierce, J. und Aaronson, S. (1989). Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science* **243**, 800-4.

May, S., Ashique, A., Karlen, M., Wang, B., Shen, Y., Zarbali, K., Reiter, J., Ericson, J. und Peterson, A. (2005). Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev Biol.* **287**, 378-89.

- McCormick, F.** (1993). Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* **363**, 15-6.
- McDermott, A., Gustafsson, M., Elsam, T., Hui, C., Emerson, C. J. und Borycki, A.** (2005). Gli2 and Gli3 have redundant and context-dependent function in skeletal muscle formation. *Development* **132**, 345-57.
- McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X. und Brueckner, M.** (2003). Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* **114**, 61-73.
- Meredith, M., Hutchins, G. und Moore, G.** (1979). Role of the left interventricular sulcus in formation of interventricular septum and crista supraventricularis in normal human cardiogenesis. *Anat Rec.* **194**, 417-28.
- Meyer, N. und Roelink, H.** (2003). The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord. *Dev Biol.* **257**, 343-55.
- Mikawa, T.** (1999). Determination of heart cell lineages. In S.A. Moody (ed.), *Cell Lineage and Fate Determination.*, Academic Press, San Diego, 451-462.
- Mongeon, F., Burkhart, H., Ammash, N., Dearani, J., Li, Z., Warnes, C. und Connolly, H.** (2010). Mongeon FP, Burkhart HM, Ammash NM, Dearani JA, Li Z, Warnes CA, Connolly HM. *JACC Cardiovasc Interv.* **3**, 290-7.
- Montcouquiol, M., Rachel, R., Lanford, P., Copeland, N., Jenkins, N. und Kelley, M.** (2003). Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* **423**, 173-7.
- Moodie, S. und Wolfman, A.** (1994). The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet.* **10**, 44-8.
- Moon, A.** (2008). Mouse models of congenital cardiovascular disease. *Curr Top Dev Biol.* **84**, 171-248.
- Moore, K. und Persaud, T.** (1996). Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen (4.Auflage). *Schattauer Verlag.*
- Moorman, A. und Christoffels, V.** (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev.* **83**, 1223-67.
- Moorman, A., Webb, S., Brown, N., Lamers, W. und Anderson, R.** (2003). Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart* **89**, 806-14.
- Motoyama, J., Milenkovic, L., Iwama, M., Shikata, Y., Scott, M. und Hui, C.**

- (2003). Differential requirement for Gli2 and Gli3 in ventral neural cell fate specification. *Dev Biol.* **259**, 150-61.
- Nigg, E. und Raff, J.** (2009). Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell* **139**, 663-78.
- Nilsson, M., Zage, P., Zeng, L., Xu, L., Cascone, T., Wu, H., Saigal, B., Zweidler-McKay, P. und Heymach, J.** (2010). Multiple receptor tyrosine kinases regulate HIF-1alpha and HIF-2alpha in normoxia and hypoxia in neuroblastoma: implications for antiangiogenic mechanisms of multikinase inhibitors. *Oncogene Epub ahead of print.*
- Nogales, E., Downing, K., Amos, L. und Löwe, J.** (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol.* **5**, 451-8.
- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y. und Hamada, H.** (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* **418**, 96-9.
- Nüsslein-Volhard, C. und Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature* **287**, 795-801.
- Ocbina, P., Tuson, M. und Anderson, K.** (2009). Primary cilia are not required for normal canonical Wnt signaling in the mouse embryo. *PLoS One* **4**, e6839.
- Omura, T., Heldin, C. und Ostman, A.** (1997). Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization. *J Biol Chem.* **272**, 12676-82.
- Pagán-Westphal, S. und Tabin, C.** (1998). The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis. *Cell* **93**, 25-35.
- Pan, J. und Snell, W.** (2005). Chlamydomonas shortens its flagella by activating axonemal disassembly, stimulating IFT particle trafficking, and blocking anterograde cargo loading. *Dev Cell.* **9**, 431-8.
- Pan, J. und Snell, W.** (2007). The primary cilium: keeper of the key to cell division. *Cell* **129**, 1255-7.
- Pan, Y., Bai, C., Joyner, A. und Wang, B.** (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol.* **26**, 3365-77.
- Patten, B.** (1951). Development of the chick during the third and fourth days of incubation. *Early Embryology of the chick* edn **4**, **New York, McGraw-Hill**, 156-213.
- Pazour, G. und Rosenbaum, J.** (2002). Intraflagellar transport and cilia-

- dependent diseases. *Trends Cell Biol.* **12**, 551-5.
- Pazour, G. und Witman, G.** (2003). The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr Opin Cell Biol.* **15**, 105-10.
- Pedersen, L., Veland, I., Schröder, J. und Christensen, S.** (2008). Assembly of primary cilia. *Dev Dyn.* **237**, 1993-2006.
- Pensky, B.** (1982). Review of Medical Embryology. *McMillan, New York*, 291-355.
- Perkins, L., Hedgecock, E., Thomson, J. und Culotti, J.** (1986). Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* **117**, 456-87.
- Person, A., Klewer, S. und Runyan, R.** (2005). Cell biology of cardiac cushion development. *Int Rev Cytol.* **243**, 287-335.
- Peters, T., Ausmeier, K., Dildrop, R. und Rütger, U.** (2002). The mouse Fused toes (Ft) mutation is the result of a 1.6-Mb deletion including the entire Iroquois B gene cluster. *Mamm Genome* **13**, 186-8.
- Pexieder, T.** (1975). Cell death in the morphogenesis and teratogenesis of the heart. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* **51**, 3-99.
- Piperno, G., Siuda, E., Henderson, S., Segil, M., Vaananen, H. und Sassaroli, M.** (1998). Distinct mutants of retrograde intraflagellar transport (IFT) share similar morphological and molecular defects. *J Cell Biol.* **143**, 1591-601.
- Piwko, W. und Jentsch, S.** (2006). Proteasome-mediated protein processing by bidirectional degradation initiated from an internal site. *Nat Struct Mol Biol.* **13**, 691-7.
- Plotnikova, O., Golemis, E. und Pugacheva, E.** (2008). Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer Res.* **68**, 2058-61.
- Purkinje, J. und Valentin, G.** (1835). Bemerkung über die Unabhängigkeit der Flimmerbewegungen der Wirbelthiere von der Integrität des centralen Nervensystems. *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin*, 159-160.
- Quarmby, L. und Parker, J.** (2005). Cilia and the cell cycle? *J Cell Biol.* **169**, 707-10.
- Qyang, Y., Martin-Puig, S., Chiravuri, M., Chen, S., Xu, H., Bu, L., Jiang, X., Lin, L., Granger, A., Moretti, A. et al.** (2007). The renewal and differentiation of Isl1+ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Stem Cell.* **1**, 165-79.
- Redkar, A., Montgomery, M. und Litvin, J.** (2001). Fate map of early avian

cardiac progenitor cells. *Development* **128**, 2269-79.

Reid, J., Coleman, E. und Stevenson, J. (1979). Pulmonary hypertension accompanying ventricular septal defect and patent ductus arteriosus. Management in infancy and early childhood. *Thorax* **34**, 454-8.

Richardson, J. und Burns, D. (2002). Mouse models of Alzheimer's disease: a quest for plaques and tangles. *ILAR J.* **43**, 89-99.

Richarte, A., Mead, H. und Tallquist, M. (2007). Cooperation between the PDGF receptors in cardiac neural crest cell migration. *Dev Biol.* **306**, 785-96.

Risebro, C. und Riley, P. (2006). Formation of the ventricles. *ScientificWorldJournal* **6**, 1862-80.

Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M. und Evans, M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* **323**, 445-448.

Rodat-Despoix, L. und Delmas, P. (2009). Ciliar functions in the nephron. *Pflugers Arch.* **458**, 179-87.

Rohatgi, R., Milenkovic, L. und Scott, M. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**, 372-6.

Rosenbaum, J. und Witman, G. (2002). Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 813-25.

Ross, A., May-Simera, H., Eichers, E., Kai, M., Hill, J., Jagger, D., Leitch, C., Chapple, J., Munro, P., Fisher, S. et al. (2005). Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet.* **37**, 1135-40.

Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. und Harker, L. (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1207-10.

Rychter, Z., Rychterová, V. und Lemez, L. (1979). Formation of the heart loop and proliferation structure of its wall as a base for ventricular septation. *Herz* **4**, 86-90.

Sadler, T. (2004). Langman's Essential Medical Embryology. *Lippincott Williams & Wilkins*.

Sakata, Y., Kamei, C., Nakagami, H., Bronson, R., Liao, J. und Chin, M. (2002). Ventricular septal defect and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor CHF1/Hey2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 16197-202.

- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M. und Kondoh, H.** (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* **126**, 3915-24.
- Satir, P.** (2007). Cilia biology: stop overeating now! *Curr Biol.* **17**, R963-5.
- Satir, P., Pedersen, L. und Christensen, S.** (2010). The primary cilium at a glance. *J Cell Sci.* **123**, 499-503.
- Schaeffer, H. und Weber, M.** (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* **19**, 2435-44.
- Schild, C., Wirth, M., Reichert, M., Schmid, R., Saur, D. und Schneider, G.** (2009). PI3K signaling maintains c-myc expression to regulate transcription of E2F1 in pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog.* **48**, 1149-58.
- Schilling, T., Concordet, J. und Ingham, P.** (1999). Regulation of left-right asymmetries in the zebrafish by Shh and BMP4. *Dev Biol.* **210**, 277-87.
- Schleiffarth, J., Person, A., Martinsen, B., Sukovich, D., Neumann, A., Baker, C., Lohr, J., Cornfield, D., Ekker, S. und Petryk, A.** (2007). Wnt5a is required for cardiac outflow tract septation in mice. *Pediatr Res.* **61**, 386-91.
- Schlessinger, J.** (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci.* **18**, 273-5.
- Schneider, L., Clement, C., Teilmann, S., Pazour, G., Hoffmann, E., Satir, P. und Christensen, S.** (2005). PDGFRalpha signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr Biol.* **15**, 1861-6.
- Scholey, J.** (2008). Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J Cell Biol.* **180**, 23-9.
- Scholey, J. und Anderson, K.** (2006). Intraflagellar transport and cilium-based signaling. *Cell* **125**, 439-42.
- Schroeder, J., Jackson, L., Lee, D. und Camenisch, T.** (2003). Form and function of developing heart valves: coordination by extracellular matrix and growth factor signaling. *J Mol Med.* **81**, 392-403.
- Schweizer, L. und Varmus, H.** (2003). Wnt/Wingless signaling through beta-catenin requires the function of both LRP/Arrow and frizzled classes of receptors. *BMC Cell Biol.* **2**, 4.
- Selicorni, A., Colli, A., Passarini, A., Milani, D., Cereda, A., Cerutti, M., Maitz, S., Alloni, V., Salvini, L., Galli, M. et al.** (2009). Analysis of congenital heart

- defects in 87 consecutive patients with Brachmann-de Lange syndrome. *Am J Med Genet A*. **149A**, 1268-72.
- Sharma, R. und Chopra, V.** (1976). Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. **48**, 461-5.
- Shiba, D., Yamaoka, Y., Hagiwara, H., Takamatsu, T., Hamada, H. und Yokoyama, T.** (2009). Localization of Inv in a distinctive intraciliary compartment requires the C-terminal ninein-homolog-containing region. *J Cell Sci*. **122**, 44-54.
- Sillitoe, R. und Joyner, A.** (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **23**, 549-77.
- Simonneau, G., Galiè, N., Rubin, L., Langleben, D., Seeger, W., Domenighetti, G., Gibbs, S., Lebrec, D., Speich, R., Beghetti, M. et al.** (2004). Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. **43**, 5S-12S.
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O., Jenny, A. et al.** (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet*. **37**, 537-43.
- Singla, V. und Reiter, J.** (2006). The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* **313**, 629-33.
- Slough, J., Cooney, L. und Brueckner, M.** (2008). Monocilia in the embryonic mouse heart suggest a direct role for cilia in cardiac morphogenesis. *Dev Dyn*. **237**, 2304-14.
- Song, Y. und Mandelkow, E.** (1993). Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1671-5.
- Sorokin, S.** (1962). Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Biol*. **15**, 363-77.
- Spann, J., Carabello, B., Gash, A., Denenberg, B., Donner, R., Maurer, A., Malmud, L. und Siegel, J.** (1984). Assessment of systolic ventricular muscle function in man: the end systolic index. *Herz* **9**, 255-69.
- Spassky, N., Han, Y., Aguilar, A., Strehl, L., Besse, L., Laclef, C., Ros, M., Garcia-Verdugo, J. und Alvarez-Buylla, A.** (2008). Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Dev Biol*. **317**, 246-59.

- Srivastava, D.** (2004). Heart disease: an ongoing genetic battle? *Nature* **429**, 819-22.
- Srivastava, D.** (2006). Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* **126**, 1037-48.
- Srivastava, D. und Olson, E.** (2000). A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* **407**, 221-225.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. und McMahon, A.** (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* **13**, 2072-86.
- Steding, G. und Seidl, W.** (1980). Contribution to the development of the heart. Part 1: normal development. *Thorac Cardiovasc Surg.* **28**, 386-409.
- Stein, A., Pache, R., Bernadó, P., Pons, M. und Aloy, P.** (2009). Dynamic interactions of proteins in complex networks: a more structured view. *FEBS J.* **276**, 5390-405.
- Stewart, S., Kucia, A. und Poropat, S.** (1995). Early detection and management of right ventricular infarction: the role of the critical care nurse. *Dimens Crit Care Nurs.* **14**, 282-91.
- Strigini, M. und Cohen, S.** (2000). Wingless gradient formation in the Drosophila wing. *Curr Biol.* **10**, 293-300.
- Sulik, K., Dehart, D., Ilangaki, T., Carson, J., Vrablic, T., Gesteland, K. und Schoenwolf, G.** (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev Dyn.* **201**, 260-78.
- Tan, S., Rosenthal, J., Zhao, X., Francis, R., Chatterjee, B., Sabol, S., Linask, K., Bracero, L., Connelly, P., Daniels, M. et al.** (2007). Heterotaxy and complex structural heart defects in a mutant mouse model of primary ciliary dyskinesia. *J Clin Invest.* **117**, 3742-52.
- te Welscher, P., Fernandez-Teran, M., Ros, M. und Zeller, R.** (2002a). Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes Dev.* **16**, 421-6.
- te Welscher, P., Zuniga, A., Kuijper, S., Drenth, T., Goedemans, H., Meijlink, F. und Zeller, R.** (2002b). Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science* **298**, 827-30.
- Teilmann, S. und Christensen, S.** (2005). Localization of the angiopoietin receptors Tie-1 and Tie-2 on the primary cilia in the female reproductive organs.

Cell Biol Int. **29**, 340-6.

Thom, T., Haase, N., Rosamond, W., Howard, V., Rumsfeld, J., Manolio, T., Zheng, Z., Flegal, K., O'Donnell, C., Kittner, S. et al. (2006). Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **113**, e85-151.

Thomas, K., Folger, K. und Capecchi, M. (1986). High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* **44**, 419-28.

Toschi, A., Edelstein, J., Rockwell, P., Ohh, M. und Foster, D. (2008). HIF alpha expression in VHL-deficient renal cancer cells is dependent on phospholipase D. *Oncogene* **27**, 2746-53.

Tran, P., Haycraft, C., Besschetnova, T., Turbe-Doan, A., Stottmann, R., Herron, B., Chesebro, A., Qiu, H., Scherz, P., Shah, J. et al. (2008). THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat Genet.* **40**, 403-10.

Treier, M., Gleiberman, A., O'Connell, S., Szeto, D., McMahon, J., McMahon, A. und Rosenfeld, M. (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* **12**, 1691-704.

Van der Heiden, K., Groenendijk, B., Hierck, B., Hogers, B., Koerten, H., Mommaas, A., Gittenberger-de Groot, A. und Poelmann, R. (2006). Monocilia on chicken embryonic endocardium in low shear stress areas. *Dev Dyn.* **235**, 19-28.

Van Leeuwen, P., Geue, D., Lange, S., Cysarz, D., Bettermann, H. und Grönemeyer, D. (2003). Is there evidence of fetal-maternal heart rate synchronization? *BMC Physiol.* **3**.

Van Mierop, L. (1979). Embryology of the univentricular heart. *Herz* **4**, 78-85.

Van Mierop, L. und Kutsche, L. (1985). Development of the ventricular septum of the heart. *Heart Vessels* **1**, 114-9.

Varjosalo, M. und Taipale, J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* **22**, 2454-72.

Veland, I., Awan, A., Pedersen, L., Yoder, B. und Christensen, S. (2009). Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiol.* **111**, 39-53.

Vierkotten, J. (2006). Funktionsanalyse von Ftm: Identifizierung einer neuen

Komponente des zilienassoziierten Shh-Signalweges. *Dissertation*, Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Vierkotten, J., Dildrop, R., Peters, T., Wang, B. und Rüther, U. (2007). Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Development* **134**, 2569-77.

Vogel, G. (2005). News focus: Betting on cilia. *Science* **310**, 216-8.

Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 615-9.

Vuillemin, M. und Pexieder, T. (1989a). Normal stages of cardiac organogenesis in the mouse: I. Development of the external shape of the heart. *Am J Anat.* **184**, 101-13.

Vuillemin, M. und Pexieder, T. (1989b). Normal stages of cardiac organogenesis in the mouse: II. Development of the internal relief of the heart. *Am J Anat.* **184**, 114-28.

Wagner, C. (2008). News from the cyst: insights into polycystic kidney disease. *J Nephrol.* **21**, 14-6.

Wang, B., Fallon, J. und Beachy, P. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* **100**, 423-34.

Washington Smoak, I., Byrd, N., Abu-Issa, R., Goddeeris, M., Anderson, R., Morris, J., Yamamura, K., Klingensmith, J. und Meyers, E. (2005). Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development. *Dev Biol.* **283**, 357-72.

Watanabe, Y. und Nakamura, H. (2000). Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by Sonic hedgehog. *Development* **127**, 1131-40.

Waterston, D. (1918). The development of the heart in man. *Trans. roy. Soc. Edinb.* **52**, 257-302.

Wedaman, K., Meyer, D., Rashid, D., Cole, D. und Scholey, J. (1996). Sequence and submolecular localization of the 115-kD accessory subunit of the heterotrimeric kinesin-II (KRP85/95) complex. *J Cell Biol.* **132**, 371-80.

Wemmer, K. und Marshall, W. (2007). Flagellar length control in chlamydomonas--paradigm for organelle size regulation. *Int Rev Cytol.* **260**, 175-212.

Wen, X., Lai, C., Evangelista, M., Hongo, J., de Sauvage, F. und Scales, S.

- (2010). Kinetics of hedgehog-dependent full-length Gli3 accumulation in primary cilia and subsequent degradation. *Mol Cell Biol.* **30**, 1910-22.
- Wenink, A.** (1978). The conducting tissues in primitive ventricle with outlet chamber. Two different possibilities. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **75**, 747-53.
- Wenink, A.** (1981). Embryology of the ventricular septum. *Virchows Archiv* **390**, 71-79.
- Wenink, A. und Gittenberger-de Groot, A.** (1982). Left and right ventricular trabecular patterns. Consequence of ventricular septation and valve development. *Br Heart J.* **48**, 462-8.
- Wenink, A., Oppenheimer-Dekker, A. und Moolaert, A.** (1979). Muscular ventricular septal defects: a reappraisal of the anatomy. *Am J Cardiol.* **43**, 259-64.
- Wessels, A., Anderson, R., Markwald, R., Webb, S., Brown, N., Viragh, S., Moorman, A. und Lamers, W.** (2000). Atrial development in the human heart: an immunohistochemical study with emphasis on the role of mesenchymal tissues. *Anat Rec.* **259**, 288-300.
- Wessels, A. und Sedmera, D.** (2003). Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiol Genomics.* **15**, 165-76.
- Wigley, W., Fabunmi, R., Lee, M., Marino, C., Muallem, S., DeMartino, G. und Thomas, P.** (1999). Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol.* **145**, 481-90.
- Wolf, M., Saunier, S., O'Toole, J., Wanner, N., Groshong, T., Attanasio, M., Salomon, R., Stallmach, T., Sayer, J., Waldherr, R. et al.** (2007). Mutational analysis of the RPGRIP1L gene in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis. *Kidney Int.* **72**, 1520-6.
- Yamazaki, H., Nakata, T., Okada, Y. und Hirokawa, N.** (1995). KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. *J Cell Biol.* **130**, 1387-99.
- Yanagawa, S., van Leeuwen, F., Wodarz, A., Klingensmith, J. und Nusse, R.** (1995). The dishevelled protein is modified by wingless signaling in Drosophila. *Genes Dev.* **9**, 1087-97.
- Yang, X. und Seto, E.** (2008). Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell.* **31**, 449-61.
- Yang, X., Wang, Y., Zhang, J., Li, Y., Xu, J., Zhu, J., Zhao, W., Chu, D. und Wiedemann, P.** (2009). Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in mediating hypoxia-

- induced expression of HIF-1alpha and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **50**, 1873-9.
- Yang-Snyder J, M. J., Brown JD, Lai CJ, Moon RT.** (1996). A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol.* **6**, 1302-6.
- Yost, C., Torres, M., Miller, J., Huang, E., Kimelman, D. und Moon, R.** (1996). The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* **10**, 1443-54.
- Yun, S., Lee, M., Ryu, J., Song, C. und Han, H.** (2009). Role of HIF-1alpha and VEGF in human mesenchymal stem cell proliferation by 17beta-estradiol: involvement of PKC, PI3K/Akt, and MAPKs. *Am J Physiol Cell Physiol.* **296**, 317-26.
- Zariwala, M., Knowles, M. und Omran, H.** (2007). Genetic defects in ciliary structure and function. *Annu Rev Physiol.* **69**, 423-50.
- Zecca, M., Basler, K. und Struhl, G.** (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-44.
- Zhang, J., Lin, Y., Zhang, Y., Lan, Y., Lin, C., Moon, A., Schwartz, R., Martin, J. und Wang, F.** (2008). Frs2alpha-deficiency in cardiac progenitors disrupts a subset of FGF signals required for outflow tract morphogenesis. *Development* **135**, 3611-22.
- Zhang, X., Ramalho-Santos, M. und McMahon, A.** (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell* **106**, 781-92.
- Zhang, Y. und Hancock, W.** (2004). The two motor domains of KIF3A/B coordinate for processive motility and move at different speeds. *Biophys J.* **87**, 1795-804.
- Zhao, Y., Hong, D., Pawlyk, B., Yue, G., Adamian, M., Grynberg, M., Godzik, A. und Li, T.** (2003). The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3965-70.
- Zhao, Z. und Rivkees, S.** (2000). Programmed cell death in the developing heart: regulation by BMP4 and FGF2. *2000* **217**, 388-400.
- Zimmerman, K.** (1898). Beiträge zur Kenntnis einiger Drüsen und Epithelien. *Arch Mikrosk Entwickl Mech.* **52**, 552-706.

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Rütter für das Überlassen des Themas, die hilfreichen Diskussionen und die Möglichkeit selbstständig zu forschen.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für die relativ spontane Übernahme des Koreferates und die rasche Begutachtung.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Rüdiger Riehl für seine Hilfe bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ferner bedanke ich mich bei den Mitgliedern des EMTs für eine Menge spaßiger Momente, viel Hilfsbereitschaft sowie ein gutes Arbeitsklima.

Ein ganz besonderer Dank geht an Johanna Lier für die tolle Zusammenarbeit bei der Jagd nach dem Fantom und für den immerwährenden Beistand auch in schweren Phasen.

Widmen möchte ich diese Dissertation meiner Frau Silke und meiner Tochter Junis, die in meiner Studien- und Promotionszeit viele Entbehnungen ertragen und zahlreiche Belastungen auf sich nehmen mussten und doch immer zu mir gestanden und mich unterstützt haben.

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Kardiale Ziliopathie als Ursache perimembranöser ventrikulärer Septumdefekte“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Außerdem versichere ich, dass diese Dissertation noch in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt worden ist.

Düsseldorf, den

(Christoph Gerhardt)