

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

Die Rolle von Gremlin-1 für die kardiale Entwicklung im
Zebrafischembryo

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Sandra Scheitza
aus
Frankfurt am Main/ Höchst
2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Kandolf

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Hypothese und Fragestellung	9
1.2	Der Zebrafisch	9
1.2.1	Der Zebrafisch als Modellorganismus	9
1.2.2	Die Entwicklung des Zebrafischembryos	10
1.2.3	Die embryonale Herzentwicklung	13
1.2.4	Die Rolle einzelner Signaltransduktionswege in der Herzentwicklung	17
1.3	Bone Morphogenetic Proteins – BMPs	19
1.3.1	Aufbau der BMPs	19
1.3.1.1	BMP-2	19
1.3.1.2	BMP-4	20
1.3.2	Funktion der BMPs im Rahmen der Embryogenese	20
1.3.3	Signalkaskade der BMPs	22
1.3.4	Smads und deren Signaltransduktion	24
1.3.5	BMP-Antagonisten	24
1.3.6	Die Rolle von BMPs während der embryonalen Herzentwicklung	26
1.4	Gremlin--1	27
1.4.1	Expression, Proteinaufbau und Funktion.....	27
1.4.2	Die „Cystine- knot“- Struktur	29
1.4.3	Wirkmechanismen	31
1.4.4	Gremlin-2 in der kardialen Entwicklung im Zebrafischembryo	33
1.4.5	Gremlin-2 und seine Assoziation mit Vorhofflimmer	34

2	Material	35
2.1	Geräte	35
2.2	Software	36
2.3	Datenbanken	36
2.4	Gebrauchsmaterialien	36
2.5	Verbrauchsmaterialien	36
2.6	Chemikalien	37
2.7	Immunologische Materialien	39
2.7.1	Mediensupplemente/ Antibiotika	39
2.7.2	Antikörper und Farbstoffe	39
2.7.3	Bakterienstämme	39
2.8	Molekularbiologische Materialien	39
2.8.1	Primer	39
2.8.1.1	Primer zur Amplifizierung von zGrem-1	39
2.8.1.2	Primer zur Klonierung von zGrem-1 in pBluescript	39
2.8.1.3	Primer zur Ligation	40
2.8.2	Morpholinos (MO) (antisense-Oligonukleotide) (Gene-Tools).....	40
2.8.3	Hybridisationssonden kardialer Markergene	40
2.9	Molekularbiologische Verbrauchsmaterialien	40
2.10	Plasmide	41
2.11	Kits	41
2.12	Puffer und Lösungen	42
2.13	Feste Nährböden für Bakterien	43
2.14	Fischlinien	44
3	Methoden	45
3.1	RNA-Isolation aus Zebrafischen	45
3.2	Agarosegelelektrophorese	45
3.3	cDNA-Synthese	46
3.4	Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
3.4.1	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	47

3.5	Klonierung von zGremlin-1 in pBluescript und pCS ₂ +	48
3.5.1	Linearisierung des Plasmids	48
3.5.2	Verdauung von Plasmid und RT-PCR Produkt	48
3.5.3	Ligation des PCR-Produktes mit dem linearisierten Vector	48
3.5.4	Transformation von kompetenten Bakterien mit dem	49
	Gremlin-1 enthaltenden Vektor.....	49
3.5.5	Kolonien-PCR	49
3.5.6	Klonselektion	50
3.5.7.	Plasmid isolation mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit	50
3.5.8	Sequenzierung	50
3.6	Fischzucht und Verpaarung	50
3.7	Analysen der Herzentwicklung im lebenden Embryo	51
3.7.1	„Loss of Function“-Experimente (Gremlin-1 “knock-down”)	51
3.7.1.1	Eingesetzte Morpholino Antisense Oligonukleotide	51
3.7.1.2	Mikroinjektion zum “knock down” von Gremlin im Embryo	51
3.7.1.3	Fixierung der Zebrafischembryonen	52
3.7.1.4	Versuchspläne.....	52
3.7.2	“Gain of function“-Experimente	53
3.7.2.1	Linearisierung des Gremlin-1 enthaltenden pCS ₂ +-Vektors	53
3.7.2.2	Synthese der capped mRNA	53
3.7.2.3	Mikroinjektion zur Gremlin-1-Überexpression	53
3.7.2.4	Versuchspläne	53
3.8	Statistische Analyse	54
3.9	In situ Hybridisierung	54
3.9.1	Herstellung von RNA-Antisense-Sonden	54
3.9.1.1	Restriktionsverdau des Expressionsplasmids	54
3.9.1.2	In vitro Transkription der Antisense RNA Sonde	55
3.9.2	Durchführung der „Whole mount“ in situ Hybridisierung	56
3.10	Bildgebende Dokumentation	57
3.10.1	Mikroskopische Untersuchungen	57
3.10.2	Fotodokumentation	58

4	Ergebnisse	59
4.1	Klonierung von zGremlin-1 in pBluescript und pCS2+	59
4.2	„Loss of function“ – Experimente	63
4.2.1	Titrierung der optimalen Morpholino Antisense Oligonukleotid- Konzentration	64
4.2.2	Differenzierung der Herzanlage nach „knock down“ von Gremlin-1	65
4.2.2.1	Kardiales Jogging	66
4.2.2.2	Kardiales Looping	69
4.2.2.3	Die Differenzierung des Atriums und des des Ventrikels	70
4.2.2.4	Differenzierung der Kardiomyozyten	72
4.2.2.5	Herzrhythmus	73
4.3	„Gain of function“ – Experimente	75
4.3.1	Titrierung der optimalen zGremlin-1 capped mRNA Konzentration	75
4.3.2	Phänotyp des Embryos insgesamt und des Herzens	76

4.4	Rescue des „knock down“ Phänotyps mit zGremlin-1 capped mRNA	76
5	Zusammenfassung	77
6	Diskussion	79
6.1	Die Bedeutung von Gremlin auf die Herzkontraktion	79
6.2	Die Bedeutung von Gremlin-1 für die Differenzierung der Herzanlage nach „knock down“ bzw. Überexpression	80
6.3	Die Bedeutung von Gremlin-1 für das kardiale „Jogging“ und „Looping“	81
6.4	Die Differenzierung des Atriums und des Ventrikels unter dem Einfluss von Gremlin-1.....	82
6.5	Die Auswirkungen von Gremlin-1 auf die Kardiomyozytendifferenzierung	83
7	Literaturverzeichnis	84
8	Danksagung	104
9	Lebenslauf	105

1. Einleitung

1.1 Hypothese und Fragestellung

Gremlin-1 (Grem1) ist ein Gen aus der DAN-Familie, und gehört damit zu den Antagonisten der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), die essentiell an der embryonalen Entwicklung des Herzens beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb der Einfluss von Gremlin auf die Herzentwicklung untersucht werden.

Im Einzelnen sollen die Differenzierung der Herzanlage, das kardiale Jogging und Looping, die Ausdifferenzierung der Kardiomyozyten und die Funktion des Herzens betrachtet werden.

1.2 Der Zebrafisch

1.2.1 Der Zebrafisch als Modellorganismus

Der Zebrafisch, *danio rerio*, vereint die Eigenschaften von Invertebraten, nämlich eine kurze Generationszeit, eine hohe Anzahl von Nachkommen und technisch leicht zugängliche Embryonen, die sich außerhalb des Mutterleibes entwickeln (Metscher et al. 1999), mit denen von Vertebraten. So entwickelt er während der Embryonalphase prinzipiell alle Organsysteme, die sich auch im Menschen ausbilden, auch wenn die Differenzierung verschiedener Organe auf früheren Stufen der Evolution zum Stillstand kommt. So entwickelt das Herz nur eine linke Herzkammer und einen linken Vorhof, das rechte Herz wird erst in höheren Wirbeltieren ausgebildet. Die Lungenanlage bildet beim Fisch die Schwimmblase, erst in höheren Wirbeltieren wird sie sich weiter zur Lunge differenzieren. Die frühe embryonale Entwicklung der Hauptorgansysteme ist aber sehr ähnlich.

Die Haltung des Zebrafisches ist leicht zu handhaben und die Embryonen sind unter dem Lichtmikroskop aufgrund eines transparenten Chorions und transparenter Zellen, sichtbar und einfach während ihrer raschen embryonalen

Entwicklung zu beobachten, wobei in den ersten 48 Stunden nach Entstehung der Zygote alle wesentlichen Organsysteme angelegt werden.

Genfunktionen können im Zebrafischembryo auf einfache und schnelle Weise in ihrer Expression manipuliert werden. So führt die Injektion von mRNA in die Zygote zu einer Überexpression des codierten Proteins, die Injektion von „Morpholino“ Antisense Oligonukleotiden bewirkt einen „knock down“ des entsprechenden Gens.

1.2.2 Die Entwicklung des Zebrafischembryos

Zebrafisch-Oocyten entwickeln sich innerhalb von 48 Stunden nach Befruchtung zur Zebrafisch-Larve, die bereits alle Organe des späteren adulten Fisches aufweist. Die Schnelligkeit dieser Vorgänge ist einer der Hauptgründe für die Etablierung des Zebrafisches als Modellorganismus. Die Embryogenese des Zebrafisches verläuft dabei in mehreren Entwicklungsstufen:

Das Zebrafischei besteht aus einer Animalpolzelle mit darunter liegender Dotterzelle. In den ersten drei Stunden der Entwicklung, nach Entstehung der Zygote, finden hauptsächlich Zellteilungen ohne Zellwachstum statt, bis aus der einzelligen Zygote circa 1000 Zellen hervorgegangen sind. Diese werden als Blastomere bezeichnet. Etwa zu diesem Zeitpunkt entwickelt sich extraembryonales Gewebe, das Dotter-Synzytium. Es entsteht, wenn die Blastomere, die die Grenzschicht zur Dotterzelle bildet, kollabiert und dabei ihr Zytoplasma und ihre Zellkerne in das Zytoplasma der Dotterzelle entlässt. Das Synzytium bildet die Grenzschicht zwischen Dotterzelle und Blastoderm und ermöglicht Zellwanderungen während der Gastrulation. Nach circa 4 Stunden und weiteren Zellteilungszyklen beginnt ein Prozess, der als Epibolie bezeichnet wird. Dabei wandern die Blastomeren, vermittelt durch das Dotter-Synzytium, vom Animal- zum Vegetalpol des Embryos, wobei die Dotterzelle vollständig mit Blastodermzellen bedeckt wird. Circa 5 Stunden nach der Befruchtung ist die Dotterzelle zur Hälfte mit Blastomeren bedeckt (50% Epibolie). Dies ist der Beginn der Gastrulationsphase, die etwa 5-6 Stunden nach der Befruchtung des Eis beginnt. In der Gastrulationsphase wandern

laterale und ventrale Blastodermzellen zielgerichtet zur dorsalen Seite des Embryos. Diesen Vorgang bezeichnet man als Konvergenz. Die konvergierenden Blastodermzellen interagieren mit Zellen des dorsalen Mesoderms, was zu deren Ausdehnung bzw. Extension entlang der antero-posterioren Körperachse führt und zur Bildung des chordalen Mesoderms, dem späteren Notochord, beiträgt. Am Ende der Gastrulation, nach circa 6 Stunden, ist die Bildung der 3 Keimblätter (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm) und die Etablierung der dorso-ventralen und antero-posterioren Körperachsen abgeschlossen. Man spricht hier vom *shield*-Stadium. Diese Bezeichnung leitet sich von einer Stelle des Keimrings (engl. *germring*) her, an welcher sich eine Akkumulation von Zellen ausbildet, dem sogenannten *shield*. Dort befindet sich die dorsale Seite des Embryos. Das Blastoderm bedeckt zu diesem Zeitpunkt in etwa die Hälfte des kugelförmigen Embryos, gut sichtbar in der Ansicht auf den Animalpol. Das Blastoderm differenziert in zwei unterschiedliche Zell-Lagen, den äußere Epi- und den inneren Hypoblast. Nach der Gastrulation beginnt die Segmentierungsphase, in der, entlang der antero-posterioren Körperachse durch Konvergenz und Extension, die Bildung der Somiten erfolgt (Kimmel et al., 1995).

Nach 10 Stunden, dem sogenannten *bud*-Stadium, bedeckt das Blastoderm bereits fast vollständig den Dotter. Das kaudale Ende des Embryos besitzt dabei eine Verdickung (engl. *bud*). Anterior des Rumpfes (engl. *tailbud*) befindet sich die verdickte Neuralplatte, deren posteriorer Teil sich zum Rückenmark und den Spinalnerven entwickeln wird. Die ersten 18 Somiten des Embryos sind nach ca. 18 Stunden entwickelt, zur gleichen Zeit ist das Vorläuferorgan der Augen sowie posterior davon das Mittelhirn sichtbar. Die Entwicklung des Rumpfes ist nach 18 Stunden durch das Zusammenziehen des Dottersacks gekennzeichnet, welches den Embryo zu einem relativen Längenwachstum in Bezug zu dessen Dicke veranlasst. Die Augenlinse, sowie das Gehörvorläuferorgan, sind sichtbar und die Dottersackverlängerung klar vom Dottersack abgrenzbar. Das Gehirn ist bereits in seine einzelnen Komponenten (Pros-, Di-, Telencephalon) strukturiert.

Nach 24 Stunden schließlich ähnelt der Zebrafischembryo dem menschlichen Embryo in einem vergleichbaren Entwicklungsstadium nach 40-45 Tagen. Die Organanlagen sind weitestgehend ausdifferenziert, der Embryo außerhalb seines Chorions lebensfähig. Kleinhirn, Epiphyse sowie Hypothalamus im Diencephalon sind unterscheidbar. Das Riechorgan anterior-dorsal des Vorderhirns, sowie die Otolithen im Gleichgewichtsorgan sind erkennbar. Der letzte Somit ist ausgebildet. Blutbildung, Herz-Kreislauf, Leber und Niere beginnen zu arbeiten. Das schlagende Herz und der pulsierende Blutstrom im Gefäßsystem sind sichtbar.

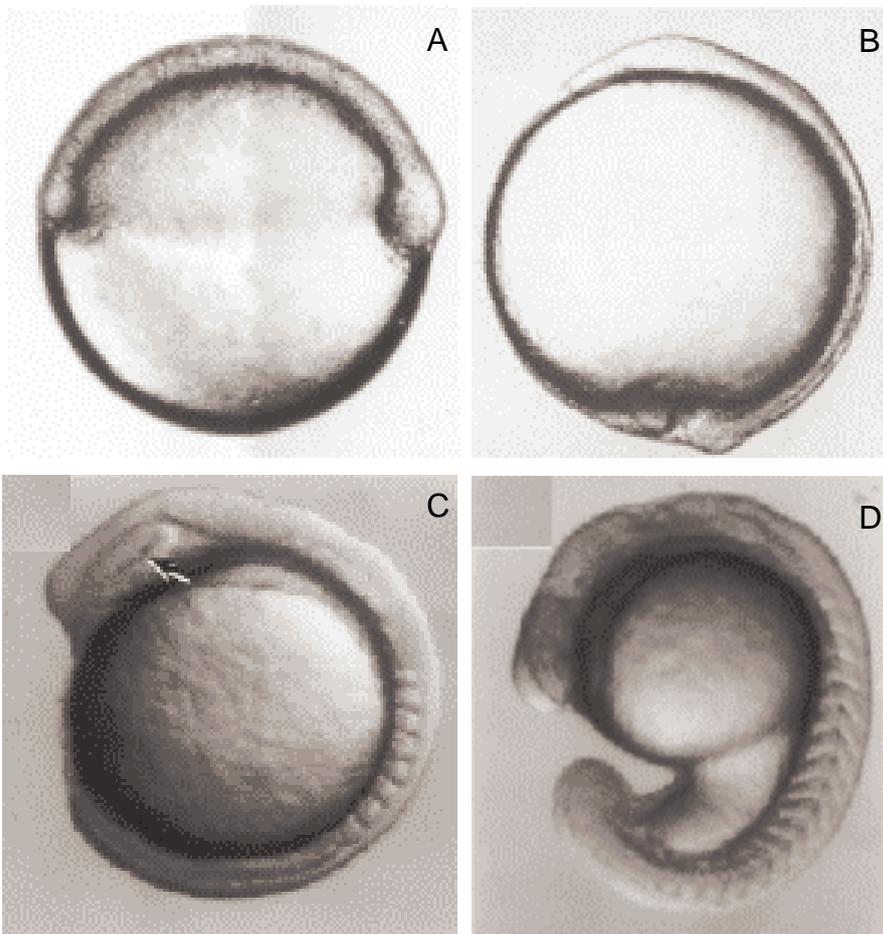




Abbildung 1: Entwicklung des Zebrafischembryos (Grafiken aus Westerfield):
A Embryo im *shield*-Stadium (6 hpf, 50% epiboly); **B** Embryo im *bud*-Stadium (10 hpf.); **C** Embryo 14 hpf mit 8 vollentwickelten Somiten (engl. *eight somites stage*); **D** Embryo 18 hpf. mit bereits gestrecktem Rumpf, klar abgrenzbarem Dottersack und Dottersackextension; **E** Embryo 24 hpf mit strukturiertem Gehirn und weitestgehend entwickelten Organen wie im späteren adulten Fisch. (hpf: hours post fertilization)

1.2.3 Die embryonale Herzentwicklung

Das Herz des Zebrafisches ist, wie bei allen Vertebraten, das erste, durch komplexe morphogenetische Interaktionen, unter Einbeziehung von verschiedenen embryonalen Zellen, vollständig differenzierte Organ. Schon 72 Stunden nach der Befruchtung der Eizelle ist das kardiovaskuläre System weitgehend ausgereift und in der Struktur und Funktion vergleichbar zu dem eines neugeborenen Säugers, wobei der Lungenkreislauf fehlt und ebenso auch das komplette rechte Herz mit Vorhof und Kammer, das sich erst in höheren Wirbeltieren entwickelt.

Die Herzentwicklung nimmt Ausgang von dem anterior-lateralen Teil des Plattenmesoderms (ALPM). Kurz nach der Gastrulation werden Vorläuferzellen innerhalb des anterolateralen Mesoderms durch induzierende Signale des benachbarten Endoderms bilateral entlang der Längsachse zum sog. kardiogenen Feld organisiert. Die Felder migrieren zur Mittellinie und

verschmelzen zu einem primitiven Herzschlauch, der kurz nach seiner Bildung, der sog. kardialen Fusion, beginnt peristaltisch zu kontrahieren (Olson und Srivastava 1996).

Der primitive Herzschlauch besteht bereits aus einer inneren Endokard- und einer äußeren Myokardschicht, die durch eine extrazelluläre Matrix (*cardiac jelly*) voneinander getrennt sind, und ist von Beginn an in folgende Abschnitte organisiert: Von rostral nach kaudal ist der Herzschlauch unterteilt in den Bulbus arteriosus oder Ausflusstrakt (*outflow tract*), die zukünftige ventrikuläre Kammer, die zukünftige atriale Kammer und den Sinus venosus oder Einflusstrakt (*inflow tract*, kurz IFT). Die zukünftige Position jeder einzelnen Herzzelle im embryonalen Herzen ist bereits im ALPM festgelegt und kann durch spezifische Genexpressionsmuster verfolgt werden. Außerdem werden die Vorläuferzellen in zwei verschiedene Zellpopulationen eingeteilt, der ersten und zweiten Herzlinie. Die Zellen der ersten Herzlinie sind am Aufbau des Sinus venosus, des atrioventrikulären Kanals (AVC), des Ventrikels und des Atriums beteiligt, wohingegen die Zellen der zweiten Herzlinie zur Entwicklung des Bulbus arteriosus, des Endokards und Teilen des Atriums beitragen (Stennard, 2005). Wie bei der Entwicklung höherer Vertebraten beginnt sich das Herz des Zebrafischs nach der kardialen Fusion zu drehen, wodurch die spätere Position der Herzkammern festgelegt wird. Parallel zur Herzdrehung reifen die kontraktile Kardiomyozyten von Atrium und Ventrikel zu Kammerkardiomyozyten heran, entwickeln ein spezialisiertes Erregungsleitungssystem und beginnen zu proliferieren (Stainier, 1992; Weinstein, 1996).

Bereits das gestreckte tubuläre Herz beginnt sich rhythmisch zu kontrahieren. Als ersten Schritt der späteren Rechts-Links-Asymmetrie wandert das Herz nach links, es findet das sogenannte „*jogging*“ des Herzens statt, etwa 21 hpf (hours post fertilization). Dieses kardiale „*jogging*“ ist 24 hpf abgeschlossen. Als zweiter Schritt folgt danach das nach rechts gerichtete kardiale „*looping*“.

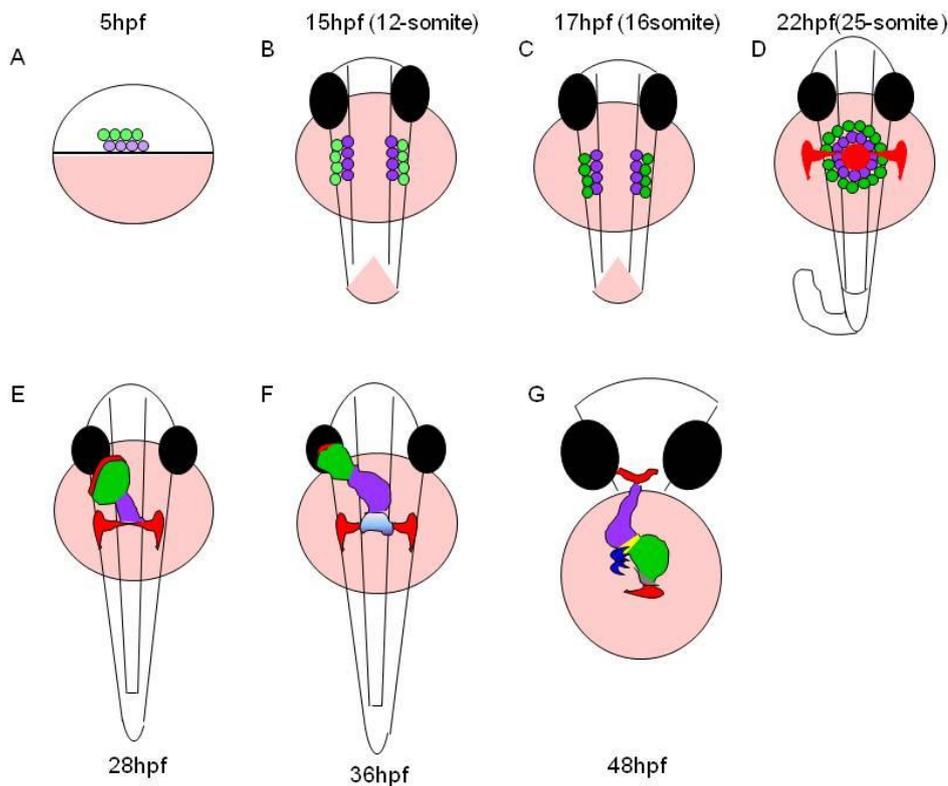


Abbildung 2: Phasen der embryonalen Herzentwicklung: (A) 5 Stunden nach der Fertilisation(hpf) nimmt die Blastula (weiß) und der Dottersack (rosa) jeweils 50% ein. In diesem Stadium sind die kardialen Progenitorzellen bilateral der marginalen Zone angeordnet. Die Vorläuferzellen für den Vorhof (lila) sind mehr nach ventral ausgerichtet als diejenigen für den Ventrikel (hellgrün). Während der Gastrulation wandern beide Progentorzelltypen nach dorsal in Richtung des Mittellinienendes bis hin zum ALPM. Während des mittleren und späten Somiten-Stadiums dehnt sich das Herzmuskelgewebe durch kontinuierliche Differenzierung mehr lateral des ALPM aus. Dies wird bedingt durch die Entwicklung arterieller Myozyten (grün). Unterdessen migrieren die endokardialen Zellen (rot) bereits aus dem ALPM in Richtung der Mittellinie, die Herzmuskelzellen folgen diesem Verhalten etwas später. Wenn die bilateralen Herzfelder entlang der Mittellinie fusionieren, bilden sie eine kardiale Scheibenanordnung mit den endokardialen Zellen in der Mitte, ähnlich einem Loch, ventrikulären Myozyten drum herum und atrialen Myozyten an der Peripherie der Scheibe (D). Die Herzmorphogenese verwandelt das scheibenförmige Herz in ein Herzrohr. Das Endokard bildet die innere

Auskleidung des myokardialen Rohrs. (E) 28 hpf hat sich das lineare Herzrohr gebildet, mit dem venösen Pol in der anterioren linken Region und dem arteriellen Pol im Bereich der Mittellinie. (F) Die kardiogene Differenzierung geht entlang des arteriellen Pols weiter, woraus neue Kardiomyozyten (lila verlaufend) in diesen Bereich aufgenommen werden. 36 hpf hat die kardiale Schleifenbildung (looping) begonnen, mit einer Verschiebung des Ventrikels in Richtung der Mittellinie, und der sichtbaren Verengung im Bereich des AV Kanals (F). Das Herzrohr entwickelt sich kontinuierlich weiter und bildet eine S-förmige Schleife (G). Ellipsoide, extrakardiale Pro-epikardialen Zellen (blau) beginnen in der Nähe des AV-Kanal (gelb), das Myokard mit einer epikardialen Schicht zu bedecken. Der Sinusknoten (grau) ist in der inneren Krümmung des Atriums, in der Nähe des venösen Pols. (aus "Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease" von Jeroen Bakkers, Hubrecht Institute-KNAW & University Medical Center Utrecht and Interuniversity Cardiology Institute of The Netherlands; online publish-ahead-of-print 19 May 2011).

Das frühembryonale Herz aller Wirbeltiere besteht aus zwei Kammern, einem Atrium mit dünnem, aus einer Zell-Lage bestehenden Myokard und relativ dicker Herzgallertschicht und einem Ventrikel mit dickem und mehrschichtigem Myokard, bei dem das Herzgallert bereits durch subendokardiales Gewebe ersetzt wurde (Christoffels, 2004; Serbedzija, 1998; Stainier, , 2001; Stainier, 1993). Atrium und Ventrikel, die aus venösem Blut mit geringem Blutdruck arterielles Blut mit hohem Druck erzeugen, sind durch den AVC getrennt, der einen unidirektionalen Blutfluss sicherstellt (Hu N et al., 2001). Dieser erzeugt durch Bündelung und verzögerte Weiterleitung des elektrischen Erregungssignals eine sequentielle Kontraktion beider Kammern, ausgehend vom IFT. Dies wird durch die elektrische Isolation der Kardiomyozytenpopulationen von Atrium und Ventrikel, durch nicht leitendes Gewebe, dem sog. AV-Ring, erreicht. Das Erregungssignal wird mit Hilfe von Zellen mit verzögerter Erregbarkeit, die im sog. AV-Knoten organisiert sind, überbrückt. Zum anderen wird am AVC eine flexible AV-Klappe ausgebildet, die

bei der ventrikulären Kontraktion den Blutrückfluss ins Atrium verhindert (Lyons, 1996; Moorman, 2004; Serbedzija, 1998; Stainier, 2001, 1992; Yelon, 2001). Bis zu diesem Schritt verläuft die embryonale Herzentwicklung in allen Vertebraten gleich. Während das Fischherz an diesem Punkt seine Entwicklung abgeschlossen hat und nur noch durch Zellteilung wächst, entwickeln Vögel und Säugetiere ein weiteres Kreislaufsystem, das rechte Herz und den Lungenkreislauf.

1.2.4 Die Rolle einzelner Signaltransduktionswege in der Herzentwicklung

Die Herzentwicklung wird über ein breites Netzwerk verschiedener Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle kontrolliert.

Die Expression spezifischer Markergene, wie z. B. *gata-5* oder *bmp-2*, ist bereits in myokardialen Herzvorläuferzellen am Ende des Blastulastadiums zu beobachten (Stainier, 2001).

Früheste Transkriptionsfaktoren, welche in beiden Herzfeldern des sich bildenden Herzbogens exprimiert werden sind *Gata4/5/6* und *Nkx2.5*. In den Promotorregionen dieser Gene befinden sich *Bmp*-spezifische *Smad*-Bindestellen, so dass z.B. *Bmp-4* direkt die Expression von *Gata-4* regulieren kann, während *Bmp*-Signale zusammen mit *Gata*-Faktoren die Transkription von *Nkx2.5* kontrollieren (Brown et al., 2004; Peterkind et al., 2005; Rojas et al. 2005).

Gata-4 und *Nkx2.5* sind in differenzierenden Kardiomyozyten beider Herzfelder sowie in Neuralleistenzellen exprimiert und können zeitlich und regional in Anwesenheit von verschiedenen Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren die Expression herzspezifischer Proteine initiieren. In differenzierten atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten wird *MLC2a* (myosin-light-chain2a) exprimiert, welches in Anwesenheit von *Nkx2.5*, *Gata-4*, *Mef2* und *RAR* aktiviert wird, sowie andere kontraktile Proteine (z.B. *MHCs*, *cardiac α Actin*, *Troponin*). Es können Zellen beider Herzvorläuferpopulationen aufgrund der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle unterschieden werden. Zellen des ersten Herzfeldes exprimieren z.B. *Tbx-5*, *eHand* und

Bmp10, während in Zellen des zweiten Herzfeldes *Islet1 (Isl1)*, *dHand* und *Fgfs* detektiert werden können. Die Differenzierung erster Herzfeldzellen in Kardiomyozyten des linken Ventrikels wird synergistisch durch *Nkx2.5* und *Tbx5* reguliert. So kontrollieren *Nkx2.5*, *Tbx5* und *Gata4/5/6* z.B. die Expression von *eHand*, *Irx-4* und *Bmp-10* (Buckingham et al., 2005).

Auf der anderen Seite ist der Notch-Signaltransduktionsweg für die korrekte Bildung und Differenzierung der ventrikulären Trabekelschicht verantwortlich (Waldo et al., 2005).

In den zweiten Herzfeldvorläuferzellen ist der Transkriptionsfaktor *Isl1* ausschlaggebend für die Entwicklung aller Derivate dieser Herzvorläufer. So führt der konventionelle Verlust von *Isl1* zum Verlust des Ausflusstraktes und rechten Ventrikels, kontrolliert die Aktivierung von *Fgf*- und *Bmp*-Signalen und resultiert weiterhin in einer signifikanten Verminderung von Proliferation und Migration. Neben der Regulation dieser Signalmoleküle bindet *Isl1* zusammen mit *Gata*-Faktoren an spezifische Promotorregionen von *Mef2c* und aktiviert so die Expression von *Mef2c* und indirekt *dHand* spezifisch im zweiten Herzfeld (Srivastava, 2006; McFadden et al., 2000).

Für die Entwicklung des Ausflusstraktes aus Herzfeld- und Neuralleistenzellen konnte genetisch nachgewiesen werden, dass die Expression von *Fgf8*- und *Fgf10*-Liganden direkt über den Transkriptionsfaktor *Tbx1* reguliert wird (Vitelli, et al., 2002; Hu T et al., 2004; Xu et al., 2004), während die Expression von *Tbx1* von *Shh*-Signalen abhängig ist (Garg et al., 2001). Neben *Shh*-Signalen wird *Tbx1* positiv autoreguliert, indem es *FoxA2*-Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche wiederum positiven Einfluss auf die *Tbx1*-Expression in Neuralleistenzellen haben (Hu et al., 2004; Yamagishi et al., 2003). Für die korrekte Drehung der Blutgefäße des Ausflusstraktes ist die linkseitige Expression von *Pitx2* verantwortlich, welches über *CyclinD2* die verstärkte Proliferation im linken Ausflusstrakt kontrolliert (Yashiro et al., 2007; Kioussi et al., 2002). Die Regulation der Expression von *Pitx2* im Ausflusstrakt des Herzens wurde auf kanonische *Wnt*-Signale sowie *Tbx1* zurückgeführt (Srivastava, 2006; Kioussi et al., 2002; Nowotschin et al., 2006).

1.3 Bone Morphogenetic Proteins – BMPs

Die systematische experimentelle und klinische Erforschung der Bone Morphogenetic Proteins begann, vor allem hinsichtlich ihres Einflusses auf den Knochen, in den 1980er Jahren.

Anfang der 80er Jahre wurde von Sampath und Reddi ein reproduzierbarer Bio-Assay eingeführt, durch den gezeigt werden konnte, dass der von der Knochengrundsubstanz abgetrennte Proteinanteil ausschlaggebend für die Knocheninduktion ist (Sampath & Reddi 1981). Im Anschluss daran wurden BMPs erstmals gezielt in klinische Studien eingesetzt, wie etwa von Johnson, der Pseudoarthrosen mit autologen oder allogenen Knochenimplantaten in Kombination mit BMP erfolgreich behandelte (Johnson et al.; 1988).

1.3.1 Aufbau der BMPs

Der Aufbau der Proteine der TGF- β -Superfamilie ist bei allen Mitgliedern sehr ähnlich. Jedes Protein besitzt eine N-terminale Signalsequenz, mit deren Hilfe es an die Zelloberfläche gelangt. Dort verbleibt es in der Extrazellulärmatrix.

Des Weiteren besitzt es eine Prodomäne und eine mature Domäne am Carboxy-terminalen Ende. Solange die Prodomäne an das Protein gebunden ist, ist dieses noch inaktiv. Erst durch die proteolytische Abspaltung der Prodomäne wird das Protein aktiv. Das Hauptstrukturmerkmal der TGF- β -Proteine ist ein hoch konserviertes Motiv aus 7 Cysteinresten im reifen Protein (Hogan, 1996).

Während BMP-2 in seiner Sequenz nur zu 60 % identisch mit BMP-7 ist, zeigt es innerhalb seiner Untergruppe mit BMP-4 eine hohe Übereinstimmung. Die Aminosäuresequenz von BMP-2 und BMP-4 ist hoch konserviert und gleicht sich in 80% (Griffith et al, 1996).

1.3.1.1 BMP-2

BMP-2 ist ein 32 kd großes homodimeres Protein. Es wird als ein 453 Aminosäuren langes Proprotein synthetisiert und nach Glykolisierung,

proteolytischer Spaltung und Dimerisierung entsteht das reife Protein aus den 114 C-terminalen Proproteinresten (Scheufler et al., 1999). Wie oben bereits erwähnt besitzt BMP-2 das für seine Superfamilie charakteristische Cysteinmotiv, wobei sechs Cysteinreste drei Disulfidbrückenbindungen innerhalb der Ketten bilden während der siebte Cysteinrest eine Bindung zwischen den beiden Polypeptidketten des Dimers herstellt (McDonald und Hendrickson, 1993; Murray-Rust et al., 1993). Die Sequenz am N-terminalen Ende, die dem ersten Cysteinrest vorangeht, besteht aus vielen positiv geladenen Aminosäuren und ist unter anderem für die Heparinbindung verantwortlich (Koenig et al., 1994).

1.3.1.2 BMP-4

Das Gen BMP4 kodiert für ein 408 Aminosäuren langes Protein, welches, wie alle Mitglieder der TGF- β Familie, zunächst als inaktives Vorläufermolekül synthetisiert wird (Aono et al. 1995). Im Rahmen eines Reifungsprozesses erfolgt im endoplasmatischen Retikulum die Dimerisation der evolutionär hochkonservierten, carboxyterminalen Domänen (TGF- β Domänen) und die proteolytische Abspaltung der großen vorgelagerten Prodomänen im Bereich einer ersten Konsensussequenz.

BMP-4 wird während der Embryogenese weitläufig exprimiert. Die Tatsache, dass im Tiermodell sowohl ein Funktionsverlust als auch ein Funktionsgewinn, etwa in Form eines konstitutionell aktiven BMP-4-Rezeptors oder Verlust eines Antagonisten, zu Fehlbildungen führen kann, spricht hierbei für die Notwendigkeit einer genauen zeitlichen und örtlichen Regulation der BMP4-Dosis für eine ungestörte Entwicklung dieser Organsysteme (Brunet et al. 1998; Hu et al. 2003).

1.3.2 Funktion der BMPs im Rahmen der Embryogenese

BMPs leiten biologische Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung ein und sind hierdurch an der Steuerung der Embryogenese,

von der Differenzierung der Keimblätter, in erster Linie der Induktion des Mesoderms, bis zur Morphogenese nahezu aller Organsysteme beteiligt (Hogan 1996).

Die TGF- β -Superfamilie umfasst mittlerweile etwa 30 Mitglieder, von denen 15 für den Menschen beschrieben worden sind (Reddi 2003).

Fast alle BMPs besitzen eine Primärstruktur, die zu etwa 40% mit der von TGF- β übereinstimmt. Anhand der Homologie in der Aminosäuresequenz ist es möglich, drei BMP-Untergruppen abzugrenzen: BMP-2 (früher BMP-2A) und BMP-4 (früher BMP-2B) stimmen zu ungefähr 80% überein. BMP-5, BMP-6 und BMP-7 (auch osteogenic protein 1, *OP-1*) bilden eine Gruppe mit 78% Übereinstimmung, während BMP-3 sich deutlich von den anderen Mitgliedern der BMP-Familie unterscheidet und für sich alleine steht (Reddi, 2003). BMPs aktivieren über Transmembranrezeptoren mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität eine intrazelluläre Signalkaskade, die von Smad-Proteinen getragen wird. Die effektive Ligandenkonzentration kann durch extrazelluläre Antagonisten (Noggin, Dan u.a.), inhibitorische Rezeptoren (BAMBI) und inhibitorische Proteine des Zytoplasmas (Smurf1) moduliert werden.

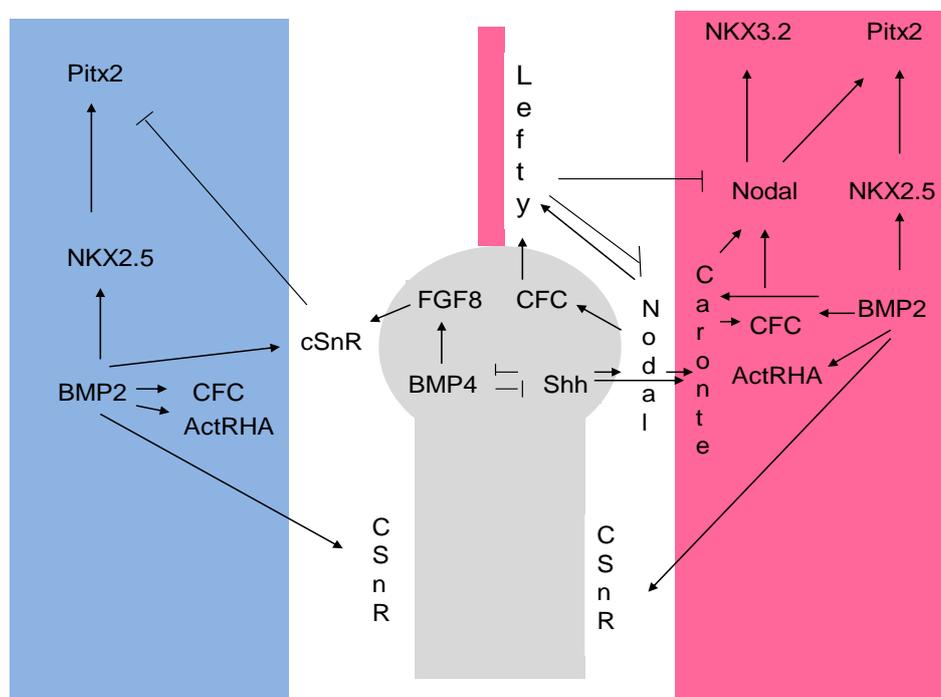


Abbildung 3: Interaktionen bei der Rechts-Links Ausrichtung (L-R) und dem

kardialen „looping“: Innerhalb des *Hensen-Knoten* (HN), bedingt durch entgegengesetzte Reaktionen von *Shh* und *BMP4*, findet die Bildung einer asymmetrischen Meldezentrale statt, was letztlich zur Lateralisation des *lateralen Mesoderms* (LMP) führt. In einem kleinen Areal, angrenzend an den linksgelegenen Bereich des HN, induziert *Shh Nodal*. *Nodal* etabliert die Expression von *Lefty* entlang der Mittellinie. Für diese Induktion ist der Co-Faktor *CFC* erforderlich. *Lefty* ist an der Expression von *Nodal* beteiligt und verhindert die Ausbreitung von linksseitigen Signalen auf die rechte Seite. *Nodal* durchquert, mit Hilfe von *Caronte*, das paraxiale und intermediale Mesoderm und erreicht das *LPM*, welches in der Lage ist, bedingt durch die Signalgebung von *CFC* und *ActRHA*, auf *Nodal* zu reagieren. *Nodal* wird im *LPM* hochreguliert und induziert die Expression von *Pitx2* und *NKx3.2*. Anschließend wird *Nodal* runterreguliert und die Expression von *Pitx2* wird von *NKx2.5* übernommen. *BMP2* wird zur Aufrechterhaltung der Expression von *CFC*, *ActRHA* und *NKx2.5* im *LPM* benötigt.

Auf der rechten Seite wird *FGF8* asymmetrisch im *NH* gebildet. Es reguliert die Expression von *cSnR* runter. Dieser Antagonist verhindert die Expression von *Pitx2* und somit, die Ausbreitung von linksseitigen Signalen auf die rechte Seite. Außerdem wird *cSnR* symmetrisch im paraxialen Mesoderm exprimiert.

Beide Expressionsbereiche benötigen die Signalgebung von *BMPs*. (entlehnt bei T. Brand, 2003).

1.3.3 Signalkaskade der BMPs

Die BMPs vermitteln ihre Signale über den Smad-Signaling-Pathway an den Zellkern. Es werden zwei verschiedene Typen unterschieden: der Typ-I-Rezeptor und der Typ-II-Rezeptor.

Bisher wurden fünf unterschiedliche Typ-II-Rezeptoren und sieben Typ-I-Rezeptoren beschrieben (Miyazono et al., 2000). Zu den Typ-II-Rezeptoren gehören der ActivinR Typ II und ActivinR Typ IIB (ActR-II und ActR-IIB), der TGF- β -Typ-II-Rezeptor (T β R-II), der MIS Typ-II-Rezeptor (MISR-II) und der BMP Typ-II-Rezeptor (BMPR-II). Die Typ-I-Rezeptoren werden als Activin

receptor-like kinases (ALKs) bezeichnet. Unter den Typ-I-Rezeptoren ALK-1 bis ALK-7 wurden bisher drei Rezeptoren als BMP-bindend beschrieben, nämlich ALK-2, ALK-3 (auch BMPRI-A genannt) und ALK 6 (auch BMPRI-B) (Koenig et al., 1994; ten Dijke, 1994).

Die BMPs können, im Gegensatz zu anderen Mitgliedern ihrer Superfamilie, an beide Rezeptoren auch alleine binden, eine hohe Affinität der Rezeptorinteraktion gibt es allerdings nur bei gleichzeitiger Bindung an beide Rezeptoren. Zur Aktivierung binden die BMP-Homodimere parallel sowohl an den Typ-II- als auch an den Typ-I-Rezeptor.

Nach der BMP-induzierten Bildung eines heteromeren Komplexes phosphoryliert die Rezeptorkinase des Typ-II-Rezeptors, der als konstitutiv aktiv postuliert wird, den Typ-I-Rezeptor in seiner GS-Domäne. Dabei handelt es sich um einen Bereich, der für die Typ-I-Signalübertragung von großer Bedeutung ist (Wrana et al., 1994; ten Dijke et al., 1996). Der somit aktivierte Typ-I-Rezeptor initiiert nun die intrazelluläre Signalübertragung durch die Phosphorylierung weiterer Signalmoleküle wie der Smads (Koenig et al., 1994).

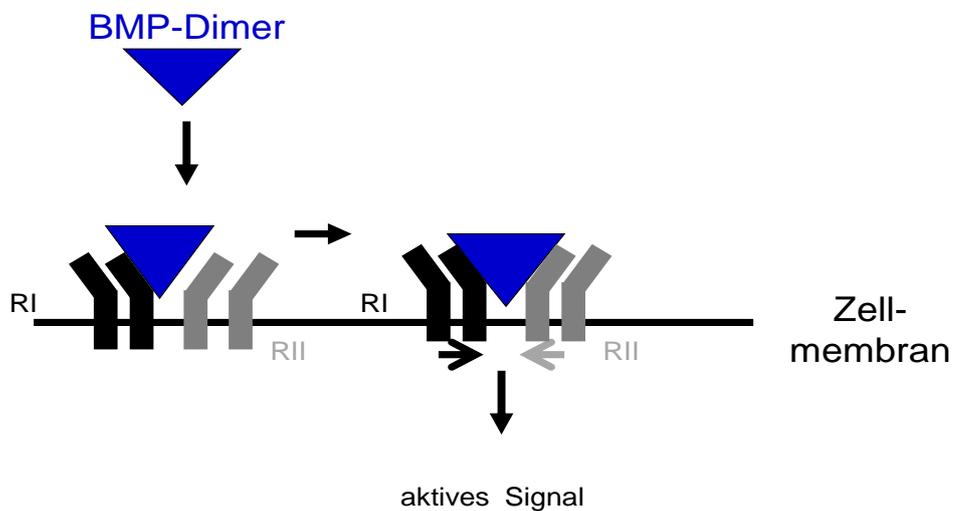


Abbildung 4: Schematische Darstellung des BMP Signalwegs: Nach Ligandenbindung an den Typ I Rezeptor, mit hoher Affinität, erfolgt die

Rekrutierung des niederaffin bindenden Typ II Rezeptor-Signalkomplexes. Intrazellulär aktiviert die aktive Kinas des Typ II Rezeptors den Typ I Rezeptor durch Transphosphorylierung (Müller et al, 2006).

1.3.4 Smads und deren Signaltransduktion

Anhand ihrer funktionellen Fähigkeiten werden drei unterschiedliche Gruppen von Smads unterschieden. Es gibt R-Smads (Rezeptorregulierte Smads), Co-Smads (common-mediator Smads) und I(inhibitory)-Smads. Die phosphorylierten R-Smads bilden Komplexe mit den Co-Smads, welche für den Transport in den Zellkern verantwortlich sind. Im Zellkern erkennen R-Smads und Co-Smads spezifische Sequenzen in den Promotoren ihrer Zielgene (Massagué, 1998). Auf diese Weise können sie die Transkription ihrer Zielgene regulieren. Die I-Smads, wie zum Beispiel Smad-6 und Smad-7, verhindern die Signaltransduktion. Einerseits konkurrieren sie mit den R-Smads um die Rezeptorbindung und verhindern so eine Phosphorylierung. Andererseits bildet *Smad-6* auch Komplexe mit Smad-1 und beeinflusst so seine weitere Wirkung. (Bai et al., 2000). Die Expression sowohl von *Smad-6* als auch von Smad-7 erhöht sich in Abhängigkeit von BMP, Activin und TGF- β , was ein negatives Feedback dieser Signalübertragungswege vermuten lässt (Nakao et al., 1997; Ishisaki et al., 1999).

1.3.5 BMP-Antagonisten

Bei den extrazellulären Antagonisten des BMP Signalweges handelt es sich um sezernierte Proteine, welche die BMPs mit hoher Affinität binden und dadurch die Aktivierung der Signalkaskade hemmen. Diese Proteine sind meist zwischen 170 und 250 Aminosäuren lang und hemmen die verschiedenen BMPs unterschiedlich stark. Ein gemeinsames Charakteristikum aller extrazellulären Inhibitoren stellt die Ausbildung eines Cysteinknotens (auch von-Willebrand Typ C Domäne genannt) dar, welcher die Faltung des Peptides bestimmt und die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Die große Vielfalt von

unterschiedlichen Effekten, die durch diesen Signaltransduktionsweg vermittelt werden kann, kommt zustande, weil das Signal sukzessive spezifiziert werden kann. Dieser Prozess findet auf drei Ebenen statt:

Als erster extrazellulärer Inhibitor der BMP-Wirkung wurde Noggin beschrieben. Noggin bindet mit hoher Affinität Komplexe mit BMPs und verhindert so die weitere Bindung von BMPs an ihre membranständigen Rezeptoren. Dies wurde zunächst für BMP-4 und später dann auch für BMP-2 gezeigt (Zimmermann et al., 1996; Massagué und Chen; 2000). Mit Chordin wurde ein weiterer direkter BMP-Antagonist gefunden. Die Dan-Familie, eine weitere Gruppe von BMP-Antagonisten, umfasst unter anderem Gremlin-1, Cerberus, Dan und Gremlin-2 (PRDC). Hierbei handelt es sich ebenfalls um sekretorische Proteine, die jedoch in ihrer Sequenz kaum Ähnlichkeiten mit Noggin und Chordin haben (Hsu et al., 1998). Da sie die BMPs jedoch über den gleichen Mechanismus inhibieren, wird angenommen, dass Strukturähnlichkeiten bestehen und beispielsweise alle Antagonisten dieselbe Bindungsstelle für das zu bindende BMP besitzen (Hsu et al., 1998).

Ein weiterer extrazellulärer, aber membrangebundener Inhibitor ist Bambi (BMP und Aktivin membran-gebundener Inhibitor). Der Pseudorezeptor ist ein Transmembran-Glycoprotein mit einer extrazellulären Domäne und ähnelt sehr stark dem Typ-I-Rezeptor, jedoch besitzt er selbst keine Kinaseaktivität. So kommt es nach der Bindung von BMPs zu keiner intrazellulären Signaltransduktion. BAMB1 bindet an die BMP Rezeptoren und verhindert dadurch die Ausbildung eines funktionellen BMP-Rezeptor-Komplexes. Die Expression von BAMB1 wird durch BMPs, TGF β und Wnt aktiviert (Gazzerro und Canalis 2006).

Auch im Zellkern selbst kann die Signalübertragung gehemmt werden. Der Übertragungsweg der Mitglieder der TGF- β -Familie wird aber nicht nur negativ reguliert, sondern es gibt auch unterschiedliche akzessorische Faktoren. Für TGF- β werden beispielsweise Betaglycan und Endoglin als Akzessoren beschrieben, die die Bindung an den TGF- β -Rezeptor verstärken (Massagué, 1998). Des Weiteren wird die Bindung zwischen DNA und intrazellulären

Signalproteinen von mehreren nukleären Kofaktoren reguliert, die die Bindung der Smads an die DNA verstärken. Sie sind sowohl signalwegspezifisch als auch genspezifisch und werden nur in bestimmten Zelltypen exprimiert. Sie selbst haben alle keine eigene intrinsische Aktivität und können so ihre Wirkung nur in Zusammenarbeit mit den Smads entfalten. Die Smad-Signalkaskade reguliert vor allem die Differenzierung von Zellen. Sie beginnt mit der Bindung von BMP an präformierte, transmembrane Rezeptordimere, die aus mindestens einem Typ I Rezeptor und einem Typ II Rezeptor bestehen. BMPs binden an diese Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität. Der Typ II Rezeptor aktiviert den Typ I Rezeptor durch Phosphorylierung, Aktivierte R-Smads dimerisieren mit Smad-4, einem unspezifischen Signalprotein, das auch in die Signaltransduktion von TGF- β eingebunden ist. Mit Hilfe von Koaktivatoren und Korepressoren modifiziert der Komplex Smad-4/R-Smad nach Translokation in den Nukleus die Transkription von Zielgenen (Ghosh-Choudhury et al 2000; Graham et al 1994).

1.3.6 Die Rolle von BMPs während der embryonalen Herzentwicklung

Die essentielle Rolle des Bmp-Signalweges in der Entwicklung des Herzmesoderms wurde bereits in Invertebraten und niederen Vertebraten beschrieben. Es hat sich gezeigt, dass aus dem dorsalen Ektoderm sezerniertes Decapentaplegic (Bmp2/4-Homolg), die Expression von tinman (Nkx2.5-Homolog) in angrenzenden Mesodermzellen aufrechterhalten kann, welche später zum dorsalen Herzschlauch fusionieren (Staehling-Hampton et al., 1994). In den Bmp2/4 homologen Mutanten ging hingegen die Expression von tinman verloren und es konnte kein Herzmesoderm gebildet werden (Spencer et al., 1982; Bodmer und Frasch, 1999). Außerdem konnte in in vivo- und ex vivo-Experimenten gezeigt werden, dass die ektopische Expression von Bmp-Rezeptoren oder Bmp2/4-Liganden die ektopische Nkx2.5-Expression induziert und anschließend schlagende Kardiomyozyten gebildet werden (Schultheiss et al., 1997; Shi et al., 2000). Andererseits

hemmte die ektopische Noggin-Expression *in vivo* die Differenzierung in Kardiomyozyten.

Um die Herzbildung ausschließlich im Bereich des anterioren Endoderms zu begünstigen, ist eine Zone mit hoher Bmp-Aktivität erforderlich. Für die Begrenzung des Herzfeldes werden Bmp2/4-Liganden aus dem anterioren Endoderm durch Noggin-Freisetzung aus dem Notochord gehemmt (Marvin et al., 2001; Schneider und Mercola, 2001; Tzahor und Lassar, 2001).

So sind konventionelle Nullmutanten entweder bereits zum Zeitpunkt der Bildung des mesodermalen Keimblattes (BmpRIa^{-/-}, BmpRII^{-/-}, ActRIa^{-/-}, Smad4^{-/-}) oder kurz nach der Bildung eines lineares Herzrohrrudiments embryonal letal (Bmp4^{-/-}, Bmp2^{-/-}) (van Wijk, B. et al., 2006). Andere Bmp-Nullmutanten entwickelten sich normal (Bmp5^{-/-}, Bmp6^{-/-}, Bmp7^{-/-}), zeigen jedoch in Kombination Defekte bei der epithelial-mesenchymalen Veränderung der Zellstruktur im atrioventrikulären Bereich (Bmp5^{-/-}Bmp7^{-/-}, Bmp6^{-/-}Bmp7^{-/-}) (Dudley und Robertson, 1997).

Mittels konditioneller Eliminierung von Bmp-Liganden oder -Rezeptoren nach Spezifizierung des Herzmesoderms konnten spät-embryonale Herzdefekte nachgewiesen werden, z.B. Defekte bei der epithelial-mesenchymalen Veränderung der Zellstruktur (EMT) im atrioventrikulären Übergangsbereich (Cushionbildung) und bei der korrekten Teilung der Ausflusstraktgefäße, was zumeist auf verminderte Proliferation zurückgeführt wurde (van Wijk et al., 2006; Gaussin et al., 2002; Liu et al., 2004; Stottmann et al., 2004; Ma et al., 2005; Park et al., 2006; Yang et al., 2006; Jia et al., 2007).

1.4. Gremlin-1

1.4.1 Expression, Proteinaufbau und Funktion

Erstmals wurde Gremlin-1 (Grem1) von Topol et al. 1997 beschrieben. Nachdem Fibroblasten der Ratte mit dem viralen Onkogen v-mos transformiert wurden, zeigte sich eine Abnahme im Expressionsniveau des Gremlinproteins.

Analog zu diesen Ergebnissen wurden Gen und Protein als „Drm“ („down-regulated in mos“) bezeichnet (Topol et al., 1997).

Heute hat sich vor allem der Name Gremlin bzw. Gremlin-1 (es gibt auch Gremlin-2) durchgesetzt. Gremlin wurde bisher nicht nur in der Ratte, sondern in vielen anderen Arten nachgewiesen.

Gremlin-1 ist ein 20,7- kd großes Protein. Es wird als ein 184 Aminosäuren langes Glykoprotein synthetisiert und gehört zur Cystein-Knot-Superfamilie. Gremlin-1 hat zwei Exons und verschiedene genetische Variationen in Form von „Single Nucleotide Polymorphismen“. Gremlin-1 ist ein relativ kleines globuläres Protein, das durch eine hochkonservierte Sequenz charakterisiert ist. Die Translation der Transkripte findet am rauen endoplasmatischen Retikulum, entsprechend dem sekretorischen Proteinbiosyntheseweg, statt. Die Aminosäuren 1-24 sind als Signalsequenz für die Andockung an das raue endoplasmatische Retikulum und die Einleitung des sekretorischen Proteinbiosyntheseweges von großer Bedeutung. Sie können in der posttranslationalen Modifikation abgespalten werden. Weitere posttranslationale Modifikationen sind Phosphorylierungen sowie die Glykosylierung einer kleineren Fraktion des Proteins (Flicek et al., 2011).

Weitere posttranslationale Modifikationen sind Phosphorylierungen sowie die Glykosylierung einer kleineren Fraktion des Proteins, wobei die funktionelle Bedeutung der Zucker bisher noch nicht eindeutig geklärt ist. Gremlin-1 lässt sich *in vitro* sowohl im Extrazellulärraum als auch nichtkovalent an der Zellmembran gebunden nachweisen (Topol et al., 2000; Wordinger et al., 2008).

Gremlin-1 spielt eine wichtige Rolle für verschiedenste Prozesse der Embryo- und Organogenese. So ist es an der Ausbildung der Neuralleiste (Hsu et al., 1998), der Atemwege und des Lungenkreislaufes (Costello et al., 2009), der Extremitäten und der Netzhaut (Wordinger et al., 2008), sowie bei der Aussprossung der Ureterknospe und damit bei der Ausbildung der Nieren (Michos et al., 2007) beteiligt. Zudem fördert Gremlin-1 die Angiogenese (Mitola

et al., 2010; Stabile et al., 2007) sowie die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen und die Migration von Monozyten.

Im Rahmen von Krankheitsprozessen wirkt Gremlin-1 an der Modellierung von Schmerzverarbeitungsprozessen im Rückenmark (Ohtori et al., 2002) sowie bei fibrotischen Veränderungen von Niere, Lunge, Leber und bei der Ausbildung von Arthrose mit (Wordinger et al., 2008). Nach Gefäßverletzungen wird Gremlin vermehrt exprimiert (Maciel et al., 2009).

Seine Bedeutung in der Onkologie wird gegensätzlich diskutiert (Namkoong et al., 2006). Die Ergebnisse einiger Autoren weisen auf eine supprimierende Wirkung in der Krebsentstehung hin (Topol et al., 1997; 2005; Chen et al., 2002). Andere Arbeiten zeigen, dass einige Tumoren Gremlin vermehrt exprimieren (Namkoong et al., 2006; Wang et al., 2012) und Gremlin die Proliferation von Krebszellen steigern kann (Stabile et al., 2007). Am genauesten ist die Beteiligung von Gremlin bei der diabetischen Nephropathie untersucht. Für die Behandlung dieser Erkrankung wird es als möglicher Ansatzpunkt diskutiert (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2009).

1.4.2 Die „Cystine- knot“- Struktur

Nahe dem C-Terminus besitzt Gremlin-1 eine Cystein- reiche Region, die zur Ausbildung einer hochstabilen Ringkonformation führt, die die Proteine der „Cystine- knot“- Superfamilie kennzeichnet.

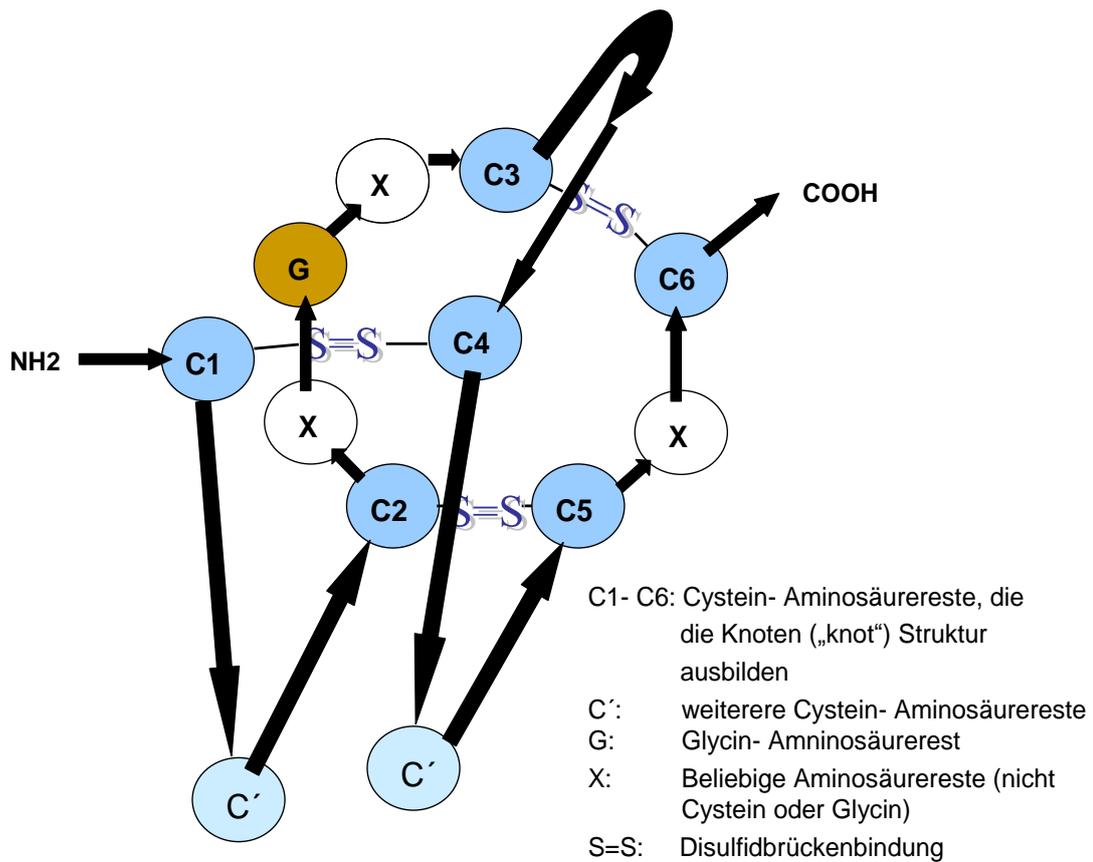


Abbildung 5: Aufbau der „Cystine- knot“- Struktur von Proteinen aus der CAN („Cerberus and DAN“- oder DAN- Familie: C1-C6 stellen Cystein- Aminosäurereste dar, die für die Knotenausbildung verantwortlich sind; C' beschreibt weitere Cystein- Aminosäurereste; mit G sind Glycin- Aminosäurereste beschrieben; X kennzeichnet eine beliebige Aminosäure, die nicht Cystein und Glycin ist; die Disulfidbrücken sind mit S=S beschrieben. (nach Stang, 2012).

Viele Mitglieder der „Cystine- knot“- Superfamilie haben eine maßgebende Rolle als Signalgeber im menschlichen Stoffwechsel inne, häufig im Rahmen der Embryogenese, der Angiogenese, des Zellwachstums und der Zellaktivierung. Als wichtige Vertreter seien der „Platelet Derived Growth Factor“ (PDGF), der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF), der „Tumor Necrosis Factor-alpha“ (TNF- α) und der „von-Willebrandt-Faktor“ (vWF)

genannt. Unter den Strukturproteinen lassen sich zum Beispiel die Muzine dieser Proteingruppe zuordnen.

Daneben gehören auch die BMP- Proteine sowie ihre Gegenspieler, die BMP-Antagonisten, zu der „Cystine- knot“ Superfamilie (Vitt et al., 2001).

Anhand der unterschiedlichen Anzahl und Anordnung der Cysteine und deren begleitende Aminosäuren lässt sich eine weiterführende Klassifikation der BMP-Antagonisten aufstellen.

Gremlin gehört zur *DAN*-Familie. Während deren Mitglieder 8 Cysteinaminosäuren innerhalb der „Cystine- knot“- Formation besitzen, von denen 6 an der Ausbildung der Ringstruktur beteiligt sind, besitzen die anderen bekannten *BMP*- Antagonisten Ringstrukturen mit 9 oder 10 Cysteinresten (Avsian-Kretchmer et al., 2004).

1.4.3 Wirkmechanismen

Neben schon länger bekannten Wirkungen auf den Signalweg der BMP-Proteine wurden in neuerer Zeit zunehmend BMP- unabhängige Mechanismen entdeckt, über die das Protein Gremlin-1 seine Wirkung entfaltet.

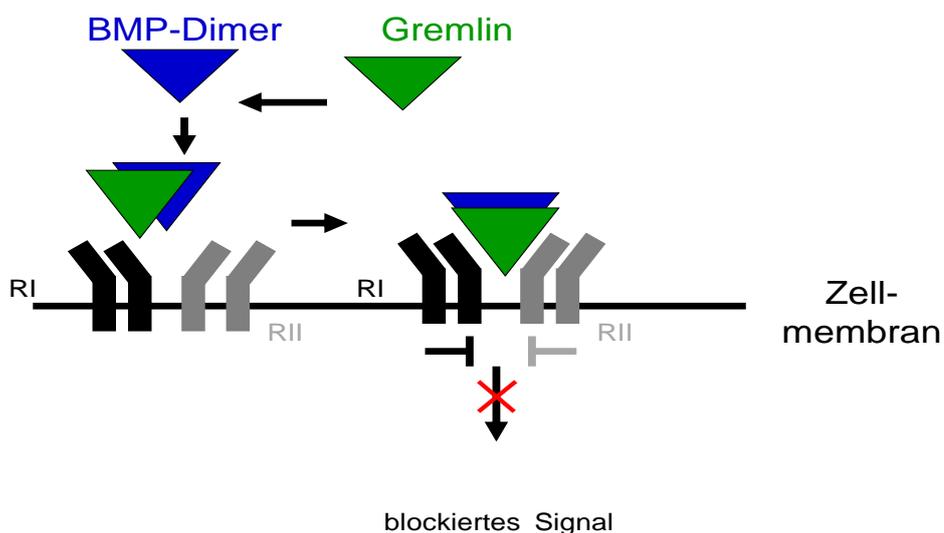


Abbildung 6: Darstellung des von Gremlin-1 blockierten BMP-Signalweges: Ohne den Einfluss von Gremlin-1 bindet das BMP-Dimer an den Serotonin-/Threonin- Rezeptor vom Typ 1 und 2 (R I und R II) und aktiviert den Smad-Signaling Pathway. Unter dem Einfluss von Gremlin-1 können BMPs nicht an die Rezeptoren binden und somit kommt es zu keiner Signalgebung (aus Müller et al, 2006).

Neben den regulatorischen Wirkungen auf die BMP-Signalwege ist in Versuchen mit Maus- Endothelzellen eine direkte Bindung von Gremlin-1 an ein Zellmembranprotein beschrieben worden, was zu einer Aktivierung von verschiedenen Motilitätsfaktoren (paxillin, FAK, ERK1\ 2) und der Phosphorylierung von fokalen Adhäsionskontakten führt. Durch diesen Mechanismus kommt es zu einer gesteigerten Angiogenese und Migration der Endothelzellen, interessanterweise in Synergismus mit BMP4 (Stabile et al., 2007).

Gremlin wurde 2010 als zusätzlicher Agonist an dem *VEGFR2*- Tyrosinkinase-Rezeptor beschrieben, der als wichtigster proangiogenetischer Rezeptor bekannt ist. Es führte *in vitro* und *in vivo* zu einer *VEGFR2*- abhängig gesteigerten Angiogenese (Mitola et al., 2010). Im Jahr 2011 entdeckte Chiodelli, dass Heparansulfat- Proteoglykane auf Endothelzellen als Corezeptoren bei der Bindung und Aktivierung des *VEGFR2*- Rezeptors involviert sind (Chiodelli et al., 2011).

Als weiterer Wirkmechanismus wurde die Interaktion von Gremlin-1 mit den Proteinen Slit1 und Slit2 beschrieben, die als negative Regulatoren von Chemotaxievorgängen bekannt sind. Die Wirkung von Slit2 auf humane Monozyten konnte mit Gremlin-1 um bis zu 100% verstärkt werden. Sofern sich Gremlin mit den Monozyten zusammen in der oberen Kammer der „Boyden Chamber“ (Boyden, 1962) befand, konnte eine hemmende Wirkung auch dann nachgewiesen werden, wenn keine „Slits“ zugegeben wurden. Wurde Gremlin-1 zusammen mit dem „chemoattractant“ (SDF1a oder fMLP) in die untere Kammer gegeben, zeigte sich dieser Effekt allerdings nicht. Demzufolge scheint Gremlin sowohl mit zugegebenen als auch mit endogen in den Monozyten

gebildeten Slits interagieren zu können und eine direkte Hemmung der eingesetzten Chemokine ausgeschlossen zu sein. Möglicherweise erklärt diese Arbeit auch die Rolle der Glykosylierung von Gremlin-1 an Position 42: Die Glykosylierung selber oder der umgebende Aminosäurebereich ist entsprechend der Versuchsergebnisse für die Bindung zwischen den Slit-Proteinen und Gremlin-1 verantwortlich (Chen et al., 2004)

Wie bereits erwähnt greift Gremlin-1 auch in den Tumorstoffwechsel ein. In diesem Zusammenhang interagiert es mit dem YWHAH- Protein.0.

Außerdem führt Gremlin-1 zu einer p53- unabhängigen Induktion des Tumorsuppressorgens p21 (Chen et al., 2002).

1.4.4 Gremlin-2 in der kardialen Entwicklung im Zebrafischembryo

Pulmonale Venen und das pulmonale Myokard entwickeln sich aus dem pharyngealen Mesoderm, ein Prozess, der Pitx2-abhängig ist (Liu et al., 2002; Mommersteeg et al., 2007). Während der Entwicklung ist die Pitx-2-Expression durch den BMP-Signalweg reguliert. Gremlin-2, in seiner Eigenschaft als BMP-Antagonist, wird ebenfalls im pharyngealen Mesoderm (Müller et al., 2006), ähnlich wie Pitx-2, exprimiert (Furtado et al. 2008; Monteiro et al., 2008; Schlange et al., 2002). Dies legt nahe, dass auch Gremlin-2 den BMP-Signalweg beeinflussen kann. Des Weiteren ist während der embryonalen Entwicklung im Zebrafisch Gremlin-2 für die ordnungsgemäße Expression von Pitx-2, sowie für die kardiale Lateralisation und die Vorhofdifferenzierung erforderlich.

Eine Gremlin-2-Überexpression steigert die Kardiomyozytendifferenzierung und proliferation im Vorhof.

Während der Herzentwicklung entsteht in Gremlin-2-überexprimierten Zebrafischembryonen nicht nur ein Herz am üblichen Ort, sondern es kommt zur Bildung ektooper herzähnlicher Bereiche, die aus atrialen Kardiomyozyten bestehen und sich autonom rhythmisch kontrahieren. Diese ektope Herz-Areale entstehen entlang des LPM.

Die Tatsache, dass Gremlin-2 vor allem die Differenzierung des Atriums fördert, während die des Ventrikels nicht tangiert oder sogar gehemmt wird, kann durch die Marker *amhc* (Vorhof) und *vmhc* (Ventrikel) nachgewiesen werden (Müller et al, 2012).

1.4.5 Gremlin-2 und seine Assoziation mit Vorhofflimmern

Jüngste Studien haben gezeigt, dass Varianten und Mutationen im Genom zu einer Anfälligkeit für Vorhofflimmern beitragen. Gezielte Experimente zeigen Mutationen auf Genen, die für Ionenkanäle, Gap Junctions und spezielle Signalmoleküle kodieren. Bei vielen Fällen von Vorhofflimmern kommt es zur Initiation von elektrischen Signalen in ektopischen Vorhofregionen, häufig in unmittelbarer Nähe zu pulmonal-venösen Muskelsträngen (Haissaguerre et al., 1998; Levin et al., 2009).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass bestimmte erbliche Formen von Vorhofflimmern durch eine fehlerhafte Funktion von Gremlin-2 bedingt sind. (Müller et al, 2012).

Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass *Pitx2* das Auftreten von Vorhofflimmern beeinflusst. Selbst eine kleine Veränderung der *Pitx2*-Expression kann schon zu einer vermehrten Anfälligkeit des Herzens für Arrhythmien führen (Kirchhof et al., 2011). Da die Expression von *Pitx2* durch *Grem2* mitreguliert wird, beeinflusst *Grem2* auch über die Regulation der Expression von *Pitx2* das Auftreten von Vorhofflimmern.

2. Material

2.1 Geräte

Autoklav	Systemec
AxioSkop 2 plus	Zeiss
Axiocam MRC	Zeiss
Analysenwaage	Kern
Binokular MZ 125	Leica
Brutschrank Bakterieninkubator	Heraeus
DCD Kamera DC 500	Leica
Feinwaage CP 124 S	Sartorius
Gefrierschränke Premium	Bosch
Gelelektrophoresekammern mittel	PeqLab, Biometra
Injektionsapparatur Femtojet	Eppendorf
Kapillarenzieher PC-10	Narishige
Konfokalmikroskop	Leica
Kühlschränke	Liebherr, Bosch
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Magnetrührer	Omnilab
Mikrowelle	Bosch
Multipipetten, elektrisch, Kainin 250, 1000	Eppendorf
Multipipette plus	Eppendorf Material
P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller	Sutter Instruments
Pasteurpipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL	Neolab
pH-Meter 2001 C	Schwarz
Schüttler Duomax	Heidolph
Strahlenphotometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Thermocycler T3	Biometra
Vortex-Hochgeschwindigkeitsmischer	Werner
	Hassa GmbH
Waagen	Eppendorf

Wasserbad Isotemp 2

Fischer

Lifesciences

Zentrifugen

Eppendorf

2.2 Software

Excel Microsoft

Powerpoint Microsoft

Photoshop Adobe

Premiere Adobe

Word Microsoft

Axiovision (Zeiss)

2.3 Datenbanken

Ensemble

www.sanger.ac.uk

Pubmed

www.ncbi.nlm.nih.gov

2.4 Gebrauchsmaterialien

Drigalski-Spatel/Glasstäbe

Neolab

Duranglasgefäße

Schott

Mehrkanalpipetten 0,5-10 µL, 2,5-25 µL, 25-250 L

Brand

Mikropinzetten, Gr. 1; 55

Neolab

Mikropipetten 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL

Eppendorf

Objekträger

Neolab

Pipettierhilfe acu-jet

Brand

2.5 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie

Toppits

Deckgläschen

Neolab

Dünnschichtchromatographieplatten (PEI Zellulose)	Merck
Frischhaltefolie	Toppits
Glaskapillaren, dünn, 1,0 mm	World Precision Istruments
Glasplatten, 6 mm	Glas Hlawatsch
Klebefolien für Mikrotiterplatten	Qiagen
Objektträger	Menzel Neolab
Pasteurpipetten Plastik	Neolab
Pasteurpipetten Glas	Fischer
PCR-Platten, x wells	Lifesciences
Petrischalen	Steinbrenner
Pipettenspitzen	Greiner bio-one
Plastikfiltratflaschen 100 mL, 250 mL, 1 L	Starlab GmbH
Plastikpipetten (5 ml, 25 ml)	Nunc Nalgene
Puderfreie Nitrilhandschuhe	Sarstedt
Reaktionsgefäße 0,2 mL, 1,5 mL, 2 mL	Semper Med
Skalpelle, Einweg	Eppendorf
Sterilfilter FP30/0,2 CA-S	Gebr. Martin GmbH
	Schleicher & Schuell

2.6 Chemikalien

Aceton, p.A.	AppliChem
Acrylamid	Bayer
Agar	Bayer
Agarose	Invitrogen
Ammoniumpersulfat	Sigma
Borsäure	Bayer
Bromphenolblau	Sigma
BSA (bovine serum albumine)	Sigma
Calciumchlorid	Sigma

Chloroform	Sigma
ddH ₂ O	Bayer
DEPC H ₂ O	Bayer
dNTP	Quiagen
DTT	Invitrogen
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth
Entellan	Merck
Ethanol, p.A.	AppliChem
Ethidiumbromid	Sigma
Formamid	Invitrogen
Glycerol	Sigma
Heparin	Invitrogen
Isopropanol	Sigma
LB-Medium	Bayer
Methanol	Merck
Methylcellulose	Fluka
Methylenblau	Sigma
NBT/BCIP Stock Lösung	Roche
NTMT-Puffer	Invitrogen
Paraformaldehyd	Fluka
PFA	Roche
Phenylthiocarbamid (Phenythiourea, PTU)	Sigma
Proteinase Inhibitor Cocktail	Sigma
Salzsäure, konzentriert (HCl)	Sigma
SOC-Medium	Invitrogen
Trizol	Invitrogen
Tween -20	Roth
Wasserstoffperoxid, 30% (w/v)	Merck
Xylencyanol	Sigma

2.7 Immunologische Materialien

2.7.1 Mediensupplemente/ Antibiotika

Ampicillin	Sigma
(Amp 50 mg/l + 50 mg/ml H ₂ O, Steril filtriert und bei -20°C gelagert.)	
Kanamycin	Sigma

2.7.2 Antikörper und Farbstoffe

Methylenblau	Sigma
Digoxigenin-Labeling-Mix	Roche
Fluorescein-Labeling-Mix	Roche
Anti-Digoxigenin, alkal. Phosphatase-gekoppelt	Roche
Anti-Fluorescein Fab-Fragment (Roche1:4000)	Roche

2.7.3 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> One Shot TOP10	Invitrogen
--	------------

2.8 Molekularbiologische Materialien

2.8.1 Primer

2.8.1.1 Primer zur Amplifizierung von zGrem-1

5'- CCA-CTA-TTA-AAC-TGA-GGA-TGA-CTA-AAG-ACG-C-3'
3'-CAA-GTC-GAC-AGA-AGT-GCA-GCG-GCA-CTG-5'

2.8.1.2 Primer zur Klonierung von zGrem-1 in pBluescript

BamHI: 5'-CG/GGA-TCC-ATG-ACT-AAA-GAC-GCA-TTA-GC-3'
EcoRI: 3'-CG/GAA-TTC-TTA-ATC-CAA-GTC-GAC-AGA-AGT-G-5'

2.8.1.3 Primer zur Ligation

SP6-pCS2+: 5'-CCC-AAG-CTT-GAT-TTA-GGT-GAC-3'

T7-pCS2+: 5'-CTA-CGT-AAT-ACG-ACT-CAC-TAT-AG-3'

2.8.2 Morpholinos (MO) (antisense-Oligonukleotide) (Gene-Tools)

Es wurden zwei Morpholinos, eines gegen das Startcodon und ein zweites gegen die Splicing Site gerichtet, verwendet. Die Morpholino Antisense Oligonukleotide (Morpholinos) wurden lyophilisiert von der Firma Gene Tools, LLC, Philomath, OR, USA bezogen. Die Aufnahme des Lyophilisats erfolgt in 300 µl autoklaviertem H₂O (c= 8,4ng/ml). Direkt nach der Aufnahme in H₂O wird das Morpholino aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor der Mikroinjektion wurde das Morpholino für diese Arbeit mit H₂O auf die unten beschriebenen Konzentrationen verdünnt.

2.8.3 Hybridisationssonden kardialer Markergene

Nkx2.5, cmlc2, amhc, vmhc wurden kloniert in pBluescript von Deborah Yelon, UC San Diego, USA, bezogen. Lefty2 and pitx2 wurden von Didier Y. R. Stainier, Cardiovascular Research Institute, San Francisco, USA kloniert in pBluescript bezogen.

2.9 Molekularbiologische Verbrauchsmaterialien

DNase I	Boehringer Mannheim
DNase I (Rnase frei)	Roche
dNTP Mix 25 mM	Roche
First Strant Reaction Buffer	Invitrogen
G50-Sepherase	Amersham
High-fidelity DNA Polymerase	Stratagene
Ligase-Puffer	Roche

Protease	Sigma
Proteinase 20 mg/ml	Roche
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
reverse Transkriptase	Invitrogen
RNase	Amersham
RNase-Inhibitor RNA-guard	Amersham
RNA-Polymerase	Roche
Sp6-Polymerase	Roche
T ₄ -Ligase	Roche
T ₃ + T ₆ – Polymerase	Roche
Taq-Polymerase	Qiagen
Transkriptionpuffer	Roche
Trifast-Gold	Invitrogen

2.10 Plasmide

pCS ₂₊ Expressionsvektor	AG Rottbauer
pBluescript SK II (+)	Invitrogen

2.11 Kits

Reverse Transkriptase	Promega
QIAfilter Kit	Qiagen
QIAprep Kit	Qiagen
Gel Extraction Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
mMessage mMachine Kit	Ambion
RNeasy Kit	Qiagen
RNeasy RNA Purification Kit	Qiagen

2.12 Puffer und Lösungen

5x SDS-PAGE Elektrophorese-Puffer:	0.125 M Tris, 1.25 M Glycin, 0.5 % SDS (v/v)
10xTBS	100 mM Tris/HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl
TBST-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.1 % (v/v) Tween-20
X% iges Agarose Gel	X g Agarose, 100 ml TAE (1x), 0.2 µg/ml Ethidiumbromid
10 × Ladepuffer	50 % Glycerin, 100 mM EDTA pH 8,0, 1 % SDS, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol
Blocking-Puffer 1	5 % Schafserum, 0,2 % BSA in PBT
Blocking-Puffer 2	10 % FCS in PBDT
Blocking-Puffer 3	1,5 % FCS in PBDT
Hybridisierungspuffer	50 % Formamid, 25 % 20x SSC, 5 mg/m L torula RNA, 50 µg/mL Heparin,0,1 % Tween 20
Ladepuffer (Agarose)	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerol
PBDT, 100 ml	10 ml 10x PBS, 1 ml DMSO, 100 µL Tween 20, PBS, 2 L: 16 g NaCl, 0,4 g

	KCl, 2,88 g Na ₂ HPO ₄ , 0,48 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBSBT, 1 L	100 mL 10x PBS, 1 mL Tween 20, 2 g BSA
PBT	1 x PBS, 0,1 % Tween 20
Proteinase K-Lösung 10 mg/ml	1 mL 10 % Sarcosyl, 9 mL 0,5 M EDTA pH 8, 10 mg Proteinase K
SSC 20x, 1 L	175,3 g NaCl, 88,2 g Na-Citrat, pH 7,0
TBE, 10x, 1 L	121,1 g Tris, 3,72 g EDTA, 51,53 g Borsäure, pH 8

2.13 Feste Nährböden für Bakterien

Herstellung fester Nährböden wird LB-Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5% (w/v) Bacto Agar ergänzt. Für die Selektion auf Antibiotika-Resistenzen wird das agarhaltige Medium nach dem Autoklavieren auf 60°C abgekühlt, erst dann kann der gewünschte Medienzusatz hinzugefügt werden. Der pH-Wert war mit NaOH 5M auf 7,5 eingestellt, die Konzentration an Ampicillin bzw. Kanamycin betrug 25µg/ml. Waren in dem Gemisch keine Schlieren mehr zu sehen, wurden nach kurzer Abkühlzeit je 10ml der Flüssigkeit auf eine sterile Petrischale von 100mm Durchmesser aufgebracht. Die Platten wurden mit einem Deckel versehen, umgedreht und in Alufolie verpackt. Die so hergestellten Platten können bei 4°C 4-8 Wochen gelagert werden.

2.14 Fischlinien

Die verwendeten Zebrafische sind vom Stamm *Danio rerio*. Diese Fischart gehört zur Familie der Cyprinidae, Ordnung Cypriniformes. Es handelt sich um eine Wild-Typ Linie (AB) und eine Transgene Linie Tz[cmlc2:egfp] aus der Fischzucht des Max Planck-Instituts in Tübingen und der TU Dresden (zur Verfügung gestellt von Dr. Chr. Antos).

3. Methoden

3.1 RNA-Isolation aus Zebrafischen

Für die RNA-Isolation werden ca. 50-100 Zebrafischembryonen benötigt, die nach Entfernung des Mediums in flüssigem N₂ schockgefroren und bei –80°C bis zur Verwendung gelagert werden. Nach Zugabe von 1mL Trifast-Gold (PeqLab) werden die Embryonen mit dem Polytron homogenisiert. Danach werden 200µL Chloroform zugegeben und die Phasen für 15s kräftig vermischt. Die Mischung wird für 2-3 min bei RT inkubiert und dann für 15min in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die farblose wässrige Phase wird vorsichtig in ein frisches Gefäß überführt und mit 500µL Isopropanol vermischt. Der Ansatz wird für 10min bei RT inkubiert und anschließend bei 13.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit 1mL 75 % Ethanol gewaschen. Das Sediment wird für 20min getrocknet. in 50µL ddH₂O aufgenommen und 5min bei 50°C gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung der RNA wird diese bei –80°C gelagert.

3.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Gele aus 1-2 % Agarose in TBE hergestellt. Die DNA wurde mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt, in die Taschen des Gels eingebracht und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 0,5x TBE und mit 5V/cm in einer Elektrophoresekammer (von Peqlab) mit Hilfe einer Spannungsquelle (Biometra). Durch die Anregung des Ethidiumbromids mit UV-Licht ($\lambda=254$ nm) konnte das Bandenmuster detektiert werden. Eine 100 bp oder 1 kb DNA-Leiter diente dabei als Größenstandard (Gibco BRL).

3.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA Synthese wurden ca. 300ng RNA eingesetzt. Es wurde folgender Reaktionsansatz pipetiert:

- RNA (ca 300ng) x μ l
- Primer (50-250ng) 1 μ l
- DEPC-H₂O ad 12 μ l (für die negativ Kontrollreaktion (–RT) ad 13 μ l)

Der Ansatz wurde mit Hilfe eines Vortexers gut gemischt und bei +72°C für 10min inkubiert (Denaturierung):

Zugabe von:

- 4 μ l 5x *First Strand Reaction Buffer* (Invitrogen)
- 2 μ l DTT (Invitrogen)
- 1 μ l 10 μ M dNTPs (Roche)

Der Ansatz wurde erneut gut gemischt mit Hilfe eines Vortexers und, bei 42°C für 2min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 μ l (200U) Reverse Transkriptase (SuperscriptII; Invitrogen). Der Ansatz wurde für 1h bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung des Enzyms bei 72°C für 15min. Für die RT-PCR Reaktion wurde 1 μ l cDNA eingesetzt.

3.4 Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die RNA von DNA-Restbeständen zu befreien, erfolgte zunächst ein DNase-Verdau. Dafür wurde die DNase im Volumenverhältnis 1:9 zur RNA dazugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 10 min bei 75 °C inaktiviert.

Mittels RT-PCR („Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction“) wurde die RNA in c-DNA (kopierte Desoxyribonukleinsäure) umgeschrieben und vervielfältigt. Es wurde das „ImProm-II Reverse Transcription System“ von Promega verwendet.

Je RNA-Ansatz wurde ein Pipettiergefäß mit 4,0 μ l 5x Reaktionspuffer, 2,5 μ l MgCl₂ (ca. 5 mM), 1,0 μ l Nukleotidmischung, 0,5 μ l Ribonuklease Inhibitor und 1,0 μ l Reverser Transkriptase befüllt. Zu den beiden Ansätzen wurden je 11 μ l einer kombinierten Lösung aus isolierter RNA und den Primern zugegeben.

Während der 5 minütigen Inkubation im Heizblock bei 25 °C lagerten sich die Primer an die RNA („Annealing“) an. Dann wurde die Temperatur 60 min auf 42 °C erhöht, was zur Anknüpfung der Nukleotide an die Primer führte („Extend“). Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch 15 min Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Es folgte die Vervielfältigung der für zGremlin-1 kodierenden cDNA- Sequenzen in der Polymerase- Kettenreaktion. In ein 1,5 ml Sammelgefäß wurden 56,8 µl Nuklease- freies Wasser, 8,0 µl 10x thermophiler Polymerase- Reaktionspuffer, 3,2 µl MgCl₂, 1,0 µl PCR Nukleotid- Mix, 1,0 µl Taq DNA- Polymerase und 20 µl des Reversen Transkriptionsproduktes in genannter Reihenfolge gegeben. Zur Denaturierung wurde der Ansatz 2 min bei 94 °C inkubiert. Anschließend folgten 25 Zyklen mit jeweiliger Denaturierung (94 °C für 1 min), Primeranlagerung (60 °C für 1 min) und DNA- Verlängerung (72 °C für 2 min). Nach dem letzten Zyklus, bei dem die Extension für 5 min durchgeführt wurde, wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Anhand der Extinktion wird die Konzentration der DNA mit einem Spektralphotometer bestimmt. Es wird eine Quarzküvette mit 1cm Schichtdicke verwendet. Nach Eichung des Photometers mit H₂O wird die in H₂O gelöste DNA bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm 47,5µg/ml doppelsträngiger DNA, 40µg/ml einzelsträngiger DNA/RNA und etwa 30µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide. Das Verhältnis zwischen den Extinktionen bei 260 und 280nm gibt Aufschluss über mögliche Verunreinigungen mit Proteinen, wobei die Zielwerte zwischen 1,5 und 2 liegen sollten.

3.5 Klonierung von zGremlin-1 in pBluescript und pCS₂₊

3.5.1 Linearisierung des Plasmids

Hierzu wurden ca. 5µg der Plasmid-DNA in einem Restriktionsverdau eingesetzt. Das jeweilige Restriktionsenzym ergibt sich durch den vorliegenden Expressionsvektor und die zur Klonierung von Grem1 eingesetzten Restriktionsschnittstellen. Es wurde folgender Ansatz in ein Reaktionsgefäß pipetiert:

- 5µg Plasmid-DNA
- 1µl Restriktionsenzym
- 2µl 10x Reaktionspuffer
- ad 20µl bidest. H₂O

Der Ansatz wurde 2h bei 37°C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die linearisierte DNA gefällt, zentrifugiert und das Pellet in 20 µl Wasser gelöst. Zur Kontrolle der vollständigen Linearisierung des Expressionsplasmids wurde ein 1µl Aliquot des aufgereinigten Restriktionsenzymverdau auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und das Auftreten einer entsprechenden Bande der richtigen Größe überprüft.

3.5.2 Verdauung von Plasmid und RT-PCR Produkt

Der Restriktionsverdau von DNA mit der jeweiligen Restriktionsendonuklease (New England Biolabs) erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.5.3 Ligation des PCR-Produktes mit dem linearisierten Vector

Durch T4-DNA Ligase wird die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'OHGruppe und 5'Phosphatgruppe katalysiert.

Vektoren und das gewünschte DNA-Fragment werden mit entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt und dann in der Ligrationsreaktion eingesetzt.

Es wird folgender Reaktionsansatz pipetiert:

- 1mol Vektor

- 3-5 mol DNA-Fragment
- 1µl 10x Ligasepuffer
- ad 10µl H₂O

Diese Reaktion wurde für 5min bei RT bis über Nacht bei 14°C inkubiert. 1-5µl des Reaktionsansatzes wurden zur Transformation von chemokompetenten *E.coli* eingesetzt.

3.5.4 Transformation von kompetenten Bakterien mit dem Gremlin-1 enthaltenden Vektor

Durch einen kurzen Hitzeschock ist es möglich, in chemokompetente Bakterien DNA mit einem Plasmid einzuführen. Es wurden One Shot®TOP10 Competent Cells (Invitrogen) verwendet. Ein Aliquot (50µl) der kompetenten Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Es folgte die Zugabe von 1-5µl eines 10µl Ligationsansatzes. Durch Schnipsen gegen das Reaktionsgefäß wurden die Bakterien vorsichtig gemischt und anschließend für 20min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Hitzeschock für 1min bei 42°C. Es wurden sofort 800µl LB-Medium zugegeben. Durch Invertieren wurde der Ansatz vorsichtig gemischt. Es folgte eine Inkubation für 30min bei 37°C im Heizblock. Es wurden nun 100µl-200µl der Bakteriensuspension auf Selektionsagarplatten (LB/Amp) ausplattiert.

.

3.5.5 Kolonien-PCR

Um sehr schnell zu überprüfen, ob eine Bakterienkolonie das gewünschte Insert trägt, kann eine Kolonie-PCR durchgeführt werden. Es wird ein Standard-PCR Mix pipetiert, anstelle der DNA-Matrize wird mit einer weißen (10µl) Spitze eine Kolonie abgestreift und in den PCR-Mix überführt.

3.5.6 Klonselektion

Zur Klonselektion wird je Kolonie ein Bakterienröhrchen mit 5ml LB Medium befüllt und eine Bakterien-Kolonie darin über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Das weitere Verfahren (Mini-Prep) wird mit dem QIA prep-Kit (Quiagen) durchgeführt. Es wird nach Herstellerangaben verfahren (www.qiagen.com).

3.5.7. Plasmidisolation mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit

Zur Isolation von Plasmiden aus 50ml über Nacht Kulturen wird das Qiagen Plasmid-Midi Kit verwendet. Es wird nach Herstellerangaben verfahren (www.qiagen.com).

3.5.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG, Ebersberg bei München, durchgeführt.

3.6 Fischzucht und Verpaarung

Die Fischzucht erfolgte analog zu den Anweisungen in: „THE ZEBRAFISH BOOK- A guide for the laboratory use of zebrafish Danio* (Brachydanio) rerio“ (Monte Westerfield, Institute of Neuroscience, University of Oregon).

Zur Verpaarung wurden die Fische am Nachmittag zuvor in Verpaarungstanks überführt, in denen Männchen und Weibchen durch ein Sieb vom Boden getrennt und durch ein weiteres Sieb voneinander separiert sind.

Am nächsten Vormittag (zwischen 8h-10h) wurden die Barrieren zwischen den Fischen entfernt, jedoch nicht das Sieb über dem Boden. Circa 30 Minuten nach dem Legen können die befruchteten Eier in Fischwasser gesammelt werden. Die Embryonen wurden bei 28,5 °C in klares Ei-Wasser (ohne das fungizid und bakterizid wirkende Methylenblau) überführt und in einem Brutschrank bei 28,5 °C inkubiert. Zur Unterdrückung der Pigmentbildung zu

Dokumentationszwecken wurde dem Fischwasser 100x PTU (Phenylthioharnstoff, 1:100 verdünnt) zugegeben.

3.7 Analysen der Herzentwicklung im lebenden Embryo

3.7.1 „Loss of Function“-Experimente (Gremlin-1 “knock-down”)

Der Zebrafisch bietet als Modell den Vorteil, dass die Translation von Genen mittels Morpholino - Injektion in die Zygote durch Blockierung der Bindung der mRNA an das Ribosom verhindert werden kann, so dass ein „knock down“ des entsprechenden Gens funktionell entsteht.

3.7.1.1 Eingesetzte Morpholino Antisense Oligonukleotide

Die verwendeten Morpholino waren zum einen gegen das Startcodon und ein zum anderen gegen die Splicing Site gerichtet. Beide wurden von Gene Tools entworfen.

3.7.1.2 Mikroinjektion zum “knock down” von Gremlin im Embryo

Zur Vorbereitung der Mikroinjektion wurden aus 3 %iger Agarose in Fischwasser Injektionsrampen hergestellt, wozu eine Plastikmatrize auf der erstarrende Agarose in einer Petrischale plaziert wurde. Die Injektionsnadeln wurden mit einem „P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller“ der Firma Sutter Instruments, USA, hergestellt. Hierzu wurden Glaskapillaren (Außendurchmesser: 1mm) im Gerät eingespannt. Die Kapillare wurde erhitzt und durch schnelles Auseinanderziehen eine sehr dünne Spitze an der Glasnadel produziert. Diese muss vor dem Injizieren noch abgebrochen werden, wodurch man eine sehr feine Injektionsnadel erhält, welche den Embryonen bei der Injektion nur eine geringfügige mechanische Verletzung zufügt.

Die Embryonen wurden in den Injektionsrampen aufgereiht und im 1-4-Zellstadium mit Hilfe eines Femtojet (Eppendorf, Deutschland) injiziert. Die typischen Injektionseinstellungen lauteten wie folgt: Injektionsdruck 400 hPa, Injektionsdauer 0,1 s, Kapillardruck 3 hPa. Je nach Öffnung der Injektionsnadel konnten diese Angaben aber variieren.

Die Injektion erfolgte in der vorliegenden Arbeit in den Dottersack, wobei das injizierte Volumen maximal 1/8 des Dottersackvolumens betragen darf. In der vorliegenden Arbeit wurde 1 nl injiziert. Die injizierten Eier wurden in eine mit Eiwasser gefüllte Petrischale übertragen und 6 h bei 28,5 °C inkubiert. Danach wurden die nicht fertilisierten Eier und die abgestorbenen Embryonen weggesammelt, die Übrigen mit Eiwasser und 1xPTU über Nacht bzw. so lange bei 28,5 °C inkubiert, bis sie das entsprechende Stadium erreicht hatten.

3.7.1.3 Fixierung der Zebrafischembryonen

Die Embryonen wurden nach dem Erreichen ihres gewünschten Entwicklungsstadiums in 1%igem PFA fixiert. Danach werden die Embryonen in aufsteigender Methanolreihe (25 % MeOH/75 % PBT; 50% MeOH/50 % PBT; 75 % MeOH/25 % PBT) Dehydrierung und je Gelege bei – 20°C gelagert.

3.7.1.4 Versuchspläne

Zur Durchführung der geplanten Versuche wurden Embryonen im 2 bis 4 Zell-Stadium mit Morpholino Antisense Oligonukleotiden, gerichtet entweder gegen das Startcodon oder gegen die Prozessierungsstelle der mRNA, injiziert. Pro Versuchsansatz wurden mindestens drei Gelege von jeweils mindestens 100 Embryos injiziert und anschließend analysiert. Als Kontrollen dienten jeweils mindestens 30 nicht-injizierte Wildtyp-Geschwister aus demselben Gelege. Nach Injektion wurden die nicht fertilisierten Eier aussortiert und tote Embryos 6 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion entfernt. Der Prozentsatz der nicht fertilisierten Eier und der verstorbenen Embryos innerhalb von 24 Stunden nach Injektion wurde genau dokumentiert. Bei mehr als 25 % nicht befruchteter Eier

oder verstorbener Embryos wurde das entsprechende Gelege nicht für die weiteren Auswertungen herangezogen.

3.7.2 "Gain of function"-Experimente

3.7.2.1 Linerarisierung des Gremlin-1 enthaltenden pCS₂+-Vektors

Dieses Verfahren ist unter 3.4.1 beschrieben

3.7.2.2 Synthese der capped mRNA

Zur *in vitro* Transkription von mRNA zur Mikroinjektion wurde das mMESSAGE mMACHINE Kit von Ambion verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

Das Plasmid pCS₂+ dient als Vektor für die *in vitro* Transkription von mRNA.

3.7.2.3 Mikroinjektion zur Gremlin-1-Überexpression

Die Mikroinjektion wurde analog zu der bei den „loss-of-function“-Experimenten (siehe 3.6.1.2.) durchgeführt.

3.7.2.4 Versuchspläne

Zur Durchführung der geplanten Versuche wurden Embryonen im 2 bis 4 Zell-Stadium mit *in vitro* synthetisierter capped mRNA injiziert. Pro Versuchsansatz wurden mindestens drei Gelege von jeweils mindestens 100 Embryos injiziert und anschließend analysiert. Als Kontrollen dienten jeweils mindestens 30 nicht-injizierte Wildtyp-Geschwister aus demselben Gelege. Nach Injektion wurden die nicht fertilisierten Eier aussortiert und tote Embryos 6 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion entfernt. Der Prozentsatz der nicht fertilisierten Eier und der verstorbenen Embryos innerhalb von 24 Stunden nach Injektion

wurde genau dokumentiert. Bei mehr als 25 % nicht befruchteter Eier oder verstorbener Embryos wurde das entsprechende Gelege nicht für die weiteren Auswertungen herangezogen.

3.8 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden als Prozent der insgesamt injizierten Embryos angegeben \pm Standardabweichung. Statistische Tests wurden mit dem Student-t-Test durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3.9 In situ Hybridisierung

3.9.1 Herstellung von RNA-Antisense-Sonden

3.9.1.1 Restriktionsverdau des Expressionsplasmids

Um eine markierte Antisense RNA Sonde herzustellen, ist es zunächst notwendig, den Expressionsvektor und die zur Klonierung von Grem1 eingesetzten Restriktionsschnittstellen zu linearisieren. Hierzu werden ca. 5 μ g der Plasmid-DNA in einem Restriktionsverdau eingesetzt. Das jeweilige Restriktionsenzym ergibt sich durch den vorliegenden Expressionsvektor. Es wird folgender Ansatz in ein Reaktionsgefäß pipetiert:

- 5 μ g Plasmid-DNA
- 1 μ l Restriktionsenzym
- 2 μ l 10x Reaktionspuffer
- ad 20 μ l bidest. H₂O

Der Ansatz wird 2h bei 37°C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wird die linearisierte DNA gefällt, zentrifugiert und das Pellet in 20 μ l Wasser gelöst. Zur Kontrolle der vollständigen Linearisierung des Expressionsplasmids wurde ein 1 μ l Aliquot des aufgereinigten Restriktionsenzymverdaus auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und das Auftreten einer entsprechenden Bande der richtigen Größe überprüft.

3.9.1.2 In vitro Transkription der Antisense RNA Sonde

Durch *in vitro* Transkription wird eine einzelsträngige Antisense RNA Sonde hergestellt. Durch die Zugabe von Digoxigenin bzw. Fluorescein markierten Nukleotiden (DIG-11-UTP bzw. FLUO-11-UTP) zum Reaktionsansatz erfolgt eine Markierung des antisense Transkripts an jeder 20. – 25. Position durch die RNA-Polymerasen SP6, T3 und T7. (Roche, Produktblatt). Es wird folgender Ansatz in ein Reaktionsgefäß pipetiert:

- 1µg linearisierte Plasmid-DNA
- 2µl 10x Transkriptions Puffer (Roche)
- 2µl 10x DIG- bzw. FLUO-labeling Mix (Roche)
- 2µl RNA-Polymerase (Roche)
- 0,5µl RNase Out (RNase Inhibitor) (Roche)
- ad 20µl DEPC-H₂O

Der Ansatz wird 2h bei 37°C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend werden 2µl RNase freie DNaseI (Roche) zum Ansatz gegeben, gut gemischt und erneut ca. 15-30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die synthetisierte RNA gefällt, zentrifugiert und das Pellet in 30µl DEPC-H₂O gelöst. Zur Kontrolle der *in vitro* Transkription und dem vollständigen Verdau der Plasmid-DNA werden 3µl der aufgereinigten Antisense RNA Sonde auf einem 1,5 %igen Agarosegel untersucht.

Reaktionsansatz:

- 2xNTP/Cap-Lösung 10µl
- 10xReaction Buffer 2µl
- lineare DNA (Matrize) 1µg
- Enzym (SP6, T3 od.T7) 2µl
- H₂O ad 20µl

Die Inkubation erfolgt für 2 h bei 37 °C, danach wird 1 µl DNaseI (RNase-frei) (Roche) zugegeben und das Gemisch für weitere 15min. inkubiert.

Zum Nachweis der mRNA wurden spezifische Antisense RNA Sonden, welche mit Digoxigenin oder Fluorescein markiert wurden, verwendet. Mit einem Antikörper, welcher spezifisch Digoxigenin (Anti-DIG) oder Fluorescein (Anti-

FLUO) erkennt, und zudem mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, erfolgt der Nachweis der gebundenen Sonde und somit indirekt auch der exprimierten mRNA. Die alkalische Phosphatase katalysiert hierbei die Umsetzung eines Farbstoffes.

3.9.2 Durchführung der „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Die PFA-fixierten und in Methanol gelagerten Embryonen werden bei RT in einer absteigenden Methanolreihe (75 % MeOH/25 % PBT, 50% MeOH/50 % PBT, 25 % MeOH/75 % PBT) je 5 Minuten rehydriert und anschließend 4x für 5 min in PBT gewaschen. Embryos werden aus dem Eppendorfgefäß mit 100% PBT in eine Petrischale gegossen, die Petrischale wird mit PBT zur Hälfte gefüllt. Unter dem Mikroskop werden die Embryos mit Hilfe zweier spitzer Pinzetten aus der Eihülle befreit, die Embryos dürfen dabei nie direkt berührt werden. Nur die Eihaut soll gegriffen, aufgerissen und auseinandergezogen werden, so dass Embryos in PBT schwimmen. Die Embryos werden mit einer Pipette eingesammelt und jeweils 20 – 40 Embryos in ein Well einer 24well Platte gegeben. Gelege wurden dabei niemals gemischt. Das PBT wurde abgesaugt und 500µl PBT 100% wurde vorsichtig in jedes Well pipettiert, so dass der Strahl der Flüssigkeit nicht direkt auf die Embryos traf, sondern gegen die senkrechte Wand des Wells gerichtet war. Das PBT wurde erneut abgesaugt und noch mal 500µl PBT 100% dazu gegeben. Anschließend wurde die Platte 5min leicht geschwenkt.

Danach erfolgt die Permeabilisierung der Embryonen ab dem 24 hpf-Stadium: dazu werden die Embryonen mit 10 µg/ml Proteinase K bei RT für 20 min (24 hpf), 30 min (36 hpf), 40 min (48 hpf) bzw. 50 min (72 hpf) verdaut. Embryonen älterer Entwicklungsstadien werden mit entsprechend höherer Proteinase K-Konzentration verdaut. Danach werden die Embryonen 2x mit PBT gewaschen, 20 min mit 4 % PFA refixiert und nochmals 2x mit PBT gewaschen. Zur Prähybridisierung der Embryonen, d.h. zur Absättigung der unspezifischen DNA- und RNA-Bindestellen, werden diese anschließend in Hybridisierungspuffer bei +70 °C für 4-5 h inkubiert. Danach werden die

Embryonen in Hybridisierungspuffer mit der RNA-Sonde über Nacht bei 70 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Embryonen bei 70 °C für je 10 min mit 75 % Hybridisierungspuffer/25 % 2x SSC, 50 % Hybridisierungspuffer/50 % 2x SSC, 25 % Hybridisierungspuffer/75 % 2x SSC, 100 % 2x SSC gewaschen. Danach werden die Embryonen 2x 30 min bei 70 °C mit 0,2x SSC gewaschen. Dann werden die Embryonen bei RT für 5 min mit 75 % 0,2x SSC/25 % PBT, 50 % 0,2x SSC/50 % PBT, 25 % 0,2x SSC/75 % PBT und 100 % PBT gewaschen und 2 h mit „Blocking-Puffer“ 1x inkubiert, wobei unspezifische Antikörperbindestellen abgedeckt werden. Die Antikörperreaktion erfolgt bei 4 °C über Nacht. Dazu wird ein anti-Digoxigenin-/Fab-Fragment Antikörper (Roche, DEutschalnd) 1:2000 in „Blocking“-Puffer 1x gelöst und mit den Embryos inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Embryonen bei RT 4x kurz und 4x für je 30 min mit 2 mg/ml BSA in PBT gewaschen. Anschließend werden die Embryonen 3x für 5 min in frisch hergestelltem NTMT-Puffer äquilibriert. Die Färbereaktion erfolgt bei RT mit 20 µL NBT/BCIPLösung/ ml NTMT im Dunkeln unter leichtem Schwenken und muss in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden. Das Abstoppen der Färbereaktion erfolgt durch mehrmaliges Waschen mit PBT. Der Dotter kann durch Waschen der Embryonen mit 100 % Ethanol aufgeklärt werden, wodurch eine erheblich bessere Dokumentation ermöglicht wird, ein schwaches Signal aber auch verloren gehen kann.

3.10 Bildgebende Dokumentation

3.10.1 Mikroskopische Untersuchungen

Sämtliche Untersuchungen zu den „loss and gain of function“ Experimenten wurden mit Binokular (MZ 125, von Leica) vorgenommen. Alle Schritte der *in situ* Hybridisierung wurden unter einem AxioSkop 2 plus (Zeiss) durchgeführt.

3.10.2 Fotodokumentation

Die Embryonen werden zusammen mit 2,5 % Methylzellulose in die Mulde eines Objektträgers gegeben und darin mit Hilfe einer Präpariernadel ausgerichtet. Die Fotodokumentation erfolgte an einem Compound-Mikroskop Imager Z1 der Firma Zeiss mit einer AxioCam. Je nach Zielsetzung werden dabei Durchlichtaufnahmen (lebende Embryonen) oder Hellfeldaufnahmen (fixierte und gefärbte Embryonen) mit separater Lichtquelle durchgeführt. Danach wurden lebende Embryonen in Fischwasser und fixierte Embryonen in PBS gewaschen.

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung von zGremlin-1 in pBluescript und pCS2+

Gremlin-1 befindet sich im Zebrafisch-Genom auf Chromosom 17 und besteht aus zwei kurzen Exons und einem Intron. Abbildung 7 zeigt die Genstruktur von zGremlin-1.

5´upstream sequence:

```
agcgctcagaacagagctccataccttatttgactctgactcggaattctggatcattt  
ggttcagctatctttatctgtagttgttatggcacaagacctttgtgaacatagc
```

Exon 1:

AGAAGTTTAAACCACTATTAACCTGAG

Intron (536 bp):

```
gtaagtctgcacatctactgaatattttatttgaaaaacaaacattttatcttaattaaaa
```

.....

```
cctatgatttagttacattgaattgaaatgaatgttctgttccttctccatgtgaaag
```

Exon 2:

```
GATGACTAAAGACGCATTAGCTGTCACTATCGTGGTCTTGTGGCTGCTCTG  
CAATCCGGCGAGGATCAGGGGAACCGGGGGATTTC AAGGCGCCATTCCCT  
CACCCAAATAAATACAGTCCAAACCAGTCGGAGCAGTCACCGCAGACACC  
GCAGGCCGGTTCCAGGGGAATGGGACCGCCTTCAGCCGGGGACGAGGT  
GCTGGACTCCAGCCAGGAGGCTTTACACGTAACGGAGCGCCGGTATCTCA  
AACTCGACTGGTGTA AAACGCAGCCGCTGAAGCTGATGATCTACGAAGAC  
GGATGCCAACCGCGCGCCATCATCAACCGCTTCTGCTACGGACAGTGCAA  
CTCTTTCTACATCCCTCGACACATTTACCAAGAGGATGGCGCGTTCCAGTC  
GTGCTCCGTGTGCAAGCCCAAAGTTTTACGACCGTCACTTACACGCTCTT  
CTGCCCGGTCAA ACTCCCAACACCAAGAAAAAGCGCGTGCGGCGTGTCA  
AACAGTGCCGCTGCACTTCTGTGCGACTTGGATTAAACCTTAACTCACTGAC  
TGATGTTGTTGT
```

3´downstream sequence:

```
Tgttggtacatgctgctgttcttgactaacatgcttgacatatcattgatatgt  
gtttgttagtcaaaacaacagctttaatattgtgaagatattcatctgatgcaattaa
```

Abbildung 7: Gremlin-1 Genstruktur: Die Basensequenz der Exons ist mit Großbuchstaben geschrieben, Intron und die direkt vor Exon 1 und nach Exon 2 gelegenen Sequenzen sind mit Kleinbuchstaben geschrieben. Die für das Gremlin-1-Protein kodierende Sequenz ist in lila dargestellt (aus: Ensembl Genome Browser, Transcript ID: ENSDART00000043382).

Nach der Extraktion von Gesamt-RNA aus Wildtyp (AB-Linie) Zebrafischembryos 24 Stunden nach Fertilisation (hpf) wurde cDNA synthetisiert und zGremlin-1 mit Hilfe von PCR amplifiziert. Folgende Primer kamen dabei, zur späteren Klonierung in pBluescript SK II (+), zum Einsatz:

„ForwardPrimer“ mit BamHI-Restriktionsschnittstelle:

```
cg/ggatcc/atgactaaagacgcattagc
```

„Reverse Primer“ mit EcoRI-Restriktionsschnittstelle:

```
cg/gaattc/ttaatccaagtcgacagaagtg
```

Zur Klonierung von zGremlin-1 in pCS2+ wurden folgende Primer verwendet:

„Forward Primer“ mit BamHI-Restriktionsschnittstelle:

```
cg/ggatcc/atgactaaagacgcattagc
```

„Reverse Primer“ mit EcoRI-Restriktionsschnittstelle:

```
cg/gaattc/ttaatccaagtcgacagaagtg
```

Die Lage der beiden Primerpaare im Gen zeigt die folgende Darstellung:

AGAAGTTTAAACCACTATTAAACTGAG (Exon 1)

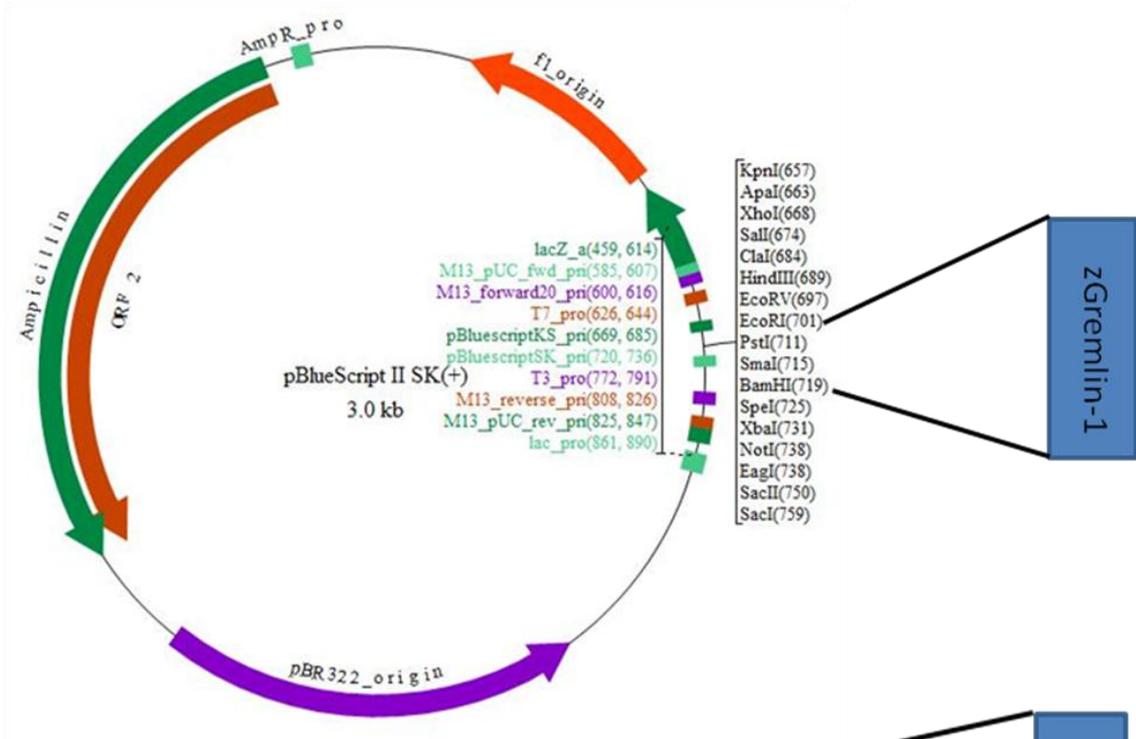
```
GATGACTAAAGACGCATTAGCTGTCACTATCGTGGTCTTGTGGCTGCTCTG  
CAATCCGGCGAGGATCAGGGGAACCGGGGATTTCAAGGCGCCATTCCT  
CACCCAAATAAATACAGTCCAAACCAGTCGGAGCAGTCACCGCAGACACC
```

GCAGGCCGGTTCAGGGGAATGGGACCGCCTTCAGCCGGGGACGAGGT
GCTGGACTCCAGCCAGGAGGCTTTACACGTAACGGAGCGCCGGTATCTCA
AACTCGACTGGTGTAACGCAGCCGCTGAAGCTGATGATCTACGAAGAC
GGATGCCAACCGCGCGCCATCATCAACCGCTTCTGCTACGGACAGTGCAA
CTCTTTCTACATCCCTCGACACATTTACCAAGAGGATGGCGCGTTCCAGTC
GTGCTCCGTGTGCAAGCCCAAAGTTTTACGACCGTCACTTACACGCTCTT
CTGCCCCGGTCAAACCTCCCAACACCAAGAAAAAGCGCGTGCGGCGTGTCA
AACAGTGCCGCTGCACTTCTGTGCGACTTGGATTAAACCTTAACTCACTGAC
TGATGTTGTTGT (Exon 2)

Abbildung 8: Position der zur PCR verwendeten Primer innerhalb der Gensequenz von zGremlin-1: Primerlage in den Exons von zGremlin-1 zur Klonierung in pBluescript und pCS₂₊.

Anschließend wurde das PCR-Produkt nach Aufreinigung und Verdau mit BamHI und EciRI in die Transcriptionsvektoren pBluescript und pCS₂₊ kloniert, nachdem auch sie mit Hilfe der Restriktionsendonuklaesen BamHI und EcoRI verdaut und linearisiert worden waren. Abbildung 9 zeigt die Karten der beiden Vektoren im Detail. Die Ligatur der PCR-Produkte mit den linearisierten Plasmiden erfolgte mit einer T4-DNA-Ligase.

pBluescript SK II (+)



pCS2+

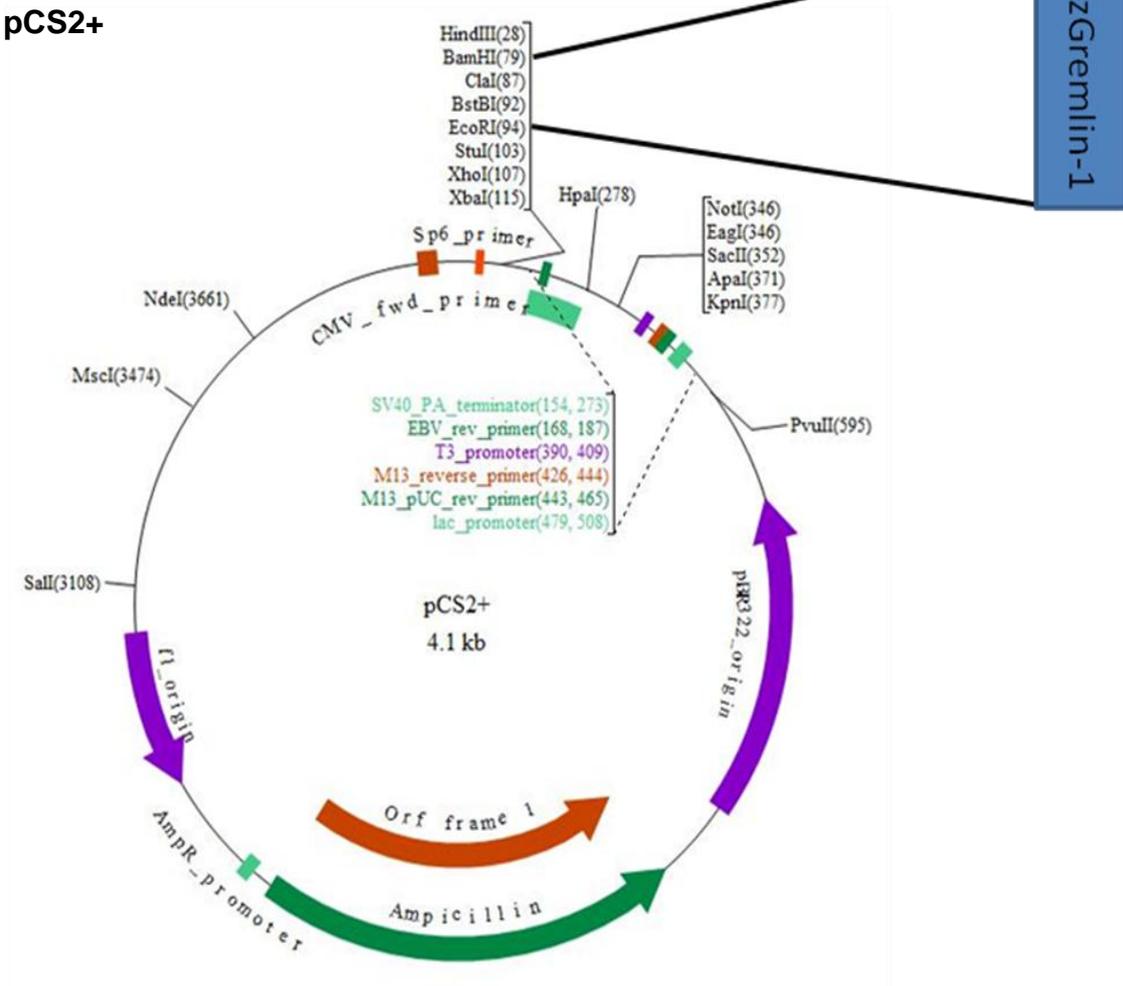


Abbildung 9: Vektorkarten von pBluescript SK II (+) und von pCS2+
(Abbildungen übernommen von BVTech Plasmid).

4.2 „Loss of function“ – Experimente

Wildtyp Embryos der Linie AB wurden im 2- bis 4-Zellstadium mit Morpholino Antisense Oligonukleotiden mit einer Glasnadel injiziert. Dabei wurde 1 nl Morpholino-Lösung in den Dottersack neben die sich teilenden Zellen appliziert. Das Wirkprinzip der eingebrachten Morpholino Antisense Oligonukleotide wird in Abbildung 10 veranschaulicht. Dabei binden die Morpholino Antisense Oligonukleotide an die mRNA, die jetzt nicht mehr als einfacher Strang im Bereich der Bindungsstelle für die Ribosomen vorliegt. Das Ribosom kann diese mRNA nicht mehr binden, so dass kein funktionsfähiges Protein gebildet wird, obwohl die Translation des Gens intakt ist.

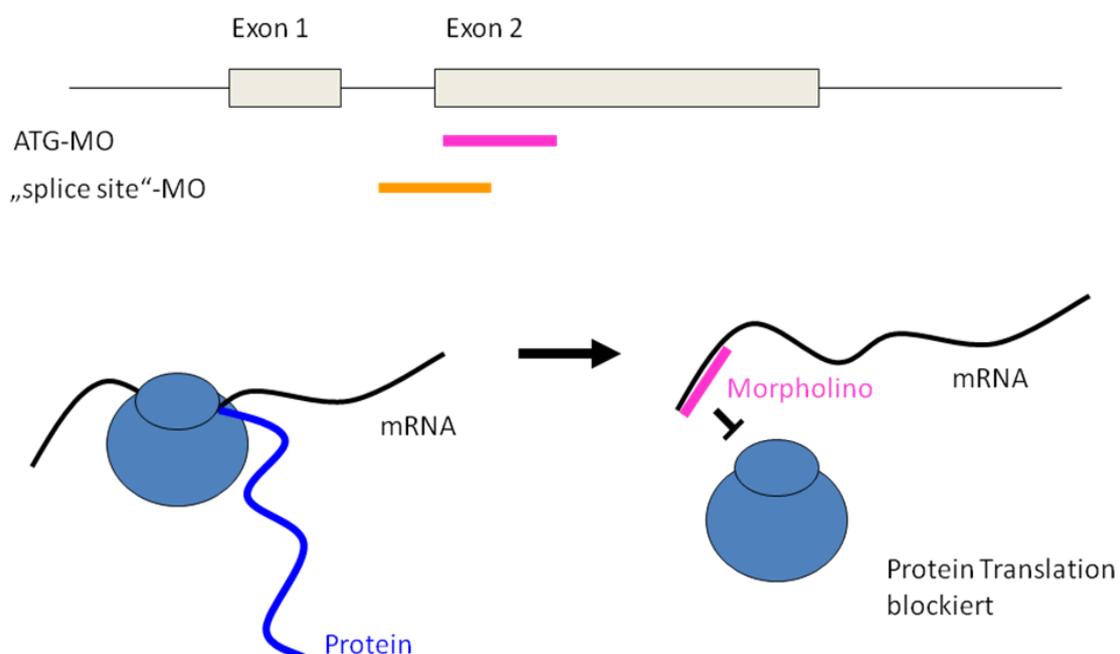


Abbildung 10: Wirkmechanismus der Morpholino Antisense Oligonukleotide: In **blau** dargestellt: Ribosom; In **pink** dargestellt: Morpholino Antisense Oligonukleotid gerichtet gegen das Starccodon der mRNA; In **orange** dargestellt:

Morpholino Antisense Oligonukleotid gerichtet gegen die „Splicing site“ der mRNA; ATG-MO: Morpholino Antisense Oligonukleotid gerichtet gegen das Startcodon; „splice site“ MO: Morpholino Antisense Oligonukleotid gerichtet gegen die Prozessierungs-Schnittstelle der mRNA.

4.2.1 Titrierung der optimalen Morpholino Antisense Oligonukleotid-Konzentration

Es wurden zwei verschiedene Morpholino Antisense Oligonukleotide (Morpholinos) eingesetzt, wie in Abbildung 10 bereits gezeigt, nämlich ein Morpholino gegen das Startcodon und ein Morpholino gegen die „splicing site“ der mRNA, also gegen die Stelle, an der die mRNA zugeschnitten wird, bevor sie vom Ribosom abgelesen werden kann, so dass ein funktionsfähiges Protein entsteht. Beide Morpholinos wurden in ihrer Wirkung in Vorversuchen getestet. Dabei wurden sie jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: 0,5 mM, 1,0 mM und 1,5 mM. Es wurden jeweils pro Morpholino und Konzentration die Gelege von 3 verschiedenen Wildtyp-Paaren untersucht, wobei in jedem Gelege wenigstens 100 Embryos mit Morpholino injiziert wurden, mindestens 30 nicht injizierte Geschwister-Embryos dienten als Kontrolle.

Es zeigte sich, dass beide Morpholinos bei keiner der drei Konzentrationen zu ausgeprägteren toxischen Effekten im Embryo führten. Alle injizierten Embryos zeigten weiterhin eine zwar gering verzögerte (um 1-2 Stunden, wohl aufgrund des Injektionstraumas), aber dennoch regelrechte Entwicklung innerhalb der ersten 72 Stunden, was die Entwicklung des Schädels, der Kiefer, der Augen, des Gehirns, der Somiten und der Flossen betraf, Strukturen, deren Morphologie am Zebrafischembryo leicht verfolgt werden kann.

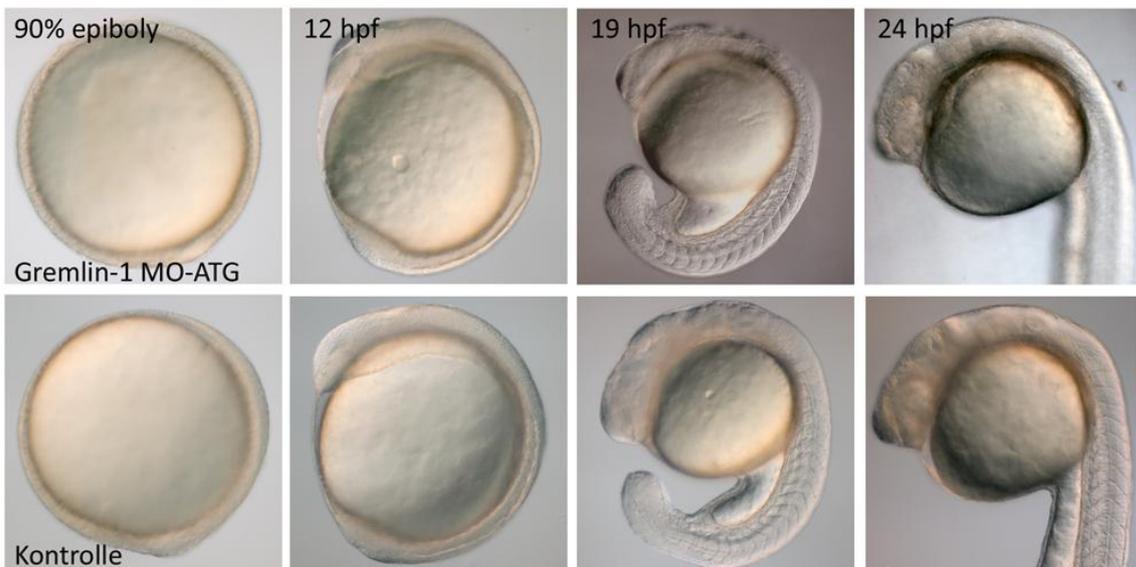


Abbildung 11: Darstellung von Zebrafischembryos 9 hpf, 12 hpf, 19 hpf und 24 hpf nach Injektion von 1,5 mM ATG-MO im Vergleich zu dem jeweiligen nicht-injizierten Geschwister-Embryo. (eigene Fotos).

4.2.2 Differenzierung der Herzanlage nach „knock down“ von Gremlin-1

Wildtyp-Embryos wurden im 2 bis 4-Zellstadium mit Morpholino Antisense Oligonukleotiden , entweder gerichtet gegen das Start-Kodon (Morpholino 1) oder gerichtet gegen die „Splicing site“ (Morpholino 2) der mRNA von Gremlin-1, injiziert. Dann wurde die morphologische Ausbildung der Herzanlage im Zeitverlauf im lebenden Embryo beobachtet. Hierzu wurde eine transgene Fischlinie herangezogen, Tg[cmlc2:egfp], in der der Promotor der „*cardiac myosin light chain 2*“ mit „green fluorescent protein“ gekoppelt ist, so dass die Kardiomyozyten im lebenden Embryo grün leuchten und so das Herz während seiner Entwicklung im lebenden Embryo beobachtet werden kann. Als Kontrollen dienten die nicht-injizierten Geschwister des gleichen Geleges. Pro Morpholino wurden 3 Gelege von je mindestens 100 Embryos analysiert. Injiziert wurde jeweils 1 nl einer Morpholino-Lösung mit einer Morpholino-Konzentration von 1,0 mM.

Die Differenzierung der Herzanlage fand gering verzögert statt (ca. 1 Stunde später), was wohl auf das Injektionstrauma zurückzuführen war. Es zeigte sich aber, dass nach dem „knock down“ von Gremlin-1 die Morphologie der

Herzanlage zu den verschiedenen Entwicklungsstadien (präkardiale Felder, primitiver Herzschlauch, S-förmiges Herz), im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen, im Wesentlichen unverändert war.

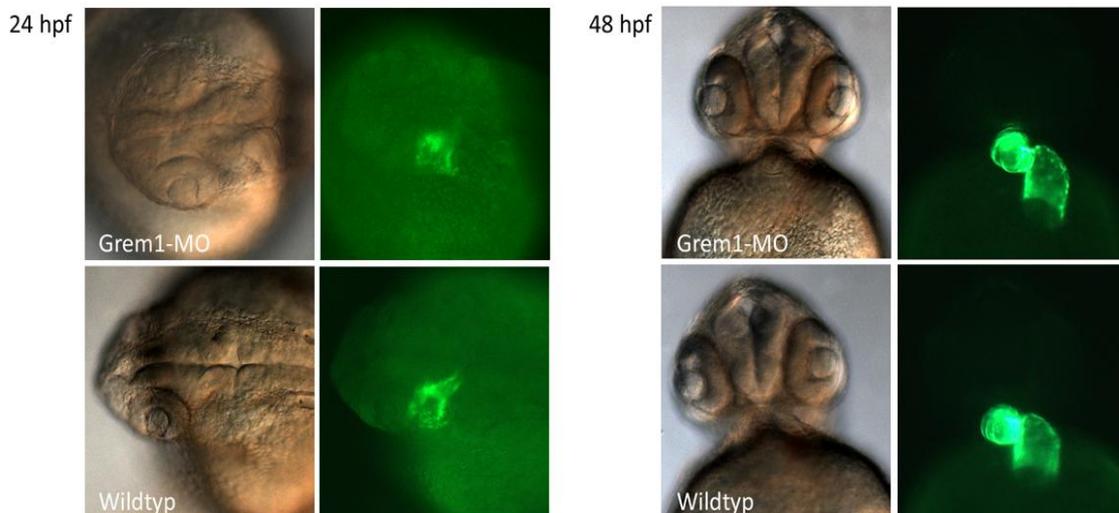


Abbildung 12: Herzmorphologie im lebenden Zebrafischembryo zu verschiedenen kritischen Zeitpunkten der Herzentwicklung: nach „knock down“ von Gremlin-1 im Vergleich zu den nicht-inizierten Geschwister-Embryonen. Gezeigt sind Tz[cmlc2:rgfp] transgene Zebrafischembryos im Alter von 24 und 48 hpf. Injiziert wurde hier Morpholino Antisense Oligonukleotid gerichtet gegen das Startcodon von Grem1 mRNA. Hpf: hours post fertilization.

4.2.2.1 Kardiales Jogging

Das Herz führt während seiner embryonalen Entwicklung charakteristische Faltungsprozesse durch, so dass beim Fisch am Ende ein zweikammriges S-förmiges Herz entsteht, bei höheren Wirbeltieren bildet sich das Herz vierkammrig aus. Dabei muss während der kardialen Entwicklung die sogenannte Rechts-Links-Asymmetrie des Herzens festgelegt werden. Diese wird durch verschiedene Faktoren initialisiert und aufrechterhalten. Im Zebrafischembryo führt die linksseitige Expression von nodal 1, lefty 1 und lefty 2, pitx2, und die Interaktion von bmp4 und shh zur Etablierung dieser Asymmetrie des Herzens.

Um den Einfluss von Gremlin-1 auf diese Faltungsprozesse des Herzens, nämlich die charakteristische Bewegung des Herzens nach links 24 hpf (kardiales „Jogging“) und die charakteristische Drehung des Ventrikels nach rechts 36 bis 48 hpf (kardiales „Looping“), zu analysieren, wurden Wildtyp-Embryos im 2 bis 4 – Zellstadium mit Morpholino 1 oder mit Morpholino 2 injiziert und zu kritischen Zeitpunkten der Herzentwicklung, nämlich 13 hpf, 17 hpf, 19 hpf, 24 hpf, 36 hpf und 48 hpf, fixiert und mit speziellen myokardialen Markern, wie *cmhc2*, *nkx 2.5*, *shh*, *bmp4*, *nodal 1*, *pitx2* und *lefty2*, mit Hilfe der „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung gefärbt. Als Kontrollen dienten die nicht-injizierten Geschwister-Embryonen. Pro Morpholino und Zeitpunkt wurden jeweils 3 Gelege mit mindestens 100 Embryos analysiert.

Abbildung 13 zeigt, dass sich die präkardialen Felder zunächst im „lateral plate mesoderm“ symmetrisch zur Mittel-Linie des Embryos formieren (13 hpf), dann aufeinander zuwandern (17 hpf) und schließlich fusionieren, so dass der primitive Herzschlauch entsteht (19 hpf, Daten nicht gezeigt). Gegen 21 hpf beginnt der Herzschlauch, sich nach links zu bewegen (Beginn des kardialen Joggings, Daten nicht gezeigt), etwa 24 hpf befindet sich das Herz vollständig auf der linken Seite des Embryos (kardiales Jogging beendet). Die Greml1-Morphants, also die Embryos, in denen Gremlin-1 funktionell ausgeknockt worden war, zeigten dabei ein regelrechtes Jogging des Herzens, vergleichbar zu ihren nicht-injizierten Geschwistern. Das Jogging fand allenfalls gering verzögert statt, der Beginn lag bei 21 bis 22 hpf, während ihre nicht-injizierten Geschwister bereits 20 bis 21 hpf mit der Herzverlagerung nach links begannen.

Die Expression der Faktoren, die das kardiale Jogging im Zebrafischembryo initialisieren, nämlich *shh*, *bmp4*, *nodal 1*, *pitx2* und *lefty2*, ist in Abbildung 14 dargestellt. Auch hier zeigt sich, dass die Expression bei Gremlin-1-Morphants und bei Wildtypkontrollen vergleichbar ist und auch zu vergleichbaren Zeitpunkten während der Entwicklung des Embryos stattfindet, allenfalls mit geringer zeitlicher Verzögerung in den Gremlin-1-Morphants von 30 bis 60 Minuten.

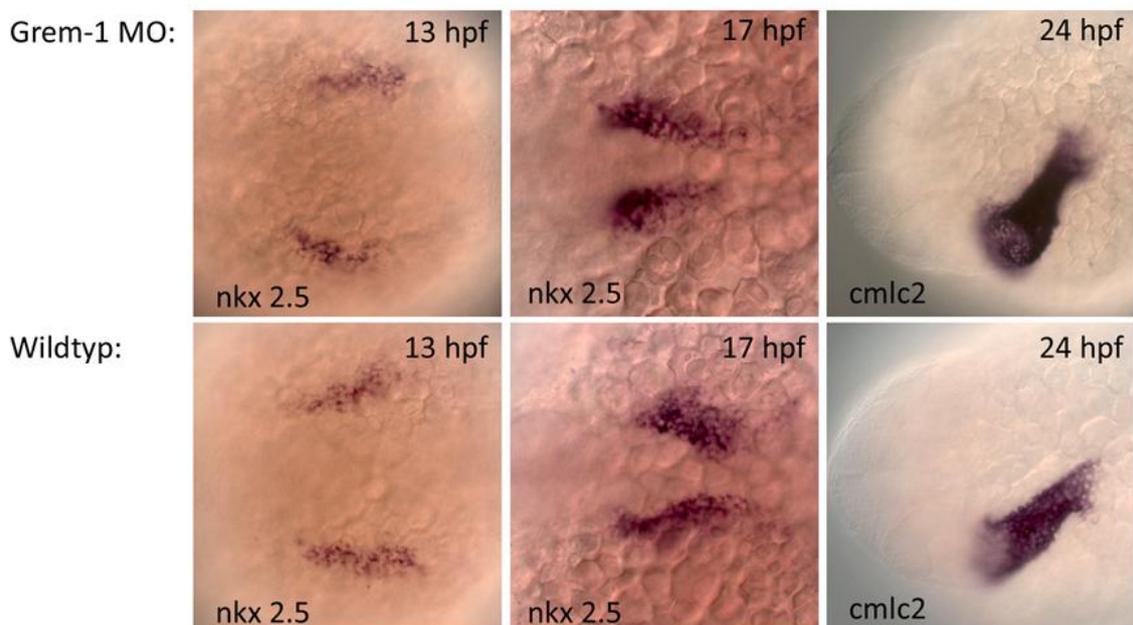


Abbildung 13: Kardiales Jogging bei Grem1-Morphants im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen: Dargestellt sind die präkardialen Felder in Embryos 13 hpf und 17 hpf, jeweils in Grem1-Morphants und Kontrollen. 24 hpf ist das kardiale Jogging abgeschlossen, das Herz liegt jetzt auf der linken Seite des Embryos, oben dargestellt im Grem1-Morphant, unten im Wildtyp Embryo. Nkx 2,5 markiert frühe wenig differenzierte Kardiomyozyten, cmlc2 markiert weiter ausgereifte Kardiomyozyten.

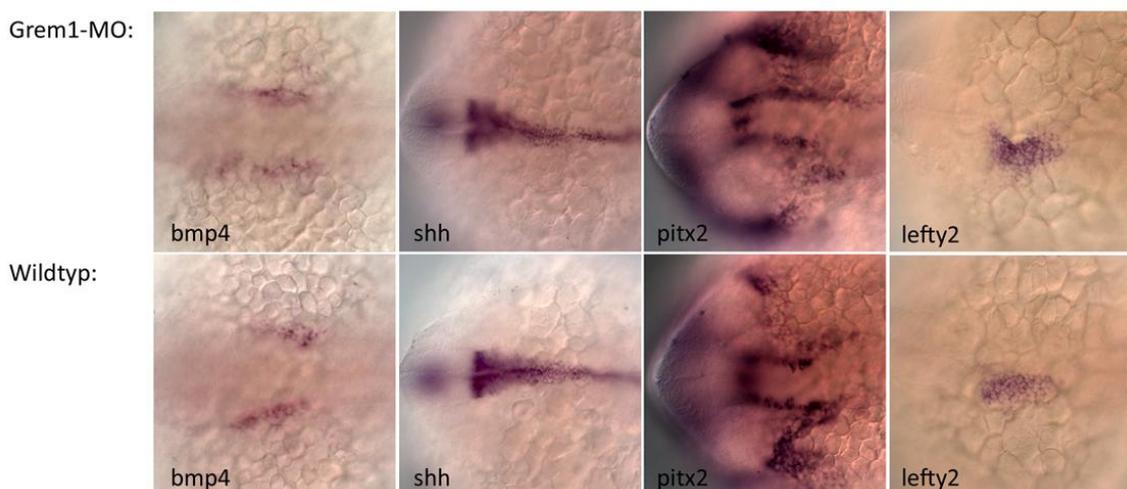


Abbildung 14: Expression von Faktoren, die das kardiale Jogging im Zebrafisch-Embryo initiieren, in Grem1-Morphants im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen:

Dargestellt ist die Expression 19 hpf von *bmp4*, *shh*, *pitx2* und *lefty2*, vier zentralen Markern, die die rechte und linke Seite des Embryos durch ihre Expression definieren und so festlegen, auf welche Körperseite das Herz sich verlagert zwischen 21 und 24 hpf. Oben sind *Grem1*-Morphants gezeigt, unten zum Vergleich die Wildtyp-Geschwister.

4.2.2.2 Kardiales Looping

Wie oben bereits erklärt findet der zweite Faltungsprozess des embryonalen Herzens, das sogenannte „Looping“ beim Zebrafisch-Embryo zwischen 36 und 48 hpf statt. Nach „knock down“ von *Gremlin-1* durch die Injektion von Morpholino 1 oder Morpholino 2 wurde dieser Prozess im lebenden Embryo in Tz[*cmlc2:egfp*]-Fischembryos und in fixierten Wildtyp-Embryos, die 36 hpf und 48 hpf fixiert worden waren, untersucht. Abbildung 15 zeigt, dass der funktionelle „knock down“ von *Gremlin-1* das kardiale „Looping“ nicht beeinflusst. Auch Faktoren, die diesen zweiten Faltungsprozess des Herzens initiieren und steuern, wie *bmp4*, *shh* und *pitx2*, wurden in ihrer Expression kurz vor Beginn der Drehung des Ventrikels nach rechts nicht verändert (siehe Abbildung 16).

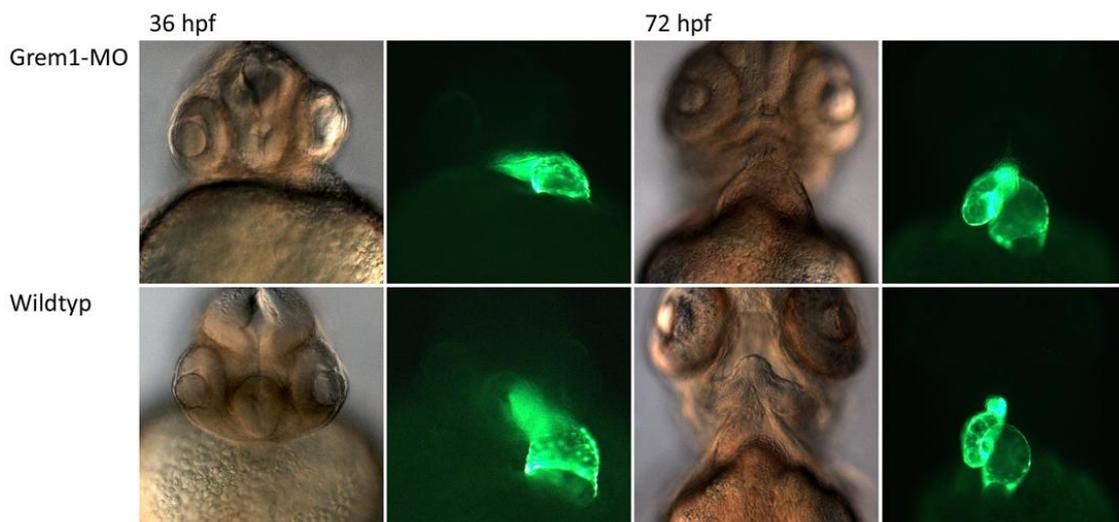


Abbildung 15: Kardiales Looping in Grem1-Morphants und Wildtyp-Geschwister-Embryos: Dargestellt sind lebende Embryos der Linie Tz[cmlc2:egfp] 36 hpf, wenn das kardielle Looping gerade beginnt, und 72 hpf, wenn das Herz in seiner endgültigen S-förmigen Gestalt vorliegt. Oben sind Gremlin-1-Morphants dargestellt, unten ihre Wildtypgeschwister. Gremlin-1-Morphants und Wildtypgeschwister-Embryos 48 hpf, wo das Looping abgeschlossen wird, wurden bereits in Abbildung 12 dargestellt.



Abbildung 16: Expression von bmp4 und pitx2 kurz vor Beginn des kardialen Loopings im Zebrafisch-Embryo: Gezeigt sind Grem1-Morphants und Wildtyp-Geschwister-Embryos 24 hpf. Ventral ist links, dorsal rechts im Bild. Embryo-Ansicht von oben.

4.2.2.3. Die Differenzierung des Atriums und des Ventrikels

Bereits 19 hpf können mit speziellen myokardialen Markern die Kardiomyozyten sichtbar gemacht werden, die als atriale Kardiomyozyten den Vorhof bilden werden, und die Kardiomyozyten, die die Herzkammer bilden werden als ventrikuläre Kardiomyozyten. Abbildung 17 zeigt Atrium und Ventrikel in einem Wildtyp-Embryo.

cmlc2/amhc



Abbildung 17: Darstellung von Atrium und Ventrikel in einem Wildtyp-Embryo zu verschiedenen Entwicklungsstadien: Atriale Kardiomyozyten sind dunkel-lila dargestellt, ventrikuläre Kardiomyozyten rot. Abgebildet sind Wildtyp-Embryos zu Beginn und nach Abschluß des kardialen Joggings nach links. Cmlc2 (cardiac myosin light chain 2): rot; amhc (atrial myosin heavy chain): dunkel-lila.

Nach Injektion von Morpholino 1 oder Morpholino 2 in Wildtyp-Embryos und konsekutivem “knock down” von Gremlin-1 zeigte sich die Differenzierung von Atrium und Ventrikel unverändert zu Wildtyp-Embryos. Abbildung 18 zeigt einige Entwicklungsstadien von Grem1-Morphants und Wildtypgeschwistern im Vergleich.

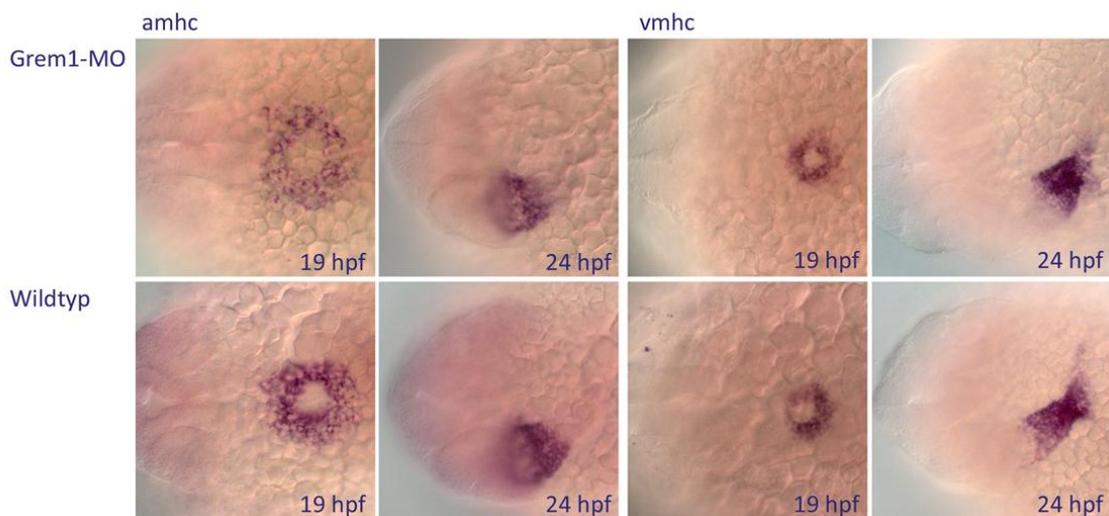


Abbildung 18: Differenzierung von Vorhof und Herzkammer in Grem1-Morphants im Vergleich zu ihren nicht-injizierten Wildtyp-Geschwistern:

Dargestellt sind Grem1-Morphants und ihre Wildtyp-Geschwister 19 hpf und 24 hpf. Amhc (atrial myosin heavy chain) markiert das Atrium, vmhc (ventricular myosin heavy chain) markiert den Ventrikel. Alle Embryos sind von oben gezeigt, ventral ist links, dorsal rechts im Bild.

4.2.2.4 Differenzierung der Kardiomyozyten

Man unterscheidet im Zebrafischembryo eine frühe Differenzierungsphase der Kardiomyozyten, während sie links und rechts von der Mittel-Linie die beiden präkardialen Felder bilden, und eine spätere Phase nach Fusion der beiden präkardialen Felder, wenn das Herz beginnt, sich zu kontrahieren und adequate interzelluläre Verbindungen ebenso wie myokardiale Strukturproteine ausgebildet werden müssen, um die erforderliche Kontraktilität des Herzmuskels zu gewährleisten. Während der frühen Differenzierungsphase spielen insbesondere *bmp2*, *gata5* und *nkx2.5* eine wichtige Rolle, damit die präkardialen Felder sich adequat ausbilden und differenzieren können. Auch der Wnt-Signaling Pathway spielt hier eine wichtige Rolle.

Zur Klärung der Frage, ob Gremlin-1 die frühe Differenzierung der Kardiomyozyten beeinflusst, wurden Embryos im 2- bis 4-Zellstadium mit Morpholino 1 oder Morpholino 2 injiziert und 13 hpf fixiert. Pro Morpholino und untersuchtem Marker wurden mindestens 3 Gelege von je mindestens 100 Embryos injiziert. Mindestens 30 Embryos dienten pro Gelege als nicht-injizierte Wildtyp-Kontrollen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. Es zeigte sich, dass Gremlin-1 auf die Ausbildung der präkardialen Felder und auf die frühe Differenzierung der Kardiomyozyten keinen relevanten Einfluss hatte. Dies zeigte sich anhand einer unveränderten Expression von *bmp2*, *gata5* und *nkx2.5* in Grem1-Morphants im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern.

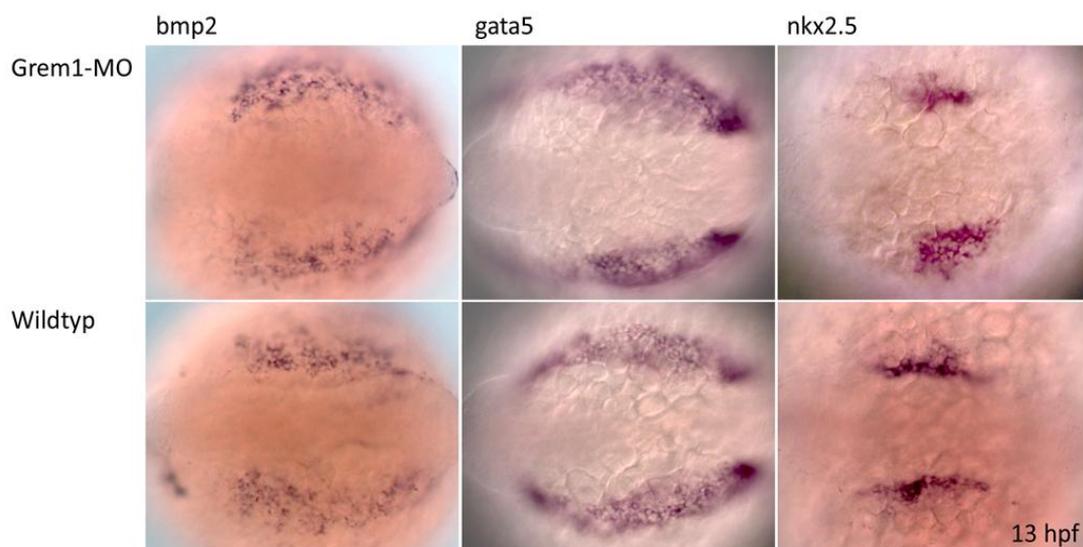


Abbildung 19: Expression von bmp2, gata5, nkx2.5 und wnt11 12 hpf in Grem1-Morphants und Wildtyp-Kontrollen: Gezeigt werden Grem1-Morphants und ihre Wildtyp-Geschwister, Ansicht von oben. Der Kopf zeigt immer nach links, der Rücken nach rechts. Alle dargestellten Embryos sind 13 hpf.

Für die spätere Differenzierung der Kardiomyozyten zu funktionsfähigen kontraktilen Zellen ist neben anderen Faktoren bmp4 verantwortlich. Hier konnte wie bereits in Abbildung 14 und 16 gezeigt, kein Unterschied in der Expression von bmp4 in Grem1-Morphants und ihren nicht-injizierten Wildtyp-Geschwistern festgestellt werden. Die Expression von bmp4 war sowohl in den präkardialen Feldern 19 hpf (siehe Abbildung 14) als auch später im bereits schlagenden Herzen 24 hpf (siehe Abbildung 16) in beiden Gruppen gleich. Auch morphologisch unterschieden sich die Herzen 24 hpf, 36 hpf, 48 hpf und 72 hpf nicht zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 12 und 15).

4.2.2.5 Herzrhythmus

Im Zebrafischembryo beginnt das Herz bei regelrechter Entwicklung etwa 21 hpf zu schlagen. Zur Evaluierung des Einflusses von Gremlin-1 auf die Herzfrequenz wurde in mindestens 3 Gelegen von je mindestens 100 Embryos pro Injektion von Morpholino 1 oder Morpholino 2 die Herzfrequenz pro Minute gezählt. Das wurde 21 hpf, 26 hpf und 48 hpf durchgeführt. Pro Gelege, das untersucht wurde, dienten mindestens 30 nicht-injizierte Geschwister-Embryos als Kontrollen.

Überraschenderweise zeigte es sich, dass in den Embryos, bei denen Gremlin-1 durch die Injektion der Morpholino Antisense Oligonukleotide funktionell ausgeknockt worden war, das Herz 21 hpf überhaupt nicht schlug, bei keinem der injizierten Embryos. Auch 26 hpf zeigte ein nur sehr geringer Anteil der Gremlin-1-Morphants ein schlagendes Herz. Bei diesem geringen Anteil war die Herzfrequenz deutlich herabgesetzt im Vergleich zu den nicht-injizierten Geschwistern. Erst 48 hpf zeigten alle Gremlin-1-Morphants ein schlagendes

Herz, die Herzfrequenz pro Minute war aber immer noch deutlich reduziert. Die genauen Ergebnisse zeigen Abbildung 20 und 21.

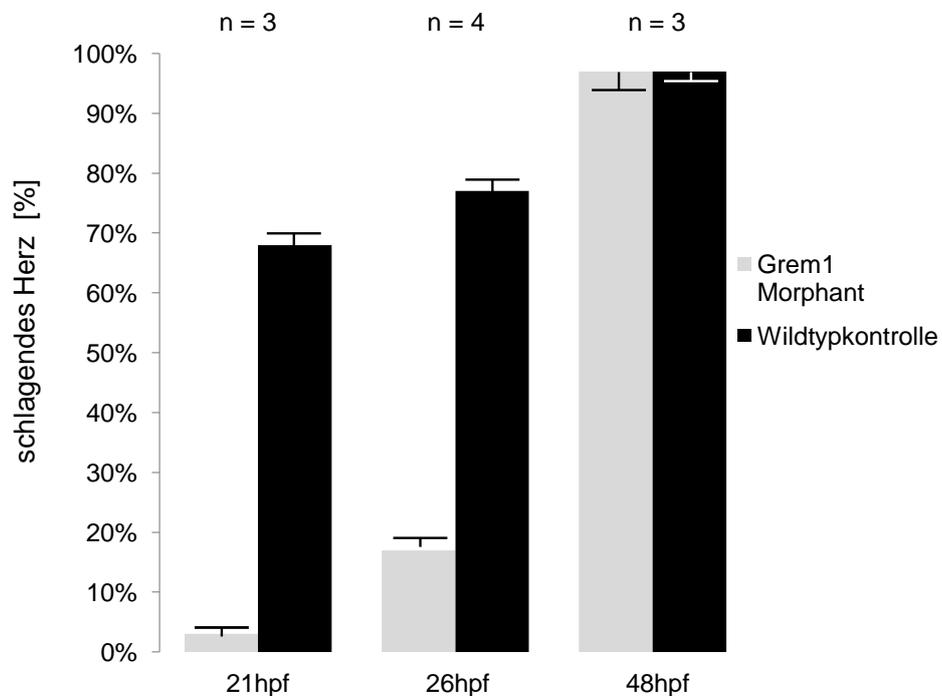


Abbildung 20: Prozentualer Anteil der Embryos mit schlagendem Herzen bei den Gremlin-1-Morphants im Vergleich zu den nicht-injizierten Kontrollen 21 hpf, 26 hpf und 48 hpf

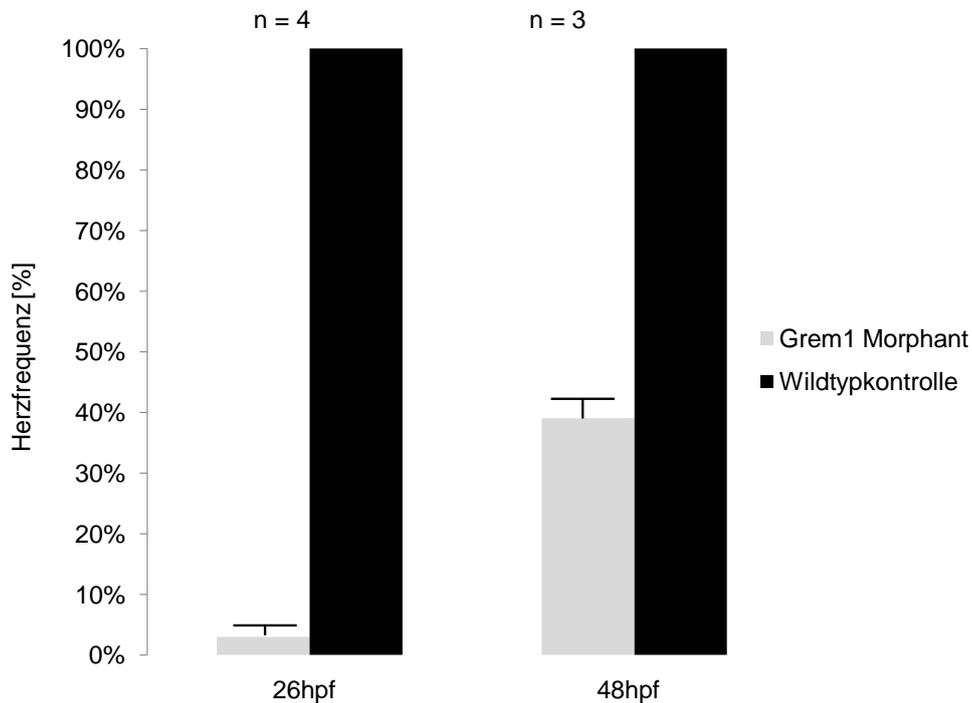


Abbildung 21: Relative Reduktion der Herzfrequenz bei denjenigen Gremlin1-Morphants, bei denen das Herz 26 hpf und 48 hpf funktionsfähig war im Vergleich zur Herzfrequenz der Wildtyp-Kontrollen (= 100%)

4.3 „Gain of function“ – Experimente

Zur Überexpression von Gremlin-1 wurde capped mRNA in vitro synthetisiert und dann in den Dottersack von Embryos im 2- bis 4-Zellstadium injiziert. Dabei wurden pro Versuch mindestens 3 Gelege von je mindestens 100 Embryos injiziert, mindestens 30 nicht-injizierte Wildtyp-Geschwisterembryos dienten pro Gelege als Kontrollen.

4.3.1 Titrierung der optimalen zGremlin-1 capped mRNA Konzentration

Es wurde 1 nl einer wässrigen Lösung von drei verschiedenen Konzentrationen von capped Gremlin-1 mRNA injiziert, um die optimale Injektionsmenge zur Überexpression von Gremlin-1 herauszufinden, nämlich 10 µmol/l, 15 µmol/l

und 20 $\mu\text{mol/l}$. Keine der Konzentrationen wirkte sich toxisch auf die Embryos aus, der Phänotyp nach Injektion war der eines Wildtyp-Embryos.

4.3.2 Phänotyp des Embryos insgesamt und des Herzens

Wie oben bei den Grem1 - „knock down“ – Experimenten beschrieben, wurden auch hier nach Überexpression von Gremlin-1 die gesamte Morphologie des Herzens, die Ausbildung der Rechts-Links-Asymmetrie, des kardialen „Joggings“ und „Loopings“, der frühen Differenzierung der präkardialen Felder und der späteren myokardialen Differenzierung sowie der Herzrhythmus analysiert. Alle Versuche wurden an mindestens 3 Gelegen durchgeführt von je mindestens 100 Embryos. Als Kontrollen dienten je Gelege mindestens 30 nicht-injizierte Wildtyp-Geschwister.

Es zeigte sich, dass keiner der genannten kardialen Entwicklungsprozesse durch die Überexpression von Gremlin-1 beeinflusst wurde. Auch die Kontraktion des Herzens setzte nach Überexpression von Gremlin-1 zur regelrechten Zeit, nämlich 21 hpf ein. Ein Unterschied zu den Wildtypkontrollen war nicht zu erkennen. Auch die Herzfrequenz war nach Gremlin-1-Überexpression vergleichbar mit der in Wildtyp-Embryos.

4.4 Rescue des „knock down“ Phänotyps mit zGremlin-1 capped mRNA

Während der „knock down“ von Gremlin-1 zu einer deutlichen zeitlichen Verzögerung der ersten Herzkontraktionen führte, und die Herzen nach Gremlin-1-„knock down“ auch erheblich langsamer schlugen, veränderte die reine Überexpression von Gremlin-1 den Herzrhythmus nicht. Wurden Morpholino 1 oder Morpholino 2 aber gleichzeitig mit der capped Gremlin-1 mRNA in den Dottersack injiziert, so konnte der Effekt, den die Morpholino Antisense Oligonukleotide auf den Herzrhythmus hatten, zu 90 % wieder aufgehoben werden. Damit war ein spezifischer „Rescue“ des „knock down“ – Phänotyps durch die gleichzeitige Gabe von Gremlin-1 mRNA möglich, was für spezifische Effekte der Gremlin-1-mRNA und der Morpholinos 1 und 2 spricht.

5. Zusammenfassung

Die kardiale Entwicklung im Embryo wird neben anderen Faktoren maßgeblich von den Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) reguliert. Auch für verschiedene ihrer Antagonisten, wie Noggin oder Gremlin-2 konnte eine zentrale Rolle während der embryonalen Entwicklung des Herzens festgestellt werden. Die Funktion von Gremlin-1, einem weiteren BMP-Antagonisten, in der kardialen Entwicklung ist bisher im Wesentlichen unbekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb im Zebrafisch-Embryo die Rolle von Gremlin-1 für die frühe und späte Differenzierung des embryonalen Herzens, seine Faltungsprozesse und Bewegungen im Embryo, seine Kontraktilität und den Herzrhythmus untersucht werden.

Nach funktionellem „knock down“ von Gremlin-1 mit Hilfe von Morpholino Antisense Oligonukleotiden und nach Überexpression mit Hilfe von capped mRNA zeigte sich, dass Gremlin-1 die Kontraktilität und den Herzrhythmus maßgeblich beeinflusst. So finden die ersten kardialen Kontraktionen nach „knock down“ von Gremlin-1 wesentlich später statt als in Wildtypembryos. Außerdem ist die Herzfrequenz nach Ausschaltung von Gremlin-1 im Vergleich zu Wildtypembryos deutlich reduziert. Andere zentrale Schritte der Herzentwicklung, wie die frühe und die spätere Differenzierung der Kardiomyozyten, die kardialen Faltungsprozesse und die Ausbildung von Atrium und Ventrikel, wurden dagegen durch Gremlin-1 nicht beeinflusst. Die nach „knock down“ Gremlin-1 verspätet auftretenden kardialen Kontraktionen und die reduzierte Herzfrequenz konnten durch die gleichzeitige Injektion von Morpholino Antisense Oligonukleotiden und capped Gremlin-1 mRNA wieder aufgehoben werden. Damit war ein spezifischer Rescue der Gremlin-1-Morphants durch Gremlin-1 mRNA möglich, was auf einen spezifischen Effekt der Morpholino Antisense Oligonukleotide und der mRNA hinweist.

Weitere *in vitro*- und *in vivo*- Versuche sind notwendig, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu identifizieren, wie Gremlin-1 den Herzrhythmus und die Herzaktion beeinflusst. Es ist denkbar, dass eine

fehlerhafte Funktion von Gremlin-1 bei bradykarden oder auch tachykarden Herzrhythmusstörungen eine Rolle spielt, so daß nach genauer Klärung der molekularen Funktion von Gremlin-1 mögliche neue therapeutische Strategien zur Therapie von Herzrhythmusstörungen entwickelt werden könnten.

6 Diskussion

Fehlbildungen im kardiovaskulären System sind der am häufigsten auftretende Geburtsdefekt bei sämtlichen Lebendgeburten. Unter den Totgeburten bzw. dem intrauterinen Fruchttod wird ihre Häufigkeit noch um ein vielfaches höher geschätzt (Olson und Srivastava 1996). Es ist deshalb von großer Wichtigkeit, die embryonale Differenzierung des Herzens auch auf molekularer Ebene zu verstehen. In der vorliegenden Studie wurde deshalb die Rolle eines relativ neuen BMP-Antagonisten, nämlich von Gremlin-1, für die Herzentwicklung untersucht, nachdem in der Vergangenheit hatte gezeigt werden können, dass BMPs eine zentrale Rolle für die kardiale Entwicklung spielen und auch ein weiterer BMP-Antagonist, nämlich Gremlin-2, vor die Differenzierung des Atriums eine wichtige Rolle spielt (Müller et al, 2012).

6.1 Die Bedeutung von Gremlin-1 für die Herzkontraktion

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass bestimmte erbliche Formen von Herzrhythmusstörungen (Vorhofflimmern) durch eine fehlerhafte Funktion von Gremlin-2 bedingt sind. (Müller et al, 2012).

Des Weiteren konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass Pitx2 das Auftreten von Vorhofflimmern beeinflusst. Selbst eine kleine Veränderung der Pitx2-Expression kann schon zu einer vermehrten Anfälligkeit des Herzens für Arrhythmien führen (Kirchhof et al., 2011). Da die Expression von Pitx2 durch Gremlin-2 mit reguliert wird, beeinflusst Gremlin-2 auch über die Regulation der Expression von Pitx2 das Auftreten von Vorhofflimmern.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass auch Gremlin-1 Einfluss auf den Herzrhythmus hat, denn nach Gremlin-1 „knock-down“ kam es zu einer deutlichen Reduktion der Pulsfrequenz der Explanaten im Vergleich zu den Wildtypkontrollen. Bei einer gesteigerten Gremlin-1 Expression waren keine signifikanten Unterschiede zum Herzrhythmus nicht-injizierter Kontrollen festzustellen.

Es ist möglich, dass Gremlin-1 wie Gremlin-2 Pitx2 reguliert und darüber die für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Herzkontraktion erforderlichen Ionenkanäle, Strukturproteine, Gap - und Tight Junctions mit reguliert. Eventuell nimmt Gremlin-1 auch Einfluss auf ihre Expression, vielleicht auch auf ihre Regulation durch dritte Faktoren.

Die genauen zugrundeliegenden molekularen Zusammenhänge müssen in künftigen Studien genauer untersucht werden.

6.2 Die Bedeutung von Gremlin-1 für die Differenzierung der Herzanlage nach „knock down“ bzw. Überexpression

Die regelrechte Entwicklung des Herzens erfordert ein komplexes Zusammenspiel von adäquater Zell-Differenzierung, gesteuert von einer Fielzahl an Faktoren und Signaltransduktionswegen, einer feindosierten Zell-Migration, und einer komplizierten Interaktion von verschiedenen embryonalen Zelltypen. Es gibt deshalb zahlreiche Möglichkeiten, wie eine angeborene Fehlbildung des Herzens entstehen kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, wie sich der Verlust bzw. die Überexpression von Gremlin-1 auf die allgemeine Differenzierung der Herzanlage auswirkt.

Die Herzentwicklung wird, wie ausführlich unter 1.2.4 beschrieben ist, über ein breites Netzwerk verschiedener Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle kontrolliert.

Da es zu keinen signifikanten Veränderungen im Bereich der präkardialen Felder, der Ausbildung und Lage des primitiven Herzschauches und des S-förmigen Herzens kam, kann der Rückschluss gezogen werden, dass Gremlin-1 die Funktionskaskade von BMP-4 während der kardialen Entwicklung im Zebrafisch nicht blockiert. Ansonsten käme es, zum Beispiel über den BMP-4-abhängigen Transkriptionsfaktor Nkx2.5, zu einem Fehler bei der Differenzierung erster Herzfeldzellen zu Kardiomyozyten des linken Ventrikels, da diese u.a. synergistisch durch Nkx2.5 reguliert werden. Da jedoch die Herzanlage in den mit Morpholino Antisense Oligonukleotiden injizierten

Zebrafischembryonen und in den mRMA injizierten Explanaten im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen nicht verändert ausgebildet wurde, scheint es zu keiner Unregelmäßigkeit in der BMP-4-Signaltransduktion zu kommen.

6.3 Die Bedeutung von Gremlin-1 für das kardiales „Jogging“ und „Looping“

Die genaue Regulation der Expression vieler Faktoren, die die kardiale Entwicklung im Embryo beeinflussen, ist bisher nicht geklärt. Innerhalb einer Gruppe von Proteinen, ohne die es zu keiner spezifischen kardialen Myozytengenesese käme, ist der Homeobox-Transkriptionsfaktor *Nkx2.5*, der für die Ausbildung der Herzanlage verantwortlich ist, am ausführlichsten beschrieben, und es scheint, dass er eine tragende Rolle in der frühen kardialen Entwicklung spielt (Schwartz und Olson 1999, Evans 1999; Epstein 2000).

Wäre die BMP-Signalgebung durch *Nkx2.5* gestört oder gänzlich unterbrochen, würde das embryonale Herz zwar angelegt, jedoch wären in der frühen Entwicklung morphologische Auffälligkeiten nachzuweisen: Ein schlagender linearer Herzschauch wäre angelegt, die Initiierung des Loopings bliebe jedoch aus. Als Folge einer frühen hämodynamischen Insuffizienz käme es zu einer Wachstumsretardierung und schließlich zum embryonalen Tod (Lyons et al. 1995). Tanaka et al. (1999) zeigten auch einen Stillstand der Kardiogenese auf, jedoch erst nach Initialisierung des Loopings. Nichts davon konnte jedoch nach dem „knock down“ von Gremlin-1 bei den „*loss of function*“ - und den „*gain of function*“ - Experimenten beobachtet werden. Auch die in der „whole mount“ *in situ* Hybridisierung festgestellte Expression von *Nkx2.5* war in den Gremlin-1-Morphants im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern unverändert. Gremlin-1 beeinflusst die Expression und Funktion von *Nkx2.5* damit wohl nicht.

Auch andere Faktoren, die für eine regelrechte frühe Differenzierung des Herzens essentiell sind, wie *bmp2* und *gata5*, werden durch Gremlin-1 offenbar nicht reguliert, da die Ausbildung der präkardialen Felder auch nach „knock down“ von Gremlin regelrecht von statten geht.

Ab 21 hpf kommt es unter dem Einfluss von *shh* und *bmp4* zum kardialen Jogging und Looping. Gremlin-1 hatte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf diese beiden essentiellen Faltungsprozesse des Herzens. Die Rechts-Links-Asymmetrie des Herzens wird also nicht unter dem Einfluss von Grem1 hergestellt. Die hierfür verantwortlichen zentralen Faktoren, wie *nodal 1*, *bmp4*, *shh* und *pitx2* werden durch Gremlin-1 nicht nennenswert beeinflusst, weder in ihrer Expression auf mRNA-Ebene noch in ihrer Funktion, da die Herzanlage sich regelrecht erst nach links und dann wieder nach rechts bewegt und ein korrekt gefaltetes S-förmiges Herz entsteht.

6.4 Die Differenzierung des Atriums und des Ventrikels unter dem Einfluss von Gremlin-1

Die Differenzierung des Herzschlauchs in Atrium und Ventrikel, Ein- und Ausflusstrakt und atrioventrikulären Kanal (AVC) erfordert ein komplexes Zusammenspiel spezieller und regional exprimierter Transkriptionsfaktoren. Deren Aufgabe besteht in der spezifischen Begrenzung, der Aktivierung bzw. Inhibierung von Differenzierungsprogrammen, die die Entwicklung der späteren Komponenten des Herzens regulieren. Die Kardiomyozytenvorläuferzellen sind während der frühen Entwicklung bilateral im ALPM organisiert und zeichnen sich durch die Expression kardiospezifischer Transkriptionsfaktoren, wie *hand2*, *gata4*, *bmp4* oder *nkx2.5*, aus (Chen and Fishman, 2000, Harvey et al, 2002., Serbedzija et al, 1998., Yelon et al., 2001). Diese induzieren in den Kardiomyozytenvorläuferzellen die Expression kardial- kontraktile Proteine, wie *cmlc1* oder *cmlc2* (Yelon et al., 1999., Yelon et al., 2002., Zaffran et al., 2002). Die Entwicklung des AVC beginnt mit der regionalen Expression von *BMP-4* an der Grenze zwischen atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten. *Bmp4* induziert in den benachbarten endokardialen Zellen deren Differenzierung und steuert durch gezielte Regulation von Zellzyklusgenen die Proliferation der Kardiomyozyten, die adequate Herzdrehung und in Säugern die intraatrialen und -ventrikulären Septierungen. (Harrelson et al., 2004.).

Die Kardiomyozytenvorläufer sind in diesem Stadium innerhalb des ALPM bereits in atriale und ventrikuläre Populationen unterteilt. Die ventrikulären Zellen sind dabei durch die Expression von *vmhc* (*ventricular myosin heavy chain*) von den atrialen unterscheidbar (Yelon et al., 2001., Yelon et al., 2002., Yelon et al., 1999., Yelon and Stainier, 1999).

Diese Differenzierungsprozesse fanden auch nach „knock down“ von Gremlin-1 regelrecht statt. Atrium und Ventrikel bildeten sich morphologisch unauffällig und innerhalb der dafür beim Zebrafisch-Embryo vorgesehenen Zeit aus. Es zeigten sich keinerlei Veränderungen bzw. Abweichungen in der Entwicklung von Atrium und Ventrikel bei den Explanaten.

6.5 Die Auswirkungen von Gremlin-1 auf die Kardiomyozytendifferenzierung

Die Ausbildung der präkardialen Felder, die Fusion der bilateral organisierten Kardiomyozytenvorläufer zu einem medialen Herzschauch und das kardiale Jogging und Looping erfordert eine komplexe Serie von spezifischen Zellbewegungen der einzelnen Zellpopulationen. Bei der Ausbildung des Herzschauches fusionieren gestaffelt erst die zukünftigen ventrikulären und dann die zukünftigen atrialen Kardiomyozytenpopulationen (Reiter et al., 1999.). Die kardiale Fusion hängt u. a. von Transkriptionsfaktoren wie *Hand2* (Han, (Yelon et al., 2001.)) und *Gata5* (Faust, (Kupperman et al., 2000., Reiter et al., 1999) ab.

Die Zellmigration wurde durch den „knock down“ von Gremlin-1 nicht wesentlich beeinflusst, da alle hiervon abhängigen Entwicklungsschritte regelrecht abliefen.

Auch die frühe Differenzierung der Kardiomyozyten, die schließlich zur adequaten Ausbildung der Herzfelder führt, zeigte keine Störung nach „knock down“ von Gremlin-1. Insbesondere die Expression von *bmp2*, *gata5* und *nkx2.5* waren ungestört trotz eines funktionell fehlenden Gremlin-1.

7. Literaturverzeichnis

- Abu-Issa R**, Smyth G, Smoak I, Yamamura K, Meyers EN.
Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse.
Development, 2002; 129: p.4613-4625.
- Ackermann GE** und Paw BH.
Front Biosci, 2003; 8: p.1227-53.
- Alexander J**, Rothenberg M, Henry GL und Stainier DY.
Casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish.
Dev Biol, 1999; 215(2): p.343-57.
- Aono A**, Hazama M et al.
Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer.
Biochem Biophys Res Commun, 1995; 210(3): p.670-7
- Avsian-Kretchmer O** und Hsueh AJ.
Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists.
Mol Endocrinol. 2004; 18(1): p.1-12. Epub 2003.
- Bai S**, Shi X, Yang X und Cao X.
Smad6 as a transcriptional corepressor.
J. Biol. Chem., 2000; 275: p.8267-8270
- Balemans W** und Van Hul W.
Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators.
Dev Biol. 2002; 250(2): p. 231-50.
- Bao Z**, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL.
Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by Irx4.
Science, 1999; 283: p.1161-1164.
- Bodmer R** und Frasch M.
Genetic Dissection of Heart Development. In: Heart Development.
Academic Press, 1999.
- Boyden S**.
The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes.

- J Exp Med. 1962; 115: p. 453-66.
- Branford WW**, Essner JJ, Yost HJ.
Regulation of gut and heart left-right asymmetry by context-dependent interactions between Xenopus lefty and BMP-4 signaling.
Dev Biol, 2000; 223: 291-306.
- Breckenridge RA**, Mohun TJ und Amaya E.
A role for BMP signalling in heart looping morphogenesis in Xenopus.
Dev Biol, 2001; 232(1): p.191-203.
- Brown CO**, III, Chi X, Garcia-Gras E, Shirai M, Feng XH, Schwartz RJ.
The cardiac determination factor, Nkx2-5, is activated by mutual cofactors GATA-4 and Smad1/4 via a novel upstream enhancer.
J Biol Chem, 2004; p:10659-10669.
- Bruneau BG**, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG, Seidman CE.
Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome.
Dev Biol, 1999; 211: p.100-108.
- Bruneau BG**, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG.
A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease.
Cell, 2001; 106: p.709-721.
- Brunet LJ**, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM.
Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton.
Science, 1998; 280: p.1455-1457.
- Buckingham M**, Meilhac S, Zaffran S.
Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells.
Nat Rev Genet, 2005; 6: p.826-835.
- Burkus JK**, Transfeldt EE, Kitchel SH, Watkins RG, Balderston RA.
Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using recombinant human BMP-2.
Spine, 2002; 27: p.2396-2408
- Cai CL**, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S.
Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart.
Dev Cell, 2003; 5: p.877-889.
- Capdevila J**, Vogan KJ, Tabin CJ, Belmonte JCI.
Mechanisms of left-right determination in vertebrates.
Cell, 2000; 101: p.9-21

- Carcamo J**, Weis FMB, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J.
Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to TGF- β and activin.
Molecular and Cellular Biology, 1994; 14: p.3810-21
- Chen B**, Athanasiou M, Gu Q, Blair DG
Drm/Gremlin transcriptionally activates p21(Cip1) via a novel mechanism and inhibits neoplastic transformation.
Biochem Biophys Res Commun. 2002; 295(5): p.1135-41.
- Chen B**, Blair DG, Plisov S, Vasiliev G, Perantoni AO, Chen Q, Athanasiou M, Wu JY, Oppenheim JJ, Yang D: Cutting edge
Bone morphogenetic protein antagonists Drm/Gremlin and Dan interact with Slits and act as negative regulators of monocyte chemotaxis.
J Immunol. 2004; 173(10): p.5914-7.
- Chen H**, Shi S, Acosta L, Li W, Lu J, Bao S, Chen Z, Yang Z, Schneider MD, Chien KR, Conway SJ, Yoder MC, Haneline LS, Franco D, Shou W.
BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. Development, 2004; 131: p.2219-2231.
- Chen JN**, Haffter P, Odenthal J, Vogelsang E, Brand M, van Eeden FJ, Furutani-Seiki M, Granato M, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins M.C., and Nusslein-Volhard C.
Development, 1996; 123: p. 293-302.
- Chen JN** und Fishman MC.
Genetics of heart development.
Trends Genet, 2000; 16(9): p. 383-8.
- Chiodelli P**, Mitola S, Ravelli C, Oreste P, Rusnati M, Presta M.
Heparan sulfate proteoglycans mediate the angiogenic activity of the vascular endothelial growth factor receptor-2 agonist gremlin.
Epub 2011; 31(12): p.116-27.
- Christoffels VM**, Burch JB and Moorman AF.
Cardiovasc Med, 2004; 14(8): p.301-7.
- Clark KL**, Yutzey KE, Benson DW.
Transcription factors and congenital heart defects.
Annu Rev Physiol, 2006; 68: p.97-121.
- Constam DB**, Robertson EJ.
Regulation of BMP activity by prodomains and proprotein convertases.
J Cell Biol, 1999; 144: p.139-49.
- Costello CM**, Cahill E, Martin F, Gaine S, McLoughlin P.

Role of gremlin in the lung: development and disease.
Epub Review, 2009; 42(5): p. 517-23.

Dickmeis T, Mourrain P, Saint-Etienne L, Fischer N, Aanstad P, Clark M, Strahle U und Rosa F.

A crucial component of the endoderm formation pathway, CASANOVA, is encoded by a novel sox-related gene.
Genes Dev, 2001. 15(12): p.1487-92.

Dodou E, Verzi MP, Anderson JP, Xu SM, Black BL.

Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development.
Development, 2004; 131: p.3931-3942.

Driever W, Stemple D, Schier A, and Solnica-Krezel L.

Trends Genet, 1994; 10(5): p.152-9.

Dudley AT und Robertson EJ.

Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos.
Dev Dyn, 1997; 208: p.349-362.

Eimon PM, Harland RM.

In Xenopus embryos, BMP heterodimers are not required for mesoderm induction, but BMP activity is necessary for dorsal/ventral patterning.
Dev Biol. 1999; 216(1): p.29-40.

Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Chen Y, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S et al.

Ensembl 2011. Nucleic Acids Res. 2011; 39: D800–D806.

Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G et al.

Osteogenic protein-1 (BMP-7) in the treatment of tibial nonunions.
J Bone Joint Surg Am, 2001; 83-A Suppl 1: p.159-60

Furtado MB, Solloway MJ, Jones VJ, Costa MW, Biben C, Wolstein O, Preis JI, Sparrow DB, Saga Y, Dunwoodie SL et al.

BMP/SMAD1 signaling sets a threshold for the left/right pathway in lateral plate mesoderm and limits availability of SMAD4.
Genes Dev, 2008; 22: p.3037-49.

Garg V, Yamagishi C, Hu T, Kathiriya IS, Yamagishi H, Srivastava D.

Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development.
Dev Biol, 2001; 235: p.62-73.

Gaussin V, Van de PT, Mishina Y, Hanks MC, Zwijsen A, Huylebroeck D, Behringer RR, Schneider MD.

Endocardial cushion and myocardial defects after cardiac myocyte-specific conditional deletion of the bone morphogenetic protein receptor ALK3.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2002; 99: p.2878-2883.

Gazerro E und Canalis E.

Bone morphogenetic proteins and their antagonists.

Metab Discord, 2006; 7: p.51-65. Rev.

Germain S, Howell M, Esslemont GM, Hill CS.

Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif.

Genes Dev 2000; 14: p.435-451.

Ghosh-Choudhury N, Ghosh-Choudhury G, Celeste A, Ghosh PM, Moyer M, Abboud SL, Kreisberg J,

Bone morphogenetic protein-2 induces cyclin kinase inhibitor p21 and hypophosphorylation of retinoblastoma protein in estradiol-treated MCF-7 human breast cancer cells.

Biochim Biophys Acta 2000; 1497: p.186-196.

Graff JM.

Embryonic patterning: To BMP or not to BMP, that is the question.

Cell 1997; 89: p.171-74.

Graham A, Francis-West P, Brickell P, Lumsden A..

The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic

1994

Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, et al.

BMPs: from structure to clinical use.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2005; 38: p.1463-73

Grego-Bessa J, Luna-Zurita L, del Monte G, Bolos V, Melgar P, Arandilla A, Garratt AN, Zang H, Mukoyama YS, Chen H, Shou W, Ballestar E, Esteller M, Rojas A, Perez-Pomares JM, de la Pompa JL.

Notch signaling is essential for ventricular chamber development.

Dev Cell 2007; 12: p.415-429.

Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD.

Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein – 1: structural paradigm of the TGF- β superfamily.

Proc Natl Acad Sci 1996; 93: p.878-83.

Groeneveld EH und Burger EH.

BMPs in human bone regeneration.

Eur J Endocrinol 2000; 142: p.9-21.

Haffter P und Nusslein-Volhard C.

Int J Dev Biol 1996. 40(1): p. 221-7.

Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Metayer P and Clementy J.

Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins.

N Engl J Med, 1998; 339: p.659-66.

Hanai J, Chen LF, Kanno T, Ohtani-Fujita N, Kim WY, Guo WH, Imamura T, Ishidou Y, Fukuchi M, Shi MJ, Stavnezer J, Kawabata M, Miyazono K, Ito Y.

Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter.

J Biol Chem 1999; 274: p.31577-31582.

Harrelson Z, Kelly RG, Goldin SN, Gibson-Brown JJ, Bollag RJ, Silver LM und Papaioannou VE.

Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development.

Development 2004; 131(20): p. 5041-52.

Harvey RP.

Patterning the vertebrate heart.

Nat Rev Genet 2002; 3:544-556.

Harvey RP, Lai D, Elliott D, Biben C, Solloway M, Prall O, Stennard F, Schindeler A, Groves N, Lavulo L, Hyun C, Yeoh T, Costa M, Furtado M und Kirk E.

Homeodomain factor Nkx2-5 in heart development and disease.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2002; 67: p.107-14.

Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I.

Tbx5 associates with Nkx2.5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation.

Nat Genet 2001; 28: p.276-280.

Hogan BL.

Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development.

Genes Dev. 1996; 10: p.1580-1594.

Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM.

The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities.

- Mol Cell, 1998; 1: p. 673-683.
- Hu MC**, Piscione TD, et al.
Elevated SMAD1/beta-catenin molecular complexes and renal medullary cystic dysplasia in ALK3 transgenic mice.
Development 2003; 130(12): p.2753-66.
- Hu N**, Yost H.J, und Clark EB.
Anat Rec 2001; 264(1): p. 1-12.
- Hu T**, Yamagishi H, Maeda J, McAnally J, Yamagishi C, Srivastava D.
Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors.
Development 2004; 131: p.5491-5502.
- Ishisaki A**, Yamato K, Hashimoto S, Nakao A, Tamaki K, Nonaka K, ten Dijke P, Sugino H, Nishihara T.
Differential inhibition of Smad-6 and Smad-7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells.
J. Biol. Chem., 1999; 274 (19): p. 13637-13642.
- Jia Q**, McDill BW, Li SZ, Deng C, Chang CP, Chen F.
Smad signaling in the neural crest regulates cardiac outflow tract remodeling through cell autonomous and non-cell autonomous effects.
Dev Biol 2007; 311: p.172-184
- Jiao K**, Kulesa H, Tompkins K, Zhou Y, Batts L, Baldwin HS, Hogan BL.
An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart.
Genes Dev 2003; 17: p.2362-2367.
- Johnson EE**, Urist MR, Finerman GA.
BMP augmentation grafting of resistant femoral nonunions. A preliminary report.
Clin Orthop Relat Res 1988; 230: p.257-65.
- Kaartinen V**, Dudas M, Nagy A, Sridurongrit S, Lu MM, Epstein JA.
Cardiac outflow tract defects in mice lacking ALK2 in neural crest cells.
Development 2004; 131: p.3481-3490.
- Kikuchi Y**, Agathon A, Alexander J, Thisse C, Waldron S, Yelon D, Thisse B und Stainier DY.
Casanova encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish.
Genes Dev 2001; 15(12): p. 1493-505.
- Kikuchi Y**, Trinh LA, Reiter JF, Alexander J, Yelon D and Stainier DY.

The zebrafish bonnie and clyde gene encodes a Mix family homeodomain protein that regulates the generation of endodermal precursors.

Genes Dev 2000; 14(10): p. 1279-89.77.

Kimmel CB, Ballard W, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF.
Stages of Embryonic Development of the Zebrafish.
Developmental Dynamics (1995), 203: p255-310.

Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, Ohgi KA, Lin C, Gleiberman A, Wang J, Brault V, Ruiz-Lozano P, Nguyen HD, Kemler R, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rosenfeld MG.

Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development.

Cell, 2002; 111: p.673-685.

Kirchhof P, Kahr PC, Kaese S, Piccini I, Vokshi I, Scheld HH, Rotering H, Fortmueller L, Laakmann S, Verheule S et al.

PITX2c is expressed in the adult left atrium, and reducing Pitx2c expression promotes atrial fibrillation inducibility and complex changes in gene expression.

Circ Cardiovasc Genet, 2011; 4: p.123-33.

Kishigami S, Mishina Y.

BMP signalling and early embryonic patterning. Cytokine and Growth Factors.

Review 2005; 16: p.265- 78.

Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquet AL, Vertura F, Grant RA.

Characterization and cloning of a receptor of BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells.

Mol Cell Biol, 1994; 14: p.5961-5974.

Kupperman E, An S, Osborne N, Waldron S und Stainier DY.

A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development.

Nature, 2000; 406(6792): p. 192-5.

Lee KH, Evans S, Ruan TY, Lassar AB.

SMAD-mediated modulation of YY1 activity regulates the BMP response and cardiac-specific expression of a GATA4/5/6-dependent chick Nkx2.5 enhancer.

Development, 2004; 131: p.4709-4723.

Levin MD, Lu MM, Petrenko NB, Hawkins BJ., Gupta TH, Lang D, Buckley PT, Jochems J, Liu F, Spurney C F et al.

Melanocyte-like cells in the heart and pulmonary veins contribute to atrial arrhythmia triggers.

J Clin Invest, 2009; 119: p.3420-36.

Leong LM und Brickell PM.

Molecules in focus: BMP-4.

Int J Biochem Cell Biol, 1996; 28: p.1293-96

Levander G.

On the formation of new bone in bone transplantation.

Acta Chir Scand, 1934; 74: p.425-26.

Levander G.

A study of bone regeneration.

Surg Gynaecol Obstet, 1938; 67: p.705-14.

Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN.

Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C.

Science, 1997; 276: p.1404-1407.

Liu C, Liu W, Palie J, Lu MF, Brown NA und Martin JF.

Pitx2c patterns anterior myocardium and aortic arch vessels and is required for local cell movement into atrioventricular cushions.

Development, 2002; 129: p. 5081-91.

Liu W, Selever J, Wang D, Lu MF, Moses KA, Schwartz RJ, Martin JF.

Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2004; 101: p.4489-4494.

Lohr JL und Yost HJ.

Am J Med Genet, 2000; 97(4): p. 248-57.

Lyons G.E.

Curr Opin Genet Dev, 1996; 6(4): p.454-60.

Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L and Harvey RP.

Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5.

Genes Dev, 1995; 9: p.1654-1666.

Ma L, Lu MF, Schwartz RJ, Martin JF.

Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning.

Development, 2005; 132: p.5601-5611.

Maciel TT, Melo RS, Campos AH.

Gremlin promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration.

J Vasc Res., 2009; 46(4): p.325-32. Epub 2009.

Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB.

Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm.

Genes Dev, 2001; 15: p.316-327.

Massague J.

TGF-beta signal transduction.

Annu Rev Biochem, 1998; 67: p.753-791.

Massague J und Chen Y-G.

Controlling TGF-β signaling.

Genes Dev, 2000; 14: p.627-644.

Massague J und Wotton D.

Transcriptional control by the TGF-β/ Smad signalling system.

The EMBO Journal, 2000; 19: p.1745-54.

Massberg S, Konrad I, Bültmann A, Schulz C, Münch G, Peluso M, Lorenz M, Schneider S, Besta F, Müller I, Hu B, Langer H, Kremmer E, Rudelius M, Heinzmann U, Ungerer M, Gawaz M.

Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo.

FASEB J., 2004;18(2): p.397-9. Epub 2003.

McDonald NQ und Hendrickson WA.

A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif.

Cell, 1993; 73 (3): p.421-424.

McFadden DG, Charite J, Richardson JA, Srivastava D, Firulli AB, Olson EN.

A GATA-dependent right ventricular enhancer controls dHAND transcription in the developing heart.

Development, 2000; 127: p.5331-5341.

Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Gañan Y, Economides AN, Hurlé JM.

The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb.

Development, 1999; 126(23): p. 5515-22.

Metscher BD und Ahlberg PE.

Dev Biol, 1999; 210(1): p.1-14. Review.

Michos O, Gonçalves A, Lopez-Rios J, Tiecke E, Naillat F, Beier K, Galli A, Vainio S, Zeller R

Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis.

Development, 2007; 134(13): p. 2397-405. Epub 2007.

Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Leali D, Ballmer-Hofer K, Zammataro L, Presta M.

Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2.

Development, 2007; 134(13): p. 2397-405. Epub 2007.

Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Leali D, Ballmer-Hofer K, Zammataro L, Presta M.

Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2.

Blood, 2010; 116(18): p. 3677-80. Epub 2010.

Miyazono K, ten Dijke P und Heldin C.-H.

TGF-signaling by Smad proteins.

Adv. Immunol., 2000.

Monteiro R, van Dinther M, Bakkers J, Wilkinson R, Patient R, ten Dijke P und Mummery C.

Two novel type II receptors mediate BMP signalling and are required to establish left-right asymmetry in zebrafish.

Dev Biol, 2008; 315: p.55-71.

Mommersteeg MT, Christoffels VM, Anderson RH und Moorman AF.

Atrial fibrillation: a developmental point of view.

Heart Rhythm, 2009; 6: p.1818-24.

Moormann AF, Soufan AT, Hagoort J, de Boer PA, Christoffels VM, Ann N Y.

Acad Sci, 2004; 1015: p.171-81.

Müller II, Knapik E W und Hatzopoulos AK.

Expression of the protein related to Dan and Cerberus gene--prdc-- During eye, pharyngeal arch, somite, and swim bladder development in zebrafish.

Dev Dyn, 2006; 235: p.2881-8.

Müller II, Melville DB, Tanwar V, Rybski WM, Mukherjee A, Shoemaker BM, Wang WD, Schoenhard JA, Roden DM, Darbar D, Knapik EW und Hatzopoulos AK.

Novel atrial fibrillation-associated gene GREMLIN2 regulates cardiac laterality, cardiomyocyte differentiation and atrial rhythm.

Disease Models and Mechanisms, 2012; in press.

Murray-Rust J, McDonald NQ, Blundell TL, Hosang M, Oefner C, Winkler F, Bradshaw RA.

Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors.

Structure, 1993; 1 (2): p.153-159.

Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P.

TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad-2, Smad-3 and Smad-4.

Embo J, 1997; 16 (17): p. 5353-5362.

Namkoong H, Shin SM, Kim HK, Ha SA, Cho GW, Hur SY, Kim TE, Kim JW.

The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein.

BMC Cancer, 2006; 6: p. 74.

Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H.

Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow.

Nature 2002; 418: p.96-99.

Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbaur B, Chambon P und Dolle P.

Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse.

Development, 2001; 128(7): p.1019-31.

Nishimatsu S und Thomsen GH.

Ventral mesoderm induction and patterning by BMP heterodimers in Xenopus embryo.

Mech Dev, 1998; 74: p.75-88.

Nohe A, Keating E, Knaus P, Peterson NO.

Signal transduction of BMP receptors.

Cellular Signaling, 2004; 16: p.291-99.

Nowotschin S, Liao J, Gage PJ, Epstein JA, Campione M, Morrow BE.

Tbx1 affects asymmetric cardiac morphogenesis by regulating Pitx2 in the secondary heart field.

Development, 2006; 133: p.1565-1573.

Nguyen-Tran VTB, Chen J, Ruiz-Lozano P, Chien KR.

The MLC-2 Paradigm for Ventricular Heart Chamber Specification, Maturation, and Morphogenesis.

Heart Development, 1999; Academic Press.

Ohtori S, Yamamoto T, Ino H, Hanaoka E, Shinbo J, Ozaki T, Takada N, Nakamura Y, Chiba T, Nakagawara A, Sakiyama S, Sakashita Y, Takahashi K, Tanaka K, Yamagata M, Yamazaki M, Shimizu S, Moriya.

Differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma protein modulates inflammatory pain in the spinal dorsal horn.

Neuroscience, 2002; 110(3): p.579-86

Olson EN.

Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart.
Science, 2006; 313: p.1922-1927.

Olson EN und Srivastava D.

Molecular pathways controlling heart development.
Science, 1996; 272: p.671-676.

Park C, Lavine K, Mishina Y, Deng CX, Ornitz DM, Choi K.

Bone morphogenetic protein receptor 1A signaling is dispensable for hematopoietic development but essential for vessel and atrioventricular endocardial cushion formation.
Development 2006; 133: p.3473-3484.

Peterkin T, Gibson A, Loose M, Patient R.

The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development.
Semin Cell Dev Biol, 2005; 16: p.83-94.

Plageman TF, Yutzey Jr und KE.

Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development.
J Biol Chem, 2004.

Ray AD und Holloway JA.

Bone implants. Preliminary report of an experimental study.
J Bone Joint Surg Am, 1957; 39: p.1119-28.

Reddi AH.

The Cytokine Handbook.
Elsevier Science Ltd., 2003.

Reiter JF, Alexander J, Rodaway A, Yelon D, Patient R, Holder N and Stainier DY.

Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish.
Genes Dev, 1999; 13(22): p. 2983-95.

Reiter JF, Verkade H und Stainier DY.

Bmp2b and Oep promote early myocardial differentiation through their regulation of gata5.
Dev Biol, 2001; 234(2): p. 330-8.

Rengachary SS.

BMPs: basic concepts.
Neurosurg Focus, 2002; 13: Article 2.

Rojas A, De Val S, Heidt AB, Xu SM, Bristow J, Black BL.

Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead and GATA transcription factors through a distal enhancer element.

Development, 2005; 132: p.3405-3417.

Sampath TK und Reddi AH.

Dissociative extraction and reconstitution of bone matrix components involved in local bone differentiation.

Proc Natl Acad Sci USA, 1981; 78: p.7599-7603.

Schedel H, Schneller A, Vogl T et al.

MRI: a follow-up study after femur core decompression and instillation of rhBMP-2 in avascular femur head necrosis.

Röntgenpraxis, 2000; 53: p.16-24.

Scheufle C, Sebald W und Hulsmeier M.

Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution.

J Mol Biol, 1999; 287: p.103-15.

Schlange T, Arnold HH und Brand T.

BMP2 is a positive regulator of Nodal signaling during left-right axis formation in the chicken embryo.

Development, 2002; 129: p.3421-9.

Schneider VA und Mercola M.

Wnt antagonism initiates cardiogenesis in Xenopus laevis.

Genes Dev, 2001; 15: p. 304-315.

Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB.

A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis.

Genes Dev 1997; 11: p.451-462.

Senn N.

On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone.

Am J Med Sci, 1889; 98: p.219-43

Serbedzija GN, Chen JN, und Fishman MC.

Regulation in the heart field of zebrafish.

Development, 1998; 125(6): p. 1095-101.

Sharrard WJ und Collins DH.

The fate of human decalcified bone grafts.

Proc Roy Soc Med, 1961; 54: p.1101-02.

Shi Y, Katsev S, Cai C, Evans S.

BMP signaling is required for heart formation in vertebrates.
Dev Biol, 2000; 224: p.226-237,277,278.

Song L, Fassler R, Mishina Y, Jiao K, Baldwin HS.
Essential functions of Alk3 during AV cushion morphogenesis in mouse embryonic hearts.
Dev Biol, 2007; 301: p.276-286.

Spencer FA, Hoffmann FM, Gelbart WM.
Decapentaplegic: a gene complex affecting morphogenesis in Drosophila melanogaster Cell.
1982; 28: p.451-461.

Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN.
Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND.
Nat Genet, 1997; 16: p.154-160.

Srivastava D.
Making or breaking the heart: From lineage determination to morphogenesis.
Cell, 2006; 126: p.1037-1048.

Stabile H, Mitola S, Moroni E, Belleri M, Nicoli S, Coltrini D, Peri F, Pessi A, Orsatti L, Talamo F, Castronovo V, Waltregny D, Cotelli F, Ribatti D, Presta M.
Bone morphogenic protein antagonist Drm/gremlin is a novel proangiogenic factor.
Blood, 2007; 109(5): p. 1834-40. Epub 2006.

Staehling-Hampton K, Hoffmann FM, Baylies MK, Rushton E, Bate M.
dpp induces mesodermal gene expression in Drosophila.
Nature, 1994; 372: p.783-786.

Stainier DY und Fishman MC.
Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity.
Dev Biol, 1992; 153(1): p. 91-101.

Stainier DY, Lee RK and Fishman MC.
Development, 1993; 119(1): p.31-40.

Stainier DY.
Nat Rev Genet, 2001; 2(1): p. 39-48.

Stennard FA, Costa MW, Elliott DA, Rankin S, Haast SJ, Lai D, McDonald LP, Niederreither K, Dolle P, Bruneau BG, Zorn AM and Harvey RP.
Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart.

Dev Biol, 2003; 262(2): p. 206-24.

Stennard FA, Costa MW, Lai D, Biben C, Furtado MB, Solloway MJ, McCulley DJ, Leimena C, Preis JI, Dunwoodie SL, Elliott DE, Prall OW, Black BL, Fatkin D, and Harvey RP.

Development, 2005; 132(10): p. 2451-62.

Stottmann RW, Choi M, Mishina Y, Meyers EN, Klingensmith J.

BMP receptor 1A is required in mammalian neural crest cells for development of the cardiac outflow tract and ventricular myocardium.

Development, 2004; 131: p.2205-2218.

Stang MM.

Klonierung, Herstellung und erste Charakterisierung des murin- humanen Fusionsproteins mGrem1-Fc.

Dissertation, 2012.

Sun J, Zhuang FF, Mullersman JE, Chen H, Robertson EJ, Warburton D, Liu YH, Shi W.

BMP4 activation and secretion are negatively regulated by an intracellular gremlin-BMP4 interaction.

J Biol Chem., 2006; 281(39): p. 29349-56. Epub 2006.

Suzuki M, Shigematsu H, Shames DS, Sunaga N, Takahashi T, Shivapurkar N, Iizasa T, Frenkel EP, Minna JD, Fujisawa T, Gazdar AF.

DNA methylation-associated inactivation of TGFbeta-related genes DRM/Gremlin, RUNX3, and HPP1 in human cancers.

Br J Cancer, 2005; 93(9): p. 1029-37.

Tanaka M, Chen Z, Bartunkova S, Yamasaki N and Izumo S.

The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development.

Development, 1999; 126(6): p. 1269-80.

ten Dijke P et al.

Identification of type I receptor for OP-1 and BMP-4.

J Biol Chem, 1994; 269: p.16985-8.

ten Dijke P, Miyazono K und Heldin C.-H.

Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors.

Curr. Opin. Cell Biol., 1996; 8(2): p.139-145.

Topol LZ, Marx M, Laugier D, Bogdanova NN, Boubnov NV, Clausen PA, Calothy G, Blair DG.

Identification of drm, a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture.

Mol Cell Biol, 1997; 17(8): p. 4801-10.

Topol LZ, Bardot B, Zhang Q, Resau J, Huillard E, Marx M, Calothy G, Blair DG.

Biosynthesis, Post-translation Modification, and Functional Characterization of Drm/Gremlin.

J Biol Chem, 2000; 275(12): p. 8785-93.

Trinhle A und Stainier DY.

Methods Cell Biol, 2004; 76: p. 455-73.

Tzahor E und Lassar AB.

Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis.

Genes Dev, 2001; 15: p.255-260.

Urist MA.

Bone: formation by autoinduction.

Science, 1965; 150: p.893-9 und Clin Orthop Relat Res, 2002; 395:p. 4-10.

van Wijk B, Moorman AF, van den Hoff MJ.

Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation.

Cardiovasc Res., 2006; 74: p.244-255.

Vitelli F, Taddei I, Morishima M, Meyers EN, Lindsay EA, Baldini A.

A genetic link between Tbx1 and fibroblast growth factor signaling.

Development, 2002; 129: p.4605-4611.

Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJ.

Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules.

Mol Endocrinol, 2001; 15(5): p. 681-94. Review.

Waldo KL, Hutson MR, Ward CC, Zdanowicz M, Stadt HA, Kumiski D, Abu-Issa R, Kirby ML.

Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart.

Dev Biol, 2005; 281: p.78-90.

Walters MJ, Wayman GA and Christian JL.

Bone morphogenetic protein function is required for terminal differentiation of the heart but not for early expression of cardiac marker genes.

Mech Dev, 2001; 100: p.263-273.

Wang J, Sridurongrit S, Dudas M, Thomas P, Nagy A, Schneider MD, Epstein JA, Kaartinen V.

- Atrioventricular cushion transformation is mediated by ALK2 in the developing mouse heart.*
Dev Biol 2005; 286: p.299-310.
- Wang DJ**, Zhi XY, Zhang SC, Jiang M, Liu P, Han XP, Li J, Chen Z, Wang CL.
The bone morphogenetic protein antagonist Gremlin is overexpressed in human malignant mesothelioma.
Oncol Rep., 2012; 27(1): p. 58-64. doi: 10.3892/ or. 2011; 1463. Epub 2011.
- Weber C**, Erl W, Weber PC.
Lovastatin induces differentiation of Mono-Mac 6 cells.
Biochem Funct; 1995; 13: p.273–277.
- Weinstein BM** und Fishman MC.
Cardiovasc Res, 1996; 31 Spec No: p. E17-24.
- Wordinger RJ**, Zode G, Clark AF.
Focus on molecules: gremlin.
Exp Eye Res, 2008; 87(2): p. 78-9. Epub 2007, Review.
- Wordinger RJ**, Zode G, Clark AF.
Focus on molecules: gremlin.
Exp Eye Res, 2008; 87(2): p. 78-9. Epub 2007, Review.
- Wozney JM.**
The BMP family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult.
Eur J Oral Sci, 1998; 106: p.160-66.
- Wrana JL**, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J.
Mechanism of activation of the TGF-beta receptor.
Nature, 1994; 370: p.341-347.
- Xu H**, Morishima M, Wylie JN, Schwartz RJ, Bruneau BG, Lindsay EA, Baldini A.
Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract.
Development, 2004; 131: p.3217-3227.
- Yamagishi H**, Maeda J, Hu T, McAnally J, Conway SJ, Kume T, Meyers EN, Yamagishi C, Srivastava D.
Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer.
Genes Dev, 2003; 17: p.269-281.
- Yamamoto Y** und Oelgeschläger M.
Regulation of BMPs in early embryonic development.
Naturwissenschaften, 2004; 91: p.519-34.

Yang L, Cai CL, Lin L, Qyang Y, Chung C, Monteiro RM, Mummery CL, Fishman GI, Cogen A, Evans S

Isl1Cre reveals a common Bmp pathway in heart and limb development.
Development, 2006; 133: p.1575-1585.

Yanagita M.

BMP antagonists: Their role in development and involvement in pathophysiology.

Cytokine & Growth Factors Reviews, 2005; 16: p.309-17.

Yashiro K, Shiratori H, Hamada H.

Haemodynamics determined by a genetic programme govern asymmetric development of the aortic arch.

Nature, 2007; 450: p.285-288.

Yelon D.

Cardiac patterning and morphogenesis in zebrafish.

Dev Dyn, 2001; 222(4): p 552-63.

Yelon D, Feldman JL and Keegan BR.

Genetic regulation of cardiac patterning in zebrafish.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002; 67: p. 19-25.

Yelon D, Horne SA und Stainier DY.

Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish.

Dev Biol, 1999; 214(1): p. 23-37.

Yelon D und Stainier DY.

Patterning during organogenesis: genetic analysis of cardiac chamber formation.

Semin Cell Dev Biol, 1999; 10(1): p. 93-8.

Yelon D und Stainier DY.

Pattern formation: swimming in retinoic acid.

Curr Bio, 2002; 12(20): p. R707-9.156.

Yelon D, Weinstein BM und Fishman MC.

Cardiovascular system.

Results Probl Cell Differ 2002; 40: p. 298-321.

Yutzey KE, Rhee JT und Bader D.

Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart.

Development, 1994; 120(4): p. 871-83.

Zaffran S und Frasch M.

Early signals in cardiac development.

Circ Res, 2002; 91(6): p.457-69.

Zhang Q, Shi Y, Wada J, Malakauskas SM, Liu M, Ren Y, Du C, Duan H, Li Y, Li Y, Zhang Y.

In Vivo Delivery of Gremlin siRNA Plasmid Reveals Therapeutic Potential against Diabetic Nephropathy by Recovering Bone Morphogenetic Protein-7.

PLoS One. 2010; 5(7): e11709.

Zhang Y, Zhang Q.

Bone morphogenetic protein-7 and Gremlin: New emerging therapeutic targets for diabetic nephropathy.

Biochem Biophys Res Commun. 2009; 383(1): p.1-3. Epub. 2009, Review.

Zimmerman C M und. Mathews LS.

Activin receptors: cellular signalling by receptor serine kinases.

Biochem Soc Symp, 1996; 62: p.25-38.

Zwijzen A, Verschueren K, Huylebroek D.

New intracellular components of BMP/Smad signalling cascade.

FEBS Letters, 2003; 546: p.133-39

8. Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Iris Müller bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Christopher Antos, vom Max-Planck-Institut in Tübingen bzw. von der TU Dresden, für die Bereitstellung der Zebrafische.

Mein Dank gilt auch dem gesamten Laborteam der AG Gawaz, bes. Frau Christina Neff, die mich immer bereitwillig unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte danke ich Herrn Professor Dr. Meinrad Gawaz für die Annahme als Doktorandin.

9. Lebenslauf

Name: Sandra Scheitza

Geburtsdatum: 04.09.1981

Geburtsort: Farnkfurt am Main/ Höchst

Eltern: Peter Scheitza, Diplom. Betriebswirt & Elvira Scheitza, gebr. Leschinger, Bürokauffrau

Schulbildung:

1988-1992 Grundschule Reifenberg i.Ts.

1992-1999 St. Angela Gymnasium, Königstein i.Ts

1999-2001 Graf-Anton-Günther Gymnasium Oldenburg/Oldb.

Studium:

2002-200 Studium der Zahnmedizin an der Universität Leipzig:

Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 22.10.2003

2005-2009 Studium der Zahnmedizin an der Eberhardt-Karls Universität Tübingen:

Zahnärztliche Vorprüfung am 5.10.2006

Staatsexamen am 15.6.2009

Beruf:

September 2009 – August 2011 Assistenzzeit bei Dres. Grodeck in Delmenhorst

Von September 2011 bis März 2013 angestellte Zahnärztin in o.g. Praxis

Seit September 2012 zertifizierte Parodontologin der APW

Seit April 2013 in eigener Praxis niedergelassen in Ganderkesee-Schierbrok