

Analyse genetischer Programme in der Entwicklung von Epikard und sinoatrialem Knoten am venösen Pol des Herzens

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von
Dipl.-Biochem. Thomas Grieskamp,
geboren am 23.05.1980 in Ahlen

2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.03.2006 bis zum 15.12.2010 am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Kispert angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Andreas Kispert
Korreferentin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner
Tag der Promotion: 03.03.2011

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Andreas Kispert für die Möglichkeit, in seinem Labor dieses spannende Projekt angehen zu dürfen, sowie seine engagierte und exzellente Betreuung und Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Cornela Wiese, Dr. Vincent Christoffels, Timo Lüdtker, Carsten Rudat und Julia Norden danke ich für ihren Beitrag zu dieser Arbeit und für viele hilfreiche Diskussionen.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie, insbesondere den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Andreas Kispert, für ihre Unterstützung, ihre Vorschläge und die sehr nette Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt Frau Marianne Petry für ihre wertvollen Ratschläge und ihre freundliche Hilfe.

Ferner gilt mein Dank wissenschaftlichen Kollegen in aller Welt für das Überlassen von Plasmiden, Antikörpern und die Bereitstellung von transgenen Mauslinien.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern und meiner Oma, die mich während meines Studiums uneingeschränkt unterstützt und motiviert haben und ohne die es diese Arbeit nicht gegeben hätte.

Für meine Eltern.

Zusammenfassung

Die Entwicklung des murinen Herzens ist ein hoch komplexer und genetisch streng regulierter Vorgang, der früh in der Embryonalentwicklung zur Bildung eines funktionellen Organs führt. Dieses hat zunächst die Gestalt eines einfachen linearen Schlauchs, der das venöse Blut vom posterioren (venösen) Einflussbereich nach anterior, dem Ausflussbereich pumpt. Durch Rekrutierung von Vorläuferzellpopulationen sowohl am anterioren als auch venösen Pol kommt es zur Verlängerung des linearen Herzschauchs. Anschließende Differenzierungs- und Morphogeneseprozesse führen zur Ausbildung des vierkammrigen Herzens.

Der venöse Pol ist also ein wichtiges Rekrutierungszentrum für viele Zellen des wachsenden Herzens. Es konnte gezeigt werden, dass er Zellen für die Differenzierung der Kavalvenen zur Verfügung stellt (Christoffels et al., 2006). An dieser Entwicklung ist der T-Box Transkriptionsfaktor *Tbx18* beteiligt. Der Sinusknoten (SK), der dominante Taktgeber des Herzens, ist teilweise in das Myokard der Kavalvenen eingebettet und daher vermutlich mit ihrer Entwicklung verbunden. Darüber hinaus ist der venöse Pol eng mit der Zellpopulation des Proepikardialorgans (PeO) assoziiert, welche an der Oberfläche des Septum transversum in direkter Nachbarschaft zu den Sinus-Hörnern (embryonalen Vorläufer der Kavalvenen) liegt. Dieses PeO exprimiert ebenfalls *Tbx18* und bildet das Epikard und in der Folge Teile der Koronargefäße. Trotz der Wichtigkeit des venösen Pols in der Entwicklung, sind die genetischen Grundlagen, die zu seiner Etablierung und seiner Differenzierung in Kavalvenen, Sinusknoten und Epikard (Koronargefäße) führen, nur unvollständig verstanden.

In dieser Arbeit wurde die Funktion von *Tbx18* für die Entwicklung des SK in der Maus auf morphologischer, histologischer und molekularer Ebene weitergehend charakterisiert. Der SK besteht aus einer großen Kopfdomäne innerhalb der rechten Kavalvene und einer Schwanzdomäne innerhalb der Crista terminalis. Es konnte gezeigt werden, dass diese beiden Domänen separate regulatorische Bereiche mit unterschiedlichen genetischen Programmen sind. *Tbx18* wird für die Bildung der Kopfdomäne benötigt. Ein Verlust von *Tbx18* führt zu einem Verlust der Kopfdomäne, die Schrittmacherfunktion kann aber auch von der Schwanzdomäne übernommen werden. Schaltet man neben *Tbx18* auch noch den T-Box Transkriptionsfaktor *Tbx3* aus, von dem man vorher gezeigt hat, dass er für eine korrekte Genregulation im SK

notwendig ist, ergibt sich ein additiver Phänotyp, mit einem Verlust der Kopfdomäne und ektopischer Expression atrialer Marker (wie *Cx40*) im Rest des Knotens. Dies lässt auf zwei unabhängige Funktionen von *Tbx3* und *Tbx18* in der SK-Entwicklung schließen. *Tbx18* kontrolliert die Rekrutierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zum SK-Kopf und sobald dieses Myokard gebildet wurde, sichert *Tbx3* die Aufrechterhaltung des spezifischen SK-Genprogramms.

In einem weiteren Teilprojekt wurde die Rolle des Notch-Signalweges in der Entwicklung des Epikards und der Koronargefäße untersucht. Es konnte die Expression von Signalwegskomponenten sowohl im frühen Epikard, als auch während der Koronargefäßentwicklung bestimmt werden. Epikardialer Verlust von *Rbpj*, dem intrazellulären Vermittler des kanonischen Notch-Signalweges, führt bei adulten Tieren zu stark vergrößerten Koronar-Arterien und Venen. Mit Hilfe einer *Tbx18* basierten Zellschicksalsanalyse, konnte gezeigt werden, dass das Epikard zu Fibroblasten und koronaren glatten Muskelzellen beiträgt, aber nicht zu endothelialen und myokardialen Zellen. In der *Rbpj*-Mutante kondensieren diese Zellen auch um die Koronararterien, differenzieren aber nicht in glatte Muskelzellen. Konditionelle frühzeitige Aktivierung des Notch-Signalweges im Epikard führt zu verfrühter glattmuskulärer Differenzierung und verhindert koronare Angiogenese. Der Notch Signalweg ist also sowohl notwendig als auch ausreichend im Epikard und der Koronargefäßentwicklung glattmuskuläre Differenzierung auszulösen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass er dabei den Tgfb-Signalweg reguliert und mit ihm gleichzeitig kooperiert.

Schlagworte: Mausentwicklung, *Tbx18*, Sinusknoten, Notch-Signalweg, Epikard-entwicklung, Koronargefäßentwicklung, glatte Muskelzellen

Abstract

The development of the murine heart is a highly complex and genetically strictly regulated process, which results in the first functional organ in the developing embryo. At this point it is a simple tube-like structure, pumping blood from the posterior venous pole towards the anterior outflow tract. Recruitment of precursors from the anterior and posterior pole drive the elongation of this linear heart tube. Continuous differentiation and morphological changes lead to establishment of the mature four chambered heart.

The venous pole is an important precursor pool for cells of the developing heart. Under the control of the T-Box transcription factor *Tbx18* the venous pole provides cells for the differentiation of caval veins. The sinoatrial node (SAN), the dominant pacemaker of the heart, is part of the myocardium of the caval veins and thus it is strongly joined to its development. Additionally the venous pole is spatially associated with the proepicardial organ (PEO), a population of cells at the surface of the septum transversum region. The PEO is also positive for *Tbx18* and gives rise to the epicardium, the partial origin of coronary vasculature. Despite the importance of the venous pole, the genetic fundamentals that regulate its formation and differentiation into caval veins, SAN and epicardium (coronary vasculature) are insufficiently understood.

In this work, the role of the T-Box transcription factor *Tbx18* in SAN development was characterised by morphological, histological and molecular experiments in mouse. The SAN consists of a large head within the right caval vein, and a tail along the terminal crest. We found that both parts represent separate regulatory domains expressing distinctive gene programs. *Tbx18* is required to establish the head domain. Loss of *Tbx18* lead to loss of this domain, but the pacemaker function can be overtaken by the remaining tail domain. Combined loss of *Tbx18* und *Tbx3*, which controls differentiation of sinus node cardiomyocytes, resulted in an additive phenotype, a loss of the head domain and ectopic expression of atrial markers like *Cx40* in the remaining tail. Our data provide evidence for independent functions of *Tbx18* and *Tbx3* in SAN formation, in which *Tbx18* controls the recruitment of mesenchymal precursors to the SAN head, and *Tbx3* imposes the SAN specific gene program.

A second part of the work was to define the role of Notch signaling in murine epicardial and coronary vasculature development. We detected expression of a number of

pathway components in early epicardial development as well as during formation of coronary vasculature. Adult mice with epicardial deletion of *Rbpj*, the intracellular mediator of canonical Notch signaling, exhibited enlarged coronary arteries and veins. Using a Tbx18 based genetic lineage tracing system it was shown that the epicardium gives rise to fibroblasts and coronary smooth muscle cells but not to endothelial and myocardial cells. In *Rbpj*-deficient mice cells surround the developing coronary arteries but fail to differentiate into smooth muscle cells. Conditional activation of Notch signaling in the epicardium leads to premature smooth muscle cell differentiation, and prevents coronary angiogenesis. Notch signaling is for this reason necessary and sufficient for coronary smooth muscle differentiation. We could also show that it regulates, and cooperates with Tgfb signaling.

Key words: Mouse development, Tbx18, sinoatrial node, Notch signaling, epicardial development, coronary vessel development, smooth muscle cells

ABKÜRZUNGEN.....	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Das Säugerherz.....	2
1.1.1 Das Reizleitungssystem	3
1.2 Die embryonale Entwicklung des Herzens	4
1.2.1 Die Entstehung des sinoatrialen Knoten in der Herzentwicklung	8
1.2.2 T-Box Gene in der Herzentwicklung.....	9
1.2.3 <i>Tbx18</i> in der Embryonalentwicklung	11
1.3 Die Rolle des Epikards in der Herzentwicklung.....	13
1.3.1 Genetische Kontrolle der Epikardentwicklung	17
1.4 Der Notch Signalweg	20
1.4.1 Die Rolle des Notch Signalwegs in der Herz- und Gefäßentwicklung	22
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
2. MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1 Reagenzien und Geräte	24
2.2 DNA-Vektoren, rekombinante Plasmide und Wirtssysteme.....	29
2.2.1 Klonierungsvektoren.....	29
2.2.2 Wirtssysteme.....	29
2.2.2.1 <i>Bakterienstämme</i>	29
2.3 Versuchstiere	29
2.4 Plasmidkonstrukte	30
2.5 DNA-Methoden.....	30
2.5.1 Lösungen	30
2.5.2 Medien und Agarplatten.....	31
2.5.3 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen	31
2.5.3.1 <i>Lagerung rekombinanter Bakterienstämme</i>	32
2.5.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	32
2.5.4.1 <i>Mini-Boiling-Methode</i>	32
2.5.4.2 <i>Plasmidisolierung mit Hilfe von M&N Midi-Säulen</i>	32
2.5.4.3 <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Photometrie</i>	32
2.5.5 Analyse von DNA-Fragmenten	33
2.5.5.1 <i>Restriktionsverdau von Plasmid-DNA</i>	33

2.5.5.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	33
2.6	RNA-Methoden.....	34
2.6.1	Lösungen.....	34
2.6.2	Herstellung von Hybridisierungssonden.....	35
2.6.3	<i>In situ</i> Hybridisierung.....	36
2.6.3.1	<i>Schnittpräparate</i>	36
2.6.4	3-D Geweberekonstruktion.....	38
2.7	Mausmethoden.....	38
2.7.1	Lösungen.....	38
2.7.2	Embryologische Methoden.....	38
2.7.2.1	<i>Verpaarung</i>	38
2.7.2.2	<i>Präparation der Embryonen</i>	39
2.7.2.3	<i>Fixierung und Dehydrierung von Embryonen und Geweben</i>	39
2.7.2.4	<i>Genotypisierung von Embryonen mittels Reportergenexpression</i>	39
2.7.2.5	<i>Genotypisierung von Embryonen mittels PCR</i>	40
2.7.3	Isolierung von Herzen aus Embryonen verschiedener Stadien.....	40
2.8	Histologische Methoden.....	41
2.8.1	Lösungen.....	41
2.8.2	Paraffinschnitte.....	41
2.8.3	Hematoxilin-Eosin-Färbung.....	41
2.8.4	Dokumentation.....	42
2.9	Zellkultur-Methoden.....	42
2.9.1	Lösungen und Medien.....	42
2.9.2	Zellkulturvorbereitungen.....	43
2.9.3	Explantation der isolierten Herzanteile.....	43
2.9.4	Weiterführung der Zellkultur.....	43
2.9.5	Dokumentation.....	44
2.10	Immunologische Methoden.....	44
2.10.1	Lösungen.....	44
2.10.2	Antigennachweis auf Schnitten.....	45
2.10.3	Antigennachweis in Zellkultur.....	45
2.10.4	TUNEL-Assay.....	46
2.10.5	BrdU-Inkorporationsassay.....	46
2.10.6	Dokumentation.....	46
3.	<u>ERGEBNISSE</u>.....	47

3.1 Funktion des T-Box Gens <i>Tbx18</i> in der SAN Entwicklung	47
3.1.1 <i>Sinusknotenbildung benötigt <i>Tbx18</i></i>	49
3.1.2 <i>Zellschicksalsanalyse der <i>Tbx18</i> positiven SAN-Domäne</i>	54
3.1.3 <i>Molekulare Analyse des SK in der <i>Tbx18/Tbx3</i> Doppelmutante</i>	55
3.2 Notch-Signalweg in der Epikardentwicklung	58
3.2.1 <i>Kontrolle der genutzten <i>Tbx18^{cre}</i> Maus</i>	62
3.2.2 <i>Massive morphologische Defekte nach epikardialem Verlust von <i>Rbpj</i> in den Koronargefäßen</i> ..	62
3.2.3 <i>Anschalten des Notch Signalweges im Epikard ist ausreichend für vorzeitige glattmuskuläre Differenzierung</i>	71
3.2.4 <i>Anschalten des Notch Signalweges führt auch zu glattmuskulärer Differenzierung in epikardialen Explantatkulturen</i>	76
3.2.5 <i>Der <i>Tgfb</i> Signalweg und die Expression von <i>Pdgfrb</i> ist dem Notch Signalweg nachgeschaltet</i> ...	80
4. DISKUSSION	82
4.1 Die Funktion von <i>Tbx18</i> in der Entwicklung des Sinusknotens	82
4.1.1 <i>Herkunft der SK-Zellen und Regulation der Entwicklung</i>	85
4.1.2 <i>Modell der SK-Entwicklung</i>	88
4.2 Der Notch-Signalweg in der Epikard Entwicklung	89
4.2.1 <i>Zellschicksale epikardialer Zellen</i>	89
4.2.2 <i>Der Notch Signalweg ist notwendig und ausreichend um glatte Muskelzelldifferenzierung zu induzieren</i>	90
4.2.3 <i>Die Funktion von TGF-vermittelter Signaltransduktion in Bezug auf den Notch Signalweg</i>	93
5. LITERATUR	97
6. LEBENSLAUF	106
7. ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	107
8. WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN	108
9. ANHANG	109

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Micro- (10^{-6})
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AV-Kanal	Atrioventrikulärer Kanal
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIC	Differential-Interferenzkontrast
diff.	differenziert(e)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DV	dorsoventral
E	Embryonaltag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transformation
EPDC	<i>epicardially derived cells</i>
et al. (et alteri)	und andere
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FCS/FKS	<i>fetal calf serum</i> /fetales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
G	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobulin
k	kilo-
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
<i>LacZ</i>	β-Galactosidase
LB Vollmedium	(Luria-Bertani-Medium)

LiCl	Lithiumchlorid
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	Milli- (10^{-3})
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mM	millimolar
mmol	millimol
mRNA	<i>messenger</i> RNA
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	New England Biolabs, Inc.
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMRi	Naval Medical Research Institute (USA), Mäusestamm
Ø	Durchmesser
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
p.A.	zur Analyse
p.c.	post coitum
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PDGF-BB	<i>platelet-derived growth factor-BB</i>
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potentia hydrogenii
POD	<i>horseradish peroxidase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rnasin	Rnase Inhibitor
RT	Raumtemperatur
SAN (SK)	<i>sinoatrial node</i> / sinoatrialer Knoten, oder Sinus Knoten
s.o.	siehe oben
sec	Sekunde(n)
SM-	<i>smooth muscle-</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderen
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
wt	Wildtyp
<i>Wt1</i>	Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor 1
z. B.	zum Beispiel
ZO1	Zonula occludens 1 (<i>Tight junction protein 1</i>)

1. Einleitung

„Das Herz hat seine Vernunft, die der Verstand nicht kennt.“

Blaise Pascal

Dieses und viele andere Zitate quer durch alle geschichtlichen Epochen und sämtlichen Glaubensrichtungen der Erde zeugen von der literarischen, emotionalen und philosophischen Bedeutung des menschlichen Herzens. Aber nicht nur im übertragenen Sinn hat das Herz eine wichtige, wenn nicht die wichtigste Funktion im menschlichen Körper. „Herz-Kreislauf-Erkrankungen waren 2006 mit 36% aller Todesfälle in nahezu allen OECD-Ländern die häufigste Todesursache.“ Zu den Ursachen gehören insbesondere die ischämischen (koronaren) Herzkrankheiten (OECD, 2009). Aber auch die kongenitalen Herzdefekte, von denen etwa 1 Neugeborenes aus 125 in den Vereinigten Staaten von Amerika (National Heart, Lung and Blood Institute. Congenital Heart Defects. December 2007.), mit mehr oder weniger stark ausgeprägtem Phänotyp, betroffen sind, machen die Notwendigkeit bewusst die entwicklungsbiologischen Grundlagen der Herzentwicklung zu verstehen. Aus diesem Verständnis heraus ergeben sich möglicherweise die Ansätze zur gezielten Therapie adaptierter und kongenitaler Herzdefekte.

1.1 Das Säugerherz

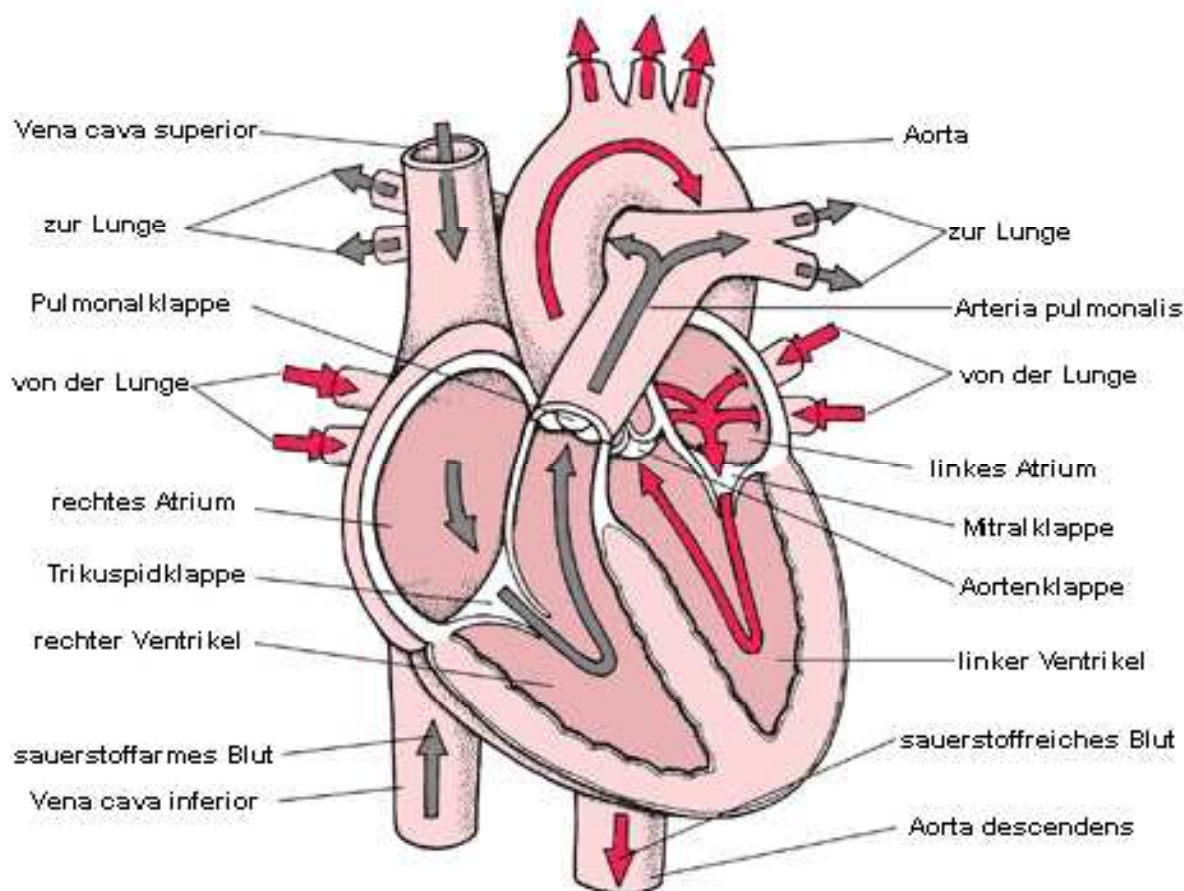


Abbildung 1-1: Anschnitt durch ein Säugerherz mit Blutstromrichtung.

Bild eines Herzens mit Anschnitten durch die Kammern, um die innere Struktur darzustellen. Rote Pfeile: sauerstoffreiches Blut, graue Pfeile: sauerstoffarmes Blut (nach Merck Manuals, Home Edition, 2003)

Um die detaillierten Vorgänge der Herzentwicklung später besser beschreiben zu können, sollte man erstmal die Struktur des Herzens und die Grundlagen der embryonalen Herzentwicklung beschreiben. Das adulte Herz von Säugern ist vereinfacht gesagt ein Muskel mit verschiedenen Hohlräumen. Diese 4 Hohlräume werden auch als Kammern bezeichnet. Zwei Vorkammern (Atrium) leeren das Blut in die größeren Hauptkammern (Ventrikel). Innerhalb des Herzens sorgen 4 Herzklappen dafür, dass das Blut innerhalb des Herzens nur in eine Richtung gepumpt werden kann. Der rechte Ventrikel pumpt das Blut in die Lungen, um Sauerstoff aufzunehmen und Kohlendioxid abzugeben. Mit Sauerstoff angereichertes Blut fließt von den Lungen in das linke Atrium zurück, von wo aus es in den linken Ventrikel und von dort durch den

ganzen Körper gepumpt wird. Für diesen größeren Körperkreislauf benötigt das Herz eine größere Pumpleistung als im kleineren Lungenkreislauf. Zu diesem Zweck wird der linke Ventrikel in der Embryonalentwicklung größer und kräftiger als der Rechte ausgebildet. Noch vor der Geburt werden diese beiden Ventrikel durch das Kammerseptum (Septum interventriculare) voneinander getrennt, wobei allerdings erst durch das Schließen des interatrialen Septums nach der Geburt wirklich zwei separate Kreisläufe etabliert werden.

1.1.1 Das Reizleitungssystem

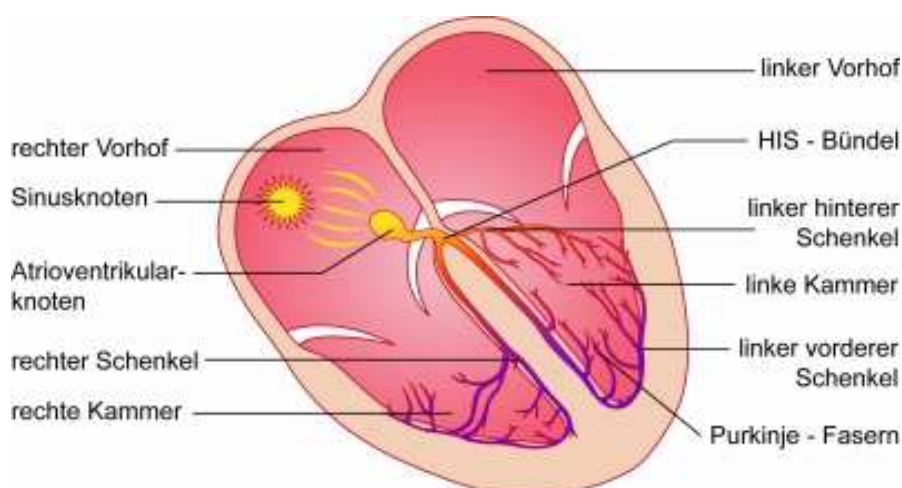


Abbildung 1-2: Schematischer Aufbau des Reizleitungssystems eines Säugerherz.

Bild eines Herzens mit Anschnitten durch die Kammern, Sinusknoten (sinoatrialer Knoten) (nach vitanet.de)

Kongenitale Herzdefekte werden oft begleitet von Arrhythmien. Diese erschweren eine effektive Therapie dieser Menschen erheblich. Arrhythmien basieren meist auf adaptiven oder kongenitalen Defekten des Reizleitungssystems. Heutzutage lassen sich vieler dieser Defekte, wie das „sick sinus syndrome“ nur mit der Implantation eines künstlichen Schrittmachers therapieren. Ein tieferes Verständnis der molekularen und zellulären Entstehung dieser Strukturen könnte das in Zukunft möglicherweise überflüssig machen.

In den letzten Jahren sind die Gene, die an der Entstehung kongenitaler Herzdefekte beteiligt sind, immer mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Der Großteil dieser Gene kodiert für Transkriptionsfaktoren wie die T-Box Gene, die im Folgenden näher beschrieben werden. Ein wichtiger Bestandteil des Reizleitungssystems ist der

sinoatriale Knoten, der auch als „Schrittmacher“ des Herzens bezeichnet wird. Dieser Name beschreibt seine Funktion, da seine Zellen in der Lage sind autonom zu depolarisieren und so die Reizleitungskaskade auszulösen, welche im Folgenden über den Rest des Reizleitungssystems weitergeleitet wird.

Für die Kontraktion der Herzmuskelzellen ist eine Entladung des elektrischen Potenzials an der Zellmembran notwendig. Diese Entladung beginnt im sinoatrialen Knoten, einer kleinen Gruppe von Zellen im rechten Atrium nahe der Verbindung zur vena cava superior und erreicht den atrioventrikulären Knoten, nachdem sie über den rechten und linken Vorhof gewandert ist. Da die Vorhöfe und die Hauptkammern elektrisch isoliert voneinander sind, kann die Entladung nur über den atrioventrikulären Knoten weitergeleitet werden, in dem sie verzögert wird. Diese Verzögerung ist von physiologischer Bedeutung um ein geordnetes Pumpen des Blutes vom Atrium zum Ventrikel zu gewährleisten. Nach dem AV-Knoten wird die Entladung über das His-Bündel zu dem rechten und linken Tawaraschenkel weitergeleitet, welche sich wiederum in die Purkinje-Fasern aufspalten, um so die gesamten ventrikulären Zellen zu erreichen.

Der sinoatriale Knoten (Sinusknoten) ist heterogen in Struktur und Funktion. Morphologische Studien beim Menschen beschreiben verschiedene Zelltypen innerhalb des Knotens (Irisawa et al., 1978): Primitiven Myozyten von unterschiedlicher Größe und dazwischenliegende Fibroblasten bilden die Hauptzellmasse (Boyett et al. 2000). Seine Form erinnert an ein Kommazeichen, wobei der Kopf in der Nähe der vena cava superior liegt und der Schwanz sich innerhalb der crista terminalis befindet (Liu et al. 2006).

1.2 Die embryonale Entwicklung des Herzens

Die Entwicklung des Herzens setzt in der Embryonalentwicklung zu dem Zeitpunkt ein, wenn der Embryo seinen Ernährungsbedarf nicht mehr alleine durch Diffusion decken kann. Die frühesten Vorläufer sind eine kleine Population von epithelialen Zellen, den sogenannten primären Herzfeldern, die bilateral paarweise angelegt werden und im cranio-lateralen Plattenmesoderm des späten Gastrulationsstadiums liegen (Harvey, 2002).

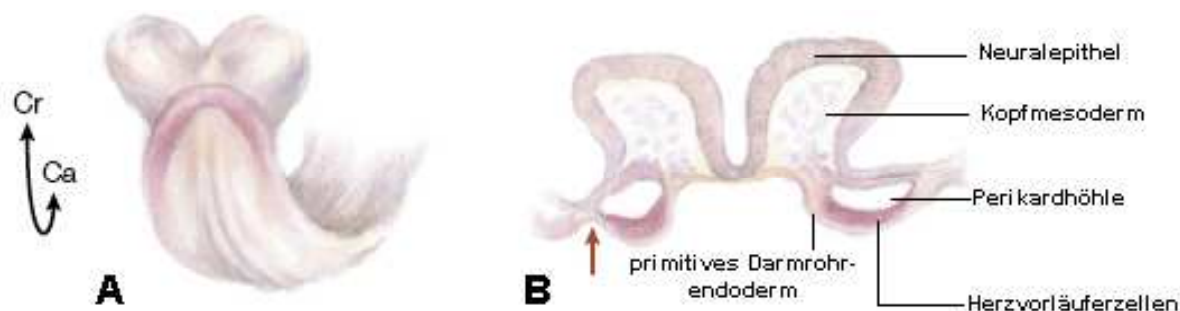


Abbildung 1-3: Herzentwicklung der Maus (E7,75)

(A) zeigt den ganzen Embryo, (B) einen repräsentativen transversen Schnitt durch den Embryo. Das Myokard und seine Vorläuferzellen sind rot hervorgehoben. Die Vorläuferzellen des murinen Herzens stellen sich als sichelförmiges Epithel im cranialen und cranio-lateralen Mesoderm dar. Die Vorläuferzellen dehnen sich lateral fast bis zur Verbindung zum extraembryonalen Gewebe aus (roter Pfeil). (Cr) Cranial, (Ca) Caudal (nach Harvey, 2002).

Das erste morphologische Zeichen der Herzentwicklung beginnt mit der Fusion dieser Vorläufer in der ventralen Mittellinie zum linearen Herzschlauch. Bei dieser Fusion werden zwei endokardiale Schläuche, die von myokardialen Zellen umgeben sind, zusammengebracht. Das Lumen des linearen Herzschlauchs wird zu diesem Zeitpunkt nur von endothelialen Zellen gebildet und von myokardialen Zellen umhüllt. Das Herz ist zu diesem Zeitpunkt das erste funktionale Organ.

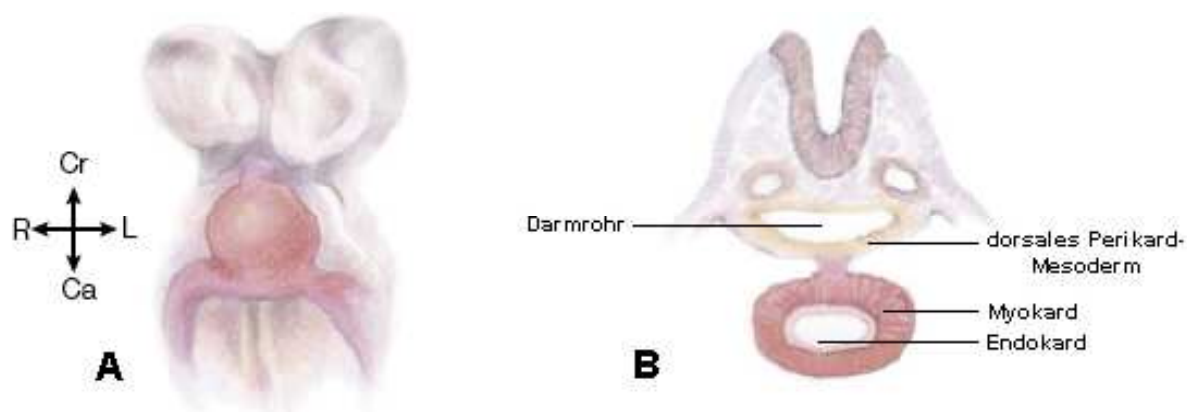


Abbildung 1-4: linearer Herzschlauch (E8,25)

(A) zeigt den ganzen Embryo, (B) einen repräsentativen transversen Schnitt durch den Embryo. Das Myokard ist rot hervorgehoben. Die Herzvorläuferzellen bewegen sich nach ventral und bilden den linearen Herzschlauch. Der Einflusstrakt ist caudal und der Ausflusstrakt cranial dargestellt. (Ca) Caudal, (Cr) Cranial, (L) Links, (R) Rechts (nach Harvey, 2002).

Die dorsale Grenze des Myokards bleibt nach der Fusionierung mit dem ventralen Darmrohr verbunden und bildet später das dorsale Mesokard. Wie der ganze Embryo,

hat auch der lineare Herzschlauch eine anteriore-posteriore Polarität, wobei die anteriore Region den „Ausflusstrakt“ (Conus cordis und Truncus arteriosus) und die posteriore Region die „Einflussregion“ (Sinus venosus) darstellt. Über den Sinus venosus wird das Blut von der Nabelschnur-Vene, der Kardinal-Vene und der Vitellinmembran-Vene in den Herzschlauch geleitet. Über den Conus cordis wird das frühe Herz mit den arteriellen Bögen der Aorta verbunden. Diese sind wiederum mit der dorsalen Aorta und der peripheren Zirkulation verknüpft. Im weiteren Verlauf des Wachstums des linearen Herzschlauches werden Zellen aus dem sekundären Herzfeld an beiden Polen hinzugefügt und der Herzschlauch verschlingt sich dabei zu seiner Rechten.

Primäres und sekundäres Herzfeld wurden in frühen Studien nicht unterschieden. Man war der Auffassung, dass das primäre Herzfeld der Ursprung für das gesamte Myokard des embryologischen Herzens ist (Rosenquist & DeHaan, 1966). Folgt man diesem Modell enthält der primitive Herzschlauch bereits alle späteren Kompartimente des Herzens in primitiver Form. Neuere Studien haben aber zeigen können, dass Zellen aus dem sekundären Herzfeld erst später hinzugefügt werden, um den primitiven rechten Ventrikel und den Ausflusstrakt zu bilden. Zellen des primären Herzfelds tragen nach diesen Analysen nur zum primitiven linken Ventrikel und zum Teil zum primitiven Atrium bei (Christoffels et al., 2000; Brand, 2003).

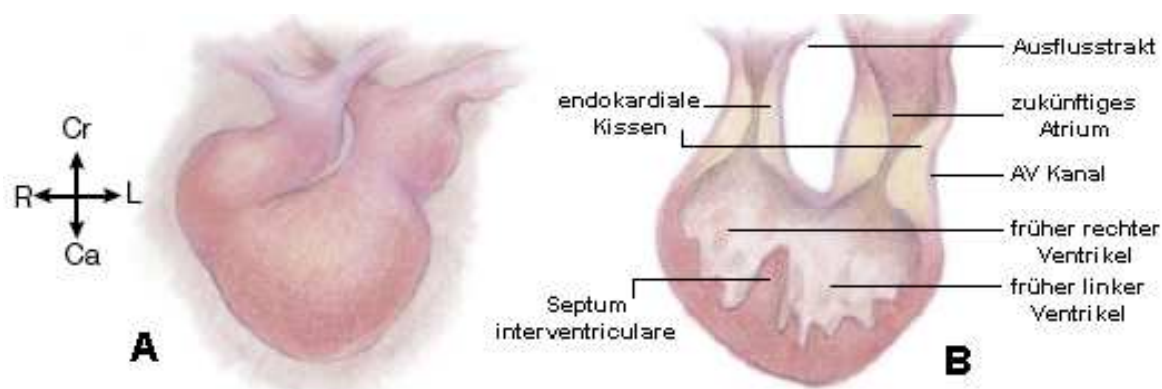


Abbildung 1-5: Verschlingung des Herzschlauchs (E10,5)

(A) zeigt das ganze Herz, (B) einen repräsentativen longitudinalen Schnitt durch das Herz. Die Verschlingung des linearen Herzschlauchs bringt den Einflusstrakt mit dem zukünftigen Atrium in eine dorsal-craniale Position über den zukünftigen Ventrikeln. Endokardiale Kissen im atrioventrikulären Kanal sind die Vorläufer der Mitral- und Trikuspidklappe. Endokardiale Kissen im Ausflusstrakt sind die Vorläufer des Septums zwischen Aorta und Arteria pulmonalis und der Aorten- und Pulmonalklappe. (Ca) Caudal, (Cr) Cranial, (L) Links, (R) Rechts (nach Harvey, 2002).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass schon zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt sowohl primäres als auch sekundäres Herzfeld klar definiert sind (Harvey, 2002). Das Verschlingen und Wachstum des Herzens bei gleichzeitig festen Polen erlaubt es dem primitiven Atrium, aus dem im späteren Verlauf die Kammern des Atriums hervorgehen, relativ zum gesamten Herzen gesehen in eine anterior-dorsale Position zu gelangen. Dabei nimmt der ventrikuläre und proximale Ausfluss-Trakt eine caudal-ventrale Position ein. Dieser Vorgang erlaubt es den bereits terminierten Herzregionen in ihre relative Position zueinander zu gelangen. Diese Schleifenbildung des Herzens ist die erste morphologische Veränderung, welche die Rechts-Links-Achse des Embryos sichtbar macht, während die dorso-ventrale und die anterior-posteriore Achse ja schon sehr viel früher deutlich wurden. Diese Schleifenbildung nach Rechts ist somit nicht zufällig, sondern die Konsequenz der vorher auf molekularer Ebene determinierten Achse und keine Konsequenz des Wachstums an sich (Taber TA. Et al, 1995). Die Trennung der Ventrikel wird im Folgenden durch das Septum interventrikulare abgeschlossen. Der Ausflusstrakt wird als Folge der Verschlingung zwischen den zukünftigen Atrien auf der ventralen Seite eingeklemt und bildet später die Aorta und die Pulmonalarterie. Der Einflusstrakt überspannt mit den Atrien die beiden Ventrikel auf der dorsalen Seite und bildet die Hohlvenen und die Pulmunalvenen.

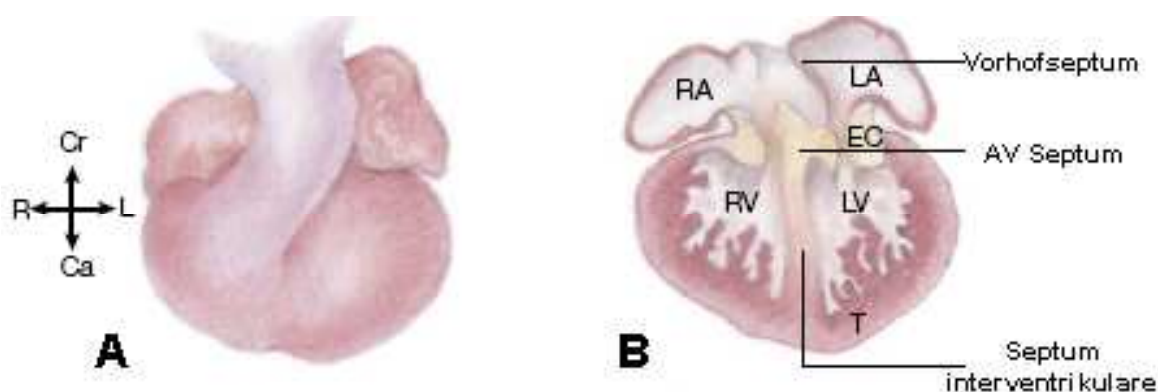


Abbildung 1-6: Ausgeformtes Herz (E12,5)

(A) zeigt das ganze Herz, (B) einen repräsentativen longitudinalen Schnitt durch das Herz. Nach der Neuordnung der Herzstrukturen ist die Trennung der Ventrikel durch das Septum interventrikulare abgeschlossen. Linkes und rechtes Atrium sind angelegt. Dies wird durch eine weitere Verschlingung des Herzens erreicht, wobei der Ausflusstrakt zwischen den zukünftigen Atrien auf der ventralen Seite eingeklemt wird. Der Einflusstrakt überspannt mit den Atrien die beiden Ventrikel auf der dorsalen Seite. (Ca) Caudal, (Cr) Cranial, (EC) Endokardiale Kissen, (L) Links, (LA) linkes Atrium, (LV) linker Ventrikel, (R) Rechts, (RA) rechtes Atrium, (RV) rechter Ventrikel, (T) Trabeculae (nach Harvey, 2002).

Das myokardiale interventrikuläre Septum verschmilzt mit dem atrioventrikulären Septum, welches sich aus den endokardialen Kissen des atrioventrikulären Kanals entwickelt. Die Kammerbildung wird aber letztendlich erst nach der Geburt abgeschlossen mit dem Verschluss des interatrialen Septums.

1.2.1 Die Entstehung des sinoatrialen Knoten in der Herzentwicklung

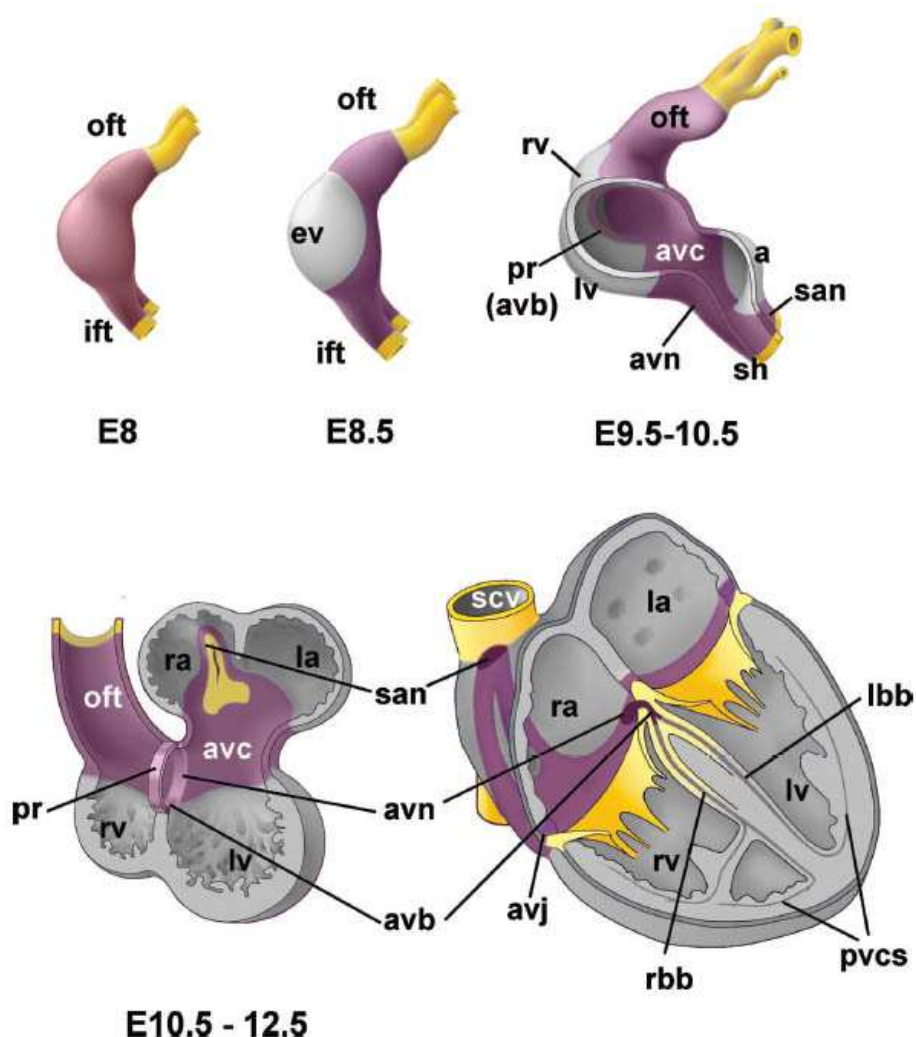


Abbildung 1-7: Embryologischer Ursprung von Teilen des Reizleitungssystems.

Bild eines Herzens während der Embryonalentwicklung mit Anschnitten. Früher Herzschlauch mit primitivem Gewebe (schwach lila). Kammermyokard expandiert (grau), während das Myokard außerhalb (lila) nicht expandiert und zu Teilen des Reizleitungssystems beiträgt. Bilder 1-3: laterale Sicht; Abkürzungen in Englisch (a) Atrium, (avb) atrioventrikuläre Bündel, (avc) Atrioventrikulärer Kanal, (avn) atrioventrikulärer Knoten, (avj) atrioventrikuläre Verbindung, (ev) primitiver Ventrikel, (ift) Einflusstrakt, (la) linkes Atrium, (lbb) linke Bündeläste, (lv) linker Ventrikel, (oft) Ausflusstrakt, (pr) primäre Ring – später avb, (pvcs) peripheres ventrikuläres Reizleitungssystem, (ra) rechtes Atrium, (rbb) rechte Bündeläste, (rv) rechter Ventrikel, (san) sinoatrialer Knoten, (scv) Vena cava superior, (sh) Sinus Horn, (Christoffels et al., 2009)

Die morphologische, entwicklungsbiologische und molekulare Entstehung des Reizleitungssystems und des SK war bis vor wenigen Jahren noch fast gänzlich unbekannt. Frühe histologische Analysen wiesen allerdings darauf hin, dass sich die erste „Schrittmacher“-Struktur zwischen E10 und 11 aus sinus horn Myocard bildet (Viragh et al., 1980, van Mierop et al., 1970). Spätere genetische Ansätze bestätigten diesen Fund und schlossen atriales Myokard als Quelle für den SK aus. Diese Experimente konnten eine essentielle Rolle von *Tbx3* in der Spezifizierung von Knotenzellen gegenüber atrialen Zellen beschreiben (Hoogars et al., 2007). *Tbx3* fungiert dabei als transkriptionaler Repressor, um Kammerbildung zu unterdrücken (Mommersteeg et al., 2007). *Tbx3* ist in diesem Zusammenhang aber nicht nur notwendig für die Differenzierung, sondern auch ausreichend für die Induktion des SK-Genprogramms im atrialen Myokard.

Für den analysierten Transkriptionsfaktor *Tbx18* konnte bisher nur eine Funktion in der benachbarten Region der Sinus Hörner (später Kavalvenen) nachgewiesen werden, wo es für die Rekrutierung und Myokalisierung der Zellen dieser Struktur notwendig ist (Christoffels et al., 2006).

1.2.2 T-Box Gene in der Herzentwicklung

Tbx-Gene (auch T-Box Gene) kodieren für eine große Familie von DNA bindenden Transkriptionsfaktoren. Es konnten schon für einige Familienmitglieder wichtige Rollen in der Herzentwicklung, aber auch der gesamten Embryonalentwicklung nachgewiesen werden. Bis heute konnten in Wirbeltieren 19 verschiedene T-Box Gene identifiziert werden. Die Entdeckung dieser Familie geht auf die Beschreibung von Brachyury (T) (Herrmann et al. 1990) zurück, nach dem T-Box-Transkriptionsfaktoren benannt sind.

Man findet T-Box Gene in verschiedenen Spezies, bis hin zum Menschen mit hoher evolutionärer Konservierung (Technau et al., 1999; Yi et al., 1999; Papaioannou 2001). Vergleichende genetische Untersuchungen weisen auf ein Urgen hin, aus dem sich durch Genduplikation und Translokation die heutige Vielfalt von T-Box Genen gebildet hat. (Agulnik et al., 1996). Die Nummerierung dieser Gene ist völlig willkürlich und ist auf den Zeitpunkt ihrer Entdeckung zurückzuführen (Papaioannou et al., 1999). Der dargestellte Stammbaum zeigt die phylogenetische Verwandtschaft der verschiedenen

T-Box Gene, wobei wir es mit 5 verschiedenen Subfamilien zu tun haben: *T*, *Tbr1/Eomes*, *Tbx6*, *Tbx2* und *Tbx1*.

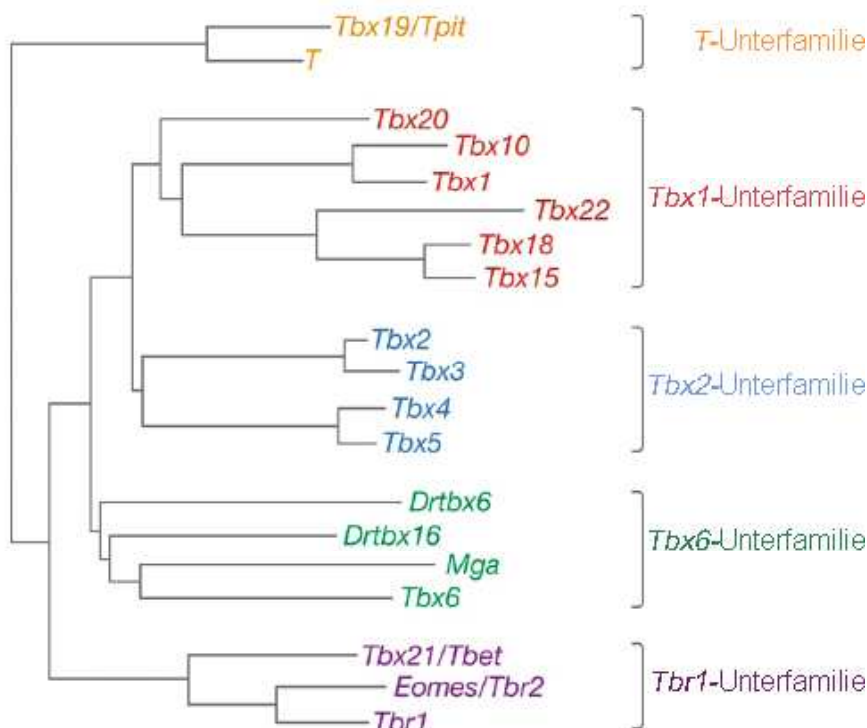


Abbildung 1-8: Phylogenetischer Stammbaum der T-Box Proteine der Maus (Naiche et al. 2005)

Die Unterfamilien sind Verwandtschaftsbeziehungen, die sich durch stärkere Sequenzähnlichkeit außerhalb der T-Box zeigen (Papaioannou, 2004; Showell et al., 2004; Kiefer, 2004).

Ihre Namen haben die T-Box Gene erhalten, da sie sich alle durch eine hoch konservierte charakteristische DNA-Bindungsdomäne von etwa 180 Aminosäuren auszeichnen, der T-Box (Kispert et al., 1993; Kispert et al., 1995). Diese Domäne bindet an einer spezifischen Bindungsstelle auf der DNA, der T-Bindungsstelle, welche aus einer palindromen Basensequenz aus zwei Halbseiten (TTTCACACCT) aufgebaut ist. Andere Familienmitglieder binden ebenfalls an diese Sequenz oder an Variationen in der Zusammenstellung der Halbseiten (Kispert et al., 1993; Ghosh et al., 2001; Sinha et al., 2000; Lingbeek et al., 2001).

Es konnten auch schon zu einzelnen T-Box Genen Mutationen im menschlichen Genom gefunden werden, die mit bestimmten Syndromen verbunden sind. Das DiGeorge-Syndrom entsteht bei Menschen mit einer Deletion in *TBX1*, Mutationen von *TBX3*

verursachen das Ulnar-Mammary-Syndrom, von *TBX4* das Small-Patella-Syndrom, von *TBX5* das Holt-Oram-Syndrom und von *TBX22* eine X-chromosomal vererbten Gaumenspalte mit Ankyloglosson (Verwachsung der Zunge am Mundboden) (Chieffoet al., 1997; Bamshad et al., 1997; Basson et al., 1997; Braybrook et al. 2001, Li et al., 1997). Sieben Mitglieder dieser Familie sind im Laufe der kardiovaskulären Entwicklung eines Säugerherzens exprimiert: *Tbx1*, *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx4*, *Tbx5*, *Tbx18* und *Tbx20*.

Tbx1 wird z.B. im Mesoderm des sekundären Herzfelds exprimiert und ist an dessen Regulation und Funktion und an der Bildung des Ausflusstraktes beteiligt. *Tbx2* wird im Myokard außerhalb der Herzkammern exprimiert, im Sinus venosus und im atrioventrikulären Kanal. *Tbx2* ist für dessen Differenzierung nötig, indem es Kammermyokard Differenzierung blockiert. *Tbx3* zeigt dabei eine Koexpression mit *Tbx2*. *Tbx4* wird im Bereich des Atriums exprimiert. *Tbx5* wird in den mesenchymalen Vorläuferzellen des Herzens und als Gradient im Herzschlauch mit der stärksten Expression im Sinus venosus exprimiert. *Tbx5* ist an der Kammerdifferenzierung beteiligt (Stennard and Harvey, 2005). *Tbx20* wird in den mesenchymalen Vorläuferzellen des Herzens und im gesamten Herzschlauch exprimiert. Es ist für die Kammerbildung von Bedeutung und reprimiert *Tbx2*, in dem es direkt auf dem Bmp/Smad Signalweg einwirkt (Singh et al., 2005, Singh et al. 2009). Nur *Tbx5* und *Tbx18* weisen eine epikardiale Expression auf (Hatcher et al., 2000; Kraus et al., 2001). Da die Expression und Funktion von *Tbx18* eine wichtige Rolle in dieser Arbeit spielen werden, wird im Folgenden nochmal detaillierter auf dieses T-Box Gen eingegangen.

1.2.3 *Tbx18* in der Embryonalentwicklung

Tbx18 gehört mit *Tbx15* und *Tbx22* zur *Tbx1*-Unterfamilie. Es kodiert für ein Protein mit 613 Aminosäuren und zeigt eine komplette Sequenzkonservierung in der T-Box Region im Vergleich zum humanen *TBX18*-Genlocus und 94,5% Sequenzübereinstimmung mit der Aminosäuresequenz. (Kraus et al., 2001).

Expression von *Tbx18* ist ab dem Embryonalstadium 7,75 in den segmentierten Somiten und im präsomitischen und paraxialen Mesoderm zu finden. *Tbx18* wird in den Gliedmaßenknospen und in der anterioren Somitenhälfte exprimiert, wo ist essentiell für die aufrecht Erhaltung der anterioposterioren Polarität der Somiten ist. (Bussen et al.,

2004). Außerdem exprimiert das Proepikardialorgan und das embryonale Epikard, die Kavalvenen und deren embryonale Vorläuferstrukturen, die Region des septum transversum sowie der linke Ventrikel *Tbx18*. Für die Ureterentwicklung konnte *Tbx18* im Labor von Prof. Kispert bereits als notwendig für die Differenzierung des Uretermesenchyms beschrieben werden (Airik et al., 2006). Außerdem ist die Expression von *Tbx18* im murinen Innenohr notwendig für die Musterung und Differenzierung des periotischen Mesenchyms (Trowe et al., 2008).

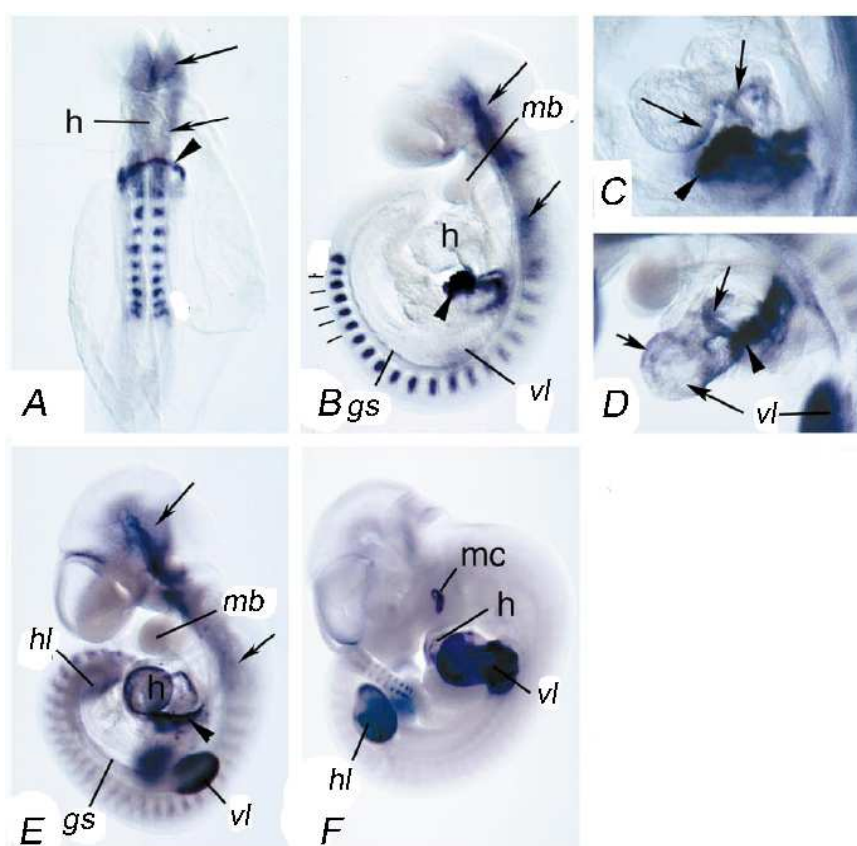


Abbildung 1-9: *Tbx18* Expression in der Mausentwicklung. Die *Tbx18* Expression während der Mausentwicklung wurde mittels in situ Hybridisierung ganzer Embryonen markiert. (B-F) laterale Ansicht, (A) ventrale Ansicht. (A) E8,25 (6 Somiten): Eine halbkreisförmige Expressionsdomäne von *Tbx18* im splanchnischen Mesoderm hat sich posterior zu Herzen geformt (Pfeilkopf). *Tbx18* Expression im paraxialen Mesoderm ist markiert (Pfeile). (B) E9,25, *Tbx18* Expression ist weiter in den anterioren Somitenhälften und im paraxialen Mesoderm zu sehen (Pfeile). Somitengrenzen sind mit Markierungen gekennzeichnet. Eine starke Expression ist im Proepikardialorgan und in den beiden verbindenden Flügeln im Mesoderm des Septum transversum zu sehen (Pfeilkopf). Außerdem ist eine schwache Expression im Genitalstreifen und den entstehenden Vordergliedmaßen zu sehen. (C) Höhere Vergrößerung der Herzregion eines E9,5 Embryo. Zellen des Proepikardialorgans (Pfeilkopf) beginnen sich über das posteriore Herzmyokard zu legen (Pfeile). (D) Bei E9,75 zeigt das ganze Epikard *Tbx18* Expression (Pfeile). Das Proepikardialorgan (Pfeilkopf) exprimiert weiterhin stark *Tbx18*. (E) E10,5 *Tbx18* Expression den Gliedmaßenknospen, im paraxialen Mesoderm (Pfeile) Mesothelium (Pfeilkopf) und Genitalstreifen. (F) E11,5, *Tbx18* Expression ist nun im Mesenchym zu sehen, das die Maxillare-Mandibulare Spalte umgibt. (vl) Vordergliedmaßen-Knospe, (gs) Genitalstreifen, (h) Herz, (hl) Hintergliedmaßen-Knospe, (mb) Mandibularbogen, (mc) Mandibular / Maxilliar Spalt Region (nach Kraus et al., 2001).

1.3 Die Rolle des Epikards in der Herzentwicklung

Während der frühen Herzentwicklung besteht der lineare Herzschlauch nur aus 2 Zellschichten, dem Endo- und Myokard, das nur durch extrazellulärer Matrix voneinander getrennt ist (engl.: cardiac jelly). Die ausgeformte Herzwand von Vertebraten ist allerdings aus drei Schichten aufgebaut, dem inneren Endokard, dem äußeren Epikard und dem Myokard dazwischen. Das Endokard kleidet alle Innenräume des Herzens aus und ist der zelluläre Ursprung der Herzklappen. Das Myokard ist als Muskelschicht hauptsächlich für Kontraktion und Pumpleistung verantwortlich und wichtig für Festigkeit, Größe und Gestalt des Herzens. Das Epikard bildet morphologisch die äußere Hülle des Herzens und besteht aus einschichtigem Epithelgewebe.

Dieses Epikard entwickelt sich aus einem extrakardialen Primordium, der proepikardialen Serosa (Proepikardialorgan). Ausgehend von einer Ansammlung von Zellen im Septum transversum, die der Perikardhöhle zugewandt sind und ventral der Leberknospe in der Nähe des Sinus venosus liegen, bedecken diese Zellen das Myokard (Viragh und Challice, 1981; Komiyama et al., 1987; Viragh et al., 1993; Männer, 1999). Das Proepikardialorgan setzt sich aus Zellen mesodermalen Ursprungs zusammen und ist eine Ansammlung mesenchymaler Zellen mit extrazellulärer Matrix. Um das Myokard zu erreichen müssen die Zellen des Proepikardialorgans einen Teil der Perikardhöhle durchqueren. In Säugetier- und Fischembryonen lösen sich einzelne Zellaggregate vom Proepikardialorgan ab, schwimmen frei in der Perikardhöhle und erreichen so die Myokardoberfläche (Komiyama et al., 1987; Kuhn und Liebherr, 1988; Munoz-Chapuli et al., 1997). In Vögel- und Amphibienembryonen werden die Zellen des Epikards über eine Gewebebrücke auf das nackte Myokard übertragen (Männer, 1992, 1993; Vrancken Peeters et al., 1995). Diese Brücke (sinus-ventrikuläres Ligament) wird zwischen dem Proepikardialorgan in der Nähe des Sinus venosus und der atrioventrikulären Grube ausgebildet.

An jedem Anheftungspunkt auf der Oberfläche bildet sich eine kleine Gruppe von epithelialen Zellen. Erst durch gleichmäßige Proliferation und Fusion mit anderen „Flecken“ erfolgt eine komplette Bedeckung des Myokards.

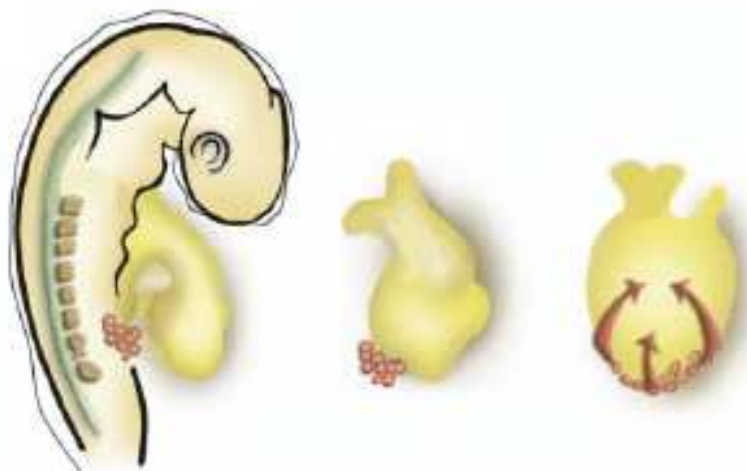


Abbildung 1-10: Bedeckung des Herzens mit Zellen aus dem Proepikardialorgan. Einzelne Zellaggregate lösen sich vom Proepikardialorgan ab, durchqueren die Perikardhöhle und erreichen die Mykardoberfläche (Komiya et al., 1987; Kuhn und Lieberr, 1988; Munoz-Chapuli et al., 1997). Nach Erreichen der Oberfläche bilden sich daraus flache und isolierte „Flecken“ von Epikard. Erst durch Proliferation und Fusion mit anderen „Flecken“ erfolgt eine komplette Bedeckung des Myokards (Chien et al., 2002).

Beide Mechanismen führen zur Bildung eines einschichtigen Epithels um das Myokard, welches als Epikard bezeichnet wird. (Komiya et al., 1987; Fransen und Lemanski, 1990; Männer, 1992; Vranken Peeters et al., 1995; Männer et al., 2001).

Nur die proximalen Anteile des Ausflusstraktes (Conus cordis), als Teil des zukünftigen Ventrikels, werden von Epikard bedeckt, welches sich vom Proepikardialorgan ableitet (Männer, 1999). Der distale Anteil (Truncus arteriosus), der intraperikardiale Anteil der späteren großen Arterien, wird dagegen möglicherweise von Epikard bedeckt, das sich vom perikardialen Mesothel an der Schnittstelle zwischen Ausflusstrakt und dorsaler Wand der Perikardhöhle ableitet.

Myokard und Epikard bilden im weiteren Entwicklungsverlauf einen mit subepikardialer Matrix gefüllten Raum, der zuerst in den arterioventrikulären, conoventrikulären und interventrikulären Gruben entsteht. Später erweitert sich dieser Raum über die Ventrikel und die ventralen Anteile des Atriums (Perez-Pomares et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass dieser Raum Fibronektin und Kollagen vom Typ I, IV, V, VI (Tidball, 1992; Hurle et al., 1994; Kalman et al., 1995; Bouchey et al., 1996; Kim et al., 1999), ebenso wie Proteoglykane und Laminin (Kalman et al., 1995), GP68 (Morita et al., 1998), Vitronektin, Fibrillin-2, Elastin (Bouchey et al., 1996), Tenaskin-X (Burch et al., 1995) und Flektin enthält (Tsuda et al., 1998). Diese Matrix akkumuliert Wachstumsfaktoren wie Fgfs

(engl.: fibroblast growth factor) und Vegfs (engl.: vascular endothelial growth factor) (Lavine et al., 2005; Tomanek et al., 1999).

Einige dieser epikardialen Zellen durchlaufen einen epithelial-mesenchymalen Übergang (EMT, engl.: epithelial mesenchymal transition). Sie lösen sich dabei aus dem Verbund des Epikardepithels ab, werden mesenchymal und dringen in den subepikardialen Raum ein (Perez-Pomarez et al., 1997; Dettmann et al., 1998).

Durch den Vorgang der EMT verändern diese Zellen nun die Struktur ihrer Intermediär-Filamente von einem epithelialen (Cytokeratin-positiven) zu einem mesenchymalen (Vimentin-positiven) Phänotyp (Perez-Pomarez et al., 1997, 1998b). Die Expression von Vimentin scheint für die Zellen notwendig zu sein, um einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp zu bekommen (Hay, 1995). Hierbei wird das Zytoskelett umstrukturiert, wobei die Aktinstruktur von der epithelialen, subkortikalen Anordnung in eine Anordnung mit Stressfasern umgewandelt wird (Landerholm et al., 1999).

Trennt man das Epikard vom Myokard oder wird die Entwicklung des Epikards mikrochirurgisch oder genetisch unterbrochen, führt dies zu Koronargefäßanomalien und einer dünneren Myokardwand (Männer, 1993; Kwee et al., 1995; Yang et al., 1995; Moore et al., 1999; Gittenberger-de Groot et al., 2000; Perez-Pomares et al., 2002a). Die Erklärung dafür ist, dass die aus dem Epikard hervorgehenden mesenchymalen Zellen normalerweise in die ventrikuläre Kammerwand einwandern, um z.B. die Gefäße der Koronarien zu bilden. Markierungsexperimente mit Wachtel-Hühnchen Chimären und andere Experimente haben gezeigt, dass Zellen aus dem Epikard nicht nur die Quelle von koronaren endothelialen Zellen sind, sondern auch perivaskulären, interstitiellen und subendokardialen Fibroblasten und koronaren glatten Muskelzellen (Gittenberger-de Groot et al., 2000; Viragh and Challice, 1981; Dettman et al., 1998; Männer, 1999, 2000a; Vrancken Peeters et al., 1999). Die mesenchymalen Zellen, die zu Fibroblasten differenzieren, wandern in tiefere myokardiale Schichten ein und beteiligen sich am Aufbau des fibrösen kardialen Stützskeletts (Dettman et al., 1998; Gittenberger-de Groot et al., 1998). Mesenchymale Zellen, die sich aus dem Epikard entwickeln, besiedeln die atrioventrikulären Endokardkissen, die späteren AV-Klappen. (Gittenberger-de Groot et al., 1998; Perez-Pomares et al., 2002a). Aktuelle Analysen in der Maus gehen in Kontrast zu den Ergebnissen aus dem Hühnchen davon aus, dass

koronare arterielle Endothelien aus reprogrammierten venösen Zellen entstehen, die aus dem venösen Pol des Herzens stammen und von dort den gesamten Ventrikel besiedeln (Red-Horse et al., 2010).

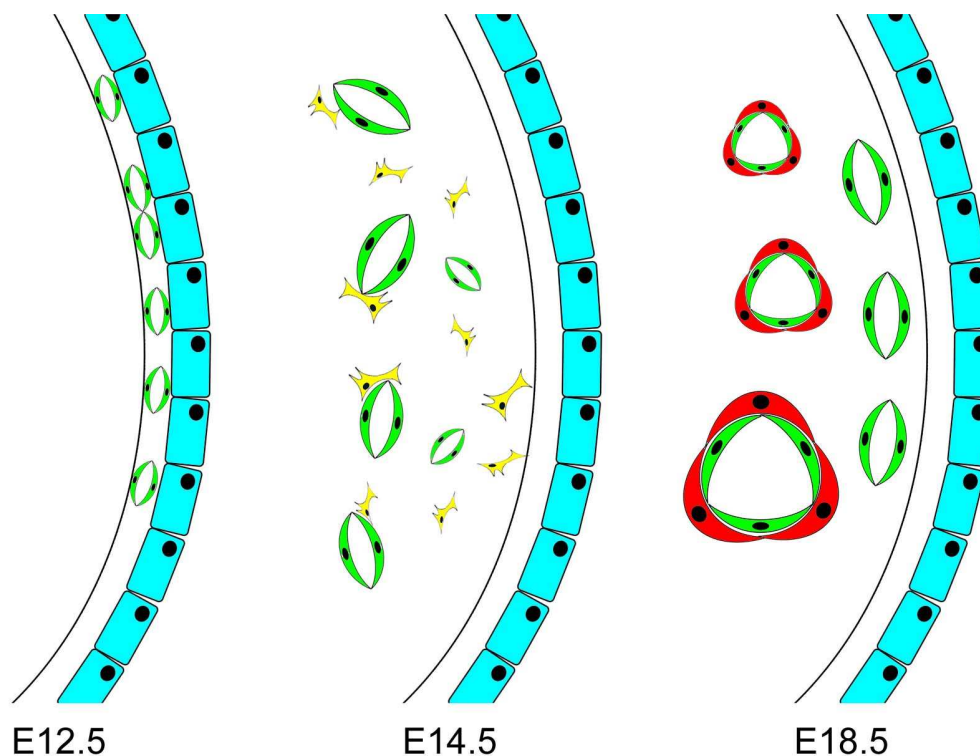


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der Koronargefäßentwicklung. Besiedlung des subepicardialen Raums mit venösen endothelialen Zellen aus dem venösen Pol (grün) bei E12.5 (Red-Horse et al., 2010), dann Dedifferenzierung dieser Zellen und Einwanderung in den Ventrikel zusammen mit mesenchymalen Zellen, die aus der EMT einzelner Epikardzellen hervorgegangen sind (gelb) ab ca. E12.5, und Differenzierung dieser Zellen in verschiedene Zelltypen, wie glatte Muskelzellen um die Koronargefäße (rot) und Fibroblasten (nicht gezeigt) zwischen E14.5 und E18.5.

In den letzten Jahren kam zusätzlich die Frage auf, ob mesenchymale Zellen aus dem Epikard auch zur Population der Kardiomyozyten beitragen können. Zwei unabhängige Studien sind zu dem Schluss gekommen, dass das murine Epikard während der Embryonalentwicklung auch Kardiomyozyten bildet (Cai et al., 2008, Zhou et al., 2008). Die regenerativen Kapazitäten des Zebrafischepikards, welches Teile des adulten Herzens nach einer Verletzung regenerieren kann, wobei auch untergegangenes Myokard regeneriert wird, ist ein zusätzliches Indiz für die zumindest generelle Möglichkeit einer Epikardzelle in Myokard zu differenzieren (Lepilina et al. 2006; Major

et al., 2007). Diese natürlichen regenerativen Fähigkeiten findet man allerdings nicht in höheren Vertebraten.

1.3.1 Genetische Kontrolle der Epikardentwicklung

Die molekularen und genetischen Grundlagen der Entstehung und Entwicklung des Epikards sind bisher nur unzureichend verstanden. Zell-Adhäsionsmoleküle sind aber wohl an der Entstehung des Epikards beteiligt. Das Ausschalten von z.B. α -4 *Integrin* (Yang JT., 1995, Sengbusch et al. 2002) oder *VCAM-1* (Kwee L., 1995; Gurtner GC., 1995) verhindert das Anheften des Epikards. *VCAM-1*, welches vom Myokard exprimiert wird interagiert mit α -4 *Integrin*, welches vom Epikard selbst exprimiert wird. Diese Anhaftung des Epikards am Myokard basiert also auf der *VCAM-1*/ α -4 *Integrin* vermittelte Zell-Adhäsion.

Für eine zunehmend dicker und kompakter werdende Kammerwand sind eine direkte Vaskularisierung, der Austausch von Stoffwechsel-Endprodukten und konstante Signale von Wachstumsfaktoren notwendig. Da es bei frühem Verlust des Epikards schon vor E14.5 (dem Einsetzen der Koronargefäßentwicklung bei der Maus) zu einer Hypoplasie des Ventrikels kommt, kann dieser Effekt noch nicht durch mangelnde Sauerstoffversorgung erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung dieses Phänotyps besteht in einem Mangel von Signalen, die beim Wildtyp normalerweise vom Epikard auf das darunterliegende Myokard einwirken. Metabolische Studien (Tokuyasu KT., 1990) haben gezeigt, dass die Proliferationsrate von Kardiomyozyten mit der Entfernung zum Epikard abnimmt.

Im Proepikardialorgan, dem sich entwickelnden Epikard und den durch EMT gebildeten mesenchymalen Zellen ist eine große Bandbreite von Transkriptionsfaktoren exprimiert. Darunter sind z.B. die Zink-Finger enthaltende Proteine *ets-1* (Marcias et al., 1998a), *WT1* (Moore et al., 1999), *slug* (Carmona et al., 2000), das Homeobox-Gen *Msx1* (Chan-Thomas et al., 1993) und *Epicardin* (Robb et al., 1998). *Ets-1* und *slug* sind an der EMT beteiligt (Marcias et al., 1998a; Carmona et al., 2000), indem sie die Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen reprimieren (Savagner et al., 1997; Cano et al., 2000; Carmona et al., 2000). Um einen motilen Phänotyp auszubilden muss die Epikardzelle die extrazelluläre Matrix manipulieren. *Ets1* aktiviert dafür die

Expression proteolytischer Enzyme. (Wasylyk et al., 1993). Auch *WT1* ist an der EMT beteiligt und der Verlust von *WT1* führt zu früher embryonaler Lethalität (Sucov et al., 1994). Dabei ist die Anzahl aus EMT gebildeter mesenchymaler Zellen geringer, und die Koronargefäße zeigen Defekte auf (Kreidberg et al., 1993; Moore et al., 1999). Epikardiale Expression von *WT1* wirkt dabei durch direkte transkriptionale Regulation von *snail1* und E-cadherin auf die EMT ein (Martinez-Estrada et al., 2010). Neuere Ergebnisse lassen sogar darauf schließen, dass auch in der Perikardentwicklung ähnliche Prozesse ablaufen für die *WT1* und andere epikardiale Faktoren benötigt werden (Norden et al., 2010). In dieser und anderen Studien konnte gezeigt werden, dass *WT1* über *Raldh2* (Retinsäure synthetisierendes Enzym) Expression direkt auf den Retinsäure-Signalweg einwirken kann. *WT1* unterdrückt die Differenzierung mesenchymaler Zellen, die aus der EMT hervorgegangen sind, damit sie weiter Retinsäure produzieren (Carmona et al., 2001; Munoz-Chapuli et al., 2002; Perez-Pomares et al., 2002a).

Gata4 besitzt eine wichtige Rolle in der Bildung des Proepikardialorgans. Bei Mäusen mit *Gata4*-Nullallelen fehlt das Proepikardialorgan völlig, was natürlich auch zu einem Fehlen des Epikards führt. Es bilden sich Herz-Defekte, wie eine unterbrochene Herzverschlingung, fehlende Kammertrennung und ein hypoplastisches ventrikuläres Myokard (Watt et al., 2004). Aber auch in der EMT spielen GATA-Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Das Myokard exprimiert den Transkriptionsfaktor *FOG-2*. Dieser ist Kofaktor von GATA-Transkriptionsfaktoren, im Besonderen von *Gata4*. Ohne diese Expression ist die Anzahl mesenchymaler Zellen, die aus der EMT stammen, geringer, Koronargefäße fehlen gänzlich und es kommt zu einer Hypoplasie des Ventrikels. Durch *FOG-2* scheint eine Einleitung der EMT erst ermöglicht zu werden (Tevosian et al., 2000).

Der zelluläre Beitrag des Epikards zum Myokard des sich entwickelnde Herzens ist stark umstritten (Männer, 1999; Cai et al. 2008; Zhou et al., 2008), allerdings sind einige Aspekte der Herzentwicklung von der Anwesenheit eines Epikards abhängig. Für diesen Effekt ist ein direkter Zellkontakt notwendig, wobei Medium, das durch epikardiale Zellen konditioniert war, nicht ausreicht (Eid et al., 1992). Dadurch wurde gezeigt, dass physiologisch relevante Interaktionen zum Zeitpunkt des direkten Kontakts von Epikard und Myokard stattfinden müssen. Diese Interaktionen basieren zum Teil auf der

Expression des *RALDH2* im Epikard (Moss et al., 1998; Xavier-Neto et al., 2000). Das Retinsäuresignal aus dem Epikard ist notwendig für eine normale Morphogenese des Herzens (Sucov et al., 1994; Kastner et al., 1997) und für die Entwicklung einer kompakten Muskelschicht im Ventrikel-Myokard (Xavier-Neto et al., 2000; Perez-Pomares et al., 2002a). Wenn der entsprechende Rezeptor *RXR α* in den myokardialen Zellen fehlt, kommt es zu ähnlichen Phänotypen (Sucov et al., 1994; Dyson et al., 1995; Kwee et al., 1995; Moore et al., 1999). Weiterführende Analysen haben präzisiert, dass epikardiale Zellen das Wachstum und das Überleben des unterliegenden Myokards regulieren (Lavine et al., 2005). Dort wurde beschrieben, dass Retinsäure die Produktion von *Fgf9*, *16* und *20* im Epikard reguliert und die epikardiale Expression von *Fgf9* induziert. Diese Signale sind in der Lage die myokardiale Proliferation in der embryonalen Entwicklung zu regulieren. Im Myokard wiederum agieren *Fgf*-Rezeptoren 1 und 2 als Empfänger dieser Signale. Es sind bereits einige weitere Faktoren bekannt, welche die EMT und weitere Differenzierung der eingewanderten mesenchymalen Zellen regulieren. Zu einer Stimulation der EMT in vitro kommt es bei Zugabe der Wachstumsfaktoren *bFGF*, *VEGF*, *EGF* (Dettman et al., 1998) und einer stärkeren Stimulation durch *Fgf1*, *2* und *7*. Diese stimulierenden Faktoren werden von embryonalen Kardiomyozyten produziert und ermöglichen mit Hilfe von anderen reprimierenden Faktoren eine Balance zwischen Stimulation und Inhibition der EMT (Morabito et al., 2001). *BMP*-Signale aus dem Epikard wiederum aktivieren die Expression dieser Faktoren (Munoz-Chapuli et al., 2002). Die Differenzierung mesenchymaler Zellen im Hühnchen nach der EMT zu endothelialen Zellen wird von *bFGF* und *VEGF* aus dem Myokard vermittelt (Tomanek et al., 1998, 1999, 2001; Wessels und Perez-Pomares, 2004). Die so entstandenen Endothelzellen rekrutieren undifferenzierte mesenchymale Zellen durch Sekretion von *PDGF-BB*. Diese Zellen entwickeln sich dann zu glatten Muskelzellen und perivaskulären Fibroblasten (Munoz-Chapuli et al., 2002). Der *Pdgf* Signalweg ist dabei notwendig für Proliferation glattmuskulärer Vorläuferzellen und die initiale EMT. *Pdgfrb* ist ein Marker für spätere glatte Muskelzellen (Mellgren et al., 2008). Der *Tgfb* Signalweg wiederum spielt eine Rolle in epikardialer EMT und glattmuskulärer Differenzierung (Langlois et al., 2010; Sridurongrit et al., 2008). Für die Entwicklung in glatte Muskelzellen wird transkriptionell aktiver *SRF* (serum response factor) benötigt (Lu et al., 2001). *SRF* als Mitglied der

MADS-Box Familie ist Aktivator für spezifische glattmuskuläre Gene wie *Calponin*, *SM22 α* und *SM γ Aktin* (Landerholm et al., 1999). SRF ist wiederum ein Zielgen vom Tgfb Signalweg (Martin-Garrido et al., 2010).

1.4 Der Notch Signalweg

Obwohl der Notch-Signalweg über die letzten Jahrzehnte intensiv untersucht worden ist und er nach diesen Erkenntnissen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung sämtlicher Wirbeltiere spielt, wurde seine Rolle in der Entwicklung des Epikard bisher noch nicht untersucht. Notch Signalübertragung ist ein essentieller Prozess für die laterale Inhibition, die Entscheidung von Zellschicksalen und die Abgrenzung zwischen Geweben. Im adulten Gewebe sorgt es für Gewebe-Homeostase und ist an der Geweberegeneration beteiligt (Conboy et al., 2003; Conboy and Rando 2002; Ehebauer et al., 2006; Kohler et al., 2004; Nakamura and Shiba, 2007; Wilson and Radtke 2006). Notch Signalübertragung ist auf äußerst komplexe Weise mit vielen weiteren Signalwegen verbunden. Es wurden daher schon zahlreiche Phänotypen bei Mutationen in Komponenten dieses Signalwegs beschrieben, wobei der Name (Mohr, 1919) auf einen Phänotyp bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zurückgeht, die Kerben (engl. Notches) in den Flügeln hatte.

Sämtliche Rezeptoren (Notch1-4) und alle Liganden (Delta-like1, 3, 4 und Jagged1, 2) in Vertebraten sind Transmembranproteine (Wharton et al., 1985). Neuste Studien haben allerdings gezeigt, dass Delta-like 3 wohl nicht zu den Liganden zählt, da es den Notch-Rezeptor nicht aktivieren kann (Gefferis et al., 2007). Für eine Signalübertragung in Trans ist ein direkter Zell-Zell Kontakt notwendig. Nach der Bindung zum Liganden wird die extrazelluläre Domäne, welche nur mit Hilfe von nicht-kovalenten Bindungen an der intrazellulären Domäne befestigt ist, physisch von der Transmembrandomäne getrennt und in die Trans-Zelle mittels Endozytose aufgenommen (Nichols et al. 2007). In Folge dieser Trennung kommt es zu einer Konformationsänderung im Transmembranbereich, welche erst eine Proteindomäne freigibt an der es im Folgenden am Notch-Rezeptor zu proteolytischen Spaltungen kommt und die intrazelluläre Domäne freigesetzt wird (Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000; Schroeter et al., 1998). Für die Bindung an den Liganden sind die EGF-ähnlichen sich wiederholenden Proteindomänen im

extrazellulären Teil des Proteins verantwortlich. Die intrazelluläre Domäne (NICD, engl.: Notch intracellular Domain) besitzt eine Kern-Lokalisierungs-Sequenz, welche es ihr ermöglicht in den Zellkern überzugehen und dort direkt verschiedenste Zielgene aus der HES (engl.: hairy/enhancer of split), der HERP (engl.: HES related protein), der MESP (engl.: mesoderm posterior) und der Hey-Familie (engl.: hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif) sowie Lfng (engl.: Lunatic Fringe (Cole et al, 2002; Jarriault et al., 1995; Jouve et al., 2000; Kageyama et al., 2007; Maier and Gessler, 2000; Takahashi et al., 2000, Kageyama and Nakanishi 1997; Steidl et al. 2000) zu aktivieren. Nur *Hes1*, *Hes 5*, *Hes7*, *Hey1*, *Hey2* und *HeyL* sind direkte Zielgene von Notch (Nishimura et al. 1998; Bessho et al. 2001; Katoh and Katoh 2007).

Für diese Aktivierung muss NICD vorher an den CSL (auch RBPJk) Transkriptionsfaktor binden, was über seine RAM Domäne (engl.: RBPJk associated molecule) vermittelt wird (Beatus et al., 2001). In der Abwesenheit von NICD formt CSL einen großen Multiproteinkomplex, der bereits an die Zielgene bindet und diese reprimiert (Lai et al., 2002). Durch die Bindung von NICD an CSL werden diese Korepressoren freigesetzt und zusätzlich Koaktivatoren gebunden (Jeffries et al., 2002).

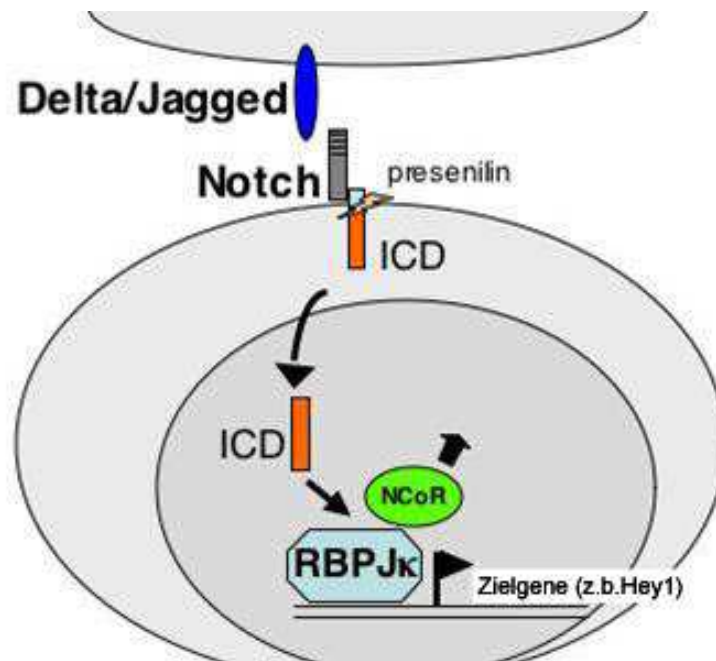


Abbildung 1-12: Schematisches Modell des kanonischen Notch-Signalweges. (ICD) intrazelluläre Domäne von Notch, (NCoR) Notch Korepressoren (nach www.amc.nl).

Ein wichtiger regulativer Aspekt des Notch Signalweges ist die Bearbeitung des unfertigen Proteins vor der Präsentation auf der Zelloberfläche im Trans-Golgi Netzwerk (Blamueller et al., 1997; Logeat et al., 1998).

1.4.1 Die Rolle des Notch Signalwegs in der Herz- und Gefäßentwicklung

Für viele Prozesse der Herz und Gefäßentwicklung stellt der Notch Signalweg ein zentrales Steuerungselement dar und Defekte in dieser Kaskade führen zu schweren kardiovaskulären Defekten. Zu diesen Prozessen zählen die endokardiale Kissenbildung, die Reifung des ventrikulären Myokards, die Bildung des atrioventrikulären Kanals, arterio-venöse Schicksalsentscheidung, Angiogenese des Blutgefäßnetzwerks, Proliferation von endothelialen Zellen und allgemeine glattmuskuläre Differenzierung in Gefäßen (de la Pompa et al., 2009; Morrow et al., 2008). Bisher konnte nur für die Transkriptionsfaktoren Hey 1, 2 und L eine Rolle in der kardiovaskulären Entwicklung nachgewiesen werden (Fischer et al., 2003). Expression von N1ICD in mesothelialen Zellen des PeO und des Epikards, in neugebildeten Gefäßen und in endothelialen und glattmuskulären Zellen koronarer Arterien in der Entwicklung des Hühnchens (Yang et al., 2009) spricht außerdem für eine Funktion dieses Signalweges in der Epikardentwicklung. Diese Funktion wurde bisher allerdings nicht beschrieben.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Der venöse Pol ist ein wichtiges Zentrum für die Herzentwicklung. Aus ihm gehen Herzstrukturen wie die Kavalvenen (in der rechten Kavalvene sind große Teile des SK eingebettet), das Epikard und die Koronargefäße hervor. Defekte in dieser Region führen zu massiven Entwicklungsstörungen, die Krankheitsbilder wie Arrhythmien oder sogar frühe embryonale Lethalität zur Folge haben. Bisher ist allerdings wenig über die zellulären und molekularen Mechanismen der Entwicklung dieser Struktur bekannt. *Tbx18* ist dabei ein zentraler Faktor, der in der gesamten Region exprimiert ist und eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Kavalvenen spielt (Christoffels et al.2006).

Für diese Arbeit soll daher die Rolle von *Tbx18* in der Entwicklung des SK auf morphologischer, histologischer und molekularer Ebene beschrieben werden. Sie soll Aufschluss darüber geben, ob der SK aus einer kleinen Vorläuferpopulation innerhalb des Sinushornmyokards hervorgeht oder durch Transdifferenzierung aus bereits vorhandenen mesenchymalen Zellen. Neben der Morphogenese soll die Regionalisierung dieser Struktur weiter aufgeklärt werden. Außerdem soll das Zusammenspiel mit *Tbx3*, einem wichtigen Faktor der SK-Entwicklung, beschrieben werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit soll die Rolle des Notch Signalweges in der Entwicklung des Epikards und der Koronargefäße beschreiben. Zu diesem Zweck wird ein konditioneller Ansatz mit einem *Tbx18^{cre}* Allel verwendet, da ein ubiquitärer Verlust des Notch-Signalweges zu früher embryonaler Lethalität führt. Es wurde bereits eine Beteiligung des Notch-Signalwegs an der allgemeinen Gefäßentwicklung, der Arterien-differenzierung und der Endokardentwicklung beschrieben. Die Funktion in der Epikardentwicklung ist aber bisher ungeklärt. In diesem Zusammenhang ermöglicht es dieser konditionelle Ansatz außerdem genau zu klären, welche verschiedene Zelltypen aus dem embryonalen Epikard entstehen können.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Geräte

Antibiotika:	Ampicillin-NaSalz (Roth) Streptomycin (Sigma)
Computer:	Apple Macintosh Imac Software: Office:mac v.X. (Microsoft) Filemaker Pro 6.0 (Filemaker) Photoshop CS (Adobe) Mac Vector 10.5.2 (Accelrys) Amira 3.1.1 for OSX (Mercury)

Enzyme, Biochemikalien, Kits für die Molekularbiologie:

5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (Roche), Anti-Digoxigenin-AP-Fab Fragmente (Roche), Antigen unmasking solution (VectorLabs), Blocking Reagent (Roche), BM Purple AP Substrate (Roche), BSA (New England Biolabs), DIG-Labeling-NTP-Mix (Roche), Dnase I (Roche), Lysozym, Oligonucleotide (Sigma), Proteinase K (Roche), Restriktionsendonukleasen (NEB, Fermentas), Rnase A (Roth), Rnasin (Promega), SP6 RNA Polymerase (Roche), T3 RNA Polymerase (NEB), T7 RNA Polymerase (NEB), 1 kB Leiter (GibcoBRL), Taq DNA Polymerase (Sigma), Vectastain DAB Substrate Kit für Peroxidasen (VectorLabs), Vectastain Peroxidase-anti-Kaninchen IgG (PK4001, Vector), Vectastain Peroxidase-Mouse-on-Mouse-Kit (PK2200, Vector)

Feinchemikalien und gebrauchsfertige Lösungen:

10x Transkriptionspuffer (SP6, T3, T7), Agarose, Chloroform, DMSO, EGTA, Essigsäureanhydrid, Ethanol, Ethidiumbromid, Formaldehyd, Formamid, Glutaraldehyd, H₂O₂, Isopropanol, Lithiumchlorid, Methanol, Mowiol, NP40 (Igepal), Paraformaldehyd, Phenol, Rotihistol, Triethanolamin, Triton X-100, Tween-20, X-Gal (Amersham, BioRad, Boehringer, Pharmacia, Fluka, Gibco, Roth, Sigma, GibcoBRL, Riedel-de-Häen, Fisher Chemikals, J.T.Baker)

Filterpapier:	Faltenfilter (Schleicher&Schüll)
Geldokumentationskammer:	Biorad, Sony Thermadrucker UP890CE
Gelelektrophoresezubehör:	Eigenbau
Glaswaren:	Objektträger: Superfrost plus (Menzel), Deckgläser: 24x60mm (Roth)
Grobchemikalien:	p.A. Qualität (Fluka, Merck, Sigma, Roth, AppliChem, J.T. Baker)
Heizplatte:	Schott
Hybridisierungssofen:	mit Kippschüttler (Amersham)
Immunochemikalien:	Primäre Antikörper:

Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen Wt1 (1:200, C-19, Santa Cruz),
Ziege polyklonaler Antikörper gegen Tbx18 (1:200, C-20, Santa Cruz),
Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen ZO1 (Tjp1) (1:200, 61-7300, Zymed
Lab. Inc.),
monoklonaler Antikörper gegen CD31 (Pecam1) (1:50, 550274, BD Pharmingen),
Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen GFP (1:200, sc-8334, Santa Cruz),
monoklonaler Antikörper gegen GFP (1:200, 11814460001, Roche),
Ziege polyklonaler Antikörper gegen P-Smad2/3 (Ser433/435; 1:50, sc-11769,
Santa C.),
monoklonaler Antikörper gegen alpha-Smooth muscle actin (Acta2), Cy3
konjugiert (1:200, C 6198, Sigma),
monoklonaler Antikörper gegen alpha-Smooth muscle actin (Acta2), FITC
Conjugate (1:200, F3777, Sigma),
Ziege polyklonaler Antikörper gegen cardiac troponin I (Tnni3) (1:200, 4T21/2,
HyTest),
monoklonaler Antikörper gegen heavy chain cardiac myosin (Myhc) (1:200, ab15,
Abcam),
Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen SM22alpha (Tagln) (1:200, ab14106,
Abcam),
Ziege polyklonaler Antikörper gegen ephrinB2 (Efnb2) (1:200, AF496, R&D
Systems),

monoklonaler Antikörper gegen CoupTFII (Nr2f2) (1:100, PP-H7147-10, R&D Systems),
Ratte monoklonaler Antikörper gegen endomucin (Emcn) (1:2, D. Vestweber, MPI Münster; Germany),
Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen Notch3 (1:200, ab23426, Abcam),
Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen periostin (Postn) (1:50, ab14041, Abcam),
Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen Delta-like1 (Dll1) (1:100, H-265, sc9102, Santa Cruz),
Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen Vegf (Vegfa) (1:100, sc-507, Santa Cruz),
Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen eNos (Nos3) (1:200, Affinity BioReagents),
Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen bovine aortic smooth muscle myosin (BASM, smooth muscle myosin heavy chain 204/200, smMHC) (1:200, R. Adelstein, Bethesda, USA),
Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen collagen type IV (1:200, #AB756P, Millipore Corp.) und
Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen Pdgf receptor beta (prediluted, ab15502, Abcam)

Sekundäre Antikörper:

Alexa488 Ziege-gegen-Kaninchen (Invitrogen, 1:250),
Alexa488 Esel-gegen-Maus (Invitrogen, 1:200),
Rhodamin Ziege-gegen-Kaninchen (Dianova, 1:200),
Red-X Esel-gegen-Maus (Dianova, 1:200),
R-PE em575 Schwein-gegen-Ziege (Invitrogen, 1:200),
biotinylierter Esel-gegen-Ziege (Dianova, 1:200),
biotinylierter Ziege-gegen-Maus (Dianova, 1:200),
biotinylierter Ziege-gegen-rat (Dianova, 1:200),
DyLight 488-conj. Fab-Fragment Esel-gegen-Kaninchen (Dianova, 1:200) und

Biotinylierter Ziege-gegen-Kaninchen (Dianova, 1:200)

Inkubatoren:	Wasserbäder (GfL), Rundschüttler (Infors HT), Trockeninkubatoren (Mettler), CO ₂ -Brutschrank: CO ₂ -Auto-Zero (Heraeus)
Laborbedarf, allgemein:	Multimed, KDL, Kimberly-Clark
Medien:	Bactoagar, Hefeextrakt, (Gibco) DMEM (GibcoBRL), Panserin 401 (PAN Biotech)
Mikropipetten:	0,5-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl (Roth)
Mikroskope:	Leica MZ75, Leica DM5000 mit Digitalkamera Leica DFC 300FX und DFC 350F, Leica DMI6000B mit Leica DFC350FX, Leica M420 mit Fuji Digitalkamera HC3002, Leica MZFLIII mit UV-Lampe ebq 100 (Leistungselektronik Jena GmbH), Stereomikroskop Axioplan (Zeiss) mit Digitalkamera ProgRes C14 (Jenoptik) und UV-Lampe (Zeiss)
Mikrotom:	Leica RM2155
Mikrowellenofen:	LG
Netzteil:	Biorad Powerpack 300
pH-Meter:	WTW
Photometer:	Eppendorf BioPhotometer
Sicherheitswerkbank:	LaminAir (Heraeus)
Plastikwaren:	Greiner, Sarstedt, Falcon, Sigma
Präparierbesteck:	Fine Science Tools
Säulenmaterialien:	NucleoBond-Säulen (Macherey&Nagel)
Schüttler und Rührer:	Heidolph, Assistent, IKA, Stuart, GFL
Thermoblock:	Eppendorf ThermoStat plus
Thermocycler:	Primus 96 plus (MWG-Biotech) peqSTAR 96 (PEQLAB Biotechnologie GmbH)
Thermomixer:	Eppendorf 5436, HLC
Trockenplatte:	Medax

UV-Lampen:	UV Stratalinker 2400 (Stratagene)
Waagen:	Kern
Wasser:	Leitungswasser doppelt deionisiert (Millipore Ionenaustauscher)
Zellkulturbedarf:	Antibiotika, Deckgläser (Marienfeld), Gelatine, Nährmedien, Pasteurpipetten aus Glas (Brand), Pinzetten, Plastikwaren
Zentrifugationszubehör:	50 ml Becher (Beckman)
Zentrifugen:	Eppendorf Tischzentrifuge 5415D, Beckman Model J6B mit den Rotoren JA-10, JA-20, Heraeus Biofuge13 und Biofuge15

2.2 DNA-Vektoren, rekombinante Plasmide und Wirtssysteme

2.2.1 Klonierungsvektoren

Es wurden verschiedene Plasmidvektoren für *in vitro* Transkription verwendet:

Der Polylinker trägt zu beiden Seiten Bindungstellen für je 2 Polymerasen (T7, T3, SP6 Promotor) und ermöglicht dadurch sowohl die Generierung eines Sinn-Stranges, als auch eines Gegen-Sinn Stranges durch *in vitro* Transkription.

2.2.2 Wirtssysteme

2.2.2.1 Bakterienstämme

Plasmid-DNA wurde in E. Coli-Zellen vom Stamm XL10-Gold transformiert (Stratagene): Tet^r Δ(mcrA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lac1^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]

2.3 Versuchstiere

Die eingesetzten Mäuse hatten den NMRI-Wildtypstamm als genetischen Hintergrund. Folgende rekombinanten Allele, fanden in dieser Arbeit Verwendung:

<i>Tbx3Cre</i> ^(Δneo) :	MGI: <i>Tbx3</i> ^{tm1.1(cre)Vmc} , Hoogaars et al., 2007
<i>Tbx18Gfp</i> ^(Δneo) :	MGI: <i>Tbx18</i> ^{tm2Akis} , A. Kispert, unveröffentlicht
<i>Tbx18Cre</i> ^(Δneo) :	MGI: <i>Tbx18</i> ^{tm4(cre)Akis} , Wiese et al., 2009
<i>msd::Tbx18</i> :	MGI: Tg(Dll1-Tbx18)2Akis, Bussen et al., 2004
<i>Rosa26</i> ^{lacZ} :	MGI: Gt(ROSA)26Sor ^{tm1Sor} , Soriano, 1999
<i>Rosa26</i> ^{mTmG} :	MGI: Gt(ROSA)26Sor ^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo} , Muzumdar, 2007
<i>Rosa26</i> ^{N1ICD} :	MGI: Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(notch1)Dam} , Douglas A Melton
<i>Rbpj</i> ^{flox} :	MGI: <i>Rbpj</i> ^{tm1Hon} , Tasuko Honjo

2.4 Plasmidkonstrukte

Sonde gegen:	erhalten von:	Restriktion:	Transkription:
<i>Tbx3</i>	V. Papaioannou	Sal1	T7
<i>Tbx18</i>	A. Kispert	Hind3	T7
<i>lacZ</i>	Johannes Beckers	Cla1	T7
<i>GFP</i>	-	BamH1	T7
<i>Hcn4</i>	-	Not1	T7
<i>Cx40</i>	-	Kpn1	T3
<i>Cx43</i>	-	Sal1	T7
<i>Cre</i>	V. Christoffels	Hind3	T3
<i>Epicardin</i>	Suzanne Cory	EcoR1	T7
<i>Dll1</i>	A. Gossler	Sal1	T3
<i>Dll3</i>	-	Not1	T7
<i>Dll4</i>	A. Gossler	Hind3	T7
<i>Notch1</i>	Tom Gridley	Cla1	T7
<i>Notch2</i>	Tom Gridley	Not1	T7
<i>Notch3</i>	A. Gossler	EcoR1	T3
<i>Notch4</i>	A. Gossler	Xho1	T3
<i>Jag1</i>	Tom Gridley	EcoR1	T3
<i>Jag2</i>	Tom Gridley	EcoR1	T3
<i>Hey1</i>	Prof. Gessler	Bgl2	T7
<i>Hey2</i>	Prof. Gessler	Hind3	T7
<i>HeyL</i>	Prof. Gessler	BamH1	T7
<i>Wt1</i>	David Hursman	BamH1	T3
<i>Sox9</i>	-	Sal1	T7
<i>Fbln2</i>	Riken clone	Sal1	T7
<i>Aldh1a2</i>	Pierre Chambon	EcoR1	T3
<i>α4-Integrin</i>	Weissman	Hind3	T3

Tabelle 1: Plasmidkonstrukte zur Herstellung von Hybridisierungssonden

2.5 DNA-Methoden

2.5.1 Lösungen

10x PCR Puffer Nr.8:	100 mM TRIS.HCl pH8.5, 20 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl, 50% DMSO (Sigma),
5x KCM-Puffer:	500 mM KCl, 150 mM CaCl ₂ , 250 mM MgCl ₂ in Millipore H ₂ O
dNTPs	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (für PCR)
Ethidiumbromid:	10 mg/ml in H ₂ O

Ladepuffer (DNA):	1x TAE, 60 mM EDTA, 50% Glycerin, 0,25% Xylencyanol
Lysozym:	10 mg/ml in TE
Natriumacetat:	3 M in H ₂ O, pH 6,0
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
Phenol/Chloroform:	1:1:0,5 geschmolzenes Phenol / Chloroform / TE
STET:	8% Saccharose, 0,5% Triton X-100, 0,05 M EDTA, 0,01 M TRIS.HCl pH 8,0
TAE (50x):	2M TRIS.Acetat, 0,05M EDTA, pH 8,0
TE:	1 mM EDTA, 10 mM TRIS.HCl, pH 8,0
Transformations-Lösung:	50-500 ng rekombinante Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz in 100 µl 1x KCM-Puffer

2.5.2 Medien und Agarplatten

LB:	10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt und mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt
LB/Amp:	LB mit 100 µg/ml Ampicillin
LB-Agar:	LB mit 1,5% Bactoagar

2.5.3 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA in KCM-kompetente Bakterien vom Stamm E.coli XL10-Gold wurde ca. 100 ng DNA mit 20 µl 5x KCM versetzt und mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt. Das gleiche Volumen an kompetenten Bakterien wurde zugesetzt, nach dem sie auf Eis aufgetaut, und 20 min auf Eis inkubiert wurden. Darauf folgte eine Inkubation für 10min bei RT. Dann wurde 1ml LB-Medium, vorgewärmt auf 37°C, hinzugefügt und 20 min bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden sedimentiert (RT,

Eppendorf Tischzentrifuge), in 400 µl Restmedium resuspendiert und auf Amp-Platten ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 12-14h konnten einzelne Klone mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers gepickt werden. Es wurden stets mehrere Klone gepickt, in 2ml Amp-LB Medium überführt, über Nacht inkubiert und schließlich mit Hilfe einer Restriktionsanalyse nach Plasmidaufreinigung beurteilt.

2.5.3.1 Lagerung rekombinanter Bakterienstämme

Für kurze Zeit konnten die Bakterienkulturen bei 4°C aufbewahrt werden. Für eine langfristige Lagerung wurden die Bakterienkulturen mit 96%-Glycerin im Verhältnis 3:1 versetzt, in ein Nunc-Röhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

2.5.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA

2.5.4.1 Mini-Boiling-Methode

Es ist eine schnelle Aufreinigung von Plasmid DNA mit dieser Methode möglich, so dass damit die korrekte Insertion in ein Plasmid bei einer Vielzahl von transformierten Bakterien kontrolliert werden kann. Da sie aber viele Protein-Verunreinigungen aufweist, ist die DNA meist nur für Kontrollexperimente einsetzbar. Die Durchführung erfolgte nach Standardprotokollen.

2.5.4.2 Plasmidisolierung mit Hilfe von M&N Midi-Säulen

Um die benötigte Plasmid-DNA besonders rein zu erhalten wurde ein Kit von Macherey&Nagel verwendet. Für diese Arbeit kam ein Protokoll für eine Ansatzgröße von 100 ml Medium zum Einsatz. Es wurde dabei nach Hersteller-Angaben vorgegangen.

2.5.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Photometrie

Die spektroskopische Bestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm (Eppendorf BioPhotometer). Eine Absorption von OD=1 entspricht einer

Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngigen Nukleinsäuren. Eine Aussage über den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren ergibt das Verhältnis der Absorptionswerte $A_{260}:A_{280}$. Es sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook und Russell, 2001). Die Konzentration von Plasmid-DNA wurde mit TE auf 1 µg/µl eingestellt.

2.5.5 Analyse von DNA-Fragmenten

2.5.5.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für die Linearisierung von Plasmid-DNA und Charakterisierung des jeweiligen Inserts wurden zum Verdau Restriktionsendonukleasen vom Typ 2 eingesetzt. Die jeweils vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen wurden mit Hilfe der mitgelieferten 10x Reaktionspuffer eingestellt. Teilweise wurde dem Reaktionsansatz je nach Herstellerangaben noch 1:100 BSA zugesetzt (100x BSA (NEB)). Für die analytische Restriktionsbehandlung nach einer Midi-Plasmid-DNA Aufreinigung wurde 0,5µg Plasmid-DNA-Präparation unter Verwendung von 0,5µl Restriktionsenzym (2,5-5 U) in einem 20µl Ansatz für 1h verdaut. Für präparative Ansätze bei Linearisierungen wurde entsprechend mehr DNA eingesetzt (10µg in 100µl Ansatzgröße).

Bei Verdauansätzen mit 2 Enzymen wurden entweder je nach Herstellerangaben gemeinsame Pufferbedingungen eingestellt oder nacheinander verdaut.

2.5.5.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA (0,5 – 6kb) wurde analytisch in 0,8%igen Agarosegelen in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 60-120 V aufgetrennt. Die Agarose nach dem Aufkochen in der entsprechenden Gelkammer zum Erkalten gebracht. Die Gellänge richtete sich nach der Fragment-Größe und lag zwischen 5 und 10 cm (Minigele o. Midigele). Das erkaltete Gel wurde mit 1xTAE überschichtet. Vor dem Auftragen wurde die DNA mit 0,2 Volumen 6x Probenpuffer versetzt. Zur Anfärbung der DNA wurde dem Agarosegel Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,02 µl/ml zugesetzt. Die Größe von DNA-Fragmenten konnte durch einen aufgetragenen Molekulargewichtsstandard (5µl

1kB Leiter), mit Bromphenolblau-Marker zur Front-Erkennung, ermittelt werden. Gele wurden mithilfe einer Videoanlage dokumentiert.

2.6 RNA-Methoden

2.6.1 Lösungen

Antikörper:	anti-DIG-AP Antikörper, 1:5000 in Block-Lösung, vor Verwendung 1h bei 4°C präadsorbiert
Block-Lösung:	2% Blocking Reagenz (Boehringer) in MAB, zum Lösen unter Rühren auf 67°C erhitzt
DEPC-H ₂ O:	100 µl/l DEPC in bidest. H ₂ O, über Nacht inkubiert, dann autoklaviert
DIG-dNTPs:	1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP (gebrauchsfertig, Roche)
DTT:	200 mM in H ₂ O
Hybridisierungslösung:	~1 µg/ml DIG-markierte-RNA-Sonde im jeweiligen Prähybridisierungspuffer
Lösung I:	50%Formamid, 5x SSC pH 4,5, 1% SDS in ddH ₂ O
Lösung II:	50%Formamid, 2x SSC pH 4,5, 0,2% SDS in ddH ₂ O
MAB-Lösung:	100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5 (mit NaOH einzustellen), vor Gebrauch frisch ansetzen (+ 2mM Levamisol für ganze Embryonen)
Millipore H ₂ O:	ddH ₂ O gefiltert durch Millipore Filteranlage
Mowiol:	Mowiol in Glycerin, H ₂ O und 0,2M Tris.HCl pH 8,5 (Calbiochem)
NTMT:	100 mM NaCl, 100 mM TRIS.HCl pH 9,5, 50 mM MgCl ₂ , 0,1% Tween-20
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2

PBT (pH 4,5):	PBS mit 0,1% Tween-20, mit HCl auf pH 4,5 einstellen, vor Gebrauch frisch ansetzen
PBT:	PBS mit 0,1% Tween-20, vor Gebrauch frisch ansetzen
PFA/PBS:	4% Paraformaldehyd in PBS
Prähybridisierungspuffer (Schnitte):	50% Formamid, 5x SSC pH 7,0, 1x Denhardt's-Lösung, 0,1% Tween-20, 0,1 mg/ml tRNA, 1x Heparin in DEPC-H ₂ O
Prähybridisierungspuffer (Gesamtembryonen):	50% Formamid, 5x SSC pH 4,5, 1x SDS, 50 µl/ml Hefe-tRNA, 50 µl/ml Heparin in DEPC-H ₂ O
SSC(20x) pH 4,5:	3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH 4,5
SSC(20x) pH 7,0:	3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH 7,0
TAE (50x):	2M TRIS.Acetat, 0,05M EDTA, pH 8,0
TE:	1 mM EDTA, 10 mM TRIS.HCl, pH 8,0
TNT-Puffer:	10mM TRIS.HCl pH 7,5, 0,5M NaCl, 0,1% Tween-20
Triethanolamin:	mit HCl auf pH 8,0 eingestellt
Wachsstift:	ImmEdge (Vector)

2.6.2 Herstellung von Hybridisierungssonden

Für die RNA in situ Hybridisierung zum Nachweis von endogenen Transkripten wurden Digoxigenin-markierten RNA Sonden verwendet. Die Transkription wurde mit der jeweils angegebenen RNA-Polymerase durchgeführt. Der 10 µl-Standardreaktionsansatz für die in vitro Transkription enthielt (siehe Abschnitt 2.4 und 2.5.5.1):

DEPC H ₂ O	5μl
10x Transkriptionspuffer	1μl
DNA (500ng/μl)	1μl
10x DIG-Reaktionsmix	1μl
0,1mM DTT	1μl
RNAsin	0,5μl
RNA-Polymerase	0,5μl
	10μl

Nach Inkubation für 2h bei 37°C, wurde 1μl DNaseI hinzugegeben und es wurde erneut für 15min bei 37°C inkubiert, um die vorhandene DNA zu verdauen. Der darauf folgenden Zugabe von 100μl DEPC-H₂O, 10μl 4M LiCl und 300μl EtOH (vorsichtig vortexen) folgte eine Inkubation von 1-2h bei –80°C zur Fällung der RNA. Diese wird dann bei 4°C und 13000 Upm für 10min sedimentiert (Heraeus Biofuge13). Das Sediment wird 2x mit 200μl vorgekühlten 70% EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 60μl DEPC-H₂O aufgenommen.

3μl davon werden auf ein 0,8%-Agarosegel aufgetragen um die Qualität der Reaktion zu überprüfen und der Rest wird bei –80°C bis zur Verwendung gelagert.

2.6.3 *In situ* Hybridisierung

2.6.3.1 Schnittpräparate

Der Nachweis von RNA auf Dünnschnitten erfolgte mit Embryonen die mittels PFA fixiert wurden. Die Schnittdicke der in Paraffin eingebetteten Präparate lag bei 10μm. Die im folgenden beschriebenen Waschschrte erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, in speziellen sterilisierten Glasküvetten, in die ein Glasrahmen für Objektträger eingeführt werden konnte. Soweit nicht anders beschrieben, erfolgten die Waschschrte bei RT.

1.Tag:

Alle Lösungen für den ersten Tag wurden mit DEPC-H₂O angesetzt.

Zur Deparaffinierung wurden die Schnitte 2x für jeweils 10 min in Roti-Histol getaucht, anschließend 1x in 50% Roti-Histol/50% Ethanol und 2x in 100% Ethanol 2min gewaschen und im Folgenden in einer Ethanolreihe (96%, 90%, 70%, 50%) für jeweils 1 min rehydriert und anschließend für 5min in PBS gewaschen. Nun folgte für 10min bei 37°C ein Proteinase K Verdau (10µg/ml in 0,1M TRIS.HCl, pH 7,5, vorgewärmt), der mit einer Glycin/PBS (0,2%, 10 min) Lösung abgestoppt und 2x für 5min in PBS gewaschen wurde. Die Postfixierung erfolgte in einer PFA/Glutaraldehyd (4% PFA, 0,2% Glutaraldehyd, in PBS) Lösung für 20min. Nach einem Waschschrift (2x für 5min in PBS) wurden die Präparate auf den Objektträgern mit Hilfe eines speziellen Wachsstiftes (ImmEdge Pen, Vector) mit einem Ring umzogen und unter Vermeidung von Austrocknung des Präparates bis zur Prähybridisierung in PBS aufbewahrt. Die Prähybridisierungs- und später die Hybridisierungslösung wurde in einem Volumen von 5-20 µl in diese Ringe auf die Präparate pipettiert. Die Inkubation erfolgte in geschlossenen und gekammerten Plastikschaalen, die wiederum in größere Plastik-Kammern eingelegt wurden. Diese Kammern wurden mit Papiertüchern belegt, die mit der entsprechenden Inkubations-Lösung befeuchtet waren. Zusätzlich wurde bei der folgenden über Nacht-Inkubationen das gesamte Plastik-Gefäß in Kunststoffolie eingeschlagen, die von innen noch zusätzlich mit Wasser befeuchtet wurde. Dies sollte ein Verdunsten und eine damit einhergehende Konzentrationsveränderung der eigentlichen Hybridisierungslösung vermeiden. Nach der Inkubation mit Prähybridisierungslösung auf den Schnitten für 1h bei 70°C für erfolgte die Inkubation mit der Hybridisierungslösung über Nacht ebenfalls bei 70°C im Hybridisierungsofen.

2. Tag:

Am zweiten Tag wurden die Schnitte kurz in 2xSSC eingetaucht (65°C), mit 50% Formamide/ 2x SSC (2x 25min, 65°C) und PBS-T (3x 5 min) gewaschen. Darauf folgte die Vorinkubation mit der Block-Lösung für 30min bei RT und dann die Inkubation mit dem 1h präadsorbierten anti-DIG-Antikörper in Block-Lösung (1:5000) auf den Objektträgern für 2h bei RT. Nach der Antikörper-Inkubation Die Schnitte wurden anschließend in PBST gewaschen (3x 5min) und durch das Waschen in NTMT in den

alkalischen pH-Bereich überführt (2x 5 min, RT). Die Inkubation mit der Färbelösung BM-Purple auf den Schnitten erfolgte je nach Färbereaktionsgeschwindigkeit bei RT oder 4°C unter Lichtausschluss. Nachdem die gewünschte Färbeintensität erreicht ist, wird die Färbereaktion in PBS abgestoppt. Es folgt eine Postfixierung mit PFA (4%) für 2h, worauf die Objektträger nach 2x Waschen in PBS in Mowiol eingedeckt werden.

2.6.4 3-D Geweberekonstruktion

Die 3D-Geweberekonstruktion wurde mit der Software Amira 3.1.1 for OSX (Mercury Computer Systems) unter Verwendung von Schnitt in situ Serien (10µm) durchgeführt.

2.7 Mausmethoden

2.7.1 Lösungen

PFA/PBS:	4% Paraformaldehyd in PBS
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2

2.7.2 Embryologische Methoden

2.7.2.1 Verpaarung

Die zur Genexpressionsanalyse genutzten Wildtypmäuse gingen aus Verpaarungen von NMRi-Mäusen, oder den entsprechenden heterozygoten Tieren ohne Phänotyp, hervor. Homozygoten *Tbx18*^{GFP/GFP}-Embryonen wurden durch Verpaarung heterozygoter Tiere gewonnen. Für die Generierung von überlebensfähigen *Tbx18*-Mutanten des Genotyps *Tbx18*^{GFP/GFP}, *msd::Tbx18/msd::Tbx18* wurden *Tbx18*^{GFP}, *msd::Tbx18* doppelheterozygote Tiere verpaart. Für die Generierung von *Tbx18*^{Cre}, *ROSA26*^{LacZ} Embryonen wurden *Tbx18*^{Cre} heterozygote Männchen mit *ROSA26*^{LacZ} homozygoten Weibchen verpaart. Konditionell mutante Embryonen des Genotypen *Tbx18*^{Cre/+}, *Rbpj*^{flox/flox} gingen aus Verpaarungen von für das *Tbx18*^{Cre} und das Flox-Allel doppelt heterozygoten Männchen und für das Flox-Allel homozygoten Weibchen hervor.

Tbx18^{Cre/+}, *Rosa26*^{N1ICD/+} Embryonen gingen aus Verpaarungen von *Tbx18*^{Cre} Männchen und für das *Rosa26*^{N1ICD}-Allel homozygoten Weibchen hervor. Zum Einbringen eines *Rosa26*^{mtmG} wurde jeweils mit einem *Tbx18*^{Cre/+}, *Rosa26*^{mtmG/+} doppelt heterozygoten bei *Tbx18*^{Cre/+}, *Rosa26*^{mtmG/+}, *Rbpj*^{flox/flox} trippelt heterozygoten Männchen verpaart.

Um den Beginn der Tragzeit der Mäuse zu bestimmen, wurde vormittags auf das Vorhandensein eines vaginalen Pfropfs untersucht. Dieser Tag ist definitionsgemäß Tag-0,5 *post coitum* (p.c.), da die Paarung normalerweise gegen Mitternacht stattfindet. Davon ausgehend wurde dann der Zeitpunkt für die Entnahme der Embryonen errechnet.

2.7.2.2 Präparation der Embryonen

Nach dem Töten des Muttertieres durch Genickbruch wurde der Bauchraum eröffnet und die beiden Uteri herauspräpariert. Die Isolierung aus dem Uterus und den extraembryonalen Geweben erfolgte in PBS mittels eines Stereomikroskop (Leica MZ75). Bei größeren Embryonen wurde zur besseren Penetration des Fixatives der Brustkorb eröffnet und das Herz herauspräpariert, oder der Kopf und der Unterleib abgetrennt und das Zwerchfell durchstoßen.

2.7.2.3 Fixierung und Dehydrierung von Embryonen und Geweben

Isolierte Embryonen oder Herzen wurden mit 4%PFA/PBS bei 4°C über Nacht fixiert. Am folgenden Tag wurden sie in PBS gewaschen (2x für 10min in RT) und für Paraffinschnitte über eine Methanolreihe (je 1x 25%, 50%, 75% und 100% Methanol/PBS, 30 min-2h pro Schritt) dehydriert. Darauf folgte eine erneute Überführung in 100% Methanol und eine Lagerung bei -20°C bis zur Nutzung.

2.7.2.4 Genotypisierung von Embryonen mittels Reporterexpression

Die Genotypisierung von *Tbx18*^{GFP}, *Tbx18*^{Cre/+}; *Rosa26*^{N1ICD/+} und *Tbx18*^{Cre/+}; *Rosa26*^{mtmG/+}; *Rosa26*^{N1ICD/+} Embryonen erfolgte mittels des EGFP-Markers. Dabei wurden für *Tbx18*^{GFP} unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica MZFLIII) sowohl Unterschiede in Intensität als auch Expressionmuster zu Hilfe genommen. Bei

homozygoten *Tbx18*^{GFP} Embryonen ist keine GFP-Expression in den Somiten zu sehen (Bussen et al., 2004)

2.7.2.5 Genotypisierung von Embryonen mittels PCR

Es wurde zur Amplifikation allelspezifischer DNA-Fragmente eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Ein Standardreaktionsansatz enthielt ungefähr 500 ng genomische DNA, je 10 pmol der spezifischen Primer-Oligonukleotide, je 10 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 xPCR-Puffer und 1,5 U Taq-Polymerase (Sigma) und wurde mit MQ-H₂O auf ein Endvolumen von 50µl gebracht. Alle Reaktionsprotokolle basieren auf einem 2-4 min Denaturierungsschritt bei 94°C, ungefähr 30-35 Amplifikationszyklen, einen abschließenden 5-10 min Syntheseschritt und eine Lagerungsphase bei 4°C. Die Oligonukleotide wurden je nach Allel variiert (Tabelle 2):

PCR	Oligo1	Oligo2	Oligo3	Fragment (bp)	
				wt	mut
<i>Msd::Tbx18</i>	AKO0557	AKO0558			500
<i>Rosa</i> ^{LacZ}	AKO0917	AKO0918	AKO0919	500	250
<i>Tbx18</i> ^{cre}	AKO1110	AKO1111			1200
<i>Tbx18</i> ^{GFP}	AKO0630	AKO0668			1200
<i>Rbpj</i> ^{fllox}	AKO1781	AKO1004		185	215
<i>Rosa26</i> ^{N1/CD}	AKO1094	AKO1095	AKO1096	220	320
<i>Tbx3</i> ^{cre}	AKO0925	AKO0926	AKO0927	300	550

Tabelle 2: Verwendete Primerkombinationen für die Genotypisierung, wt: Wildtypallel; mut: transgenes Allel

2.7.3 Isolierung von Herzen aus Embryonen verschiedener Stadien

Nach Eröffnung des Brustkorbes wurde das Herz mit der Lunge herausgelöst. Alle Gewebeteile wurden bis auf Atrien und Ventrikel abgetrennt und die zu- und abführenden Gefäße herznah durchtrennt. Diese Schritte wurden in PBS durchgeführt.

2.8 Histologische Methoden

2.8.1 Lösungen

Acetat-Lösung:	0,5% Natriumacetat, vor Gebrauch zu filtrieren
BrdU-Lösung:	10 mg/ml 5-Bromo-2´DeoxyUridin (BrdU) in 0,9% NaCl/0,007N NaOH in ddH ₂ O, die Lösung ist bei -20°C zu lagern und vor Gebrauch stark zu schütteln
DAPI:	0,5 mg/l in PBS, zu aliquotieren und bei -20°C zu lagern

2.8.2 Paraffinschnitte

Nach der Dehydrierung von Embryonen und Herzen in Methanol wurden sie schrittweise (1:1 Methanol/Ethanol, 100%Ethanol, 1:1 Ethanol/Isopropanol; je 1x für 2h – 0,5d) in Isopropanol überführt. Dann wurden die Präparate auf 65°C erwärmt und schrittweise (25% Paraffin/Isopropanol, 50%, 75% je 1-2x für 0,5d) in 100% Paraffin überführt.

Die Einbettung und Ausrichtung der Präparate erfolgt bei RT in frischem Paraffin mit Hilfe von Pinzetten. Zur Beschleunigung des Aushärtens, wurden die weichen Plastikgefäße mit Eis gekühlt. Das Einbetten in Paraffin ermöglicht das Anfertigen von Dünnschnitten von 4-10µm Dicke mit Hilfe eines Mikrotoms.

Für histologische Färbungen (Hämatoxilin/Eosin) und Immunohistochemische Färbungen wurde eine Schnittdicke von 4-5µm gewählt und für *in situ* Hybridisierungen von 10µm. Vor dem Schneiden wurden die Paraffinböcke mit einer Rasierklinge zurechtgeschnitten und in das Mikrotom (Leica RM2155) eingespannt. Die Schnittpräparate wurden mit einer Pinzette in ein 42°C Wasserbad (DEPC-Wasser) zur Materialstreckung überführt und nach wenigen Sekunden auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Trocknung erfolgte auf Wärmeplatten bei 42°C über Nacht. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei RT.

2.8.3 Hematoxilin-Eosin-Färbung

Für diese Färbung mussten die Schnittpräparate zuerst in Roti-Histol deparaffiniert werden (1x 10 min, 1x 5min), in Ethanol/H₂O rehydriert (2x 100%, 1x70%, je 5min, H₂O,

10 min), in H₂O gewaschen und mit Hämatoxilin gefärbt (45 sec). Anschließend wurden die Objektträger in H₂O unter kontinuierlichem Zustrom von Frischwasser gewaschen, in Natriumacetat-Lösung (0,5%, 1min) inkubiert, erneut gewaschen in H₂O (2x je 1 min) und in Eosin gefärbt (1% alkalische Eosin-Lösung, 1min). Die Objektträger wurden erneut unter kontinuierlichen Wasserzustrom gewaschen, dehydriert (100% Ethanol, 2x je 2 min), in Roti-Histol geklärt (2x je 10 min) und mit Permount eingedeckt.

2.8.4 Dokumentation

Schnittpräparate wurden mit einem Stereomikroskop (Leica DM50000BM) mit angeschlossener Digitalkamera (Leica DFC300FX) im Hellfeld-Modus dokumentiert. Für die Dokumentation von Gesamtembryonen und isolierten Herzen wurde das Mikroskop Leica M420 mit Fuji Digitalkamera HC3002 verwendet.

2.9 Zellkultur-Methoden

2.9.1 Lösungen und Medien

DMEM:	von GibcoBRL als Pulver bezogen, - mit L-Glutamin (frisch hinzugefügt) - ohne Natriumpyruvat - mit 4500 mg/l Glukose - mit Pyridoxin
DMEM/Panserin 401:	1:1 Mischung der Medien DMEM und Panserin 401
Ethanol/PBS:	70% Ethanol in PBS
Gelatine/ H ₂ O:	0,1% Gelatine in H ₂ O
Glyzerin/PBS:	5% Glyzerin in PBS
Panserin 401:	von PAN Biotech fertig bezogen, - mit L-Glutamin - mit BSA - mit Transferrin
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2

2.9.2 Zellkulturvorbereitungen

Vor Gebrauch wurden Nährmedien und PBS auf 37°C vorgewärmt. Die verwendeten Gewebekulturschalen (Greiner TC-Platte, 12 Vertiefungen) waren speziell beschichtet und steril. Den Serum-freien Nährmedien wurde 2mM Glutamax, Penicillin (100 µg/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (Gibco) beigefügt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂.

Die Gewebekulturplatten wurden unter einer Werkbank mit laminarem Luftstrom geöffnet und vorbereitet. Die Kultivierung der Primärzellen wurde auf autoklavierten Glasdeckgläsern (18mm ø) durchgeführt, die kurz in 0,1% Gelatine in H₂O eingetaucht, getrocknet und dann in den Vertiefungen platziert wurden.

Die Präparation und Explantation der Primärzellen erfolgte unter Sichtkontrolle (Leica MZ75). Es wurde versucht, so keimfrei wie möglich zu arbeiten, wobei an der geöffneten Werkbank mit Handschuhen und Mundschutz gearbeitet wurde. Die Pinzetten wurden vor Beginn der Arbeiten mit 2M NaOH für min 30min behandelt und dann in sterilem H₂O gewaschen.

2.9.3 Explantation der isolierten Herzanteile

Für diesen Versuch wurden Mäuseembryonen 11,5d p.c. isoliert. Die Präparation der embryonalen Herzen erfolgte in frischem sterilen PBS, indem die Perikardhöhle eröffnet und der Embryo leicht überstreckt wurde. Dann wurde mit der Pinzette ein Teil des rechten Ventrikels abpräpariert. Der freigelegte Ventrikel wurde nun mit einer 1ml Filterspitze vorsichtig auf das Glasdeckplättchen in 2ml Medium in der Gewebekulturschale pipettiert. Die Ventrikel wurden mit der Pinzette auf dem beschichteten Glasplättchen mit den Innenseiten nach unten leicht festgedrückt. Danach wurden die Kulturschalen in den Brutschrank überführt.

2.9.4 Weiterführung der Zellkultur

Nach 2 Tagen sind epikardiale Zellen vom Ventrikel weg gewandert und formen eine kreisrunde epitheliale Monoschicht. Nach den ersten 48h wurde der Ventrikel vorsichtig

mit sterilen Pinzetten entfernt, um ein Abreißen der ausgewachsenen Epikardkultur zu vermeiden. Das Absaugen des alten Mediums und das Einfüllen des neuen Mediums wurden ebenfalls besonders vorsichtig durchgeführt, um ein Ablösen oder Beschädigen des Zellmaterials zu vermeiden. Das alte Medium wurde mit Ventrikel abgesaugt und neues Medium hinzugefügt. In den ersten zwei Tagen wurde reines DMEM als Kulturmedium verwendet. An den folgenden Tagen wurde eine 1:1 Mischung aus DMEM und Panserin 401 eingesetzt jeweils mit oder ohne 10% FkS, 250 pM rekombinantes humanes TGFb1 (#100-21, PeproTech oder R&D Systems), rekombinantes humanes PDGF-BB (250pM, Cell Signaling) und den Tgf receptor 1 (Alk5) Inhibitor SB431542 (2.5 µM, Sigma).

2.9.5 Dokumentation

Die Glasdeckgläschen mit den angewachsenen Kulturen wurden luftblasenfrei in einen Tropfen Glycerin/PBS mit dem Zellmaterial zum Tropfen hin auf einen Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser) überführt oder direkt in den Kulturschalen dokumentiert. Die Kulturen wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops (Axioplan) mit der Digitalkamera (ProgRes C14) dokumentiert, oder mit dem inversen Mikroskop Leica DMI6000B mit der Kamera Leica DFC350FX.

2.10 Immunologische Methoden

2.10.1 Lösungen

DAB:	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid, Peroxidase Substrat-Kit SK-4100 (Vector)
Glycerin/PBS:	5% Glycerin in PBS
Glycin:	1M in H ₂ O
H ₂ O ₂ /PBS:	3% H ₂ O ₂ in PBS
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
PBST:	0,2% BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS
PBSTN:	5% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum in PBST

PFA/PBS: 4% bzw. 1% Paraformaldehyd in PBS

2.10.2 Antigennachweis auf Schnitten

Die Paraffinschnitte wurden wie beim in-situ Protokoll entwacht und dann Ringe um die Präparate gezogen. Für Antikörper gegen Tbx18, P-Smad2/3, Efnb2, Emcn, Notch3, Postn, Dll1, Vegfa, Nr2f2, Nos3 and Pdgf receptor beta wurden die Paraffinschnitte vor dem Färbeprotokoll für 3min im Dampfdruckkochtopf in antigen unmasking solution (H-3300, Vector Laboratories Inc.) gekocht. Das Signal wurde dann mit Hilfe des Tyramid Signalamplifikationskit (TSA) von Perkin-Elmer (NEL702001KT) amplifiziert. Für Doppelfärbungen mit GFP wurde der sekundäre Antikörper während des Biotin Schrittes des TSA-Protokolls zugegeben. Für alle anderen Antikörper wurde das gleiche Protokoll nur ohne Amplifikation und Kochen eingesetzt. Zellkerne wurden mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Roth) gefärbt.

2.10.3 Antigennachweis in Zellkultur

Im Anschluss an die Kultur (Abschnitt 2.9.4), wurden die Glasdeckgläschen in den Vertiefungen der Kulturschale mit PBS gewaschen (1x, 5min) und in eine 24-Well Platte überführt. Für die nun folgende Fixierung wurden die Zellen in eiskaltem Methanol 10min bei -20°C gelagert. Nach der Fixierung wurde erneut mit PBS gewaschen (3x 5 min). Dann wurden die Zellen mit 3% H₂O₂-Lösung inkubiert (1x 10 min), um endogene Peroxidasen zu zerstören. Darauf folgte ein erneuter Waschschrift mit PBS (2x, 5min). Dann wurde weiter nach dem Schnittprotokoll nur min etwas größeren Volumina (ca. 50-100µl) gearbeitet. Alle Waschschrte wurden mit 1ml Volumen durchgeführt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4°C über Nacht.

Falls der sekundäre Antikörper mit Fluoreszenz gekoppelt war, wurde ab diesem Punkt auf einen geeigneten Lichtschutz geachtet, um ein frühzeitiges Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden. Zellkerne wurden mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Roth) gefärbt.

2.10.4 TUNEL-Assay

Der Nachweis apoptotischer Zellen auf 5 µm Paraffinschnitten erfolgt unter Verwendung des ApopTag Plus Fluorescein *in situ* Apoptosis Detection Kits (Chemicon International). Die gefärbten Schnitte wurden in Mowiol mit Zusatz von DAPI (0,5µg/ml) eingedeckt.

2.10.5 BrdU-Inkorporationsassay

Schwangeren Mäusen wurden 100 µl BrdU-Lösung pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach einer Inkubation von 1 h wurden die Mäuse getötet, die Embryonen entnommen, fixiert und in Methanol überführt. Die immunhistochemische BrdU-Detektion mit Zellkerngegenfärbung (DAPI) erfolgte auf 5µm Paraffinschnitten. Für den BrdU-Inkorporationsassay in der Zellkultur wurde dem Medium für 4h BrdU (0,05 mg/ml) zugesetzt, bevor sie fixiert wurden. Die immunhistochemische BrdU-Detektion wurde nach dem mouse-on-mouse Protokoll (VectorLabs) mit dem anti-BrdU Antikörper (1:200, Roche) und dem sekundären biotinylierten anti-Maus Antikörper (Vector-Labs) durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte mit dem VectastainABC-Kit (VectorLab) und die Färbung mit dem DAB-Kit. Der BrdU-Markierungsindex ergab sich aus dem Verhältnis aller BrdU-positiven Zellkerne zur Gesamtzellkernzahl in einer definierten Fläche.

2.10.6 Dokumentation

Die Präparate wurden wie in Abschnitt 2.9.5 beschrieben dokumentiert. Für Fluoreszenzbilder mit geringerer Lichtintensität wurde teilweise auch die lichtempfindlichere schwarz/weiß Digitalkamera (Leica DFC350F) eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Funktion des T-Box Gens *Tbx18* in der SAN Entwicklung

Da bisher wenig bekannt ist über die Entstehung und die Struktur des Sinus Knotens (SK), wurde in dieser Arbeit die Morphologie, Lokalisierung und molekulare Unterteilung des SK zu verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien genau analysiert und beschrieben. Der gesamte SK weist eine Expression des T-Box Transkriptionsfaktors *Tbx3* auf (Mommersteeg et al., 2007; Hoogaars et al., 2004). Diese Expression kann als Markierung zur genauen Identifizierung dieser Struktur während der gesamten Embryonalentwicklung genutzt werden (Abb. 3-1A). Eine 3 dimensionale Rekonstruktion dieser Struktur mit Hilfe des Amira Programms bei E14.5 (Abb. 3-1B) zeigte, dass der SK aus einer großen Domäne besteht, die die rechte Vena cava superior auf einer Seite umschließt, direkt benachbart zum rechten Atrium. Außerdem besteht der SK noch aus einer kleineren Domäne, die sich innerhalb des Atriums befindet, direkt an der rechten venösen Klappe.

Mit Hilfe einer Expressionsanalyse verschiedener Marker-Gene für diese Struktur und des umgebenden Gewebes auf benachbarten sagittalen Schnitten bei E14.5, konnte eine molekulare Regionalisierung der SK-Struktur aufgedeckt werden (Abb 3-2). Diese in situ Hybridisierungsfärbungen bei E14.5 zeigten 2 molekulare Subdomänen innerhalb des *Tbx3*-positiven SK.

Der Kopf des SK exprimierte *Tbx18* und *Hcn4*, welches Marker sowohl für den sich entwickelnden SK als auch die Sinus Hörner sind (Mommersteeg et al., 2007; Stieber et al., 2003; Garcia-Frigola et al. 2003). Im Gegensatz dazu exprimierte der Schwanz *Hcn4* und *Tbx3* und war frei von *Tbx18* Expression. Benachbart zu den *Tbx3*-positiven SK Domänen lagen die zukünftige Vena cava superior, die positiv für *Tbx18* ist (Christoffels et al., 2006) und auf der anderen Seite die atriale Wand und die atriale Seite der venösen Klappe, die die atrialen Marker *Cx40* und *Cx43* exprimierten. Diese beiden Expressionsdomänen bildeten eine klare Grenze aus. Aus diesen Expressionsdaten lassen sich also 2 verschiedenen regulatorische Domänen des SK ableiten.

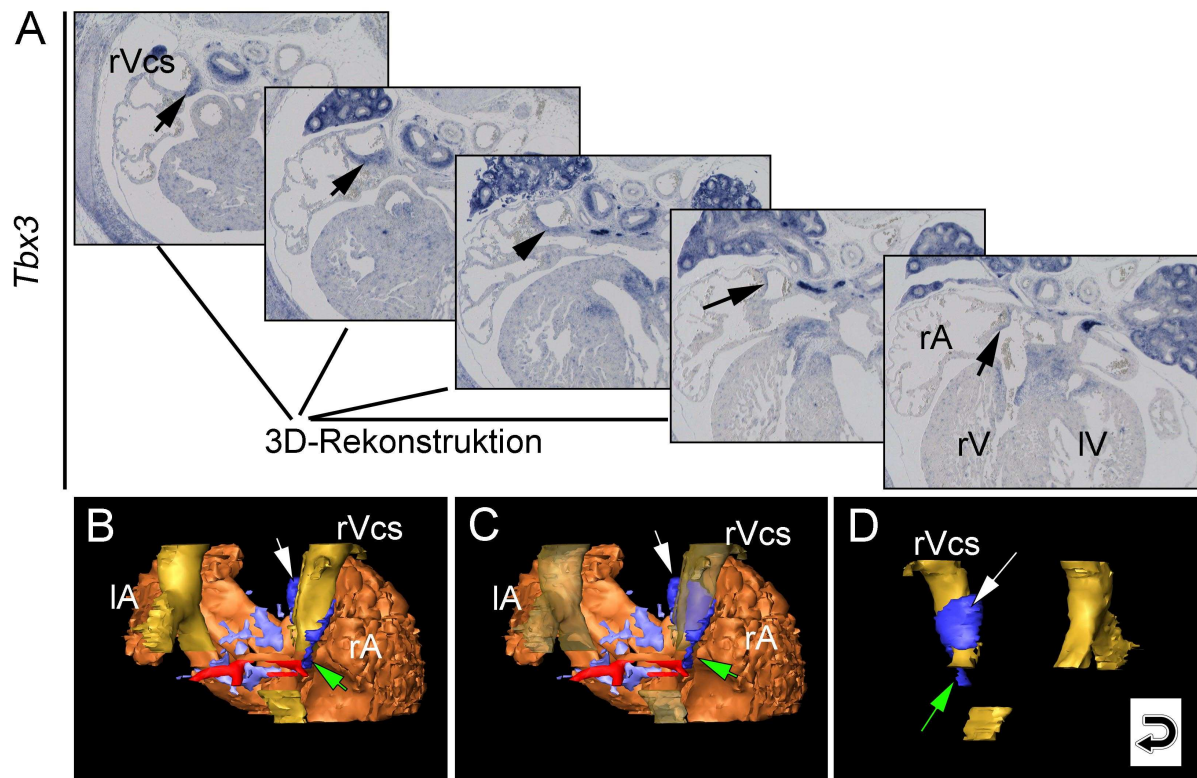


Abbildung 3-1: Darstellung der Expression von *Tbx3* mit Hilfe der *in situ* Hybridisierungsanalyse auf seriellen Schnitten und anschließende 3D Rekonstruktion. (A) zeigt transverse Schnitte durch ein E14.5 murines Herz, (B, C und D) zeigen dreidimensionale Rekonstruktionen von diesen Schnittfärbungen, wobei in (A) alle Strukturen undurchsichtig, in (C) teilweise transparent (gelbe Kavalvenen) und (D) ausschnittsweise, aber gedreht, dargestellt sind. Der weiße Pfeil deutet auf den Kopf des Sinusknotens und der grüne Pfeil auf seinen Schwanz; (blau) sinoatrialer Knoten, (hell blau) *Tbx3* positive Ganglienbündel, (rot) Pulmonalvene, (orange) Atrium, (gelb) Kavalvenen; (IA) linkes Atrium, (rA) rechtes Atrium, (rVcs) rechte Vena cava superior.

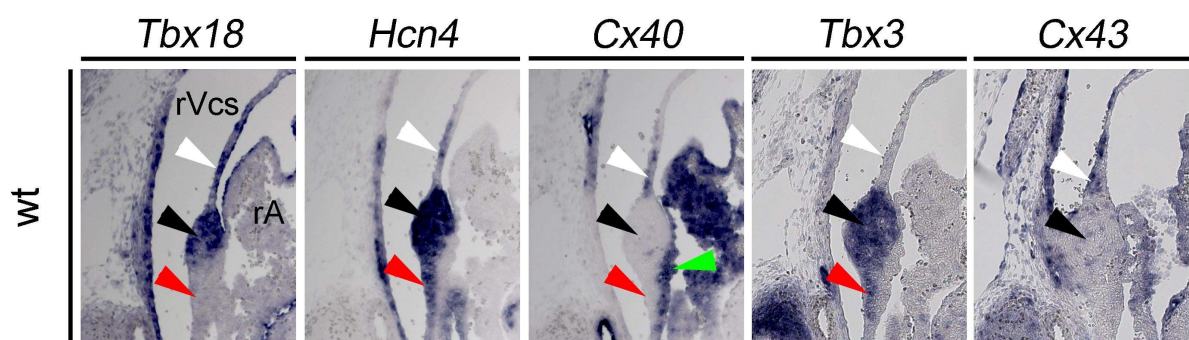


Abbildung 3-2: Unterteilung des Sinusknotens in verschiedenen Domänen. Darstellung der Expression verschiedener SK-Marker Gene mit Hilfe der *in situ* Hybridisierungsanalyse. Alle Schnitt-*in situ* Bilder zeigen sagittale Schnitte durch ein E14,5 murines Herz. Die verschiedenen Domänen des SK und des benachbarten Gewebes sind mit farbigen Pfeilen markiert: (weiß) Kavalvenengewebe, (schwarz) Kopfteil des Sinus-Knotens, (rot) Schwanzteil des Sinus Knotens und (grün) atriales Myokard. (rA) rechtes Atrium, (rVcs) rechte Vena cava superior.

3.1.1 Sinusknotenbildung benötigt *Tbx18*

Die starke Expression von *Tbx18* im SK weist auf eine Funktion in der Entwicklung der Kopfdomäne hin. Aus diesem Grund wurde die *Tbx18*^{GFP/GFP} Maus genutzt, um den Verlust von *Tbx18* im Bereich des SK zu analysieren. Für die Analyse wurden serielle Schnitte von verschiedenen Embryonalstadien angefertigt und die Markergenexpression mittels in situ Hybridisierungen bestimmt (Abb. 3-6/7).

Um zu Beginn der Analyse einen Überblick über die Morphologie des Knotens in *Tbx18* Verlustmutanten zu bekommen, wurden serielle Schnitt-in situ Färbungen von *Tbx3* im kompletten Knotenbereich angefertigt und mit Hilfe des Amira Programms 3-dimensional rekonstruiert (Abb. 3-3). Der Kopfbereich des SK war bei E14.5 signifikant kleiner, während der Schwanzbereich erhalten bleibt (Abb 3-3 und 3-4B).

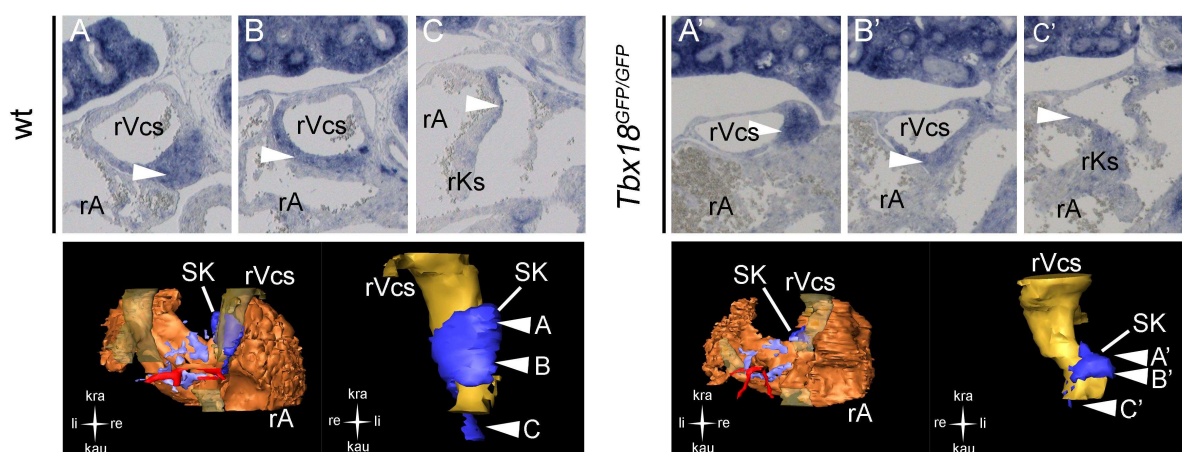


Abbildung 3-3: Morphologische Veränderungen im Sinusknoten von *Tbx18*KO-Mäusen. Darstellung der Expression von *Tbx3* mit Hilfe der *in situ* Hybridisierungsanalyse auf seriellen Schnitten und anschließende 3D Rekonstruktion von wt und *Tbx18*^{GFP/GFP} Herzen. (A-C und A'-C') zeigen transverse Schnitte durch ein E14,5 murines Herz, darunter sind die jeweiligen dreidimensionale Rekonstruktionen von diesen Schnittfärbungen, wobei auf der linken Seite jeweils Strukturen teilweise transparent (gelbe Kavalvenen) und rechts ausschnittsweise, aber gedreht, dargestellt sind. Die weißen Pfeile deuten jeweils auf die entsprechende Struktur und Schnittebene des Sinusknotens, die in der Rekonstruktion dargestellt sind; (blau) sinoatrialer Knoten, (hell blau) *Tbx3* positive Ganglienbündel, (rot) Pulmonalvene, (orange) Atrium, (gelb) Kavalvenen; (li) links, (lA) linkes Atrium, (kau) kaudal, (kra) kranial, (rA) rechtes Atrium, (re) rechts, (rVcs) rechte Vena cava superior, (SK) Sinusknoten (rKs) rechte venöse Klappe.

Weitere Färbungen von anderen Herzen der gleichen und anderer Entwicklungsstufen erlaubte über die 3-dimensionale Rekonstruktion eine statistische Analyse des Größenwachstums der Kopfregion. Der wt SK-Kopf wächst von ca. 0,002 mm³ bei E12.4 schnell an auf 0,009 mm³ bei E14.5, bleibt dann aber konstant bei diesem Volumen (Abb. 3-4A). In *Tbx18* Mutanten jedoch war bei E12.5 noch gar kein *Tbx3* positiver Kopf

zu finden und die Expression beschränkt sich auf den Teil des SK in der venösen Klappe. Im Verlauf der weiteren Entwicklung, die auch mit einer verspäteten Myokardialisierung der Vena cava superior einhergeht (Christoffels et al., 2006), wurde eine kleine Kopf-ähnliche Struktur in *Tbx18*^{GFP/GFP} Embryos gebildet. Diese Struktur bleibt während der ganzen Entwicklung signifikant kleiner als die Kontrolle (Abb. 3-4A, B). Entsprechende Messungen wie im Wildtyp ergaben, dass es in der Mutante nicht zu einem Wachstum des Knotenkopfes nach E12.5 kommt (Abb.3-4A).

Die Proliferationsrate in der *Tbx18*-positiven Kopfregion war allerdings nicht signifikant verändert (Abb. 3-5). Auch die Apoptose in dieser Region war unverändert (Daten nicht gezeigt). Nachdem diese Ursachen ausgeschlossen werden konnten und auch keine Veränderung in den Zelldichten dieser Region festgestellt werden konnte (Wiese et al., 2009), bleibt nur noch die Möglichkeit, dass die Rekrutierung der Zellen in diese Struktur gestört ist.

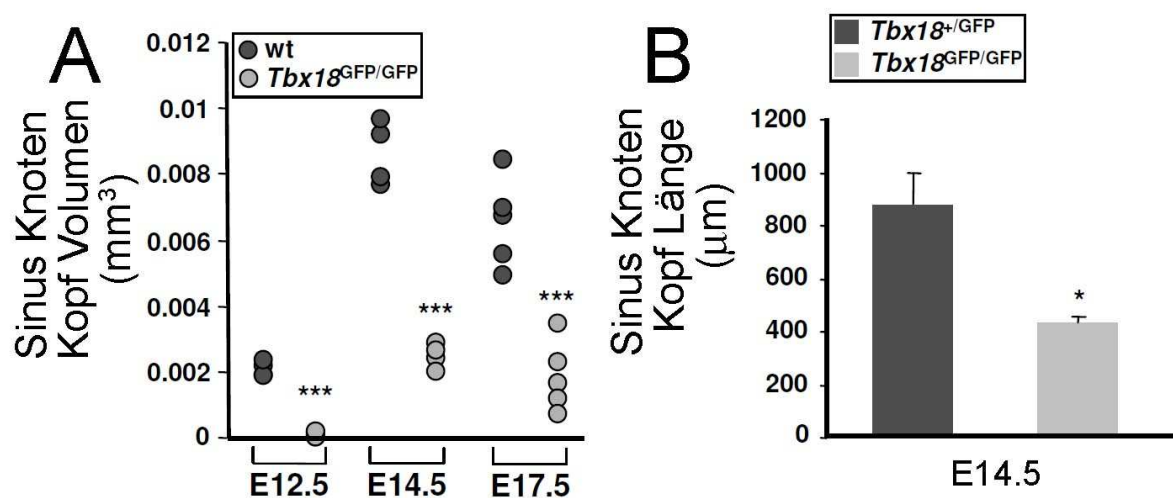


Abbildung 3-4: Volumen und Länge reduziert im Sinusknoten von *Tbx18*KO-Mäusen. (A) Bestimmung des Volumens der Kopfstruktur zu verschiedenen Embryonalstadien im wt und in der *Tbx18*-Mutante mit Hilfe der Amira-Software (n=4/5) (nach Wiese et al. 2009), (B) Bestimmung der Länge der Kopfstruktur bei E14.5 im wt und in der *Tbx18*-Mutante (n=4) (nach Wiese et al. 2009). Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student-T-Test bestimmt (* für P<0,05, *** für P<0,001)

Um einen genauen Einblick in die Veränderungen der *Tbx18*^{GFP/GFP} Mutante zu erhalten wurde eine Markeranalyse, von bereits weiter oben im wt beschriebenen Genen bei E14.5, E17.5 und Adulten Mäusen durchgeführt. Dies wurde mit Hilfe der in situ Hybridisierungsmethode auf seriellen sagittalen (Adult=transvers) Schnitten analysiert (Abb. 3-6/7). *GFP* von *Tbx18*^{GFP} Allel diente dabei als Marker für die *Tbx18* Region im *Tbx18*-Mutanten Hintergrund. Bei E14.5 und E17.5 in der Mutante wurde deutlich, dass die Entwicklung des SK-Kopfgewebes, welches positiv für *GFP*, *Tbx3* und *Hcn4* und negativ für *Cx40* und *Cx43* ist, zwar stattfindet aber verzögert ist (Abb. 3-6). Die Größe des Kopfes bleibt kleiner während der gesamten Entwicklung bis hin zum adulten SK (Abb.3-7). In den adulten *Tbx18* Mutanten war die Größe des SK extrem verringert. Diese Tiere zeigten unter Anästhesie allerdings keine Veränderungen in der Kontraktionsrate, den EEG Parametern und P-Wellen (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen und weiteren Daten konnte ein Model dieses Expressionsprofilvergleichs über die verschiedenen analysierten Embryonalstadien aufgestellt werden (Abb.4-3).

Eine klare Grenze zwischen dem SK und dem atrialen Myokard ermöglicht eine Trennung zwischen den verschiedenen elektrischen Potentialen der Gewebe (Boyett et al., 2000; Liu et al. 2007; Verheijck et al., 2001). Die Expression der Markergene *Tbx3*, *Hcn4* und *Cx40* in den verschiedenen Domänen ermöglichen es diese Grenze zu beurteilen. In *Tbx18*-Mutanten war im Gegensatz zur wt Kontrolle diese Grenze weniger klar ausgeprägt (Abb. 3-6, roter Pfeil). Allerdings waren die Marker *Hcn4* und *Cx40* auf den Färbungen in der Mutante niemals koexprimiert. Die Zellidentitäten bleiben also wohl erhalten und der Verlust der Grenze ist also eher auf morphogenetische Defekte zurückzuführen.

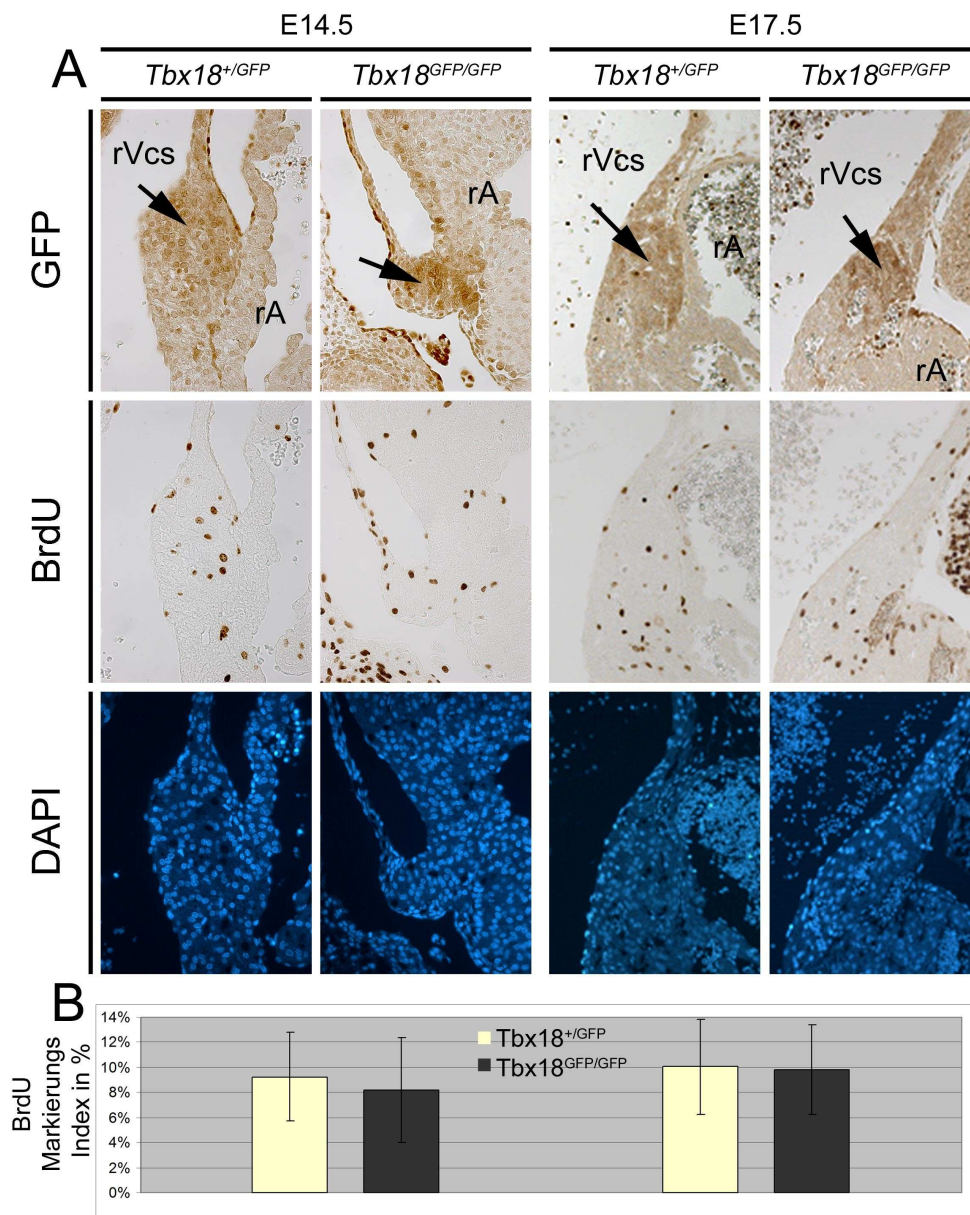


Abbildung 3-5: *Tbx18*KO-Mäuse zeigen keine Veränderungen der Zellproliferation des Sinusknotens.

BrdU-Inkorporationsassay für *Tbx18*-Mutanten und Kontrollembryonen bei E14.5 und E17.5. (A) Sagittale Schnitte des Sinusknotens zu gezeigten Stadien von Kontroll- und *Tbx18*^{GFP/GFP} Embryonen. Die ausgezählte Domäne des SK-Kopfes wurde mit Hilfe einer GFP-Antikörperfärbung auf einem benachbarten Schnitt eingegrenzt. (B) Statistische Auswertung der BrdU-Markierungsindices für beide Stadien. Der BrdU Markierungsindex entspricht dem Verhältnis aller BrdU positiven Zellkerne zur Gesamtheit aller Zellkerne im entsprechenden Abschnitt. Es wurden 4 Embryonen (bzw. 3 bei E17.5) vom jeweiligen Genotyp mit jeweils 4-5 benachbarten Schnitten ausgewertet. Als Streuungsmaß wurde die Standardabweichung genutzt. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student-T-Test bestimmt. Es besteht kein Unterschied zwischen Kontrolle und *Tbx18*KO. Das ist allerdings nicht signifikant. (rA) rechtes Atrium, (rVcs) rechte Vena cava superior.

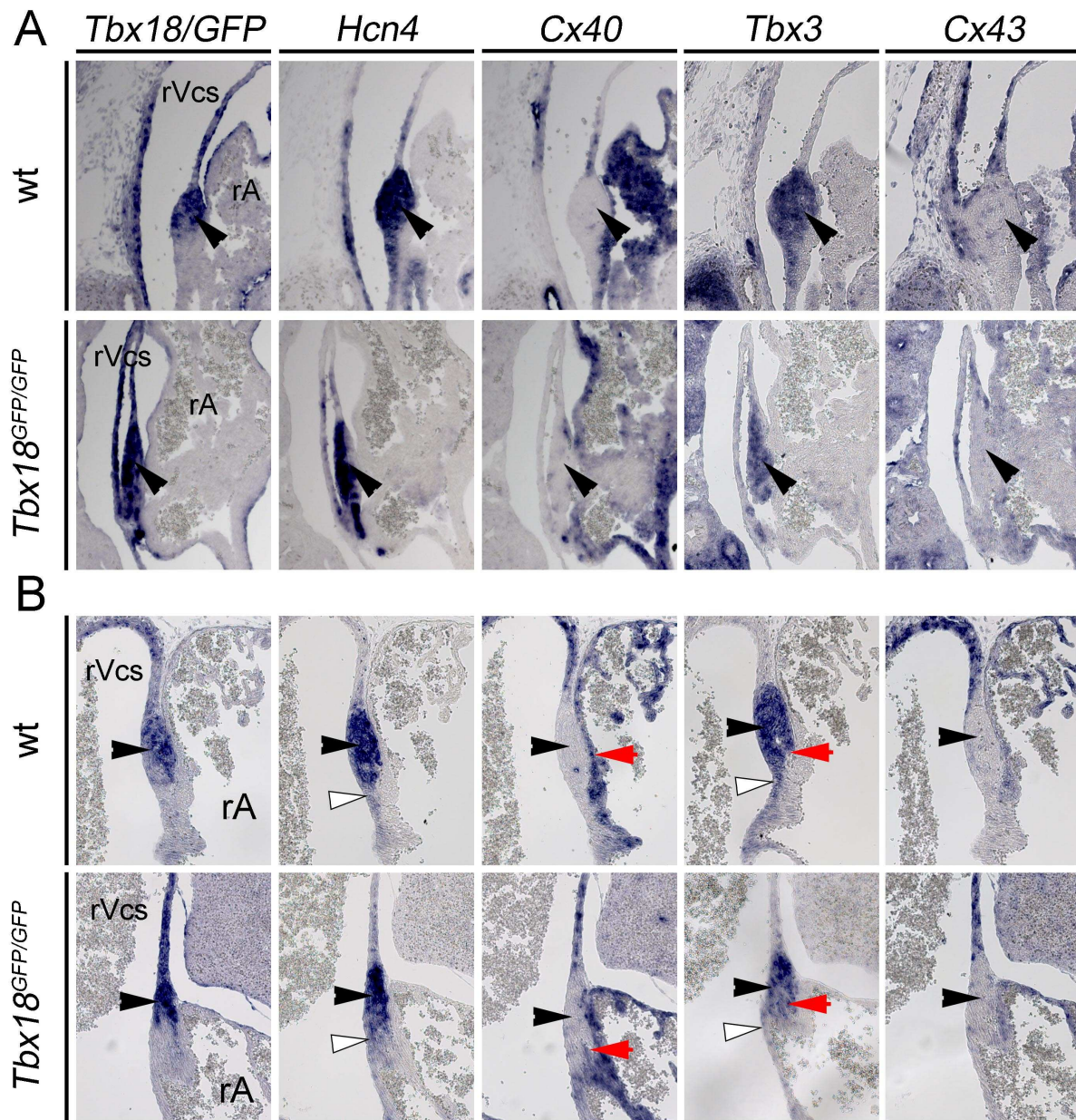


Abbildung 3-6: *Tbx18*KO-Mäuse weisen morphologische Veränderungen und Verzögerungen in der Entwicklung des Sinusknotens auf. Darstellung der Expression verschiedener SK-Marker Gene in der Kontrolle mit Hilfe der in situ Hybridisierungsanalyse und Vergleich mit *Tbx18^{GFP/GFP}* Herzen. Alle Schnitt-in situ Bilder zeigen sagittale Schnitte durch (A) E14,5 und (B) E17,5 murine Herzen. Die verschiedenen Domänen des SK und des benachbarten Gewebes sind mit farbigen Pfeilen markiert: (schwarz) Kopfteil des Sinus-Knotens, (weiß) Schwanzteil des Sinus Knotens und (rot) Grenze zum atriales Myokard. (rA) rechtes Atrium, (rVcs) rechte Vena cava superior.

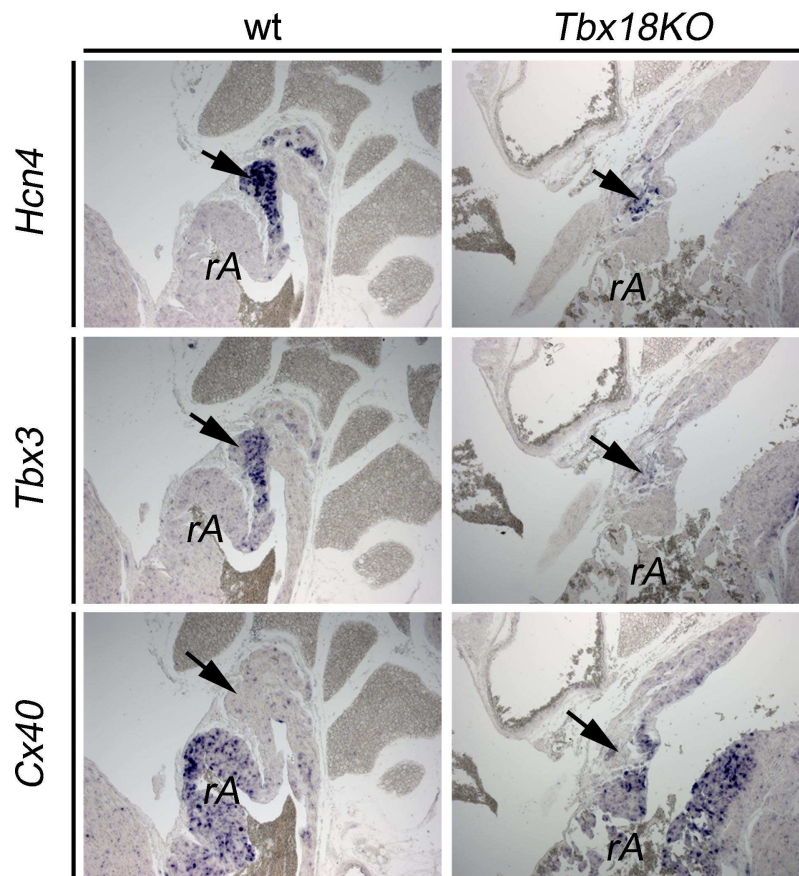


Abbildung 3-7: Adulte *Tbx18KO*-Mäuse zeigen massive morphologische Veränderungen im Sinusknoten. Darstellung der Expression verschiedener SK-Marker Gene in der Kontrolle mit Hilfe der in situ Hybridisierungsanalyse und Vergleich mit *Tbx18KO*-Herzen: Alle Schnitt-in situ Bilder zeigen transverse Schnitte durch adulte (6 Wochen) murine Herzen. Der Kopfteil des Sinus-Knotens ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. (rA) rechtes Atrium. Zur Analyse wurden *Tbx18Gfp*; *msd::Tbx18* Mäuse genutzt, da der *Tbx18KO* direkt nach der Geburt letal ist (Bussen et al., 2004)

3.1.2 Zellschicksalsanalyse der *Tbx18* positiven SAN-Domäne

Die bisherigen Ergebnisse ergaben die Möglichkeit, dass entweder *Tbx3* und *Hcn4* positives primitives Myokard expandiert und dann *Tbx18* Expression anschaltet, oder dass *Tbx18* positives Mesenchym aus dem Sinus Horn in die SK Domäne integriert wird. Um das zu beantworten wurde die *Tbx18^{cre}* Mauslinie, die in allen Zellen, die jemals *Tbx18* positiv gewesen sind, irreversibel *Cre* exprimiert, mit *Rosa26^{lacZ}* Mäusen verpaart. Alle Zellen und Tochterzellen von *Tbx18* positivem Gewebe sind nun *LacZ* (β -Galaktosidase Aktivität) positiv und erlauben die Aufklärung des Schicksals von *Tbx18* positiven Zellen während der Embryonalentwicklung. Mit Hilfe der in situ Hybridisierungsfärbungen für *lacZ* und *Tbx3* bei E14.5 und E18.5 konnte gezeigt

werden, dass sowohl der SK-Kopf, als auch überraschenderweise der Schwanz aus vormals *Tbx18* positiven Zellen gebildet wird, obwohl Dieser mittlerweile *Tbx18* negativ ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das atriale Myokard negativ für *lacZ* bleibt. *Tbx18* positive Zellen tragen also nicht zum atrialen Myokard bei (Abb. 3-7).

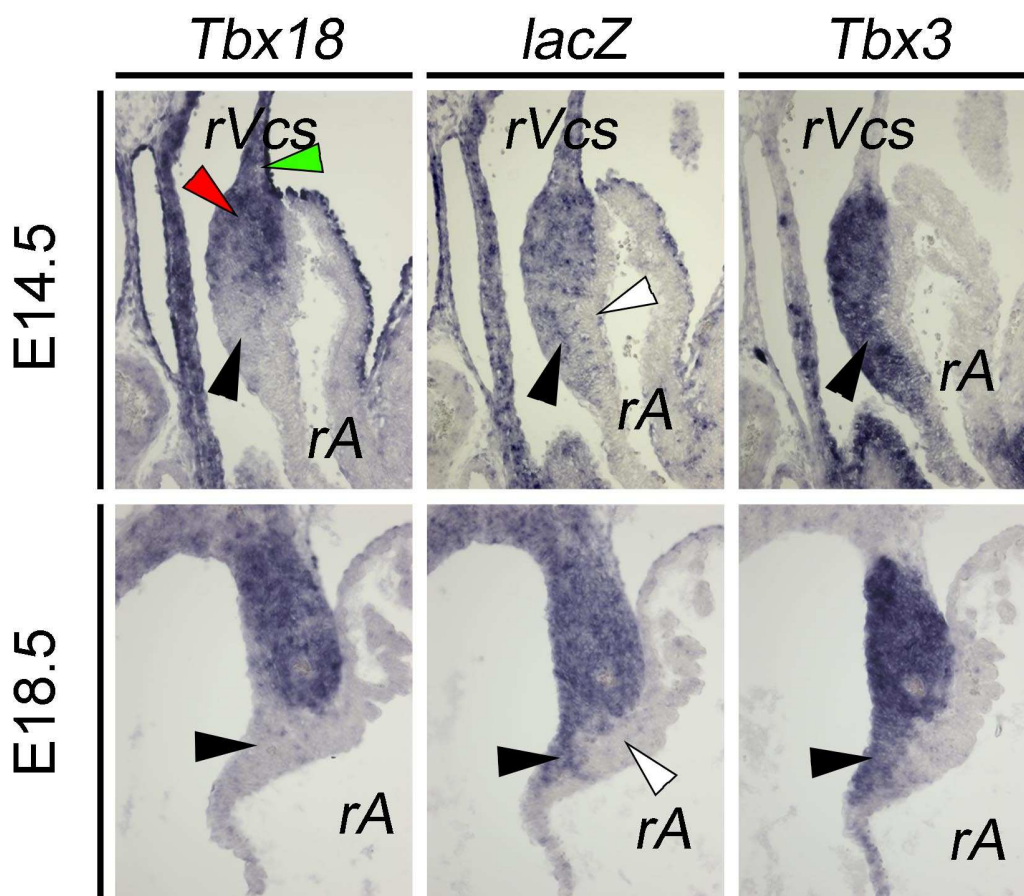


Abbildung 3-8: Zellen aus der *Tbx18*-positiven Domäne tragen auch zur Entstehung der Schwanzstruktur bei, aber nicht zum atrialen Myokard. Darstellung der Expression der SK-Marker Gene *Tbx18* und *Tbx3* und des Zellschicksalsmarker *lacZ* mit Hilfe der in situ Hybridisierungsanalyse in *Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{lacZ/+}* Herzen. Alle Schnitt-in situ Bilder zeigen sagittale Schnitte durch E14,5 und E18.5 murine Herzen. Die verschiedenen Domänen des SK und des benachbarten Gewebes sind mit farbigen Pfeilen markiert: (rot) Kopfteil des Sinus-Knotens, (schwarz) Schwanzteil des Sinus Knotens und (weiß) atriales Myokard und (grün) *Tbx18*-positives Kavalvenenmyokard. (rA) rechtes Atrium, (rVcs) rechte Vena cava superior.

3.1.3 Molekulare Analyse des SK in der *Tbx18/Tbx3* Doppelmutante

Es konnte in vorhergehenden Experimenten gezeigt werden, dass auch *Tbx3*-Mutanten einen signifikant kleineren SK aufweisen (Hoogars et al., 2007), was aber auf eine generelle Hyperplasie des gesamten Atriums zurückgeführt wurde. Eine molekulare Analyse zeigte eine ektopische Expression von *Cx43* und anderen atrialen Markern im

SK von *Tbx3*-Mutanten. *Tbx3* ist also nicht für die grundsätzlichen Zellprogramme für Wachstum und korrekte Morphologie notwendig, aber für eine korrekte Genregulation im SK.

Die bisherige Analyse hat also gezeigt, dass *Tbx18* und *Tbx3* verschiedenen Programme der SK Bildung kontrollieren. Um nun die Verbindung zwischen diesen beiden

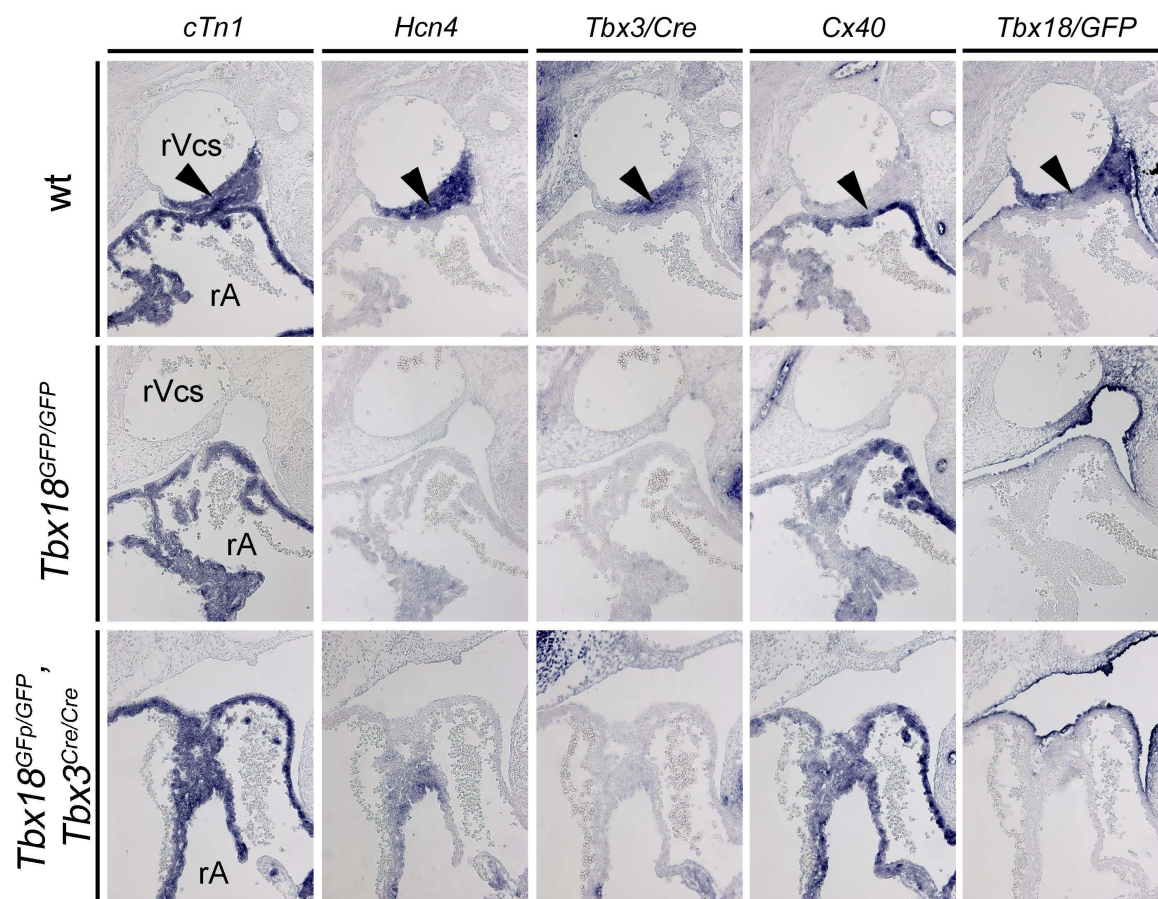


Abbildung 3-9: *Tbx3/18DoppelKO-Mäuse* rekapitulieren den Verlust des SK-Kopfes bei E12.5. Darstellung der Expression verschiedener SK-Marker Gene in der Kontrolle mit Hilfe der in situ Hybridisierungsanalyse und Vergleich mit *Tbx18^{GFP/GFP}* und *Tbx18^{GFP/GFP}; Tbx3^{Cre/Cre}* Herzen. Alle Schnitt-in situ Bilder zeigen transverse Schnitte durch E12.5 murine Herzen. Spätere Analysen sind nicht möglich, da die Doppelmutante um E13.5 stirbt. Das Kopfteil des Sinus-Knotens ist mit einem schwarzen Pfeilkopf markiert, (rA) rechtes Atrium, (rVcs) rechte Vena cava superior.

Transkriptionsfaktoren genauer zu beleuchten, wurden *Tbx18^{GFP/+} Tbx3^{Cre/+}* doppelt heterozygote Embryonen untersucht, die allerdings keinen Phänotyp zeigten (Daten nicht gezeigt). *Tbx18* und *Tbx3* interagieren also nicht auf genetischer Ebene. Doppelt homozygote Embryonen konnten nur bis E12.5 untersucht werden, da sie kurz danach starben. Diese zeigten, ähnlich wie in der *Tbx18*-Mutante keinerlei SK-Kopfdomäne, während der Schwanz vorhanden war (Abb. 3-9/10, Schwarze Pfeilköpfe). Zusätzlich

zeigte dieser Schwanz eine ektopische Expression von Cx40, was vergleichbar mit der *Tbx3*-Einzelmutante ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Gene zeitlich und funktionell unabhängig voneinander agieren. *Tbx18* kontrolliert die Rekrutierung von Vorläuferzellen für die Kopfdomäne, während *Tbx3* die anschließende Differenzierung der Myocyten des SK reguliert.

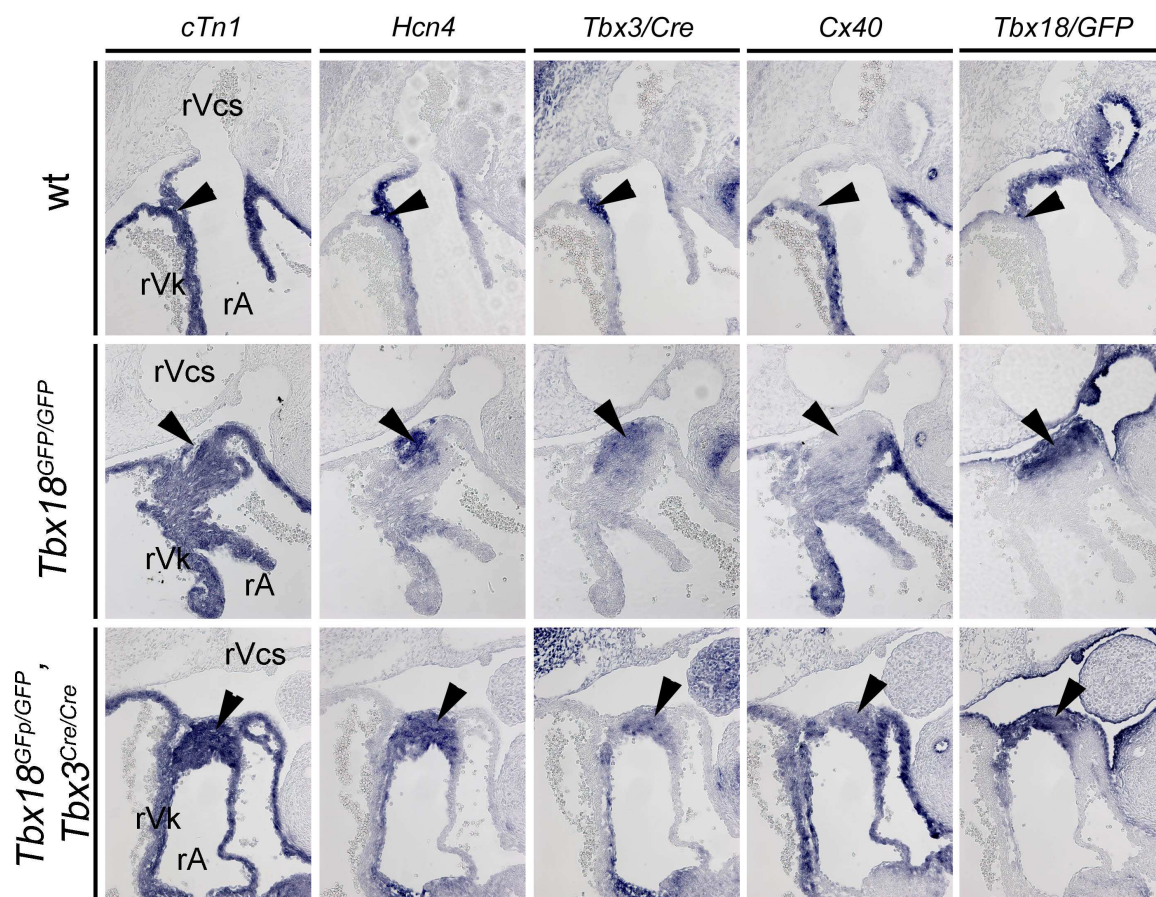


Abbildung 3-10: *Tbx3/18*DoppelKO-Mäuse weisen eine ektopische Expression von *Cx40* im Schwanzteil des SK auf. Darstellung der Expression verschiedener SK-Marker Gene in der Kontrolle mit Hilfe der in situ Hybridisierungsanalyse und Vergleich mit *Tbx18*^{GFP/GFP} und *Tbx18*^{GFP/GFP}, *Tbx3*^{Cre/Cre} Herzen. Alle Schnitt-in situ Bilder zeigen transverse Schnitte durch E12.5 murine Herzen. Spätere Analysen sind nicht möglich, da die Doppelmutante um E13.5 stirbt. Das Schwanzteil des Sinus-Knotens ist mit einem schwarzen Pfeilkopf markiert und verweist auf die ektopische Expression des atrialen Kammermyokardgens *Cx40* in der Doppelmutante, im Gegensatz zur *Tbx18*-Mutante. (rA) rechtes Atrium, (rVcs) rechte Vena cava superior (rVc) rechte Venenklappe.

3.2 Notch-Signalweg in der Epikardentwicklung

Bisher ist noch keine detaillierte Expressionsanalyse der verschiedenen Notch-Signalwegskomponenten während der Herzentwicklung in der Literatur zu finden, weil nur die Expression einzelner Komponenten in bestimmten Domänen des Herzens und zu bestimmten Embryonalstadien gezeigt wurde. Um die Rolle des Notch Signalweges in der Entwicklung des Epikard zu bestimmen, muss erstmal ein genauer Überblick über die Expression dieser Komponenten während der gesamten Epikardentwicklung vom Proepikardialorgan bei E9.5 bis zu den ausgeformten Koronargefäßen bei E18.5 gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurde für diese Arbeit ein solches Expressionsprofil von E9.5 bis E18.5 mittels RNA-in situ Hybridisierung erstellt (Abb. 3-11/12/13).

In ganzen Embryonen bei E9.5 konnte eine starke Expression *Jag1* und *Hey1* und eine sehr schwache Expression von *Notch 1,2* und *3* und *HeyL* festgestellt werden. Nach dem Übergang vom Proepikardialorgan zum Epikard wurde mit dieser Methode schwache Expression von *Notch2* und *3*, *Dll3*, *Jag1*, *Hey1*, *Hey2* und *HeyL* im Epikard von E10.5 gezeigt. Diese Ergebnisse konnten später über semiquantitative RT-PCR von epikardialen Explantatkulturen bestätigt werden (Abb.4-6). Zu späteren Zeitpunkten wurde mit Hilfe der in situ Hybridisierungsmethode keine Expression von Notch-Signalwegskomponenten mehr im Epikard nachgewiesen. Allerdings setzt zu diesem Zeitpunkt die Expression einzelner Komponenten im subepikardialen Bereich ein. Dies korreliert mit dem Beginn der EMT und der Koronargefäßentwicklung. Bei E12.5 konnte eine Expression von *Notch1* und *Dll4* in individuellen Zellen, unterhalb des Epikards, im subepikardialen Mesenchym, gefunden werden. Der Ursprung dieser Zellen ist aber vermutlich nicht das Epikard, sondern es sind die Endothelzellen des sich bildenden ersten koronaren venösen Plexus (Red-Horse et al., 2010). *Hey2* ist während der Embryonalentwicklung stark im Ventrikel exprimiert, wodurch mit dieser Methode keine Aussage über die Expression in einzelnen Zellen der sich entwickelnden Koronarien im Ventrikel gemacht werden kann. Da die Einwanderungen der Zellen aus der EMT zwischen E12.5 und E14.5 einsetzt, ist das Expressionsprofil nun komplexer und es ist schwerer den betrachteten Zelltyp genau zu bestimmen. Es konnte Expression von *Notch1* und *3*, *Dll4*, *Jag2*, *Hey1* und *HeyL* in einzelnen ventrikulären Zellen nachgewiesen werden, die wahrscheinlich endotheliale und perivaskuläre Zellen

darstellen. In den ausgereiften Koronargefäßen bei E18.5 wurde eine Expression von *Notch1*, *3* und *HeyL* im äußeren Ring der tief sitzenden Arterien festgestellt, was auf perivaskuläre Zellen hindeutet. Im inneren endothelialen Bereich dieser Arterien wurde die Expression von *Notch1*, *Dll1*, *Dll4*, *Jag1*, *Jag2* und *Hey1* nachgewiesen. Arterien wurden über ihr großes Lumen und ihre Position tief im Ventrikel identifiziert. Eine Expression außerhalb dieser Gefäße konnte nur bei *Jag1* in einer gepunkteten Weise festgestellt werden.

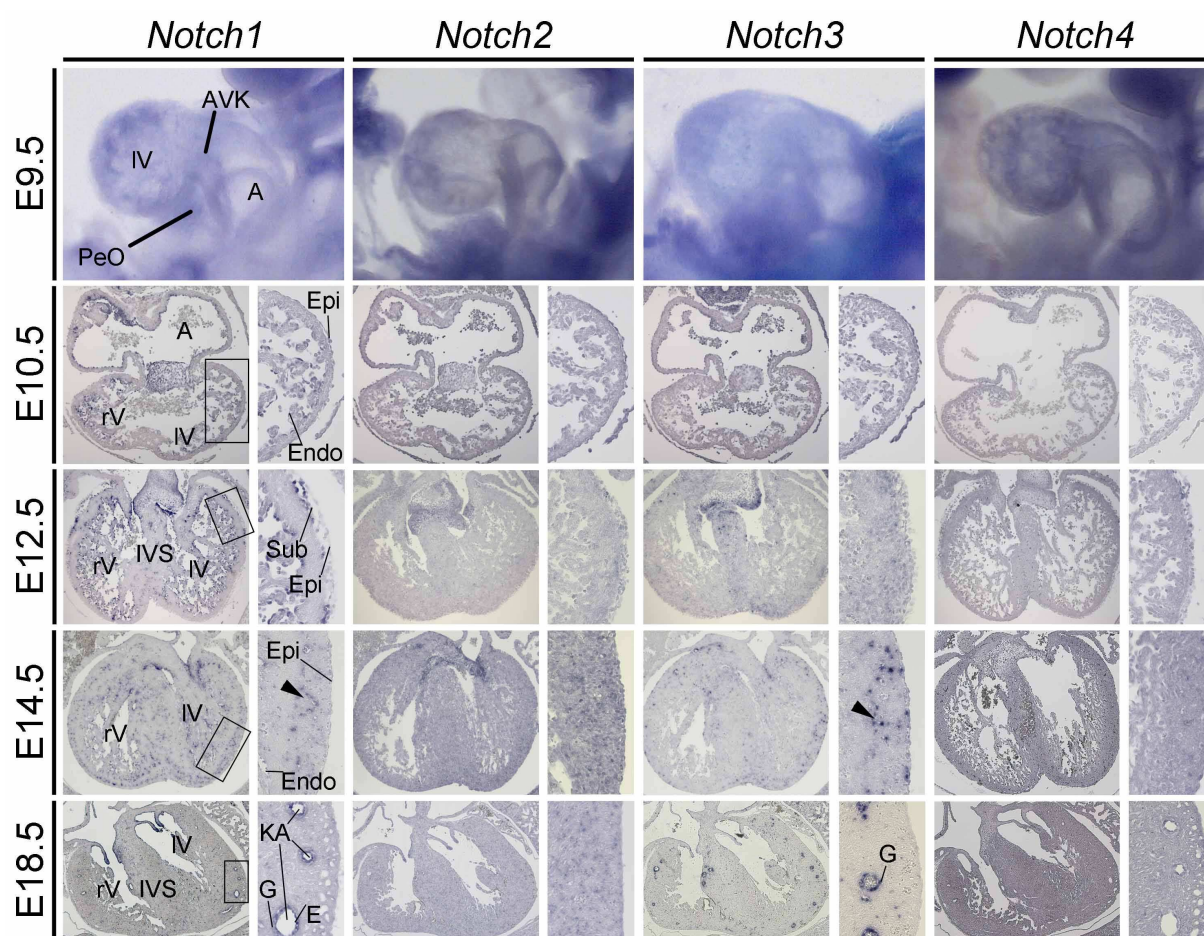


Abbildung 3-11: Darstellung der Expression von Notch-Signalweg Rezeptoren mit Hilfe der *in situ* Hybridisierungsanalyse. Die Bilder von E9.5 zeigen Ganzpräparat in situ Hybridisierungen, während für den Rest Schnitt in situ Hybrididierungen genutzt wurden. Alle Schnitt-in situ Bilder zeigen transverse Schnitte. *Notch2* und *3* zeigen eine ganz schwache Färbung im Epikard bei E10.5, *Notch1* eine Färbung in subepikardialen Zellen bei E12.5, *Notch1* und *3* in entstehenden Koronargefäße bei E14.5 (schwarzer Pfeilkopf) und in koronaren Arterien bei E18.5 (KA). (A) Atrium, (AVK) Atrioventrikulärer Kanal, (E) Endothelien, (Endo) Endokard, (Epi) Epikard, (G) glatte Muskelzellen, (IVS) interventrikuläres Septum, (IV) linker Ventrikel, (PeO) Proepikardialorgan, (rV) rechter Ventrikel, (Sub) subepikardiale Zellen.

Aus diesen Resultaten lassen sich 2 Phasen der Epikardentwicklung ableiten. Eine initiale Bildungsphase zwischen E9.5 und E10.5 in dem der Notch-Signalweg im Epikard möglicherweise noch gebraucht wird und eine spätere Differenzierung in der dieser Signalweg nicht mehr direkt im Epikard gebraucht und somit abgeschaltet wird.

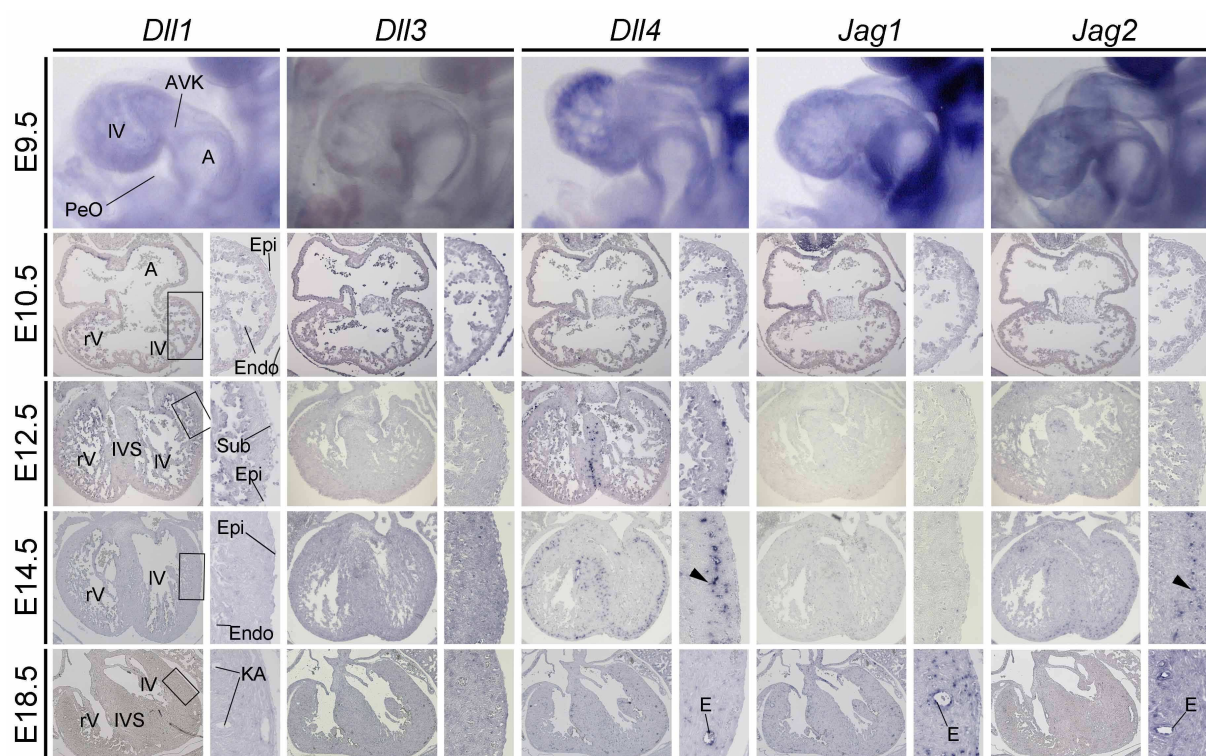


Abbildung 3-12: Darstellung der Expression von Notch-Signalweg Liganden mit Hilfe der *in situ* Hybridisierungsanalyse. Die Bilder von E9.5 zeigen Ganzpräparat *in situ* Hybridisierungen, während für den Rest Schnitt *in situ* Hybridisierungen genutzt wurden. Alle Schnitt-*in situ* Bilder zeigen transverse Schnitte. *Jag1* weist eine Färbung im Proepikardialorgan auf. *DII3* und *Jag1* zeigen eine ganz schwache Färbung im Epikard bei E10.5, *DII4* eine Färbung in subepikardialen Zellen bei E12.5, *DII4* und *Jag2* in entstehenden Koronargefäße bei E14.5 (schwarzer Pfeilkopf) und *DII4*, *Jag1* und *Jag2* in koronaren Arterien bei E18.5 (KA). (A) Atrium, (AVK) Atrioventrikulärer Kanal, (E) Endothelien, (Endo) Endokard, (Epi) Epikard, (G) glatte Muskelzellen, (IVS) interventrikuläres Septum, (IV) linker Ventrikel, (PeO) Proepikardialorgan, (rV) rechter Ventrikel, (Sub) subepikardiale Zellen.

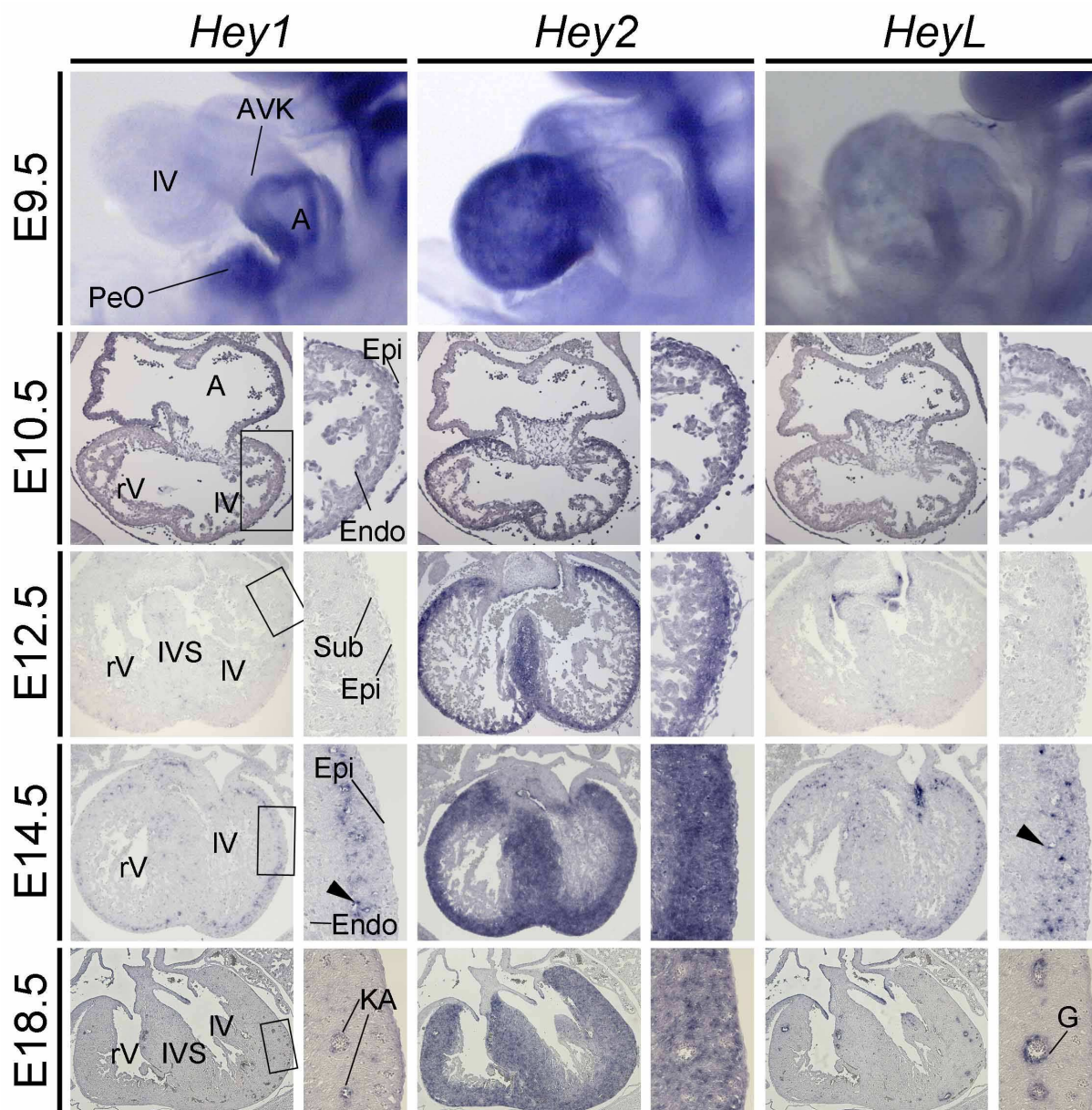


Abbildung 3-13: Darstellung der Expression von Notch-Signalweg Zielgenen mit Hilfe der *in situ* Hybridisierungsanalyse. Die Bilder von E9.5 zeigen Ganzpräparat *in situ* Hybridisierungen, während für den Rest Schnitt *in situ* Hybridisierungen genutzt wurden. Alle Schnitt-*in situ* Bilder zeigen transverse Schnitte. *Hey1* und *HeyL* weist eine Färbung im Proepikardialorgan auf. *Hey2* zeigt eine ganz schwache Färbung im Epikard bei E10.5, *Hey1* und *HeyL* eine schwache und diskontinuierliche Färbung in subepikardialen Zellen bei E12.5, sowie in entstehenden Koronargefäße bei E14.5 (schwarzer Pfeilkopf) und in koronaren Arterien bei E18.5 (KA). Eine epikardiale, subepikardiale und eine Expression in den Koronargefäßen von *Hey2* kann nicht ausgeschlossen werden, da die Expression im Ventrikel ein mögliches Signal bei dieser Methode überdeckt. (A) Atrium, (AVK) Atrioventrikulärer Kanal, (E) Endothelien, (Endo) Endokard, (Epi) Epikard, (G) glatte Muskelzellen, (IVS) interventikuläres Septum, (IV) linker Ventrikel, (PeO) Proepikardialorgan, (rV) rechter Ventrikel, (Sub) subepikardiale Zellen.

3.2.1 Kontrolle der genutzten *Tbx18^{cre}* Maus

Es gab bis vor kurzem noch keine Möglichkeit epikardiale Zellen gezielt genetisch zu manipulieren, oder die Differenzierung dieser Zellen zu verfolgen. Für die folgende Analyse wurde die in unserem Labor generierte *Tbx18^{cre}*-Maus (Trowe et al., 2010) genutzt. *Tbx18* ist wie oben beschrieben im Proepikardialorgan und in seinem Derivat, dem Epikard bis E16.5, exprimiert (Abb. 3-14A). Die endogene Expression von *Tbx18* im linken Ventrikel erlaubt allerdings nur eine Untersuchung der Epikardentwicklung auf dem rechten Ventrikel (Christoffels et al., 2009). Zur Demonstration, ob die *Cre* Expression vom *Tbx18* Locus Rekombination in allen bekannten *Tbx18* positiven Domänen herbeiführt, wurde eine *Rosa26^{mTmG}* Reportermaus (Muzumdar et al., 2007) genutzt (Abb. 3-14). Diese Reporterlinie liefert bessere Ergebnisse mit höherer zellulärer Auflösung, als die normalerweise genutzte *Rosa26^{lacZ}* Reportermaus (Soriano, 1999). Rekombination wird anschaulich durch den Austausch membrangebundener roter Fluoreszenz zu membrangebundenem GFP. Anschließende anti-GFP Immunfluoreszenzfärbungen auf Herzschnitten dieser Mäuse ermöglicht die hohe zelluläre Auflösung (Abb. 3-14C). Die Ergebnisse zeigen eine Übereinstimmung zwischen endogener Expression und Rekombination.

3.2.2 Massive morphologische Defekte nach epikardialem Verlust von *Rbpj* in den Koronargefäßen

Die Expression von Notch-Signalwegskomponenten während der Epikardentwicklung ist äußerst komplex und es ist nicht immer nur ein Rezeptor oder Ligand in einem Zelltyp exprimiert. Um von vornherein Redundanzen zwischen einzelnen Notch-Signalwegskomponenten auszuschließen, die beim Ausschalten einzelner Komponenten die Entstehung eines Phänotyps verhindern könnten, wurde für diese Analyse *Rbpj* ausgeschaltet, dem intrazellulären Vermittler des kanonischen Notch-Signalweges (Kopan et al. 2009). An dieser Stelle wird der konditionelle Ansatz mit Hilfe von *Tbx18^{cre}* wichtig, da ubiquitäres Ausschalten zu früher embryonaler Letalität führt (Oka et al., 1995). Zu diesem Zweck wurde für die weitere Analyse ein gefloxtes Allel von *Rbpj* genutzt (Tanigaki et al., 2002).

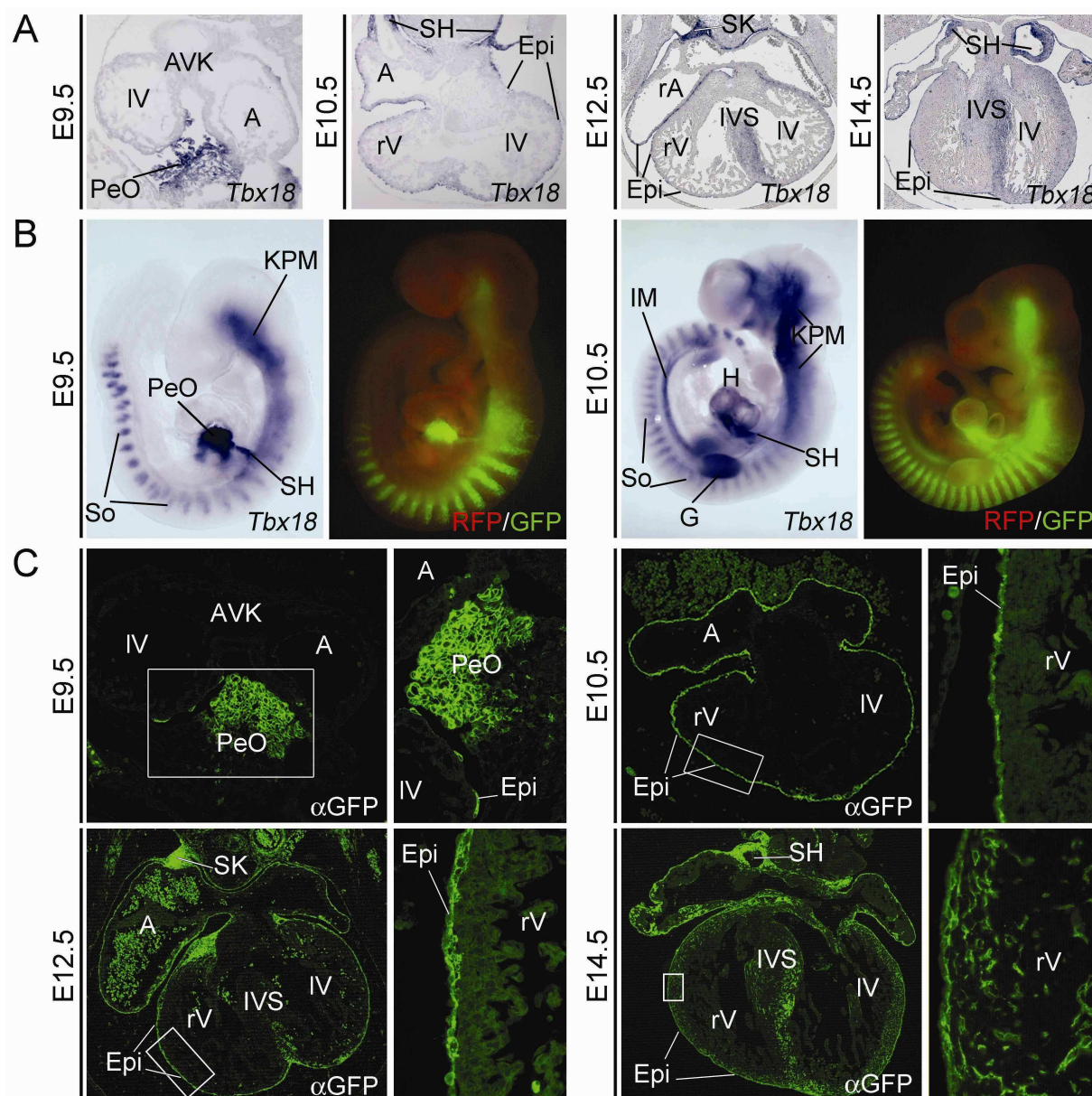


Abbildung 3-14: *Tbx18*^{cre} Mäuse rekapitulieren perfekt die endogene Expression von *Tbx18*. In situ Hybridisierungsanalyse der *Tbx18* Expression während der embryonalen Herzentwicklung der Maus. Die Expression ist sichtbar im Proepikardialorgan bei E9.5, und von E10.5 bis E14.5 im Epikard, den Sinus Hörnern, dem intraventrikulären Septum und dem Myokard des linken Ventrikels. (B) Vergleich von *Tbx18* Expression in ganzen E9.5 und E10.5 Embryonen detektiert mit In situ Hybridisierungsanalyse und GFP Reporter gen Fluoreszenz in *Tbx18*^{cre/+}*Rosa26*^{mTmG/+} Embryonen. Der *Rosa26*^{mTmG} Reporter zeigt rote Fluoreszenz in allen unrekombinierten Zellen und grüne Fluoreszenz nach Cre-Rekombination. (C) Anti GFP Immunfluoreszenz auf Schnitten verschiedener Entwicklungsstadien des *Tbx18*^{cre/+}*Rosa26*^{mTmG/+} Herzens. Beide Darstellungen der Cre Expression zeigen eine perfekte Übereinstimmung mit der endogenen Expression in (A). Außerdem sind eingewanderte Zellen im rechten Ventrikel sichtbar, die vom Epikard kommen. Weiße Rechtecke zeigen den jeweils vergrößert dargestellten Ausschnitt. (A) Atrium, (AVK) Atrioventrikulärer Kanal, (Epi) Epikard, (G) Gliedmaßenknospe, (H) Herz, (IM) intermediäres Mesoderm, (IVS) interventrikuläres Septum, (KPM) Kraniales paraxiales Mesoderm, (IV) linker Ventrikel, (PeO) Proepikardialorgan, (rV) rechter Ventrikel, (SH) Sinus Horn, (SK) Sinus Knoten, (So) Somiten.

Diese *Tbx18^{cre/+}*; *Rbpj^{flox/flox}* Mäuse wurden überraschenderweise geboren und überlebten mindesten 6 Monate. Sie zeigten bei der Geburt keine Unterschiede zur Kontrollgruppe und wiesen später nur leichte Wachstumsdefizite auf. 3 Monate alte Herzen zeigten eine normale Form, hatten aber auf der Oberfläche abnormal veränderte Gefäße (Abb. 3-15A). Auf histologischer Ebene waren sowohl die Lumen tiefliegender Gefäße, als auch der subepikardialen Gefäße stark vergrößert. Die Position innerhalb des Ventrikels lässt darauf schließen, dass hier sowohl Arterien als auch Venen betroffen sind. Diese Vermutung konnte teilweise mit Hilfe des venösen und kapillaren Markers Endomucin (Emcn) (Morgan et al., 1999) bestätigt werden (Abb. 3-15A+B). Dieser findet sich in den stark vergrößerten subepikardialen Gefäßen, wobei der generelle Endothelmarker Pecam1 auch Endothelien in den tiefer liegenden Arterien anzeigt. Um einen embryologischen Ursprung dieser Phänotypen zu bestätigen und sekundäre physiologische Ursachen nach der Geburt als Quelle auszuschließen, wurden die Herzen der Mutanten während der Embryonalentwicklung untersucht. Auch bei E18.5 konnte die gleiche morphologische und histologische Untersuchung stark vergrößerte subepikardiale Gefäße und leicht vergrößerte intramyokardiale Gefäße feststellen (Abb. 3-15B). Emcn konnte auch hier in den großen subepikardialen Gefäßen nachgewiesen werden, wobei die Menge an kapillaren Gefäßen in der Mutante stark reduziert war. Dies weist auf ein Ungleichgewicht bei der Gefäßstehung zu Gunsten der größeren subepikardialen Gefäße hin (Abb.3-15B). Dieser Phänotyp muss nach E14.5 gebildet werden, da die Morphologie und die Expression von Emcn bei E14.5 nicht groß verändert war (Abb. 3-15C). Dies passt mit dem Einsetzen von koronarer Blutzirkulation zusammen.

Diese Effekte werden aber nicht durch eine Änderung in der arteriellen oder venösen Identität hervorgerufen. Arterielle Marker wie Ephrin B2 (*Efnb2*), Dll1 und „Vascular endothelial growth factor A“ (*Vegfa*) (Sörensen et al., 2009) waren in den tief liegenden intramyokardialen Gefäßen exprimiert und nicht in den subepikardialen Gefäßen, während „nuclear receptor subfamily2, group F, member 2 (*Nr2f2*, oder *Coup-TF2*) nur in den subepikardialen Gefäßen exprimiert war (Abb.3-16).

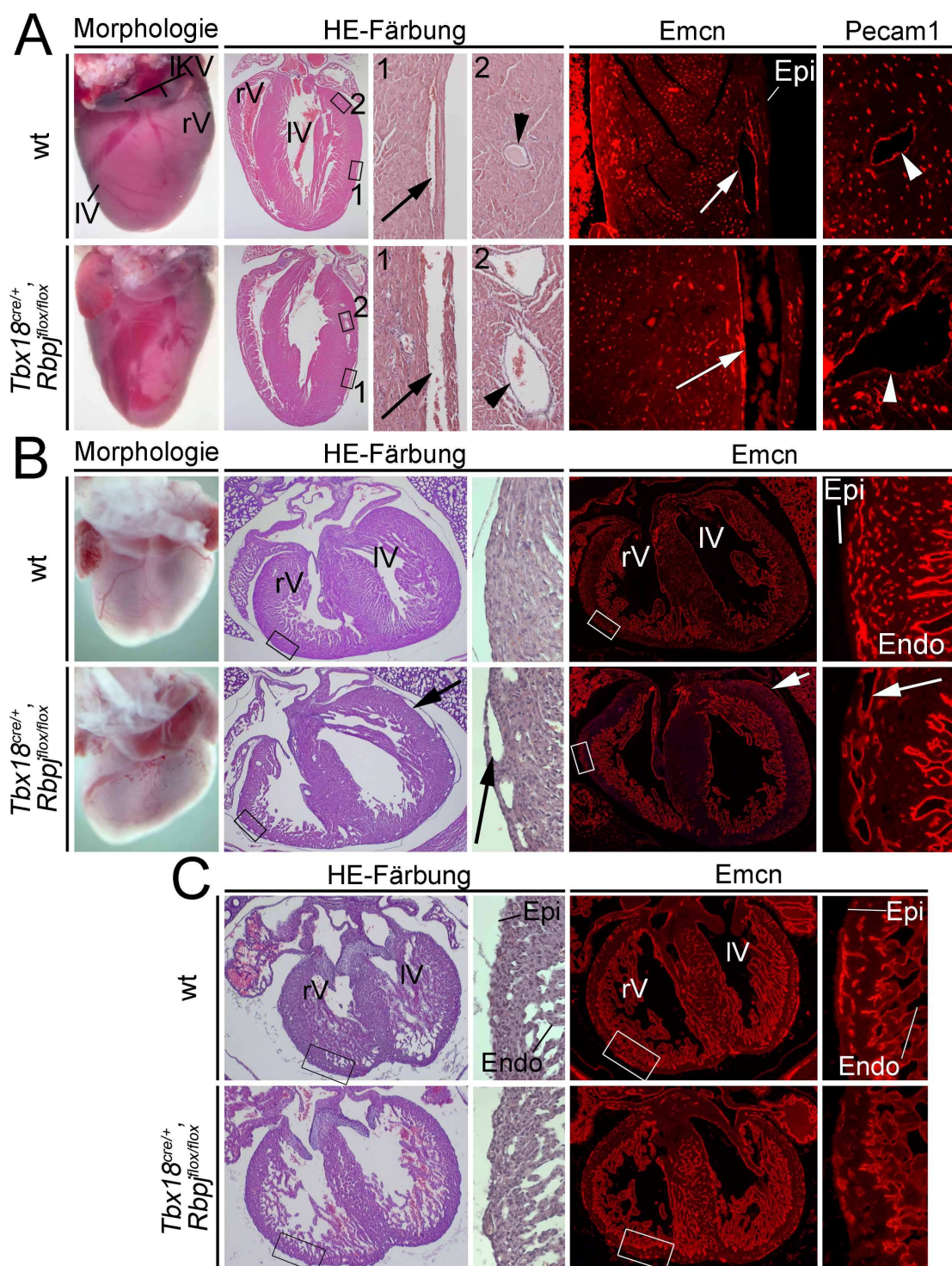


Abbildung 3-15: Mäuse mit epikardialen Verlust von *Rbpj* weisen Veränderungen in den Koronargefäßen auf Analyse der Koronargefäßentwicklung in *Tbx18^{cre/+};Rbpj^{flox/flox}* Mäusen im Alter von 3 Monaten (A), bei E18.5 (B) und bei E14.5 anhand der Morphologie von ganzen Herzen, durch HE-Färbung und durch Immunfluoreszenzfärbungen gegen Emcn, einen endothelialen Marker für große Venen und Kapillaren auf transversen Schnitten. Die Kästen auf Bildern von ganzen Herzen weisen auf die Vergrößerungen der entsprechenden Regionen rechts daneben hin. Pfeile zeigen auf die Endothelien von oberflächlichen venösen Koronarien und Pfeilköpfe auf arterielle Endothelien. (Endo) Endokard, (Epi) Epikard, (IKV) linke Kavalvene, (IV) linker Ventrikel, (rV) rechter Ventrikel.

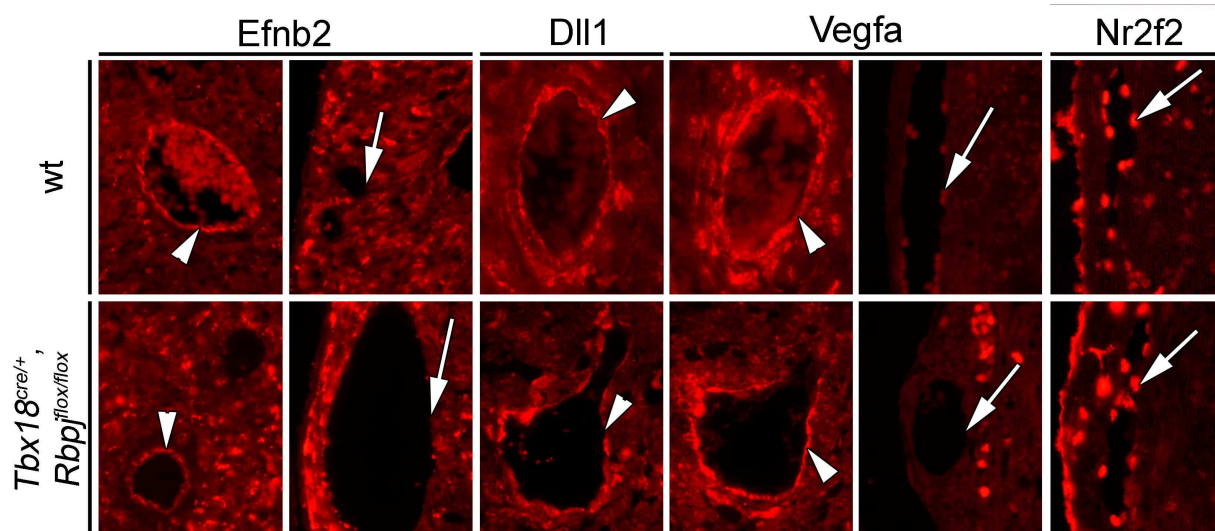


Abbildung 3-16: Keine Veränderungen in der Identität der Gefäße nach epikardialer Deletion von *Rbpj*. Höhere Auflösungen von individuellen koronaren Arterien und Venen. Die Expression verschiedener endothelialer Marker wurde mit immunohistochemischen Färbungen gezeigt. *Dll1*, *Efnb2* und *Vegfa* sind in arteriellen Gefäßen und *Nr2f2* in Kernen von venösen endothelialen Zellen exprimiert. Pfeile zeigen auf die Endothelien von oberflächlichen venösen Koronarien und Pfeilköpfe auf arterielle Endothelien.

Um zu untersuchen ob dieser Phänotyp auf eine Veränderung in der Bildung von mesenchymalen Zellen aus dem Epikard nach der EMT zurückgeht, wurde bei E14.5 die Entstehung dieser Zellen analysiert (Abb.3-17). Diese vergleichende Zellschicksalsanalyse wurde durch Einkreuzen eines *Rosa26^{mTmG}* Reporterallels durchgeführt. Anti-GFP Immunfluoreszenzfärbungen auf Schnitten von E14.5 Herzen zeigten ein intaktes Epikard und lange dünne Zellen innerhalb des Myokards, sowie Ansammlungen von Zellen unterhalb des Epikard und um tief liegende Gefäße herum. Das Mutantengerz zeigte das gleiche Bild wie im Wildtyp, was darauf hinweist, dass epikardialer Verlust von *Rbpj* keinen Einfluss auf die Entwicklung von mesenchymalen Zellen aus dem Epikard hat.

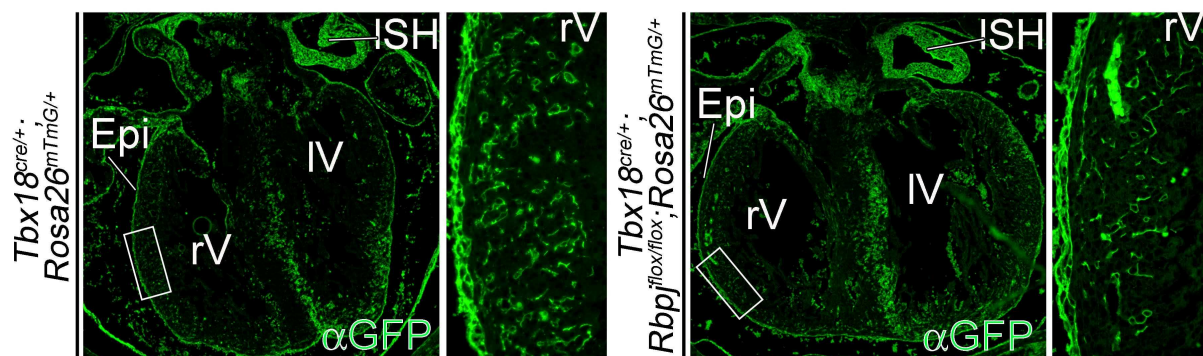


Abbildung 3-17: Entstehung und Einwanderung der Zellen, die vom Epikard abgeleitet sind, ist unverändert in *Tbx18^{cre/+}; Rbpj^{flox/flox}* Mäusen. Analyse der Bildung und Einwanderung von mesenchymalen Zellen, die aus der EMT des Epikard von *Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{mTmG/+}; Rbpj^{flox/flox}* Mäusen hervorgehen durch Immunfluoreszenzfärbungen gegen das GFP-Reporterprotein auf transversen Schnitten von ganzen E14.5 Herzen. Ausschnitte der Vergrößerungen werden durch weiße Kästen angezeigt. (Epi) Epikard, (ISH) linkes Sinushorn, (IV) linker Ventrikel, (rV) rechter Ventrikel.

Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für die Expression von GFP und Markern für arterielle endotheliale Zellen (nitric oxide synthase 3 endothelial cell, *Nos3*), venöse endotheliale Zellen (*Emcn*), glatte Muskelzellen (actin alpha 2 smooth muscle, aorta, *Acta2*, oder *SMAActin*), zukünftige glatte Muskelzellen (*Notch3*), Fibroblasten (*Periostin*, *Postn*), und Kardiomyocyten (cardiomyocyte specific troponin I cardiac 3, *Tnni3* und myosin heavy chain cardiac muscle, *Myhc*), bestätigten, dass unter wt Bedingungen Zellen aus dem Epikard zu Fibroblasten und glatte Muskelzellen, aber nicht zu endothelialen Zellen differenzieren (Abb. 3-18A-C). Außerdem konnte keine Kofärbung mit Kardiomyocyten im rechten Ventrikel entdeckt werden (Abb. 3-18D).

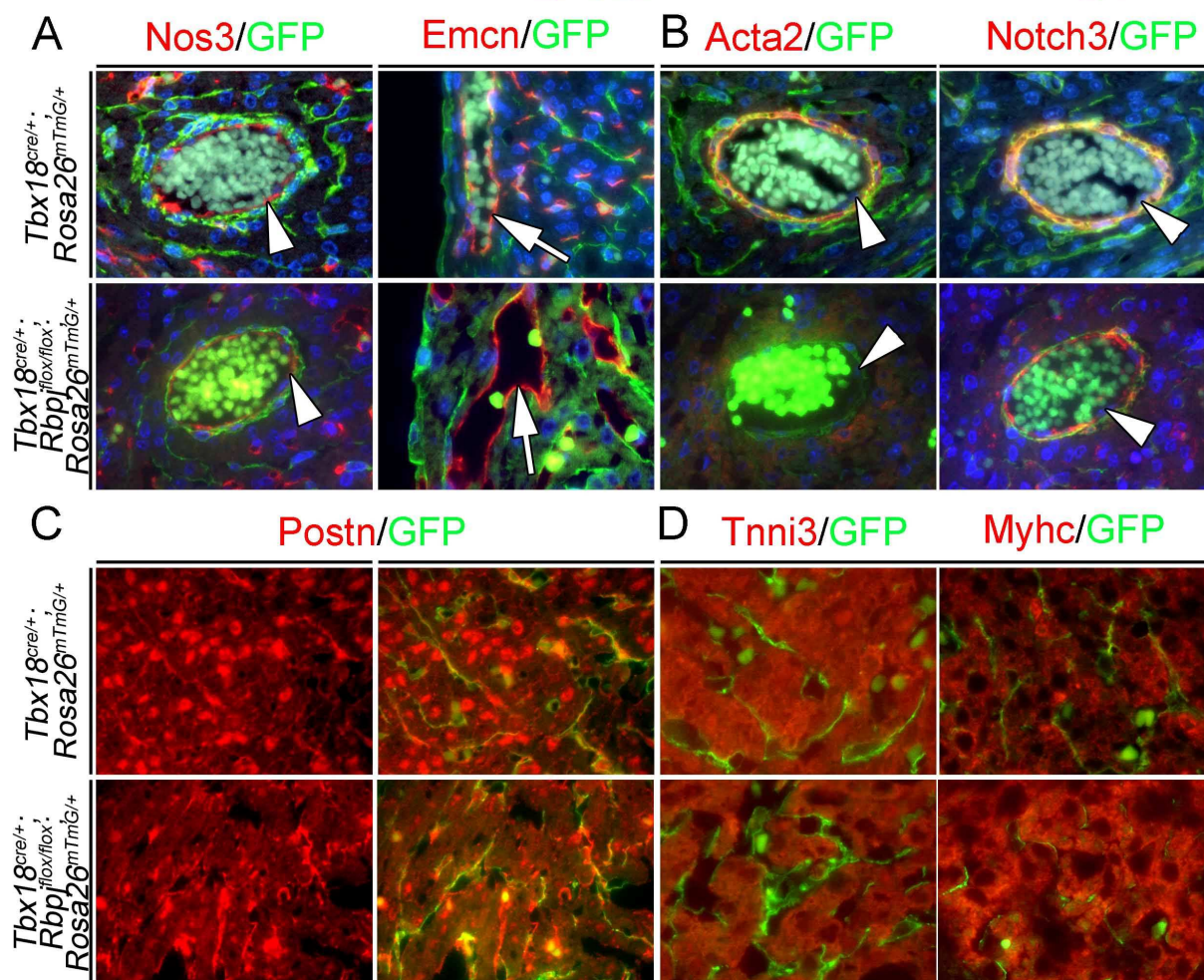


Abbildung 3-18: Veränderte Zelldifferenzierung von epikardial abgeleiteten Zellen in $Tbx18^{cre/+}; Rbpj^{flox/flox}$ Mäusen. Analyse der Zelldifferenzierung von epikardabgeleiteten Zellen von $Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{mTmG/+}; Rbpj^{flox/flox}$ Mäusen durch Doppelimmunfluoreszenzbilder des GFP-Reporterproteins (grün) und (in rot) einen Marker für arterielle endotheliale Zellen (Nos3), venösen endothelialen Zellen (Emcn) (A), glatte Muskelzellen (Acta2), Pericyten (Notch3) (B), Fibroblasten (Postn) (C), und Kardiomyocyten (Tnni3, Myhc) (D) auf seriellen transversen Schnitten des rechten Ventrikels bei E18.5. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt. Pfeile zeigen auf die Endothelien von oberflächlichen venösen Koronarien und Pfeilköpfe auf arterielle Endothelien.

In $Tbx18^{cre/+}; Rbpj^{flox/flox}$ Herzen findet die Differenzierung in glatte Muskelzellen nicht statt (Abb. 3-18B). Die Expression von Notch3 in perivaskulären Zellen bleibt allerdings erhalten (Abb. 3-18B und 3-19), was darauf hinweist, dass diese Expression unabhängig vom Notch Signalweg ist, Notch3 aber trotzdem notwendig für die Differenzierung in koronare glatte Muskelzellen ist.

Größenveränderungen in späteren arteriellen Gefäßen lassen sich nun physiologisch über den Verlust der glattmuskulären Stützfunktion erklären.

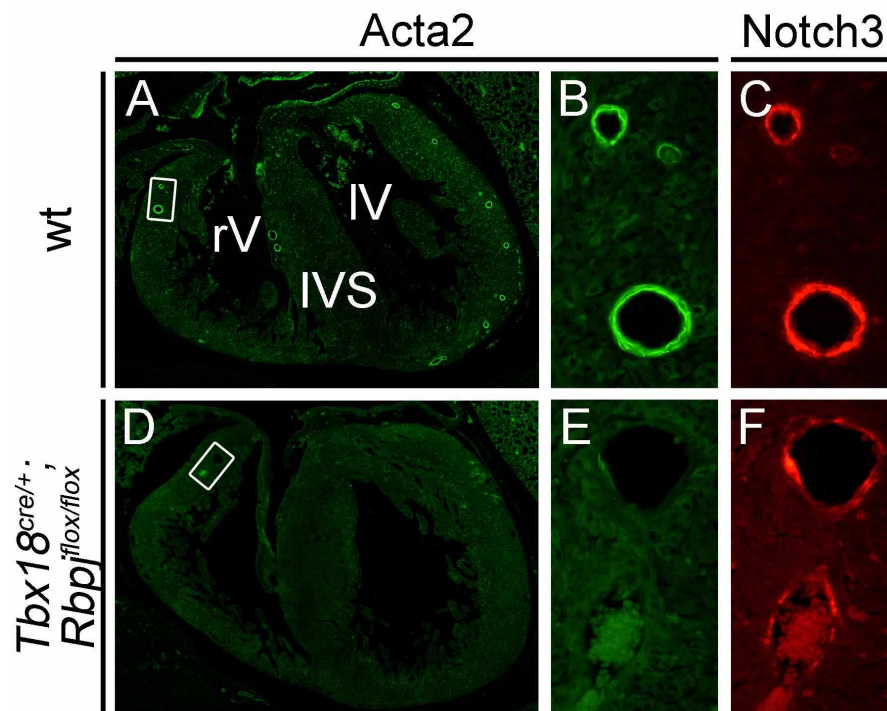


Abbildung 3-19: Vorläufer von koronaren glatten Muskelzellen kondensieren um die Koronargefäße, aber differenzieren nicht vollständig in *Tbx18^{cre/+}; Rbpj^{flox/flox}* Mäusen. (A-F) Immunofluoreszenzanalyse von Acta2 und Notch3 Expression auf transversen Herzschnitten von wt (A-C) und *Tbx18^{cre/+}; Rbpj^{flox/flox}* (D-F) Herzen bei E18.5. Ausschnitte der Vergrößerungen werden durch weiße Kästen angezeigt. Vergrößerungen zeigen koronare Arterien. Acta2 Expression fehlt komplett in der Mutante und Notch3 wird immer noch um die Arterien exprimiert. (IVS) interventrikuläres Septum, (IV) linker Ventrikel, (rV) rechter Ventrikel.

Um geringe Unterschiede in der Identität und Integrität des Epikard auszuschließen wurde zusätzlich noch die Expression verschiedener epikardialer Markergene mit Hilfe der in situ Hybridisierungsfärbung analysiert. Die Expression von „Wilms tumor 1 homolog“ (Wt1), „transcription factor 21“ (Tcf21), Tbx18, „fibulin 2“ (Fbln2) und „aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2 (Aldh1a2) in der Mutante war unverändert. Die Expression von Wt1 und Tcf21 in subepikardialen Zellen ist ein zusätzlicher Nachweis, dass die EMT nicht gestört ist (Abb. 3-20).

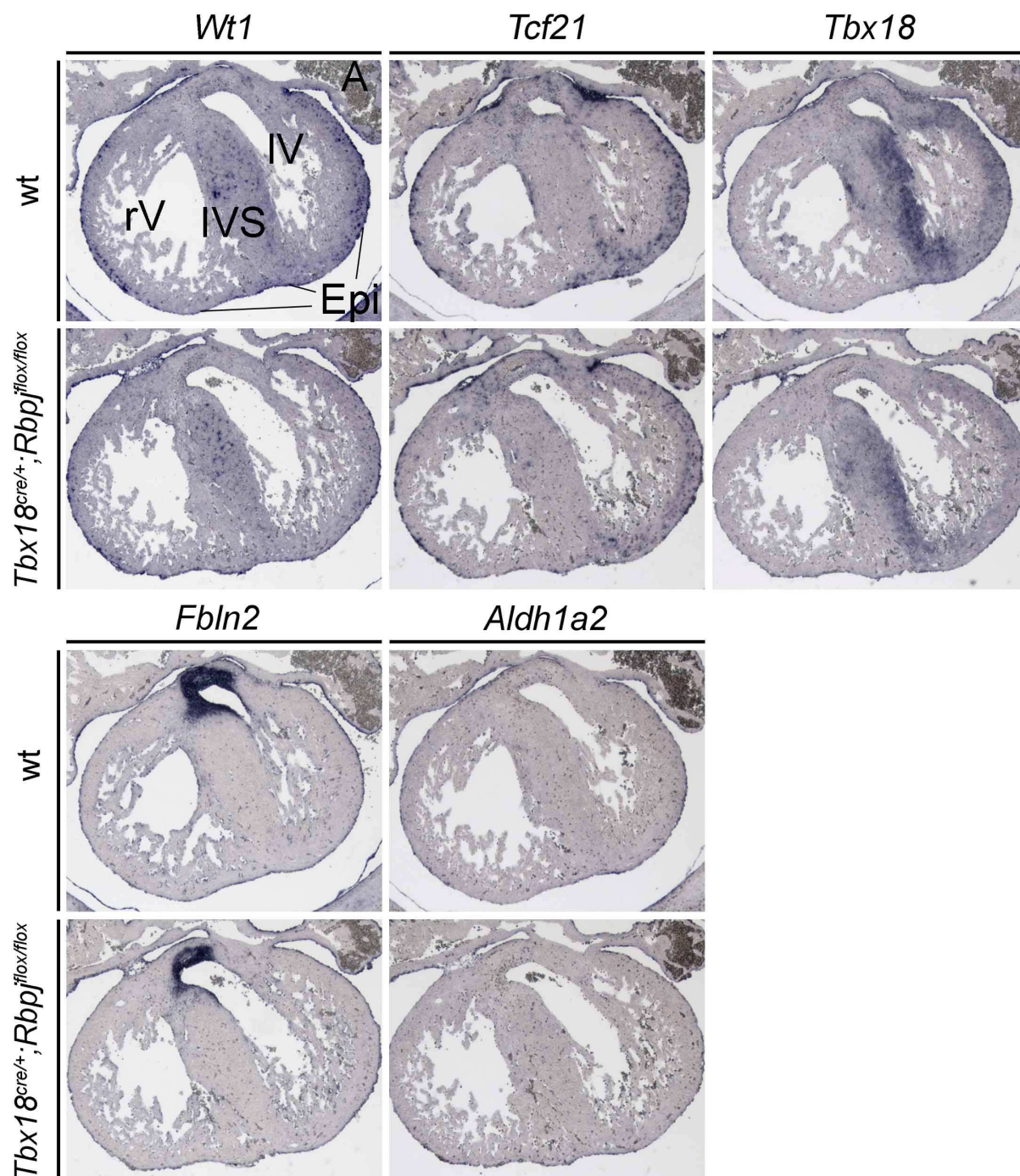


Abbildung 3-20: Der epikardiale Verlust von *Rbpj* beeinflusst nicht die epikardiale Identität und Integrität. Darstellung der Expression verschiedener epikardialer Marker Gene mit Hilfe der *in situ* Hybridisierungsanalyse. Alle Schnitt-*in situ* Bilder zeigen transverse Schnitte durch E14.5 murines Herzen. Die untere Reihe zeigt jeweils die *Rbpj*-Mutante. (A) Atrium, (Epi) Epikard, (IVS) interventrikuläres Septum, (IV) linker Ventrikel, (rV) rechter Ventrikel.

3.2.3 Anschalten des Notch Signalweges im Epikard ist ausreichend für vorzeitige glattmuskuläre Differenzierung

Die Analyse des Verlustes des Notch Signalweges während der Epikardentwicklung zeigte, dass er für die Differenzierung epikardialer abgeleiteter mesenchymaler Zellen in glatte Muskelzellen notwendig ist. Das wirft die Frage auf, ob der Notch-Signalweg frühe Epikardentwicklung stören kann. Um dieser Frage nachzugehen konnte ein konditioneller, epikardspezifischer Ansatz gewählt werden. Für diese Analyse wurde auch hier *Tbx18^{cre}*-Mäuse genutzt, welche mit *Rosa26^{NICD}*-Mäusen (Expression der Notch1 intrazellulären Domäne unter der Kontrolle des Rosa26 Promotors) verpaart wurden. Diese *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}* Mäuse sterben kurz nach E14.5 mit starken Ödemen und Blutungen.

Eine genaue morphologische und histologische Untersuchung zeigte einzelne Auswüchse auf der Oberfläche des Herzens (Abb. 3-21A+B).

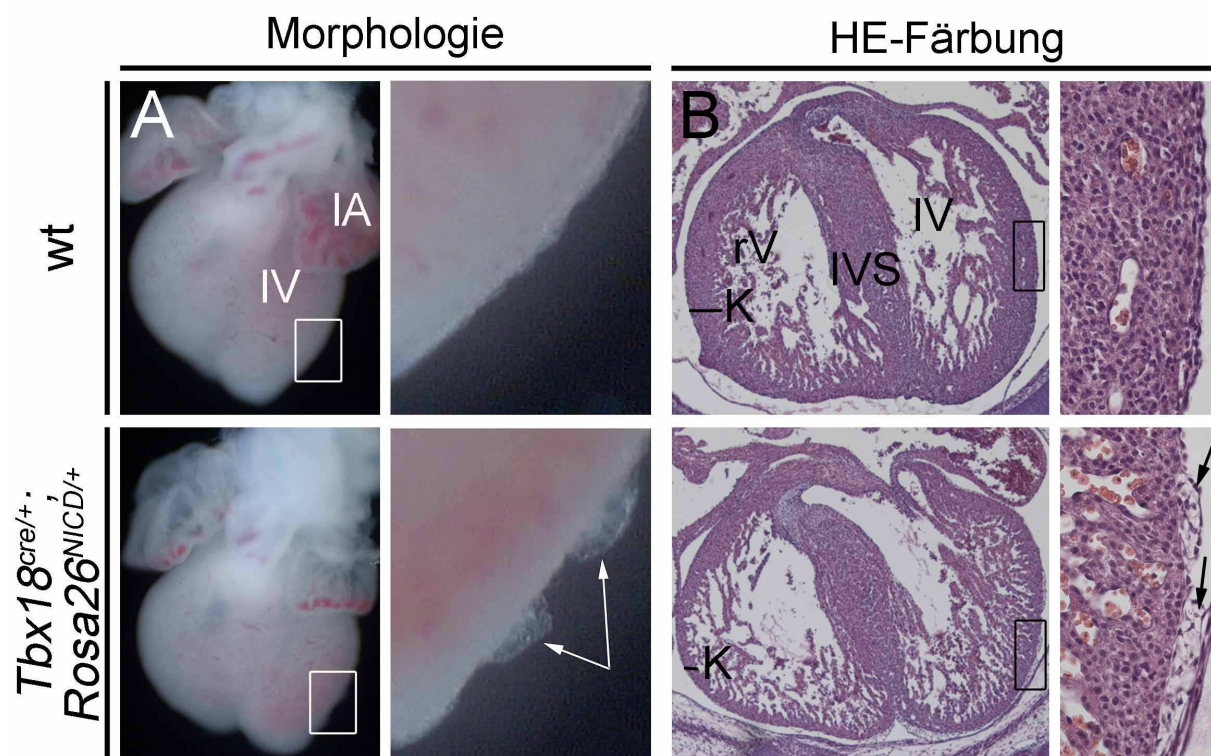


Abbildung 3-21: Morphologische und histologische Veränderungen im Epikard nach epikardialer Überexpression der intrazellulären Domäne von Notch1. Analyse der Epikardmorphologie und Histologie in *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}* Mäusen bei E14.5 anhand der Morphologie von ganzen Herzen (A) und durch HE-Färbungen (B). Die Kästen auf Bildern von ganzen Herzen weisen auf die Vergrößerungen der entsprechenden Regionen rechts daneben hin. Pfeile zeigen auf die Auswüchse auf der Oberfläche des Herzens. (IVS) interventrikuläres Septum, (K) Kompaktzone, (IA) linkes Atrium, (IV) linker Ventrikel, (rV) rechter Ventrikel.

Diese Auswüchse bestehen aus einer subepikardialen mesenchymalen Matrix, die an einigen Stellen das Epikard vom unterliegenden Myokard abhebt. Zwischen diesen Stellen wirkte das Epikard stark diskontinuierlich (Abb.3-21B). Außerdem war die myokardiale Kompaktzone stark ausgedünnt (K).

Die Expression verschiedener epikardialer Marker wie *Tbx18*, *Wt1* und *Aldh1a2* erschienen ebenfalls diskontinuierlich und reduziert an einigen Stellen (Abb. 3-22A). Es konnte eine Expression der Marker für glatte Muskelzellen oder perivaskuläre Zellen „SM myosin heavy chain“ (smMHC), *HeyL* und *Notch3* nicht wie im wt im subepikardialen intramyokardialen Bereich, sondern direkt im Epikard gefunden werden und eine intramyokardiale Expression fehlt fast vollständig (Abb. 3-22B; 3-23). *Hey2* wurde zusätzlich noch ektopisch im Epikard angeschaltet (Abb. 3-23).

Eine Zellschicksalsanalyse mit Hilfe des eingekreuzten *Rosa26^{mTmG}* Allel zeigte, dass es in der *Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{NICD/+}* Maus zu fast keiner Einwanderung in den rechten Ventrikel bei E14.5 mehr kommt. Das Epikard ist GFP-positiv, aber es waren fast keine Zellen unterhalb mehr zu finden (Abb. 3-22C). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine frühzeitige Differenzierung in glatte Muskelzellen auf der Oberfläche des Ventrikels eine EMT und Einwanderung verhindert.

Allerdings war auch keine *Emcn* Expression unterhalb des Epikards und intramyokardial wie in der Kontrolle zu sehen. *Emcn* konnte nur im Endokard und in kleinen Bereichen der atrioventrikulären Grube detektiert werden (Abb. 3-22D). Somit scheint fehlende epikardiale EMT oder frühzeitige Differenzierung auch primäre endotheliale Migration indirekt zu beeinflussen.

Erste Veränderungen der epikardialen Entwicklung ließen sich bereits frühzeitig im PeO und der Epikardbildung zeigen, da auch die Rekombination durch *Tbx18^{cre}* schon im PeO einsetzt. Anders als in der wt Kontrolle kam es erst verspätet zu einer Besiedlung des Myokards, die bei E10.5 noch nicht abgeschlossen war. (Abb. 3-24A+B). Die Differenzierung dieser epikardialen Zellen in glatte Muskelzellen setzte dann zwischen E10.5 und E12.5 ein (Abb. 3-24D).

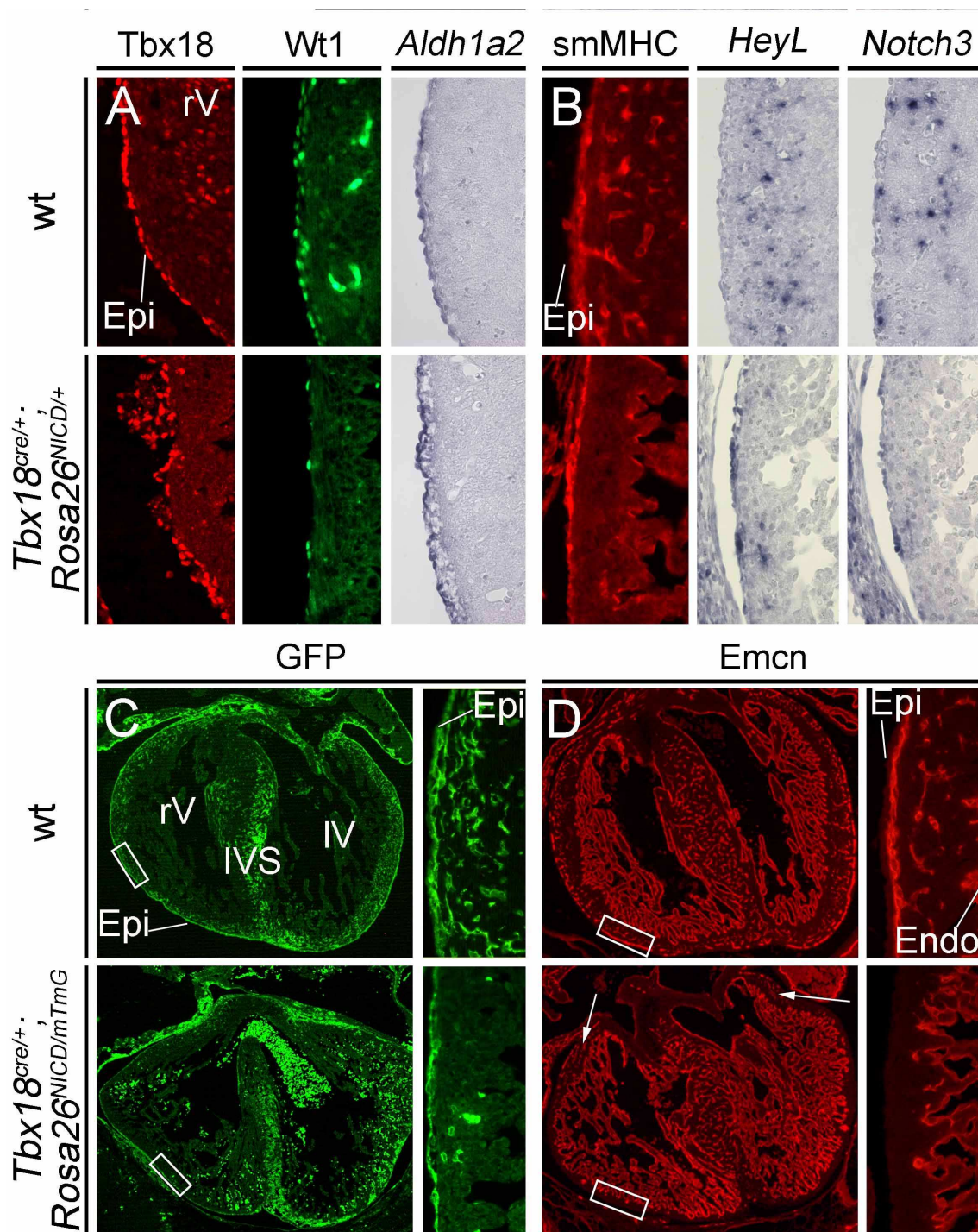


Abbildung 3-22: Gestörte epikardiale Entwicklung in *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD}* Mäusen. Die gesamte Analyse wurde auf E14.5 wt und *Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{NICD/+}* Mäusen durchgeführt, um die Identität, Integrität und Differenzierung des Epikard zu beurteilen. Immunfluoreszenzfärbungen von Tbx18, Wt1 und smMhC und in situ Hybridisierungen von Aldh1a2, HeyL und Notch3 (A+B). Alle Färbungen wurden auf transversen Schnitten durchgeführt und alle Vergrößerungen zeigen jeweils den rechten Ventrikel. Zellschicksalsanalyse mit anti-GFP Immunfluoreszenzfärbungen (C) und Emcn Immunfluoreszenzfärbungen um den initialen koronaren Prexus zu visualisieren. Weiße Pfeile markieren die verbleibenden Kapillarsprossen innerhalb der atrioventrikulären Grube. Die Kästen auf Bildern von ganzen Herzen weisen auf die Vergrößerungen der entsprechenden Regionen rechts daneben hin. (Endo) Endokard, (Epi) Epikard, (IVS) interventrikuläres Septum, (IV) linker Ventrikel, (rV) rechter Ventrikel.

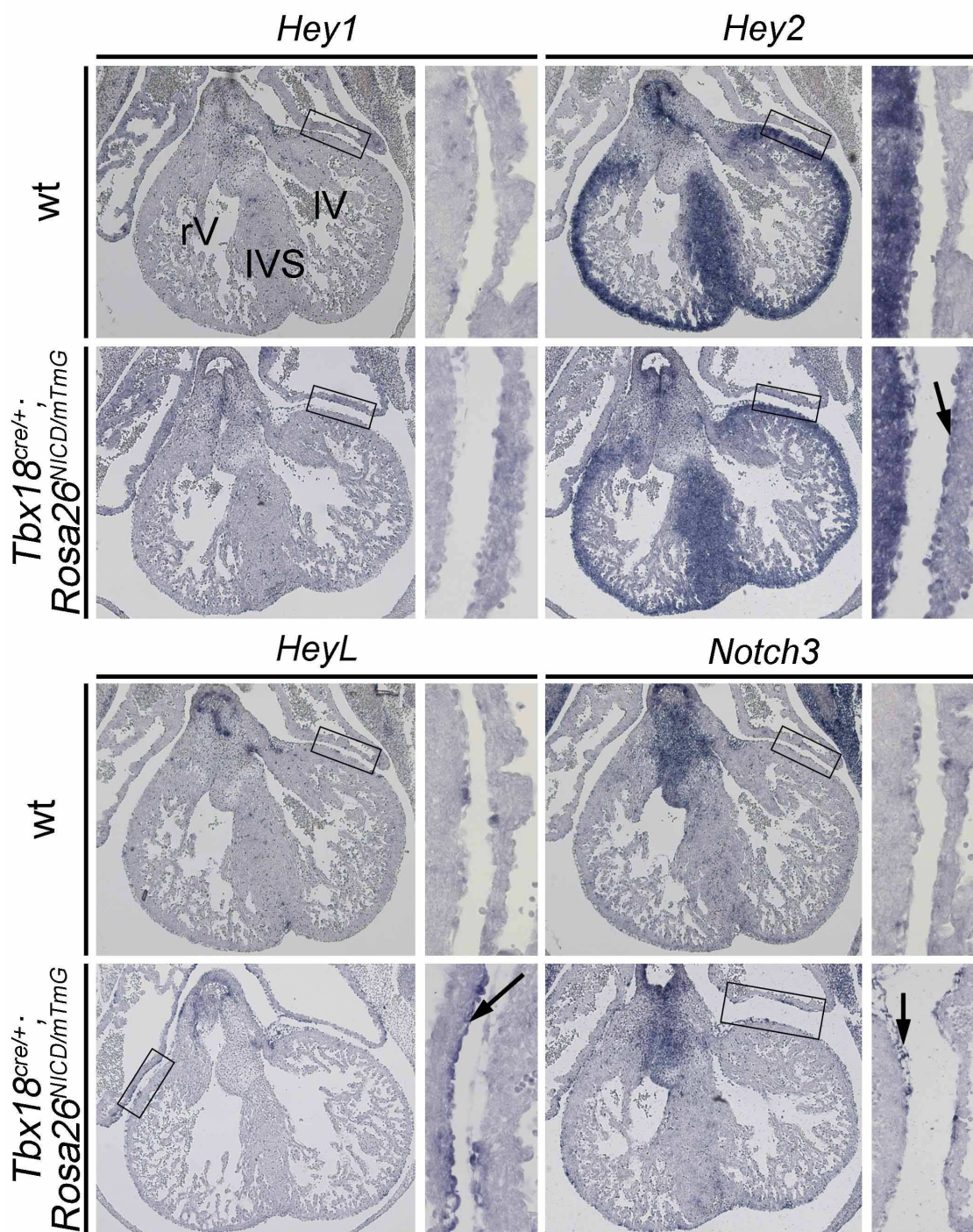


Abbildung 3-23: Spezifische Aktivierung des Notch-Signalweges im Epikard von $Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{NICD}$ Mäusen. Darstellung der Expression verschiedener Zielgene des Notch-Signalweges mit Hilfe der *in situ* Hybridisierungsanalyse bei $Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{NICD/+}$ Mäusen. Alle Schnitt-*in situ* Bilder zeigen transverse Schnitte durch E14.5 murines Herzen. Die Kästen auf Bildern von ganzen Herzen weisen auf die Vergrößerungen der entsprechenden Regionen rechts daneben hin. (IVS) interventrikuläres Septum, (IV) linker Ventrikel, (rV) rechter Ventrikel.

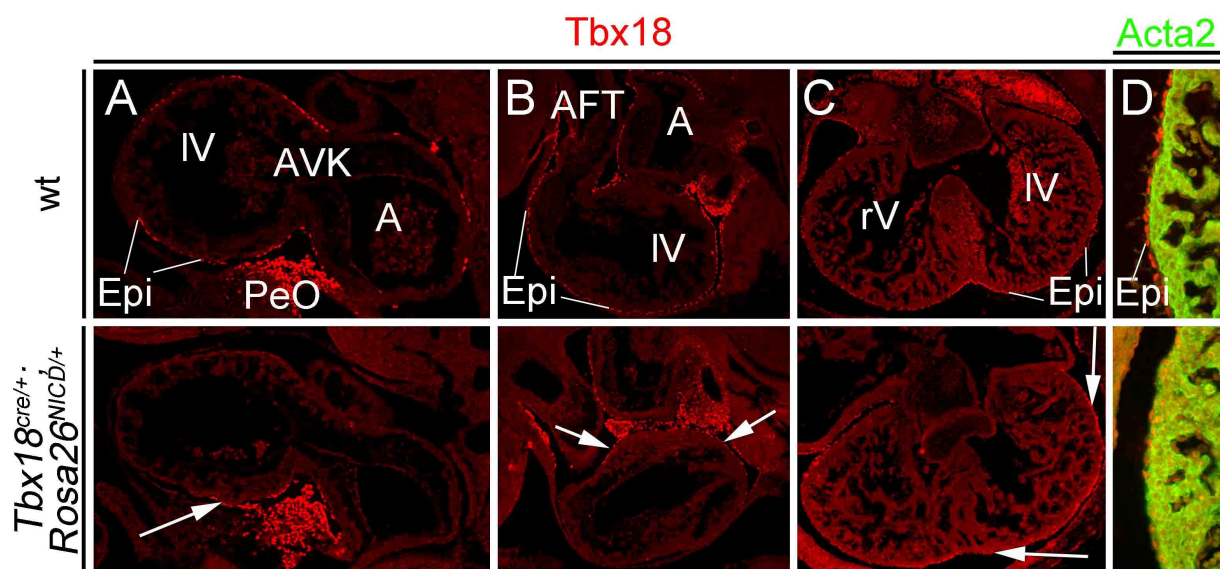


Abbildung 3-24: Defekte treten schon früh in der Embryonalentwicklung von *Tbx18*^{cre/+}; *Rosa26*^{NICD} Mäusen auf. Immunfluoreszenzanalyse von Tbx18 in rot und Acta2 in grün auf Schnitten von ganzen Herzen bei E9.5 (A), E10.5 (B), E12.5 (C+D). (D) zeigt eine Vergrößerung des Herz in (C). Weiße Pfeile zeigen auf Klaster von Tbx18-positiven Zellen. Acta2 Expression im Wildtyp ist nur im Ventrikel zu sehen, während es bei *Tbx18*^{cre/+}; *Rosa26*^{NICD/+} Mäusen auch im Epikard zu finden ist. (A) Atrium, (AFT) Ausflusstrakt, (AVK) Atrioventrikulärer Kanal, (Epi) Epikard, (IV) linker Ventrikel, (PeO) Proepikardialorgan, (rV) rechter Ventrikel.

Die Expression von „Integrin alpha 4“ (Itga4) in proepikardialen Zellen ist notwendig für ein Anheften dieser Zellen am Myokard (Yang et al., 1995). Um eine Erklärung für die Besiedlungsverzögerung zu finden, wurde die Expression dieses und anderer proepikardialer Markergene analysiert und gefunden, dass die Expression von Itga4 in der *Tbx18*^{cre/+}; *Rosa26*^{NICD/+} Maus fast vollständig (Abb. 3-25; Schwarzer Pfeil) fehlt. Außerdem fehlt die Expression von Sox9 und *Wt1* (Abb. 3-25).

Frühzeitige (pro-)epikardiale Aktivierung von Notch1 vermitteltem Notch Signalweg führt also zu Defekten in der Bildung und Differenzierung des Epikards, verhindert die Bildung eines epithelialen koronaren Plexus und verhindert myokardiales Wachstum.

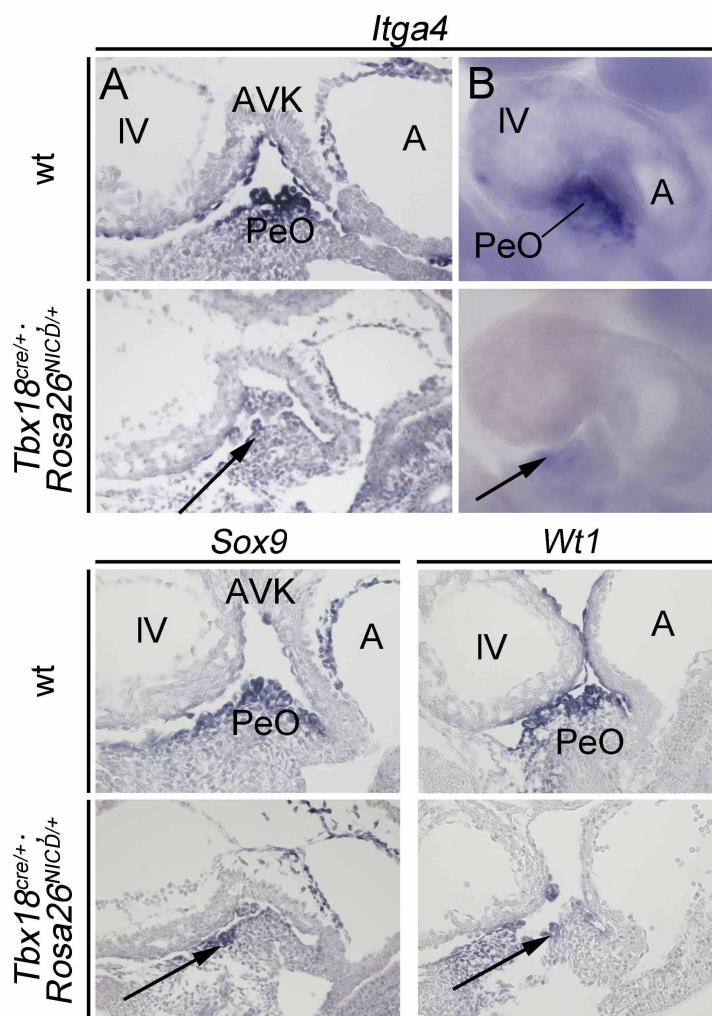


Abbildung 3-25: Die epikardiale Überexpression von *N1CD* beeinflusst die proepikardiale Identität. In situ Hybridisierungsfärbungen von *Itga2*, *Sox9* und *Wt1* auf sagittalen Schnitten und ganzen Embryonen (B). Schwarze Pfeile zeigen reduzierte Expression der entsprechenden Marker auf dem *Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{NICD/+}* PeO (A) Atrium, (AVK) Atrioventrikulärer Kanal, (IV) linker Ventrikel, (PeO) Proepikardialorgan.

3.2.4 Anschalten des Notch Signalweges führt auch zu glattmuskulärer Differenzierung in epikardialen Explantatkulturen

Um nun einen noch stärkeren Einblick in die zellulären und molekularen Konsequenzen des ektopischen Anschaltens des Notch Signalweges im Epikard zu erhalten, wurden Kulturen von primären epikardialen Zellen nach verschiedenen Kulturauern analysiert. Diese erhält man durch das Explantieren des rechten Ventrikels mit der Öffnung nach unten bei E11.5. Nach 2 Tagen Kultur unter Serum-freien Bedingungen ist ein einschichtiges Epithel aus hexagonalen Zellen im wt ausgewachsen. Die Expression

von „tight junction protein 1 (Tjp1, oder ZO1) in der Zellmembran beweist den epithelialen Charakter dieser Zellen (Abb.3-26).

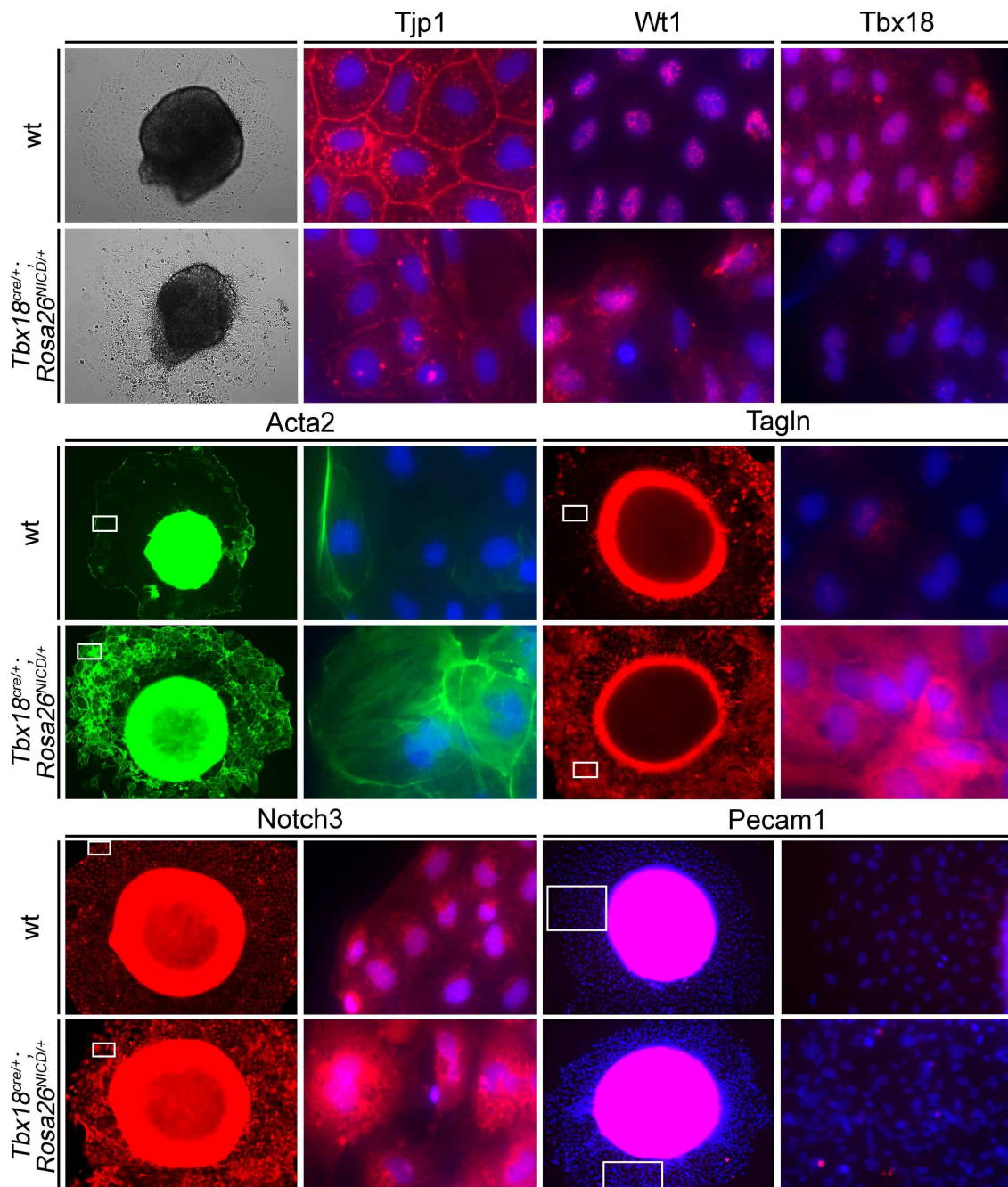


Abbildung 3-26: Verlust von epikardialer Identität und Induktion von glatter Muskelzellendifferenzierung in primären epikardialen Zellen durch N1ICD Überexpression. Zelluläre Analyse von epikardialen Auswüchsen explantierter rechter Ventrikel von wt und *Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{NICD/+}* Embryos nach 2 Tagen Kultur unter serumfreien Bedingungen mittels Durchlichtmorphologie und Immunfluoreszenzanalyse des „tight junction protein“ (Tjp1, auch ZO1), den epikardialen Transkriptionsfaktoren Wt1 und Tbx18, den glattmuskulären Proteinen Acta2, Tagln und Notch3 und endotheliales Pecam1. Gezeigt werden ganze Explantate (Durchlicht, Acta2, Tagln, Notch3 und Pecam) und vergrößerte Regionen (weiße Rechtecke). Blaue Färbung zeigt DAPI.

Auch die Färbung von Tbx18 hauptsächlich und Wt1 ausschließlich im Zellkern weist auf den epithelialen Charakter hin. Die Expression von glattmuskulären Markern „Transgelin“ (Tagln), Acta2 und Notch3 in nur geringem Maße bestätigt diesen Befund. Auch für den Endothelmarker Pecam1 lag keine Expression vor. Die Zellen bleiben also epithelial und undifferenziert.

Im Gegensatz dazu zeigten Explantate von *Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{N1CD/+}* Herzen keine glatte epitheliale Auswuchsfront und die Zellen hatten eher mesenchymalen Charakter mit weniger klaren Zellkontakten. Tjp1 war von der Membran ins Cytosol verlagert, Tbx18 Expression war runterreguliert und Wt1 Expression ins Cytosol verschoben. Alle Glattenmuskelzellmarker waren stark hochreguliert und Acta2 zusätzlich verändert von einer kortikalen Expression zu Stressfasern (Abb. 3-26). Pecam1 Färbung war weiterhin nicht zu sehen. Diese Veränderungen wurden noch verstärkt durch zwei zusätzliche Tage Kultur ohne Ventrikel (Abb. 3-27).

Die Proliferation dieser Zellen im Auswuchs war nicht signifikant verändert (Abb. 3-28). Zusammengenommen zeigen diese Resultate, dass N1ICD ausreichend ist um EMT und Differenzierung in glatte Muskelzellen auszulösen.

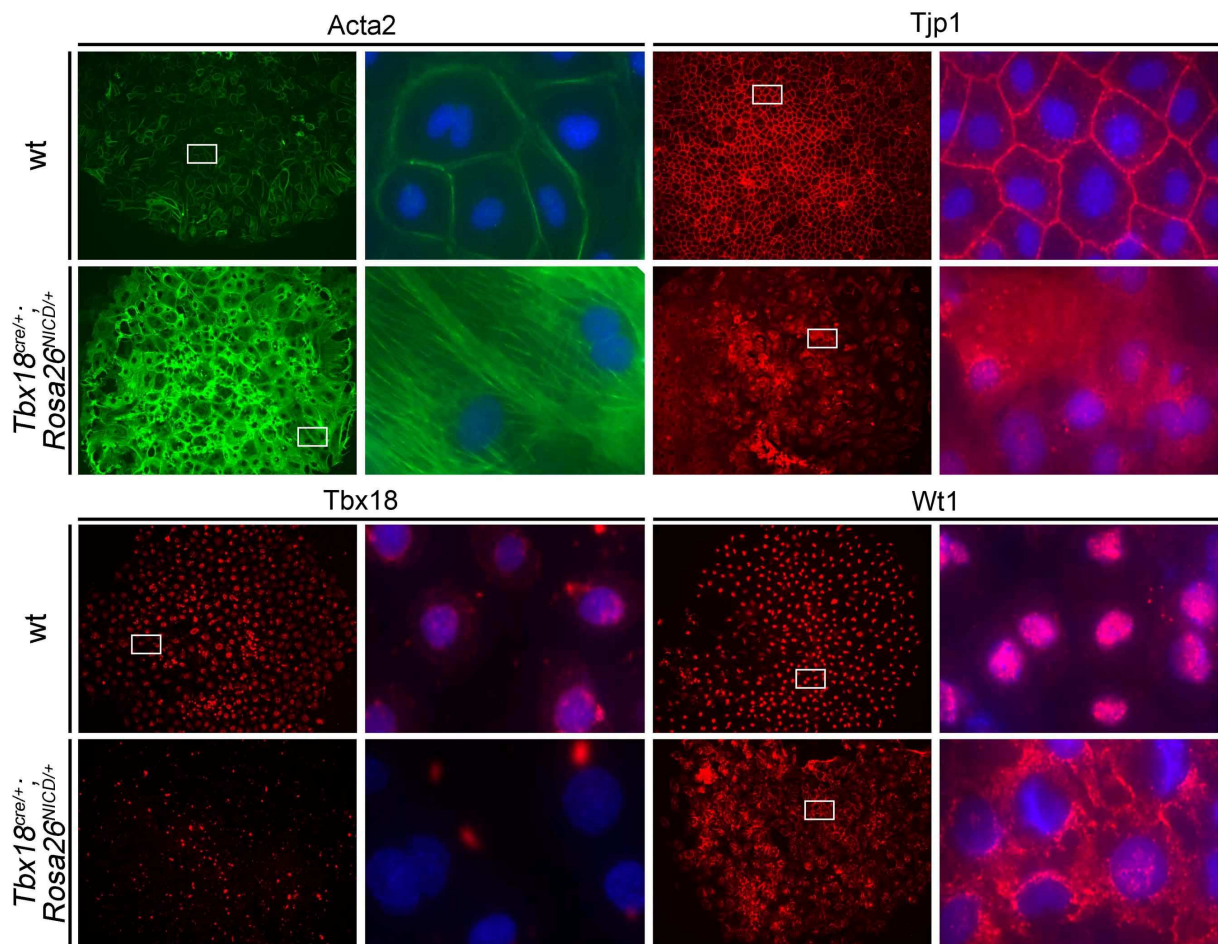


Abbildung 3-27: Noch deutlicherer Verlust von epikardialer Identität und Induktion von glatter Muskelzellendifferenzierung in primären epikardialen Zellen durch *N1CD* Überexpression nach weiteren 2 Tagen Kultur. Zelluläre Analyse von epikardialen Auswüchsen explantierter rechter Ventrikel von wt und Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{NICD/+} Embryos nach 4 Tagen Kultur, wobei nach 2 Tagen der Ventrikel entfernt wird und das Loch daraufhin zuwächst, unter serumfreien Bedingungen mittels Immunfluoreszenzanalyse des „tight junction protein“ (Tjp1, auch ZO1), den epikardialen Transkriptionsfaktoren Wt1 and Tbx18 und den glattmuskulären Proteinen Acta2. Gezeigt werden ganze Explantate und vergrößerte Regionen (weiße Rechtecke). Blaue Färbung zeigt DAPI.

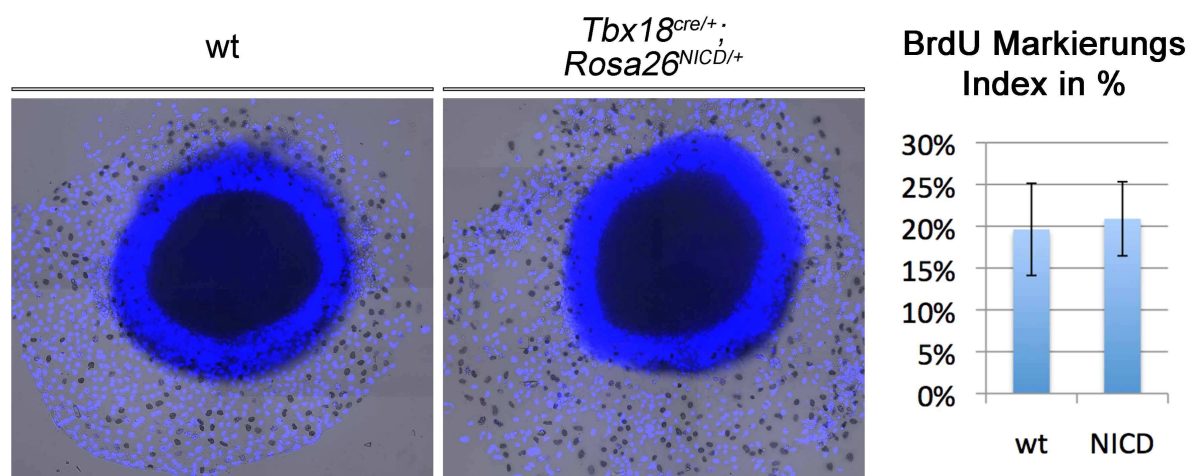


Abbildung 3-28: Die epikardialen Explantate von *Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{NICD}* Mäusen zeigen keine Veränderungen der Zellproliferation. Analyse der Zellproliferation auf epikardialen Explantaten nach 2 Tagen Kultur durch einen BrdU Inkorporationsversuch. Statistische Auswertung der BrdU-Markierungsindices wobei der BrdU Markierungsindex dem Verhältnis aller BrdU positiven Zellkerne zur Gesamtheit aller Zellkerne im entsprechenden Abschnitt entspricht. Es wurden je 4 Explante vom jeweiligen Genotyp ausgewertet. Als Streuungsmaß wurde die Standardabweichung genutzt. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student-T-Tests bestimmt. Es besteht kein Unterschied zwischen Kontrolle und *Tbx18KO*. Das ist allerdings nicht signifikant. (wt: 19.6% +/- 5.5%, NICD: 20.9% +/- 4.4%, P=0.733).

3.2.5 Der *Tgfb* Signalweg und die Expression von *Pdgfrb* ist dem Notch Signalweg nachgeschaltet

Andere Analysen konnten bereits die Notwendigkeit der *Tgfb* und *Pdgfb* Signalwege für die allgemeine glattmuskuläre Differenzierung und die koronare Arterienentwicklung beschreiben (Langlois et al., 2010; Mellgren et al., 2008). Um eine Antwort auf die Frage nach den Beziehungen zwischen dem Notch Signalweg und diesen Signalwegen zu erhalten, wurden koronare Arterien nach dem epikardialen Verlust von *Rbpj* analysiert. P-Smad2,3 dient dabei als Nachweis für einen aktiven *Tgfb* Signalweg. Sowohl P-Smad2,3 als auch *Pdgfrb* waren nicht mehr zu detektieren in perivaskulären Zellen der koronaren Arterien von *Tbx18^{cre/+}; Rbpj^{flox/flox}* E18.5 Embryos (Abb. 3-29).

Im Gegensatz dazu waren beide Proteine stark induziert im Epikard von *Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{NICD/+}* Embryos bei E14.5 (Abb. 3-30). Dies zeigt, dass ein aktivierter Notch Signalweg notwendig und ausreichend ist für die Induktion des *Tgfb* Signalweges und die Expression von *Pdgfrb* im Epikard und in den davon abstammenden mesenchymalen Zellen.

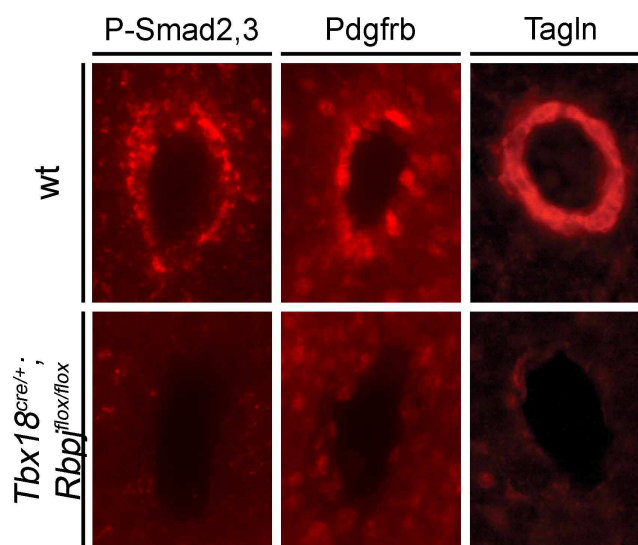


Abbildung 3-29: Der Tgfb Signalweg und Pdgfrb sind dem Notch Signalweg nachgeschaltet in der glatten Muskelzellendifferenzierung von koronaren Gefäßen. Vergleichende Immunfluoreszenzanalyse der Expression von P-Smad2,3, Pdgfrb und Tagln (rote Fluoreszenz) in koronaren Arterien der rechten Ventrikels von wt und $Tbx18^{cre/+}; Rbpj^{flox/flox}$ E18.5 Embryonen.

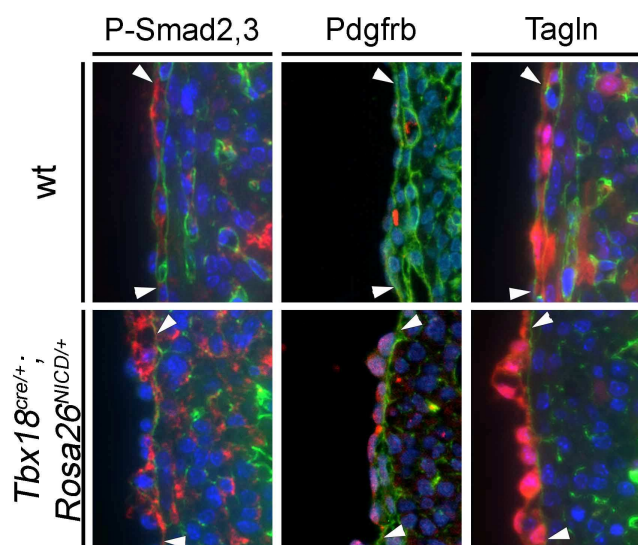


Abbildung 3-30: Der Tgfb Signalweg und Pdgfrb sind dem Notch Signalweg nachgeschaltet in der glatten Muskelzellendifferenzierung von epikardialen Zellen. Vergleichende Immunfluoreszenzanalyse der Expression von P-Smad2,3, Pdgfrb und Tagln (rote Fluoreszenz) in epikardialen und subepikardialen Zellen von wt und $Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{NICD/+}$ Embryonen bei E14.5. Grüne Fluoreszenz zeigt CollagenIV, welches die Visualisierung der Basalmembran unterhalb von Endothelien und epikardialen Zellen (weiße Pfeilköpfe) ermöglicht um das Epikard besser visuell vom Myokard unterscheiden zu können. Blaue Fluoreszenz zeigt DAPI gefärbte Kerne,

4. Diskussion

Der venöse Pol des Herzens ist ein Ausgangszentrum für viele Strukturen, die während der Herzentwicklung angelegt werden. So stellt dieses Zentrum nicht nur Zellen für den Einflussbereich des Herzens, sondern auch für das spätere Epikard und die Koronargefäße. Zu verstehen, wie aus diesem winzigen undifferenzierten Zellhaufen komplexe und verschiedenartige Strukturen entstehen, ist ein zentrales Ansinnen der Entwicklungsbiologie. Diese Arbeit gibt einen kleinen Überblick über die regulatorischen und morphologischen Prozesse, die an der Bildung des sinoatrialen Knotens, der Teil des venösen Pols ist, und an der Bildung des Epikards und der Koronarien beteiligt sind. Die Ergebnisse zeigen, dass der T-Box-Transkriptionsfaktor *Tbx18* funktionell an der Bildung der Kopfdomäne des Sinusknotens beteiligt ist und dass der Notch Signalweg notwendig und ausreichend ist für die Induktion von glattmuskulärer Differenzierung während der Epikardentwicklung.

4.1 Die Funktion von *Tbx18* in der Entwicklung des Sinusknotens

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Sinusknoten mindestens aus zwei regulatorischen Domänen besteht. Das ist zum einen der große *Tbx18* positive Kopf innerhalb der Wand der rechten Vena cava superior und zum anderen die kleinere *Tbx18* negative Schwanzdomäne direkt an der venösen Klappe, die im späteren Verlauf zur Crista terminalis wird. Vorhergehende Analysen haben diese langgestreckte „Komma“-Form des SK und deren Position bei Nagern innerhalb der Vena cava superior und des Atriums bereits beschrieben (Liu et al., 2007; Yamamoto et al., 2006; Viragh et al., 1980). Auch die Experimente und 3D-Rekonstruktionen zur Funktion des Transkriptionsfaktors *Tbx3* konnten diese Befunde bestätigen (Mommersteeg et al., 2007; Hoogaars et al., 2004). Die regulatorische Funktion von *Tbx3* für Genprogramm und Funktion des SK (Hoogars et al., 2007) zeigt, dass die Expression von *Tbx3* mit hoher Wahrscheinlichkeit die gesamte Domäne des SK widerspiegelt. Basierend auf diesen Analysen und auf den Expressionsstudien dieser Arbeit, den morphologischen Analysen und der Arbeit von Frau Dr. Cornelia Wiese konnte ein genaues genetisches Expressionsprofil während der Embryonalentwicklung des SK erstellt werden (Abb.4-1). Kurz nach E9 wird der primäre SK etabliert, welcher der späteren Schwanzdomäne

entspricht. Daran anschließend expandiert die Kopfdomäne entlang der Achse der Vena cava superior und erreicht ihre endgültige Größe bei E14.5. Dieses Expressionsprofil zeigt die *Tbx18*, *Tbx3* und *Hcn4* positive myokalisierte Kopfdomäne des SK und die *Tbx18* negative, *Tbx3* und *Hcn4* positive myokalisierte Schwanzdomäne.

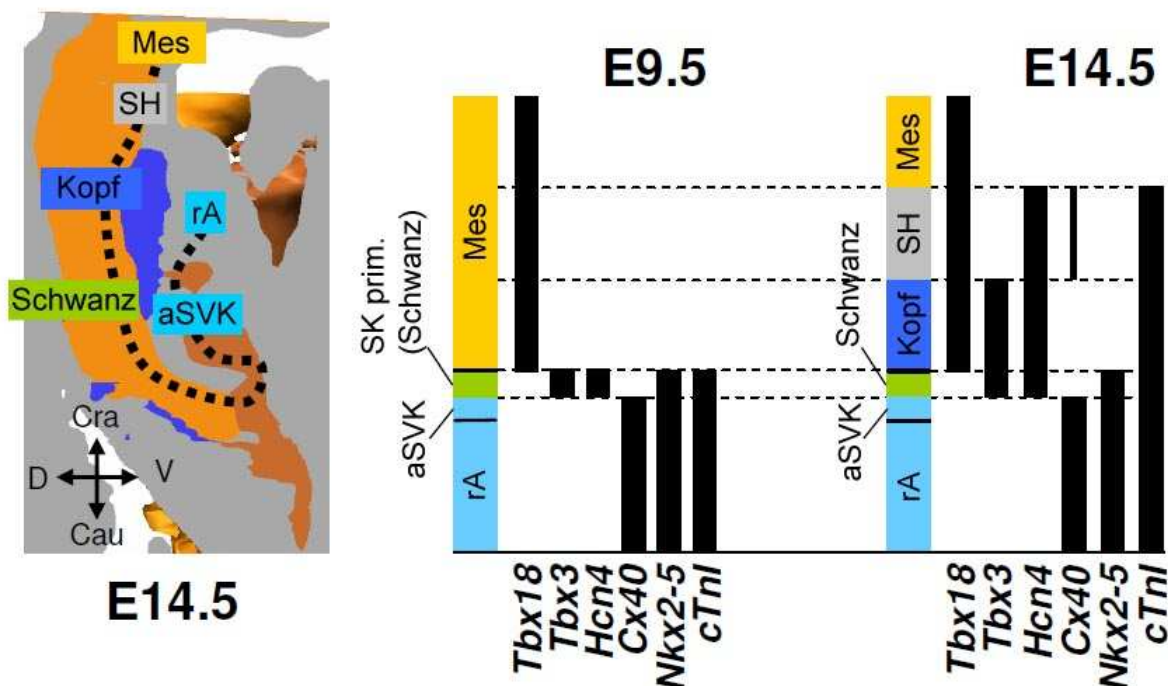


Abbildung 4-1: Entwicklung der verschiedenen genetisch unterscheidbaren SK Strukturen während der Embryonalentwicklung. Longitudinaler Schnitt durch die SK Region in einer 3-dimensionalen Rekonstruktion dieser Region mit Blick von der rechten Seite. Genexpressionsprofile vom SK und benachbartem Gewebe im wt bei verschiedenen embryonalen Stadien. Lineare farbige Darstellung vergleichbar mit Domänen auf der linken Seite. Namen auf der Achse entsprechen Namen auf dem Schnitt. Schwarze Balken zeigen Genexpressionen in korrespondierenden Geweben auf der linken Seite. (aSVK) atriale Seite der venösen Klappe, (Mes) Mesenchym (rA) rechtes Atrium, (SH) Sinus Horn (nach Wiese et al. 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass nur die Bildung des Kopfes die Expression von *Tbx18* benötigt, nicht aber die Schwanzdomäne. In *Tbx18* Mutanten konnte in Kooperation mit Frau Dr. Cornelia Wiese gezeigt werden, dass bei E12.5 der Kopf des SK erst gar nicht gebildet wird (Abb.4-2). Dies ist der erste Nachweis für zwei völlig unterschiedliche regulatorische Domänen, die nicht beide von der *Tbx18* Expression abhängen. Die Kompartimentierung dieser Region ist möglicherweise von entscheidender Bedeutung für physiologische Notwendigkeiten des Reizleitungssystems.

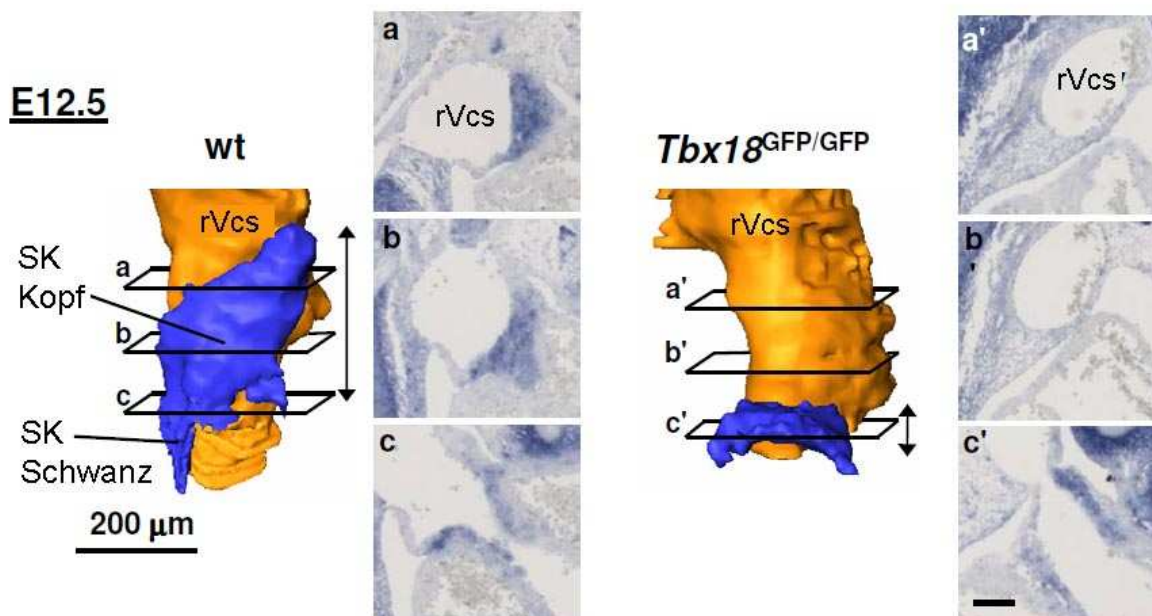


Abbildung 4-2: Entwicklung der Kopfstruktur des Sinusknotens ist bei E12.5 noch gar nicht eingesetzt in *Tbx18*KO Mäusen. 3D-Rekonstruktion des Lumens der rechten Vena cava superior (rVcs, gelb) und des *Tbx3* positiven Sinus Knotens (blau) wt und *Tbx18*^{GFP/GFP} Embryonen von seriellen transversen Schnitt in situ Färbungen für *Tbx3* bei E12.5. Schwarze Rechtecke in der Rekonstruktion verweisen auf die jeweilige Färbung mit entsprechendem Buchstaben (nach Wiese et al. 2009).

Normalerweise fungiert nur ein kleiner Teil der Kopfstruktur als dominanter Impulsgeber, während andere Bereiche von geringerer Bedeutung sind. Nach Stimulation oder pharmakologischer Behandlung kann man jedoch auch beobachten, dass das Impulszentrum innerhalb des Knotens beliebig wandern kann (Boyett et al., 2000; Boineau et al., 1983; Op't Hof, 1988; Yamamoto et al., 2006.). Schon diese Studien haben also zumindest funktionale Domänen innerhalb des SK unterschieden, die mit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften ausgestattet sind (Boyett et al., 2000). In den adulten *Tbx18* Mutanten, bei welchen die nachgeburtliche Mortalität überwunden wurde (*Tbx18*^{GFP/GFP}, *msd::Tbx18/msd::Tbx18* (Bussen et al.2004)), war die Größe des SK extrem verringert und die Grenzen zu atrialem Gewebe sehr diffus (Abb3-7).

Das Verschwimmen der Gewebegrenzen könnte auf eine falsche Spezifizierung von atrialem Myokard, oder auf morphogenetische Defekte zurückzuführen sein. Allerdings waren die Marker *Hcn4* und *Cx40* auf den Färbungen in der Mutante niemals koexprimiert. Die Zellidentitäten bleiben also wohl erhalten und der Verlust der Grenze ist also eher auf morphogenetische Defekte zurückzuführen. Dies konnte von Frau Dr.

Cornelia Wiese durch hochauflösende Doppelimmunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden (Wiese et al., 2009).

Diese Tiere zeigten unter Anästhesie keine Veränderungen in den Kontraktionsrate, den EEG Parametern und P-Wellen. Das bedeutet, dass unter stressfreien Bedingungen ein stark verkleinerter SK immer noch ausreichend ist, um als dominanter Schrittmacher zu fungieren und somit möglicherweise selbst die Schwanzregion alleine ausreicht, um einen Sinus Rhythmus zu etablieren. Jede Region scheint also in der Lage zu sein als Schrittmacher zu fungieren (Euler et al., 1979; Kalman et al. 1995). Eine Analyse unter Stressbedingungen steht noch aus und würde zeigen, ob unter diesen Bedingungen auch eine normale Funktion aufrechterhalten werden kann.

4.1.1 Herkunft der SK-Zellen und Regulation der Entwicklung

Diese Analyse wurde auch durchgeführt, um die Herkunft der SK-Zellen besser zu verstehen. Der SK könnte durch Proliferation einer bereits existierenden und spezifizierten Zellpopulation aus Myokard entstehen, durch Rekrutierung einer externen mesenchymalen Zellpopulation, die dann in SK-Zellen differenzieren, oder durch Rekrutierung einer angrenzenden bereits myokalisiertem Zellpopulation. Obwohl diese letzte Methode für andere Komponenten des Reizleitungssystems, wie der atrioventrikuläre Knoten und das Purkinjefaser Netzwerk (Pennisi et al., 2002), bereits gezeigt werden konnte, haben vorhergehende Experimente (Hoogaars et al., 2007) diese Möglichkeit für den SK ausgeschlossen. Dies konnte von Frau Dr. Cornelia Wiese für diese Arbeit noch einmal bestätigt werden (Abb. 4-4). Hier wurde mit Hilfe einer atrialen Zellschicksalsanalyse direkt gezeigt, dass atriales Myokard nicht zur Bildung des SK beiträgt. Die Expressionsanalyse, die für diese Arbeit durchgeführt wurde, konnte zeigen, dass *Tbx3* und *Hcn4* positives Myokard während der Embryonalentwicklung in Richtung *Tbx18* positives Kavalvenenmesenchym expandiert, um den Kopf des SK zu bilden (Abb. 4-1). Diese Ergebnisse lassen nur die Möglichkeit offen, dass *Tbx3* und *Hcn4* positives Myokard in diese Richtung expandiert und dann *Tbx18* anschaltet, oder dass *Tbx18* positives Mesenchym als eine Art Vorläuferzelltyp zum SK hinzugefügt wird und dann *Tbx3* anschaltet. Die durchgeführte Zellschicksalsanalyse ist ein starkes Argument für die zweite Möglichkeit (Abb. 3-8), da

ehemals *Tbx18* positive Zellen im gesamten SK, einschließlich dem Schwanz, gefunden werden können. Zusätzlich hat diese Analyse noch gezeigt, dass *Tbx18* positive Zellen nicht zum atrialen Myokard beitragen, was auf eine frühe Trennung von SK und atrialem Myokard hinweist.

Das vergleichende Expressionsprofil von wt zu *Tbx18*-Mutante zeigt, dass alle Expressionsdomänengrenzen aufrechterhalten werden und nur der SK-Kopf zu Beginn nicht ausgebildet wird bei E10.5-E12.5 und dann nur sehr reduziert nachgebildet wird bei E14.5-E17.5 (Abb. 4-3). Da Proliferation, Zelldichte und Apoptose nicht verändert waren in diesen Mutanten, ist die einzige mögliche Erklärung für diesen Phänotyp, dass Zellen aus der Kavalvenenregion nicht in der Lage sind zum SK beizutragen. Es lässt sich also daraus schließen, dass zukünftiges SK-Kopfmyokard aus *Tbx18* positiven mesenchymalen Zellen der Kavalvenenregion rekrutiert wird.

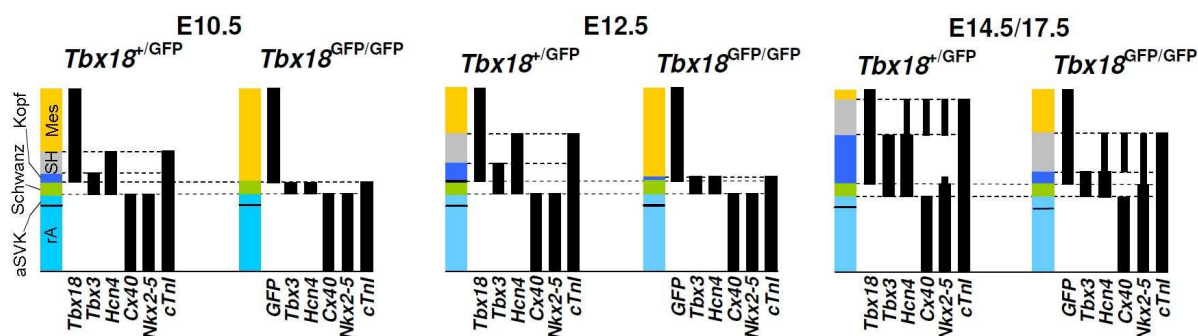


Abbildung 4-3: Schema der morphologische Veränderungen und Verzögerungen in der Entwicklung des Sinusknotens in *Tbx18*KO-Mäusen. Genexpressionsprofile vom SK und benachbartem Gewebe in *Tbx18*-Mutanten und Kontrolltieren bei verschiedenen embryonalen Stadien. Lineare Darstellung vergleichbar mit Abb. 4-1. Namen auf der Achse entsprechen Namen auf dem Modell in Abb.4-1. Schwarze Balken zeigen Genexpressionen in entsprechenden Geweben links. (aSVK) atriale Seite der venösen Klappe, (Mes) Mesenchym (rA) rechtes Atrium, (SH) Sinus Horn (nach Wiese et al. 2009).

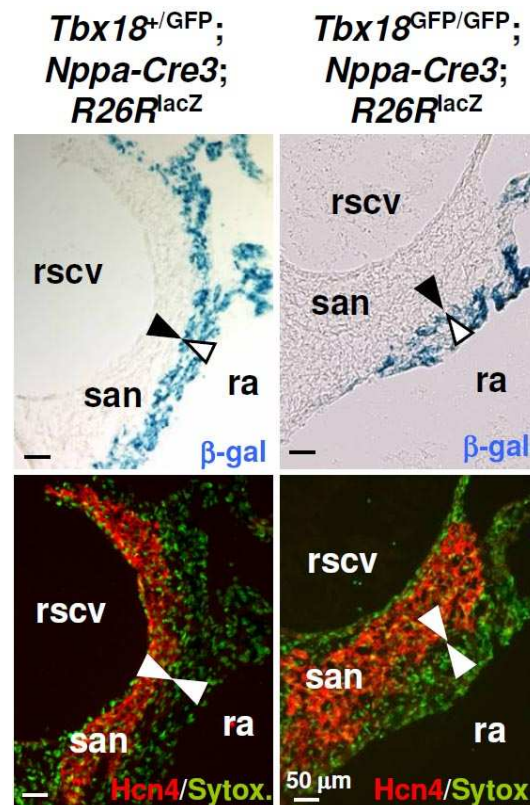


Abbildung 4-4: Atriales Myokard trägt weder im wt noch in der *Tbx18* Mutante zur Entwicklung des SK bei. Linke Seite heterozygoter wt (*Tbx18*^{GFP/+}; *Nppa::Cre3*; *R26R*) Embryo, rechte Seite homozygoter Mutanten (*Tbx18*^{GFP/GFP}; *Nppa::Cre3*; *R26R*) Embryo mit β -Galactosidase Färbung (obere Bilder) und Immunohistochemie von Hcn4 (rot) and Kernen (sytox green) auf den gleichen Schnitten bei E17.5 (nach Wiese et al. 2009).

Der SK ist also eine weitere Unterpopulation des sekundären Herzfeldes, da er auch positiv für *Islet1* ist (Mommersteeg et al., 2007), welcher als Marker für diese Region beschrieben wurde (Sun et al., 2007; Cai et al., 2003). Es muss aber eine unterschiedliche Unterpopulation sein, da das ursprüngliche sekundäre Herzfeld in der Embryonalentwicklung auch Teile des Atriums bilden kann.

Eine Analyse von *Tbx3* Mutanten im Labor von Dr. Vincent Christoffels hatte keine phänotypischen Veränderungen im SK gezeigt. Abgesehen von der Funktion von *Tbx3* im Aktivieren des SK-Genprogramms (Hoogaars et al., 2007) spielt *Tbx3* somit keine Rolle in der Zellrekrutierung zum SK. Die Analyse von *Tbx18*^{GFP/GFP}; *Tbx3*^{Cre/Cre} Doppelmutanten hat einen additiven Phänotyp beider Einzelmutanten gezeigt. Diesen Doppelmutanten fehlte der SK-Kopf und die Schwanzregion exprimiert ektopisch *Cx40* (Abb. 3-10). Da doppelheterozygote Tiere keinen Phänotyp aufwiesen, lassen diese Erkenntnisse auf 2 unabhängige Funktionen von *Tbx3* und *Tbx18* in der SK-Entwicklung

schließen. Zuerst mobilisiert *Tbx18* die Vorläuferzellen im Kavelvenenmesenchym, die dann in SK-Myokard differenzieren und sobald dieses Myokard gebildet wurde, wird *Tbx3* exprimiert. *Tbx3* sichert dann die Aufrechterhaltung des spezifischen SK-Genprogramms. Nur die kleine Schwanzregion wird unabhängig von *Tbx18* gebildet, ist aber auch auf eine Expression von *Tbx3* angewiesen (Abb. 4-5).

4.1.2 Modell der SK-Entwicklung

Zur besseren Veranschaulichung der Vorgänge während der SK-Entwicklung wurde im Labor von Dr. Vincent Christoffels für diese Analyse ein Model angefertigt. Dieses Model zeigt die Entwicklung und Herkunft der verschiedenen SK-Domänen und gibt einen Überblick über die Marker, die in den einzelnen Regionen exprimiert sind (Abb. 4-5).

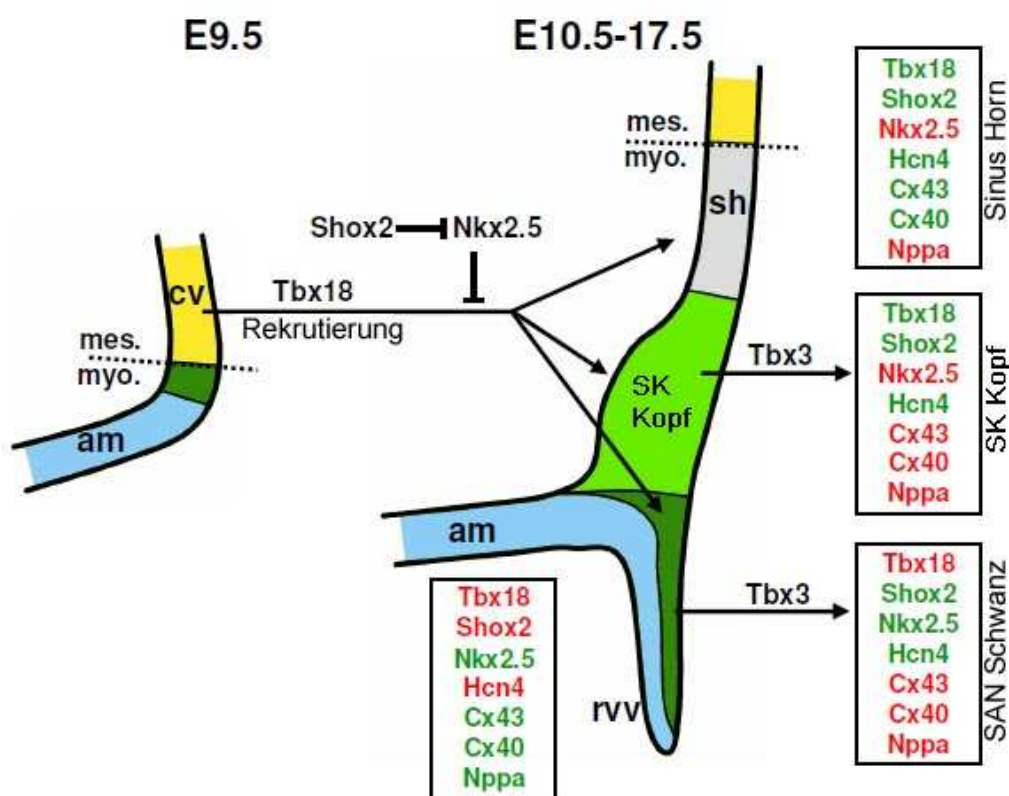


Abbildung 4-5: Schematische Darstellung der SK Entwicklung zwischen E9.5 und E17.5. Graphisches Modell der Funktion von Tbx18 und Tbx3 Funktion während der SK-Entwicklung. Tbx18 wird benötigt für die Bildung der Kopf Region des SK durch Rekrutierung mesenchymaler Vorläuferzellen aus der Sinus Horn Region nach E9.5. Tbx3 erhält ein spezifisches Genprogramm in beiden Regionen des SK. Fehlende Expression eines Gens ist in rot, Expression in grün dargestellt. (am) atriales Myokard, (cv) Kardinalvene, (mes) Mesenchym, (myo) Myokard, (sh) Sinus Horn, (rvv) rechte Seite der venösen Klappe (nach Wiese et al. 2009).

4.2 Der Notch-Signalweg in der Epikard Entwicklung

Eine benachbarte, ebenfalls *Tbx18* positive Domäne innerhalb des venösen Pols des Herzen, ist das Proepikardialorgan. Das Proepikardialorgan enthält die meisten Zellen für die Epikardentwicklung. Das Epikard wiederum ist ein wichtige Quelle für verschiedenen Zelltypen der späteren Herzentwicklung und für Signale, die zum Wachstum und zur Differenzierung des Herzens beitragen. Die Faktoren, die diese Entwicklung kontrollieren, sind bisher allerdings nur zum Teil verstanden. Auch über die möglichen zellulären Schicksale der epikardialen Zellen existieren kontroverse Meinungen. In dieser Analyse möchte ich daher diese Schicksale aufklären und die Rolle eines wichtigen Signalweges, dem Notch-Signalweg, für die Epikardentwicklung beschreiben.

4.2.1 Zellschicksale epikardialer Zellen

In den letzten Jahren wurden einige Studien veröffentlicht, die versucht haben die möglichen zellulären Derivate des Epikards aufzuklären. Analysen im Hühnchen waren da die Vorreiter und haben gezeigt, dass interstitielle Fibroblasten, perivaskuläre Zellen um die Koronarien (glatte Muskelzellen und Fibroblasten) und endotheliale Zellen der Koronargefäße gebildet werden können (Dettman et al., 1998; Wilting et al., 2007). Als die ersten genetischen Zellschicksalsanalysen dann in der Maus veröffentlicht wurden, stellten diese die Entstehung von endothelialen Zellen der Koronargefäße in Frage. Außerdem wurde nun die Möglichkeit diskutiert, dass auch myokardiale Zellen aus dem Epikard gebildet werden können (Cai et al. 2008; Zhou et al., 2008). In der ersten Studie wurde ein *Tbx18^{cre}* Allel genutzt und die Autoren haben beobachtet, dass Teile der Kardiomyocyten aus dem linken Ventrikel und dem interventrikulären Septum aus dem Epikard stammen. Die andere Gruppe wiederum nutzte ein *Wt1^{cre}* Allel und kam zu dem Ergebnis, dass in allen Teilen des Herzmyokards ein kleiner Teil von myokardialen Zellen zu finden ist, die aus dem Epikard stammen. Da aber *Tbx18* eine endogene Expressionsdomäne, schon von E10.5 an, gerade im linken Ventrikel aufweist und die endogene Expression von *Tbx18* insgesamt nur schlecht von ihrer Maus rekapituliert wird, kann man der ersten Analyse skeptisch gegenüber stehen (Christoffels et al., 2009).

Für die vorliegende Arbeit musste also erstmal nachgewiesen werden, ob das genutzte *Tbx18^{cre}* Allel die endogene Expression besser widerspiegelt. Das zu diesem Zweck durchgeführte Experiment zeigte eine Übereinstimmung zwischen endogener Expression und Reporter-gen-Aktivierung (Abb. 3-14). Die weitergehenden Analysen mit dieser Cre-Mauslinie zeigten keinerlei rekombinante Kardiomyocyten im rechten Ventrikel. Diese Ergebnisse stellen beide vorhergehenden Analysen in Frage. In der Analyse mit dem *Wt1^{cre}* Allel ist aber nur ein sehr geringer Anteil von Kardiomyocyten positiv für die Zellschicksalsmarkierung (7-18%). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen daher die Möglichkeit offen, dass eine *Tbx18*-negative Zellpopulation existiert, die gleichzeitig positiv für *Wt1* ist und auf dem Epikard in sehr geringen Zahlen existiert. Diese Zellen könnten als eine Art Stammzelle zur Bildung der Kardiomyocyten beitragen.

Im Gegensatz zu den Analysen im Hühnchen konnten auch keine endothelialen Zellen entdeckt werden, die aus dem Epikard stammen, obwohl die ersten endothelialen Marker direkt unter dem Epikard zu finden sind in der Nähe der atrioventrikulären Grube (Abb. 3-11/12, *Notch1* und *Dll4* bei E12.5; E11.5 nicht gezeigt). Dies bestätigt die Analyse von Red-Horse et al. (2010), die als Quelle für den größten Teil der koronaren Endothelien die sinus venosus Region beschreibt. Der endotheliale koronare Plexus entsteht dabei durch Sprießen vorhandener Kapillaren. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit das Epikard als Quelle für perivaskuläre Fibroblasten, glatte Muskelzellen und interstitielle Fibroblasten bestätigt werden (Abb. 3-18).

Für spätere Analysen wäre es hilfreich Cre-Allele von ausschließlich im Epikard exprimierten Genen zu nutzen, da andere kardiale Expressionsdomänen die Analyse dann nicht stören können. Außerdem wäre eine induzierbare epikardiale Cre-Linie nützlich, um die Rolle und Möglichkeiten des adulten Epikard beschrieben zu können.

4.2.2 Der Notch Signalweg ist notwendig und ausreichend um glatte Muskelzellendifferenzierung zu induzieren

Bevor die Effekte, die der Notch Signalweg auf die Epikardentwicklung hat, zur Sprache kommen, sollte auf die Ergebnisse der Expressionsanalyse eingegangen werden. In dieser Arbeit war es möglich Notch-Signalwegskomponenten während der

Epikardentwicklung im Proepikardialorgan, dem frühen Epikard bei E10.5 und in den verschiedenen Zelltypen der KoronargefäÙe zu detektieren. Die Expression bei E10.5 im Epikard war allerdings so schwach, dass dieses Ergebnis mittels semiquantitativer RT-PCR bestätigt werden musste (Abb.4-6).

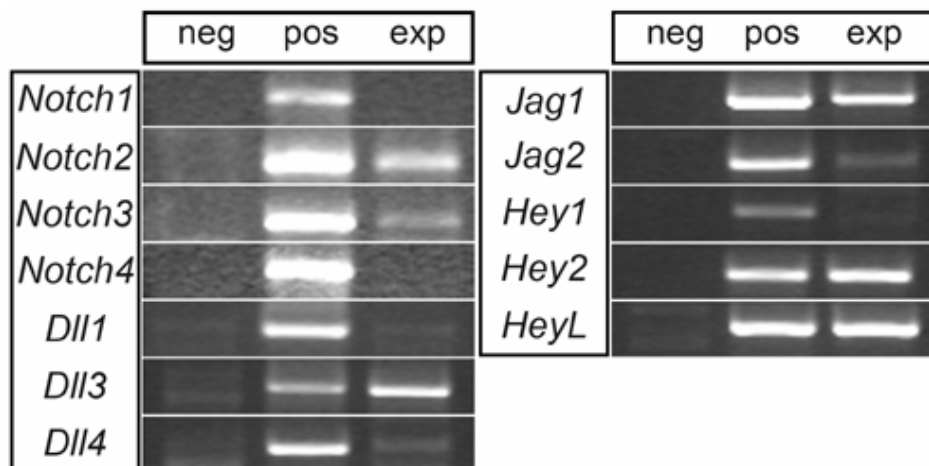


Abbildung 4-6: Bestimmung der epikardial expremierten Notch-Signalwegskomponenten mittels semiquantitativer RT-PCR. Semiquantitative RT-PCR Analyse verschiedener Notch-signalwegskomponenten von epikardialen Explantaten nach 2 Tagen Kultur unter serumfreien Bedingungen. Für diese Analyse wurden 11 komplette Wildtypkulturen gepoolt, nachdem der Ventrikel entfernt wurde. (RT-PCR durchgeführt von Timo Lüdtkke)

Nach diesem Stadium war allerdings keine Expression einer Komponente im Epikard mehr festzustellen. Das Fehlen einer Expression im späten Epikard und das Fehlen eines Phänotyps im Epikard der *Tbx18^{cre/+}; Rbpj^{flox/flox}* Maus während der gesamten Embryonalentwicklung, ist ein Hinweis darauf, dass der Notch-Signalweg keine Funktion in der Bildung und Aufrechterhaltung des Epikard hat. Die Expression in Zellen um die sich entwickelnden KoronargefäÙe sprechen für eine Funktion in der postepikardialen Entwicklung. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten außerdem zeigen, dass der Notch-Signalweg keine Rolle in der EMT und der Fibroblastenentstehung spielt (Abb. 3-17/18). Diese Schlussfolgerungen werden durch die Ergebnisse mit der *Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{N1CD/+}* Maus noch unterstützt. Die frühe Überexpression von N1ICD im Epikard und Proepikardialorgan führt hier zu einem frühen Defekt im Proepikardialorgan und zu einer frühzeitigen Differenzierung des Epikards, was eine spätere EMT ausschließt. Der Verlust der Expression von „Integrin alpha 4“ in proepikardialen Zellen der *Tbx18^{cre/+}; Rosa26^{N1CD/+}* Maus erklärt hierbei auch direkt die Probleme bei der Kolonisierung des Ventrikels, da „Integrin alpha 4“ notwendig ist für ein Anheften dieser Zellen am Myokard

(Yang et al., 1995). Um die normale Embryonalentwicklung zu gewährleisten darf es also wohl keinen aktiven Notch-Signalweg im Epikard und seinem Vorläufer geben.

Der Notch Signalweg wird aber für die Differenzierung der glatten Muskelzellen um die Koronararterien benötigt. Die Expression von zwei Rezeptoren (*Notch1* und *3*) in perivaskulären Zellen und 4 Liganden (*Dll1*, *3*, *Jag1* und *2*) in endothelialen Zellen, weisen auf Redundanzen bei der Transaktivierung des Signalweges in den Koronargefäßen hin. Hierbei könnte der Notch-Signalweg auch für die initiale Rekrutierung der Zellen aus dem Epikard zu den bereits vorhandenen Endothelien im Myokard sorgen. Ein solches Modell wurde für die allgemeine Gefäßentwicklung schon von Karsan (2008) beschrieben. Perivaskuläre Zellen werden allerdings auch in der Mutante von den Endothelien rekrutiert und exprimieren *Notch3*, differenzieren dann allerdings nicht weiter zu glatten Muskelzellen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Rekrutierung perivaskulärer Zellen *Rbpj*-unabhängig erfolgen muss und dass die Expression von *Notch3*, welcher ein wichtiger Bestandteil der Differenzierungskaskade zu glatten Muskelzellen ist, unabhängig angeschaltet werden muss. Es ist in diesem Zusammenhang bereits bekannt, dass *Notch3* in perivaskulären Zellen nur über die Interaktion mit *Jag1* in den Endothelien aktiviert werden kann (Liu et al., 2009).

Der Verlust von ausdifferenzierten glatten Muskelzellen um die Gefäße führt in der konditionellen *Rbpj*-Mutante nicht zu einem Verlust der Endothelien und ihrer Identität (Abb. 3-16). Die arterielle oder venöse Differenzierung ist also unabhängig von einer funktionellen glatten Muskelschicht. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch eine Analyse über den Verlust von *Jag1* in endothelialen Zellen, bei welcher es auch zu einem Verlust der glatten Muskelzellschicht in normalen Gefäßen kommt. Diese Gefäße behalten aber ebenfalls ihre Identität. Diese Identität könnte durch direkte Notch-Signale in *Cis* vermittelt werden, über den auch in Endothelien exprimierten *Notch1* Rezeptor.

Die allgemeine Funktion von *Rbpj* in der glattmuskulären Differenzierung von Gefäßen wurde zwar schon beschrieben (Morrow et al., 2008), aber die Rolle in der Koronargefäßentwicklung war bisher völlig neu. In der Literatur finden sich neben der angesprochenen Analyse von *Jag1* noch einige andere Studien, die sich mit der Rolle des Notch-Signalweges in der glattmuskulären Differenzierung von systemischen Gefäßen befassen. In diesen Studien werden *Notch1*, *3* und *Jag1* beschrieben als wichtige perivaskuläre und endotheliale Proteine, ohne die es nicht zu einer

Differenzierung in glatte Muskelzellen kommen kann (Domenga et al., 2004; Li et al. 2004; Doi et al. 2006). Der Notch Signalweg ist also wahrscheinlich ein genereller Regulator von glattmuskulärer Differenzierung um Gefäße jeder Art.

4.2.3 Die Funktion von TGF-vermittelter Signaltransduktion in Bezug auf den Notch Signalweg

In der Literatur wurden schon einige Signalwege beschrieben, die eine Rolle in der glattmuskulären Differenzierung von epikardialen Zellen spielen. In dieser Arbeit wird besonders auf 2 Signalwege eingegangen. Diese wurden analysiert, um ihren Bezug zum Notch Signalweg zu analysieren. Es wurde beschrieben, dass der Pdgf Signalweg notwendig für Proliferation glattmuskulärer Vorläuferzellen und die initiale EMT ist. Pdgfrb wird dabei als Marker für glatte Muskelzellen herangezogen (Mellgren et al., 2008). Der Tgfb Signalweg wiederum spielt eine Rolle in epikardialer EMT und glattmuskulärer Differenzierung (Langlois et al., 2010; Sridurongrit et al., 2008).

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass ein konditioneller epikardialer Verlust von Rbpj zu einem Verlust von stabilisiertem P-Smad2,3 um die Koronararterien führt. Dieses phosphorylierte Protein ist ein Anzeichen für einen aktiven Tgfb-Signalweg. Auch Pdgfrb war nicht mehr festzustellen um diese Gefäße (Abb. 3-29). Pdgfrb wurde allerdings schon als Notch-Zielgen in glatten Muskelzellen von Gefäßen beschrieben (Jin et al., 2008). Eine Regulation des Tgfb Signalweges durch den Notch-Signalweg wurde bisher aber nur in der glattmuskulären Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen beschrieben (Kurpinski et al., 2010).

Die ektopische Aktivierung des N1ICD Signalweges in epikardialen Zellen zeigte den genau gegensätzlichen Phänotyp. Hier wurde im Epikard bei E14.5 der Tgfb Signalweg ektopisch angeschaltet und Pdgfrb ektopisch exprimiert. Zusammengefasst bedeuten diese Ergebnisse, dass der Notch Signalweg notwendig und ausreichend ist den Tgfb Signalweg und Pdgfrb Expression in epikardialen Zellen anzuschalten.

Weitere Analysen zeigten, dass diese Aktivierung des Tgfb Signalweges wahrscheinlich über die starke Aktivierung der Expression von Tgfb1-3 im Epikard hervorgerufen wird (Abb. 4-8). Diese Aktivierung könnte direkt erfolgen oder über die Interaktion mit dem Tgfb Signalweg, der wiederum dann in einer Rückkopplungsschleife diese Expression

anschaltet (Aoyagi-Ikeda et al., 2010). In dieser Publikation wurde der Mechanismus in Kulturen von alveolaren Zellen beschrieben. Eine weitere Studie beschreibt die Kooperation dieser beiden Signalwege in der glattmuskulären Differenzierung (Tang et al., 2010). Dabei aktivieren diese beiden Signalwege kooperativ glatte Muskelzellgene. In einem weiteren zusätzlichen Experiment (Abb. 4-7) konnte gezeigt werden, dass weder die Zugabe von Tgfb1 noch PDGFBB den Verlustphänotyp retten konnte (Abb. 4-7C). Dies zeigt, dass auch in Zellen aus dem Epikard eine kooperative Aktivierung des Notch und des Tgfb Signalweges notwendig ist. Da beide Signalwege aber eigentlich separat die Expression von glatten Muskelzellmarkern aktivieren können (Abb. 4-7A+B) (Nosedá et al., 2006), muss neben einer kooperativen Aktivierung von Zielgenen, auch noch eine gegenseitige Stimulierung der Signalwege erfolgen. Außerdem stabilisiert Rbpj wohl P-Smad2,3 direkt an den Promotoren der Glattmuskelzellgene (Tang et al., 2010).

Weitere Ergebnisse zeigten, dass PDGFBB effektiv die vom Notch oder Tgfb Signalweg ausgelöste glattmuskuläre Differenzierung inhibieren konnte (Abb. 4-7A+B). Der molekulare Mechanismus dahinter konnte bisher nicht aufgeklärt werden, aber es besteht die Möglichkeit, dass PDGFBB erst die EMT einleitet und dann aktiv einen undifferenzierten Zustand der epikardialen Zellen aufrechterhalten kann.

Abschließend lässt sich sagen, dass der Notch Signalweg den Tgfb Signalweg aktivieren kann und mit ihm kooperiert, um direkt glattmuskuläre Zielgene anzuschalten in verschiedenen Umgebungen.

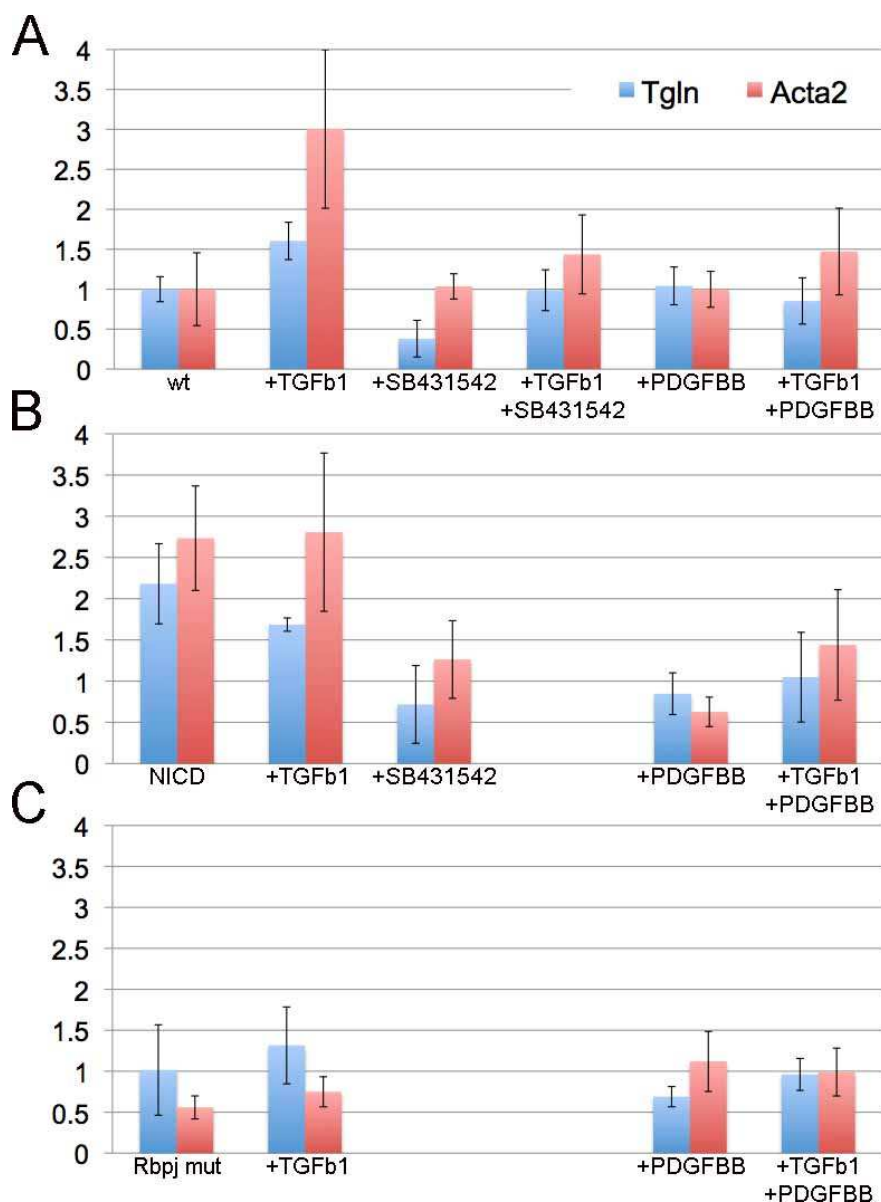


Abbildung 4-7: Notch und Tgfb Signalwege kooperieren während der Glatten Muskelzellidifferenzierung in epikardialen Explant Kulturen. Semiquantitative RT-PCR Analyse von Acta2 und Tagln Expression in verschiedenen behandelten gepoolten epikardialen Explantate von wt (A), *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}* (B) und *Tbx18^{cre/+};Rbpj^{flox/flox}* Herzen. Werte und statistische Signifikanzen im Anhang. (RT-PCR durchgeführt von Timo Lütke)

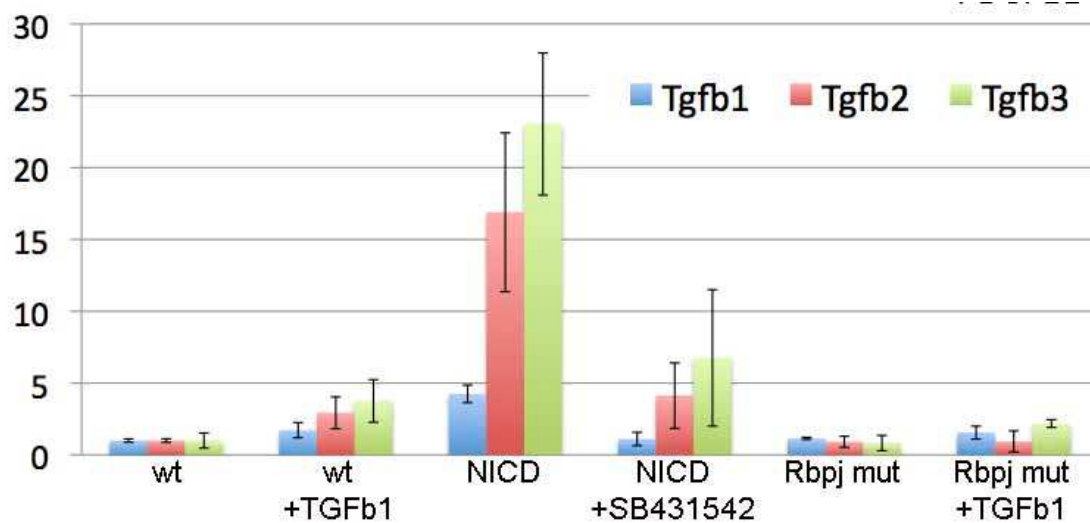


Abbildung 4-8: Der Notch Signalweg kann die Expression von Tgfb1-3 über eine Induktion des Tgfb Signalweges induzieren. Semiquantitative RT-PCR Analyse von Tgfb1, Tgfb2 und Tgfb3 Expression in verschieden behandelten gepoolten epikardialen Explantate von wt (A), *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}* (B) und *Tbx18^{cre/+};Rbpj^{fl/fl}* Herzen. Werte und statistische Signifikanzen im Anhang. (RT-PCR durchgeführt von Timo Lüttke)

5. Literatur

- Aberle H, Schwartz H, Kemler R.** Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem.* 1996 Jun 15;61(4):514-23. Review.
- Agulnik SI, Garvey N, Hancock S, Ruvinsky I, Chapman DL, Agulnik I, Bollag R, Papaioannou V, Silver LM.** Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion. *Genetics.* 1996 Sep;144(1):249-54.
- Aoyagi-Ikeda K, Maeno T, Matsui H, Ueno M, Hara K, Aoki Y, Aoki F, Shimizu T, Doi H, Kawai-Kowase K, Iso T, Suga T, Arai M, Kurabayashi M.** Notch Induces Myofibroblast Differentiation of Alveolar Epithelial Cells via TGF- α /Smad3 Pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; doi:10.1165/rcmb.2009-0140OC.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ.** Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999;284:770-776.
- Bamshad M, Lin RC, Law DJ, Watkins WC, Krakowiak PA, Moore ME, Franceschini P, Lala R, Holmes LB, Gebuhr TC, Bruneau BG, Schinzel A, Seidman JG, Seidman CE, Jorde LB.** Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat Genet.* 1997 Jul;16(3):311-5. Erratum in: *Nat Genet* 1998 May;19(1):102.
- Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Trill TA, Leblanc-Straceski J, Renault B, Kucherlapati R, Seidman JG, Seidman CE.** Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet.* 1997 Jan;15(1):30-5. Erratum in: *Nat Genet* 1997 Apr;15(4):411.
- Beatus P, Lundkvist J, Oberg C, Pedersen K, Lendahl U.** The origin of the ankyrin repeat region in Notch intracellular domains is critical for regulation of HES promoter activity. *Mech.Dev.* 2001;104: 3-20.
- Beckers J, Clark A, Wunsch K, Hrabe De Angelis M, Gossler A.** Expression of the mouse Delta1 gene during organogenesis and fetal development. *Mech Dev.* 1999 Jun;84(1-2):165-8.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W.** Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 1996 Aug 15;382(6592):638-42.
- Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S.** Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 1997 ;90: 281-291.
- Bleeker WK, Mackaay AJC, Masson-Pevet M, Bouman LN, Becker AE.** Functional and morphological organization of the Kaninchen sinus node. *Circ Res.* 1980;46:11-22
- Boineau JP, Schuessler RB, Roeske WR, Autry LJ, Miller CB, Wylds AC.** Quantitative relation between sites of atrial impulse origin and cycle length. *Am J Physiol.* 1983;245:H781-H789
- Bouchey D, Argraves WS, Little CD.** Fibulin-1, vitronectin, and fibronectin expression during avian cardiac valve and septa development. *Anat Rec.* 1996 Apr;244(4):540-51.
- Bouchey D, Drake CJ, Wunsch AM, Little CD.** Distribution of connective tissue proteins during development and neovascularization of the epicardium. *Cardiovasc Res.* 1996 Feb;31 Spec No:E104-15.
- Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M.** Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell.* 1998 Jul 10;94(1):109-18.
- Boyett MR, Honjo H, Kodama I.** The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res.* 2000;47:658-687
- Braybrook C, Doudney K, Marcano AC, Arnason A, Bjornsson A, Patton MA, Goodfellow PJ, Moore GE, Stanier P.** The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Nat Genet.* 2001 Oct;29(2):179-83.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A.** A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol.Cell* 2000;5: 207-216.
- 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 Jul 1;211(1):100-8.
- Burch GH, Bedolli MA, McDonough S, Rosenthal SM, Bristow J.** Embryonic expression of tenascin-X suggests a role in limb, muscle, and heart development. *Dev Dyn.* 1995 Aug;203(4):491-504.
- Bussen, M., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Leitges, M., Gossler, A., Kispert, A.** The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes Dev.* 2004 May 15;18(10):1209-21
- 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;5:877-889
- Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, Yang L, Bu L, Liang X, Zhang X, Stallcup WB, Denton CP, McCulloch A, Chen J, Evans SM.** A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature.* 2008;454:104-108.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA.** The transcription factor snail controls epithelial mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000 Feb;2(2):76-83.
- Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Macias D, Perez-Pomares JM, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R.** Immunolocalization of the transcription factor Slug in the developing avian heart. *Anat Embryol (Berl).* 2000 Feb;201(2):103-9.
- Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Perez-Pomares JM, Munoz-Chapuli R.** Localization of the Wilm's tumour protein WT1 in avian embryos. *Cell Tissue Res.* 2001 Feb;303(2):173-86.

- Carson CT, Kinzler ER, Parr BA.** Tbx12, a novel T-box gene, is expressed during early stages of heart and retinal development. *Mech Dev.* 2000 Aug;96(1):137-40.
- Chan-Thomas PS, Thompson RP, Robert B, Yacoub MH, Barton PJ.** Expression of homeobox genes Msx-1 (Hox-7) and Msx-2 (Hox-8) during cardiac development in the chick. *Dev Dyn.* 1993 Jul;197(3):203-16.
- Chapman DL, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, Cebra-Thomas J, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE.** Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn.* 1996 Aug;206(4):379-90.
- Chieffo C, Garvey N, Gong W, Roe B, Zhang G, Silver L, Emanuel BS, Budarf ML.** Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse Tbx1 gene. *Genomics.* 1997 Aug 1;43(3):267-77.
- Chien KR, Olson EN.** Converging pathways and principles in heart development and disease: CV@CSH. *Cell.* 2002 Jul 26;110(2):153-62. No abstract available.
- Christoffels VM, Grieskamp T, Norden J, Mommersteeg MT, Rudat C, Kispert A.** Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature.* 2009;458:E8-9; discussion E9-10.
- Christoffels VM, Habets PE, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, Bao ZZ, Palmer S, Biben C, Harvey RP, Moorman AF.** Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* 2000 Jul 15;223(2):266-78. Erratum in: *Dev Biol* 2000 Sep 1;225(1):266.
- Christoffels VM, Mommersteeg MT, Trowe MO, Prall OW, de Gier-de Vries C, Soufan AT, Bussen M, Schuster-Gossler K, Harvey RP, Moorman AF, Kispert A.** Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circ Res.* 2006 Jun 23;98(12):1555-63.
- Cole SE, Levorsoe JM, Tilghman SM, Vogt TF.** Clock regulatory elements control cyclic expression of Lunatic fringe during somitogenesis. *Dev.Cell* 2002;3: 75-84.
- Coll M, Seidman JG, Muller CW.** Structure of the DNA-bound T-box domain of human TBX3, a transcription factor responsible for ulnar-mammary syndrome. *Structure.* 2002 Mar;10(3):343-56.
- Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA.** Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 2003;302: 1575-1577.
- Conboy IM, Rando TA.** The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev.Cell* 2002;3: 397-409.
- de Haan RL.** Regional organization of pre-pacemaker cells in the cardiac primordia of the early chick embryo. *J Embryol Exp Morph.* 1963;11:65-76
- de la Pompa JL.** Notch signaling in cardiac development and disease. *Pediatr Cardiol.* 2009;30:643-650.
- de Lange FJ, Moorman AF, Anderson RH, Manner J, Soufan AT, de Gier-de Vries C, Schneider MD, Webb S, van den Hoff MJ, Christoffels VM.** Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. *Circ Res.* 2004 Sep 17;95(6):645-54. Epub 2004 Aug 5.
- de Lange FJ, Moorman AFM, Christoffels VM.** Atrial cardiomyocyte-specific expression of Cre recombinase driven by an Nppa gene fragment. *Genesis.* 2003;37:1-4
- Dettman RW, Denetclaw W Jr, Ordahl CP, Bristow J.** Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol.* 1998 Jan 15;193(2):169-81.
- Dettman RW, Pae SH, Morabito C, Bristow J.** Inhibition of alpha4-integrin stimulates epicardial-mesenchymal transformation and alters migration and cell fate of epicardially derived mesenchyme. *Dev Biol.* 2003 May 15;257(2):315-28.
- Doi H, Iso T, Sato H, Yamazaki M, Matsui H, Tanaka T, Manabe I, Arai M, Nagai R, Kurabayashi M.** Jagged1-selective notch signaling induces smooth muscle differentiation via a RBP-Jkappa-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2006;281:28555-28564.
- Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, Klionkowski B, Berrou E, Mericskay M, Li Z, Tournier-Lasserre E, Gridley T, Joutel A.** Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev.* 2004;18:2730-2735.
- Duarte A, Hirashima M, Benedito R, Trindade A, Diniz P, Bekman E, Costa L, Henrique D, Rossant J.** Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes Dev.* 2004 Oct 15;18(20):2474-8. Epub 2004 Oct 1.
- Dyson E, Sucov HM, Kubalak SW, Schmid-Schonbein GW, DeLano FA, Evans RM, Ross J Jr, Chien KR.** Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid X receptor alpha -/- mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 1;92(16):7386-90.
- Ehebauer M, Hayward P, Arias AM.** Notch, a universal arbiter of cell fate decisions. *Science* 2006;314: 1414-1415.
- Eid H, Larson DM, Springhorn JP, Attawia MA, Nayak RC, Smith TW, Kelly RA.** Role of epicardial mesothelial cells in the modification of phenotype and function of adult rat ventricular myocytes in primary coculture. *Circ Res.* 1992 Jul;71(1):40-50.
- Euler DE, Jones SB, Gunnar WP, Loeb JM, Murdock DK, Randall WC.** Cardiac arrhythmias in the conscious dog after excision of the sinoatrial node and crista terminalis. *Circulation.* 1979;59:468-475
- Fischer, A., Gessler, M.** Hey genes in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc. Med.* 2003 Aug;13: 221-226.
- Fortini ME, Artavanis-Tsakonas S.** The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell.* 1994;79:273-282.
- Fransen ME, Lemanski LF.** Epicardial development in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Anat Rec.* 1990 Feb;226(2):228-36.
- Garcia-Frigola C, Shi Y, Evans SM.** Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development. *Gene Expr Patterns.* 2003;3:777-783

- Ghosh TK, Packham EA, Bonser AJ, Robinson TE, Cross SJ, Brook JD.** Characterization of the TBX5 binding site and analysis of mutations that cause Holt-Oram syndrome. *Hum Mol Genet.* 2001 Sep 1;10(18):1983-94.
- Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Bergwerff M, Mentink MM, Poelmann RE.** Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation. *Circ Res.* 2000 Nov 24;87(11):969-71.
- Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Mentink MM, Gourdie RG, Poelmann RE.** Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res.* 1998 Jun 1;82(10):1043-52.
- Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, et al.** 1995. Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev.* 9:1-14
- Harrelson Z, Kelly RG, Goldin SN, Gibson-Brown JJ, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE.** Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development. *Development.* 2004 Oct;131(20):5041-52.
- Harvey RP.** Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet.* 2002 Jul;3(7):544-56.
- Hatcher CJ, Diman NY, Kim MS, Pennisi D, Song Y, Goldstein MM, Mikawa T, Basson CT.** A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. *Physiol Genomics.* 2004 Jul 8;18(2):129-40.
- Hay ED.** An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel).* 1995;154(1):8-20. Review.
- Hebrok M.** Hedgehog signaling in pancreas development. *Mech Dev.* 2003 Jan;120(1):45-57. Review.
- Herrmann B.G., Labeit S., Poustka A., King T.R., Lehrach H.** (1990). Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature.* 1990 Feb 15;343(6259):617-22
- Hidai H, Bardales R, Goodwin R, Quertermous T, Quertermous EE.** Cloning of capsulin, a basic helix-loop-helix factor expressed in progenitor cells of the pericardium and the coronary arteries. *Mech Dev.* 1998 Apr;73(1):33-43.
- High FA, Lu MM, Pear WS, Loomes KM, Kaestner KH, Epstein JA.** Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:1955-1959.
- Hirakow R.** Epicardial formation in staged human embryos. *Kaibogaku Zasshi.* 1992 Oct;67(5):616-22.
- Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, Verkerk AO, de Lange FJ, Wong LY, Bakker ML, Clout DE, Wakker V, Barnett P, Ravesloot JH, Moorman AF, Verheijck EE, Christoffels VM.** Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev* 2007;21:1098-1112.
- Hoogaars WM, Tessari A, Moorman AF, de Boer PA, Hagoort J, Soufan AT, Campione M, Christoffels VM.** The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res.* 2004 Jun 1;62(3):489-99.
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R.** Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev.* 1996 Sep;59(1):3-10.
- Hurle JM, Kitten GT, Sakai LY, Volpin D, Solursh M.** Elastic extracellular matrix of the embryonic chick heart: an immunohistological study using laser confocal microscopy. *Dev Dyn.* 1994 Aug;200(4):321-32.
- Irisawa H.** Comparative physiology of the cardiac pacemaker mechanism. *Physiol Rev* 1978;58:461-498.
- Iso T, Kedes L, Hamamori Y.** HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2003;194:237-255.
- Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A.** Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 1995 ;377: 355-358.
- Jenkins SJ, Hutson DR, Kubalak SW.** Analysis of the proepicardium-epicardium transition during the malformation of the RXRalpha-/- epicardium. *Dev Dyn.* 2005 Jul;233(3):1091-101.
- Jerome LA, Papaioannou VE.** DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet.* 2001 Mar;27(3):286-91.
- Jin S, Hansson EM, Tikka S, Lanner F, Sahlgren C, Farnebo F, Baumann M, Kalimo H, Lendahl U.** Notch signaling regulates platelet-derived growth factor receptor-beta expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2008;102:1483-1491.
- Jouve C, Palmeirim I, Henrique D, Beckers J, Gossler A, Ish-Horowicz D, Pourquie O.** Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development* 2000;127: 1421-1429.
- Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T.** The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* 2007;134: 1243-1251.
- Kalman F, Viragh S, Modis L.** Cell surface glycoconjugates and the extracellular matrix of the developing mouse embryo epicardium. *Anat Embryol (Berl).* 1995 May;191(5):451-64.
- Kalman JM, Lee RJ, Fisher WG, Chin MC, Ursell P, Stillson CA, Lesh MD, Scheinman MM.** Radiofrequency catheter modification of sinus pacemaker function guided by intracardiac echocardiography. *Circulation.* 1995;92:3070-3081
- Karsan A.** Notch and integrin affinity: a sticky situation. *Sci Signal.* 2008;1:pe2.
- Kastner P, Messaddeq N, Mark M, Wendling O, Grondona JM, Ward S, Ghyselinck N, Chambon P.** Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. *Development.* 1997 Dec;124(23):4749-58.

- Katoh, M. and Katoh, M.** Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. *International journal of oncology* 2007;31(2): 461-466.
- Kiefer JC.** The Tbx-files: the truth is out there. *Dev Dyn.* 2004 Sep;231(1):232-6.
- Kim H, Yoon CS, Kim H, Rah B.** Expression of extracellular matrix components fibronectin and laminin in the human fetal heart. *Cell Struct Funct.* 1999 Feb;24(1):19-26.
- Kispert A, Herrmann BG.** The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J.* 1993 Aug;12(8):3211-20. Erratum in: *EMBO J.* 1993 Dec;12(12):4898-9.
- Kispert A, Koschorz B, Herrmann BG.** The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J.* 1995 Oct 2;14(19):4763-72.
- Kohler C, Bell AW, Bowen WC, Monga SP, Fleig W, Michalopoulos GK.** Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* 2004;39: 1056-1065.
- Komiyama M, Ito K, Shimada Y.** Origin and development of the epicardium in the mouse embryo. *Anat Embryol (Berl).* 1987;176(2):183-9.
- Kopan R, Ilagan MX.** The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009;137:216-233.
- Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS.** Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93: 1683-1688.
- Kopan R.** Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci.* 2002;115:1095-1097.
- Kraus F, Haenig B, Kispert A.** Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *tbx20*. *Mech Dev.* 2001 Jan;100(1):87-91.
- Kraus F, Haenig B, Kispert A.** Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *Tbx18*. *Mech Dev.* 2001 Jan;100(1):83-6.
- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R.** WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* 1993 Aug 27;74(4):679-91.
- Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT.** The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 2000 Jul;16(7):279-83. Review.
- Kuhn HJ, Lieberr G.** The early development of the epicardium in *Tupaia belangeri*. *Anat Embryol (Berl).* 1988;177(3):225-34.
- Kurpinski K, Lam H, Chu J, Wang A, Kim A, Tsay E, Agrawal S, Schaffer DV, Li S.** Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells.* 2010;28:734-742.
- Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck C, et al.** 1995. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* 121:489-503
- Lai EC.** Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep.* 2002;3: 840-845.
- Lamas GA, Lee KL, Sweeney MO, Silverman R, Leon A, Yee R, Marinchak RA, Flaker G, Schron E, Orav EJ, Hellkamp AS, Greer S, McAnulty J, Ellenbogen K, Ehlert F, Freedman RA, Estes NA, III, Greenspon A, Goldman L.** Ventricular pacing or dual-chamber pacing for sinus-node dysfunction. *N Engl J Med.* 2002;346:1854-1862
- Landerholm TE, Dong XR, Lu J, Belaguli NS, Schwartz RJ, Majesky MW.** A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells. *Development.* 1999 May;126(10):2053-62.
- Langlois D, Hneino M, Bouazza L, Parlakian A, Sasaki T, Bricca G, Li JY.** Conditional inactivation of TGF-beta type II receptor in smooth muscle cells and epicardium causes lethal aortic and cardiac defects. *Transgenic Res.* 2010;19:1069-1068.
- Lavine KJ, Long F, Choi K, Smith C, Ornitz DM.** Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development. *Development.* 2008;135:3161-3171.
- Lavine KJ, Yu K, White AC, Zhang X, Smith C, Partanen J, Ornitz DM.** Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev Cell.* 2005 Jan;8(1):85-95.
- Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, Holdway JE, Roberts RW, Burns CG, Poss KD.** A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell.* 2006 Nov 3;127(3):607-19.
- Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T, Bonnet D, Lyonnet S, Young ID, Raeburn JA, Buckler AJ, Law DJ, Brook JD.** Holt-Oram syndrome is caused by mutations in *TBX5*, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet.* 1997 Jan;15(1):21-9.
- Li Y, Takeshita K, Liu PY, Satoh M, Oyama N, Mukai Y, Chin MT, Krebs L, Kotlikoff MI, Radtke F, Gridley T, Liao JK.** Smooth muscle Notch1 mediates neointimal formation after vascular injury. *Circulation.* 2009;119:2686-2692.
- Liberatore CM, Searcy-Schrick RD, Yutzey KE.** Ventricular expression of *tbx5* inhibits normal heart chamber development. *Dev Biol.* 2000 Jul 1;223(1):169-80.
- Lingbeek ME, Jacobs JJ, van Lohuizen M.** The T-box repressors *TBX2* and *TBX3* specifically regulate the tumor suppressor gene *p14ARF* via a variant T-site in the initiator. *J Biol Chem.* 2002 Jul 19;277(29):26120-7. Epub 2002 May 8.
- Liu H, Kennard S, Lilly B.** NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed *JAGGED1*. *Circ Res.* 2009;104:466-475.

- Liu J, Dobrzynski H, Yanni J, Boyett MR, Lei M.** Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res.* 2007;73:729-738
- Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israel A.** The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95: 8108-8112.
- Loomes KM, Taichman DB, Glover CL, Williams PT, Markowitz JE, Piccoli DA, Baldwin HS, Oakey RJ.** Characterization of Notch receptor expression in the developing mammalian heart and liver. *Am J Med Genet.* 2002 Oct 1;112(2):181-9.
- Lu J, Richardson JA, Olson EN.** Capsulin: a novel bHLH transcription factor expressed in epicardial progenitors and mesenchyme of visceral organs. *Mech Dev.* 1998 Apr;73(1):23-32.
- Lu XG, Azhar G, Liu L, Tsou H, Wei JY.** SRF binding to SRE in the rat heart: influence of age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1998 Jan;53(1):B3-10.
- Macias D, Perez-Pomares JM, Garcia-Garrido L, Carmona R, Munoz-Chapuli R.** Immunoreactivity of the ets-1 transcription factor correlates with areas of epithelial-mesenchymal transition in the developing avian heart. *Anat Embryol (Berl).* 1998 Oct;198(4):307-15.
- Maier MM, Gessler M.** Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2000;275: 652-660.
- Major RJ, Poss KD.** Zebrafish Heart Regeneration as a Model for Cardiac Tissue Repair. *Drug Discov Today Dis Models.* 2007;4(4):219-225.
- Männer J, Perez-Pomares JM, Macias D, Munoz-Chapuli R.** The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(2):89-103. Review.
- Männer J, Schlueter J, Brand T.** Experimental analyses of the function of the proepicardium using a new microsurgical procedure to induce loss-of proepicardial-function in chick embryos. *Dev Dyn.* 2005 Aug;233(4):1454-63.
- Männer J.** Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. *Anat Rec.* 1999 Jun 1;255(2):212-26.
- Männer J.** Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos. *Anat Embryol (Berl).* 1993 Mar;187(3):281-9.
- Männer J.** The development of pericardial villi in the chick embryo. *Anat Embryol (Berl).* 1992 Sep;186(4):379-85.
- Martinez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V, Hall E, Reichmann J, Devenney PS, Hohenstein P, Hosen N, Hill RE, Muñoz-Chapuli R, Hastie ND.** Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet.* 2010 Jan;42(1):89-93.
- Martin-Garrido A, Brown DI, Lyle AN, Dikalova A, Seidel-Rogol B, Lassègue B, Martin AS, Griendling KK.** NADPH oxidase 4 mediates TGF- β -induced smooth muscle α -actin via p38MAPK and serum response factor. *Free Radic Biol Med.* 2010 Nov 11
- Mellgren AM, Smith CL, Olsen GS, Eskicak B, Zhou B, Kazi MN, Ruiz FR, Pu WT, Tallquist MD.** Platelet-derived growth factor receptor beta signaling is required for efficient epicardial cell migration and development of two distinct coronary vascular smooth muscle cell populations. *Circ Res.* 2008;103:1393-1401.
- Mikawa T, Gourdie RG.** Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol.* 1996;174:221-232.
- Milanesi R, Baruscotti M, Gneocchi-Ruscione T, DiFrancesco D.** Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med.* 2006;354:151-157
- Mohr, O.L.** Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics* 1919;4(3): 275- 282.
- Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, de Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE, Papaioannou VE, Brown NA, Harvey RP, Moorman AF, Christoffels VM.** Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res* 2007;100:354–362.
- Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A.** YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development.* 1999 May;126(9):1845-57.
- Morabito CJ, Dettman RW, Kattan J, Collier JM, Bristow J.** Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transformation during avian heart development. *Dev Biol.* 2001 Jun 1;234(1):204-15.
- Morgan SM, Samulowitz U, Darley L, Simmons DL, Vestweber D.** Biochemical characterization and molecular cloning of a novel endothelial-specific sialomucin. *Blood.* 1999;93:165-175.
- Morita T, Shinozawa T, Nakamura M, Awaya A, Sato N, Ishiwata I, Kami K.** Expressions of a 68kDa-glycoprotein (GP68) and laminin in the mesodermal tissue of the developing mouse embryo. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 1998 Oct;75(4):185-95.
- Morrow D, Guha S, Sweeney C, Birney Y, Walshe T, O'Brien C, Walls D, Redmond EM, Cahill PA.** Notch and vascular smooth muscle cell phenotype. *Circ Res.* 2008;103:1370-1382.
- Müller CW, Herrmann BG.** Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *Nature.* 1997 Oct 23;389(6653):884-8.
- Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R.** A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol.Cell* 2000;5: 197-206.
- Munoz-Chapuli R, Gallego A, Perez-Pomares JM.** A Reaction-Diffusion Model can Account for the Anatomical Pattern of the Cardiac Conal Valves in Fish *J Theor Biol.* 1997 Mar 21;185(2):233-40.

- Munoz-Chapuli R, Macias D, Gonzalez-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Perez-Pomares JM.** [The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development.] *Rev Esp Cardiol.* 2002 Oct;55(10):1070-82. Review. Spanish.
- Munoz-Chapuli R, Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M.** The epicardium as a source of mesenchyme for the developing heart. *Ital J Anat Embryol.* 2001;106(2 Suppl 1):187-96.
- Murtaugh LC, Stanger BZ, Kwan KM, Melton DA.** Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:14920-14925.
- Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L.** A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis.* 2007;45:593-605.
- Nakajima Y, Yamagishi T, Hokari S, Nakamura H.** Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). *Anat Rec.* 2000 Feb 1;258(2):119-27. Review.
- Nakajima Y, Yamagishi T, Nakamura H, Markwald RR, Krug EL.** An autocrine function for transforming growth factor (TGF)-beta3 in the transformation of atrioventricular canal endocardium into mesenchyme during chick heart development. *Dev Biol.* 1998 Feb 1;194(1):99-113.
- Nakamura K, Chiba C.** Evidence for Notch signaling involvement in retinal regeneration of adult newt. *Brain Res.* 2007;1136: 28-42.
- Narita N, Bielinska M, Wilson DB.** Cardiomyocyte differentiation by GATA-4-deficient embryonic stem cells. *Development.* 1997 Oct;124(19):3755-64.
- Nichols JT, Miyamoto A, Olsen SL, D'Souza B, Yao C, Weinmaster G.** DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J Cell Biol.* 2007;176: 445-458.
- Norden J, Grieskamp T, Lausch E, van Wijk B, van den Hoff MJ, Englert C, Petry M, Mommersteeg MT, Christoffels VM, Niederreither K, Kispert A.** Wt1 and retinoic acid signaling in the subcoelomic mesenchyme control the development of the pleuropericardial membranes and the sinus horns. *Circ Res.* 2010 Apr 16;106(7):1212-20.
- Noseda M, Fu Y, Niessen K, Wong F, Chang L, McLean G, Karsan A.** Smooth Muscle alpha-actin is a direct target of Notch/CSL. *Circ Res.* 2006;98:1468-1470.
- Oka C, Nakano T, Wakeham A, de la Pompa JL, Mori C, Sakai T, Okazaki S, Kawaichi M, Shiota K, Mak TW, Honjo T.** Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development.* 1995;121:3291-3301.
- Olivey HE, Svensson EC.** Epicardial-myocardial signaling directing coronary vasculogenesis. *Circ Res.* 2010;106:818-832.
- Op 't Hof T.** The mammalian sinoatrial node. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1988;573-598
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR.** Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):767-801. Review.
- Papaoannou VE.** T-box genes in development: from hydra to humans. *Int Rev Cytol.* 2001;207:1-70. Review.
- Papaoannou VE.** The ascendancy of developmental genetics, or how the T complex educated a generation of developmental biologists. *Genetics.* 1999 Feb;151(2):421-5. No abstract available.
- Pennisi DJ, Rentschler S, Gourdie RG, Fishman GI, Mikawa T.** Induction and patterning of the cardiac conduction system. *Int J Dev Biol.* 2002;46:765-775
- Perez-Pomares JM, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Atencia G, Wessels A, Munoz-Chapuli R.** Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol.* 2002 Dec;46(8):1005-13.
- Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R.** Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Dev Dyn.* 1997 Oct;210(2):96-105.
- Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R.** Immunolocalization of the vascular endothelial growth factor receptor-2 in the subepicardial mesenchyme of hamster embryos: identification of the coronary vessel precursors. *Histochem J.* 1998 Sep;30(9):627-34.
- Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R.** The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo: an immunohistochemical and quail-chick chimera study. *Dev Biol.* 1998 Aug 1;200(1):57-68.
- Perez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Munoz-Chapuli R, Wessels A.** Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). *Dev Biol.* 2002 Jul 15;247(2):307-26.
- Pinco KA, Liu S, Yang JT.** alpha4 integrin is expressed in a subset of cranial neural crest cells and in epicardial progenitor cells during early mouse development. *Mech Dev.* 2001 Jan;100(1):99-103.
- Quaggin SE, Schwartz L, Cui S, Igarashi P, Deimling J, Post M, Rossant J.** The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development.* 1999 Dec;126(24):5771-83.
- Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, Krasnow MA.** Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature.* 2010;464:549-553.
- Robb L, Mifsud L, Hartley L, Biben C, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Harvey RP.** epicardin: A novel basic helix-loop-helix transcription factor gene expressed in epicardium, branchial arch myoblasts, and mesenchyme of developing lung, gut, kidney, and gonads. *Dev Dyn.* 1998 Sep;213(1):105-13.
- Romano LA, Runyan RB.** Slug is a mediator of epithelial-mesenchymal cell transformation in the developing chicken heart. *Dev Biol.* 1999 Aug 1;212(1):243-54.
- Romano LA, Runyan RB.** Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. *Dev Biol.* 2000 Jul 1;223(1):91-102.

- Rosenquist, G. C. and DeHaan, R. L.** (1966). In *Contributions to Embryology*, Vol. 38, pp. 111-121. Washington DC: Carnegie Institution of Washington.
- Savagner P, Yamada KM, Thiery JP.** The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 1997 Jun 16;137(6):1403-19.
- Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R.** Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 1998;393: 382-386.
- Sengbusch JK, He W, Pinco KA, Yang JT.** Dual functions of [alpha]4[beta]1 integrin in epicardial development: initial migration and long-term attachment. *J Cell Biol.* 2002 May 27;157(5):873-82. Epub 2002 May 20.
- Showell C, Binder O, Conlon FL.** T-box genes in early embryogenesis. *Dev Dyn.* 2004 Jan;229(1):201-18. Review.
- Singh MK, Christoffels VM, Dias JM, Trowe MO, Petry M, Schuster-Gossler K, Burger A, Ericson J, Kispert A.** Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2. *Development.* 2005 Jun;132(12):2697-707. Epub 2005 May 18.
- Singh R, Horsthuis T, Farin HF, Grieskamp T, Norden J, Petry M, Wakker V, Moorman AF, Christoffels VM, Kispert A.** Tbx20 interacts with smads to confine tbx2 expression to the atrioventricular canal. *Circ Res.* 2009 Aug 28;105(5):442-52.
- Sinha S, Abraham S, Gronostajski RM, Campbell CE.** Differential DNA binding and transcription modulation by three T-box proteins, T, TBX1 and TBX2. *Gene.* 2000 Nov 27;258(1-2):15-29.
- Sorensen I, Adams RH, Gossler A.** DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. *Blood.* 2009;113:5680-5688.
- Soriano P.** Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* 1999;21:70-71
- Sridurongrit S, Larsson J, Schwartz R, Ruiz-Lozano P, Kaartinen V.** Signaling via the Tgf-beta type I receptor Alk5 in heart development. *Dev Biol.* 2008;322:208-218.
- Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A.** The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:15235-15240
- Stottmann RW, Choi M, Mishina Y, Meyers EN, Klingensmith J.** BMP receptor IA is required in mammalian neural crest cells for development of the cardiac outflow tract and ventricular myocardium. *Development.* 2004 May;131(9):2205-18. Epub 2004 Apr 8.
- Struhl G, Adachi A.** Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* 1998; 93: 649-660.
- Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM.** RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev.* 1994 May 1;8(9):1007-18.
- Sun Y, Liang X, Najafi N, Cass M, Lin L, Cai C, Chen J, Evans S.** Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev Biol.* 2007;304:286-296
- Swift MR, Weinstein BM.** Arterial-venous specification during development. *Circ Res.* 2009;104:576-588.
- Taber LA, Lin IE, Clark EB.** 1995. Mechanics of cardiac looping. *Dev. Dyn.* 203:42-50
- Takahashi Y, Koizumi K, Takagi A, Kitajima S, Inoue T, Koseki H, Saga Y.** Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway. *Nat.Genet.* 2000;25: 390-396.
- Tang Y, Urs S, Boucher J, Bernaiche T, Venkatesh D, Spicer DB, Vary CP, Liaw L.** Notch and transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling pathways cooperatively regulate vascular smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem.* 2010;285:17556-17563.
- Tanigaki K, Han H, Yamamoto N, Tashiro K, Ikegawa M, Kuroda K, Suzuki A, Nakano T, Honjo T.** Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol.* 2002;3:443-450.
- Technau U, Bode HR.** HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in Hydra. *Development.* 1999 Feb;126(5):999-1010.
- Tevosian SG, Deconinck AE, Tanaka M, Schinke M, Litovsky SH, Izumo S, Fujiwara Y, Orkin SH.** FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell.* 2000 Jun 23;101(7):729-39.
- Tidball JG.** Distribution of collagens and fibronectin in the subepicardium during avian cardiac development. *Anat Embryol (Berl).* 1992;185(2):155-62.
- Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J, Aranda S, Palomo S, McCormick F, Izpisua-Belmonte JC, de la Pompa JL.** Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* 2004 Jan 1;18(1):99-115. Epub 2003 Dec 30.
- Tokuyasu KT.** 1990. Co-development of embryonic myocardium and myocardial circulation. In *Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function*, ed. EB Clark, A Takao, pp. 205-18. Mt. Kisco, NY: Futura
- Tomanek RJ, Lotun K, Clark EB, Suvarna PR, Hu N.** VEGF and bFGF stimulate myocardial vascularization in embryonic chick. *Am J Physiol.* 1998 May;274(5 Pt 2):H1620-6.
- Tomanek RJ, Ratajska A, Kitten GT, Yue X, Sandra A.** Vascular endothelial growth factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Dyn.* 1999 May;215(1):54-61.
- Tomanek RJ, Sandra A, Zheng W, Brock T, Bjercke RJ, Holifield JS.** Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor differentially modulate early postnatal coronary angiogenesis. *Circ Res.* 2001 Jun 8;88(11):1135-41.

- Trowe MO, Maier H, Schweizer M, Kispert A.** Deafness in mice lacking the T-box transcription factor Tbx18 in otic fibrocytes. *Development*. 2008 May;135(9):1725-34.
- Trowe MO, Shah S, Petry M, Airik R, Schuster-Gossler K, Kist R, Kispert A.** Loss of Sox9 in the periotic mesenchyme affects mesenchymal expansion and differentiation, and epithelial morphogenesis during cochlea development in the mouse. *Dev Biol*. 2010;342:51-62.
- Tsuda T, Majumder K, Linask KK.** Differential expression of flectin in the extracellular matrix and left-right asymmetry in mouse embryonic heart during looping stages. *Dev Genet*. 1998;23(3):203-14.
- van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H.** Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell*. 1997 Mar 21;88(6):789-99.
- Van den Eijnde SM, Wenink AC, Vermeij-Keers C.** Origin of subepicardial cells in rat embryos. *Anat Rec*. 1995 May;242(1):96-102.
- van Mierop LHS, Gessner IH.** The morphologic development of the sinoatrial node in the mouse. *Am J Cardiol*. 1970;25:204-212
- van Mierop LHS.** Localization of pacemaker in chick embryo heart at the time of initiation of heartbeat. *Am J Physiol*. 1967;212:407-415
- Verheijck EE, van Kempen MJ, Veereschild M, Lurvink J, Jongma HJ, Bouman LN.** Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc Res*. 2001;52:40-50
- Viragh S, Challice CE.** The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec*. 1981 Sep;201(1):157-68.
- Viragh S, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Kalman F.** Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat Embryol (Berl)*. 1993 Oct;188(4):381-93.
- Virágh Sz, Challice CE.** The development of the conduction system in the mouse embryo heart. III. The development of sinus muscle and sinoatrial node. *Dev Biol*. 1980;80:28-45
- Vlemminckx K, Kemler R, Hecht A.** The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/beta catenin complex in *Xenopus laevis*. *Mech Dev*. 1999 Mar;81(1-2):65-74.
- Vrancken Peeters MP, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, Hungerford JE, Little CD, Poelmann RE.** The development of the coronary vessels and their differentiation into arteries and veins in the embryonic quail heart. *Dev Dyn*. 1997 Mar;208(3):338-48.
- Vrancken Peeters MP, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, Poelmann RE.** Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium. *Anat Embryol (Berl)*. 1999 Apr;199(4):367-78.
- Vrancken Peeters MP, Mentink MM, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC.** Cytokeratins as a marker for epicardial formation in the quail embryo. *Anat Embryol (Berl)*. 1995 Jun;191(6):503-8.
- Wagner N, Wagner KD, Theres H, Englert C, Schedl A, Scholz H.** Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev*. 2005 Nov 1;19(21):2631-42.
- Wang Q, Lan Y, Cho ES, Maltby KM, Jiang R.** Odd-skipped related 1 (Odd1) is an essential regulator of heart and urogenital development. *Dev Biol*. 2005;288:582-594
- Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A.** The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem*. 1993 Jan 15;211(1-2):7-18. Review. Erratum in: *Eur J Biochem* 1993 Aug 1;215(3):907.
- Watt AJ, Battle MA, Li J, Duncan SA.** GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 24;101(34):12573-8. Epub 2004 Aug 13.
- Wessels A, Perez-Pomares JM.** The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004 Jan;276(1):43-57. Review.
- Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S.** Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 1985;43(3 Pt 2): 567- 581.
- Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG.** Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature*. 1990 Feb 15;343(6259):657-9.
- Wilson A, Radtke F.** Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer. *FEBS Lett*. 2006;580: 2860-2868.
- Wilting J, Buttler K, Schulte I, Papoutsis M, Schweigerer L, Manner J.** The proepicardium delivers hemangioblasts but not lymphangioblasts to the developing heart. *Dev Biol*. 2007;305:451-459.
- Wu J, Iwata F, Grass JA, Osborne CS, Elnitski L, Fraser P, Ohneda O, Yamamoto M, Bresnick EH.** Molecular determinants of NOTCH4 transcription in vascular endothelium. *Mol Cell Biol*. 2005 Feb;25(4):1458-74.
- Xavier-Neto J, Shapiro MD, Houghton L, Rosenthal N.** Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart. *Dev Biol*. 2000 Mar 1;219(1):129-41.
- Yamamoto M, Dobrzynski H, Tellez J, Niwa R, Billeter R, Honjo H, Kodama I, Boyett MR.** Extended atrial conduction system characterised by the expression of the HCN4 channel and connexin45. *Cardiovasc Res*. 2006;72:271-281
- Yang JT, Rayburn H, Hynes RO.** 1995. Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 121:549-60
- Yang K, Doughman YQ, Karunamuni G, Gu S, Yang YC, Bader DM, Watanabe M.** Expression of active Notch1 in avian coronary development. *Dev Dyn*. 2009;238:162-170.

Yi CH, Terrett JA, Li QY, Ellington K, Packham EA, Armstrong-Buisseret L, McClure P, Slingsby T, Brook JD. Identification, mapping, and phylogenomic analysis of four new human members of the T-box gene family: EOMES, TBX6, TBX18, and TBX19. *Genomics*. 1999 Jan 1;55(1):10-20.

Zamora M, Manner J, Ruiz-Lozano P. Epicardium-derived progenitor cells require beta-catenin for coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:18109- 18114.

Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, Jiang D, von Gise A, Ikeda S, Chien KR, Pu WT. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*. 2008;454:109-113.

6. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Grieskamp
Geburtsdatum: 23.05.1980
Geburtsort: Ahlen (Westf.)
Familienstand: ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Kirsten Grieskamp, geb. Reddig und Theodor Grieskamp
Konfession: röm. Katholisch

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule St. Marien	Ahlen (Westf.)
1990 – 1999	Bischöfliches Gymnasium St. Michael Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife	Ahlen (Westf.)

Hochschulstudium

1999 – 2006	Biochemie	Universität Hannover
	Diplom: 16.01.2006	
	Prüfungsfächer: Biochemie, Organische Chemie, Zell- und Entwicklungsbiologie	
	Diplomarbeit: „Funktionelle Analyse von <i>Tbx18</i> in der Entwicklung des Epikards der Maus“	
2006 – heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover im Labor von Prof. Dr. Andreas Kispert im Rahmen meiner Dissertation	

7. Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Analyse genetischer Programme in der Entwicklung von Epikard und sinoatrialem Knoten am venösen Pol des Herzens“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben werden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den

(Thomas Grieskamp)

8. Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- 1: **Grieskamp T**, Rudat C, Lüdtko THW., Norden J, Kispert A.
Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium derived cells.
Circ Res. 2011 Jan 20. [Epub ahead of print]
- 2: Norden J, **Grieskamp T**, Lausch E, van Wijk B, van den Hoff MJ, Englert C, Petry M, Mommersteeg MT, Christoffels VM, Niederreither K, Kispert A.
Wt1 and retinoic acid signaling in the subcoelomic mesenchyme control the development of the pleuropericardial membranes and the sinus horns. **Circ Res.** 2010 Apr 16; 106(7):1212-20.
- 3: Singh R*, Horsthuis T*, Farin HF, **Grieskamp T**, Norden J, Petry M, Wakker V, Moorman AF, Christoffels VM, Kispert A.
Tbx20 interacts with smads to confine tbx2 expression to the atrioventricular canal. **Circ Res.** 2009 Aug 28;105(5):442-52, *contributed equally to this work
- 4: Christoffels VM, **Grieskamp T**, Norden J, Mommersteeg MT, Rudat C, Kispert A.
Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. **Nature.** 2009 Apr 16;458(7240)
- 5: Wiese C*, **Grieskamp T***, Airik R, Mommersteeg MT, Gardiwal A, de Gier-de Vries C, Schuster-Gossler K, Moorman AF, Kispert A, Christoffels VM.
Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. **Circ Res.** 2009 Feb 13;104(3):388-97, *contributed equally to this work
- 6: Kobayashi K*, Luo M*, Zhang Y*, Wilkes DC, Ge G, **Grieskamp T**, Yamada C, Liu TC, Huang G, Basson CT, Kispert A, Greenspan DS, Sato TN.
Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. **Nat Cell Biol.** 2009 Jan; 11(1):46-55, *contributed equally to this work

9. Anhang

	Durschnitt ± SA		P-Wert verglichen mit wt		P-Wert vergl. mit wt + TGFB1	
	Tagln	Acta2	Tagln	Acta2	Tagln	Acta2
wt	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.46				
wt + TGFB1	1.60 ± 0.23	3.01 ± 0.99	0,0004	0,0011	nicht bestimmt	
wt + SB431542	0.38 ± 0.23	1.03 ± 0.16	0,0126	0,9231	0,0014	0,0377
wt + TGFB1 + SB431542	0.99 ± 0.26	1.44 ± 0.49	0,9307	0,2932	0,0190	0,0836
wt + PDGF-BB	1.04 ± 0.24	1.00 ± 0.23	0,7130	0,9939	nicht bestimmt	
wt + TGFB1 + PDGF-BB	0.85 ± 0.29	1.47 ± 0.54	0,2764	0,1036	nicht bestimmt	
NICD	2.18 ± 0.49	2.73 ± 0.63	0,0010	0,0049	P-Wert verglichen mit NICD	
NICD + TGFB1	1.69 ± 0.08	2.81 ± 0.96	0,0005	0,0036	0,1792	0,9293
NICD + SB431542	0.72 ± 0.47	1.26 ± 0.47	0,2028	0,4115	0,0437	0,0385
NICD + PDGFBB	0.85 ± 0.25	0.63 ± 0.18	0,2490	0,1216	0,0038	0,0385
NICD + TGFB1 + PDGF-BB	1.05 ± 0.54	1.44 ± 0.67	0,8328	0,3219	0,1595	0,1856
Rbpj mut	1.01 ± 0.55	0.56 ± 0.14	0,9701	0,1555	P-value verglichen mit Rbpj mut	
Rbpj mut + TGFB1	1.32 ± 0.47	0.75 ± 0.18	0,3593	0,4018	0,6997	0,2263
Rbpj mut + PDGFBB	0.69 ± 0.12	1.12 ± 0.37	0,0455	0,7527	0,6806	0,0837
Rbpj mut + TGFB1 + PDGF-	0.96 ± 0.20	0.99 ± 0.29	0,7792	0,9785	0,9453	0,1030
	Durchschnitt ± SA			P-Wert verglichen mit wt		
	Tgfb1	Tgfb2	Tgfb3	Tgfb1	Tgfb2	Tgfb3
wt	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.52	-	-	-
wt + TGFB1	1.72 ± 0.53	1.68 ± 1.11	3.76 ± 1.48	0,1817	0,0190	0,0090
NICD	4.25 ± 0.61	16.89 ± 5.53	23.03 ± 4.95	0,0367	0,0199	0,0179
NICD + SB431542	1.11 ± 0.46	4.13 ± 2.28	6.75 ± 4.75	0,7454	0,0282	0,0539
Rbpj mut	1.14 ± 0.08	0.91 ± 0.38	0.83 ± 0.53	0,4106	0,8439	0,6765
Rbpj mut + TGFB1	1.55 ± 0.45	0.94 ± 0.73	2.19 ± 0.27	0,0790	0,9511	0,3894
	P-Wert verglichen mit NICD			P-Wert verglichen mit Rbpj mut		
	Tgfb1	Tgfb2	Tgfb3	Tgfb1	Tgfb2	Tgfb3
wt		nicht bestimmt			nicht bestimmt	
wt + TGFB1		nicht bestimmt			nicht bestimmt	
NICD		nicht bestimmt			nicht bestimmt	
NICD + SB431542	0,0045	0,0053	0,0115		nicht bestimmt	
Rbpj mut		nicht bestimmt			nicht bestimmt	
Rbpj mut + TGFB1		nicht bestimmt		0,0440	0,9681	0,2181

Anhang I: Die Tabelle enthält Durchschnittswerte und Standard Abweichungen (SA) sowie bestimmte P-Werte für Fig. 4.7/8. Werte beziehen sich jeweils auf beschriebene Graphen. Statistische Signifikanz wird angenommen bei P-Werten unter 0,05. Signifikante Änderungen sind fett gedruckt.