

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Regulation des kardiovaskulogenen Schlüsselfaktors *mesP1*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
VERONICA BARBARA JARSCH
aus München

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Andreas Schober Prof. Dr. Calin Vico Prof Dr. Ulrich Pohl Prof. Dr. Claudia Veigel
Betreuung durch den habilitierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. rer. nat. Robert David
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	26.06.2014

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	11
1.1	Entstehung und Bedeutung der terminalen Herzinsuffizienz	11
1.1.1	Das kardiovaskuläre Kontinuum	11
1.2	Therapie der terminalen Herzinsuffizienz	12
1.3	Eigenschaften Embryonaler Stammzellen	17
1.3.1	Embryonale Stammzellen der Maus und des Menschen – Gewinnung und Kultivierung.....	18
1.3.1.1	Murine embryonale Stammzellen	18
1.3.1.2	Humane embryonale Stammzellen.....	20
1.3.2	Ethische und rechtliche Aspekte.....	21
1.4	Embryonale Stammzellen in Forschung und Medizin	23
1.4.1	Zelltherapeutischer Einsatz embryonaler Stammzellen in der Kardiologie	24
1.4.2	Das Potenzial adulter Stammzellen, parthenogenetische Stammzellen und iPS-Zellen	25
1.5	Herzentwicklung im Embryo	28
1.5.1	Allgemeine Embryonalentwicklung	28
1.5.2	Faktoren und Signalwege der molekularen Herzentwicklung	32
1.5.3	Der Transkriptionsfaktor MesP1	32
1.5.4	Expressionsmuster und Funktion von <i>mesP1</i> während der Embryonalentwicklung	33
1.5.5	Regulation des frühen kardialen Transkriptionsfaktors <i>mesoderm posterior 1</i> (<i>mesP1</i>)	35
1.5.6	Der Transkriptionsfaktor Brachyury(T).....	36
1.5.6.1	Charakterisierung des humanen Brachyury(T)-Gens und –Proteins	39
1.5.7	Der Transkriptionsfaktors Eomesodermin.....	39
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	41

2	Material und Methoden	43
2.1	Material	43
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	43
2.1.2	Synthetische Proteine	45
2.1.3	Enzyme	46
2.1.4	Antikörper.....	46
2.1.5	Kits.....	46
2.1.6	Laborgeräte und sonstige Materialien	47
2.1.7	Biologisches Material	50
2.1.7.1	Zellen	50
2.1.7.2	Bakterien.....	50
2.1.8	Vektoren.....	50
2.1.8.1	Expressionsvektor pIRES2-EGFP	50
2.1.8.2	pCMV-Sport6-Vektor	51
2.1.8.3	Konstrukte für den Dual Luciferase Reporter-Assay	52
2.1.8.4	pMesP1- Δ CD4 und pMesP1-EGFP.....	54
2.1.8.5	Kontroll-Vektor pCMV-dsRed	55
2.1.8.6	<i>Sh-knock down</i> -Konstrukte.....	55
2.1.9	Oligonukleotide	56
2.1.10	Primer	56
2.2	Methoden.....	57
2.2.1	Statistische Methoden	57
2.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	57
2.2.2.1	Bakterienkultivierung	57
2.2.2.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	57
2.2.3	Techniken der Nukleinsäureisolierung und-analytik.....	58
2.2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	58
2.2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	58

2.2.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus embryonalen Stammzellen.....	59
2.2.3.4	cDNA-Synthese durch reverse Transkription	59
2.2.3.5	Quantitative RT-PCR.....	60
2.2.4	Reporter-Assay	60
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden	61
2.2.5.1	Gesamtproteinextraktion und Proteinbestimmung	63
2.2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	63
2.2.5.3	Westernblot-Analyse	64
2.2.6	Bandshift-Assay	65
2.2.7	Zellkulturmethoden.....	65
2.2.7.1	Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen.....	65
2.2.7.2	Anzucht von <i>feeder</i> -Zellen.....	67
2.2.7.3	Konservierung von murinen embryonalen Stammzellen und Mäusefibroblasten	68
2.2.7.4	Stabile Transfektion von murinen embryonalen Stammzellen mit TransIT-LT1 Transfektions-Reagenz..	69
2.2.7.5	Selektion von stabil transfizierten embryonalen Stammzellklonen	70
2.2.7.6	Transiente Transfektion von murinen embryonalen ES-Zellen mit TransIT-LT1 Transfektions-Reagenz.....	70
2.2.7.7	Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen	71
2.2.7.8	Gewinnung von Zellmaterial für Zeitreihen	72
2.2.8	<i>Knock down</i> von Genen mittels <i>short hair pin</i> -RNA	72
2.2.9	<i>In-situ</i> Hybridisierung.....	73
3	Ergebnisse.....	74
3.1	Generierung von Vektoren zur Brachyury(T)- bzw. Eomesodermin-Überexpression in embryonalen Stammzellen	74
3.2	Generierung stabil transfizierter ES-Zellklone	77

3.3	Nachweis der Expression der trans-fizierten Plasmid-cDNA mittels RT-PCR	78
3.4	Einfluss der Brachyury(T)- und Eomesodermin-Überexpression auf das kardiale Differenzierungspotential muriner ES-Zellklone.....	79
3.5	Einfluss der Brachyury(T)- und der Eomesodermin-Überexpression auf die endogene MesP1-mRNA-Expression	81
3.6	<i>mesP1</i> als direktes Zielgen des Brachyury(T)-Proteins	82
3.6.1	Bindung des Brachyury(T)-Proteins an potentielle Zielsequenzen im <i>mesP1</i> -Promotor	83
3.6.1.1	Reporter-gen-Assay.....	83
3.6.1.2	EMSA.....	85
3.6.2	Bindung von Brachyury(T) in der Stammzellkultur	86
3.6.2.1	Transaktivierung eines 3,4 kb- <i>mesP1</i> -Promotorfragments durch Brachyury(T).....	87
3.6.2.2	Brachyury(T) als notwendige Voraussetzung für die MesP1-abhängige Kardiogenese in pluripotenten ES-Zellen:	90
3.7	Zeitliche Abhängigkeit von Brachyury(T)- und MesP1-Expression	91
3.8	<i>in vivo</i> Abhängigkeit der MesP1-Expression von Brachyury(T) ...	92
3.8.1	Koexpression der Brachyury(T)- und MesP1-mRNAs in Wildtyp-Mausembryonen.....	92
3.8.2	Partieller Verlust der MesP1-mRNA in <i>brachyury(T)</i> - <i>knock-out</i> -Embryonen.....	93
4	Diskussion:	95
4.1	Entschlüsselung der molekularen Herzentwicklung.....	95
4.2	Regulation des kardiovaskulogenen Schlüsselfaktors <i>MesP1</i>	96
4.3	Untersuchung der Rolle von Eomesodermin und Identifikation assoziierter Faktoren.....	100
4.4	Reprogrammierung adulter Stammzellen	101
4.5	Forschung an murinen embryonalen Stammzellen.....	101

4.6	Ist die Vision von der Kultur kontraktile Kardiomyozyten aus humanen embryonalen Stammzellen realistisch?	102
5	Zusammenfassung:.....	105
6	Abkürzungsverzeichnis:	106
7	Eidesstattliche Versicherung	110
8	Danksagung:.....	111
9	Lebenslauf:	112
	Persönliche Daten	112
	Berufliche Tätigkeit	112
	Schulbildung und Studium	112
	Posterpräsentationen und Zeitschriftenartikel	112
	Auszeichnungen und Förderungen	113
10	Literatur:.....	114

Abbildungsverzeichnis:

ABBILDUNG 1: DAS KARDIOVASKULÄRE KONTIUM BEI DER ENTWICKLUNG DER CHRONISCHEN HERZINSUFFIZIENZ..	12
ABBILDUNG 2: STATISTIK DER DEUTSCHEN STIFTUNG ORGANSPENDE	13
ABBILDUNG 3: ANZAHL DER PATIENTEN AUF DER WARTELISTE DER DEUTSCHEN STIFTUNG ORGANTRANSPLANTATION IM JAHR 2012 IM VERGLEICH ZUR TRANSPLANTATIONSQUOTE IM JAHR 2012..	14
ABBILDUNG 4: GEWINNUNG MURINER ES-ZELLEN.....	19
ABBILDUNG 5 EMBRYOID BODIES	20
ABBILDUNG 6: SCHEMA DER KEIMENTWICKLUNG IN LÄNGSSCHNITTEN (A), SEITENANSICHTEN (B) UND TRANSVERSALSCHNITTEN (C)	29
ABBILDUNG 7: DARSTELLUNG DER FRÜHEN HERZENTWICKLUNG IN TRANSVERSALSCHNITTEN (2. UND 3. WOCHE)	30
ABBILDUNG 8: EXPRESSIONSVEKTOR PIRES-EGFP MIT MULTIPLE CLONING SITE (MCS).....	51
ABBILDUNG 9: PCMV-SPORT6.....	52
ABBILDUNG 10: pFIREFLYLUC-TK-VEKTOR	53
ABBILDUNG 11: pRENILLA LUC-TK-VEKTOR.....	53
ABBILDUNG 12: pMESP1-ΔCD4 BZW -EGFP	54
ABBILDUNG 13: pDsRED-EXPRESS-N1 4,7 KB.....	55
ABB. 14: AUFBAU DER TRANSFER-KASSETTE FÜR DEN WESTERN-BLOT.....	64
ABBILDUNG 15: VEKTOREN DER FIRMA RZPD MIT HUMANER BRACHYURY(T)-CDNA UND HUMANER EOMESODERMIN-CDNA	75
ABBILDUNG 16: MITHILFE DER RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN <i>XhoI</i> UND <i>EcoRI</i> , WURDE DIE <i>BRACHYURY(T)</i> -CDNA IN DEN EXPRESSIONSVEKTOR PIRES2-EGFP KLONIERT	76
ABBILDUNG 17: DIE <i>EOMESODERMIN</i> -CDNA WURDE MITHILFE DER RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN <i>SnaBI</i> UND <i>XhoI</i> IN PIRES2-EGFP KLONIERT	76
ABBILDUNG 18: EGFP-FLUORESCENZ EINES STABIL TRANSFIZIERTEN HUMANEN <i>BRACHYURY(T)</i> KLONS (A) UND EINES STABIL TRANSFIZIERTEN HUMANEN <i>EOMESODERMIN</i> -KLONS (B)	77
ABBILDUNG 19: NACHWEIS DER ÜBEREXPRESSION VON HUMANEM <i>BRACHYURY(T)</i> (A) UND HUMANEM <i>EOMESODERMIN (B)</i> AUF MRNA-EBENE IN STABIL TRANSFIZIERTEN MURINEN ES-ZELLKLONEN	78
ABB. 20: ANZAHL SCHLAGENDER AREALE PRO 500 AUSGESÄTER ZELLEN IN JEWEILS ZWEI STABIL HUMANEN BRACHYURY(T)-ÜBEREXPRIMIERENDEN KLONEN, ZWEI STABIL HUMANEN EOMESODERMIN- ÜBEREXPRIMIERENDEN KLONEN SOWIE ZWEI UNTRANSFIZIERTEN GSES-KLONEN	80
ABBILDUNG 21: EXPRESSION DES ENDOGENEN <i>MESP1</i> -GENS	82
ABBILDUNG 22: DIE VERTEILUNG VON ZIELSEQUENZEN FÜR T-BOX-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN IM 3,4 KB- PROMOTOR-FRAGMENT DES <i>MESP1</i> -GENS.....	83
ABBILDUNG 23: ERGEBNIS EINES DUAL LUCIFERASE REPORTER-ASSAYS.....	84
ABBILDUNG 24: ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA).....	85

ABBILDUNG 25: SEMIQUANTITATIVE WESTERN-BLOT-ANALYSE	87
ABBILDUNG 26: TRANSIENTE TRANSFEKTION VON BRACHYURY(T)-ÜBEREXPRIMIERENDEN ES-ZELLKLONEN UND KONTROLLEN MIT DEM VEKTORS pMESP1-ΔCD4	88
ABBILDUNG 27: TRANSFEKTION EINES HUMANEN <i>MESP1</i> -PROMOTORFRAGMENTS MIT NACHGESCHALTETEM <i>EGFP</i> -GEN IN BRACHYURY(T)-ÜBEREXPRIMIERENDE MURINE EMBRYONALE ES-ZELLEN UND IN KONTROLL-ZELLEN.	89
ABBILDUNG 28: VERLUST FRÜHER KARDIALER MARKER IN EMBRYOIDKÖRPERCHEN. <i>KNOCK DOWN</i> VON ENDOGENEM BRACHYURY(T) IN MURINEN ES-ZELLEN.....	90
ABBILDUNG 29: DARSTELLUNG DER ZEITLICHEN KORRELATION DES AUFTRETENS VON BRACHYURY(T)- UND MESP1-PROTEIN IN MURINEN EMBRYONALEN STAMMZELLEN IM VERLAUF DER DIFFERENZIERUNG MITTELS EINES WESTERN-BLOT-ASSAYS	91
ABBILDUNG 30: <i>WHOLE MOUNT IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG FÜR MESP1- (LINKS) UND BRACHYURY(T)-MRNA (RECHTS) IN MAUSEMBRYONEN (E7.5).....	93
ABBILDUNG 31: <i>WHOLE MOUNT IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNGEN VON WILDTYP-MAUSEMBRYONEN (OBEN) UND <i>BRACHYURY(T)</i> - <i>KNOCK-OUT</i> -EMBRYONEN	94

Tabellenverzeichnis:

TABELLE 1: HOMOLOGE ZUM MURINEN <i>T</i> -GEN IN ANDEREN SPEZIES.....	37
TABELLE 2: HOMOLOGE DES T-BROTEINS IN UNTERSCHIEDLICHEN SPEZIES	39
TABELLE 3: ZUSAMMENSETZUNG DES TRANSFEKTIONSANSATZES FÜR DIE STABILE TRANSFEKTION VON MURINEN ES-ZELLEN.....	69
TABELLE 4: ZUSAMMENSETZUNG DES TRANSFEKTIONSANSATZES FÜR DIE TRANSIENTE TRANSFEKTION VON MURINEN ES-ZELLEN.....	71

1 Einleitung

1.1 Entstehung und Bedeutung der terminalen Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist ein bedeutendes Gesundheitsproblem. Die Anzahl Betroffener steigt mit dem Alter und ist eine der führenden Todesursachen und eine der häufigsten Ursachen für Hospitalisation in höherem Alter. Infolge der zunehmenden Lebenserwartung weltweit und der verbesserten Behandlungsmöglichkeiten steigt die Anzahl derer, welche ein fortgeschrittenes Stadium der Herzinsuffizienz erreichen, stetig an.

Die ABCD-Klassifikation der American Heart Association (AHA) und die Klassen III und IV der sogenannten NYHA-Klassifikation der New York Heart Association umfasst die Patienten mit einer Herzinsuffizienz im Endstadium, welche gekennzeichnet ist, durch eine fortgeschrittene strukturelle Herzerkrankung und schwere Herzinsuffizienzsymptome in Ruhe trotz maximaler medikamentöser Therapie.

1.1.1 Das kardiovaskuläre Kontinuum

Das kardiovaskuläre Kontinuum beschreibt den Weg vom Risikofaktor über die Entwicklung der Arteriosklerose und der koronaren Herzkrankheit hin zu akuten kardialen Ereignissen bis zur terminalen Herzinsuffizienz.

Terminale Herzinsuffizienz ist definiert als ein nach Leitlinien austherapierter Zustand mit der Notwendigkeit einer pharmakologischen und/oder mechanischen Kreislaufunterstützung. Neben dem Einsatz von positiv inotropen Substanzen und Vasopressoren kommen Ultrafiltration, perkutane und chirurgische kardiale Assist-Systeme sowie die Herztransplantation zum Einsatz. In diesem Stadium ist der Patient trotz maximaler pharmakologischer Therapie meist nicht in der Lage auch nur geringste Anstrengungen oder Belastungen auf sich zu nehmen. Dies bedeutet sehr oft Bettlägerigkeit für die Betroffenen. Das Herz ist gerade noch dazu fähig die inneren Organe in einem Umfang mit Sauerstoff zu versorgen, dass zu keinem Organversagen kommt, es besteht das Risiko

Einleitung

wiederholter Dekompensationen mit Rückwärts- und Vorwärtsversagen oder des kardiogenen Schocks.

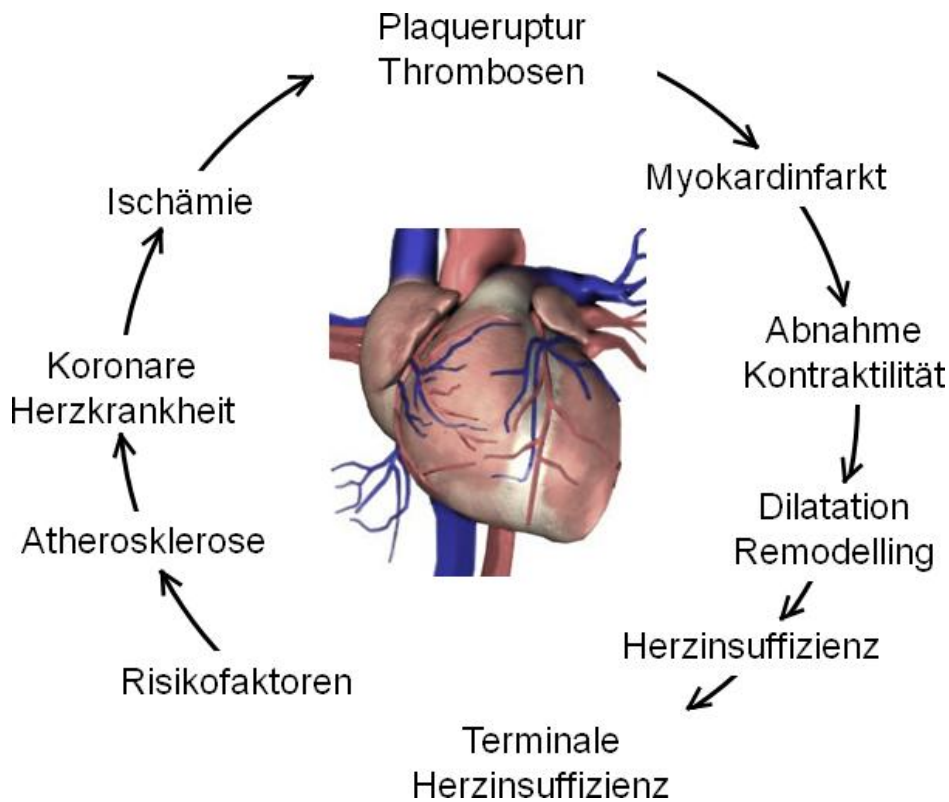


Abbildung 1: Das kardiovaskuläre Kontinuum bei der Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz: Ausgehend von Risikofaktoren kommt es zur verstärkten Arteriosklerose in den Gefäßen. Die koronare Herzkrankheit führt über Myokardischämie und -infarkt zu einer Abnahme der Herzmuskelkontraktilität, zu einem Umbau des Herzmuskels und zur Dilatation. Es kommt zur Herzinsuffizienz, also einer Unfähigkeit des Herzens eine für den Körper ausreichende Menge Blut zu transportieren ohne Druckanstieg in den Vorhöfen.

1.2 Therapie der terminalen Herzinsuffizienz

Voraussetzung einer Therapie der terminalen Herzinsuffizienz ist eine ausführliche Diagnostik durch nicht-invasive und invasive Methoden wie die laborchemische Bestimmung von Herzinsuffizienzmarkern im Blut, Echokardiographie, Kardio-MRT, Links- und Rechtsherzkatheter. Alle beherrschbaren Ursachen sollten untersucht und soweit möglich behoben werden (Klappendefekte, Stenosen der Koronararterien etc.) und eine

Einleitung

leitliniengerechte medikamentöse Therapie etabliert werden. Begleitend kommt die Gabe von Diuretika, Opiaten und Sauerstoff infrage. Gegebenenfalls empfiehlt sich die Restriktion der Trinkmenge, eine orale Antikoagulation oder eine nicht-invasive Beatmung.

Optimalerweise wird der Patient in einer kardiologischen Abteilung mit Herzinsuffizienz-Programm behandelt. Es sollte eine Kooperation mit einer herzchirurgischen Abteilung bestehen, welche Erfahrung in der Behandlung mit ventrikulären Unterstützungssystemen und der Herztransplantation besitzt.

Die allogene Herztransplantation, ist im Wesentlichen durch zwei Faktoren limitiert.

Zum einen birgt sowohl die Transplantation selbst, als auch die intensive postoperative Immunsuppression zahlreiche Risiken. Dazu gehören die akute Organabstoßung, pulmonaler und systemischer Bluthochdruck, Herzrhythmusstörungen, Lungen- und Nierenversagen, Infektionen und maligne neoplastische Erkrankungen (Ramakrishna, Jaroszewski et al. 2009). Eine Transplantation wird daher so lange wie möglich hinausgezögert. Zum anderen herrscht in Deutschland und anderen Ländern ein enormer Spendermangel (siehe Abbildung 3).

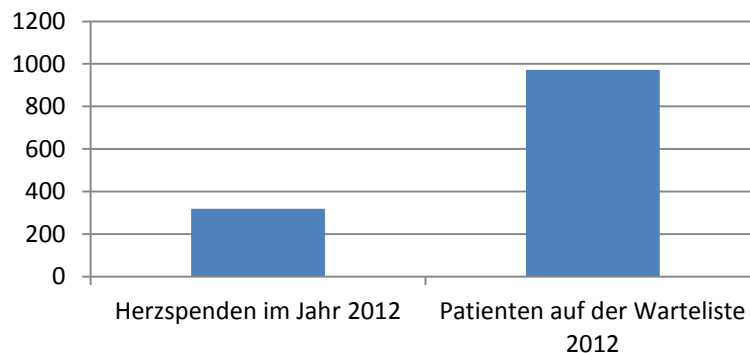


Abbildung 2: Statistik der Deutschen Stiftung Organspende zur Spenderanzahl 2012 im Vergleich zur Zahl der Patienten, welche auf eine Transplantation eines Herzens oder eine Kombinationstransplantation warten

So wurden nach Angaben von Eurotransplant im Jahr 2012 bundesweit nur 318 Herzen gespendet und 346 Transplantationen durchgeführt, davon waren 21 Kombinationstransplantationen von einem Herz und einem

Einleitung

weiteren Organ. Die Differenz dieser Zahlen kommt durch die Möglichkeit des Organtausches über Eurotransplant zustande.

Die Anzahl von Organspenden ist zudem seit Jahren leicht rückläufig und steht im Kontrast zur Anzahl derer, die auf der Warteliste für eine Transplantation stehen: Im Jahr 2012 warteten 972 Patienten auf ein Herz, 38 weitere auf eine Kombinationstransplantation von einem Herz und einem weiteren Organ (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2012; Eurotransplant International Foundation 2012). Die Risiken der Transplantation in Kombination mit dem beschriebenen Spendermangel haben mehrere Konsequenzen: Nur wenige Patienten erhalten eine Transplantation und bei denjenigen, welche zur Transplantation gelistet werden, ist die Erkrankung bereits sehr weit fortgeschritten. Das bedeutet, dass sie oft während der Wartezeit versterben oder die Transplantation nur kurz überleben.

Auf der Suche nach Alternativen zur Herztransplantation wurden bereits verschiedene Wege beschritten.

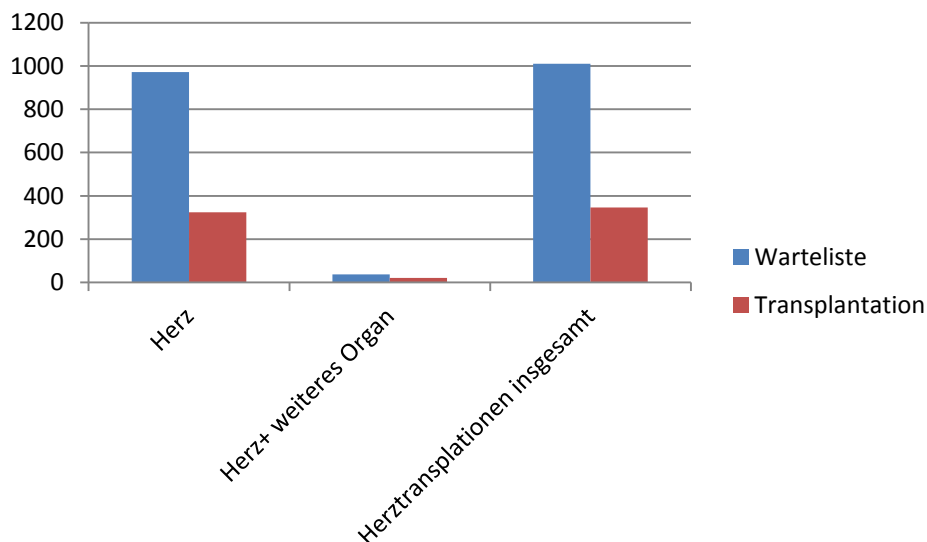


Abbildung 3: Anzahl der Patienten auf der Warteliste der Deutschen Stiftung Organtransplantation im Jahr 2012 im Vergleich zur Transplantationsquote im Jahr 2012 (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2012; Eurotransplant International Foundation 2012).

Chirurgische Lösungen, die auf eine Verbesserung der Geometrie des linken Ventrikels abzielten, enttäuschten durch hohe perioperative Mortalität und spätere Redilatation. Zu diesen operativen Ansätzen zählt zum Beispiel die 1995 durch den Chirurgen Batista eingeführte partielle

Einleitung

Ventrikulektomie. Hierbei wird ein Teil des linken Ventrikels, meist die laterale Wand, reseziert. Gleichzeitig kann eine Mitralklappenrekonstruktion erfolgen. Man erhoffte sich durch diese Operationstechnik eine, gemäß der Laplace-Gleichung, durch Reduktion des Ventrikelumfangs, verbesserte Pumpfunktion (Batista 1999; Mehmet 2005; Agarwal, Cascade et al. 2009).

Eine 1985 von Carpentier und Chachques eingeführte Methode, die *dynamic cardiomyoplasty*, bei der ein Lappen des linken *M. latissimus dorsi* geschädigte Teile der Herzwand ersetzen sollte, wurde weltweit bei mehr als 1000 Patienten durchgeführt, zeigte jedoch keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Moreira and Leirner 2001; Moreira and Stolf 2001; Moreira, Stolf et al. 2001; Parga, Avila et al. 2001).

Mechanische Hilfen, sogenannte Herzunterstützungssysteme (*ventricular assist devices* = VAD) zur Funktionsstärkung des linken oder auch beider Ventrikel, dienten früher ausschließlich als Überbrückungsmaßnahme bis zur Transplantation. Technische Verbesserung und Miniaturisierung erlauben heute teilweise eine Langzeit- oder Dauertherapie, die gelegentlich sogar eine Erholung des Herzens mit der Möglichkeit der Wiederentfernung des Unterstützungssystems zur Folge hat (Dandel, Weng et al. 2011). Auch der komplette Ersatz des Herzens durch ein künstliches System (*total artificial heart* = TAH), ist bis heute bereits bei über 8900 Patienten durchgeführt worden, dabei wurde eine Gesamtüberlebensrate von 79% erreicht (Meyer and Slaughter 2011).

Eindeutige Nachteile der VAD-Versorgung sind das erhöhte Infektionsrisiko, ein erhöhtes Risiko für psychiatrische Erkrankungen (Baba, Hirata et al. 2006), die permanente Abhängigkeit von einer Stromquelle, sowie ein erhöhtes Thrombembolie- und Blutungsrisiko (Wong, Cheung et al. 2010; Schaffer, Arnaoutakis et al. 2011). Letzteres ist zum einen auf die erforderliche Antikoagulation zurückzuführen, zum anderen auf eine durch das Bluttrauma erworbene Thrombozytendysfunktion und eine erworbene von-Willebrand-Erkrankung (Mattner, Chaberny et al. 2007; Struber, Meyer et al. 2009).

Als vielversprechend wird in letzter Zeit die Transplantation von Zellen angesehen, die in das geschädigte Myokard einwandern und sich dort funktionell integrieren sollen. Auch hier gibt es verschiedene Ansätze. Von P. Menasche verwendete Skelettmuskelzellen tendieren sogar zur

Einleitung

Integration in das myokardiale Gewebe, bewahren jedoch ihren Phänotyp. Aus dem Knochenmark stammende hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen, mit denen Menasche ebenfalls arbeitete, sind zwar zur Interaktion mit myokardialen Zellen fähig, die damals postulierte Differenzierung wird heute jedoch als sehr fraglich angesehen (Menasche 2005; Menasche 2005). Es scheint daher notwendig, auf Zellen zurückzugreifen, die das Potential besitzen, erstens das geschädigte Herzgewebe wieder zu besiedeln, zweitens mit verbliebenen Herzmuskelzellen elektrophysiologisch zu interagieren und drittens durch Förderung der Angiogenese die Versorgung der Muskelzellen wiederherzustellen. In Tierversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene myogene Zellen in der Lage sind, nach Injektion in betroffenes Herzgewebe, dieses zu besiedeln, Zellzellverbindungen zum endogenen Myokard auszubilden, und die Postinfarktfunktion zu verbessern (Soonpaa, Koh et al. 1994; Koh, Soonpaa et al. 1995; Klug, Soonpaa et al. 1996; Leor, Patterson et al. 1996; Min, Yang et al. 2002; Yang, Min et al. 2002).

Dass sich auch humane embryonale Stammzellen und daraus gewonnene Kardiomyozyten, *in vivo* in Herzgewebe ansiedeln, zeigten zum Beispiel Leor et al. 2007. Zwei bis vier Wochen nach der Injektion undifferenzierter und differenzierter humaner embryonaler Stammzellen in infarziertes Herzgewebe von Ratten, konnten die Arbeitsgruppe diese Zellen sowohl in normalem, also auch (in geringerem Umfang) in krankem Gewebe nachweisen. Die Zellen bildeten kein neues Myokard, waren aber an der Gefäßneubildung beteiligt. Die Transplantation von Kardiomyozyten, welche aus humanen embryonalen Stammzellen gewonnen worden waren, führte ebenfalls innerhalb von zwei bis vier Wochen zu unorganisierten Inseln von Muskelfasern und Bindegewebe und verhinderte dadurch eine Dysfunktion des linken Ventrikels sowie eine Ausdünnung durch Narbenbildung (Leor, Gerecht-Nir et al. 2007).

Da die Verwendung fötaler humaner Kardiomyozyten für den Einsatz in der Therapie myokardialer Erkrankungen einerseits aus ethischen Gründen, andererseits als Folge der quantitativen Limitierung unrealistisch ist, muss nach alternativen Zellquellen gesucht werden, auf die leichter zurückgegriffen werden kann. Ideal wäre die gezielte Herstellung der benötigten Zellarten. Voraussetzung dafür ist ein möglichst genaues

Einleitung

Verständnis der molekularen Mechanismen, welche während des Differenzierungsprozesses in diesen Zellen ablaufen. In Frage kommen pluripotente Stammzellen verschiedenen Ursprungs. Die am meisten beforschten Zellen sind derzeit die embryonalen Stammzellen (*embryonic stem cells* = *ESC*), die induzierten pluripotenten Stammzellen (*induced pluripotent stem cells* = *iPS* und *protein induced pluripotent stem cells* = *piPS*). 2012 wurde der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin an die beiden Vorreiter dieser Forschungsrichtung, John Gurdon (Vereinigtes Königreich) und Shin'ya Yamanaka (Japan) verliehen (Nobelprize.org 2013). In den Medien diskutiert werden zudem die sogenannten parthenogenetischen Stammzellen. Den Goldstandard unter den pluripotenten Stammzellen stellen dabei nach wie vor die embryonalen Stammzellen dar. Vor- und Nachteile der Verwendung embryonaler Stammzellen in der Forschung sollen in den folgenden Kapiteln erläutert werden. Im Anschluss folgt eine kurze Vorstellung der oben genannten adulten Stammzellarten.

1.3 Eigenschaften Embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) zeichnen sich durch die Eigenschaften der hohen Proliferationsfähigkeit, der Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch asymmetrische Teilung und der Fähigkeit der Produktion aller Zellenarten eines Organismus aus. Zudem vermehren sie sich mit relativ kurzen Generationszeiten von circa 12-16 Stunden und besitzen ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis (Badura-Lotter 2005).

Als Gene, die für den Erhalt des undifferenzierten Zustands embryonaler Stammzellen essentiell scheinen, werden die im Folgenden genannten angesehen: Der am besten untersuchte Marker ist *oct-4* (Nichols, Zevnik et al. 1998; Pesce and Scholer 2001; Lemischka 2010; Pardo, Lang et al. 2010; Stefanovic and Puceat 2010). Weitere sind zum Beispiel *tra1-60* (Badcock, Pigott et al. 1999; Singh, Mok et al. 2010), *tra-1-81* (Henderson, Draper et al. 2002), *SSEA3*, *SSEA4* (Reubinoff, Pera et al. 2000) und *nanog* (Chambers, Colby et al. 2003; Hough, Clements et al. 2006) sowie einige andere (Brivanlou, Gage et al. 2003; Carpenter, Rosler et al. 2004; Rosler, Fisk et al. 2004; Allegrucci and Young 2007). Mit einsetzender Differenzierung der Zelle werden diese Gene inaktiv.

Einleitung

ES-Zellen können alle circa 210 verschiedenen Zelltypen des Säugetierorganismus bilden (Bradley, Evans et al. 1984; Conley, Young et al. 2004). Werden murine ES-Zellen nach Entnahme aus der inneren Zellmasse der Blastozyste (*inner cell mass* = *ICM*, siehe Abbildung 4), Kultivierung und Manipulation, in scheinschwangere Mäuse reimplantiert (zusammen mit tetraploiden Zellen und Trophoblastzellen), so können aus ihnen *in vivo* lebensfähige Nachkommen entstehen, welche somit vollständig von ES-Zellen abstammen (Nagy, Gocza et al. 1990; Nagy, Rossant et al. 1993).

Ein weiterer Vorteil von ES-Zellen ist die gute genetische Veränderbarkeit *in vitro*, welche die Aufklärung von Genfunktionen ermöglicht. Besonders bewährt haben sich dafür sogenannte *gain of function*-, bzw. *loss of function*-Strategien. Diese erlauben Untersuchungen von genetischen Veränderungen, die *in vivo* keine oder auch letale Folgen für den Embryo hätten und der Phänotyp einer solchen Veränderung daher nicht hätte untersucht werden können.

Aufgrund dieser Eigenschaften bieten sich für ES-Zellen in der Forschung viele Anwendungsfelder. Ein großes Potenzial wird ihnen für den medizinischen Einsatz in der Gewebezüchtung, in der Untersuchung von Medikamentenverträglichkeiten des Embryos und in der Erforschung der molekularen Embryonalentwicklung, zugeschrieben (Pera, Reubinoff et al. 2000).

Besonders für die Forschung geeignet zeigten sich aufgrund ihrer relativ einfachen Kultivierbarkeit ES-Zellen der Maus. Deren Isolation gelang zuerst Evans und Kaufmann im Jahr 1981. Seither sind zahlreiche Linien generiert worden und stehen der Forschung zur Verfügung (Evans and Kaufman 1981).

1.3.1 Embryonale Stammzellen der Maus und des Menschen – Gewinnung und Kultivierung

1.3.1.1 Murine embryonale Stammzellen

ES-Zellen der Maus werden kommerziell für die Forschung generiert und angeboten. Gewonnen werden murine ES-Zellen (mES-Zellen) in der

Einleitung

Regel am Tag vier *post conceptionem* (p.c.) aus der ICM *in vitro* kultivierter Blastozysten (siehe Abbildung 4).

Die Entnahme kann auf zweierlei Art und Weise durchgeführt werden: Die Zellen werden mittels einer Pipette aus der umgebenden Trophoblastenhülle herausgesaugt, oder die Hülle wird über Antikörper und Komplementaktivierungsprozesse lysiert (*immunosurgery*). Ein genaues Protokoll liefert Brock J. Conley (Conley, Denham et al. 2005).

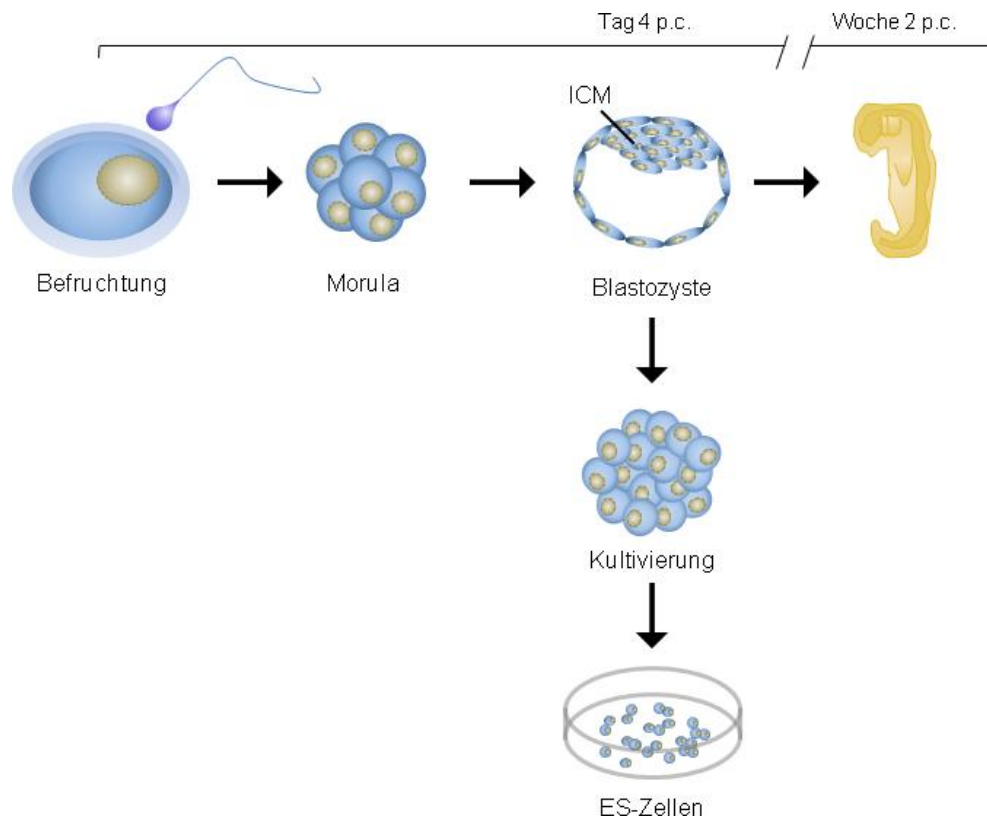


Abbildung 4: Gewinnung muriner ES-Zellen: Die Entnahme muriner ES-Zellen erfolgt in der Regel am Tag 4 p.c. aus der ICM (*inner cell mass*) von Mäuseembryonen. Während aus der kompletten Blastozyste ein Embryo entstehen kann, sind die isolierten Zellen der ICM zwar in der Lage Zellen aller drei Keimblätter hervorzubringen, allerdings in weitgehend unorganisierter Anordnung.

Die isolierten Zellen können auf inaktivierten Mausfibroblasten (*feeder*-Zellen) kultiviert werden, welche durch die Sekretion verschiedener Zytokine ihre Weiterdifferenzierung verhindern. *Feeder*-Zellen werden aus Mausembryonen gewonnen und müssen vor ihrer Verwendung durch Zerstörung ihres Zellspindelapparates inaktiviert werden. Dies gelingt mit Hilfe eines Zellgiftes wie Mitomycin C oder durch Bestrahlung mit Röntgen- bzw. γ -Strahlen. Eine Alternative zur Anzucht auf *feeder*-Zellen ist die

Einleitung

Kultivierung in einem *LIF*-haltigen (*Leukemia Inhibitory Factor*) Medium (Williams, Hilton et al. 1988; Pease, Braghetta et al. 1990).

LIF, ein Mitglied der Interleukinfamilie, ist ein Zytokin, welches bei trächtigen Mäusen unter anderem essentiell für die Implantation der Blastozysten in den Uterus ist (Kimber 2005).

ES-Zellen der Maus können, wenn sie regelmäßig passagiert werden, über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, ohne dass sie ihre wesentlichen Eigenschaften verlieren. Dasselbe gilt für ihre Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff.

Unter dem Entzug von *LIF* und/oder oben genannten *feeder*-Zellen, differenzieren *ESC* spontan und bilden Zellaggregationen, so genannte *embryoid bodies* (*EBs*) (siehe Abbildung 5).

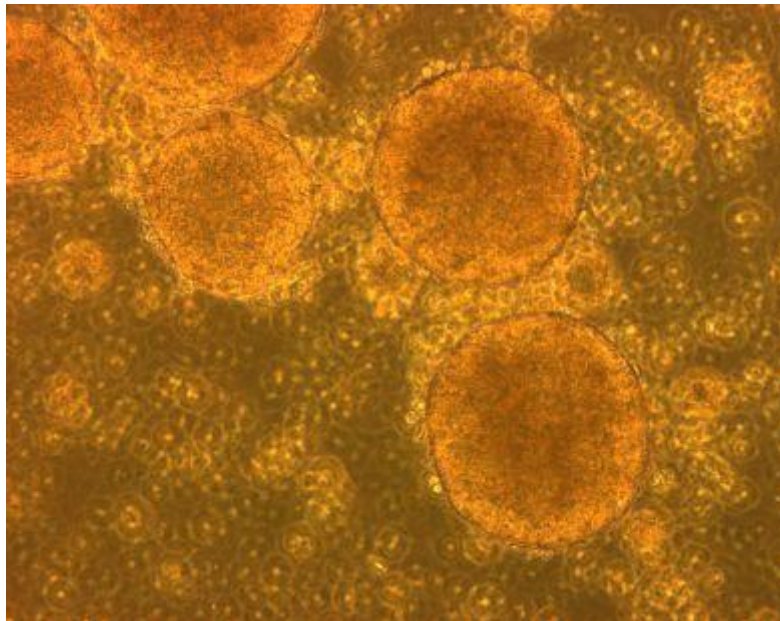


Abbildung 5 *Embryoid bodies*: Wenn keine Faktoren auf die ES-Zellen einwirken, die deren Weiterdifferenzierung verhindern, bilden sich spontan Zellaggregate, so genannte *embryoid bodies* (*EBs*). Im Bild zu sehen sind murine *EBs* der Linie GSES in Schwebekultur an Tag 5 der Differenzierung.

Auf gelatinierte Zellkulturschalen ausplattiert bilden sich ekto-, endo- und mesodermale Zellschichten, die sich von den *EBs* ausgehend ausbreiten.

1.3.1.2 Humane embryonale Stammzellen

Erste Versuche zur Etablierung humaner ES-Zellen wurden im Jahre 1994 (Bongso, Fong et al. 1994) unternommen. Die erste humane ES-Zelllinie

Einleitung

stammt von Thomson et al. (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Reubinoff, Pera et al. 2000). Humane ES-Zellen werden ebenfalls aus der *ICM* von Blastozysten gewonnen, wobei meist die immunochirurgische Methode der Isolierung angewandt wird (Pera, Reubinoff et al. 2000). Ähnlich ihren murinen Pendanten können humane ES-Zellen in Kultur in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden und bilden im Verlauf ihrer Differenzierung eine Vielzahl an unterschiedlichen Geweben aus (Shambloott, Axelman et al. 2001). Verschiedene Zelllinien zeigen dabei eine vergleichbare Markerexpression und ein ähnliches Differenzierungsverhalten (Carpenter, Rosler et al. 2004; Adewumi, Aflatoonian et al. 2007). Unterschiedliche Arbeitsgruppen zeigten in der Vergangenheit, dass die Differenzierung humaner ESC in Richtung bestimmter Phänotypen gelenkt werden kann (Levenberg, Golub et al. 2002; Xu, Police et al. 2002).

Die Kultivierung von humanen ES-Zellen unterscheidet sich insofern von der Kultivierung muriner Zellen, als dass der Einsatz von *LIF* nicht möglich ist. Auch benötigen sie zur Vermehrung einen Zell-Zellkontakt und weisen charakteristischerweise eine ungefähr 30 bis 40 Stunden dauernde Verdoppelungsrate auf, also das circa Zweifache der Verdoppelungsrate von murinen ES-Zellen (Johnson, Shindo et al. 2008; Park, Kim et al. 2008).

Da die potentielle Verwendung für Transplantationen eine Kultivierung ohne Verunreinigung durch murine Proteine erfordert, wurde intensiv nach Methoden gesucht, humane ES-Zellen ohne *feeder*-Zellschicht zu kultivieren. So gelang es humane ES-Zellen auf fötalen Zellen und adulten humanen Fibroblasten vorübergehend in undifferenziertem Zustand zu halten (Richards, Fong et al. 2002).

Dem Einsatz dieser Ergebnisse stehen jedoch ausgeprägte ethische und rechtliche Aspekte entgegen.

1.3.2 Ethische und rechtliche Aspekte

In Deutschland ist es nach dem Embryonenschutzgesetz nicht nur generell verboten, embryonale Stammzellen zu generieren. Das Stammzellgesetz verbietet auch, sie einzuführen oder zu verwenden. Zu Forschungszwecken können für Import und Verwendung

Einleitung

Ausnahmegenehmigungen ausgestellt werden. Geforscht werden kann somit derzeit nur an importierten humanen embryonalen Stammzellen, die aus Embryonen stammen, welche im Ausland durch künstliche Befruchtung entstanden sind und nicht für eine Schwangerschaft verwendet wurden (Bundesministeriums der Justiz 1990).

Dies wurde zunächst durch das Stammzellgesetz vom Juli 2002 geregelt, dem zufolge deutsche Forscher nur Stammzellen aus Linien verwenden durften, welche vor dem 1. Januar 2002 etabliert worden waren. Diese Linien waren jedoch nicht unter standardisierten Bedingungen angelegt worden und waren daher untereinander schlecht vergleichbar. Außerdem reicherten sich unter den damals praktizierten Bedingungen Mutationen an, die eine Interpretation von Ergebnissen erschwerten.

Seit einer Verschiebung des Stichtags auf den 1. Mai 2007 durch den deutschen Bundestag im April 2008, können Forscher in Deutschland nun unter anderem auch mit Zelllinien arbeiten, die frei von tierischem Material sind. Bisher wurden in der Bundesrepublik 74 Anträge genehmigt (Stand Oktober 2012 (Robert Koch Institut 2012)). Die Genehmigung erfolgt durch die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES). Diese bezeichnet sich als ein „unabhängiges und interdisziplinär zusammengesetztes Expertengremium, dessen Aufgabe die Prüfung und Bewertung von Anträgen auf Einfuhr und Verwendung humaner embryonaler Stammzellen (hES-Zellen) nach dem Stammzellgesetz ist“. Die ZES wurde am 1. Juli 2002 mit dem Inkrafttreten des Stammzellgesetzes durch die Bundesregierung berufen und arbeitet inzwischen in ihrer dritten Berufsperiode. Sie besteht aus 18 ehrenamtlichen Mitgliedern aus den Bereichen Biologie, Medizin sowie philosophische, medizinische und theologische Ethik (Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung 2012).

Deutschland hat im Artikel 1 des Grundgesetzes die Achtung und den Schutz der Würde des Menschen zum obersten Leitprinzip allen Handelns gemacht. Dieser Grundsatz wurde durch die sogenannte Objektformel von Günter Dürig bezüglich seiner Verletzung durch den Staat genauer definiert und dies unabhängig von der physischen Dauer seiner Existenz. Es gilt der Grundsatz, dass menschliches Leben in keiner Weise, vor allem auch nicht zum Zweck der Forschung, instrumentalisiert werden darf. Die Diskussion um die Zulassung und die ethische Vertretbarkeit der Forschung an

Einleitung

embryonalen Stammzellen führt damit unweigerlich zu Kontroversen, die schon bei anderen Themen, wie der Debatte um Schwangerschaftsdiagnostik oder Präimplantationsdiagnostik aufgeworfen wurden. Kontrovers diskutiert wird unter anderem der Zeitpunkt, ab welchem einem Embryo das Recht auf Menschenwürde zugesprochen werden kann. In einer 1993 festgelegten Neuregelung des Schwangerschaftsabbruchs durch das Bundesverfassungsgericht wurde klargestellt, dass es sich bei einem Embryo ab dem Zeitpunkt der Nidation um individuelles und damit schützenswertes Leben handelt. Der für die Embryonenforschung maßgebliche Zeitraum der ersten 14 Tage bleibt damit ausgespart. Kirchliche Vertreter fordern den Schutz menschlichen Lebens vom Zeitpunkt der Befruchtung an.

Die im Rahmen der öffentlichen Diskussion immer wieder aufgeworfene Befürchtung, dass die Nutzung importierter humaner ES-Zellen in Deutschland einen Anreiz zur Herstellung und Tötung von Embryonen im Ausland darstellen könnte, wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft nicht geteilt. Dagegen spricht zum Beispiel, dass weltweit nach 2002 hunderte neue Zelllinien erstellt wurden, deren Nutzung durch Deutschland nicht voraussehbar war, da erst 2008 die Verschiebung des Stichtags diskutiert und beschlossen wurde.

1.4 Embryonale Stammzellen in Forschung und Medizin

Wie in Kapitel 1.2 bereits beschrieben, finden embryonale Stammzellen in verschiedenen Forschungsbereichen Anwendung und zahlreiche Gebiete der Medizin schreiben ihnen ein enormes Potenzial in der Therapie von degenerativen Erkrankungen oder ischämischem Gewebe zu.

Beispielweise ist in der Medikamentenentwicklung die Testung auf Kardiotoxizität ein sehr wichtiger Schritt, der umfangreiche Tierversuche unumgänglich macht. Ein verlässliches *in vitro* Model würde diese Phase der Pharmaforschung revolutionieren (Ameen, Strehl et al. 2008; Asp, Steel et al. 2010).

1.4.1 Zelltherapeutischer Einsatz embryonaler Stammzellen in der Kardiologie

Voraussetzung für die Verwendung embryonaler Stammzellen als Quelle für Herzgewebe in der Therapie myokardialer Läsionen (sogenanntes *tissue engineering*) wäre die standardisierte Produktion von Kardiomyozyten in sogenannten Zellbanken. Dass sich aus ES-Zellen alle wichtigen Zelltypen des ausdifferenzierten Herzens gewinnen lassen, wurde bereits vor Jahren in verschiedenen Arbeitsgruppen festgestellt (Wobus, Wallukat et al. 1991; Maltsev, Rohwedel et al. 1993). Die Gewinnung hochdifferenzierter Kardiomyozyten aus murinen ES-Zellen und ihre Verwendung für die stabile Transplantation über einen Zeitraum von sieben Wochen gelangen bereits 1996 (Klug, Soonpaa et al. 1996). Projekte zur Etablierung einer standardisierten Zellproduktion für diesen Zweck wurden zum Beispiel von Dang et al. sowie Zweigert et al. unternommen (Dang, Kyba et al. 2002; Zweigerdt, Burg et al. 2003). Zahlreiche weitere Forscher folgten. Loren J. Field zieht in seiner 2003 veröffentlichten Übersichtsarbeit zu diesem Thema den Schluss, dass Herzmuskelzellen, welche aus embryonalen Stammzellen gewonnen wurden, stabil transplantierbar sind, und zwar sowohl in gesundes, als auch krankes Herzgewebe. Auch wurde in vielen Fällen eine Verbesserung der Herzfunktion festgestellt. Der genaue Mechanismus der gemessenen Funktionsverbesserung des Herzmuskels konnte bis dahin jedoch nicht vollständig geklärt werden. Ein Großteil des Effekts scheint auf die gesteigerte Angiogenese und damit auf die Rettung von kritisch unterversorgtem Herzgewebe im Randbereich der Ischämie, der sogenannten Penumbra, zurückzuführen zu sein (Dowell, Rubart et al. 2003).

Eines der Hauptprobleme auf dem Weg zur klinischen Anwendung des *tissue engineering*s, ist die Gewährleistung einer immunologischen Verträglichkeit der so gewonnenen Transplantate. Die konservative medikamentöse Immunsuppression, wie sie auch bei Herztransplantationen verwendet wird, hat, wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, starke Nebenwirkungen, welche zu einer Beeinträchtigung der Lebensqualität des Patienten führen. Dieses Problem könnte zum Beispiel durch einen Abgleich der *HLA*-Marker (*human leucocyte antigen* =

Einleitung

Oberflächenproteine von Leukozyten) umgangen werden, wofür die Anlage von „Stammzellbanken“ nötig wäre.

Eine andere Möglichkeit wäre eine genetische Manipulation der für die immunologische Reaktion verantwortlichen Oberflächenproteine (Brenner 2008).

Die Generierung autologer embryonaler Stammzellen durch therapeutisches Klonen, welche das Problem der immunologischen Unverträglichkeit umgehen würde, ist in Deutschland derzeit verboten. Unter therapeutischem Klonen versteht man die Herstellung von Stammzellen, welche mit dem Empfängerorganismus genetisch identisch sind, durch den Transfer eines Zellkerns in eine befruchtete und entkernte Eizelle.

In einigen Ländern wie Südkorea, Belgien, Schweden und manchen Staaten der USA ist die Erzeugung von Embryonen und damit die Herstellung autologer embryonaler Stammzellen möglich, dort werden erste dahingehende Versuche bereits unternommen. In anderen Ländern, so auch in Deutschland, werden diese Methoden als ethisch höchst bedenklich angesehen, siehe auch Kapitel 1.3.2.

1.4.2 Das Potenzial adulter Stammzellen, parthenogenetische Stammzellen und iPS-Zellen

Adulte Stammzellen, also solche, die in einem ausgereiften Organismus auch in höherem Lebensalter existieren und für die Erhaltung der Organe notwendig sind, kommen in Geweben aus allen drei Keimblättern, zum Beispiel dem Knochenmark, dem Herzen, der Leber und der Haut vor. Zum Teil lassen sich in einem Gewebe auch mehrere Stammzellpopulationen finden (Hillyer and Wells 1993). Ihr Ursprung liegt höchstwahrscheinlich in der Ontogenese. Sie persistieren in ihren verschiedenen Geweben in den sogenannten Stammzellnischen, in welchen ihnen durch zelluläre und nicht-zelluläre Komponenten ein Milieu geboten wird, welches ihnen ermöglicht ihren undifferenzierten Zustand beizubehalten. Gehen im Ursprungsorgan Zellen zugrunde, so kommt es durch Milieuänderungen in der Stammzellnische zu einer Aktivierung des Differenzierungsprozesses. Dabei besitzen die adulten Stammzellen Eigenschaften, die mit denen

Einleitung

embryonaler Stammzellen vergleichbar sind, so zum Beispiel eine hohe Proliferationsfähigkeit und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch asymmetrische Teilung.

Adulte Stammzellen weisen jedoch hinsichtlich ihrer Differenzierungskapazität Limitierungen auf. Das heißt, sie können sich durch asymmetrische Teilung in verschiedene Zelllinien weiterdifferenzieren, allerdings nicht in alle Zellarten des Organismus (Mimeault and Batra 2006).

Da man sich von der Verwendung adulter Stammzellen unter anderem weniger rechtliche und ethische Probleme erwartet und weil die Hoffnung besteht, dass man mit ihrer Hilfe langfristig individuell auf jeden Patienten angepasste Gewebe generieren könnte, entwickelte sich die Forschung an den sogenannten iPS- und piPS-Zellen zu einem der sich am schnellsten weiterentwickelnden Gebiete der heutigen Biologie. Hierbei handelt es sich um pluripotente Stammzellen, die durch künstliche Reprogrammierung von nicht-pluripotenten somatischen Zellen entstanden sind. Die Umwandlung wird durch von außen angeregte Expression bestimmter Gene angestoßen, für die verschiedene Techniken existieren.

In ersten Versuchen gelang es 2006 mithilfe von Retroviren die Transkriptionsfaktoren *c-myc*, *klf-4*, *oct-4* und *sox-2* in murine Zellen einzubringen. Dies führte zu einer Reprogrammierung der Zellen in einen pluripotenten Zustand (Takahashi and Yamanaka 2006). Der Japaner Yamanaka erhielt für seine Forschung zusammen mit dem Briten John Gurdon im Jahr 2012 den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie.

Es folgten zahlreiche weitere Experimente, unter anderem mit dem Transkriptionsfaktor *nanog* (Okita, Ichisaka et al. 2007). Auch die Reprogrammierung menschlicher Körperzellen gelang kurze Zeit später (Takahashi, Tanabe et al. 2007; Park, Zhao et al. 2008). Die Verwendung von *c-myc*, welches ein bekanntes Pro-Onkogen ist und der Einsatz von Retroviren als Vektoren, waren jedoch Risiken, welche die klinische Anwendung gefährdeten.

Ein Ansatz, die Verwendung von Retroviren zu Umgehen, bestand in deren Ersatz durch Adenoviren, welche sich nicht ins Zellgenom integrieren (Stadtfeld, Nagaya et al. 2008).

Einleitung

2009 gelang es schließlich sogenannte protein-induzierte pluripotente Stammzellen (piPS-Zellen) durch das Einbringen von rekombinaten Proteinen zu erzeugen (Zhou, Wu et al. 2009).

Die meisten dieser alternativen Methoden erreichen jedoch eine weitaus niedrigere Effizienz als die stabile Transfektion durch die ursprünglichen vier Pluripotenzgene. Bei den ersten Generationen von iPS-Zellen lag die Erfolgsrate nur bei 0,05 %. Diese Prozentzahl liegt in der gleichen Größenordnung wie der Anteil natürlich vorkommender Stammzellen in einer Population von Hautzellen, so dass die Hypothese aufkam, dass nicht terminal ausdifferenzierte Zellen, sondern eben diese adulten Stammzellen zu iPS-Zellen werden (Yamanaka 2009). Dies konnte jedoch bald widerlegt und die Ausbeute zum Teil drastisch erhöht werden. So gelang es zum Beispiel Huangfu et. al. durch die Zugabe von Valproinsäure die Effizienz der Reprogrammierung durch Retroviren um das Hundertfache zu steigern (Huangfu, Maehr et al. 2008). Warren et al. fanden eine Strategie der Reprogrammierung, welche auf der Anwendung synthetisierter RNA basierte. Diese war zuvor modifiziert worden, um zelleigene antivirale Abwehrmechanismen zu umgehen. In ihrer Arbeit zeigen die Forscher, dass sie mithilfe dieses Ansatzes verschiedene humane Zelltypen reprogrammieren konnten, so dass diese sogar Pluripotenz aufwiesen. Zudem mit einer Effizienz, welche vorangegangene Protokolle weit übertraf. Die so gewonnenen Zellen nannten sie RiPSCs (*RNA-induced pluripotent stem cells*). Durch dieselbe Methode konnte die Differenzierung der so gewonnenen Zellen anschließend auch in Richtung der Entstehung ausdifferenzierter Muskelzellen gelenkt werden (Warren, Manos et al. 2010).

In der medizinischen Anwendung gelangen ebenfalls Erfolge. So konnten bereits patientenspezifische Zellen bei ALS-Erkrankten und Patienten mit spinaler Muskelatrophie isoliert, zu iPS-Zellen reprogrammiert und dann zu Neuronen ausdifferenziert werden. Allerdings wurden die Zellen bisher verwendet um die Erkrankung genauer zu untersuchen, nicht um zerstörte Zellen zu ersetzen (Dimos, Rodolfa et al. 2008; Ebert, Yu et al. 2009). Im Jahr 2010 generierten Moretti et al. patientenspezifische iPS aus Angehörigen einer Familie mit erblichem *long QT*-Syndrom. Die iPS waren in der Lage zu funktionellen Kardiomyozyten von atrialem, ventrikulärem und nodalem Phänotyp zu differenzieren und zeigten dabei die

Einleitung

elektrophysiologischen Merkmale der Erkrankung: eine verlängerte QT-Zeit. Den Forschern war es möglich, an den Zellen die verantwortliche R190Q–KCNQ1 Mutation genauer zu charakterisieren, sowie eine erhöhte Anfälligkeit für Katecholamin induzierte Tachyarrhythmien nachzuweisen. Der *in vitro* Einsatz von Beta-Blockern milderte die Ausprägung des Phänotyps ab (Moretti, Bellin et al. 2010)

Bei Mäusen wurden die Zellen bereits im Organismus eingesetzt, so konnte durch Transplantation von iPS-Zellen im Maus-Model bereits Sichelzellanämie und Parkinson therapiert werden, allerdings unter dem Risiko von Teratom- und Tumorentstehung, so dass eine Anwendung im Menschen derzeit noch nicht realistisch ist (Hanna, Wernig et al. 2007; Wernig, Zhao et al. 2008). Im Gegensatz zu der Forschung an embryonalen Stammzellen, stößt die Forschung im Gebiet der iPS-Zellen auf überwiegend positive Resonanz in Medien und Öffentlichkeit, obwohl auch hier „Missbrauch“ möglich ist und durchaus Risiken bestehen, so fehlen zum Beispiel Langzeituntersuchungen auf Tumorbildung (Cyranoski 2008).

1.5 Herzentwicklung im Embryo

Im vorliegenden Projekt wurde versucht, durch Manipulation auf genetischer Ebene die Differenzierung embryonaler Stammzellen so zu beeinflussen, dass es zu einer Anreicherung funktionellen Herzwes in der Zellkultur kommt. Um die vorgenommenen Eingriffe in die molekulare Herzentwicklung nachzuvollziehen und in das gegenwärtige Modell der embryonalen Kardiogenese einordnen zu können, soll im Folgenden ein Überblick über die betreffenden Bereiche gegeben werden.

Dabei gilt die allgemein akzeptierte Annahme, dass die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu ausgereiften Zellen des kardiovaskulären Systems, also die *in vitro* ablaufende Embryogenese, ähnlich der Entwicklung des embryonalen Herzkreislaufsystems *in vivo* erfolgt.

1.5.1 Allgemeine Embryonalentwicklung

Die Entwicklung des kardiovaskulären Systems im Embryo beginnt ungefähr ab der Mitte der dritten Embryonalwoche, wenn sowohl der Nährstoff- und Sauerstoffbedarf des wachsenden Embryos, als auch die

Einleitung

Strecke zwischen Keimoberfläche und den inneren Organanlagen so groß werden, dass die Versorgung durch Diffusion nicht mehr möglich ist (Moore, Vidhya et al. 2007). Zeitgleich entwickeln sich extra- und intraembryonale Gefäße und die Herzanlage. Letztere hat ihren Ursprung im Primitivstreifen des Mesoderms. Mesenchymale Zellen, die durch den Primitivstreifen wandern und nach lateral austreten, formen dort das laterale Seitenplattenmesoderm, in welchem sich die linken und rechten Herzanlagen (*heart forming regions (HFR)*) ausbilden. Diese wandern nach kranial und vereinigen sich vor der Neuralplatte zu einem Halbmond aus kardiogenen mesenchymalen Zellen, der kardiogenen Platte, auch primäres Herzfeld genannt (Wittler 2002; Wagner and Siddiqui 2007).

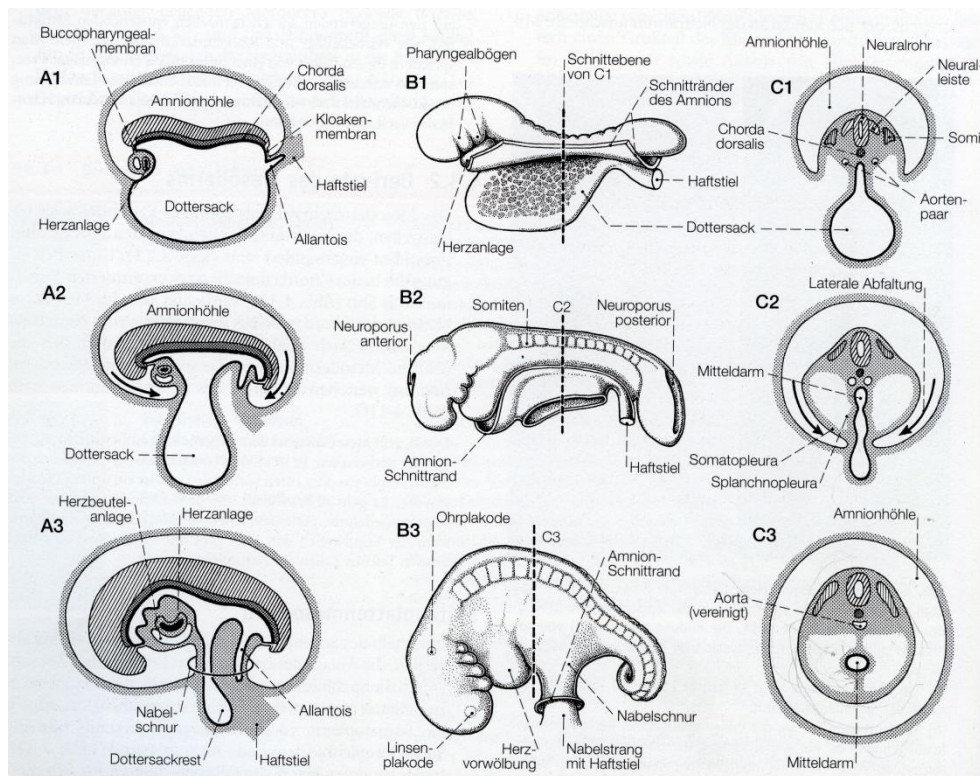


Abbildung 6: Schema der Keimentwicklung in Längsschnitten (A), Seitenansichten (B) und Transversalschnitten (C), Reihe 1 entspricht dabei Entwicklungstag 24, Reihe 2 Entwicklungstag 26 und Reihe 3 Entwicklungstag 28 (aus Beninhoff, Drenckhahn; Anatomie Band 1)

In Säugetieren werden ein dorsales somatisches Mesoderm und ein ventral gelegenes viszerale Mesoderm unterschieden. In Letzterem formiert sich, medial des primären Herzfelds, ein sekundäres Herzfeld, welches Zellen zur Entwicklung des ventrikulären Ausflusstrakts, des rechten Ventrikels,

Einleitung

des konotrunkalen Septums, sowie der Semilunarklappen beisteuert (Schumacher, Hess et al. 2007).

In der dritten Embryonalwoche verdichten sich nahe der kardiogenen Platte Mesenchymzellen zu angiogenetischem Material. Die im Zentrum dieser Verdichtungen liegenden Zellen differenzieren zu primitiven Blutzellen. Die in der Peripherie liegenden Zellen entwickeln sich zu Endothelzellen, aus welchen, in Verbindung mit Epithelzellen, ein Gefäßplexus entsteht.

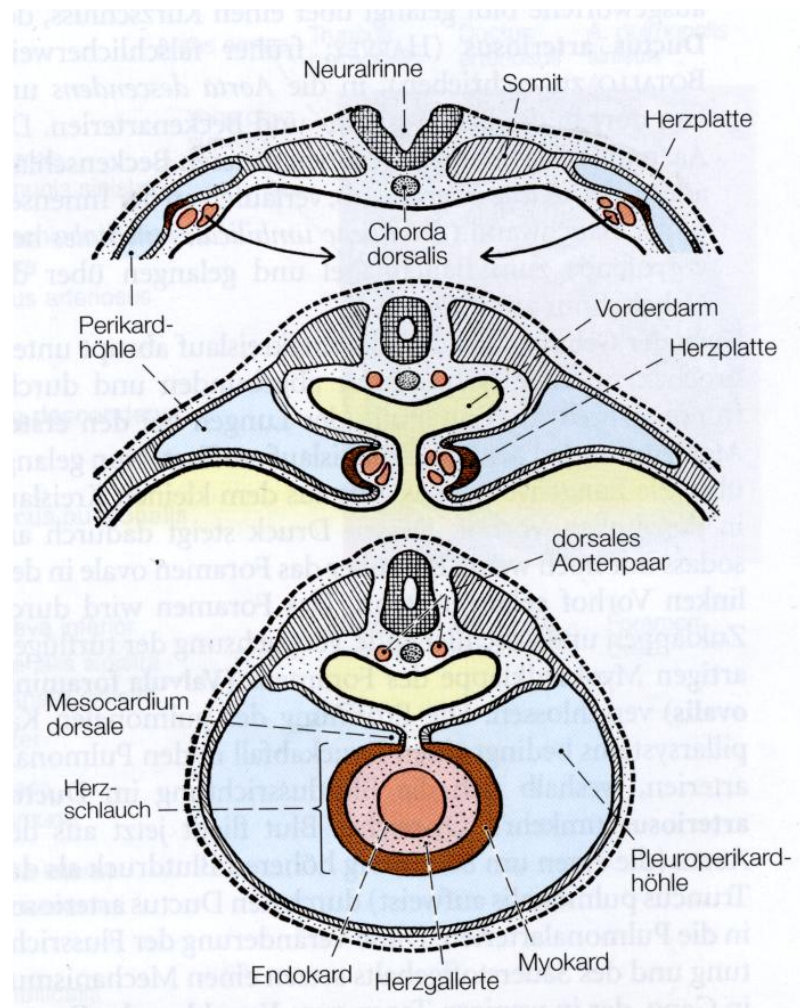


Abbildung 7: Darstellung der frühen Herzentwicklung in Transversalschnitten (2. und 3. Woche). Das Epithel des viszeralen Blattes der Perikardhöhle verdichtet sich zur Myokardplatte, aus der das Myokard hervorgeht. Der medial gelegene Gefäßplexus fusioniert zum Endokardrohr. Dieses liegt hufeisenförmig ventral der Pharyngealbögen und wird durch die laterale Abfaltung des Embryos in die Mittellinie verlagert, wodurch die beiden Schenkel verschmelzen und den unpaaren Herzschlauch bilden (aus Beninhoff, Drenckhahn; Anatomie Band 2).

Einleitung

Im anterioren Teil dieses Plexus bilden sich durch Verschmelzungen zwei Endokardröhren, die sich im Zuge der Abfaltung nach medial verlagern und dort zum Herzschauch fusionieren.

Die Zellen der kardiogenen Platte formen das Myokard und ummanteln den Endokardschauch. Lateral und rostral der kardiogenen Zone entsteht durch Spaltbildung im Mesoderm die unpaare primäre Perikardhöhle, welche sich während der Abfaltung um die Herzanlage schließt (Benninghoff and Drenckhahn 2003).

Der unpaare Herzschauch krümmt sich durch schnelles Längenwachstum s-förmig. Zwei Einschnürungen gliedern die so entstehende Herzscheife in einen atrialen Teil, einen ventrikulären Teil und einen Abschnitt, aus dem der Aortenbogen (*Truncus aorticus*) hervorgeht. Durch Septierung und Faltung entsteht im Folgenden das Vierkammerherz, welches Verbindung zum Gefäßsystem aufnimmt und am 22. bis 23. Tag der Embryonalentwicklung zu schlagen beginnt (Moore, Vidhya et al. 2007).

Die Entwicklung des Gefäßsystems beginnt zeitgleich, aber unabhängig von der Entwicklung der Herzanlage. Erste Blutinseln entstehen extraembryonal im Haftstiel, im Chorion und in der Wand des Dottersacks aus Zellen des Mesenchyms, den sogenannten Hämangioblasten. Kurz danach beginnt die intraembryonale Vaskulogenese nahe der kardiogenen Platte. Ende der dritten Woche verschmelzen die bis dahin unabhängig voneinander wachsenden Blutinseln sowohl intra-, also auch extraembryonal zu einem kommunizierenden Gefäßsystem und der Haftstiel wird zur Nabelschnur. Über die Dottersackvenen entsteht eine Verbindung des Gefäßplexus im Dottersack zur venösen Pforte des Herzschauches, der das Blut über den embryonalen Ausflußtrakt des Herzens (*Saccus aorticus*) in die paarigen Aorten pumpt. Ab der fünften Woche vereinigen sich diese zur gemeinsamen Brust- und Bauchaorta (*Aorta descendens*) und der *Saccus aorticus* wird mit den Pharyngealarterien zum Aortenbogen. Ab der 8. Embryonalwoche hat das embryonale Kreislaufsystem weitgehend seinen definitiven Zustand erreicht (Benninghoff and Drenckhahn 2003).

1.5.2 Faktoren und Signalwege der molekularen Herzentwicklung

Die Entstehung von Kardiomyozyten im anterolateralen Mesoderm wird durch Signale des angrenzenden Endoderms angeregt. Molekulare Untersuchungen führten zur Entdeckung verschiedener sezernierter Signalproteine, die verantwortlich für den primären Stimulus zu sein scheinen, der die Herzentwicklung im Mesoderm induziert. Zellen des kardiogenen Halbmonds werden durch Zytokine der BMP- (*bone morphogenetic protein*) und TGF- (*transforming growth factor*) Familie beeinflusst. Auch Inhibitoren des *wnt*-Signalwegs, sowie der *insulin-like growth factor* (IGF) und der *fibroblast growth factor* (FGF) spielen eine bedeutende Rolle (Eisenberg and Eisenberg 2006; Kwon, Cordes et al. 2008).

Bei den genannten Faktoren handelt es sich um extrazelluläre Signalmoleküle. Sie induzieren die Differenzierung anderer Zellen zu kardiovaskulärem Gewebe. Als der früheste Marker in diesen Zellen, welche später zu kardiovaskulärem Gewebe heranreifen, gilt der Transkriptionsfaktor mesoderm posterior 1 (MesP1) (Saga, Hata et al. 1996).

1.5.3 Der Transkriptionsfaktor MesP1

Bei MesP1 handelt es sich um einen sogenannten *basic-helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktor (*bHLH*-Transkriptionsfaktor). Er wird kodiert durch das beim Menschen auf Chromosom 15 liegende *mesP1*-Gen. Bei der Maus findet sich das entsprechende Gen auf Chromosom 7.

BHLH-Transkriptionsfaktoren spielen eine zentrale Rolle bei Zellproliferations-, Zelldeterminations- und Zelldifferenzierungsprozessen (Jan and Jan 1993). *BHLH*-Domänen sind circa 60 Aminosäuren lang und enthalten eine basische (*basic*) DNA-Bindungsregion, gefolgt von einer α -Helix (*helix*), einer Schleifenstruktur (*loop*) und einer weiteren α -Helix (Ferre-D'Amare, Prendergast et al. 1993). Die *HLH*-Domäne begünstigt die Bildung von Homo- und Heterodimeren zwischen Mitgliedern dieser Transkriptionsfaktor-Familie, was die Regulation der Expression von Genen über verschiedene Mechanismen erlaubt (Murre, McCaw et al. 1989).

Einleitung

Die Länge des offenen Leserasters (*ORF* = *open reading frame*) von *mesP1* beträgt bei der Maus 732 Basenpaare (*base pairs* = *bp*), beim Menschen 807 *bp* inklusive des Stop-Codons. Das Gen kodiert damit für ein 243 bzw. 268 Aminosäuren enthaltendes Protein.

Murine und humane gespleißte *mesP1*-mRNA stimmen zwar bezüglich der Basensequenz nur zu 68% überein, im Bereich des *bHLH*-Motivs sind jedoch 88% der Basen identisch. Auf Proteinebene erhöht sich die Übereinstimmung dieses Bereichs sogar auf 96%, was einem Unterschied von 2 Aminosäuren entspricht. Die beiden unterschiedlichen Aminosäuren liegen in der Schleifenstruktur.

16 Kilobasen von *mesP1* entfernt liegt ein Gen eines zweiten Mitglieds der *mesP*-Familie, das *mesP2*-Gen. Es enthält ein zu 92% identisches *bHLH*-Motiv (Saga, Hata et al. 1996).

1.5.4 Expressionsmuster und Funktion von *mesP1* während der Embryonalentwicklung

MesP1 wird im frühen Mesoderm exprimiert, welches sich später zu extra-embryonalem und kranio-kardialen Mesoderm differenziert (Saga, Hata et al. 1996).

Saga et al untersuchten den zeitlichen und räumlichen Verlauf der *mesP1*-Expression bereits im Jahr 1996. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass die früheste Expression von *mesP1* in der Region auftritt, die als Startpunkt der Gastrulation bekannt ist. 6.5 *dpc* (*days post conceptionem* = Tage nach der Befruchtung) bis 6.75 *dpc* steigt die Expression stark an und ist dabei auf die Zellen des Primitivstreifens beschränkt. Kurz vor Abschluss der Gastrulation (7.5 *dpc*) wird die Expression in fast allen mesodermalen Zellen herunter reguliert, mit Ausnahme von Zellen an der Basis der Allantois (Saga, Hata et al. 1996).

MesP1-single-knockout-Mäuse wiesen bei Saga morphogenetische Abnormitäten des Herzens, wie die Bildung zweier Herzschräuche (*Cardia bifida*) durch das Ausbleiben der Fusion der beiden Herzanlagen, auf. Verantwortlich dafür scheint eine verminderte Migrationsaktivität der Herzvorläuferzellen zu sein. (Saga, Miyagawa-Tomita et al. 1999). Teilweise scheint *mesP1* durch eine in den knockout-Mäusen vermehrte Expression des verwandten Gens *mesP2* ersetzbar zu sein. Das Fehlen

Einleitung

beider Gene führt in Mäuseembryos zu Defekten des nichttaxialen Mesoderms mit der Folge, dass sowohl die Entwicklung des Herzens, als auch die des Gastrointestinaltraktes und der Somiten stark beeinträchtigt ist (Kitajima, Takagi et al. 2000).

Saga et al. konnten 1999 zeigen, dass MesP1 der früheste molekulare Marker in Herzvorläuferzellen ist (Saga, Miyagawa-Tomita et al. 1999). 2008 zeigten David et al., dass die Überexpression von MesP1 in *Xenopus laevis* zur Bildung ektopisch schlagenden Herzgewebes führt. Die Überexpression des Gens in murinen ES-Zellen hatte eine um den Faktor vier bis fünf gesteigerte kardiale Differenzierung zur Konsequenz, was phänotypisch, aber auch auf *mRNA*- und Protein-Ebene gezeigt werden konnte. Die entstandenen Kardiomyozyten waren elektrophysiologisch und morphologisch mit normalen Herzmuskelzellen vergleichbar. Es konnten alle vier für ES-Zellen beschriebenen Kardiomyozyten nachgewiesen werden. In Durchflußzytometrie-Untersuchungen (*fluorescence activated cell sorting* = *FACS*) auf *fetal liver kinase 1* (*flk1*, auch *VEGF Receptor 2*), dem frühesten Marker für das Seitenplattenmesoderm, konnte gezeigt werden, dass MesP1 die Bildung von Flk1-positiven Zellen fördert. Als direktes Zielgen von MesP1 wurde der *wnt*-Signalweg-Inhibitor *dickkopf-related protein 1* (*dkk-1*) identifiziert (David, Brenner et al. 2008).

Dkk-1 ist ein Mitglied der dickkopf-Familie und wird von verschiedenen Zellen sezerniert. Es besitzt zwei Cystein-reiche Regionen und ist durch seine *wnt*-inhibierende Wirkung in verschiedene Phasen bzw. Regionen der Embryonalentwicklung involviert. Die Antagonisierung von *wnt* erfolgt über zwei Wege. Zum Einen wird die Interaktion von Wnt mit dem Gen für das *low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6* (LRP5/6) blockiert, zum Anderen bildet Dkk-1 einen Komplex mit dem Transmembranprotein KREMEN, welches die Internalisierung von LRP5/6 begünstigt. LRP5/6 ist ein wichtiger Co-Rezeptor im kanonischen *wnt*-Signalweg. Durch die Internalisierung steht er für diese Funktion nicht mehr zur Verfügung, was zur Inhibierung des *wnt*-Signalwegs führt (Semenov, Tamai et al. 2001; Cheng, Biechele et al. 2011). Die Blockade des kanonischen *wnt*-Signalwegs führt zur Initialisierung der Kardiovaskulogenese im Embryo (Eisenberg and Eisenberg 2006).

Bondue et al. konnten ebenfalls 2008 zeigen, dass eine transiente Expression von MesP1 über einen intrinsischen und zellautonomen

Einleitung

Mechanismus die Spezifizierung von Zellen zu kardiovaskulären Vorläuferzellen beschleunigt und verstärkt. In ihren Experimenten band MesP1 direkt an regulatorische DNA-Abschnitte, welche in Promotorregionen von Schlüsselgenen der Kardiogenese zu finden sind. Zusätzlich hatte MesP1 einen negativen regulatorischen Einfluss auf Schlüsselgene, welche für andere mesodermale und endodermale Differenzierungswege verantwortlich sind (Bondue, Lapouge et al. 2008).

Im selben Jahr zeigte die Arbeitsgruppe um Lindsley, dass MesP1 die Entwicklung des Mesoderms unabhängig vom wnt-Signalweg begünstigt. In ihren Experimenten beobachteten die Forscher, dass eine vorübergehende MesP1-Expression Veränderungen im Differenzierungsverhalten von Zellen auslöst, welche mit epithelial-mesenchymalen Transitionen verknüpft sind. Auch diese Gruppe stellte fest, dass die Expression von MesP1 das Entwicklungspotenzial embryonaler Stammzellen insofern einschränkt, als keine hämatopoetischen Stammzellen mehr entstehen können, sondern nur noch kardiovaskuläre Progenitorzellen (Lindsley, Gill et al. 2008).

1.5.5 Regulation des frühen kardialen Transkriptionsfaktors *mesoderm posterior 1* (*mesP1*)

Die Regulation des als essentiell für die embryonale Herzentwicklung geltenden Transkriptionsfaktors *mesoderm posterior 1* (*mesP1*) war bisher vollkommen unklar. Dieser Faktor gilt als der früheste Marker aller kardiovaskulären Vorläuferzellen (Saga, Hata et al. 1996; Saga, Miyagawa-Tomita et al. 1999; Kitajima, Takagi et al. 2000; Saga, Kitajima et al. 2000; Kitajima, Miyagawa-Tomita et al. 2006; David, Brenner et al. 2008).

Für das Verständnis der komplexen Vorgänge, die bei der Initiation der embryonalen Herzentwicklung ablaufen, ist eine Untersuchung der Regulation dieses Transkriptionsfaktors von entscheidender Bedeutung. Verschiedene Arbeiten haben sich mit der Herkunft früher kardialer Vorläuferzellen beschäftigt. Die frühen Herzvorläuferzellen wurden zuerst von Sakurai et al. (Sakurai, Era et al. 2006) als doppelt positiv für die

beiden Marker PDGFR und VEGFR/flk-1 beschrieben, später erweiterten Bondue et al. (Bondue, Lapouge et al. 2008) diese um den Marker CXCR4. Sowohl Bondue et al. als auch David et al. zeigten, dass die Differenzierung von ESC zu einer Flk-1-positiven Zellpopulation durch MesP1 induziert wird.

Als möglichen Regulator früher kardialer Zellen nannten Izumi et al 2007 einen in Zusammenhang mit der Mesodermbildung untersuchten Marker: Eomesodermin. Izumi zeigte, dass es nach Eomesodermin *knock down* mit RNAi zu einer fast vollständigen Unterdrückung des Auftretens PDGFR-VEGFR-doppelt-positiver Zellen in der Durchflußzytometrie kommt. Diese Population, die eben wie oben beschrieben, als Quelle kardiovaskulärer Zellen angesehen wird, blieb hingegen bei einem *knock down* des frühen Transkriptionsmarkers Brachyury(T), welchen Izumi ebenfalls untersuchte, komplett unbeeinträchtigt (Izumi, Era et al. 2007).

In starkem Widerspruch zu diesen Erkenntnissen steht die Beschreibung von Kattman et al. aus dem Jahr 2006, der die kardiovaskulogenen Zellen auf eine sowohl für Brachyury(T), als auch FLk-1/VEGFR2 positive Fraktion zurückführt (Kattman, Huber et al. 2006).

Beide Faktoren, Eomesodermin und Brachyury(T), werden zu einem frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung exprimiert und sind bekannt dafür, maßgeblich an Prozessen der Mesodermformierung beteiligt zu sein. Aus diesem Grund wurden sie für die vorliegende Arbeit ausgewählt und ihre Funktion hinsichtlich der Aktivierung des *mesP1*-Gens analysiert.

1.5.6 Der Transkriptionsfaktor Brachyury(T)

Das Gen *brachyury(T)* wurde zuerst 1927 von Nadine Dobrovolskaïa-Zavadskaïa beschrieben, die eine Mutation entdeckte, die in heterozygoten Mäusen zu einer veränderten Länge des Schwanzes und der sakralen Wirbelsäule führte. In homozygoten Mäusen kam es auf Grund einer fehlerhaften Entwicklung des Mesoderms und damit einer fehlenden Verbindung zur Plazenta zum Tod der Mäuseembryonen an Tag zehn der Embryonalentwicklung (Korzh and Grunwald 2001). Erstere Beobachtungen führten zur Bezeichnung „*brachyury(T)*“ entsprechend der griechischen Vokabeln für „kurz“ (*brakhus*) und „Schwanz“ (*oura*). Brachyury(T) wird auch als T (für *tail* = Schwanz), sein Gen auch als *T*-

Einleitung

gene bezeichnet und ist damit namensgebend für eine in seinem Protein enthaltene charakteristische Aminosäuresequenz, die sogenannte T-Box. Die T-Box ist eine DNA-Bindungsdomäne, Proteine welche die T-Box enthalten fungieren als Transkriptionsfaktoren. Sie ist definiert als die kleinste Region, die notwendig und hinreichend ist, um eine DNA-Bindung zu gewährleisten. Alle Mitglieder der T-Box-Familie binden an der DNA-Sequenz TCACACCT.

T-box (*tbx*) Gene repräsentieren eine phylogenetisch konservierte Familie von Genen, welche für Transkriptionsfaktoren kodieren, die eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung, besonders der Entwicklung der Gliedmaßen und des Herzens spielen. Dabei können sie Genexpression sowohl aktivieren als auch inhibieren.

Das murine *brachyury(T)*-Gen wurde 1990 von Herrmann et al. kloniert und kodiert für ein 436 Aminosäuren langes Protein. Dessen DNA-Bindungsdomäne befindet sich in den ersten 229 Aminosäuren und bindet an der Sequenz TCACACCT (Kispert and Herrmann 1993; Kispert and Herrmann 1993; Stott, Kispert et al. 1993). Die Bindung erfolgt als Dimer. Eine C-terminal gelegene Helix des Proteins fügt sich dabei tief in eine DNA-Furche ein, ohne dass die DNA gebogen wird (Clements, Taylor et al. 1996; Muller and Herrmann 1997).

In Untersuchungen des Expressionsmusters wiesen Herrmann et al. *Brachyury(T)*-mRNA zu Beginn der Gastrulation in großen Teilen des entstehenden Mesoderms nahe des Primitivstreifens nach und im primitiven Ektoderm. Ab Tag 9.5 der Embryonalentwicklung konnten *Brachyury(T)*-Transkripte nur noch in der *Chorda dorsalis* nachgewiesen werden (Wilkinson, Bhatt et al. 1990).

In zahlreichen anderen Spezies sind Gene mit vergleichbarer Basensequenz zum *brachyury(T)*-Gen identifiziert worden, die als Homologe angesehen werden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Homologe zum murinen T-Gen in anderen Spezies

Spezies	Gen-Bezeichnung
<i>Xenopus laevis</i> (Krallenfrosch)	<i>xbra</i>
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	<i>zf-T</i> oder <i>ntl</i>

Einleitung

<i>Gallus gallus</i> (Huhn)	ch-T
<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruchtfliege)	trg
<i>Echinodermata</i> (Stachelhäuter)	hp-Ta
<i>Amphioxiformae</i> (z.B. Lanzettfischchen)	amBra
<i>Ascidacea</i> (Seescheiden)	as-T, ci-Bra
<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	hBra
<i>Mus musculus</i> (Maus)	mBra

Einleitung

1.5.6.1 Charakterisierung des humanen Brachyury(T)-Gens und –Proteins

Das humane T-Gen wurde 1996 von Y. H. Edwards et al. kloniert und das Protein untersucht. Das Gen ist auf Chromosom 6q27 lokalisiert, ist 10 kb lang und enthält zehn Exons. Die kodierende Region ist 1305 Nukleotide lang und wird zu einem 435 Aminosäuren langem Protein translatiert. Die Nukleotid-Sequenz der kodierenden Region zeigt sich zu 85% identisch zum Homolog in der Maus, 91% der Aminosäure-Sequenz stimmen überein, wobei die höchste Übereinstimmung im Bereich der T-Box zwischen Aminosäure 1 und 223 liegt, mit nur zwei unterschiedlichen Aminosäuren.

Auch zu Homologen des T-Proteins in anderen Spezies zeigt sich eine zum Teil sehr hohe Übereinstimmung (siehe Tabelle 2.) (Edwards, Putt et al. 1996; Morrison, Papapetrou et al. 1996).

Tabelle 2: Homologe des T-Proteins in unterschiedlichen Spezies

T-Protein-Homologe in unterschiedlichen Spezies	Prozentuale Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz des humanen T-Proteins
Ch-T (<i>Gallus gallus</i>)	80%
Xbra (<i>Xenopus laevis</i>)	75%
Zf-T (<i>Danio rerio</i>)	64%
As-T (<i>Ascidacea</i>)	46%
Trg (<i>Drosophila</i>)	46%

1.5.7 Der Transkriptionsfaktors Eomesodermin

Der T-Box-Transkriptionsfaktor Eomesodermin wurde zuerst in *Xenopus laevis* identifiziert, wo er eine entscheidende Rolle bei der Mesodermbildung spielt und seine maximale Expressionsrate 1-2 Stunden vor allen anderen panmesodermalen Genen erreicht (Ryan, Garrett et al. 1996).

Einleitung

Die T-Box des in der Maus gefundenen Homologs dieses Gens zeigte sich auf Nukleotid-Ebene zu 82% und auf Protein-Ebene zu 93% identisch mit der T-Box von *Xenopus*-Eomesodermin (Wattler, Russ et al. 1998; Hancock, Agulnik et al. 1999).

In situ Analysen in Mäusen zeigten bereits vor dem Zeitpunkt der Implantation im Epiblasten eine Expression des murinen Eomesodermin Homologs. Während und nach der Gastrulation findet sich Eomesodermin im Trophoblasten. Im Embryo selbst kann es im gesamten Primitivstreifen, im entstehenden Mesoderm und im vorderen viszerale Endoderm nachgewiesen werden (Ciruna and Rossant 1999; Hancock, Agulnik et al. 1999; Russ, Wattler et al. 2000; McConnell, Petrie et al. 2005).

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass Eomesodermin ein notwendiger und ausreichender Faktor ist, um die Mesodermbildung zu initiieren, sowie dass er essentiell für die Trophoblastenentwicklung und die Bildung der inneren Zellmasse bei der Gastrulation ist. Mausembryos ohne Eomesodermin stellen ihre Entwicklung kurz nach der Implantation ein und bilden keine organisierten embryonalen und extra-embryonalen Strukturen (Russ, Wattler et al. 2000). In chimären Blastozysten, welche aus Wildtyp-extraembryonalem und mutiertem embryonalem Gewebe bestanden, zeigten sich wenig Auffälligkeiten während der Gastrulation, aber keine typische Verlängerung des Primitivstreifens und kein Aufkommen extra-embryonalen und embryonalen Mesoderms. Untersuchungen in Chimären mit diploiden Wirtsembryonen, in welchen sich mutierte und Wildtyp-Epiblastzellen vermischen konnten, zeigten, dass Eomesodermin nicht absolut für die Differenzierung mesodermaler Zelltypen benötigt wird, aber eine *loss-of-function* Mutation die Migration von Epiblastzellen in den Primitivstreifen beeinflusst (Russ, Wattler et al. 2000; Bruce, Howley et al. 2003; Bjornson, Griffin et al. 2005; McConnell, Petrie et al. 2005).

Als ein mögliches Zielgen von Eomesodermin in der Maus wird *Mml* (*Mouse Mix-like*) beschrieben (Russ, Wattler et al. 2000), da in *Xenopus laevis* gezeigt wurde, dass T-Box-Gene *upstream* von *homebox*-Genen wie *mix* agieren (Tada, Casey et al. 1998; Casey, Tada et al. 1999).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die gezielte Programmierung pluripotenter Stammzellen ist eine vielversprechende Möglichkeit der Gewinnung kardialen Ersatzgewebes zur Therapie ischämischen Myokards. Die fortwährende Erweiterung dieses Forschungsgebiets durch die zunehmende Bedeutung verschiedener Formen der reprogrammierten Zellen (Meissner, Wernig et al. 2007; Takahashi, Tanabe et al. 2007; Ieda, Fu et al. 2010) gebietet die genaue Entschlüsselung der molekularen Vorgänge während der Differenzierungsprozesse der Embryogenese (Hescheler, Fleischmann et al. 1997; Saga, Kitajima et al. 2000; Bondue, Lapouge et al. 2008; David, Brenner et al. 2008; Lindsley, Gill et al. 2008). Besonders attraktiv wird auf lange Frist die gezielte *forward*-Programmierung von pluripotenten Stammzellen durch den Einsatz definierter Faktoren, zu spezifischen Zelltypen für die verschiedenen klinischen Anwendungen sein. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass kardiovaskuläre Vorläuferzellen sowohl in Embryonen als auch während des Differenzierungsvorgangs embryonaler Stammzellen durch die Expression des Transkriptionsfaktors MesP1 charakterisiert werden. Die Aktivierung dieses Faktors im frühen Mesoderm ist bisher noch relativ unklar, es werden verschiedene Faktoren, darunter Brachyury(T) und Eomesodermin diskutiert. In vorliegender Arbeit sollen daher die potentiellen *upstream* Regulatoren des *mesP1*-Gens, Eomesodermin und Brachyury, bezüglich ihrer Rolle bei der Aktivierung der Expression analysiert werden. Genauer gesagt, soll herausgefunden werden, welches dieser beiden Gene die Expression von MesP1 auf transkriptionaler Ebene steuert.

Zunächst sollte eine stabile Überexpression in undifferenzierten murinen embryonalen Stammzellen zeigen, ob bereits das alleinige Vorhandensein von entweder Brachyury(T) oder Eomesodermin zur vermehrten Transkription von *mesP1* führt, oder ob hier zuerst eine Differenzierung zu Mesoderm begonnen haben muss. Anschließend sollte das Differenzierungsverhalten der stabilen Zellklone über die Quantifizierung der sich ausbildenden schlagenden Areale verglichen werden. Auf der Basis dieser Analysen sollte derjenige der beiden Transkriptionsfaktoren, der einen positiven Einfluss auf das kardiovaskulogene Differenzierungsverhalten und die endogenen MesP1-Expression zeigte, auf sein Bindungsverhalten am *mesP1*-Promotor untersucht werden. Dies

Einleitung

sollte mit Hilfe von Reporter-Gen-Assays und *Electrophoretic Mobility Shift* Assay (EMSA) durchgeführt werden, sowie *in vivo* durch Nachweis einer Aktivierung an einem zusätzlich transfizierten pMesP1-EGFP-Plasmids. Als Voraussetzung für diese Experimente sollte zuerst in einer Western-Blot-Analyse das Vorhandensein des entsprechenden Transkriptionsfaktor in den überexprimierenden Zellklonen nachgewiesen werden. Die Konsequenzen des Verlusts des endogenen Transkriptionsfaktors auf die MesP1-abhängige Kardiovaskulogenese in murinen embryonalen Stammzellen sollte mit Hilfe eines *sh-knock down*-Experiments beleuchtet werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob es eine gemeinsame zeitliche oder räumliche Expression des ausgewählten Transkriptionsfaktors und MesP1 gibt. Dazu bot sich eine Quantifizierung der endogenen Proteinmenge in sich in Differenzierung befindlichen murinen embryonalen Stammzellen im Zeitverlauf mittels Western-Blot-Analyse an, sowie *in-situ*-Hybridisierungen in Mausembryonen. Die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors an den *mesP1*-Promotor und speziell an potentielle Zielsequenzen im Promotor sollten mittels Transaktivierungsversuchen, Reporter-Assays und EMSA untersucht werden. *In-situ*-Hybridisierungen an *knock-down*-Embryonen zur Visualisierung möglicher Folgen eines Verlustes des ausgewählten Transkriptionsfaktors auf die *mesP1*-positiven kardiovaskulogenen Vorläuferzellen *in vivo* sollten das Projekt abschließen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
1kb-DNA-Ladder	NEB	N3232L
α -Monothioglycerol	Sigma	96-27-5
β -Mercaptoethanol	Merck	1.15433.1000
Acrylamid 30% BisSolution	Serva	161-0158
Agarose	Roth	6352.4
Ammoniumpersulfat	Sigma	A-6761
Basal Iscove Medium	Biochrom	FG0465
Blasticidin	Invitrogen	R210-01
Bradfortreagenz	Biorad	500-0002
BCA Protein Assay Reagenz	Thermo Scientific	23224
Chlorophorm	Merck	1.024.451.000
Coomassie Brilliant Blue G-20	Serva	17525
Complete Proteinaseinhibitor (Tabletten)	Roche	11697498001
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma	D-5870
dNTP mix 100 mM	MBI-Fermentas	RO 192
Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 4,5 g/l Glucose	Invitrogen	41965-062

Material und Methoden

Essigsäure 100%	Roth	3738.1
Ethanol 100%	Merck	1.085431.000
Ethidiumbromid	Roth	7870.1
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom (für ES-Zell-Medien) Invitrogen (für Fibroblasten-Medium)	S0615 10270106
Gelatine, porcine	Sigma	G1890
Geneticinsulphat (G418)	Invitrogen	10131-013
Glycin	Roth	3908.2
Glycerin	Roth	3783.1
Kollagenase IV	Invitrogen	17104019
L-Glutamin	Invitrogen	25030-024
LIF (ESGRO)	Millipore	ESG1107
MEM	Invitrogen	11140-35
Methanol	Roth	4627.2
Milchpulver blotting grade	Roth	T145.2
Mitomycin C	Sigma	M0503
NaCl	Roth	3957.1
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	2326.2
Orange G	Sigma	0-1625
Penicillin Streptomycin	Invitrogen	15070-063
Phenolchlorophorm	Roth	A1562

Material und Methoden

Phenylmethylsulfonylflurid	Sigma	P7626
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen	H-5460.1000
Plasmocin	Cayla (Invitrogen)	ant-mpt
Ponceau S	Sigma	P-3504
Proteinmarker (Prestained Protein Marker Broad Range)	BioLabs	P7708S
Salzsäure (HCl)	Roth	4625.1
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Biorad	161-0801
Transfektionsmedium	Opti-MEM® Invitrogen	51985026
Transfektionsreagenz (Mirus TransIT-LT1 Transfection reagent)	Mobitec/Fischer scientific	MIR 2300
Tris	Roth	5429.3
Trypan-Blue-Solution	Sigma	T8154
1x Trypsin-EDTA	Invitrogen	25300-054
10x Trypsin-EDTA	Invitrogen	15400
Tween 20	Biorad	161-0781
Zeocin	Invitrogen	ant-zn1p

2.1.2 Synthetische Proteine

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Brachyury/Bry protein	abcam	ab114235

2.1.3 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
DNase 1	Qiagen	18047-019
Ligase	Invitrogen	
Proteinase K	Invitrogen	25530-015
Reverse Transkriptase	Invitrogen	
Taq-Polymerase	Amersham Healthcare	GE 27-0799061

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Brachyury(T)- Antikörper (goat polyclonal)	Santa Cruz	sc-17745X
Anti-Eomesodermin- Antikörper (rabbit polyclonal)	Abcam	ab233-45-100
goat-anti-rabbit IgG- HRP Sekundär- Antikörper	Santa Cruz	sc-2004
donkey-anti-goat IgG- HRP Sekundär- Antikörper	Santa Cruz	sc-2020

2.1.5 Kits

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Realtime RT-PCR Polymerase-Mix	BioRad IQ SYBR Green Super Mix kit	

Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega	E1910
RNA MiniKit RNeasy	Qiagen	74104
Omniskript RT-Kit Quiagen	Qiagen	205113

2.1.6 Laborgeräte und sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Bakterienkulturschalen	Greiner	3500142
Brutschrank	Jouan IG 150	
Einfrierbehälter	Nalgene	
Elektrophorese Netzteil	Consort Powersupply E865	
FACS Analysegerät	Beckman Coulter Epica XL	
FACS-Analyse Software	EXPO 32 ADC	
Filme	Amersham Hyperfilm TM ECL GE Healthcare	28906837
Filmentwickler	Du Pont DP 250 Daylight Processor	
Fotokassette	Amersham Hyperscreen	
Gelelektrophoresekammer	BioRad	
Gelvideokammer	BioRad Gel Doc 2000	
Handschuhe	Hartmann Peha-soft satin powderfree	2100398

Material und Methoden

Heizblock	HLC-biotech HBT 130	
Kryo-Tube Einfrier- Röhrchen	Nunc	2013-10
Labormagnetrührer	Heidolph MR 3001	
Mikroskop	Zeiss Axiovert 200	
Mikroskop-Photokamera	Carl Zeiss Axio Cam HRc	
Mikroskop-Videokamera	Sony DCR-TRV19E	
Parafilm® M	American national can company	
Photometer	Tecan Genios Multifunktion Fluorescence Absorbance and Luminescence Microplate Reader	
Plattformschüttler	Heidolph polymax 1040	
PVDF-Membran	Zefa laborservice GmbH Immobilon-P hydrophob, Porengröße 0,45 µm	Z.IPVH00010
Realtime RT-PCR Cyclers	Biometra T personal Thermal Cyclers BioRad MyiQ Single Color PCR Detection System	
Rüttelplatte	neolab orbizal shaker	

Material und Methoden

Sterilbänke	Jouan MSC 12 Heraeus Hera safe Heraeus Hera guard	
Sterilfilter für Spritzen 0,2µm	Peske	9972-21
Sterilfilter Bottel-Top	Peske	9925-50
Vortex	Vortex Genie 2 Scientific Industries	
Wasserbad	Medingen W 12	
Whatman-Papier	unterschiedliche Firmen	
Zellkulturflaschen T25 Vent-Kappe	Peske	902500
Zellkulturflaschen T75 Vent-Kappe	Peske	907500
Tellkulturflaschen Vent- Kappe	Peske	901500
Zellkulturflaschen T25 Filterkappe	M&B Stricker	TPP90026
Zellkulturflaschen T75 Filterkappe	M&B Stricker	TPP90073
Zellkulturflaschen T150 Filterkappe	M&B Stricker	TPP90151
Zellkulturschalen 10 cm	Schubert und Weiss	294766416
Zellkultur-6-Well-Platten	Peske	9206-40
Zellkultur-24-Well-Platten	Peske	9224-40
Zellkultur-96-Well-Platten	Greine Bio-one	650101

Zentrifugen	Hettich-Zentrifuge Mikro 20 BR 4 Jouan	
-------------	--	--

2.1.7 Biologisches Material

2.1.7.1 Zellen

Beschreibung	Herkunft
Murine embryonale Stammzellen eines Subklons der Linie D3 (Mäusestamm Agouti 120/SV) kurz GSES genannt	Dr. M. Aguet ISREC, Lausanne

2.1.7.2 Bakterien

Stamm	Beschreibung	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F-; <i>mcrA</i> ; $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$; $\phi 80/lacZ\Delta M15$; $\Delta lacX74$; <i>recA1</i> ; <i>araD139</i> ; $\Delta(araleu)7697$; <i>gal(U)</i> ; <i>galK</i> ; <i>rpsL</i> (Str ^R); <i>endA1</i> ; <i>nupG</i> ; λ^-	Invitrogen

2.1.8 Vektoren

2.1.8.1 Expressionsvektor pIRES2-EGFP

<i>pIRES2-EPFP</i>	Clontech
--------------------	----------

Dieses Plasmid wurde verwendet um ein humanes *brachyury(T)*-Überexpressions-Konstrukt sowie ein humanes *eomesodermin*-Überexpressions-Konstrukt zu generieren (siehe Abbildung 8). *pIRES2-EPFP* enthält eine Region mit mehreren Restriktionsschnittstellen, (*MCS* = *multiple cloning site*), in welche das humane *brachyury*-Gen oder das humane *eomesodermin*-Gen kloniert wurden. Zwischen der *MCS* und der für einen Fluoreszenz-Marker (*EGFP* = *enhanced green fluorescent*

protein) kodierenden Region enthält der Vektor als zusätzliche Translations-Startstelle eine „*internal ribosomal entry site*“ (IRES) aus dem Enzephalomyokarditisvirus. Dies hat den Vorteil, dass von dem in die MCS klonierten Gen und dem *EGFP*-Gen ein gemeinsames Transskript gebildet wird, von welchem beide Proteine separat translatiert werden können.

Bei *EGFP* handelt es sich um ein Fluoreszenzprotein von 29 kDa, mit einem Exzitationsmaximum bei 488 nm und einem Emissionsmaximum bei 507 nm. Epifluoreszenzmikroskopisch können dadurch Zellklone identifiziert werden, welche grün fluoreszieren, also sowohl das Plasmid aufgenommen haben, als es auch transkribieren und translatieren.

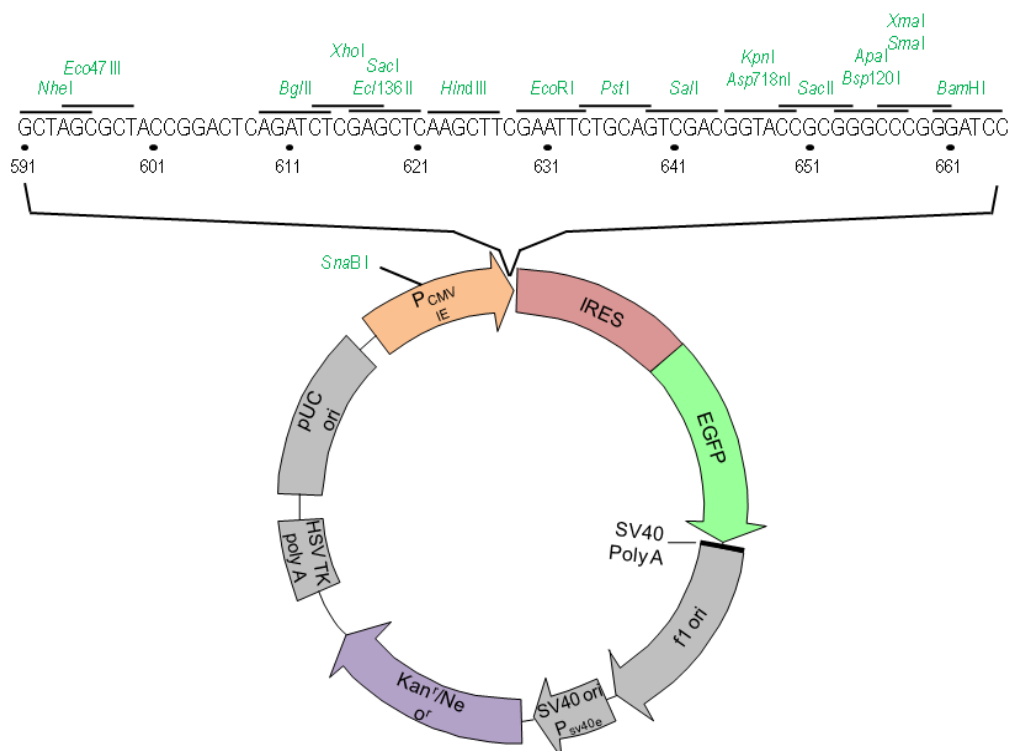


Abbildung 8: Expressionsvektor pIRES-EGFP mit *multiple cloning site* (MCS) (Sequenzausschnitt)

Die Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette ermöglicht die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen durch Beigabe von Aminoglycosid-Antibiotika ins Kulturmedium. Hierfür wurde Geneticin (G418) verwendet.

2.1.8.2 pCMV-Sport6-Vektor

pCMV-Sport6	rzpd
-------------	------

Humane *eomesodermin*- und *brachyury(T)*-cDNA wurde aus den jeweiligen pCMV-Sport6-Plasmiden (siehe Abbildung 9) der Firma RZPD

(Ressourcenzentrum Primärdatenbank, jetzt *ImaGenes* und *ATLAS Biolabs GmbH*) isoliert.

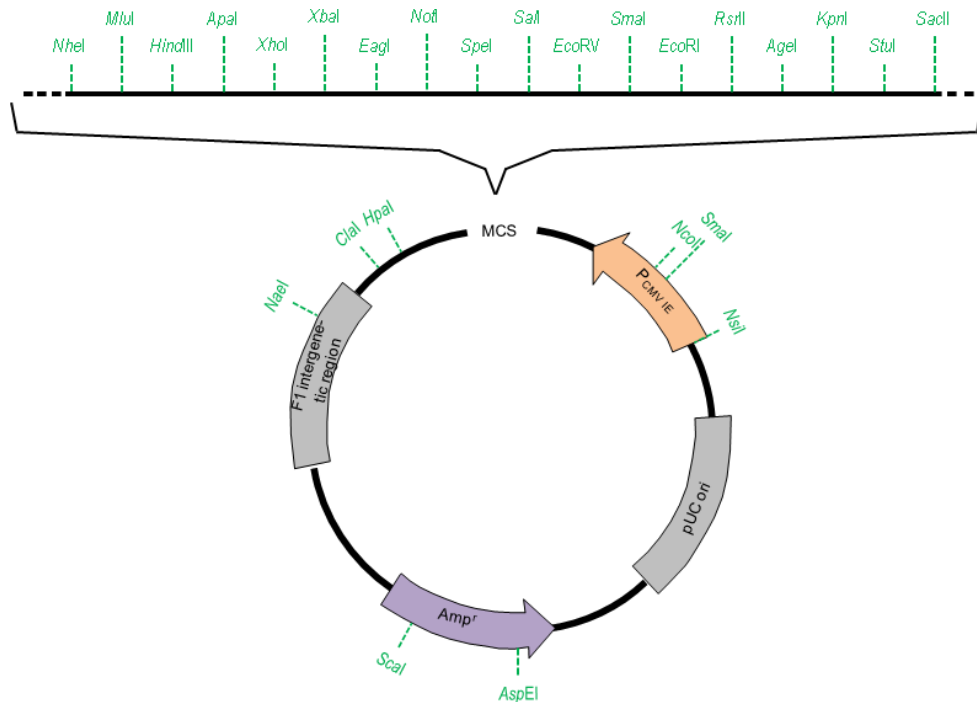


Abbildung 9: pCMV-Sport6

2.1.8.3 Konstrukte für den Dual Luciferase Reporter-Assay

Die direkte Bindung von Brachyury(T)-Protein und Eomesodermin-Protein an potentielle Zielsequenzen im *mesP1*-Promotor sollte mittels Dual Luciferase-Reporter-Assays untersucht werden.

In den Vektor pFireflyLUC-tk (siehe Abbildung 10) waren bereits in Vorarbeiten mithilfe der beiden Restriktionsenzyme *Hind* III und *Bam*H I die in Abbildung 22 dargestellten potentiellen Zielsequenzen für T-Box-Transkriptionsfaktoren des *mesP1*-Promotors kloniert worden.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und um Variabilitäten z. B. im Pipettenvolumen zu eliminieren wurde ein Vektor ko-transfiziert, der eine in der selben Probe messbare, aber unabhängig exprimierte Renilla-Luciferase enthält (siehe Abbildung 11).

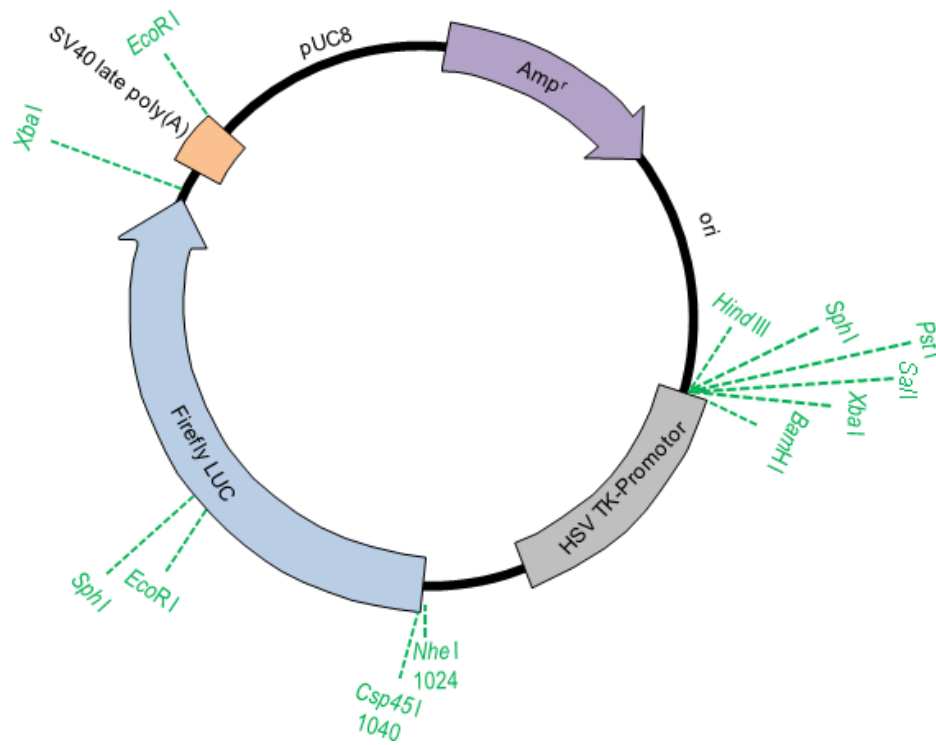


Abbildung 10: pFireflyLUC-tk-Vektor

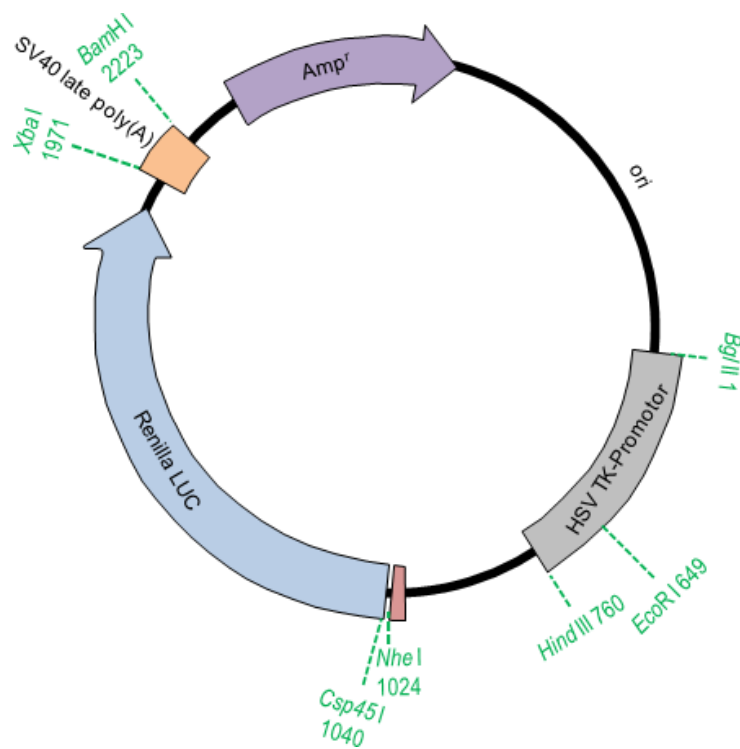


Abbildung 11: pRenillaLUC-tk-Vektor

2.1.8.4 pMesP1- Δ CD4 und pMesP1-EGFP

Die Regulation eines 3,4 kb-mesP1-Promotor-Fragments durch das Brachyury(T)-Protein wurde in Transaktivierungsexperimenten untersucht. Dafür wurden Vektoren verwendet, welche bereits in Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe erstellt worden waren (siehe Abbildung 12).

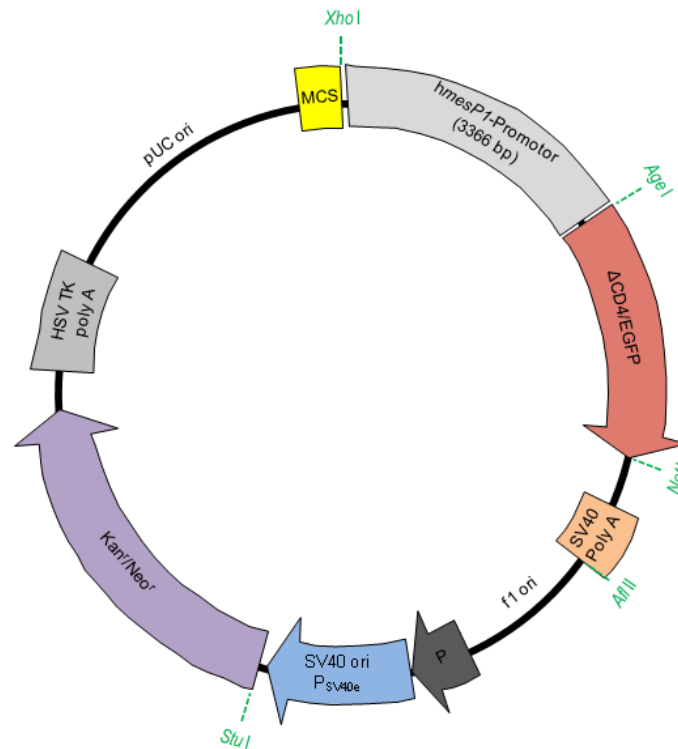


Abbildung 12: pMesP1- Δ CD4 bzw. -EGFP

2.1.8.5 Kontroll-Vektor pCMV-dsRed

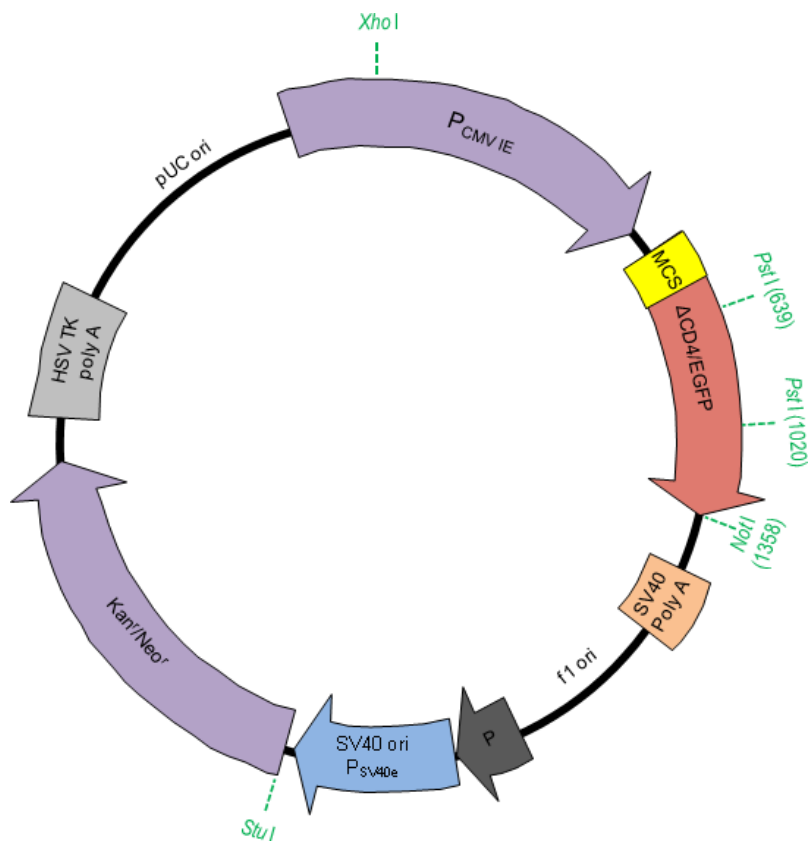


Abbildung 13: pDsRed-Express-N1 4,7 kb

2.1.8.6 Sh-knock down-Konstrukte

Für einen stabilen *knock down* der endogenen Brachyury(T)-mRNA in murinen ES-Zellen wurde das Block-IT System von Invitrogen verwendet. Für die Plasmid-Herstellung wurden folgende Oligonukleotide verwendet (die *loop*-bildende Sequenz ist dabei fett gedruckt):

mBra, upper strand 5'-CACCGCTACAGTCACAGACATTTCT
TCGAAAAAGAAATGTCTGTGACTGTAGC-3'

mBra, lower strand 5'-AAAAGCTACAGTCACAGACATTTCT
TTTCGAAAGAAATGTCTGTGACTGTAGC-3'

veränderte Kontrolle für murines Brachyury(T)

upper strand 5-CACCGGACTAACCACCTTTCATGTA
TCGAAATACATGAAAGGTGGTTAGTCC-3'

lower strand 5'-AAAAGGACTAACCACCTTTCATGTA
TTTCGATACATGAAAGGTGGTTAGTCC-3'

2.1.9 Oligonukleotide

Für den *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)* wurden folgende Oligonukleotide verwendet

hMesP-1 (-1,5kb) GCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACCGCGCC

Im hundertfachen unspezifischen Überschuss wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

hMesP-1us (-1,5kb) GCTGGGATTACaggaaaaaGCCACCGCGCC;

In kleinen Buchstaben sind die mutierten Nukleotide in der T-Box-Bindungsstelle dargestellt.

2.1.10 Primer

Primer für qRT-PCR zum Nachweis der murinen GAPDH-mRNA in transfizierten murinen ES-Zellen:

mGAPDHUp812 5' TCT TGG GCT ACA CTG AGG AC 3'

mGAPDHLo934 5' ACC AGG AAA TGA GCT TGA CA 3'

Primer für qRT-PCR zum Nachweis der humanen Brachyury(T)-mRNA in transfizierten murinen ES-Zellen:

hBraUp174 5' CAC CAA TGA GAT GAT CGT GA 3'

hBraLo279 5' GTC CAG CAG GAA GGA GTA CA 3'

Primer für qRT-PCR zum Nachweis der humanen Eomesodermin-mRNA in transfizierten murinen ES-Zellen:

hEoUp943 5' GTGTTCGTAGAGGTGGTGCT 3'

hEoLo1095 5' CTGTCTCATCCAGTGGGAAC 3'

Primer für qRT-PCR zum Nachweis der endogenen MesP1-mRNA in murinen ES-Zellen:

mMespFloUp604 5' CAG TAC GCA GAA ACA GCA TC 3'

mMespFloLo699 5' GGT TTC TAG AAG AGC CAG CA 3'

Primer für qRT-PCR zum Nachweis der EGFP-Expression in murinen ES-Zellen die mit pIRES2-EPFP transfiziert wurden:

mEGFPU418 5' CAC AAG CTG GAG TAC AAC TAC 3'

mEGFPLoBamH1 5' GTA TGG ATC CTT ACT TGT ACA GCT CGT
CC 3'

Primer für qRT-PCR zum Nachweis der endogenen Brachyury(T)-mRNA-Expression in murinen ES-Zellen:

mBraUp836 5' ACC CAG CTC TAA GCA ACC AC 3'

mBraLo974 5' ACT CCA AGG CTA GAC CAG TT 3'

Primer für qRT-PCR zum Nachweis verschiedener endogener Markergene:

mMef2cUp1326 5' CCC CTT CGA GAT ACC CAC AA 3'

mMef2cLo1476 5' GAA GGT CTG GTG AGT CCA ATG G 3'

mGATA4Up641 5' GAG AGT GTG TCA ATT GTG GG 3'

mGATA4Lo1058 5' GTG GCA TTG CTG GAG TTA C 3'

2.2 Methoden

2.2.1 Statistische Methoden

Mittels T-Test wurde geprüft ob die Mittelwerte zweier Ergebnisse signifikant voneinander abweichen. Dabei wurde ein p-Wert von weniger als 0,05 für signifikant gehalten.

Abweichungen der Ergebnisse vom Mittelwert wurden mit dem *standard error of the mean* (SEM) dargestellt.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Bakterienkultivierung

Transgene E. coli-Stämme wurden über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator mit LB Medium unter der dem Plasmid entsprechenden Antibiotikaselektion inkubiert.

2.2.2.2 Transformation von *Escherichia coli*

Das Einschleusen von Fremd-DNA in Bakterien erfolgte mittels Hitzeschockmethode.

50 µl kompetenter TOP10-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 7,5 µl des Ligationsansatzes versetzt und durch Schnippen des Reaktionsgefäßes

gemischt. Die Lösung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, 30 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und eine weitere Minute auf Eis ausgekühlt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit 250 µl SOC-Medium im Schüttelinkubator (225 rpm). Anschließend wurde die Kultur kurz zentrifugiert und 90% bzw. 10% des Ansatzes auf Platten mit einem dem Plasmid entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

2.2.3 Techniken der Nukleinsäureisolierung und-analytik

2.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

Große Mengen an DNA wurden mit dem Qiagen MaxiKit nach Angaben des Herstellers gewonnen. Geringere Mengen zu analytischen Zwecken wurden als sogenannte Mini-Präparation oder TELT-Präparation nach folgender Methode isoliert: 3-4 ml einer Kultur wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min, Raumtemperatur). Das Sediment wurde in 150 µl TELT-Puffer und 15 µl Lysozym resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Denaturierung des Lysozyms wurde die Probe 120 Sekunden bei 95°C aufgekocht. Plasmid-DNA wurde von der chromosomalen DNA und den Proteinen durch Inkubation auf Eis für 5 Minuten getrennt. Die chromosomale DNA und die Proteine präzipitieren und können durch Zentrifugation (14000 rpm, 20 min, 4°C) abgetrennt werden. Die im Überstand vorhandenen Plasmide wurden in ein zweites Eppendorf-Gefäß überführt und durch Inkubation mit 1 Volumen Isopropanol über 5 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Nach einem Waschschriff mit 70%-igem Ethanol wurde die DNA über 10 Minuten luftgetrocknet, in 25-30 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase resuspendiert und über 5 Minuten bei 65°C inkubiert.

2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Verwendete Puffer, Medien und Lösungen:

Komponente:	Menge:
<i>50 x TAE-Puffer:</i>	
Tris-Acetat (pH 8,0)	2 M

Essigsäure	950 mM
EDTA	50 mM

DNA-Fragmente wurden durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese in 1xTAE-Puffer aufgetrennt. Verwendet wurden je nach zu erwartender Fragmentgröße Gele mit 1-2% Agarose. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in Puffer gelöst, in der Mikrowelle bei 360 W aufgeköcht, auf Handwärme abgekühlt und nach Zugabe von 0,5 mg/ml Ethidiumbromid in eine Gelkammer gegossen.

Die aufzutragenden Proben wurden mit 10 Vol% DNA-Auftragspuffer versetzt, die Elektrophorese erfolgte bei 60-120 Volt. Als Längenstandard wurde eine 1000 bp-Ladder (NEB) verwendet. Die DNA Banden wurden unter UV-Licht in einem Transluminator sichtbar gemacht und abfotografiert.

2.2.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus embryonalen Stammzellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus murinen embryonalen Stammzellen erfolgte mittels RNeasy-Mini-Kit aus circa 1×10^6 Zellen (entspricht circa 40 μ l Zellmaterial nach Zentrifugation bei 2.500 rpm über 3 Minuten bei Raumtemperatur).

Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

2.2.3.4 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese mit dem Omniscript RT-Kit von Qiagen wurden jeweils 2 μ g der isolierten Gesamt-RNA (siehe Kapitel 2.2.3.3) mit H₂O versetzt sodass sich eine Menge von 12,75 μ l ergab. Dazu wurden 2 μ l Puffer, 2 μ l dNTP Mix (5mM), 2 μ l Random-Primer-Verdünnung (100 ng/ μ l) bzw. Specific-Primer-Verdünnung (100 pg/ μ l), 1 μ l Omniscript Transkriptase (4U/ μ l), sowie 0,25 μ l RNase-Inhibitor gegeben. Die Reaktion erfolgte für 60 min bei 37°C, anschließend wurden die Proben für 5 min auf 93°C erhitzt. Das Volumen wurde durch Zugabe von 20 μ l zweifach destilliertem Wasser verdoppelt, die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

2.2.3.5 Quantitative RT-PCR

Die aus Gesamt-RNA durch reverse Transkription (siehe Kapitel 2.2.3.4) gewonnene cDNA wurde zur Quantifizierung von Markergenen mittels Real-Time-PCR (qRT-PCR) genutzt. Um geeignete Sequenzen zur Erstellung von Primerpaaren zu ermitteln, wurde die DNA Star Software verwendet. Die Spezifität der Primerpaare wurde durch eine PCR und eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.3.2) überprüft.

qRT-PCR erlaubt die Quantifizierung spezifischer DNA-Abschnitte dadurch, dass nach jedem Vervielfältigungszyklus die Anzahl der entstandenen Kopien durch Fluoreszenzmessung bestimmt wird. Ein fluoreszierender Farbstoff, wie das für vorliegende Arbeit verwendete SYBR-Green, lagert sich an doppelsträngige DNA an und ändert dadurch sein Emissionsmaximum. Es besteht somit eine direkte Korrelation zwischen der Mengenzunahme der gewünschten DNA-Kopien und der Zunahme der detektierten Fluoreszenz. Erst ab einer gewissen Mindestmenge von DNA-Kopien kann es zu einer positiven Messung kommen, es folgt eine exponentielle Phase, dann eine Übergangsphase und schließlich wird ein Fluoreszenzmaximum erreicht. Der Fluoreszenzwert, der der zehnfachen Standardabweichung des Hintergrundsignals entspricht, gilt als Signalgrenzwert (*threshold*), dessen Überschreitung als Durchbruchzyklus *CT* (*cycle threshold*) einer qRT-PCR definiert wird.

2.2.4 Reporter-Assay

Um die Interaktion des Transkriptionsfaktors Brachyury(T) mit ausgewählten Sequenzabschnitten des *mesP1*-Promotors zu untersuchen wurde mit dem Dual Luciferase Reporter Assay gearbeitet. Dual bedeutet dabei, dass in einem System zwei unabhängige Reporter-Enzyme zeitgleich exprimiert und gemessen werden. Eines der beiden Enzyme wird konstitutiv exprimiert und dient als interne Kontrolle. Die Expression des zweiten Enzyms wird hierauf normalisiert. Eine technisch bedingte Variabilität der Ergebnisse kann so deutlich reduziert werden.

Im Dual Luciferase Reporter-Assay wird mit *firefly* und *renilla* Luziferasen gearbeitet, Enzymen, welche aufgrund ihres unterschiedlichen evolutionären Ursprungs eine entsprechend individuelle Struktur haben und

nicht dieselben Substrate verarbeiten können. Beides sind Proteine, welche posttranslational nicht verarbeitet werden müssen, sondern sofort aktiv werden können.

Firefly Luziferase verarbeitet ein Luziferin aus Glühwürmchen, die Fluoreszenz-Reaktion, welche durch die *renilla* Luziferase katalysiert wird, stammt aus einer Seefederart, welche zu den Oktokorallen gehört.

Die für das Experiment ausgewählten Promotor-Abschnitte wurden in Vorarbeiten durch Christiane Groß und Robert David in den pFireflyLUC-tk-Vektor Vektor kloniert siehe Kapitel 2.1.8.3.

Die Plasmide wurden nach dem in Kapitel 2.2.7.4 beschriebenen Verfahren in Brachyury(T)-überexprimierende Stammzellklone transfiziert und zwei Tage mit Blasticidin selektiert.

Nach 48 Stunden wurde der Zellrasen 15 Minuten auf der Schüttelplatte mit 250 µl basischem Lysepuffer (BLP) inkubiert, dann mit der Pipette vom Well-Boden gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Durch zweimaliges Einfrieren und wieder Auftauen wurde der Lyse-Vorgang unterstützt. Die Proben wurden entweder sofort verarbeitet oder 1-3 Tage bei -80°C gelagert, dann auf Eis aufgetaut und verarbeitet.

Die Durchführung des Assays erfolgte nach Hersteller-Protokoll.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

Verwendete Puffer, Medien und Lösungen:

Komponente:	Menge:
<i>Lysepuffer</i>	
TrisHCl	100 mM
Complete	4%
PMSF	2%
<i>Ladepuffer:</i>	
TrisHCl pH 6,8	0,125 M
SDS	20 g/l

Material und Methoden

Glycerin	50 Vol%
β-Mercaptoethanol	0,5 Vol%
<i>SDS-Elektrophorese-Puffer (10x) (Running-Buffer):</i>	
Glycin	144g
Trisbase	30g
SDS	10g
H ₂ O	ad. 1 L
<i>Transfer-Puffer (10x) (Towbin-Buffer):</i>	
Tris	0,025 M
Glycin	0,192 M
Methanol	20%
<i>Waschpuffer (10x) (Puffer W):</i>	
Tris	100 mM pH8
NaCl	150 mM
<i>Trenngel:</i>	
Acryl/Bis 30%	2,5 ml
TrisHCl 3M	0,744 ml
SDS 10 g/l	0,6 ml
H ₂ O	2,3 ml
APS	30 µl
TEMED	5 µl
<i>Sammelgel</i>	
Acryl/Bis 30%	0,66 ml
TrisHCl 3M	83 µl

SDS 10 g/l	200 µl
H ₂ O	1,4 ml
APS	10 µl
TEMED	2 µl
<i>Coomassie-Entfärber</i>	
Essigsäure 100%	7,5%
Methanol	50%

2.2.5.1 Gesamtproteinextraktion und Proteinbestimmung

Für die Gesamtproteinextraktion wurden ES-Zellen vom Zellkulturgefäß mittels Trypsin-EDTA abgelöst und mit 2000 rpm über 10 Minuten zentrifugiert. 1×10^6 Zellen wurden in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und anschließend zwei Sekunden lang mit Ultraschall behandelt.

Für die Proteinbestimmung wurde 1 µl der Probe in ein Well einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach Zugabe von 9 µl H₂O und 200 µl Bradfortreagenz (Reagenz A und B im Verhältnis 1:49) erfolgte eine Inkubation bei 37°C auf der Schüttelplatte. Anschließend wurde die Probe im Photometer (Tecan) bei 560 nm in einer Plastikküvette gemessen.

2.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in einem diskontinuierlichem SDS Polyacrylamidgel mittels vertikaler Plattenelektrophorese nach Laemmli in einer 1 mm Minigel-Apparatur. Obige Tabelle zeigt die verwendete Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel berechnet für ein Gel.

Die Gelkomponenten wurden jeweils mittels eines Magnetrührers gemischt. Das Trenngel wurde während der 30-minütigen Aushärtungsphase mit 100 µl 75% Ethanol überschichtet, um das Austreten eingeschlossener Luft zu ermöglichen. Vor dem Gießen des Sammelgels wurde das Ethanol mit Whatman-Papier aufgenommen.

Gele wurden in feuchte Papiertücher gewickelt bei 4°C bis zu zwei Tage lang aufbewahrt.

Vor Auftragung der Proben wurden diese im Verhältnis 1:1 mit Ladepuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte für circa 75 Minuten bei 145 Volt in einer BioRad-Elektrophoresekammer. Als Größenstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker verwendet.

2.2.5.3 Westernblot-Analyse

Nach Auftrennung der Protein-Proben durch SDS-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.5.2) wurden die Proteine in einer BioRad-Apparatur für nassen Transfer auf eine PDVF-Membran übertragen. Die Aktivierung der Membran erfolgte in Methanol für 60 Sekunden, anschließend wurde sie 60 Sekunden mit ddH₂O gewaschen und zusammen mit den Filter und Schwämmen für zehn Minuten in *Towbin-buffer* inkubiert. Abb. 14 zeigt den Aufbau der Transfer-Kassette.

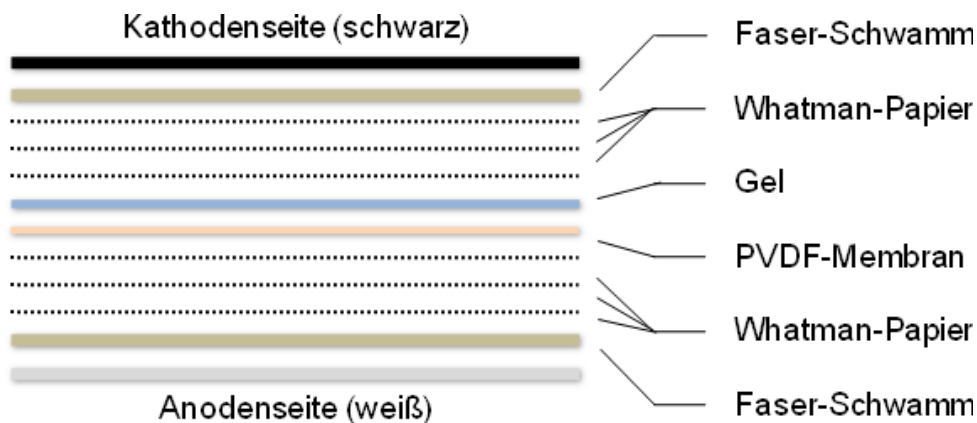


Abb. 14: Aufbau der Transfer-Kassette für den Western-Blot

Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 275 mA über 60 Minuten unter kontinuierlicher Kühlung auf Eis. Im Anschluss daran wurde die Membran bei Raumtemperatur für 30 Minuten in 20 ml Blocklösung geschüttelt.

Nach Abnahme der Blocklösung folgte die 30 minütige Inkubation in einer Verdünnung des primären Brachyury(T)-Antikörpers mit 5% Milchpulver in 1,5 ml Puffer W. Es folgten vier Waschschrte von jeweils 5 Minuten in jeweils 25 ml Puffer W und 0,1% Tween auf der Rüttelplatte. Anschließend wurde die Membran 30 Minuten in einer 1:10000-fachen Verdünnung des Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers mit 5% Milch in 1,5 ml Puffer W inkubiert.

Nach Wiederholung der vier Waschschrirte wurde die Membran abgetropft und mit insgesamt 100 µl der Entwicklerlösung zwischen zwei Folien für 60 Sekunden inkubiert. Die Detektion des Signals erfolgte radiographisch mit Filmen des Typs Amersham Hyperfilm™ ECL.

2.2.6 Bandshift-Assay

Der Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Pierce) durchgeführt. Dabei wurde synthetisch hergestelltes Brachyury(T)-Protein der Firma Abcam verwendet.

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.1.9 aufgeführt.

2.2.7 Zellkulturmethoden

2.2.7.1 Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen

Verwendete Puffer, Medien und Lösungen:

Komponente:	Menge:
-------------	--------

Kulturmedium:

Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose	500 ml
FCS (Biochrom)	10 Vol%
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0,1 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
MEM	10 ml
LIF	1000 U/ml
β-Mercaptoethanol	0,1 mM

Selektionsantibiotika:

G418	0,4 g/l
Blasticidin	

Differenzierungsmedium.

Iscove's Modified Dulbecco's Medium	500 ml
FCS (Biochrom)	10 Vol%
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0,1 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
MEM	10 ml
α-Monothioglycerol	0,004 Vol%

Konservierungs-/Einfriermedium:

FCS (Biochrom)	50 Vol%
Kulturmedium für undifferenzierte ES-Zellen	40 Vol%
DMSO	10 Vol%

Feeder-Zell-Medium:

Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose	500 ml
FCS (Gibco)	10 Vol%
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0,1 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
β-Mercaptoethanol	0,1 mM

Murine embryonale Stammzellen wurden in angefeuchteter Luft bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert und im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturschalen oder -flaschen im oben beschriebenen Kulturmedium. Dabei wurden die 24-Well-Platten mit 1,5 ml Medium pro Well, die 6-Well-Platten mit 2,5 ml Medium pro Well, die 10 cm-Schalen mit 10 ml, die T75-Flaschen mit 15 ml und die T150-Flaschen mit 25 ml Medium befüllt. Die 24-Well-Platten, die 6-Well-Platten und die 10 cm-Schalen wurden zur Verbesserung der Zelladhäsion vor ihrer Verwendung 15 min bei 37°C mit 0,1% Gelatine inkubiert.

Durch die Zugabe von *LIF* (*Leukemia inhibitory factor*) zum Kulturmedium wurde die spontane Differenzierung der murinen ES-Zellen verhindert. Zum Teil wurden die Zellen auch auf feeder-Zellen gezogen (siehe Kapitel 2.2.7.2).

Bei der Kultivierung ohne feeder-Zellen erfolgte die Passage bei einer Konfluenz von circa 30%. Dazu wurde das Medium aus dem Kulturgefäß abgesaugt, der Zellrasen zweimalig mit PBS gewaschen (PBS-Menge circa 2/3 der Mediummenge) und anschließend mit 1xTrypsin-EDTA (1 x TE) für max. 5 min im Brutschrank inkubiert. Für T75-Flaschen wurden 3 ml 1xTE verwendet. Um die Trypsinierungs-Reaktion anzuhalten wurde Kulturmedium (mindestens das doppelte Volumen der TE-Menge) zugegeben. Der durch die Zugabe von FCS im Medium enthaltene Serumprotease-Inhibitor Alpha-1-Antitrypsin inaktiviert das Trypsin, Ca²⁺ und Mg²⁺ saturieren überschüssiges EDTA.

Zellen, welche auf einer *feeder*-Schicht kultiviert worden waren, wurden im Brutschrank 25 min mit Kollagenase inkubiert. Die in Nestern gewachsenen ES-Zellen lösten sich nach Zugabe von 10 ml Kulturmedium durch sanftes Schwenken aus dem Fibroblastenrasen und konnten mit einer Glaspipette aufgenommen werden.

Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1300 Umdrehungen/min über 5 min erfolgte die Resuspension des Zellpellets in Medium und die erneute Aussaat in einer Verdünnung von circa 1:10.

2.2.7.2 Anzucht von *feeder*-Zellen

Als *feeder*-Zellen wurden Mäusefibroblasten verwendet, die selbst hergestellt wurden. Dazu wurden männliche und weibliche CD1-Mäuse verpaart. Am Tag 13 wurden die Embryonen entnommen und rote Gewebeteile (v.a. Augen und Leber) entfernt. Das übrige Gewebe wurde

mit einem Skalpell möglichst fein zerkleinert und für 20 Minuten in 10x Trypsin-EDTA inkubiert. Nach Zentrifugation (1300 U/min; 5 min, RT) wurden die so erhaltenen Einzelzellen in der Konzentration von circa 3 Embryonen pro Flasche auf T75-Zellkulturflaschen ausgesät.

Für die Verwendung als *feeder*-Zellen wurden Fibroblasten der zweiten bis vierten Passage in Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 h durch Mitomycin C inaktiviert. Mitomycin C ist ein aus *Streptomyces caespitosus* isoliertes Antibiotikum, welches durch *cross-linking* komplementärer DNA-Stränge die Replikationsphase einer Zelle verhindert. Inaktivierte Fibroblasten sind daher teilungsunfähig und können die auf ihnen wachsenden Stammzellen nicht überwuchern.

Zur Inaktivierung wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Fibroblasten auf 10cm-Schalen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde der Zellrasen mit 5 ml Mitomycin C (8 µg/ml) überschichtet und für circa zweieinhalb Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS konnten die Fibroblasten direkt als *feeder*-Zellen für die ES-Zell-Kultur verwendet werden.

Da normale Mausfibroblasten durch Selektionsantibiotika wie zum Beispiel Geneticinsulfat abgetötet werden und somit eine Selektion transfizierter ES-Zellklone (siehe Kapitel 2.2.7.5) auf *feeder*-Zellen nicht möglich ist, wurden Geneticinsulfat-resistente Mausfibroblasten hergestellt. Dazu wurden männliche Geneticin-resistente Black 6-Mäuse mit weiblichen CD1-Mäusen verpaart.

2.2.7.3 Konservierung von murinen embryonalen Stammzellen und Mäusefibroblasten

Sowohl ES-Zellen als auch Fibroblasten wurden zur Konservierung in Kryogefäßen bei -160°C aufbewahrt. Dazu wurden sie wie zur Passagierung vom Kulturgefäß abgelöst und abzentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde resuspendiert und auf eine Konzentration von bis zu 6×10^6 Zellen/ml verdünnt. Pro Kryogefäß wurden 400 µl davon zu 600 µl vorgekühltem Einfriermedium gegeben. In einem Isopropanol-ummantelten Einfrierbehälter wurden die Zellen um circa 1°C/min zuerst auf -80°C abgekühlt und circa 24 h später zur dauerhaften Aufbewahrung auf -160°C überführt.

Zellproben, die wieder aufgetaut werden sollten, wurden, um eine Schädigung durch das DMSO im Einfriermedium möglichst gering zu halten, manuell im 37°C-Wasserbad geschwenkt, bis ein Wassermantel um den Eiskern zu erkennen war und anschließend langsam in 10 ml Kulturmedium überführt. Nach Zentrifugation im 15 ml-Röhrchen wurde der DMSO-haltige Überstand abgenommen und die Zellen im Kulturgefäß ausgesät.

2.2.7.4 Stabile Transfektion von murinen embryonalen Stammzellen mit TransIT-LT1 Transfektions-Reagenz

Die Transfektion zur Generierung stabiler Zellklone erfolgte bei einer Konfluenz von circa 40% auf 10cm-Schalen. Der Zellrasen wurde einmal mit 2,5 ml Transfektionsmedium (Opti-MEM®) gewaschen, anschließend wurden 2,5 ml Transfektionsmedium in den Schalen vorgelegt.

Der Transfektionsansatz wurde, wie in Tabelle 3 angeführt, angesetzt. Zuerst wurde das Transfektionsmedium dem TransIT-LT1 Transfektions-Reagenz (Mirus) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der zu transfizierenden Plasmid-DNA folgte eine weitere Inkubationszeit von 15 min. Anschließend wurde der Transfektionsansatz an den Rand der gekippten Zellkulturschale in das vorgelegte Medium gegeben und langsam über den Zellrasen geschwenkt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Transfektionsansatzes für die stabile Transfektion von murinen ES-Zellen

Transfektionsansatz pro 10cm-Schale	
Transfektionsmedium (Optimem)	250 µl
TransIT-LT1 Transfektions Reagenz (Mirus)	15 µl
Plasmid-DNA	10 µg
Transfektionsmedium pro 10cm-Schale (auf Zellrasen vorzulegen)	
Transfektionsmedium (Optimem)	2,5 ml

Nach mindestens 6 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit 5 ml Kultivierungsmedium gewaschen und anschließend 10 ml Kulturmedium zugegeben.

2.2.7.5 Selektion von stabil transfizierten embryonalen Stammzellklonen

Die Zugabe des jeweils notwendigen Selektionsantibiotikums zu stabil transfizierten ES-Zellklonen erfolgte 48 h nach der Transfektion. Im Transfektionsvektor enthaltene Antibiotika-Resistenzgene ermöglichten eine Selektion mit Geneticinsulfat (CMV-Überexpressionsklone) bzw. Geneticinsulfat (G418) und Blasticidin (*sh-knock down*-Klone). Nach täglichem Mediumwechsel mit jeweils zweimaligem Spülen mit PBS konnten circa 7-9 Tage später Einzelklone separiert werden. Dazu wurden durch epifluoreszenzmikroskopische Analyse *EGFP*-exprimierende Zellklone ausgewählt. In einer 96-Well-Platte wurden pro Well 40 µl 1xTE vorgelegt. Anschließend wurden die Zellkulturschalen mit PBS gespült und mit circa 5 ml PBS überschichtet. Mithilfe einer 10µl-Pipette wurden einzelne Klone gelöst, aufgenommen und in jeweils ein Well der vorbereiteten Platte gegeben. Nach zehnmalem Auf- und -Abpipettieren wurden die einzelnen Klone circa 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine möglichst vollständige Vereinzelung der Zellen zu erreichen, und in je ein Well einer 6-Well-Platte überführt. Nach circa 5 Stunden folgte die Zugabe des Selektionsantibiotikums.

Pro Klon wurde aus circa 1×10^6 Zellen genomische DNA extrahiert, um mittels einer mRNA-Analyse die stabile Integration des transfizierten Vektors zu überprüfen (siehe Kapitel 2.2.3.5)

2.2.7.6 Transiente Transfektion von murinen embryonalen ES-Zellen mit TransIT-LT1 Transfektions-Reagenz

Transiente Transfektionen von ES-Zellen wurden ebenso wie stabile Transfektionen (siehe Kapitel 2.2.7.4) mit Hilfe von TransIT-LT1 Transfektions-Reagenz und Optimem-Medium vorgenommen. Die zu transfizierenden Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät.

Analog zur stabilen Transfektion wurde zuerst der Zellrasen mit Transfektionsmedium (500 µl) gewaschen und der Transfektionsansatz angesetzt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Transfektionsansatzes für die transiente Transfektion von murinen ES-Zellen

Transfektionsansatz pro Well einer 6-Well-Platte

Transfektionsmedium (Optimem)	50 µl
TransIT-LT1 Transfektions-Reagenz (Mirus)	3 µl
Plasmid-DNA	1 µg
Kontroll-Plasmid	1 µg
Transfektionsmedium pro Well einer 6-Well-Platte (auf Zellrasen vorzulegen)	
Transfektionsmedium (Optimem)	500 µl

Nach 24 h Stunden Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel mit Kulturmedium.

2.2.7.7 Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen

Zur Differenzierung wurden ES-Zellen in Petrischalen mit 10 ml Differenzierungsmedium in Schwebekultur gezogen. Eine Selektion wurde ab diesem Zeitpunkt nicht mehr durchgeführt.

Die schon nach einem Tag erkennbaren Embryoid-Körperchen (*embryoid bodies* = *EBs*) setzten sich zum Teil ab, hafteten aber kaum an und konnten mit einer 1000µl-Pipette leicht abgespült werden. Ab Tag 3 der Differenzierung ließ die Neigung zur Adhäsion deutlich nach. Für den an Tag zwei und vier notwendigen Mediumwechsel wurden die Zellen durch oben beschriebenes Anspülen vom Schalenboden gelöst und durch kreisende Bewegungen in der Mitte zentriert, wo sie mit einer 1000 µl-Pipette aufgenommen und umgesetzt werden konnten.

Um eine genaue Beobachtung der Differenzierung der EBs zu ermöglichen, wurden diese nach 6 Tagen aus der Schwebekultur in eine adhärenzte Kultur überführt. Um das Alter der EBs anzugeben, ist eine Unterscheidung zwischen den Tagen in Schwebekultur und jenen in adhärentem Wachstum üblich. So wird z. B. Tag zwei nach dem Übergang zur adhärenzten Kultur als Tag 6+2 der Differenzierung bezeichnet.

Die Aussaat in mit Gelatine beschichteten 24-Well-Platten erfolgte am Tag 6+0 der Differenzierung. Es wurden zwischen 20 und 30 EBs pro Well eingesetzt. Um eine optimale Adhäsion zu gewährleisten, erfolgte der nächste Mediumwechsel erst am Tag 6+4 der Differenzierung. Die nun aus etwa 2500 Zellen bestehenden EBs setzten sich binnen zwei Tagen ab und bildeten spontan schlagende Areale aus, die durch Auszählung im Durchlichtmikroskop einfach zu quantifizieren waren.

2.2.7.8 Gewinnung von Zellmaterial für Zeitreihen

Um den Expressionsverlauf bestimmter Markergene über einen gewissen Zeitraum auf mRNA-Ebene durch RT-PCR bzw. auf Proteinebene durch FACS und Westernblot-Analyse zu untersuchen, wurden für mindestens 14 Abnahmezeitpunkte jeweils 1×10^6 Zellen in getrennten Petrischalen in Differenzierung gegeben.

In 8-stündigen Zeitabständen wurde der Inhalt einer Petrischale mittels einer Glaspipette aufgenommen, bei 5.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

2.2.8 ***Knock down von Genen mittels short hair pin-RNA***

Um in einer Zelle die Translation der mRNA bestimmter Gene spezifisch zu verhindern, können kleine mRNA-Stücke, sogenannte *shRNA* (*short hair pin*-RNA, „Haarnadel“-mRNA) verwendet werden. Diese Methode beruht auf einem Mechanismus, der natürlich in Zellen als „RNA-Interferenz“, kurz RNAi bekannt ist. Kleine doppelsträngige mRNA-Stücke (*siRNA*, *small interfering RNA*) treten dabei, unter Komplexbildung mit verschiedenen Enzymen, in Wechselwirkung mit mRNA und führen zu deren Zerschneidung. Die Translation zum funktionellen Protein wird damit

weitgehend verhindert. Die Beschreibung dieses Mechanismus in *Chaenorhabditis elegans* durch A. Fire und C. Mello wurde 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin gewürdigt.

Zur stabilen Suppression der Translation endogener Brachyury(T)-RNA in ESC wurde auf das BLOCK-IT System von Invitrogen zurückgegriffen. Die initiale Plasmid-Herstellung erfolgte nach Anleitung des Herstellers, dabei wurden die in Kapitel 2.1.8.6 beschriebenen Oligonukleotide verwendet.

Die Transfektion der fertigen Plasmide in ESC der Linie GSES wurde wie in Kapitel 2.2.7.4 beschrieben durchgeführt. Zur Selektion wurde wie vom Hersteller beschrieben das Antibiotikum Zeocin verwendet.

2.2.9 *In-situ* Hybridisierung

Mäuse für *in situ*-Hybridisierungen wurden gemäß der EU-Richtlinie 2010/63/EU behandelt. Schwangere Weibchen wurden durch Genickbruch getötet. Dieses Vorgehen benötigt keine Zustimmung durch eine Ethikkommission.

Die Vorbereitung der Mäuseembryonen und die anschließende *in situ*-Hybridisierung erfolgte wie von Lickert *et al.* in ihrer Veröffentlichung im Jahr 2002 beschrieben (Lickert, Kutsch et al. 2002).

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von Vektoren zur Brachyury(T)- bzw. Eomesodermin-Überexpression in embryonalen Stammzellen

Brachyury(T) und Eomesodermin sind hochkonservierte Transkriptionsfaktoren. Aus diesem Grund ist eine Kreuzfunktionalität zu erwarten. Da die Ergebnisse dieser Arbeit langfristig auf humane ES-Zellen übertragen werden sollen, erfolgten die Transfektionen mit humaner cDNA. Dadurch ist auch ein spezifischer Nachweis der mRNA und des Proteins der transfizierten Gene und ihre Unterscheidung von der jeweiligen endogenen RNA und den endogenen Proteinen möglich.

Für diese Arbeit wurden Expressions-Vektoren erstellt, die der Generierung Brachyury(T)- und Eomesodermin-überexprimierender muriner ES-Zell-Klone dienen. Dazu wurde die humane 1,3 kb lange *brachyury(T)*- und die 2,06 kb lange *eomesodermin*-cDNA-Sequenz aus *pCMV-Sport6*-Vektoren der Firma RZPD (Ressourcenzentrum Primärdatenbank, jetzt ImaGenes und ATLAS Biolabs GmbH) (siehe Kapitel 2.1.8.2) amplifiziert (siehe Abbildung 15).

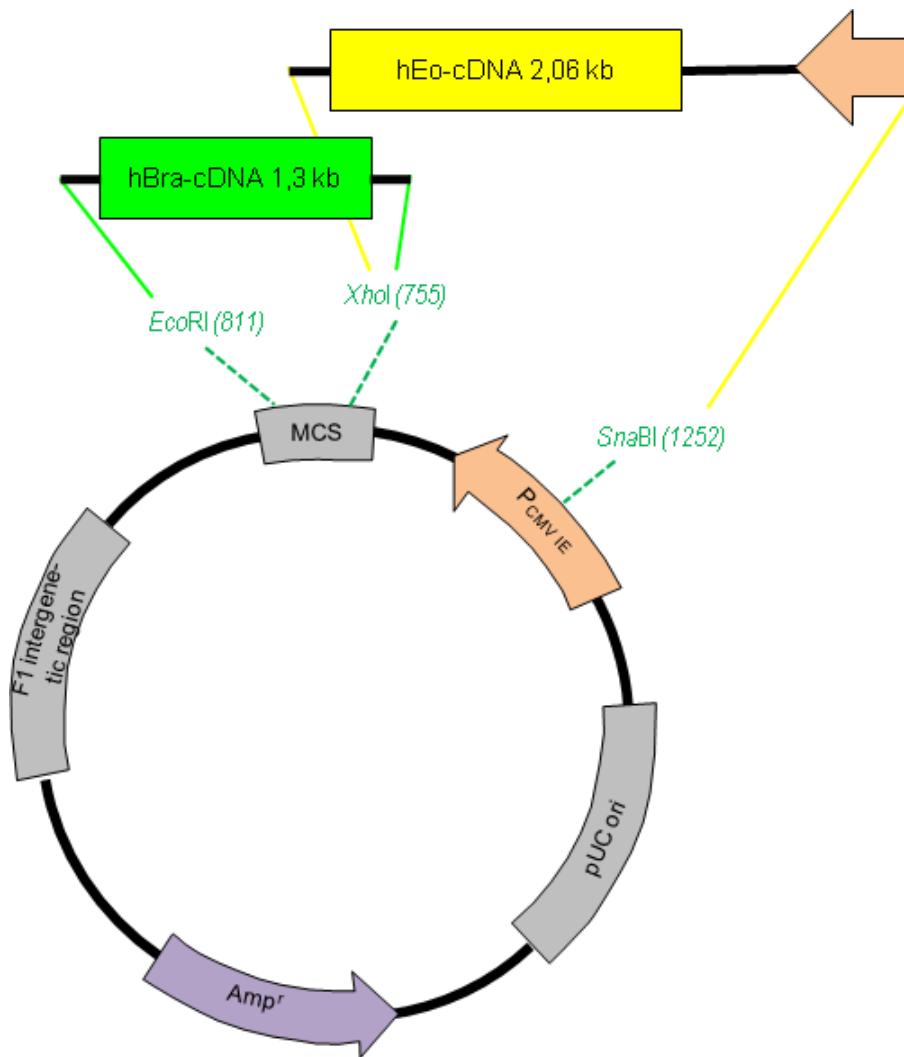


Abbildung 15: Vektoren der Firma rzpd mit humaner Brachyury(T)-cDNA und humaner Eomesodermin-cDNA jeweils nach einem PCMV-Promotor. Diese cDNA wurde für vorliegende Arbeit verwendet.

Das humane *brachyury(T)*-cDNA Amplifikat konnte mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *EcoRI* in die *multiple cloning site* des pIRES2-EGFP-Vektors kloniert werden. Ebenso erfolgte die Klonierung des humanen *eomesodermin*-cDNA Amplifikats durch *SnaBI* und *XhoI* (siehe Abbildung 16: und Abbildung 17:). Die daraus resultierenden Plasmide werden im Folgenden phBra-IRES2-EGFP und phEo-IRES2-EGFP genannt.

Eine mögliche Inaktivierung des PCMV-Promotors im Eomesodermin-Vektor durch den Schneidevorgang, wurde getestet, indem die Vektoren in murine embryonale Stammzellen transfiziert und anschließend auf die Transkription humanen Eomesodermins mittels RT-PCR untersucht wurden (siehe Kapitel 3.3)

Ergebnisse

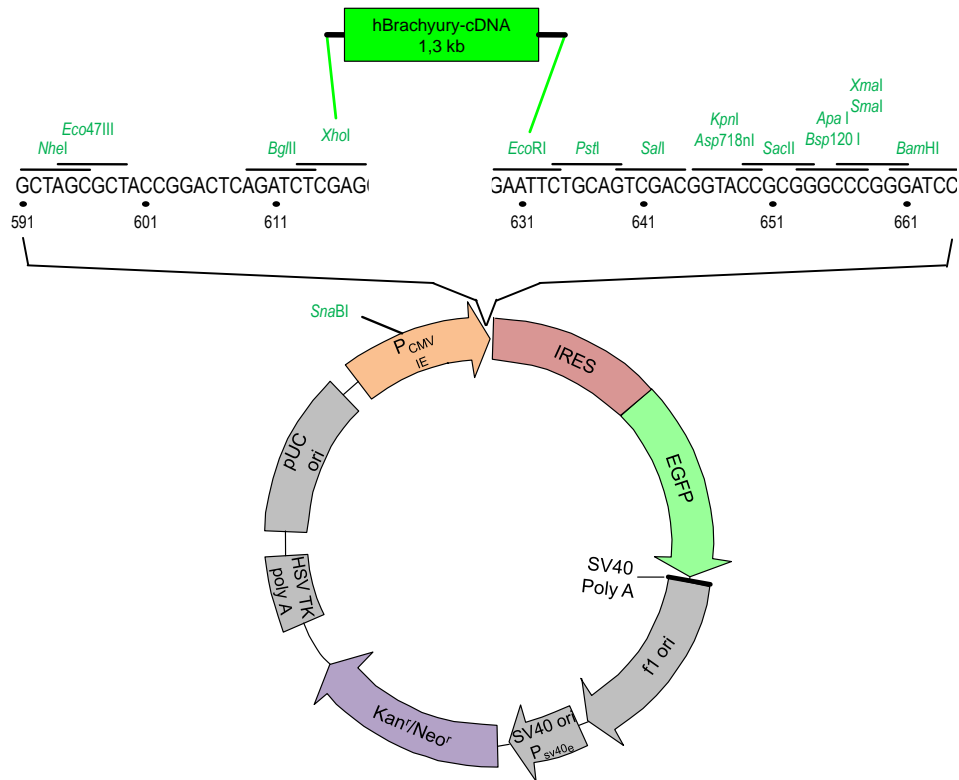


Abbildung 16: Mithilfe der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *EcoRI*, wurde die *brachyury(T)*-cDNA in den Expressionsvektor pIRES2-EGFP kloniert

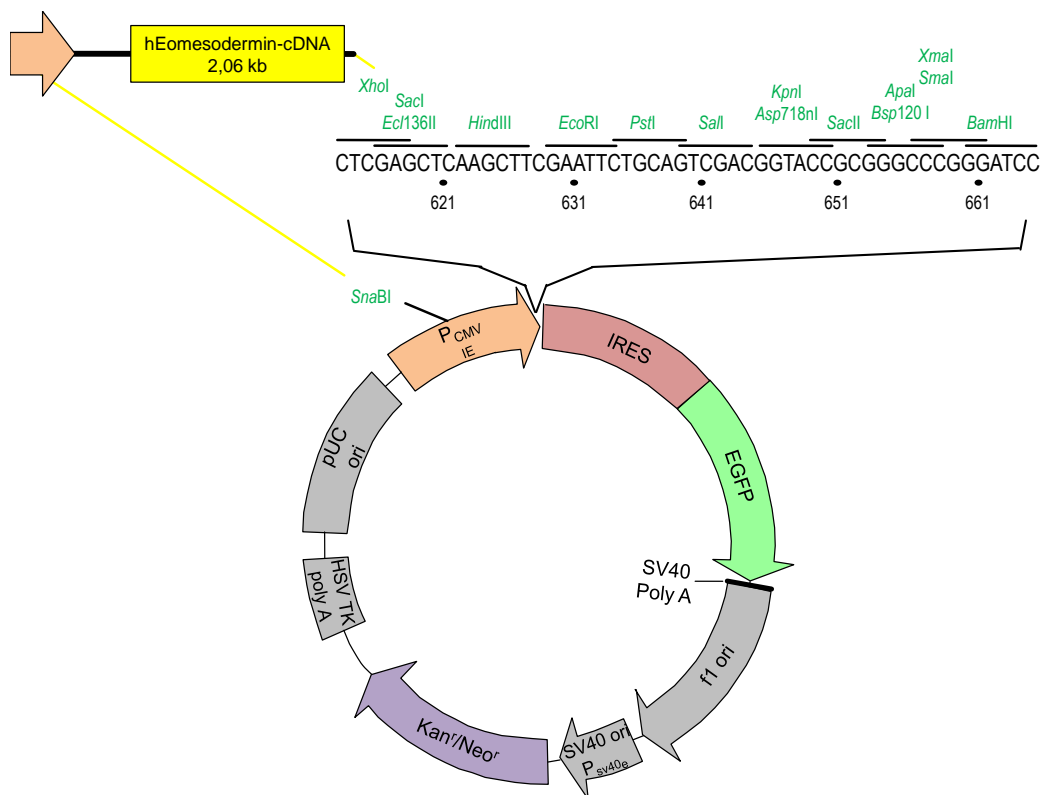


Abbildung 17: die *eomesodermin*-cDNA wurde mithilfe der Restriktionsendonukleasen *SnaBI* und *XhoI* in pIRES2-EGFP kloniert

Ergebnisse

Die resultierenden Plasmide phBra-IRES2-EGFP und phEo-IRES2-EGFP wurden in kompetente *E. coli* (K12)-Bakterienzellen transformiert. Diese wurden unter Kanamycin-Selektion vermehrt und die Plasmide anschließend mittels einer Maxi-Präparation (Qiagen) isoliert.

3.2 Generierung stabil transfizierter ES-Zellklone

Murine embryonale Stammzellen der Linie GSES wurden mit phBra(T)-IRES2-EGFP und phEo-IRES2-EGFP transfiziert (siehe Kapitel 2.2.7.4). Nach circa 7-9 Tagen Kultivierung unter G418-Selektion konnten einzelne stabil transfizierte Zellklone anhand ihrer EGFP-Fluoreszenz (siehe Abbildung 18) unter dem Fluoreszenz-Mikroskop identifiziert und isoliert werden.

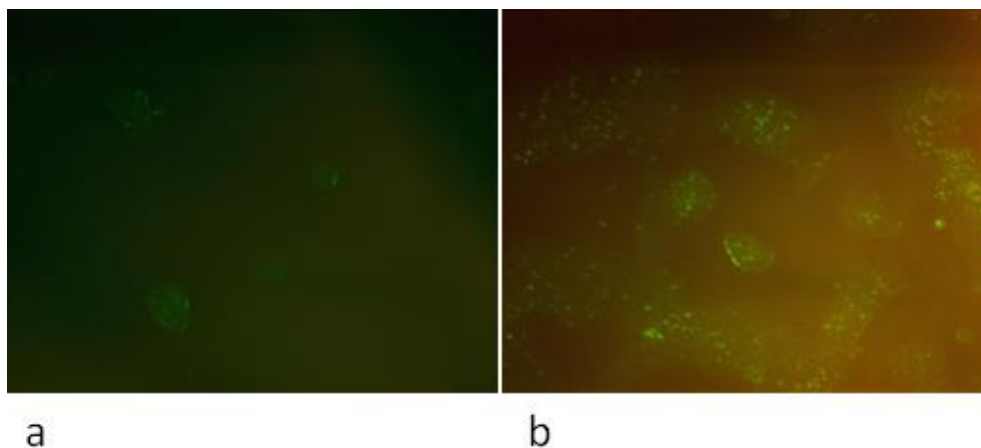


Abbildung 18: EGFP-Fluoreszenz eines stabil transfizierten humanen *brachyury(T)* Klons (a) und eines stabil transfizierten humanen *eomesodermin*-Klons (b)

Die Klone zeigten in *LIF*-haltigem Medium im Vergleich zu untransfizierten Kontrollen normales Wachstum in Kolonieform und eine ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit, was vergleichbar zu den Ergebnissen der Arbeiten von David et al. mit Transfektionen von embryonalen Stammzellen mit *mesP1* und *nkx2.5* ist (David, Brenner et al. 2008; David, Stieber et al. 2009). Daraus ist zu schließen, dass sowohl *Brachyury(T)* als auch *Eomesodermin* jeweils alleine nicht ausreichend sind, um eine Differenzierung zu induzieren.

Ergebnisse

Es wurden etwa 15 Klone gewonnen, unter konsequenter Selektion angezogen und zur Verwendung in nachfolgenden Analysen kryokonserviert.

3.3 Nachweis der Expression der trans-fizierten Plasmid-cDNA mittels RT-PCR

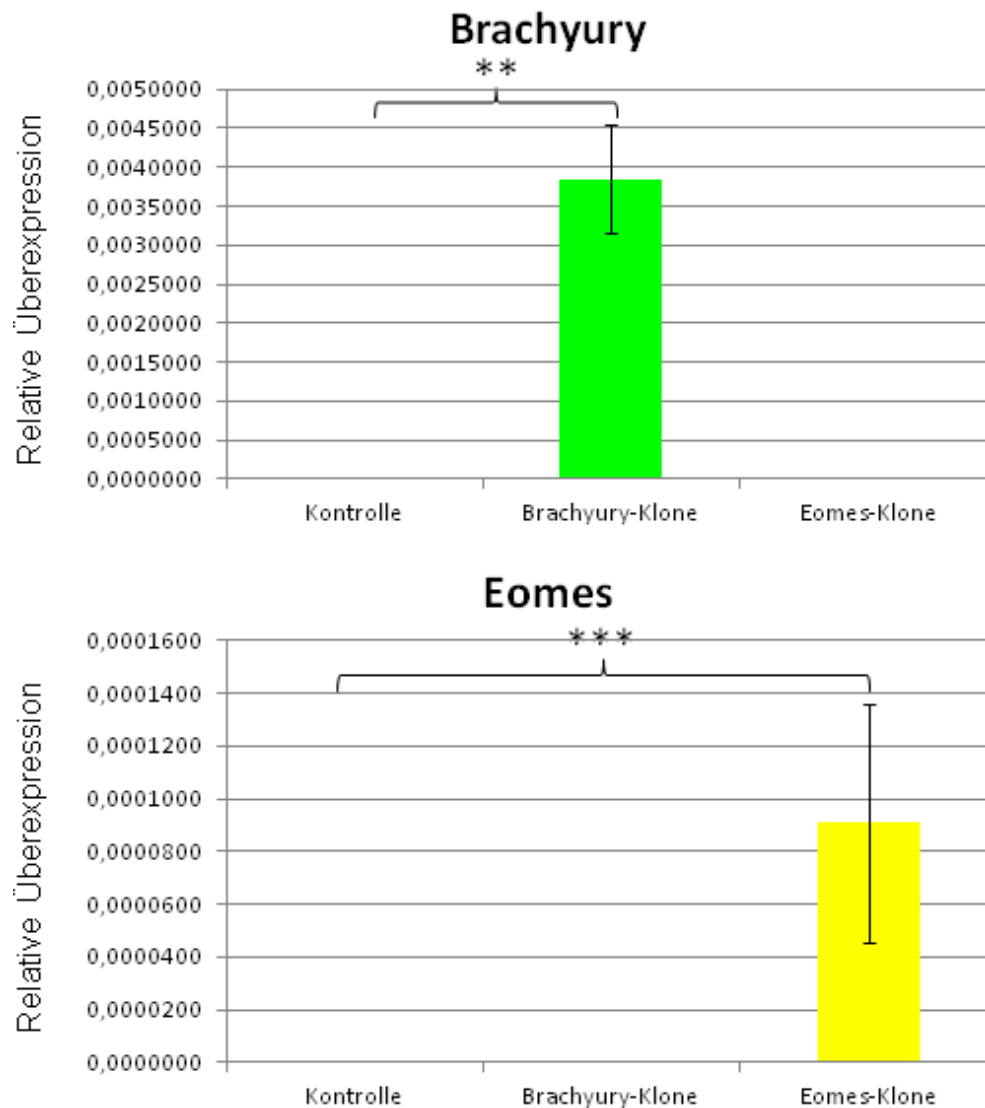


Abbildung 19: Nachweis der Überexpression von humanem *brachyury(T)* (a) und humanem *eomesodermin* (b) auf mRNA-Ebene in stabil transfizierten murinen ES-Zellklonen. n=4; **: $p \leq 0,005$; *: $p \leq 0,0005$; Fehlerindikation = SEM**

Zum Nachweis der Expression der jeweils transfizierten Expressionskonstrukte wurde die Gesamt-mRNA der Klone im

Ergebnisse

undifferenzierten Zustand mittels RT-PCR untersucht (siehe Kapitel 2.2.3.3 bis 2.2.3.5).

Als Kontrolle dienten untransfizierte ES-Zellen der Linie GSES. Durch den Nachweis der humanen *Brachyury(T)*- und humanen *Eomesodermin*-mRNA in den jeweiligen Zellklonen (siehe Abbildung 19) wurde die Transkription der transfizierten cDNA bestätigt und die Funktionalität der Überexpression als Grundlage dieser Arbeit gezeigt.

Die Abbildungen zeigen jeweils die Mittelwerte von vier Kontroll-Zellklonen, vier *brachyury(T)*-Klonen und vier *eomesodermin*-Zellklonen bezüglich ihrer humanen *Brachyury(T)*-mRNA-Spiegel (a) und ihrer humanen *Eomesodermin*-mRNA-Spiegel (b).

Ausschließlich in den überexprimierenden Klonen konnte die entsprechende mRNA nachgewiesen werden.

3.4 Einfluss der *Brachyury(T)*- und *Eomesodermin*-Überexpression auf das kardiale Differenzierungspotential muriner ES-Zellklone

Ein Einfluss der Überexpression des humanen *brachyury(T)*-Gens und humanen *eomesodermin*-Gens auf das kardiale Differenzierungspotenzial muriner embryonaler Stammzellen wurde durch Quantifizierung schlagender Areale in differenzierten Embryoid-Körperchen untersucht.

Dazu wurden je zwei Klone mit hoher mRNA-Expression in Differenzierung gebracht (siehe Kapitel 2.2.7.7). Als Kontrolle dienten untransfizierte GSES.

Zur Differenzierung wurden die Zellen sechs Tage in Schwebekultur gezogen (siehe Kapitel 2.2.7.7). Anschließend erfolgte die Aussaat der entstandenen sogenannten *embryoid bodies (EBs)* auf 24-Well-Platten. Auf diesen konnten die EBs adhärieren und sich ausbreiten. Wie in der Arbeitsgruppe in Vorarbeiten von C. Brenner gezeigt (David, Brenner et al. 2008), besteht ein *EB* am Tag der Überführung von Schwebekultur zu adhärenter Kultur aus circa 500 Zellen.

Ergebnisse

Abb. 20 zeigt für jeden der differenzierten Klone die Anzahl schlagender Areale pro EB, also pro ~ 500 ausgesäte Zellen. Die Anzahl schlagender Areale wurde gegen die Zeit in Tagen aufgetragen. Tag 6+1 bedeutet dabei das Differenzierungsalter von sieben Tagen, davon sechs Tage in Schwebekultur und ein Tag in adhärenter Kultur.

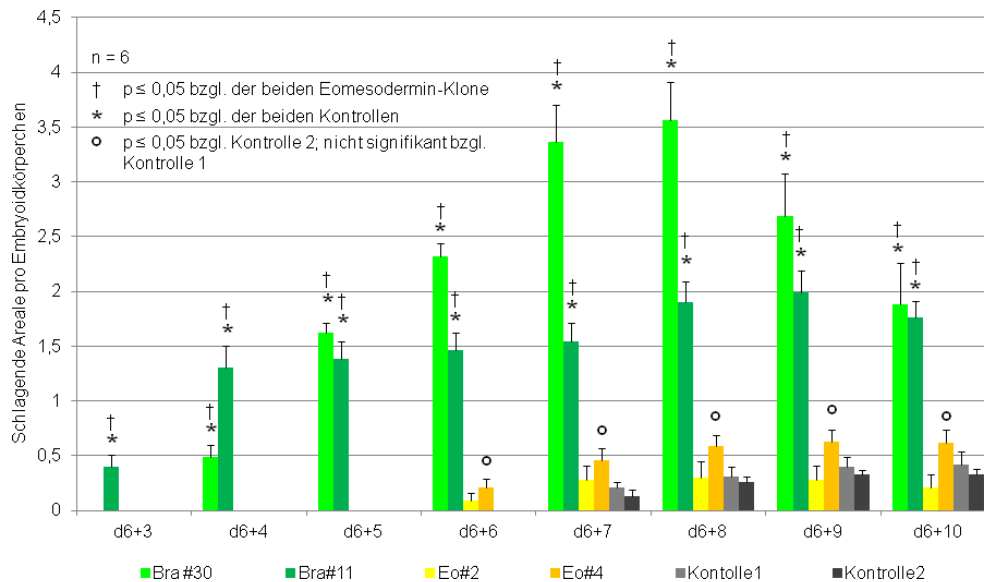


Abb. 20: Anzahl schlagender Areale pro 500 ausgesäter Zellen in jeweils zwei stabil humanen Brachyury(T)-überexprimierenden Klonen, zwei stabil humanen Eomesodermin-überexprimierenden Klonen sowie zwei untransfizierten GSES-Klonen als Kontrolle; Fehlerindikation = STABW

Pro Klon wurden sechs Wells einer 24-Well-Platte mit jeweils circa 25 *EBs* bestückt, sodass sich für jeden Klon eine Anzahl von mindestens 120 untersuchten *EBs* ergab. Die Auszählung schlagender Areale erfolgte einmal täglich. Da es aus technischen Gründen nicht möglich war, für jeden *EB* einzeln eine Zeitkurve bezüglich der Bildung schlagender Areale zu erstellen, wurden die schlagenden Areale pro Well erfasst und über die jeweils ausgesäte *EB*-Anzahl gemittelt.

Es war zu beobachten, dass die *Brachyury(T)*-überexprimierenden Klone bereits zu einem deutlich früheren Zeitpunkt schlagende Areale aufwiesen, als die Kontroll-Klone und die *Eomesodermin*-überexprimierenden Klone. In den Wells mit *EBs* der *Brachyury(T)*-überexprimierenden Klone zeigten sich bereits am Tag 6+3 bzw. 6+4 erste kontrahierende Bereiche. Dagegen bildeten sich in den *Eomesodermin*-Klonen erst an Tag 6+6 und in den Kontroll-Klonen erst an Tag 6+7 die ersten schlagenden Areale.

Ergebnisse

Die schlagenden Areale in den Brachyury(T)-überexprimierenden *EBs* bildeten sich nicht nur deutlich früher, sondern erreichten eine größere Anzahl pro *EB*. Am Tag 6+8 erreichte der Brachyury(T)-Klon 30 sein Maximum bezüglich der Anzahl an schlagenden Arealen. Zu diesem Zeitpunkt wies der Zellklon durchschnittlich circa 3,5 schlagende Areale pro 500 ausgesäte Zellen auf. In den differenzierten Zellen des Brachyury(T)-Klons 11, welcher sein Maximum einen Tag später erreichte, bildeten sich im Durchschnitt zwei schlagende Areale pro 500 ausgesäte Zellen. Beide Kontroll-Zellklone dagegen wiesen zu keinem Zeitpunkt mehr als durchschnittlich 0,4 schlagende Areale pro 500 ausgesäte Zellen auf.

Auch beide Eomesodermin-überexprimierenden Klone zeigten ein deutlich geringeres kardiales Differenzierungspotenzial als die beiden Brachyury(T)-Klone. Einer der beiden Klone, Eomesodermin-Klon 2, verhielt sich bezüglich der Anzahl schlagender Areale ähnlich den Kontroll-Klonen, der zweite Klon dagegen bildete signifikant mehr kontrahierende Zellbereiche aus, allerdings eine wesentlich geringere Anzahl als die beiden Brachyury(T)-Klone.

3.5 Einfluss der Brachyury(T)- und der Eomesodermin-Überexpression auf die endogene MesP1-mRNA-Expression

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, ist MesP1 einer der frühesten kardiovaskulären Marker der Embryogenese. Aufgrund der Ergebnisse der Auszählung schlagender Areale, die zeigte, dass sich im Vergleich zu unmanipulierten ES-Zellen in überexprimierenden Klonen bereits zu wesentlich früheren Zeitpunkten der Differenzierung schlagende Areale ausbilden, wurde die Mesp1-Expression untersucht. Eine veränderte Mesp1-Expression in den noch undifferenzierten Brachyury(T)- und Eomesodermin-überexprimierenden ES-Zell-Klonen wurde durch qRT-PCR auf mRNA-Ebene analysiert (siehe Abbildung 21).

Je vier überexprimierende Klone wurden mit vier untransfizierten Klonen verglichen. Die Abbildung zeigt jeweils die Mittelwerte, wobei die in nur sehr geringen Mengen vorhandene endogene MesP1-mRNA der Kontroll-Zellen auf 1 normiert wurde. Es wird somit die relative erhöhte Transkriptionsrate des *mesP1*-Gens in den überexprimierenden Klonen

Ergebnisse

gezeigt. Dabei zeigt sich in den Brachyury(T)-Klonen eine um Vielfaches erhöhte Transkriptionsrate. Auch in den Eomesodermin-Klonen konnte eine leicht erhöhte Menge an *MesP1*-mRNA detektiert werden, die sich jedoch nicht signifikant von der Kontroll-Probe unterschied.

Die signifikant vermehrte Transkription des *mesP1*-Gens in Brachyury(T)-überexprimierenden ES-Zellen im Vergleich zu Eomesodermin-überexprimierenden Klonen, deckt sich mit dem deutlich stärkeren kardiogenen Differenzierungspotential von Brachyury(T)-überexprimierenden Zellklonen.

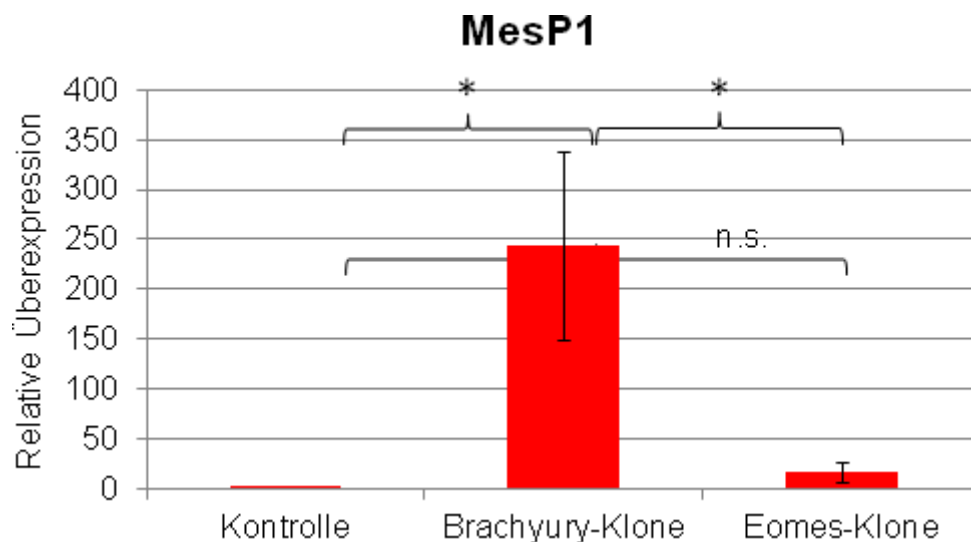


Abbildung 21: Expression des endogenen *mesP1*-Gens auf mRNA-Ebene in undifferenzierten Brachyury(T)- und Eomesodermin-überexprimierenden ES-Zellklonen, relativ zu nicht transgenen Kontroll-Klonen. n=4; *: $p \leq 0,05$; Fehlerindikation =SEM

Aufgrund kongruenter phänotypischer und molekularer Ergebnisse, die sich mit Daten von Kattman et al. (Kattman, Huber et al. 2006) decken und zeigen, dass humanes *Brachyury* zu einer verstärkten kardiovaskulären Differenzierung in murinen ES-Zellen führt, wurde der Fokus von nun an auf Brachyury gerichtet.

3.6 *mesP1* als direktes Zielgen des Brachyury(T)-Proteins

In der Arbeitsgruppe existierte aus Vorarbeiten (siehe Kapitel 1.5.3) ein 3,4kb-*mesP1*-Promotor-Fragment, welches für die folgenden Experimente verwendet wurde.

3.6.1 Bindung des Brachyury(T)-Proteins an potentielle Zielsequenzen im *mesP1*-Promotor

Durch Literaturrecherche und Analyse der Basensequenz des in der Arbeitsgruppe verwendeten 3,4 kb-*mesP1*-Promotor-Fragments, waren in Vorarbeiten verschiedene potenzielle Ziel-Elemente für T-Box-Transkriptionsfaktoren in der *mesP1*-Promotorsequenz identifiziert worden. In Abbildung 22 sind sie schematisch dargestellt.

Als potenzielle Brachyury(T)-Ziel-Sequenz wurde dabei ein Element mit der Basenabfolge TGTCACCA angesehen. Dieses ist zweimal in der Promotorregion enthalten, einmal an Position -3161 und außerdem an Position -63. An Position -727 ist dieses Element zudem in revers-komplementärer Basenabfolge zu finden.

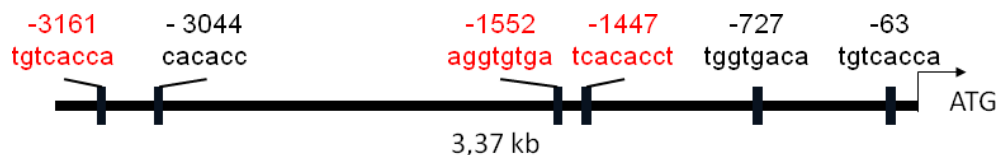


Abbildung 22: Die Verteilung von Zielsequenzen für T-box-Transkriptionsfaktoren im 3,4 kb-Promotor-Fragment des *mesP1*-Gens. Mit den rot gekennzeichneten Elementen wurde in vorliegender Arbeit gearbeitet

Zwei weitere Elemente, AGGTGTGA an Position -1552 und TCACACCT an Position -1447 sind als Bindungsstellen von T-Box-Transkriptionsfaktoren bekannt.

3.6.1.1 Reportergen-Assay

Bereits in Vorarbeiten wurden die Elemente an den Positionen -3161, -1552 und -1447 in den Vektor pHSV-tk-LUC kloniert (siehe Kapitel 2.1.8.3). Die so vorbereiteten Plasmide wurden für Dual Luciferase Reporter-Assays wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben verwendet.

In einigen Experimenten konnte eine Aktivierung am Element -3161 des *mesP1*-Promotors anhand einer verstärkten *firefly* Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden.

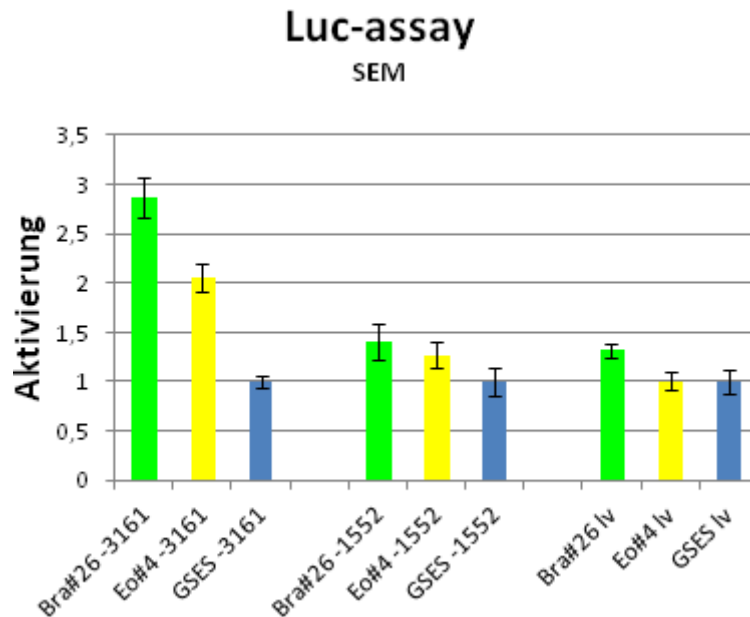


Abbildung 23: Ergebnis eines Dual Luciferase Reporter-Assays. Transfektion eines Brachyury(T)-überexprimierenden Klons (Bra#26), eines Eomesodermin-überexprimierenden Klons (Eo#4) und Wildtyp-Kontrollzellen (GSES) mit einem tk-LUC-Vektor, der zusätzlich das -3161 Element des *mesP1*-Promotors enthält (links), mit einem tk-LUC-Vektor, der zusätzlich das -1552 Element des *mesP1*-Promotors enthält (mitte) und mit einem leeren tk-LUC-Vektor als Kontrolle (rechts). Die Abbildung zeigt eine signifikant verstärkte *firefly*-Luciferase Aktivität in den Brachyury(T)-überexprimierenden Klonen, in welche der Vektor transfiziert wurde, welcher zusätzlich das Element -3161 aus dem *mesP1*-Promotor enthält. Dies weist auf eine direkte Aktivierung von Brachyury(T) an diesem Element hin.

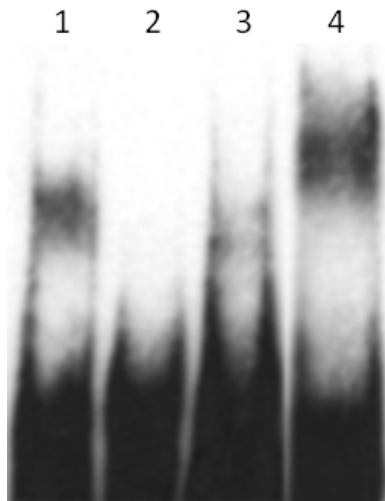
Dieses Ergebnis konnte auch in mehreren Wiederholungen des Experiments nicht verifiziert werden. Dies lag unter Anderem an einer in mehreren Experimenten massiv erhöhten *firefly*-Aktivität in den pHSV-tk-LUC-Vektor transfizierten Kontrollen. Zudem kam es immer wieder zu unerklärlich starken Schwankungen sowohl der *firefly*- als auch der *renilla*-Luciferase-Aktivität, selbst in grundsätzlich identisch behandelten Proben.

Von einer Verwertung der Ergebnisse wurde daher abgesehen. Die Versuchsreihe sollte in einem weiterführenden Projekt wiederholt und die Ursache der extremen Variabilität der Messwerte eruiert werden.

Ergebnisse

3.6.1.2 EMSA

Die Bindung des Brachyury(T)-Proteins an das isolierte Element -3161 des humanen mesP1-Promotors wurde mittels EMSA untersucht (siehe Kapitel 2.2.6)



EMSA mit humanem Brachyury-Protein. Zugegeben wurden in

Spur 1: Markiertes Oligonukleotid des Elements -3161 des humanen mesP1-Promotors

Spur 2: zusätzlich zu Spur 1 ein 100-facher Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid

Spur 3: zusätzlich zu Spur 1 ein 100-facher Überschuss an mutiertem unmarkiertem Oligonukleotid

Spur 4: zusätzlich zu Spur 1 Anti-hBrachyury(T)-Antikörper

Abbildung 24: *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)* zum Nachweis einer direkten Bindung zwischen humanem Brachyury(T)-Protein und der potenziellen Brachyury(T)-Zielsequenz. Spur 1: *in vitro* translatiertes humanes Brachyury(T)-Protein inkubiert mit markiertem Oligonukleotid des Elements -3161 des humanen *mesP1*-Promotors. Spur 2: zusätzlich 100-facher Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid. Spur 3: humanes Brachyury(T)-Protein, inkubiert mit Oligonukleotid des Elements -3161 aus dem humanen *mesP1*-Promotor und einem 100-fachen Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid, welches eine willkürliche Mutation an fünf von zehn Basen aufweist. Spur 4: Inkubation von *in vitro* translatiertem humanem Brachyury(T)-Protein mit markiertem Oligonukleotid des Elements -3161 des humanen *mesP1*-Promotors und mit Anti-*hbra(T)*-Antikörper.

Die Auftrennung der Proben in einer nicht-denaturierenden SDS-Page ist in Abbildung 24 dargestellt.

Die in der ersten Spur aufgetragene Probe enthält *in vitro* translatiertes humanes Brachyury(T)-Protein (Kapitel 2.1.2), welches mit markiertem Oligonukleotid des Elements -3161 aus dem humanen *mesP1*-Promotor

Ergebnisse

(siehe Abbildung 22) inkubiert wurde. Für die in der zweiten Spur aufgetragene Probe wurde zu diesem Ansatz ein hundertfacher Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid zugegeben, welches mit den markierten DNA-Fragmenten um die Proteinbindungsstelle kompetiert und sie aufgrund des quantitativen Unterschieds weitgehend verdrängt. Für die dritte Probe wurde zu Ansatz 1 ebenfalls ein hundertfacher Überschuss unmarkiertem Oligonukleotid zugegeben, allerdings wurde durch eine Mutation von fünf aus zehn Basen eine potentielle Bindung erschwert.

Es bindet vorwiegend das nicht mutierte Oligonukleotid. Die vierte Probe entspricht der ersten, zusätzlich wurde mit einem Anti-hBra(T)-Antikörper inkubiert. Dadurch entsteht ein größerer Protein-DNA-Komplex der im SDS-Gel entsprechend weniger weit läuft. Diese Spur beweist eine direkte Bindung zwischen Brachyury(T)-Protein und markiertem 205-Oligonukleotid. Dies zeigt, dass der bindende Faktor im Gemisch tatsächlich das Brachyury(T)-Protein ist.

3.6.2 Bindung von Brachyury(T) in der Stammzellkultur

Als nächstes sollte die Bindung des Brachyury(T)-Proteins an den *mesP1*-Promotor in der Stammzellkultur gezeigt werden. Um sicher zu stellen, dass in den Brachyury(T)-überexprimierenden ES-Zellklonen Brachyury(T) auch auf Protein-Ebene vermehrt vorhanden ist, wurde zunächst eine semiquantitative Western-Blot-Analyse durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5.1. bis 2.2.5.3).

Abbildung 25 zeigt beispielhaft eine semiquantitative Western-Blot-Analyse von vier verschiedenen humanes Brachyury(T)-überexprimierenden ES-Zellklonen. Verwendet wurden Zell-Klone im undifferenzierten Zustand. Der Gehalt an Gesamtprotein wurde zuvor photometrisch mit Hilfe des Bradford-Tests (siehe Kapitel 2.2.5.1) ermittelt. Es folgte eine Auftragung äquivalenter Proteinmengen.

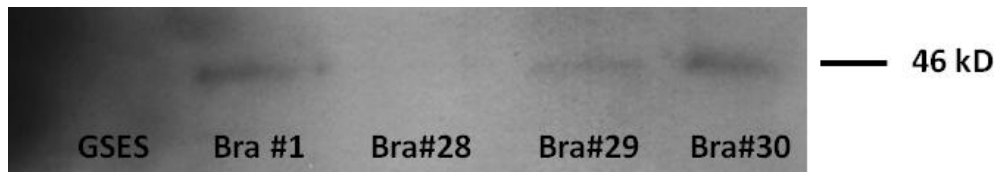


Abbildung 25: semiquantitative Western-Blot-Analyse. Gezeigt sind beispielhaft vier humanes Brachyury(T)-überexprimierende ES-Zellklone im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen (GSES). In den Brachyury(T)-Klonen 1, 29 und 30 ist eine Expression des Brachyury(T)-Proteins nachzuweisen

Im Vergleich mit untransfizierten Kontroll-Zellen bezüglich des Gehalts an humanem Brachyury(T)-Protein zeigte sich in den meisten Zellklonen eine deutliche Bande bei 46 kD wie in der Antikörperbeschreibung angegeben. Verwendet wurde ein Anti-Brachyury(T)-Antikörper. Klone, in welchen nur eine geringfügige oder keine Proteinexpression nachgewiesen werden konnte, wie Klon Bra#28, wurden für die weiteren Versuche nicht verwendet.

Der Nachweis des Proteins war Grundlage für folgende Untersuchungen.

3.6.2.1 Transaktivierung eines 3,4 kb-*mesP1*-Promotorfragments durch Brachyury(T)

Um eine Bindung des humanen Brachyury(T)-Proteins an das komplette 3,4kb-*mesP1*-Promotor-Fragment zu untersuchen, wurde auf zwei in der Arbeitsgruppe bereits vorhandene Konstrukte zurückgegriffen.

Brachyury(T)-überexprimierende ES-Zellklone und Kontrollen wurden transient mit dem Vektor pMesP1- Δ CD4 (siehe Kapitel 2.1.8.4) transfiziert. Ähnlich wie bei den oben beschriebenen Reportergen-Studien wurde, um mögliche Unterschiede in der Transfektions-Effizienz zu umgehen, ein *renilla*-Luziferasegen unter Kontrolle eines konstitutiv exprimierenden HSV-tk-Promotors kotransfiziert (siehe Kapitel 2.1.8.3). Nach 48 Stunden wurden die Zellen vom Kulturgefäß abgelöst und für qRT-PCR-Untersuchungen kryokonserviert.

Die qRT-PCR-Werte für die Δ CD4-mRNA wurden nicht wie üblich auf die Werte der endogenen mGAPDH-mRNA, sondern auf die Werte der *renilla*-Luciferase mRNA normalisiert.

Ergebnisse

In einem weiteren Experiment wurde ein zweiter, in der Arbeitsgruppe bereits vorhandener Vektor, pMesP1-EGFP (siehe Kapitel 2.1.8.4), zusammen mit dem Vektor pCMV-dsRed (siehe Kapitel 2.1.8.5) in Brachyury(T)-überexprimierende Klone sowie Kontroll-Klone kotransfiziert (siehe Kapitel 2.2.7.6).

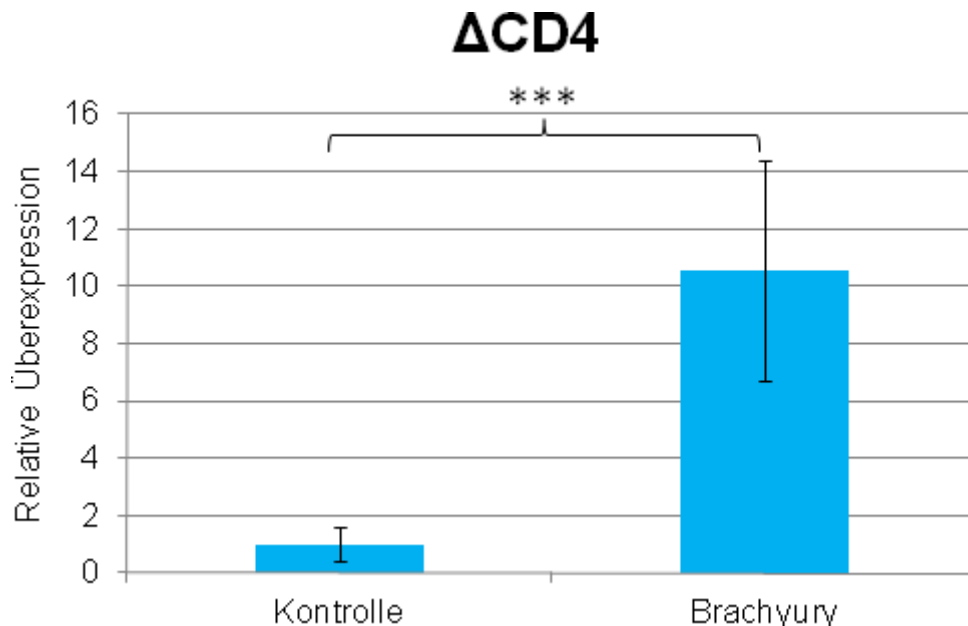


Abbildung 26: transiente Transfektion von Brachyury(T)-überexprimierenden ES-Zellklonen und Kontrollen mit dem Vektors pMesP1- Δ CD4. qRT-PCR-Untersuchungen zeigen eine signifikant vermehrte Expression des Δ CD4-Gens durch eine verstärkte Aktivierung des mesP1-Promotors in den Brachyury(T)-überexprimierenden Zellen. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde ein TK-Renilla-Vektor kotransfiziert. Auf die *renilla*-Luciferase mRNA wurden die qRT-PCR-Werte normalisiert. n=8, *: $p \leq 0,0005$, Fehlerindikation = STABW**

Wie in Abbildung 26 zu sehen, ist die Transkriptionsrate der transfizierten Δ CD4-cDNA in den Kontroll-Klonen circa um den Faktor zehn niedriger, als in den Brachyury(T)-überexprimierenden Klonen.

Eine Bindung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors Brachyury(T) am *mesP1*-Promotorfragment kann so anhand einer verstärkten Expression eines nachgeschalteten EGFP-Gens und damit verstärkten grünen Fluoreszenz überprüft werden.

Abbildung 27 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transfizierten Zellen circa 72 Stunden nach der Transfektion.

Ergebnisse

In der linken Spalte sind vier Durchlichtaufnahmen ausgewählter Zellrasenbereiche zu sehen. In der mittleren Spalte sieht man die Fluoreszenz von dsRed. Die entsprechende Aufnahme mit der grünen Fluoreszenz von EGFP ist in der rechten Spalte zu sehen.

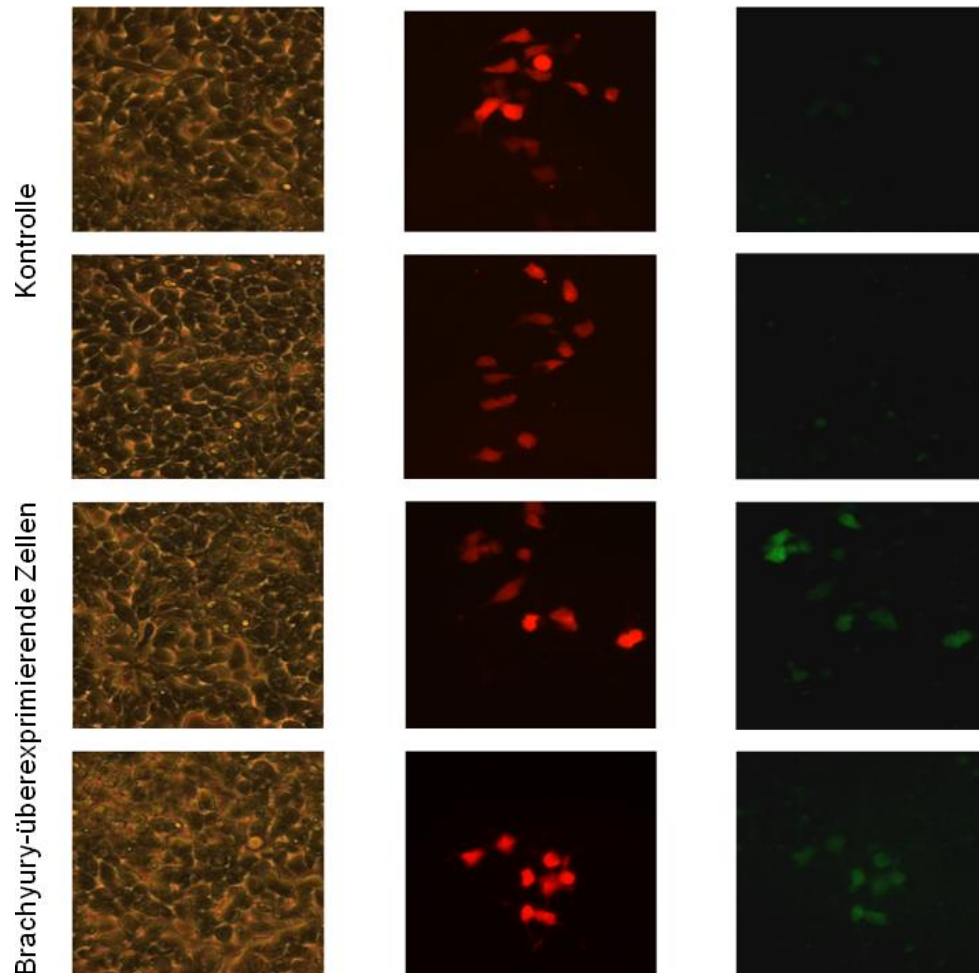


Abbildung 27: Transfektion eines humanen *mesP1*-Promotorfragments mit nachgeschaltetem *EGFP*-Gen in Brachyury(T)-überexprimierende murine embryonale ES-Zellen und in Kontroll-Zellen. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde das *dsRed*-Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors transfiziert. Links zu sehen ist die jeweilige phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, in der Mitte, die Transfektionskontrolle und rechts die *EGFP*-Expression. Es zeigt sich ausschließlich in Brachyury(T)-exprimierenden Zellen eine Aktivierung des *mesP1*-Promotor-kontrollierten *EGFP*-Gens.

Das zur Überprüfung der Transfektionseffizienz kotransfizierte *dsRed*-Gen wurde sowohl in Zellen der Kontroll-Klone, als auch in Zellen der überexprimierenden Klone in gleichem Maße exprimiert (rote Fluoreszenz). Die EGFP-bedingte grüne Fluoreszenz dagegen, war nur in den

Ergebnisse

Brachyury(T)-überexprimierenden Klonen und außerdem eindeutig in den Zellen zu finden, die auch dsRed exprimierten, also im Rahmen der Transfektion auch DNA aufgenommen hatten, was beweisend für die Spezifität ist.

3.6.2.2 Brachyury(T) als notwendige Voraussetzung für die MesP1-abhängige Kardiogenese in pluri-potenten ES-Zellen:

Um den Einfluss einer verminderten endogenen Brachyury(T)-Expression auf die Transkriptionsrate des endogenen *mesP1*-Gens zu untersuchen wurden ein *knock down* des Gens mittels *small hairpin RNA* (*sh-knock down*) (siehe Kapitel 2.2.8) vorgenommen.

Dazu wurden *sh*-Konstrukte (siehe Kapitel 2.1.8.6) in murine ES-Zellen transfiziert (siehe Kapitel 2.2.7.4). Nach mehrtägiger Selektion wurden jeweils bis zu zehn Klone isoliert und in Differenzierung gebracht. An Tag 2 wurden Zellproben entnommen und mittels qRT-PCR analysiert (siehe Abbildung 28).

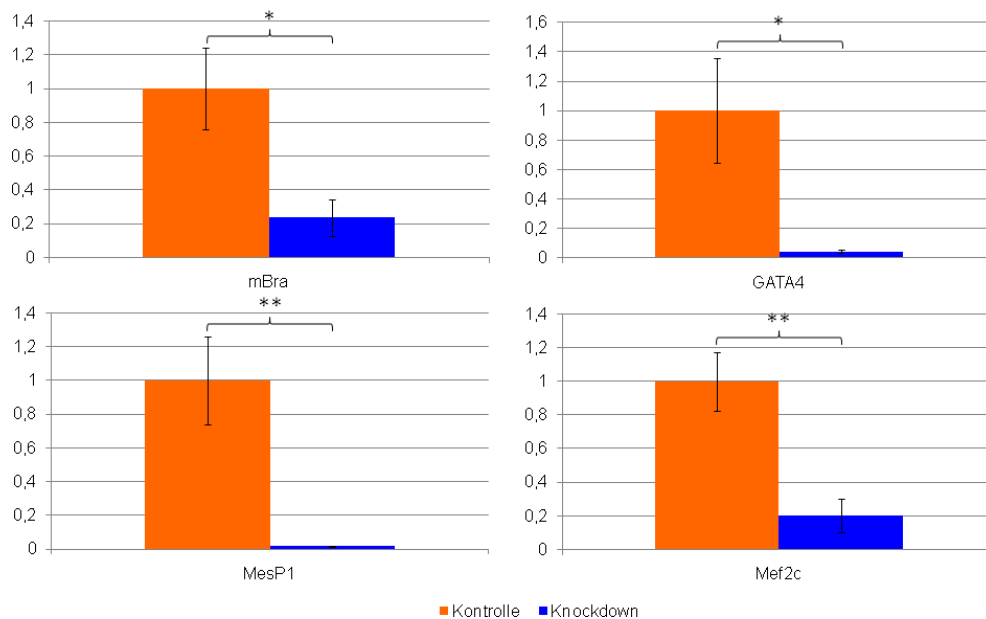


Abbildung 28: qRT-PCR Analysen zeigten den Verlust früher kardialer Marker in Embryoidkörperchen. *Knock down* von endogenem Brachyury(T) in murinen ES-Zellen durch stabil exprimierte shRNA führt zu einer signifikant verminderten Expression folgender Gene: *mesP1*, *GATA4*, n=4; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$ Fehlerindikation =SEM

Ergebnisse

Bestimmt wurden jeweils die mRNA-Spiegel von endogenem Brachyury(T), MesP1, GATA4 und Mef2c. Die Effizienz des *knock downs* zeigte sich in einer Reduktion der endogenen Brachyury(T)-mRNA um circa 20 %. Die Zellen wiesen auch einen dramatischen Verlust an MesP1-mRNA auf, sowie eine deutliche Verminderung der mRNA der frühen kardialen Marker GATA4 und Mef2c.

3.7 Zeitliche Abhängigkeit von Brachyury(T)- und MesP1-Expression

Die zeitliche Korrelation von Brachyury(T)- und MesP1-Expression wurde auf Protein-Ebene mittels Westerblot-Analyse und mittels Durchflußzytometrie untersucht.

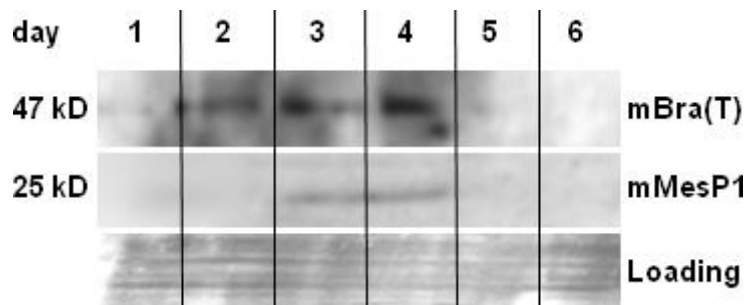


Abbildung 29: Darstellung der zeitlichen Korrelation des Auftretens von Brachyury(T)- und MesP1-Protein in murinen embryonalen Stammzellen im Verlauf der Differenzierung mittels eines Western-Blot-Assays

Dazu wurden Zellen der Linie GSES in Differenzierung gebracht. An den Tagen 1-6 nach Ausplattierung wurden Proben entnommen, zentrifugiert, und die sedimentierten Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Western-Blot-Analysen wurden wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Dabei zeigte sich bereits eine Expression des Brachyury(T)-Protein nach 24 Stunden mit einem Maximum an Tag 4. Der Anstieg des MesP1-Proteins zeigte sich zeitlich verzögert. Ein deutliches Signal ist erstmals an Tag 3 nachweisbar mit einem Maximum ebenfalls an Tag 4.

Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen der Durchflußzytometrie die von der Arbeitsgruppe Keller durchgeführt wurde. Dafür wurde eine ES-Zelllinie genutzt, welche einen *EGFP-knock-in* im *brachyury(T)*-Lokus besitzt. Über diesen *EGFP-knock-in* konnten in der Durchflußzytometrie Brachyury(T)-positive Zellen von Brachyury(T)-negativen Zellen getrennt werden. Dieses Verfahren wurde mit Zellproben der Tage 3 und 4 der

Ergebnisse

Differenzierung durchgeführt und die gewonnenen Fraktionen auf Brachyury(T)-mRNA- beziehungsweise MesP1-mRNA-Expressionsniveaus in der qRT-PCR untersucht. Um die Relationen klar darzustellen, wurden die Werte in der EGFP-negativen Fraktion jeweils auf eins normalisiert. In den EGFP-positiven Fraktionen war die Expression der Brachyury(T)-mRNA an Tag 3 mehr als 200-fach erhöht, an Tag 4 circa 40-fach. Dies zeigt die Spezifität der Markierung des *EGFP*-Proteins in der Durchflußzytometrie. Die anschließend durchgeführte Untersuchung auf MesP1-mRNA zeigte einen umgekehrten Zeitverlauf. Während an Tag 3 der Differenzierung das Verhältnis in der Expressionsrate zwischen der EGFP-positiven Zellpopulation und der EGFP-negativen Zellpopulation ungefähr bei 100:1 lag, veränderte sich dieser Quotient an Tag 4 auf 550:1 (David, Jarsch et al. 2011). Diese Daten lassen vermuten, dass die MesP1-positive Zellfraktion zu einem Großteil aus der Brachyury(T)-positiven Zellpopulation entsteht.

3.8 *in vivo* Abhängigkeit der MesP1-Expression von Brachyury(T)

Um die *in vitro* gewonnenen Daten zur Abhängigkeit der MesP1-Expression von der Expression des *brachyury(T)*-Gens *in vivo* zu verifizieren, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Heiko Lickert (Helmholtz-Zentrum München) *in situ*-Hybridisierungen vorgenommen (siehe Kapitel 2.2.9).

3.8.1 Koexpression der Brachyury(T)- und MesP1-mRNAs in Wildtyp-Mausembryonen

Die zeitliche und räumliche Koexpression von Brachyury(T)-mRNA und MesP1 –mRNA wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Lickert in Wildtyp-Mausembryonen untersucht (siehe Abbildung 30).

Für das Experiment wurden 7,5 Tage alte Embryonen verwendet. Die mRNA beider Marker konnte im Bereich der mesodermalen Vorläuferzellen im Primitivstreifen angefärbt werden, die Bilder zeigen somit eine räumliche und zeitliche Koexpression der beiden Transkriptionsfaktoren.

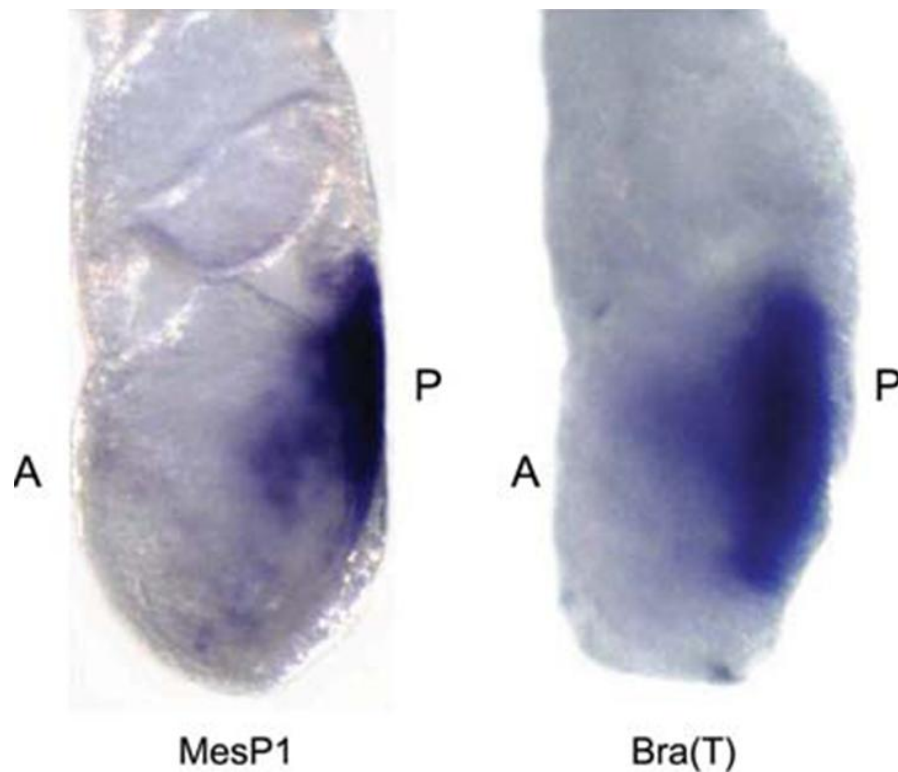


Abbildung 30: *whole mount in situ*-Hybridisierung für MesP1- (links) und Brachyury(T)-mRNA (rechts) in Mausembryonen (E7.5). Sowohl die Brachyury(T)- als auch MesP1-mRNA sind im Primitivstreifen nachweisbar. A = anterior, P = posterior

3.8.2 Partieller Verlust der MesP1-mRNA in *brachyury(T)*-knock-out-Embryonen

Auch die *in vitro knock-down*-Daten (siehe Kapitel 3.6.2.2) wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Lickert mittels *in situ*-Hybridisierungen überprüft. Verglichen wurden Wildtyp-Mausembryonen (vergleiche Kapitel 3.8.1) und *brachyury(T)*-knock-out-Embryonen. In Letzteren führte die Abwesenheit von Brachyury(T) zu einer deutlichen Reduktion von MesP1-mRNA (siehe Abbildung 31).

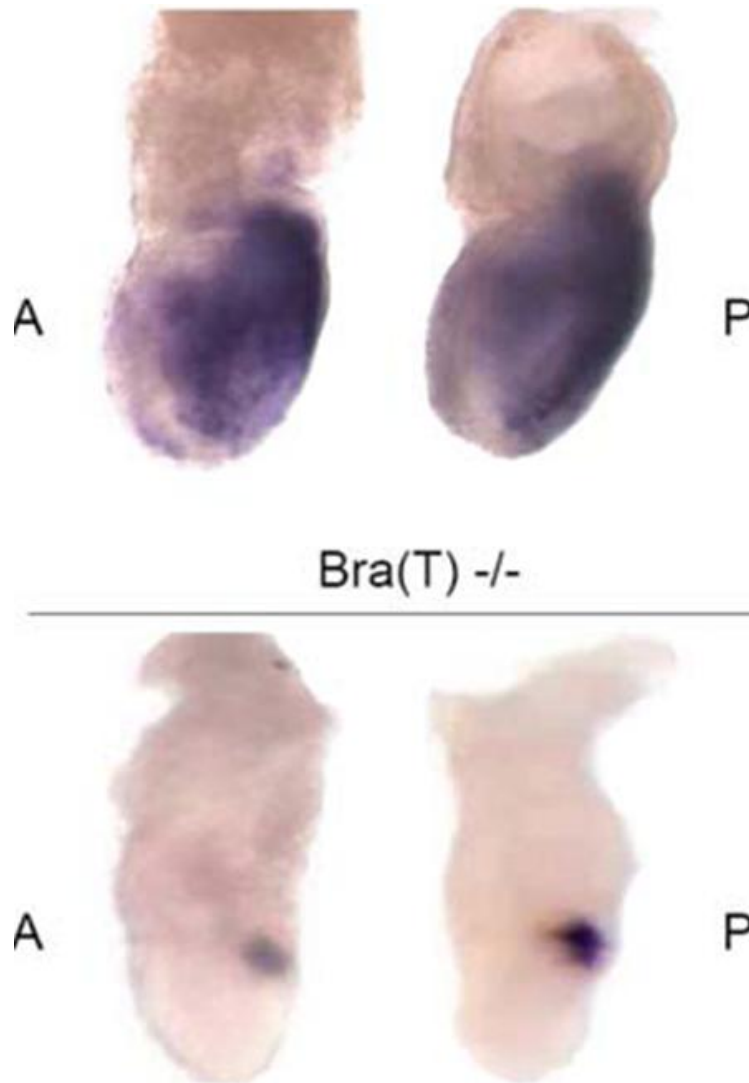


Abbildung 31: *whole mount in situ*-Hybridisierungen von Wildtyp-Mausembryonen (oben) und *brachyury(T)*-knock-out-Embryonen (unten) zeigen eine starke Reduktion der Expression von MesP1-mRNA bei fehlender Expression von Brachyury(T)-mRNA; A = anterior, P = posterior

Dies bestätigt, dass eine Bildung von funktionellen kardiovaskulären Vorläuferzellen, welche durch eine Expression des Transkriptionsfaktors MesP1 markiert sind, sowohl in ESC als auch *in vivo* von einer vorherigen Expression von Brachyury(T) abhängig ist (David, Jarsch et al. 2011).

4 Diskussion:

4.1 Entschlüsselung der molekularen Herzentwicklung

Wie in Kapitel 1.5. beschrieben, wurden bereits zahlreiche Wege beschritten, um die Ausbeute an kontraktile Kardiomyozyten in der Kultur embryonaler Stammzellen zu erhöhen. Als wichtigste Voraussetzung gilt die genaue Entschlüsselung der molekularen Herzentwicklung, um Ansatzpunkte für „*forward programming*“ zu finden. „*Forward programming*“ bedeutet das gezielte Eingreifen in die Zelldifferenzierung, um diese in Richtung einer bestimmten Gewebeart zu verstärken.

Die ersten Versuche, die darauf abzielten, Stammzellen zu verstärkter Kardiogenese anzuregen, verwendeten exogene Stimulatoren, zum Beispiel die Gabe von Retinolsäure auf murine ES-Zellen. Dies unterstützte die Entwicklung ventrikulärer Kardiomyozyten, was durch eine verstärkte Expression der Marker α MHC und MLC2v erkennbar war (Wobus, Kaomei et al. 1997). Ein ähnlicher Effekt konnte durch die Stimulation mit Ascorbinsäure (Takahashi, Lord et al. 2003) oder durch Kultivierung im Einflussbereich eines niedrig frequenten magnetischen Feldes hervorgerufen werden (Ventura, Maioli et al. 2005).

Eine gezieltere Vorgehensweise kann jedoch nur angewendet werden, wenn ein genaueres Verständnis der zugrundeliegenden Signalwege vorliegt.

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten kürzlich, dass der *bHLH*-Transkriptionsfaktor *MesP1* die Expression von Schlüsselgenen der molekularen Herzentwicklung initiiert (Bondue, Lapouge et al. 2008; David, Brenner et al. 2008; Lindsley, Gill et al. 2008; Bondue, Tannler et al. 2011). Desweiteren ergaben Ansätze für genetisches „*forward programming*“, dass der Transkriptionsfaktor *Nkx2.5* ähnlich wie *MesP1* ausreichend ist, um die Kardiogenese in murinen embryonalen Stammzellen zu verstärken. Allerdings führte *MesP1* eher zur Bildung von kardialen Progenitorzellen vom frühen oder intermediären Typ. *Nkx2.5* dagegen hat vor allen Dingen die Differenzierung zu ausgereiften Ventrikeldomyozyten zur Folge (David, Stieber et al. 2009). Die Funktion von *MesP1* wurde kürzlich von David et

Diskussion:

al. genauer untersucht (siehe Kapitel 1.5.4), wobei gezeigt werden konnte, dass MesP1 über Dkk-1 zur Inhibition des kanonischen wnt-Signalwegs in kardiovaskulären Vorläuferzellen führt (David, Brenner et al. 2008). Das bereits erwähnte 3,4-kb-mesP1-promotor-Fragment wurde erfolgreich zur Selektion von MesP1-positiven Zellen aus einem Pool differenzierender ES-Zellen mittels *magnetic cell sorting*. Es zeigte sich, dass die so gewonnene Zellfraktion zur circa 90% aus Zellen bestand, welche alle die drei kardiovaskulären Linien repräsentieren: Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen (David, Schwarz et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des Transkriptionsfaktors MesP1 betrachtet.

4.2 Regulation des kardiovaskulogenen

Schlüsselfaktors *MesP1*

Um die Signalwege der frühen Kardiovaskulogenese genauer zu verstehen, beschäftigten wir uns mit Transkriptionsfaktoren, die in der Literatur als potentielle Regulatoren von *mesP1* gehandelt wurden (Kattman, Huber et al. 2006; Izumi, Era et al. 2007).

Wir verwendeten zahlreiche Systeme und Methoden, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* um unsere Daten zu gewinnen. In den durchgeführten Experimenten wurde mit murinen embryonalen Stammzellen gearbeitet. Transfiziert wurde aber humanes Genmaterial, um die Übertragung erfolgreicher Experimente in das humane System zu vereinfachen. Die Ergebnisse sind unter Berücksichtigung dieser Tatsache zu beurteilen. Allerdings sind sowohl Brachyury, als auch Eomesodermin hoch konservierte Transkriptionsfaktoren, weshalb in diesem xenogenen System eine Funktionalität äußerst wahrscheinlich ist und im Versuchsverlauf mehrfach gezeigt werden konnte.

In den murinen ES-Zell-Klonen, die mit phBrachyury-IRES-EGFP und phEomesodermin-IRES-EGFP transfiziert wurden, konnte die vermehrte Expression der beiden Gene bereits in undifferenziertem Zustand auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR nachgewiesen werden.

In denjenigen Klonen, in welchen humane Brachyury-mRNA in undifferenziertem Zustand bereits vermehrt exprimiert wurde, war zum selben Zeitpunkt auch MesP1 auf mRNA-Ebene nachweisbar.

Diskussion:

Eine vermehrte Expression auf Proteinebene konnte nur für humanes Brachyury(T), nicht aber für humanes Eomesodermin mittels Immunoassay gezeigt werden. Diese Untersuchung könnte für den Faktor Eomesodermin in einem weiterführenden Projekt erfolgen.

In den Differenzierungsversuchen mit Brachyury(T)- und Eomesodermin-überexprimierenden Stammzell-Klonen konnte anhand der Auszählung der sogenannten „schlagenden Areale“ (*beating areas*) gezeigt werden, dass murine ES-Zellen, in welchen das humane *brachyury(T)*-Gen vermehrt exprimiert wird, deutlich früher und in weitaus größerem Umfang in Richtung kardiovaskuläres Gewebe differenzieren. Das frühe Auftreten kontraktiler Zellen in den Embryoid-Körperchen kann entweder dadurch erklärt werden, dass die hohe humane Brachyury(T)-Expression in diesen ES-Zell-Klonen bereits eine verfrühte Differenzierung in Richtung Mesoderm verursachte, oder aber dass das Brachyury(T) direkt den *mesP1*-Promotor aktiviert und so eine kardiale Differenzierung initiiert.

Klone hingegen, in welche das humane *eomesodermin*-Gen transfiziert wurde, zeigten zwar eine geringfügig verstärkte endogene MesP1-Expression auf mRNA-Ebene, aber kein oder ein nur gering verstärktes kardiogenes Differenzierungspotenzial, was den Transkriptionsfaktor als möglichen direkten Regulator der *mesP1*-kontrollierten kardiovaskulogenen Signalwege unwahrscheinlich macht.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Arbeit Izumis (Izumi, Era et al. 2007). Dieser untersuchte mittels Durchflußzytometrie den Einfluss von Brachyury(T) *knock down* sowie Eomesodermin *knock down* in murinen ESC auf die *flk-1*-positive Fraktion an Tag 4 der Differenzierung. Dabei zeigte sich bei Brachyury(T)-defizienten Zellen keine Verminderung dieser Fraktion, wohingegen die Eomesodermin *knock down*-Probe eine deutlich verringerte positive Fraktion auswies. VEGFR2/*flk-1* wird als frühester Marker für Seitenplattenmesoderm angesehen, welches wiederum als Hauptquelle für das kardiovaskuläre System gilt. Für die kardiovaskulogene Zellpopulation gilt wiederum MesP1 als frühester Faktor, weshalb unsere in Abb. 20 und Abbildung 21 genannten Ergebnisse denen von Izumi absolut widersprechen. Sie stützen vielmehr die Aussagen von Kattman et al. Kattmann postuliert in Abbildung 6 seiner Veröffentlichung, die Entstehung des Herzschlauchs sowie der Blutinseln (vergleiche Kapitel 1.5.1) aus Flk1- und Brachyury(T)- doppelt positiven Vorläuferzellen (Kattman, Huber et al.

Diskussion:

2006). Es scheint daher plausibel, dass sich im frühen Seitenplattenmesoderm eine Brachyury(T)-positive Zellpopulation zu gemeinsamen kardiovaskulären Progenitoren entwickelt, die als gemeinsamen Marker MesP1 exprimieren und zum Herz- und Gefäßsystem ausdifferenzieren.

Es muss jedoch erwähnt werden, dass Izumi ein anderes Differenzierungsprotokoll verwendete: die zweidimensionale Ausplattierung von Zellen auf Kollagen- bzw. Fibronektin-beschichteten Kulturschalen. Diese Variation kann einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Zellen haben. Auch zeigt Izumi seine Ergebnisse nur in embryonalen Stammzellen, während vorliegender Arbeit darüber hinaus auch Daten aus Wildtyp- und *knock down* Embryonen, sowie Daten aus der von Prof. Keller zur Verfügung gestellten Brachyury(T)- *knock down* Zelllinie zu Grunde liegen.

In vorliegender Arbeit wurde außerdem nicht nur mit Überexpression von Transkriptionsfaktoren gearbeitet, sondern auch verschiedene andere Herangehensweisen verfolgt. Dies ist ein weiterer Unterschied zu den oben genannten Veröffentlichungen. So wurde ein *knock down* der endogenen Brachyury(T)-mRNA in murinen ES-Zellen mittels *shRNA* vorgenommen (Abbildung 27), welcher einen massiven Abfall der endogenen MesP1-mRNA und der RNA früher kardialer Faktoren zur Folge hatte.

Gestützt wurden diese Daten durch Ergebnisse aus einem Experiment, welches zeitgleich in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. In diesem Experiment wurde mit Zellen gearbeitet, welche ein *EGFP-knock in* im *brachyury(T)*-Gen besitzen (David, Jarsch et al. 2011). Diese Zellen wurden bereits von Kattman et al in durchflußzytometrischen Experimenten verwendet. Die Ergebnisse dieser Versuche werden in Abbildung 3 dieser Veröffentlichung dargestellt. Aus Brachyury-EGFP-Zellen wurden an Tag 3 und 4 der Differenzierung durch FACS die Brachyury(T)-positive Fraktion und die Brachyury(T)-negative Fraktion voneinander getrennt und mittels qRT-PCR auf ihren Gehalt an muriner Brachyury(T)- und muriner MesP1-mRNA untersucht. Das leicht verzögerte, aber deutlich verstärkte MesP1-Signal in der Brachyury(T)-positiven Zellfraktion bestätigt die Annahme, dass MesP1-exprimierende Zellen von einer Brachyury(T)-positiven Population abstammen. Kongruent dazu sind die Immunoblot-Ergebnisse in

Diskussion:

dieser Arbeit (Abbildung 25). Sie zeigen in murinen ES-Zellen eine direkt dem Anstieg des murinen Brachyury(T)-Proteins folgende Erhöhung des murinen MesP1-Proteins.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, wurde eine Bindung des Brachyury(T)-Proteins an den Promotor des *mesP1*-Gens untersucht. *In silico* Recherche ergab die Existenz verschiedener in Frage kommender Sequenzen: drei sogenannte *T-responsiv elements*, also Nukleotid-Sequenzen, an welche T-Box-Proteine binde, eine *minimal T-responsiv site*, also eine verkürzte T-Box Nukleotid-Sequenz und zwei verwandte Elemente *upstream* des Startcodons, welche in humanen und murinen Zellen hochkonserviert sind (Abbildung 22).

In drei verschiedenen Methoden wurde die Bindung von Brachyury(T)-Protein an den *mesP1*-Promotor und explizit an das AGGTCTC-Motiv gezeigt. Dabei zeigt der *EMSA* (Abbildung 24) die hohe Spezifität mit welcher Brachyury(T) an diese Nukleotid-Sequenz bindet. Die Inkubation mit hundertfachem Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid verdrängt das markierte Oligonukleotid komplett, das Signal ist vollständig ausgelöscht. Unmarkiertes mutiertes Oligonukleotid kann das Signal deutlich reduzieren, da die Bindung erschwert ist. Dennoch kommt es eindeutig zu Verknüpfungen, was die hohe Spezifität der Bindungsstelle unterstreicht. Gefestigt wird dieses Ergebnis durch die Zugabe eines Anti-h/mBra(T)-Antikörpers. Das Signal wird räumlich versetzt, was zeigt, dass die Bande wirklich durch eine Bindung zwischen Brachyury(T)-Protein und Oligonukleotid entstanden ist.

Die Übertragung der *in vitro*-Situation auf den lebendigen Organismus gelang mit *in situ*-Hybridisierungen an Mausembryonen (Abbildung 30 und Abbildung 31). Das *mesP1*-Gen und das *brachyury(T)*-Gen zeigten eine räumliche und zeitliche Ko-Expression in den mesodermalen Zellen des Primitivstreifens. Damit konnte gezeigt werden, dass die Situation in der ES-Zellkultur *in vivo* reproduzierbar ist. Umgekehrt hatte ein Brachyury(T)-*knock out* in Mausembryonen eine massive Reduktion der MesP1-mRNA in der *in situ* Färbung zur Folge. Zusammenfassend scheint eine Entwicklung funktioneller kardiovaskulärer Vorläufer sowohl in der ES-Zellkultur als auch im Mesoderm von Mausembryonen, von einer vorausgehenden *brachyury(T)*-Aktivität abzuhängen.

4.3 Untersuchung der Rolle von Eomesodermin und Identifikation assoziierter Faktoren

Die vorgestellte Arbeit zeigt, dass der Transkriptionsfaktor *brachyury(T)* durch eine direkte Bindung am *mesP1*-Promotor die Differenzierung embryonalen Gewebes in Richtung kardiovaskulärem System induziert und verstärkt. Entscheidend für das weitere Verständnis der molekularen Herzentwicklung ist nun die Identifikation assoziierter Faktoren. Zwei kürzlich veröffentlichte Arbeiten postulieren eine Rolle von Eomesodermin als Induktor von MesP1-Expression und kardialer Differenzierung in embryonalen Stammzellen und Mausembryonen (Costello, Pimeisl et al. 2011; van den Ameele, Tiberi et al. 2012). Die Gruppe um Costello et al. zeigte unter anderem mittels Epiblast-spezifischem *knock down* des *eomesodermin*-Gens ein komplettes Ausbleiben der kardialen Entwicklung in Mausembryonen. Desweiteren untersuchten sie in Embryoidkörperchen die Auswirkung eines kompletten Fehlens von Eomesodermin und fanden in qRT-PCR-Analysen trotz deutlicher Brachyury(T)-Expression keinerlei Expression kardiospezifischer Gene wie *mesP1* oder *nkx2.5*. In Chromatin-Immunpräzipitationen wurde die Bindung von Eomesodermin an drei hochkonservierten T-Box-Bindungsstellen am *mesP1*-Genlocus beobachtet. Diese Daten stellen keinen Widerspruch zu den Ergebnissen vorliegender Arbeit dar, da von einer Beteiligung des Transkriptionsfaktors Eomesodermin an Mesoderm- und Herzentwicklung ausgegangen werden muss. Auch in unseren Versuchen ist eine Mitbeteiligung von Eomesodermin an der Kardiovaskulogenese und an der Aktivierung des *mesP1*-Promotors nicht auszuschließen. Eomesodermin-überexprimierende Klone zeigten eine leicht erhöhte MesP1-Expression und leicht verstärktes kardiovaskuläres Differenzierungsverhalten. Sowohl in den Differenzierungsversuchen mit Brachyury(T)-überexprimierenden embryonalen Stammzellen, in welchen eine verfrühte und signifikant verstärkte Entwicklung von schlagenden Arealen nachgewiesen werden konnte, als auch in den Transaktivierungsversuchen mit *mesP1*-Promotor-kontrolliertem EGFP und Δ CD4 war endogenes Eomesodermin in den Zellen vorhanden. Auch in den Wildtyp-Zellen, welche in der Immunoblot-Analyse zur zeitlichen Darstellung von Brachyury(T)- und MesP1-Protein-Expression verwendet wurden, ist endogenes Eomesodermin aktiv, ebenso

Diskussion:

in den von der Arbeitsgruppe Lickert zur Verfügung gestellten Mausembryonen.

Die fehlende Expression der kardialen Marker in Costellos Eomesodermin-defizienten Mausembryonen kann zudem auch auf eine Problematik im Rahmen der Zellmigration im Primitivstreifen zurückzuführen sein. Wie die Autoren selbst beschreiben wird Eomesodermin als essentiell für diese sehr komplexen Vorgänge während der Gastrulation angesehen (Arnold, Hofmann et al. 2008; Costello, Pimeisl et al. 2011).

Eine weitere Schwäche der Veröffentlichung von Costello et al. ist die fehlende parallele Beobachtung und Diskussion einer Rolle von Brachyury(T) in der embryonalen Kardiovaskulogenese, trotz zahlreicher Literatur zu diesem Thema.

Auf der anderen Seite zeigten van den Ameele et al., dass Eomesodermin in Abhängigkeit vom Niveau der Activin- und Nodal-Expression ES-Zell-Differenzierung entweder in Richtung endodermale Entwicklung lenken kann, oder die Bildung kardialen Mesoderms induziert. Auch diese Arbeitsgruppe weißt eine direkte Bindung von Eomesodermin an die *mesP1*-Promotor-Region im Bereich konservierter T-Box-Bindungsstellen mittels Chromatin-Immunpräzipitation nach.

4.4 Reprogrammierung adulter Stammzellen

In Anbetracht der Tatsache, dass die derzeitige Forschung und auch die Öffentlichkeit in Deutschland und international die Verwendung von iPS- und piPS-Zellen als mindestens ebenso vielversprechend und gleichzeitig rechtlich und ethisch wesentlich unbedenklicher ansieht, als die Arbeit mit embryonalen Stammzellen, sollte die Übertragung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in reprogrammierten adulten Stammzellen eines der weiterführenden Projekte darstellen.

4.5 Forschung an murinen embryonalen Stammzellen

Die Zellkultur humaner embryonaler Stammzellen ist arbeitsintensiv, zeitaufwändig und teuer. Zudem bestehen in der Bevölkerung ausgeprägte Vorbehalte, die auf ethischen Bedenken bezüglich der Verwendung

menschlichen Materials beruhen. Routinemäßig wird daher in der Grundlagenforschung mit murinen embryonalen Stammzellen gearbeitet. Gerade in der frühen Embryogenese des Säugetiers sind die Signal-Transduktionswege stark konserviert. Ihre Entschlüsselung lässt sich wesentlich leichter in murinen embryonalen Stammzellen betreiben, da diese einfacher zu kultivieren sind (siehe 1.3.1). Hat man Modelle für das Zusammenwirken verschiedener Faktoren erstellt, können diese in weiteren Ansätzen auf die humane ES-Zellkultur übertragen und überprüft werden.

4.6 Ist die Vision von der Kultur kontraktiler Kardiomyozyten aus humanen embryonalen Stammzellen realistisch?

Es gibt Hindernisse auf dem Weg zur Anwendung von ES-Zellen im Bereich der Transplantation und Gewebeersatz-Therapie, von denen im Folgenden Einzelne genannt werden sollen:

In vitro-Kultivierung von Zellen birgt immer die Gefahr der Kontamination mit Krankheitserregern, z.B. mit Mykoplasmen oder Viren. Diesem Problem kann man durch Etablierung spezieller Sicherheitsstandards begegnen. Hinzu kommt allerdings, dass bisher keine routinemäßige Kultur von hES-Zellen ohne feeder-Zellen oder konditioniertes Medium gelingt, was ein Infektionsrisiko durch endogene Viren des Tieres mit sich bringt.

Ein weiteres Problem stellt die Gefahr der Tumorbildung und des unkontrollierten Wachstums dar. Besonders wenn im Rahmen der Therapie gewünscht wird, dass transplantierte Zellen *in vivo* weiter proliferieren oder migrieren. Potentiell maligne Zellen sollten daher vor Therapieanwendung ausgesiekt werden. Die Schwierigkeit hierbei dürfte sein, dass gerade embryonale Stammzellen und die aus ihnen hervorgehenden Gewebe, viele Gemeinsamkeiten mit Tumorzellen und -gewebe besitzen, wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, welche auf der Expression der selben oder ähnlicher Marker beruhen. Dies macht ein Herausfiltern von Zellen mit erhöhtem Entartungspotenzial durch Unterschiede im Expressionsmusters kompliziert (Kim and Orkin 2011).

Diskussion:

Die Verwendung autologer Stammzellen wird, was diese Umstände angeht, als unproblematischer angesehen, denn es kann davon ausgegangen werden, dass sie sich auch unter physiologische Bedingungen in peripheren Organen ansiedeln und dort proliferieren.

Die Kontrolle der Entartung transplanteder Zellen durch ein sogenanntes „Selbstmord-Gen“ (*suicide gene*), welches bei verändertem Wachstumsverhalten die Sensitivität der Zelle gegen toxische Substanzen erhöht und sie dadurch zerstörbar macht, war ein vielbeachteter Ansatz durch Fareed et al. (Fareed and Moolten 2002). Zahlreiche Arbeitsgruppen verfolgen seither diese Methode um zum Beispiel bei Teratomentstehung an der Injektionsstelle eine Apoptose der entarteten Zellen zu initiieren (Cao, Drukker et al. 2007).

Auch genetische Instabilitäten stellen ein Risiko bezüglich der Auslösung maligner Prozesse durch Zell- oder Gewebetransplantation dar (Hanson and Caisander 2005; Caisander, Park et al. 2006). Dieses Risiko steigt mit dem Alter der Linie an. Eine Überprüfung der Vollständigkeit des Chromosomensatzes ist daher ratsam, aber teuer.

Die Überprüfung der epigenetischen Stabilität von hES-Zelllinien scheint ebenfalls ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu ihrer klinischen Anwendung zu sein, wie Rugg-Gunn et al. zeigen konnten (Rugg-Gunn, Ferguson-Smith et al. 2007). Die Überprüfung von 46 unterschiedlichen hES-Zelllinien ergab Verluste spezifischer Allel-Expressionen, welche einen Einfluss auf die Differenzierung und epigenetische Stabilität *in vitro* und auch nach Transplantationen haben könnten.

Eine über längeren Zeitraum kultivierte ES-Zelllinie birgt desweiteren die Gefahr, dass sich einzelne Zellen insofern verändern, als sie besser an die Kulturbedingungen angepasst sind und dadurch positiv selektioniert werden. Diese veränderten Zellen können im Verlauf zu einer dominierenden Population in der Kultur werden, weshalb jede Zelllinie regelmäßig diesbezüglich beurteilt werden sollte (Rosler, Fisk et al. 2004).

Die Kultur kontraktiler Kardiomyozyten aus humanen embryonalen Stammzellen zur Anwendung in der Klinik ist daher momentan noch eher eine Vision, als ein realisierbares Projekt.

Doch selbst wenn sich diese Idee eines Tages als nicht realisierbar herausstellen sollte, sind die Erkenntnisse, welche im Rahmen dieser

Diskussion:

Projekte gewonnen werden, für viele Bereiche der Grundlagenforschung und für die Forschung mit alternativen Zell-Ressourcen essentiell.

5 Zusammenfassung:

Der frühe kardiovaskulogene Transkriptionsfaktor Mesoderm Posterior 1 kennzeichnet und induziert die Zellpopulation der frühen kardiovaskulären Progenitorzellen. Die Erforschung der molekularen Vorgänge während der Differenzierung des kardiovaskulären Mesoderms erfordert eine intensive Untersuchung potenzieller Regulatoren der *mesP1*-Expression. Die beiden in der Literatur diesbezüglich kontrovers diskutierten Transkriptionsfaktoren Brachyury(T) und Eomesodermin wurden für diese Arbeit ausgewählt und analysiert. Es wurde gezeigt, dass eine MesP1-positive Zellpopulation *in vitro* und *in vivo*, von einer *brachyury(T)*-Aktivität abhängig ist. Mithilfe von für diesen Zweck konstruierten Überexpressionsvektoren wurden Brachyury(T)- und Eomesodermin-überexprimierende ES-Zell-Klone generiert. In Ersteren konnte eine verfrühte und verstärkte MesP1-Induktion und Entwicklung kardiovaskulären Gewebes beobachtet werden. Mittels EMSA, Reportergen-Assays und Transaktivierungs-Analysen wurde eine direkte Bindung von Brachyury an den *mesP1*-Promotor untersucht. Es wurde gezeigt, dass Brachyury(T) direkt an ein 3,4 kb-*mesP1*-Promotor-Fragment bindet und es aktiviert. In *in situ*-Hybridisierungen zeigte sich eine räumliche und zeitliche Koexpression der Transkriptionsfaktoren MesP1 und Brachyury(T) sowie ein Ausbleiben der MesP1-Expression bei fehlender vorangegangener Brachyury(T)-Expression.

Diese Arbeit trägt damit zum Verständnis der Signalwege in der frühen embryonalen Kardiovaskulogenese bei und könnte einen Beitrag zur Entwicklung diagnostischer und therapeutischer Methoden in der Zelltherapie, dem *tissue engineering* und der pharmakologischen Forschung leisten.

6 Abkürzungsverzeichnis:

Vol %	Volumenprozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Adenin (Purinbase)
A	Ampère
Abb.	Abbildung
Ac	Azetat
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basic-helix-loop-helix (Proteinstruktur)
BLP	basic lysis puffer
BMP	bone morphogenetic protein („knochenmorphogenetisches Protein“)
bp	base pairs („Basenpaare“)
Bra	Brachyury
BSA	bovine serum albumine („Rinderserumalbumin“)
Bsp.	Beispiel
C	Cytosin (Pyrimidinbase)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation („Unterscheidungsgruppe“ = immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen)
cDNA	complementary desoxyribonuclein acid („komplementäre Desoxyribonukleinsäure“)
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
c-Myc	myelocytomatosis cellular oncogene
CT	cycle treshold
CXCR4	chemokine receptor type 4
D	Dalton
d	days („Tage“)
Dkk-1	Dickkopf 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonuclein acid („Desoxyribonukleinsäure“)

Abkürzungsverzeichnis:

dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
Dr.	Doktor
dsDNA	double strand DNA („doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure“)
EB	embryoid body
E. coli	Echerichia coli
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein („verbessertes grün fluoreszierendes Protein“)
EGFP+	EGFP positiv/EGFP exprimierend
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
Eo	Eomesodermin
ESC/ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	et alii/et aliae/et alia („und andere“)
Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
Flk-1	fetal liver kinase 1
g	Gramm
G	Guanin (Purinbase)
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
GATA4	Transkriptionsfaktor, der an die Sequenz GATA bindet
GFP	wildtype green fluorescent protein („Wildtyp grün fluoreszierendes Protein“)
GSES	murine embryonale Stammzellen der Linie GSES
G418	Genitocinsulphat
h	Stunde
h	human (menschlich)
HCl	Hydrogenchlorid
HFR	heart forming regions („herzbildende Regionen“)
HLA	human leukocyte antigen
HRP	Horse raddish peroxidase („Meerrettich-Peroxidase“)
ICM	inner cell mass („innere Zellmasse“)
Ig	Immunglobulin
IGF	insulin-like growth factor
iPS	induced pluripotent stem cells (induzierte pluripotente Stammzellen)

Abkürzungsverzeichnis:

IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle (einer messenger RNA)
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LIF	Leukemia inhibitory factor
LRP 5/6	lipoprotein receptor-related protein 5/6
M	molare Masse
M./m.	musculus
MACS	magnetic cell sorting
MCS	multiple cloning site
med.	medicinae
Mef2c	Myocyte enhancer factor 2c
MEM	minimum essential media
MesP1	Mesoderm posterior 1
MesP2	Mesoderm posterior 2
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N ₂	flüssiger Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
Oct4	Octamer 4
ORF	open reading frame („offenes Leseraster“)
p	plasmid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
piPS	Protein induzierte pluripotente Stammzellen
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
pH	pH-Wert = Maß für den sauren oder basischen Charakter einer Lösung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rer. nat.	rerum naturalium
RNAi	RNA-Interference
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro minute)

Abkürzungsverzeichnis:

RT-PCR	PCR nach reverser Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	short hairpin Ribonukleinsäure
siRNA	small interfering RNA
T	tail (Synonym für Brachyury)
T	Thymin (Pyrimidinbase)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TAH	total artificial heart
TELT	Bezeichnung für einen Lysepuffer, welcher Tris, EDTA, LiCl und Triton X-100 enthält
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF	transforming growth factor
TE	Tris-EDTA-Puffer
U	Einheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America („Vereinigte Staaten von Amerika“)
UV	ultra violett
V	Volt
VAD	vetricular assist devices („Ventrikuläre Unterstützungssysteme“)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZES	zentrale Ethik-Kommission für Stammzellforschung

7 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich vorliegende Dissertation mit dem Thema „Regulation des kardiovaskulogenen Transkriptionsfaktors *mesP1*“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter der Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde

München den

(Veronica Barbara Jarsch)

8 Danksagung:

Meine Danksagung gilt allen voran meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Wolfgang-Michael Franz, für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas und für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meiner Promotion nachzugehen. Ebenso viel Dank schulde ich Herrn Professor Dr. rer. nat. Robert David, der mich während meiner gesamten Promotion mit seinem Wissen und seiner Geduld hervorragend betreute.

Große Unterstützung erfuhr ich durch die technischen Assistentinnen Christiane Groß, Judith Arcifa und Barbara Markieton, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Durch ihre große Hilfsbereitschaft erleichterten mir auch meine Mitdoktoranden Petra Nathan, Marcus Vallaster und Julia Jung das Arbeiten im Labor. Vielen Dank daher auch an sie.

Auf keinen Fall unerwähnt bleiben sollte Herrn Professor Dr. Dr. med. Jürgen Heesemann der mir die Teilnahme am Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“ der LMU ermöglichte.

Zuletzt möchte ich meiner lieben Familie danken. Ohne sie wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Insbesondere meine Zwillingschwester Iris und meine Eltern Michael und Monika, sowie mein Freund Sebastian Konrad haben mir mit ihren Ratschlägen und ihrem Verständnis sehr geholfen und mir die Freiräume geschaffen, eine Arbeit in diesem Umfang durchzuführen.

10 Literatur:

- Adewumi, O., B. Aflatoonian, et al. (2007). "Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative." Nat Biotechnol **25**(7): 803-816.
- Agarwal, P. P., P. N. Cascade, et al. (2009). "Novel treatment options for chronic heart failure: a radiologist's perspective." AJR Am J Roentgenol **193**(1): W14-24.
- Allegrucci, C. and L. E. Young (2007). "Differences between human embryonic stem cell lines." Hum Reprod Update **13**(2): 103-120.
- Ameen, C., R. Strehl, et al. (2008). "Human embryonic stem cells: current technologies and emerging industrial applications." Crit Rev Oncol Hematol **65**(1): 54-80.
- Arnold, S. J., U. K. Hofmann, et al. (2008). "Pivotal roles for eomesodermin during axis formation, epithelium-to-mesenchyme transition and endoderm specification in the mouse." Development **135**(3): 501-511.
- Asp, J., D. Steel, et al. (2010). "Cardiomyocyte clusters derived from human embryonic stem cells share similarities with human heart tissue." J Mol Cell Biol **2**(5): 276-283.
- Baba, A., G. Hirata, et al. (2006). "Psychiatric problems of heart transplant candidates with left ventricular assist devices." J Artif Organs **9**(4): 203-208.
- Badcock, G., C. Pigott, et al. (1999). "The human embryonal carcinoma marker antigen TRA-1-60 is a sialylated keratan sulfate proteoglycan." Cancer Res **59**(18): 4715-4719.
- Badura-Lotter, G. (2005). Forschung an embryonalen Stammzellen: Zwischen biomedizinischer Ambition und ethischer Reflexion (Kultur der Medizin), Campus Verlag.
- Batista, R. (1999). "Partial left ventriculectomy--the Batista procedure." Eur J Cardiothorac Surg **15 Suppl 1**: S12-19; discussion S39-43.

Literatur:

- Benninghoff, A. and D. Drenckhahn (2003). Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Elsevier GmbH, Urban und Fischer.
- Bjornson, C. R., K. J. Griffin, et al. (2005). "Eomesodermin is a localized maternal determinant required for endoderm induction in zebrafish." Dev Cell **9**(4): 523-533.
- Bondue, A., G. Lapouge, et al. (2008). "Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification." Cell Stem Cell **3**(1): 69-84.
- Bondue, A., S. Tannler, et al. (2011). "Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation." J Cell Biol **192**(5): 751-765.
- Bongso, A., C. Y. Fong, et al. (1994). "Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts." Hum Reprod **9**(11): 2110-2117.
- Bradley, A., M. Evans, et al. (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." Nature **309**(5965): 255-256.
- Brenner, C. J. (2008). Verstärkung der Kardiogenese in murinen embryonalen Stammzellen durch Überexpression des Transkriptionsfaktors Mesoderm posterior 1 (MesP1), Ludwig-Maximilians-Universität.
- Brivanlou, A. H., F. H. Gage, et al. (2003). "Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells." Science **300**(5621): 913-916.
- Bruce, A. E., C. Howley, et al. (2003). "The maternally expressed zebrafish T-box gene eomesodermin regulates organizer formation." Development **130**(22): 5503-5517.
- Bundesministeriums der Justiz (1990). Embryonenschutzgesetz. Bundesministerium der Justiz. Berlin.
- Caisander, G., H. Park, et al. (2006). "Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture." Chromosome Res **14**(2): 131-137.

Literatur:

- Cao, F., M. Drukker, et al. (2007). "Molecular imaging of embryonic stem cell misbehavior and suicide gene ablation." Cloning Stem Cells **9**(1): 107-117.
- Carpenter, M. K., E. S. Rosler, et al. (2004). "Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system." Dev Dyn **229**(2): 243-258.
- Casey, E. S., M. Tada, et al. (1999). "Bix4 is activated directly by VegT and mediates endoderm formation in *Xenopus* development." Development **126**(19): 4193-4200.
- Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-655.
- Cheng, Z., T. Biechele, et al. (2011). "Crystal structures of the extracellular domain of LRP6 and its complex with DKK1." Nat Struct Mol Biol **18**(11): 1204-1210.
- Ciruna, B. G. and J. Rossant (1999). "Expression of the T-box gene Eomesodermin during early mouse development." Mech Dev **81**(1-2): 199-203.
- Clements, D., H. C. Taylor, et al. (1996). "Distinct regulatory control of the Brachyury gene in axial and non-axial mesoderm suggests separation of mesoderm lineages early in mouse gastrulation." Mech Dev **56**(1-2): 139-149.
- Conley, B. J., M. Denham, et al. (2005). "Mouse embryonic stem cell derivation, and mouse and human embryonic stem cell culture and differentiation as embryoid bodies." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 23**: Unit 23 22.
- Conley, B. J., J. C. Young, et al. (2004). "Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells." Int J Biochem Cell Biol **36**(4): 555-567.
- Costello, I., I. M. Pimeisl, et al. (2011). "The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of Mesp1 to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation." Nat Cell Biol **13**(9): 1084-1091.

Literatur:

- Cyranoski, D. (2008). "Stem cells: 5 things to know before jumping on the iPS bandwagon." Nature **452**(7186): 406-408.
- Dandel, M., Y. Weng, et al. (2011). "Heart failure reversal by ventricular unloading in patients with chronic cardiomyopathy: criteria for weaning from ventricular assist devices." Eur Heart J **32**(9): 1148-1160.
- Dang, S. M., M. Kyba, et al. (2002). "Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems." Biotechnol Bioeng **78**(4): 442-453.
- David, R., C. Brenner, et al. (2008). "MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling." Nat Cell Biol **10**(3): 338-345.
- David, R., C. Brenner, et al. (2008). "MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling." Nat Cell Biol **in press**.
- David, R., V. B. Jarsch, et al. (2011). "Induction of MesP1 by Brachyury(T) generates the common multipotent cardiovascular stem cell." Cardiovasc Res.
- David, R., F. Schwarz, et al. (2013). "Selection of a common multipotent cardiovascular stem cell using the 3.4-kb MesP1 promoter fragment." Basic Res Cardiol **108**(1): 312.
- David, R., J. Stieber, et al. (2009). "Forward programming of pluripotent stem cells towards distinct cardiovascular cell types." Cardiovasc Res.
- Deutsche Stiftung Organtransplantation. (2012). "Daten und Grafiken 2012." Retrieved 09.02.2013, from <http://www.dso.de/>.
- Dimos, J. T., K. T. Rodolfa, et al. (2008). "Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons." Science **321**(5893): 1218-1221.
- Dowell, J. D., M. Rubart, et al. (2003). "Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart." Cardiovasc Res **58**(2): 336-350.

Literatur:

- Ebert, A. D., J. Yu, et al. (2009). "Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient." Nature **457**(7227): 277-280.
- Edwards, Y. H., W. Putt, et al. (1996). "The human homolog T of the mouse T(Brachyury) gene; gene structure, cDNA sequence, and assignment to chromosome 6q27." Genome Res **6**(3): 226-233.
- Eisenberg, L. M. and C. A. Eisenberg (2006). "Wnt signal transduction and the formation of the myocardium." Dev Biol **293**(2): 305-315.
- Eurotransplant International Foundation. (2012). "Yearly statistics 2012." from http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=year_2012.pdf.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-156.
- Fareed, M. U. and F. L. Moolten (2002). "Suicide gene transduction sensitizes murine embryonic and human mesenchymal stem cells to ablation on demand-- a fail-safe protection against cellular misbehavior." Gene Ther **9**(14): 955-962.
- Ferre-D'Amare, A. R., G. C. Prendergast, et al. (1993). "Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain." Nature **363**(6424): 38-45.
- Hancock, S. N., S. I. Agulnik, et al. (1999). "Mapping and expression analysis of the mouse ortholog of *Xenopus* Eomesodermin." Mech Dev **81**(1-2): 205-208.
- Hanna, J., M. Wernig, et al. (2007). "Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin." Science **318**(5858): 1920-1923.
- Hanson, C. and G. Caisander (2005). "Human embryonic stem cells and chromosome stability." APMIS **113**(11-12): 751-755.
- Henderson, J. K., J. S. Draper, et al. (2002). "Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-

- specific embryonic antigens." Stem Cells **20**(4): 329-337.
- Hescheler, J., B. K. Fleischmann, et al. (1997). "Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis." Cardiovasc Res **36**(2): 149-162.
- Hillyer, C. D. and S. J. Wells (1993). "Alternative sources of hematopoietic stem cells for bone marrow transplantation and rescue." J Hematother **2**(4): 491-499.
- Hough, S. R., I. Clements, et al. (2006). "Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and Nanog." Stem Cells **24**(6): 1467-1475.
- Huangfu, D., R. Maehr, et al. (2008). "Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds." Nat Biotechnol **26**(7): 795-797.
- Ieda, M., J. D. Fu, et al. (2010). "Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors." Cell **142**(3): 375-386.
- Izumi, N., T. Era, et al. (2007). "Dissecting the molecular hierarchy for mesendoderm differentiation through a combination of embryonic stem cell culture and RNA interference." Stem Cells **25**(7): 1664-1674.
- Jan, Y. N. and L. Y. Jan (1993). "HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis." Cell **75**(5): 827-830.
- Johnson, B. V., N. Shindo, et al. (2008). "Understanding pluripotency--how embryonic stem cells keep their options open." Mol Hum Reprod **14**(9): 513-520.
- Kattman, S. J., T. L. Huber, et al. (2006). "Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages." Dev Cell **11**(5): 723-732.
- Kattman, S. J., T. L. Huber, et al. (2006). "Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages." Dev Cell **11**(5): 723-732.

- Kim, J. and S. H. Orkin (2011). "Embryonic stem cell-specific signatures in cancer: insights into genomic regulatory networks and implications for medicine." Genome Med **3**(11): 75.
- Kimber, S. J. (2005). "Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology." Reproduction **130**(2): 131-145.
- Kispert, A. and B. G. Hermann (1993). "The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein." EMBO J **12**(12): 4898-4899.
- Kispert, A. and B. G. Herrmann (1993). "The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein." EMBO J **12**(8): 3211-3220.
- Kitajima, S., S. Miyagawa-Tomita, et al. (2006). "Mesp1-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system." Dev Dyn **235**(2): 395-402.
- Kitajima, S., A. Takagi, et al. (2000). "MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm." Development **127**(15): 3215-3226.
- Klug, M. G., M. H. Soonpaa, et al. (1996). "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts." J Clin Invest **98**(1): 216-224.
- Koh, G. Y., M. H. Soonpaa, et al. (1995). "Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs." J Clin Invest **96**(4): 2034-2042.
- Korzh, V. and D. Grunwald (2001). "Nadine Dobrovolskaia-Zavadskaia and the dawn of developmental genetics." Bioessays **23**(4): 365-371.
- Kwon, C., K. R. Cordes, et al. (2008). "Wnt/beta-catenin signaling acts at multiple developmental stages to promote mammalian cardiogenesis." Cell Cycle **7**(24): 3815-3818.
- Lemischka, I. R. (2010). "Hooking up with Oct4." Cell Stem Cell **6**(4): 291-292.
- Leor, J., S. Gerecht-Nir, et al. (2007). "Human embryonic stem cell transplantation to repair the infarcted myocardium." Heart.

Literatur:

- Leor, J., M. Patterson, et al. (1996). "Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium?" Circulation **94**(9 Suppl): II332-336.
- Levenberg, S., J. S. Golub, et al. (2002). "Endothelial cells derived from human embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4391-4396.
- Lickert, H., S. Kutsch, et al. (2002). "Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm." Dev Cell **3**(2): 171-181.
- Lindsley, R. C., J. G. Gill, et al. (2008). "Mesp1 coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs." Cell Stem Cell **3**(1): 55-68.
- Maltsev, V. A., J. Rohwedel, et al. (1993). "Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types." Mech Dev **44**(1): 41-50.
- Mattner, F., I. F. Chaberny, et al. (2007). "[Infection control measures and surveillance of patients with ventricular assist devices]." Anaesthesist **56**(5): 429-436.
- McConnell, J., L. Petrie, et al. (2005). "Eomesodermin is expressed in mouse oocytes and pre-implantation embryos." Mol Reprod Dev **71**(4): 399-404.
- Mehmet, A. (2005). Harmonische Reduktion des linken Ventrikels, Westfälische Wilhelms-Universität.
- Meissner, A., M. Wernig, et al. (2007). "Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells." Nat Biotechnol. **25**(10): 1177-1181. Epub 2007 Aug 1127.
- Menasche, P. (2005). "The potential of embryonic stem cells to treat heart disease." Curr Opin Mol Ther **7**(4): 293-299.
- Menasche, P. (2005). "Skeletal myoblast for cell therapy." Coron Artery Dis **16**(2): 105-110.
- Meyer, A. and M. Slaughter (2011). "The total artificial heart." Panminerva Med **53**(3): 141-154.

Literatur:

- Mimeault, M. and S. K. Batra (2006). "Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies." Stem Cells **24**(11): 2319-2345.
- Min, J. Y., Y. Yang, et al. (2002). "Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats." J Appl Physiol **92**(1): 288-296.
- Moore, K., T. Vidhya, et al. (2007). Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik, Elsevier GmbH, Urban und Fischer.
- Moreira, L. F. and A. A. Leirner (2001). "Dynamic cardiomyoplasty: a new summing up." Artif Organs **25**(11): 857-861.
- Moreira, L. F. and N. A. Stolf (2001). "Dynamic cardiomyoplasty as a therapeutic alternative: current status." Heart Fail Rev **6**(3): 201-212.
- Moreira, L. F., N. A. Stolf, et al. (2001). "Current perspectives of partial left ventriculectomy in the treatment of dilated cardiomyopathy." Eur J Cardiothorac Surg **19**(1): 54-60.
- Moretti, A., M. Bellin, et al. (2010). "Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome." N Engl J Med **363**(15): 1397-1409.
- Morrison, K., C. Papapetrou, et al. (1996). "Genetic mapping of the human homologue (T) of mouse T(Brachyury) and a search for allele association between human T and spina bifida." Hum Mol Genet **5**(5): 669-674.
- Muller, C. W. and B. G. Herrmann (1997). "Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor." Nature **389**(6653): 884-888.
- Murre, C., P. S. McCaw, et al. (1989). "Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence." Cell **58**(3): 537-544.

Literatur:

- Nagy, A., E. Gocza, et al. (1990). "Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse." Development **110**(3): 815-821.
- Nagy, A., J. Rossant, et al. (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8424-8428.
- Nichols, J., B. Zevnik, et al. (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**(3): 379-391.
- Nobelprize.org (2013). "All Nobel Prizes in Physiology or Medicine." Nobelprize.org.
- Okita, K., T. Ichisaka, et al. (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." Nature **448**(7151): 313-317.
- Pardo, M., B. Lang, et al. (2010). "An expanded Oct4 interaction network: implications for stem cell biology, development, and disease." Cell Stem Cell **6**(4): 382-395.
- Parga, J. R., L. F. Avila, et al. (2001). "Partial left ventriculectomy in severe idiopathic dilated cardiomyopathy: assessment of short-term results and their impact on late survival by magnetic resonance imaging." J Magn Reson Imaging **13**(5): 781-786.
- Park, I. H., R. Zhao, et al. (2008). "Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors." Nature **451**(7175): 141-146.
- Park, Y. B., Y. Y. Kim, et al. (2008). "Alterations of proliferative and differentiation potentials of human embryonic stem cells during long-term culture." Exp Mol Med **40**(1): 98-108.
- Pease, S., P. Braghetta, et al. (1990). "Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF)." Dev Biol **141**(2): 344-352.
- Pera, M. F., B. Reubinoff, et al. (2000). "Human embryonic stem cells." J Cell Sci **113** (Pt 1): 5-10.

Literatur:

- Pesce, M. and H. R. Scholer (2001). "Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development." Stem Cells **19**(4): 271-278.
- Ramakrishna, H., D. E. Jaroszewski, et al. (2009). "Adult cardiac transplantation: a review of perioperative management Part-I." Ann Card Anaesth **12**(1): 71-78.
- Reubinoff, B. E., M. F. Pera, et al. (2000). "Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro." Nat Biotechnol **18**(4): 399-404.
- Richards, M., C. Y. Fong, et al. (2002). "Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells." Nat Biotechnol **20**(9): 933-936.
- Robert Koch Institut. (2012). "Register genehmigter Forschungsvorhaben mit hES-Zellen in Deutschland." Retrieved 20.10.2012, from http://www.rki.de/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Register/register_node.html.
- Rosler, E. S., G. J. Fisk, et al. (2004). "Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions." Dev Dyn **229**(2): 259-274.
- Rugg-Gunn, P. J., A. C. Ferguson-Smith, et al. (2007). "Status of genomic imprinting in human embryonic stem cells as revealed by a large cohort of independently derived and maintained lines." Hum Mol Genet **16 Spec No. 2**: R243-251.
- Russ, A. P., S. Wattler, et al. (2000). "Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation." Nature **404**(6773): 95-99.
- Ryan, K., N. Garrett, et al. (1996). "Eomesodermin, a key early gene in *Xenopus* mesoderm differentiation." Cell **87**(6): 989-1000.
- Saga, Y., N. Hata, et al. (1996). "MesP1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation." Development **122**(9): 2769-2778.

Literatur:

- Saga, Y., S. Kitajima, et al. (2000). "Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development." Trends Cardiovasc Med **10**(8): 345-352.
- Saga, Y., S. Miyagawa-Tomita, et al. (1999). "MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube." Development **126**(15): 3437-3447.
- Sakurai, H., T. Era, et al. (2006). "In vitro modeling of paraxial and lateral mesoderm differentiation reveals early reversibility." Stem Cells **24**(3): 575-586.
- Schaffer, J. M., G. J. Arnaoutakis, et al. (2011). "Bleeding complications and blood product utilization with left ventricular assist device implantation." Ann Thorac Surg **91**(3): 740-747; discussion 747-749.
- Schumacher, G., J. Hess, et al. (2007). Klinische Kinderkardiologie: Diagnostik und Therapie der angeborenen Herzfehler. Berlin, Springer verlag.
- Semenov, M. V., K. Tamai, et al. (2001). "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." Curr Biol **11**(12): 951-961.
- Shamblott, M. J., J. Axelman, et al. (2001). "Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 113-118.
- Singh, H., P. Mok, et al. (2010). "Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells." Stem Cell Res **4**(3): 165-179.
- Soonpaa, M. H., G. Y. Koh, et al. (1994). "Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium." Science **264**(5155): 98-101.
- Stadtfield, M., M. Nagaya, et al. (2008). "Induced pluripotent stem cells generated without viral integration." Science **322**(5903): 945-949.
- Stefanovic, S. and M. Puceat (2010). "[The dual role of OCT4]." Med Sci (Paris) **26**(4): 411-416.
- Stott, D., A. Kispert, et al. (1993). "Rescue of the tail defect of Brachyury mice." Genes Dev **7**(2): 197-203.

- Struber, M., A. L. Meyer, et al. (2009). "The current status of heart transplantation and the development of "artificial heart systems"." Dtsch Arztebl Int **106**(28-29): 471-477.
- Tada, M., E. S. Casey, et al. (1998). "Bix1, a direct target of Xenopus T-box genes, causes formation of ventral mesoderm and endoderm." Development **125**(20): 3997-4006.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-872.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.
- Takahashi, T., B. Lord, et al. (2003). "Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes." Circulation **107**(14): 1912-1916.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147.
- van den Aamele, J., L. Tiberi, et al. (2012). "Eomesodermin induces Mesp1 expression and cardiac differentiation from embryonic stem cells in the absence of Activin." EMBO Rep **13**(4): 355-362.
- Ventura, C., M. Maioli, et al. (2005). "Turning on stem cell cardiogenesis with extremely low frequency magnetic fields." FASEB J **19**(1): 155-157.
- Wagner, M. and M. A. Siddiqui (2007). "Signal transduction in early heart development (II): ventricular chamber specification, trabeculation, and heart valve formation." Exp Biol Med (Maywood) **232**(7): 866-880.
- Warren, L., P. D. Manos, et al. (2010). "Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA." Cell Stem Cell **7**(5): 618-630.
- Wattler, S., A. Russ, et al. (1998). "A combined analysis of genomic and primary protein structure defines the

- phylogenetic relationship of new members of the T-box family." Genomics **48**(1): 24-33.
- Wernig, M., J. P. Zhao, et al. (2008). "Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(15): 5856-5861.
- Wilkinson, D. G., S. Bhatt, et al. (1990). "Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation." Nature **343**(6259): 657-659.
- Williams, R. L., D. J. Hilton, et al. (1988). "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells." Nature **336**(6200): 684-687.
- Wittler, L. (2002). Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik, Georg-August-Universität.
- Wobus, A. M., G. Kaomei, et al. (1997). "Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes." J Mol Cell Cardiol **29**(6): 1525-1539.
- Wobus, A. M., G. Wallukat, et al. (1991). "Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers." Differentiation **48**(3): 173-182.
- Wong, K. K., S. C. Cheung, et al. (2010). "Numerical simulation and experimental validation of swirling flow in spiral vortex ventricular assist device." Int J Artif Organs **33**(12): 856-867.
- Xu, C., S. Police, et al. (2002). "Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells." Circ Res **91**(6): 501-508.
- Yamanaka, S. (2009). "Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation." Nature **460**(7251): 49-52.

Literatur:

- Yang, Y., J. Y. Min, et al. (2002). "VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells." J Appl Physiol **93**(3): 1140-1151.
- Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (2012). Tätigkeitsbericht der Zentralen Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES).
- Zhou, H., S. Wu, et al. (2009). "Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins." Cell Stem Cell **4**(5): 381-384.
- Zweigerdt, R., M. Burg, et al. (2003). "Generation of confluent cardiomyocyte monolayers derived from embryonic stem cells in suspension: a cell source for new therapies and screening strategies." Cytotherapy **5**(5): 399-413.