

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

**VERSTÄRKUNG DER KARDIOVASKULOGENESE  
IN MURINEN EMBRYONALEN STAMMZELLEN  
DURCH ÜBEREXPRESSION DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS  
MESODERM POSTERIOR 1 (MESP1)**

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

vorgelegt von

**CHRISTOPH JOHANNES BRENNER**

aus München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang-Michael Franz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Günther Eißner
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Roland Goldbrunner Prof. Dr. Thomas Heinzeller
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Robert David
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h. c. Maximilian Reiser
Tag der mündlichen Prüfung:	9. Oktober 2008

---

<b>I. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Klinischer Hintergrund</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Embryonale Stammzellen</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Allgemeine Einführung.....	2
1.2.1.1 Gewinnung und Kultivierung embryonaler Stammzellen .....	3
1.2.1.2 Rechtliche und ethische Aspekte in Deutschland .....	5
1.2.2 Potential embryonaler Stammzellen .....	6
1.2.2.1 Zelltherapeutischer Einsatz.....	6
1.2.2.1.1 Immunologische Verträglichkeit .....	8
1.2.2.1.2 Problematik der Aufreinigung .....	9
1.2.2.1.3 Gewinnung ausreichender Zellzahlen.....	10
1.2.2.2 Weitere Einsatzmöglichkeiten .....	11
<b>1.3 Entwicklung des Herzkreislaufsystems</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 Embryonalentwicklung.....	12
1.3.2 Entwicklung auf molekularer Ebene.....	13
1.3.2.1 Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaling .....	13
1.3.2.2 TGF- $\beta$ /BMP-Signaling .....	16
1.3.2.3 FGF-Signaling.....	19
<b>1.4 Der mesoderm posterior 1 (MesP1) Transkriptionsfaktor</b> .....	<b>22</b>
1.4.1 Charakterisierung von Gen und Protein.....	22
1.4.2 Expressionsmuster und Funktion während der Embryonalentwicklung .....	24
1.4.3 Regulationsmechanismus des MesP1 .....	27
<b>1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>28</b>
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>30</b>
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	30
2.1.2 Enzyme und Proteine .....	31
2.1.3 Antikörper .....	31
2.1.4 Zellkultur-Materialien.....	33
2.1.5 Bakterienkultur-Materialien.....	33
2.1.6 Kits.....	34
2.1.7 sonstige Labormaterialien.....	34
2.1.8 Laborgeräte .....	34
2.1.9 Medien, Puffer und Lösungen.....	35
2.1.9.1 ES-Zellkultur und -analyse.....	35
2.1.9.2 Bakterienkultur und Plasmidpräparation .....	36
2.1.9.3 Proteinbiochemische Methoden .....	37
2.1.10 Plasmide.....	38
2.1.10.1 Klonierungsvektor pCR-XL-TOPO.....	38
2.1.10.2 Expressionsvektor pIRES2-EGFP.....	39
2.1.10.3 Kontrollvektor pEGFP-N1.....	40
2.1.11 Oligonukleotide.....	41

---

<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>43</b>
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	43
2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien.....	43
2.2.1.2 Transformation von Bakterien nach der Hitzeschockmethode.....	43
2.2.2 DNA-Methoden.....	44
2.2.2.1 Präparation und Reinigung von DNA.....	44
2.2.2.1.1 Präparation genomischer DNA.....	44
2.2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA.....	44
2.2.2.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	44
2.2.2.1.4 Ethanolfällung.....	45
2.2.2.1.5 Isopropanolfällung.....	45
2.2.2.2 Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten.....	45
2.2.2.2.1 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA.....	45
2.2.2.2.2 Analytische Gelelektrophorese.....	45
2.2.2.2.3 Präparative Gelelektrophorese.....	46
2.2.2.2.4 Sequenzierung der Plasmide.....	46
2.2.2.3 Subklonierung isolierter DNA-Fragmente.....	46
2.2.2.4 Ligation.....	46
2.2.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	47
2.2.2.5.1 Analyse der transfizierten Klone mittels RT-PCR.....	47
2.2.2.5.2 RT-PCR mit radioaktiver Markierung zur Quantifizierung der Expression von Markergenen.....	47
2.2.2.5.3 Nested PCR zur Kontrolle der Expression von Markergenen.....	48
2.2.3 RNA-Methoden.....	48
2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus GSES-Zellen.....	48
2.2.3.2 Reverse Transkription.....	48
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	49
2.2.4.1 Translation in-vitro.....	49
2.2.4.2 Gesamt-Proteinextraktion.....	49
2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	49
2.2.4.4 Western Blot.....	49
2.2.4.5 Immunmarkierung von Proteinen auf Western-Blot-Membranen.....	50
2.2.5 Zellkulturmethoden.....	50
2.2.5.1 Kultivierung der Zellen.....	50
2.2.5.2 Konservierung der Zellen.....	51
2.2.5.3 Transfektion mittels Elektroporation.....	51
2.2.5.4 Selektion mit Geneticinsulphat und Separation von Einzelklonen.....	52
2.2.5.5 Differenzierung der Zellen.....	52
2.2.5.6 Pharmakologische Stimulation.....	53
2.2.6 FACS – Durchflusszytometrie.....	53
2.2.6.1 Intrazelluläre Färbung.....	53
2.2.6.2 Extrazelluläre Färbung.....	54
2.2.6.3 EGFP-Detektion.....	54
2.2.6.4 Analytisches FACS.....	54
2.2.6.5 Zellsortierung.....	55

---

<b>III. ERGEBNISSE</b> .....	<b>56</b>
<b>3.1. Generierung eines Vektors zur hMesP1-Überexpression</b> .....	<b>56</b>
3.1.1 Isolierung und Klonierung der humanen MesP1-cDNA .....	56
3.1.2 Klonierung des Expressionsvektors pHMesP1-IRES2-EGFP.....	57
<b>3.2. Generierung stabil transfizierter Zellklone</b> .....	<b>58</b>
3.2.1 Transfektion und Separation einzelner Zellklone .....	58
3.2.2 Anteil der stabil transfizierten Zellen im analytischen FACS .....	58
3.2.3 Nachweis der hMesP1-Expression .....	60
3.2.3.1 Nachweis auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR.....	60
3.2.3.2 Nachweis auf Proteinebene im Western Blot .....	61
3.2.4 Nachweis unveränderter Stammzeleigenschaften.....	62
<b>3.3. Einfluss der Überexpression auf die kardiovaskuläre Entwicklung</b> .....	<b>63</b>
3.3.1 Auftreten spontan kontrahierender Kardiomyozyten in vitro .....	63
3.3.2 Auftreten von Gefäßstrukturen in vitro.....	65
3.3.3 Genexpressionsanalyse der Zellklone auf mRNA-Ebene.....	66
3.3.3.1 Tag 3 der Differenzierungsphase .....	67
3.3.3.2 Tag 6 der Differenzierungsphase .....	68
3.3.4 Genexpressionsanalyse der Zellklone auf Protein-Ebene.....	71
3.3.4.1 CD31 als vaskulärer Marker und CD45 als leukozytärer Marker .....	71
3.3.4.2 $\alpha$ -Aktinin als muskulärer Marker.....	73
<b>3.4. Pharmakologische Charakterisierung der transgenen Zellklone</b> .....	<b>75</b>
3.4.1 Stimulation mit Isoproterenol .....	75
3.4.2 Stimulation mit Carbamylcholin.....	76
<b>IV. DISKUSSION</b> .....	<b>78</b>
<b>4.1 Gewinnung von Kardiomyozyten – Limitationen bisheriger Arbeiten</b> .....	<b>78</b>
<b>4.2 Funktion von MesP1 während der Kardiovaskulogenese</b> .....	<b>80</b>
4.2.1 Verstärkte Kardiovaskulogenese in vitro.....	80
4.2.2 Funktionelle Analyse der MesP1-transfizierten Zellkultur .....	81
4.2.3 Potential des Faktors MesP1.....	82
4.2.4 MesP1-Signaltransduktion.....	82
<b>4.3 Ausblick</b> .....	<b>85</b>
4.3.1 Identifikation vorgeschalteter Faktoren.....	85
4.3.2 Reprogrammierung adulter Stammzellen.....	86
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>87</b>
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>89</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>105</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>108</b>
<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>110</b>

# I. EINLEITUNG

## 1.1 KLINISCHER HINTERGRUND

Laut Statistischem Bundesamt lagen im Jahr 2005 in Deutschland mit 367.361 Personen wie auch in den Jahren zuvor nahezu der Hälfte aller Sterbefälle die Folgen einer Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems zugrunde. Den größten Anteil daran hatten die akuten und chronischen ischämischen Herzkrankheiten mit 148.641 Todesfällen [7].

Dabei stellen heute die immer noch unzureichenden Therapiemöglichkeiten eine gravierende Ursache für die hohe Mortalität der Herzkreislauferkrankungen dar. So liegt beispielsweise die ein-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (NYHA-Stadien III-IV) bei nur etwa 50% [8], u. a. auch deshalb, weil als derzeit einzige kausale Therapie nur die Durchführung einer allogenen Herztransplantation zur Verfügung steht und selbst bei diesem grundsätzlich eleganten kurativen Ansatz der langfristige Therapieerfolg trotz Immunsuppression vor allem durch die bisher weitgehend unbeherrschbare chronische Transplantatabstoßung limitiert ist [9, 10].

Ein wesentlich größeres Problem bei der Behandlung der Herzinsuffizienz mittels Allotransplantation stellt jedoch der weltweite und vor allem auch in Deutschland bestehende Mangel an Spenderorganen dar [11]. Einige aktuelle Zahlen belegen dies recht eindrücklich: Ende des Jahres 2005 standen 755 in Deutschland noch für eine Herztransplantation gelisteten Patienten nur 396 im Jahresverlauf durchgeführte Organübertragungen gegenüber, wobei es während des selben Zeitraumes zu 793 Transplantations-Neuanmeldungen kam. Dabei ist die Zahl der jährlich zur Verfügung stehenden Organe bis heute kontinuierlich rückläufig (vgl. Abb. 1-1) [1, 12].



**Abb. 1-1**  
Anzahl der Patienten auf der Eurotransplant Warteliste (Europa) für Herztransplantationen am Ende des jeweils angegebenen Jahres im Vergleich zur Zahl durchgeführter Organtransplantationen im Jahresverlauf

Abb. modifiziert nach [1]

Um nun angesichts der geringen Anzahl an Spenderorganen eine therapeutische Alternative zu finden, wurden in der Vergangenheit bereits verschiedene Wege beschritten. Zielsetzung dabei war es vor allem, die Regeneration des erkrankten Organs zu fördern anstatt es „einfach“ auszutauschen. Viel versprechende Ansätze vor allem im Tiermodell, aber auch am Menschen [13], bot dabei die Transplantation verschiedener Muskelzellen, wie z. B. fetaler Kardiomyozyten und skelettaler Myoblasten in erkranktes Myokard, die jedoch letztendlich keine zufrieden stellende funktionelle Integration in das Empfängergewebe zeigten. Ein weiterer wichtiger Ansatz wird bis heute auch im Einsatz von adulten Stammzellen gesehen. Über diese v. a. aus dem adulten Knochenmark stammenden Vorläuferzellen existieren jedoch widersprüchliche Studien bezüglich deren klinischen Wirksamkeit und des möglichen Wirkmechanismus (Plastizität, Transdifferenzierung, Anti-apoptotische Wirkung, Angiogenese etc.), so dass deren klinische Anwendung in der Routine trotz bisher teilweise auch ermutigender Ergebnisse relativ unsicher scheint [14-18]. Als erfolgversprechender könnte sich dagegen die Verwendung embryonaler Stammzellen als Quelle therapeutisch einsetzbaren Gewebes erweisen [14, 19-25].

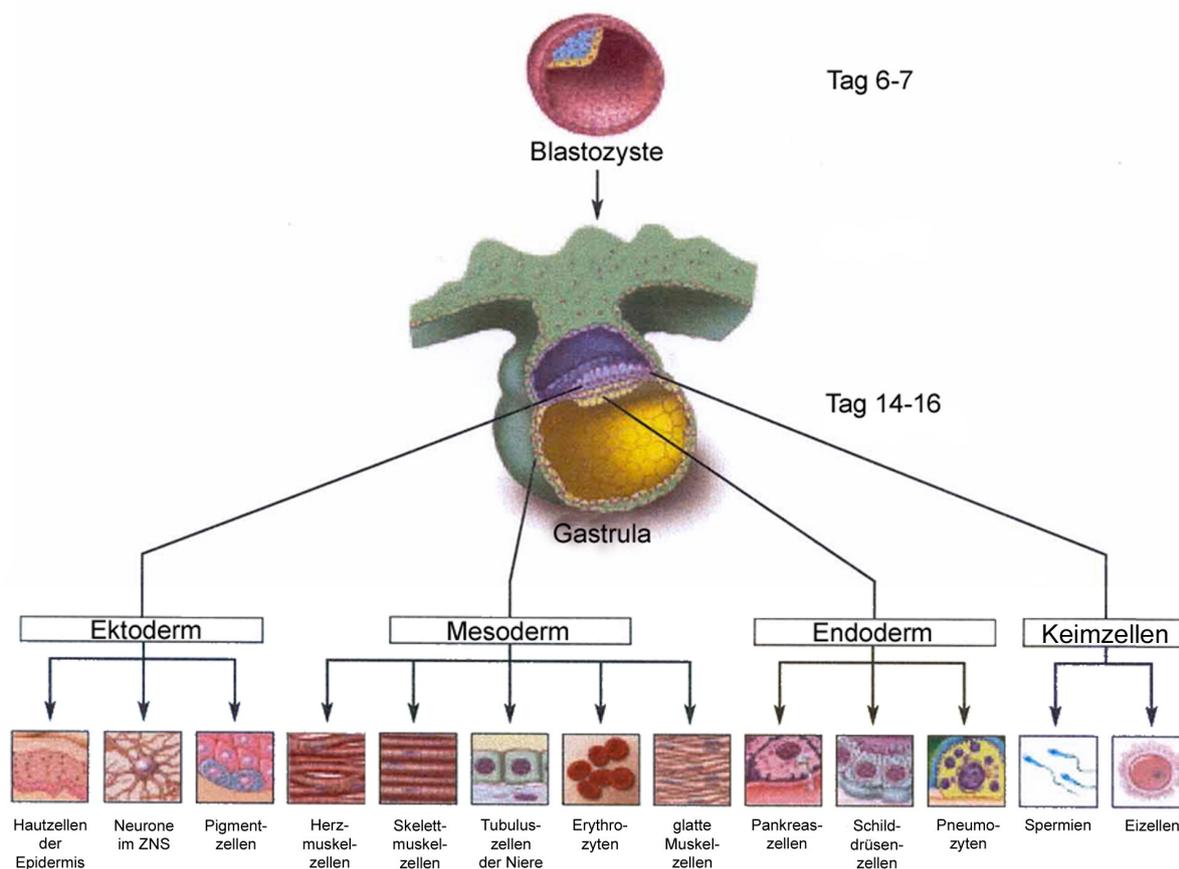
## 1. 2 EMBRYONALE STAMMZELLEN

### 1. 2. 1 Allgemeine Einführung

Bei Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) handelt es sich um eine in den vergangenen Jahren wissenschaftlich zunehmend beachtete Population an Vorläuferzellen, die aus dem sich entwickelnden Embryo gewonnen werden können (s. 1.2.1.1). In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem beschriebenen Zelltyp um pluripotente Stammzellen handelt, also Progenitoren, die per Definition in der Lage sind, alle etwa 210 verschiedene Zelltypen des Körpers zu bilden [26-30].

Bereits im Jahre 1984 konnten erste grundlegende Entdeckungen dahingehend gemacht werden, dass gewonnene murine ES-Zellen (s. 1.2.1.1) nach Übertragung in Mausblastozysten in der Lage sind, sich mit ihren Deszendenten an der Bildung aller drei Keimblätter des sich entwickelnden Embryos inklusive der Keimbahn zu beteiligen, was als deutlicher Hinweis auf eine mögliche Pluripotenz der Stammzellen gewertet werden konnte [31]. Bis zum heutigen Tag konnte dabei das Wissen über Embryonale Stammzellen sukzessive erweitert werden. So gilt heute als gesichert, dass es sich bei ES-Zellen nicht nur um pluripotente, sondern auch um immortale Zellen handelt. Es ist also möglich, embryonale Stammzellen unter speziellen Kulturbedingungen (s. 1.2.1.1) im ursprünglich undifferenzierten Zustand nahezu unbegrenzt

zu vermehren [4, 27, 32-36]. In weiteren Beobachtungen konnte schließlich gezeigt werden, dass ES-Zellen in der Lage sind, sich nach Entzug der differenzierungshemmenden Substanzen *in vitro* in Zellaggregaten (sog. Embryoid-Körperchen) zu formieren und während der spontanen Differenzierung analog der Embryonalentwicklung (s. Abb. 1-2) tatsächlich die Zellen aller drei Keimblätter inklusive der Keimzellen zu bilden [37-39].



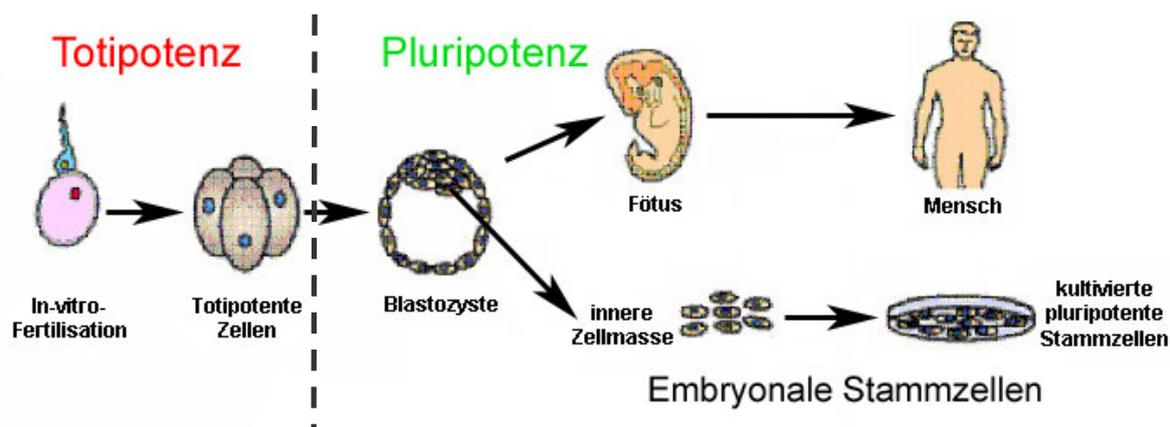
**Abb. 1-2**

**Bildung der drei Keimblätter und der Keimzellen während der Embryonalentwicklung an verschiedenen Tagen der Differenzierung während der humanen Embryogenese und der ES-Zell-Entwicklung**

Abbildung modifiziert nach [2]

### 1.2.1.1 Gewinnung und Kultivierung embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen werden durch Isolation der inneren Zellmasse aus Blastozysten gewonnen, die nach künstlicher Befruchtung *in vitro* kultiviert wurden (s. Abb. 1-3). Sie zeichnen sich durch eine Reihe spezifischer Charakteristika aus, wovon insbesondere die beiden bereits genannten, Pluripotenz und Immortalität, von entscheidender Bedeutung sind.



**Abb. 1-3 Gewinnung humaner ES-Zellen aus einem Embryo im Blastozystenstadium**

Gezeigt wird die Entwicklung einer befruchteten Eizelle zum kompletten Organismus (obere Zeile) und die Gewinnung embryonaler Stammzellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste (untere Zeile).

Abb. modifiziert nach [40]

Beide Eigenschaften der ES-Zellen bleiben jedoch nur so lange erhalten, wie sich die Zellen in ihrem ursprünglichen, nicht entwickelten (undifferenzierten) Zustand befinden. Um die spontane Differenzierung in vitro zu hemmen werden dabei als Standardmethode während der Kultivierung sogenannte „feeder“-Zellen (inaktivierte murine embryonale Fibroblasten, MEFs) eingesetzt, auf denen die Stammzellen adhären und dann durch verschiedene bisher nicht eindeutig identifizierte, aus der „feeder“-Schicht sezernierte Zytokine an der Entwicklung gehemmt werden.

Alternativ lassen sich murine ES-Zellen heute auch unter alleiniger Zugabe von „leukaemia inhibitory factor“ (LIF) [41-45] (s. 2.2.5.1) und humane ES-Zellen durch Anzucht auf humanen fötalen Fibroblasten, adulten Epithelzellen [46], Zellen der Vorhaut [47] oder durch Kultivierung auf extrazellulären Matrices [48] vermehren und damit gleichzeitig an der Differenzierung, d. h. an der Bildung der verschiedenen Gewebe- bzw. Gewebivorläuferzellen, erfolgreich hindern. Wie oben bereits beschrieben, ermöglicht die Kultivierung im undifferenzierten Stadium dabei erst die unbegrenzte Vermehrung der ES-Zellen. Erst kürzlich wurden jetzt Methoden beschrieben, mit denen man in der Lage ist, die gewonnenen ES-Zellen komplett ohne externe Kontamination mit fremdem biologischem Material (Feeder-Zellen, FCS, vgl. 2.1.9.1) zu züchten, was den hohen immunologischen und hygienischen Anforderungen gerecht wird, die für einen zukünftigen therapeutischen Einsatz im Menschen anzulegen sind (vgl. 1.2.2.1.1) [49, 50].

Zudem konnte von der Arbeitsgruppe um Shinya Yamanaka kürzlich gezeigt werden, dass pluripotente Stammzellen außer aus Embryonen auch durch externe Stimulation mit

verschiedenen Stammzellfaktoren aus differenzierten Maus-Fibroblasten und anderen adulten Gewebezellen gewonnen werden können, was in Zukunft eine neue, äquivalente Quelle für definiertes pluripotentes Zellmaterial darstellen könnte (vgl. 1.2.2.1.1) [51-54].

### 1.2.1.2 Rechtliche und ethische Aspekte in Deutschland

Die Forschung an humanen embryonalen Stammzellen unterliegt im Gegensatz zur Arbeit mit tierischen Zellen in Deutschland zurzeit sehr strengen gesetzlichen Auflagen. So ist die Gewinnung von menschlichen ES-Zellen aus Embryonen genauso wie die Forschung an totipotenten Zellen (s. Abb. 1-3) gemäß Embryonenschutzgesetz verboten. Lediglich die Einfuhr von und die Arbeit mit den pluripotenten ES-Zellen ist in begründeten Ausnahmefällen gestattet, wenn diese vor dem 1. Januar 2002 (Stichtag) im Ausland aus überzähligen für die in vitro-Fertilisation generierten Embryonen gewonnen wurden ([55] Stand Februar 2008), da ES-Zellen nicht in der Lage sind, sich zu einem lebensfähigen Individuum zu entwickeln. Hintergrund dieser rechtlichen Situation in Deutschland ist der Grundsatz, das menschliche Leben, und damit auch jeden Embryo zu schützen. Dabei wurde die oben erwähnte Stichtagsregelung beschlossen, um keine Anreize für die Gewinnung embryonaler Stammzellen im Ausland für deutsche Forschungszwecke zu bieten [56, 57]. Problematisch dabei ist jedoch, dass alle aktuell in Deutschland zugelassenen Stammzelllinien u. a. durch Kultivierung in tierischem Medium kontaminiert und damit nicht mehr für therapeutische Anwendungen am Menschen geeignet wären [58], was als Grundlage für die aktuelle Diskussion über eine mögliche Änderung (z. B. Verschiebung des Stichtags oder Einzelfallprüfungen) des Embryonenschutzgesetzes in seiner derzeit gültigen Form dient.

Als im Juni 2002 das Stammzellgesetz (StZG [55]), das die Arbeit mit humanen embryonalen Stammzellen in Deutschland innerhalb enger Grenzen erlaubt, in Kraft trat, war davon ausgegangen worden, dass die Bildung eines lebensfähigen Organismus' aus gewonnenen ES-Zellen nach Implantation in den Uterus durch fehlende Trophoblastenbildung praktisch ausgeschlossen sei (s. 1.2.1). Dies stellte eine unter ethischen Gesichtspunkten entscheidende Voraussetzung für die Vereinbarkeit des StZG mit den Anforderungen des Embryonenschutzgesetzes dar. Paradoxerweise hatte Thomson jedoch bereits im Jahre 1998 bei der erstmalig durchgeführten Isolierung von ES-Zellen aus humanen Blastozysten gezeigt, dass die Bildung von Trophoblastengewebe aus ES-Zellen durchaus noch möglich ist [35, 59].

Bis zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Dissertation wurden in Deutschland durch das Robert-Koch-Institut insgesamt 24 Genehmigungen für das Arbeiten mit importierten humanen ES-Zellen erteilt (s. Abb. 1-4).



**Abb. 1-4 Anzahl und Verteilung der nach § 11 Stammzellgesetz genehmigten Projekte in Deutschland**

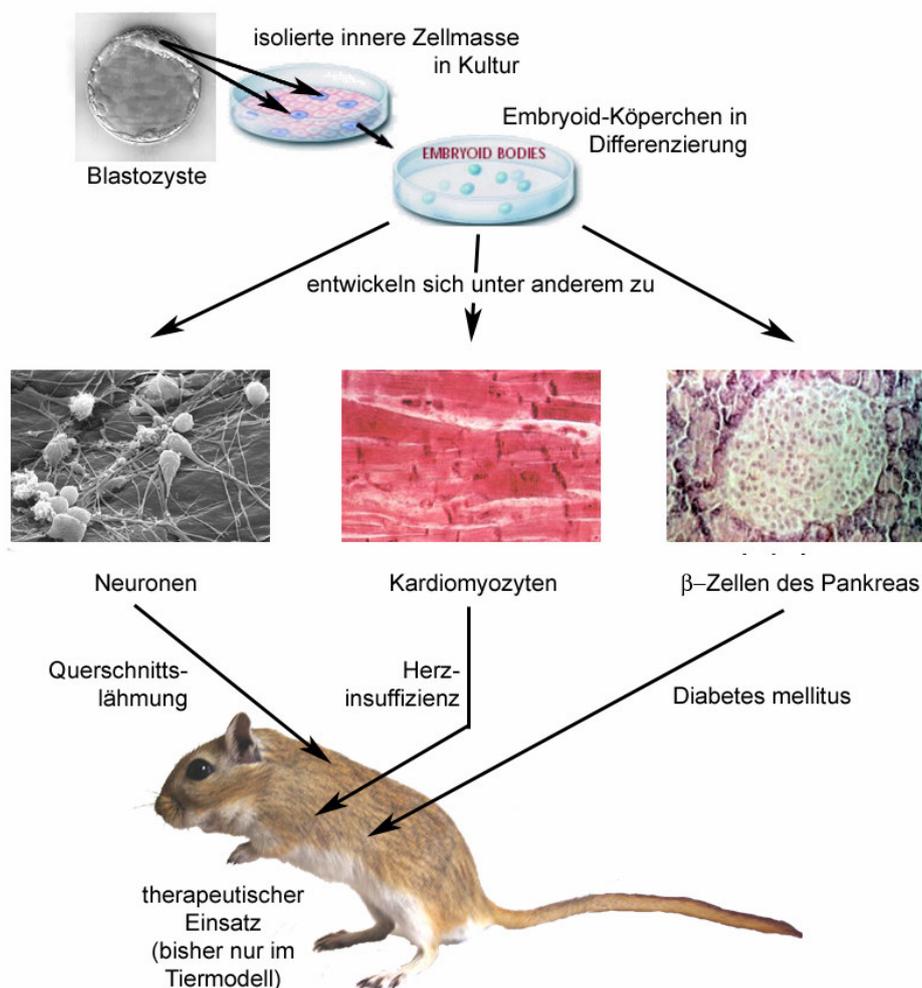
Stand: 30.1.2008, Abb. modifiziert nach [3]

## 1. 2. 2 Potential embryonaler Stammzellen

### 1.2.2.1 Zelltherapeutischer Einsatz

Von embryonalen Stammzellen verspricht man sich große Möglichkeiten für die Therapie verschiedenster Erkrankungen. Denn durch die Entdeckung der unbegrenzten Teilbarkeit (Immortalität) und der Pluripotenz dieser Zellen, also dem Potential sich in sämtliche 210 verschiedene Zelltypen des Körpers entwickeln zu können [31, 35, 37], ist eine Gewinnung von in vitro gezüchtetem Ersatzgewebe („tissue-engineering“) für erkrankte Organe in greifbare Nähe gerückt [60]. Nach Differenzierung und Aufreinigung spezifischer Zelltypen aus murinen ES-Zellen konnten so bereits verschiedene therapeutische Ansätze erfolgreich im Tiermodell getestet werden: Herzmuskelzellen zur Therapie der Herzinsuffizienz [19], neuronale Zellen zur Therapie der Querschnittslähmung [61] und  $\beta$ -Zellen des Pankreas zur Therapie des Insulin-abhängigen Diabetes mellitus [62-64]. Abbildung 1-5 zeigt dazu schematisch den Weg von der Gewinnung der ES-Zellen aus der Blastozyste über die Vermehrung und Differenzierung bis hin zum therapeutischen Einsatz im Mausmodell.

Die weltweit erste klinische Phase-I-Studie mit aus Embryonalen Stammzellen gewonnenem Gewebe an Patienten mit spinalem Querschnittssyndrom soll in den USA noch in diesem Jahr begonnen werden [65].



**Abb. 1-5 Übersicht Zelltherapie: von der Gewinnung der ES-Zellen bis zum therapeutischen Einsatz im erkrankten Tiermodell**

Abb. modifiziert nach [66]

Entscheidend für die vorliegende Arbeit ist jedoch die Tatsache, dass ES-Zellen in der Lage sind, sich spontan zu den verschiedenen Kardiomyozyten (atriale und ventrikuläre Herzmuskelzellen sowie Zellen des Reizbildungs- und -leitungssystems) [28, 30, 32, 67-70], Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen zu differenzieren [21, 71]. Im Gegensatz zu anderen potenziell für einen zelltherapeutischen Einsatz geeigneten Zelltypen (z. B. Knochenmarksstammzellen oder skelettale Myoblasten, vgl. 1.1) wurde diese Differenzierung der Zellen wie auch die funktionelle Integration in das Empfängergewebe nach Transplantation [72] bereits zweifelsfrei gezeigt.

Damit sind bereits wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung therapeutischer Ansätze aus ES-Zellen zur Heilung verschiedener kardiologischer Erkrankungen erfüllt [19, 23, 73]. Um nun jedoch den Schritt hin zum klinischen Einsatz bewältigen zu können, müssen noch

zahlreiche Probleme zufrieden stellend gelöst werden. Als wichtigste dabei sollten folgende erwähnt werden:

1. Gewährleistung einer immunologischen Verträglichkeit der Transplantate (Verhinderung einer Abstoßungsreaktion im Empfängerorganismus)
2. Gezielte Aufreinigung von Gewebezellen und deren Subtypen aus dem Gesamtzellverband für eine spezifische Transplantation
3. Kultivierung ausreichend großer Zellmengen für die Herstellung von transplantierbarem, künstlichem Gewebe (tissue-engineering)

#### 1.2.2.1.1 Immunologische Verträglichkeit

Wie bei allen allogenen Transplantationen muss auch bei der Übertragung von aus embryonalen Stammzellen gewonnenem Donor-Gewebe eine immunologische Verträglichkeit gewährleistet werden, um eine Abstoßungsreaktion des Empfängerorganismus gegen das transplantierte Gewebe zu minimieren [74-76]. Diese könnte über verschiedene Ansätze erreicht werden. Als erstes böte sich dabei die konservative medikamentöse Immunsuppression an, wie sie heute tausendfach nach Organübertragungen eingesetzt wird. Diese ist jedoch stark nebenwirkungsbehaftet und kann zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität der Patienten führen.

Bei der Verwendung Embryonaler Stammzellen dagegen könnte die Problematik auf verschiedenen Wegen umgangen werden. Über einen HLA-Abgleich mit Zellen aus einer noch anzulegenden „Stammzellbank“ könnte z. B. das genetische „mismatch“ und damit die Immunantwort im Empfängerorganismus derart minimiert werden, dass nur noch eine geringe und damit sehr nebenwirkungsarme Immunsuppression von Nöten wäre. Weitere Möglichkeiten ergäben sich zudem durch eine mögliche Aufhebung der immunogenen Wirkung des transplantierten Gewebes mittels genetischer Manipulation der exprimierten Oberflächenproteine [56]. Der Goldstandard von wissenschaftlicher Seite, wenn auch ethisch bedenklich und in Deutschland derzeit verboten, wäre jedoch die Generierung autologer embryonaler Stammzellen mittels therapeutischen Klonens, also die Erzeugung von mit dem Empfängerorganismus genetisch identischen Stammzellen durch Kerntransfer in befruchtete und entkernte humane Eizellen. Explizit erlaubt aber ist die Erzeugung menschlicher Embryonen zu Forschungszwecken derzeit nur in Belgien, Japan, Singapur, Süd Korea, Schweden, Großbritannien und einigen Staaten der USA [77]. Die Übertragung von geklonten Zellen würde ein maximales Maß an Transplantatverträglichkeit gewährleisten. Erste Versuche, therapeutisch zu klonen werden aktuell bereits unternommen [78] – mit zuweilen

auch zweifelhaftem Erfolg, wie die inzwischen widerrufenen Publikationen von Hwang et al. gezeigt haben [79-82].

Eine weitere Möglichkeit, die immunologische Abstoßungsreaktion zu umgehen, konnte kürzlich, wie oben bereits erwähnt, durch zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gezeigt werden. Ihnen gelang es, murine adulte Fibroblasten durch retrovirale Transfektion mit Pluripotenz- (Oct4, Sox2), Tumorsuppressor- (Klf4) und Protoonkogenen (c-Myc), die in ausdifferenzierten Fibroblasten normalerweise nicht mehr exprimiert werden, wieder in einen ES-Zell-ähnlichen Status zu überführen [51, 83, 84]. Dies könnte in Zukunft einmal die Möglichkeit bieten, autologe, ES-Zell-ähnliche Stammzellen („induced pluripotent stem cells“, iPS-cells) auch ohne ethische Bedenken für therapeutische Anwendungen gewinnen zu können.

#### 1.2.2.1.2 Problematik der Aufreinigung

Das zweite große Problem, die Aufreinigung kardialer Zellen für einen möglichen therapeutischen Einsatz wurde bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht. Dabei stellt nicht etwa die Detektion der Kardiomyozyten ein Problem dar, da diese in vitro relativ einfach anhand ihrer spontan einsetzenden Kontraktionsaktivität im Lichtmikroskop erkannt werden können, sondern vielmehr die Isolierung dieser Zellen und die Aufreinigung der verschiedenen Subtypen.

In der Vergangenheit wurden deshalb bereits hocheffiziente Aufreinigungsprotokolle für Kardiomyozyten in ES-Zell-Kulturen entwickelt, da sich bei einem Anteil von lediglich etwa 10% Kardiomyozyten in der ES-Zell-Kultur gezeigt hatte, dass nicht aufgereinigte embryonale Stammzellen durch den großen Anteil kontaminierender, gering- oder undifferenzierter Zellen nach Übertragung ins Tiermodell zu verschiedenartiger Tumor- und Teratombildung neigen [4, 35] (s. Abb. 1-6), wobei deren Reife und Wachstumsgeschwindigkeit stark von der Lokalisation im Empfängerorganismus abhängig sind [85].

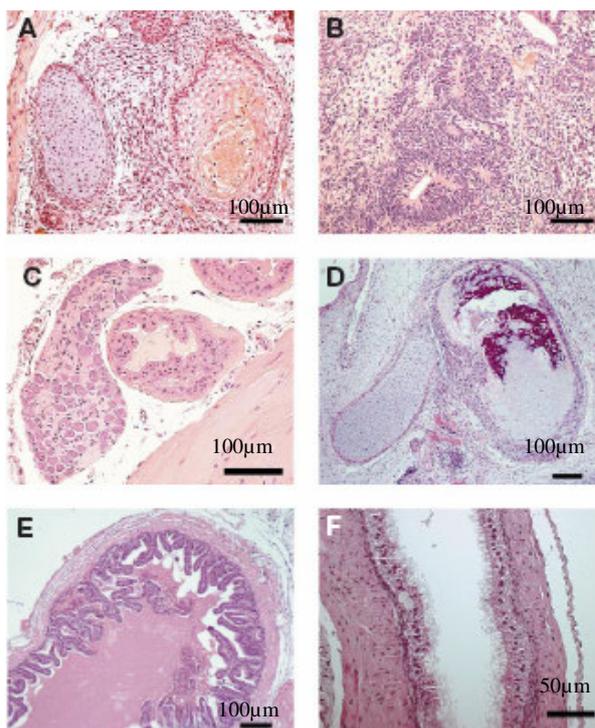


Abb. 1-6

Verschieden differenzierte Elemente in histologischen Schnitten durch Teratome nach Transplantation nicht aufgereingter humaner ES-Zellen

Abb. modifiziert nach [4]

- A - Knorpel und Epithelzellen
- B - Nervenzellen
- C - Ganglion, Drüsengewebe und quergestreifte Muskulatur
- D - Knochen und Knorpel
- E - Drüsenepithel
- F - Zilienepithel

Ein weiterer Grund für eine notwendige größtmögliche Aufreinigung nicht nur der Kardiomyozyten-Gesamtpopulation, sondern auch der Subpopulationen (z. B. ventrikuläre Zellen, atriale Zellen und Zellen des Reizbildungs- und -leitungssystems) ist, dass für den klinischen Einsatz nur mit dem geschädigten Myokardbezirk kompatible Zellen transplantiert werden sollten (z. B. ventrikuläre Zellen nach Herzinfarkt oder Sinusknotenzellen beim Ausfall dieses natürlichen Schrittmachers) um Herzrhythmusstörungen durch Erregungsleitungsstörungen oder ektope Erregungen zu vermeiden, wie sie bei Transplantation von Mischpopulationen [19, 20, 22] zu erwarten wären.

Als gängige Methoden zur Anreicherung spezifischer Herzmuskelzellen dienen heute u. a. promotorgestützte Konstrukte, die, in embryonale Stammzellen transfiziert, unter der Kontrolle kardial spezifischer Promotoren Selektionsgene exprimieren. Beispiele wären die EGFP-Expression unter dem MLC-2v- [86] oder dem ANP-Promotor [87] für die Aufreinigung im FACS-Sorter, die Expression eines Resistenzgens unter dem  $\alpha$ -MHC-Promotor für die Selektion mittels des Zellgiftes G418 [88, 89] oder die mittlerweile etablierte Aufreinigung mittels CD4-Oberflächenproteinen im MACS [90].

#### 1.2.2.1.3 Gewinnung ausreichender Zellzahlen

Mit der Etablierung hochwertiger Aufreinigungsverfahren für Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen und verschiedenen Ansätzen zur Lösung der immunologischen

Abstoßungsproblematik ist bereits ein großer Schritt in Richtung klinisch-zelltherapeutischer Anwendung von ES-Zellen vollzogen. Als eines der größten Probleme könnte sich jedoch noch die Gewinnung ausreichender Mengen therapeutisch nutzbaren Zellmaterials erweisen. Bei einem Kardiomyozyten-Anteil von knapp 10% an der gesamten ES-Zell-Kultur [91] und geschätzten  $10^8$  bis  $10^9$  Transplantatzellen pro chirurgischer Intervention [92] stellt die limitierte Proliferationsfähigkeit ausdifferenzierter Herzmuskelzellen [19] bei der Gewinnung therapeutisch einsetzbaren Gewebes (sog. „tissue engineering“) für die Routine sicherlich eines der Hauptprobleme dar [32, 60, 93].

Es wurden zwar in der Vergangenheit bereits mehrfach erfolgreich neue Methoden etabliert, um den Anteil an Kardiomyozyten in der ES-Zellkultur zu steigern, zum Beispiel durch externe Stimulation mit Ascorbinsäure [94], Retinsäure [95], dem Hyaluronsäureester HBR [96], Oxytocin [97], dem BMP-Antagonisten Noggin [91] oder dem Hepatocyte-Growth-Factor [98] genauso wie durch Kultivierung im magnetischen Feld [99]. Und auch durch genetische Manipulation wurde eine verstärkte Bildung von Herzmuskelzellen bereits gefördert: Die endogene Bildung von Stickoxid (NO) [100] bewirkte ähnlich wie die Überexpression des *zinc-finger* Transkriptionsfaktors GATA-4 [101] oder des Antagonisten des canonical Wnt-Signalweges (vgl. 1.3.2.1) Chibby [102] in der ES-Zell-Kultur eine verstärkte Kardiogenese während der Differenzierung. Jedoch handelte es sich hier vorrangig um stark deskriptive Arbeiten, die bisher nur begrenzt über die tatsächlichen Mechanismen der Kardiogenese, die beteiligten Faktoren bei der Induktion und Förderung der Herzentwicklung und ihre Steuerung aufdecken konnten (vgl. 1.3).

#### 1.2.2.2 Weitere Einsatzmöglichkeiten

Neben dem direkten therapeutischen Einsatz der ES-Zellen werden diese in naher Zukunft auch die Möglichkeit bieten, bestimmte Krankheitsbilder mit einer (zumindest teilweisen) genetischen Ätiologie genauer untersuchen zu können. Durch nach dem heutigen Stand der Technik generierte oder geklonte murine [103] und möglicherweise bald auch humane embryonale Stammzelllinien mit verschiedensten genetischen Vorbelastungen, z. B. p53-Mutation (Karzinogenese) oder Modifikationen im HLA-System (z. B. HLA-DR3 assoziiert u. a. mit Diabetes mellitus Typ I), könnten sich in Zukunft hervorragende Möglichkeiten bieten, unzählige Erkrankungen unter Zellkulturbedingungen genauestens auf ihre Herkunft und mögliche Therapiemöglichkeiten hin analysieren zu können [104].

Daneben bieten ES-Zellen natürlich auch heute schon die Möglichkeit, embryonale und fetale Entwicklungsstufen, sog. Progenitorzellen, bis hin zur ausdifferenzierten Zelle unter in vitro-

Bedingungen untersuchen und damit wichtige grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisse gewinnen zu können. Möglicherweise besteht dadurch eines Tages einmal die Chance, nach grundlegendem Verständnis der Differenzierung von ES-Zellen, diese zielgenau steuern und so die embryonalen Stammzellen als unerschöpfliche Quelle von menschlichem Ersatzgewebe therapeutisch nutzen zu können.

## 1.3 ENTWICKLUNG DES HERZKREISLAUFSYSTEMS

Embryonale Stammzellen durchlaufen die Kardiovaskulogenese in vitro ähnlich der Entwicklung des Herzkreislaufsystems eines Embryos in vivo. Im hier beschriebenen Projekt wurde versucht, durch genetische Manipulation unter anderem diese Entwicklung von ES-Zellen auf molekularer Ebene zu verändern, um so unter Zellkulturbedingungen eine Anreicherung von Herzmuskel- und Endothelzellen zu ermöglichen. Um nun einen besseren Einblick in diese Vorgänge zu vermitteln und um die Einordnung der in dieser Arbeit neu gemachten Beobachtungen in den gegenwärtigen Wissensstand zu ermöglichen, wird im Folgenden ein Überblick über die relevanten Bereiche der Kardio- und Vaskulogenese von Vertebraten gegeben, wobei der Schwerpunkt hier entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit deutlich auf der Beschreibung der Herzentwicklung liegen soll.

### 1.3.1 Embryonalentwicklung

Die Entstehung des Kreislaufsystems, der ersten funktionsfähigen Einheit im sich entwickelnden Embryo, bestehend aus Herz, Blutzellen und dem Gefäßsystem, beginnt mit der Gastrulation (dritte Woche der humanen Embryonalentwicklung), da der Embryo bei inzwischen beträchtlicher Größe ab diesem Zeitpunkt nicht mehr in der Lage ist, sich ausschließlich über Diffusion zu ernähren und deshalb für eine ausreichende Versorgung des stark proliferativen Gewebes zirkulierendes Blut benötigt [5]. Das Herz selbst stellt dabei das erste funktionsfähige Organ im Körper dar [105], dessen Entwicklung am 19. Tag in paarig angelegten kardiogenen Zonen im anterioren viszeralem Mesoderm vor der Prächordal- und der Neuralplatte mit der Induktion von Angioblasten durch das Endoderm beginnt [106]. Es formen sich Endothelzellnester, die sich zu den Endokardschläuchen verbinden und nach Translokation in die Thorakalregion und Verschmelzung Anfang der vierten Woche den primitiven Herzschauch mit einem dann inneren Endokardschlauch und einem äußeren Myokardmantel bilden [23, 106]. Während der Wochen fünf bis sieben (humane Entwicklung) entsteht anschließend durch Schleifenbildung, Septierung und Faltung das vier-

Kammer-Herz, das nach Verbindung zu den ersten Kreislaufschlingen zu schlagen beginnt [107]. Die Bildung der Septen im Herzen erfolgt dabei durch die Entwicklung von Endokardkissen im Atrioventrikularkanal.

Die ersten Gefäße des menschlichen Embryos entstehen bereits am 18. Tag (humane Entwicklung) nach der Befruchtung im Mesoderm des Dottersacks aus Hämangioblasten (gemeinsame Vorläufer der Blut- und Endothelzellen) und haben bemerkenswerterweise noch keine Verbindung zum Herzen. Diese wird, wie auch die Verbindung der Kapillarnetze der Organe zu den großen Gefäßen, erst nachträglich hergestellt. Das bedeutet also, dass sich sowohl das große Gefäßsystem (über Vaskulo- und Angiogenese) als auch die kapillaren Gefäße innerhalb der Organe selbstständig entwickeln und sich erst sekundär zu einem großen Kreislaufsystem verbinden [23, 105, 107, 108].

### **1. 3. 2 Entwicklung auf molekularer Ebene**

Die Suche nach den primären Stimuli der Kardiogenese und damit die Frage, wie und warum sich das undifferenzierte Seitenplatten-Mesoderm in der vorderen Hälfte des Embryos zu kardialem Gewebe organisiert, ist bereits oft Gegenstand entwicklungsbiologischer Forschungsansätze gewesen. Unter verschiedenen untersuchten Signalwegen haben dabei bis heute insbesondere die folgenden drei die größte Akzeptanz gefunden:

1. Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaling
2. TGF- $\beta$ /BMP-Signaling (Bone Morphogenetic Protein)
3. FGF-Signaling (Fibroblast Growth Factor)

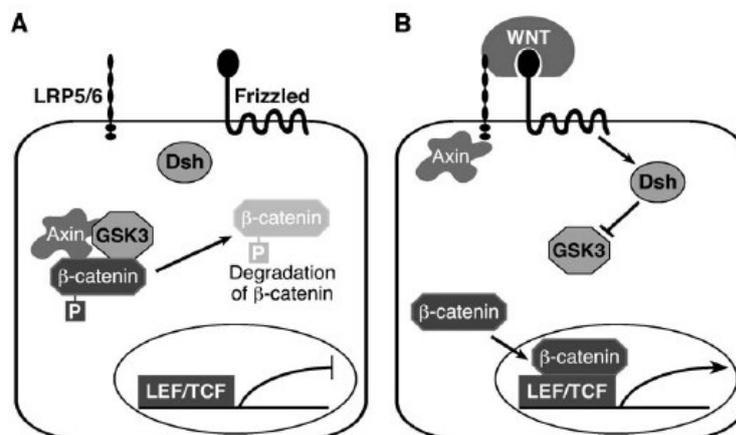
Sie sollen im Folgenden erörtert werden, um einen Überblick über die Komplexität der Regulationsmechanismen zu geben und um schließlich die Einordnung des in dieser Arbeit beschriebenen und weitgehend unbekanntes Faktors MesP1 zu ermöglichen (vgl. 4.3).

#### 1.3.2.1 Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaling

Bei den „Wnt“-s (Wingless-related mouse mammary tumor virus [MMTV] integration sites) handelt es sich um eine Familie von sezernierten Signalproteinen, die großen Einfluss auf die Embryonalentwicklung, Tumorprogression und Stammzellentwicklung im Körper haben. Im Säugetiergenom wurden bis heute 19 verschiedene Wnt-Gene identifiziert. Der Begriff Wnt selbst ist eine Kombination aus den Bezeichnungen der Gene Wingless (Wg) und Int-1. Die

Bezeichnung Wingless stammt dabei aus Untersuchungen in *Drosophila melanogaster*, in denen Mutationen des Wg-Gens zu einer flügellosen Variante der Fruchtfliege führen. Eine verstärkte Expression von Int-1 durch Integration des MMT-Virus in das Genom der Maus ist dagegen beschrieben als Promotor von Brustkrebs. Beide Proteine werden heute als homolog betrachtet und unter der Bezeichnung Wnt zusammengefasst [109].

Anfangs war man davon ausgegangen, dass die Signaltransduktion der Wnt-Proteine lediglich über einen einzigen Signalweg (sog. canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaling, s. Abb. 1-7) erfolgen würde. Diese Annahme musste jedoch zugunsten von alternativen, sog. non-canonical Wnt-Kaskaden, deren Signaltransduktion u. a. G-Protein-vermittelt über Phospholipase C, Proteinkinase C und c-jun-Kinase erfolgt, erweitert werden [5, 110].



**Abb. 1-7 Schematische Darstellung des canonical Wnt-Signaling**

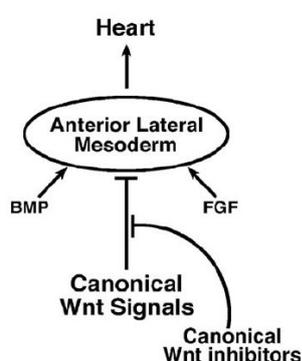
Teilbild A: In Abwesenheit eines Wnt-Signalproteins ist  $\beta$ -Catenin in einem Multiprotein-Komplex gefangen, der u. a. die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) enthält. GSK3 ist in der Lage  $\beta$ -Catenin über eine Phosphorylierung der Ubiquitinylierung zuzuführen und so zu inaktivieren, was die Signaltransduktion an dieser Stelle stoppt.

Teilbild B: Bindet jedoch ein Wnt-Protein an die Rezeptoren frizzled und LRP5/6 wird das cytoplasmatische Protein Dishevelled (Dsh) aktiviert, das wiederum die GSK3 in ihrer Aktivität hemmt. Dadurch wird  $\beta$ -Catenin nicht mehr abgebaut, sondern kann in Assoziation mit den LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren (Lymphoid enhancer-binding factor/T-cell factor) einen Komplex bilden, der nach Translokation in den Zellkern Transkriptions-Enhancer-Aktivität ausüben und so ausgewählte Gene aktivieren kann.

Abb. modifiziert nach [5]

Dabei existieren nicht nur verschiedene Signalwege, auch funktionieren die verschiedenen Wnt-Proteine nicht in gleicher Weise. Vielmehr haben sich im Laufe der Erforschung dieser Signalmoleküle zwei große Gruppen herauskristallisiert: Die Wnt1-Gruppe, die die Faktoren Wnt1, 3a und 8 enthält und ausschließlich über das canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaling zu wirken scheint und die Wnt5a-Gruppe, zu der die Faktoren 4, 5a und 11 gehören und die im

Gegensatz zur Wnt1-Gruppe das non-canonical-Wnt-Signaling initiiert. Daneben wurde gezeigt, dass die Mitglieder der Wnt5a-Gruppe (v. a. Faktor 11) zusätzlich in der Lage sind, das canonical Wnt-Signaling zu blockieren [111]. Interessant für die vorliegende Arbeit ist diese Inhibition deshalb, weil eben die Blockade des canonical Wnt-Signaling heute als eine sowohl notwendige als auch hinreichende Bedingung für die Herzentwicklung angesehen wird (s. Abb. 1-8) [5, 112-116]. Bestätigt wurde diese Annahme auch von Lickert et al. (2002), die durch Inaktivierung des „downstream“ im canonical Wnt-Signaling gelegenen  $\beta$ -Catenin im embryonalen Endoderm ebenfalls eine Induktion der Herzentwicklung in Form multipler Herzen entlang der anterior-posterior-Achse zeigen konnten [117].



**Abb. 1-8**

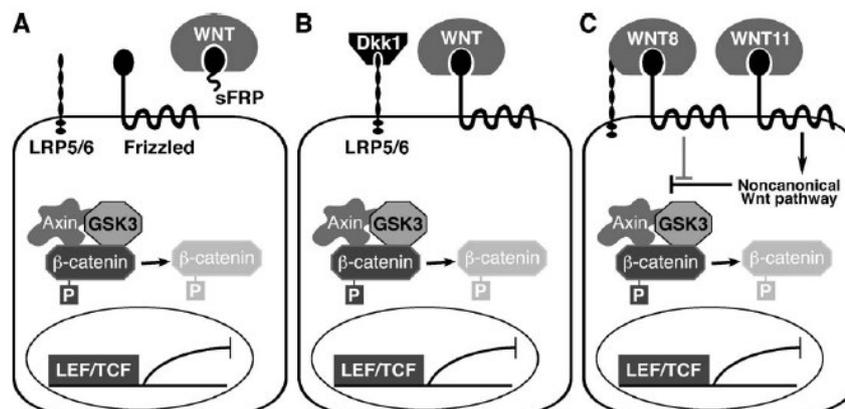
**Molekulare Induktoren für die Entwicklung des Herzens in Vertebraten**

Inhibitoren des „canonical Wnt-Signaling“ sind notwendige aber auch hinreichende Faktoren für die Induktion der Herzanlage im vorderen Seitenplattenmesoderm.

BMP- und FGF-Signalwege üben während der Herzentwicklung ebenfalls kardiogene Einflüsse auf das Mesoderm aus.

Abb. modifiziert nach [5]

Dabei sind heute verschiedene Inhibitoren des canonical Wnt-Signaling bekannt. Neben den bereits genannten nicht-kanonischen Wnt-Proteinen (z. B. Wnt11) und den sezernierten frizzled-verwandten Proteinen (sFRP) kommt dabei den Wnt-Inhibitoren Dickkopf1 (Dkk-1) und Cerberus-like 1 eine wichtige Rolle bei der Induktion der Herzentwicklung zu (s. Abb. 1-9).



**Abb. 1-9 Blockade des kanonischen Wnt-Signalwegs durch verschiedene sezernierte, extrazelluläre Faktoren**

Teilbild A: Sezernierte frizzled-verwandte Proteine (sFRP) blockieren kompetitiv die frizzled-Bindungsstelle an Wnt-Proteinen und verhindern so deren Bindung an den frizzled-Rezeptor.

Teilbild B: Dickkopf1 (Dkk-1) bindet an den LRP5/6-Rezeptor und verhindert so die Bindung von Wnt an diese zweite Klasse der Wnt-Rezeptoren (vgl. Abb. 1-6, Teilbild B).

Teilbild C: Nicht-kanonische Wnt-Proteine wie z. B. Wnt11 können durch alternative Signaltransduktion den kanonischen Wnt-Signalweg weiter downstream in der Signalkaskade blockieren, z. B. durch Verhinderung der Inaktivierung von GSK3 (vgl. Abb. 1-6, Teilbild B).

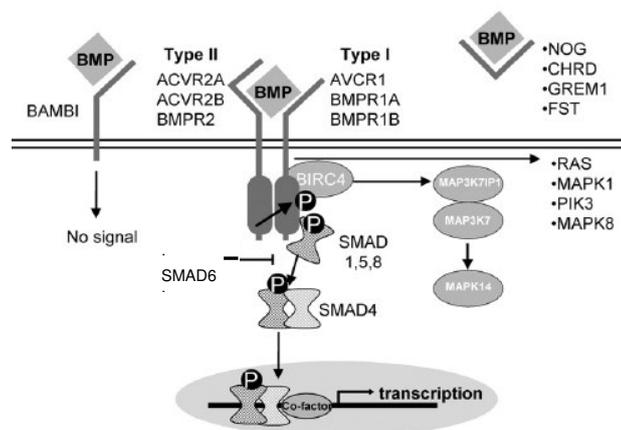
Abb. modifiziert nach [5]

Im Ganzen ist nun klar geworden, welchen wichtigen Anteil die Wnt-Signaltransduktion an der Kardiogenese in Vertebraten zu vertreten hat, insbesondere vor dem Hintergrund, dass Inhibitoren des kanonischen Wnt-Signalingwegs wie Dickkopf-1 (Dkk-1) nicht nur für die Initiation der Herzentwicklung mitverantwortlich sind, sondern auch während der weiteren Entwicklung des angelegten Herzens noch hoch exprimiert werden (Dkk-1 z. B. im Ausflusstrakt und im gesamten embryonalen Ventrikel [5]) und vermutlich einen proliferativen oder auch differenzierenden Effekt auf die entstehenden Kardiomyozyten haben können. Als wohl wichtigster, Dkk-1-induzierter Marker während der Herzentwicklung ist dabei der im Endoderm exprimierte homeodomain-Transkriptionsfaktor Hex zu nennen. Von ihm konnte gezeigt werden, dass er in der Lage ist, die kardiogene Differenzierung während der Entwicklung nicht-Zellautonom zu stimulieren [118, 119].

### 1.3.2.2 TGF-β/BMP-Signaling

Ein weiterer wichtiger Signaltransduktionsweg während der Kardiogenese ist der BMP-Signalweg. Bei den Bone morphogenetic proteins (BMPs) handelt es sich um Mitglieder einer Untergruppe der TGF-β-Superfamilie (Transforming growth factor), multipotente

Signalproteine, die eine Fülle an Zellfunktionen während der Entwicklung und in der adulten Zelle regulieren [120]. Sie treten als sezernierte Homo- oder Heterodimere auf, wobei ihre Funktion an vielen Stellen der Signalkaskade eng reguliert wird, in Form verschiedener Rezeptoren (Typ I, Typ II, BAMBI), extra- (Noggin) und intrazellulärer Inhibitoren (SMAD6, SMURF) und Signalwege (Tak1/Tab1, p38 MAPK, PI3 Kinase) (s. Abb. 1-10).



**Abb. 1-10 BMP-Signalwege**

BMPs binden an Typ-I und -II-BMP-Rezeptoren und formen mit diesen heteromere Komplexe. Nach Bindung von BMP wird der Typ-I-Rezeptor durch den Typ-II-Rezeptor phosphoryliert, was wiederum die Phosphorylierung von SMAD1, 5 und 8 zur Folge hat. Diese formen in ihrem aktivierten Zustand einen Komplex mit SMAD4 und werden anschließend in den Zellkern transportiert, wo sie als Transkriptionsregulatoren fungieren. Neben der SMAD-Signaltransduktion existieren noch alternative Signalkaskaden über Tak1/Tab1, ERK oder PIK3. Im Extrazellulärraum können BMPs durch Bindung an sezernierte Inhibitoren wie z. B. Noggin, Chordin, Gremlin, Follistatin oder den Rezeptor BAMBI, dem die intrazelluläre Domäne zur Signaltransduktion fehlt, gehemmt werden. Intrazellulär kann die BMP-Signaltransduktion durch SMAD6 und SMURF gehemmt werden.

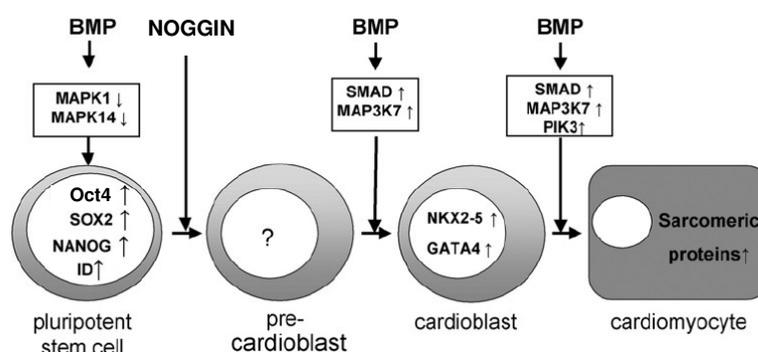
Abb. modifiziert nach [120]

Anders als die Mitglieder des Wnt-Pathways, sind BMPs offensichtlich alleine nicht ausreichend, um die Kardiogenese in Vertebraten zu induzieren [120]. Sie scheinen während der ersten Schritte der Herzentwicklung lediglich einer von vielen notwendigen Bausteinen zu sein, wobei ihnen je nach Zeitpunkt und Expressionsstärke ambivalente Funktionen zuzukommen scheinen (s. u.). So konnte durch Zugabe des BMP-Blockers Noggin (vgl. Abb. 1-10) gezeigt werden, dass je nach Zeitpunkt der Applikation die Herzentwicklung im Hühnerembryo unterdrückt, behindert oder völlig unbeeinträchtigt vonstatten gehen konnte [121-123]. In ES-Zellen war es zudem möglich, durch transiente Inhibition der BMP-Signaltransduktion mittels Noggin die Kardiogenese sogar zu stimulieren (s. Abb. 1-11) [91]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein knockout von BMPs im Embryonalstadium von Mäusen letal verlaufen kann, abhängig vom jeweiligen Typ des Bone Morphogenetic Proteins. So starben BMP2-knockouts nach Bildung des Herzschlauches, BMP4-knockouts

bereits während der Gastrulation. Ein Double-Knockout der jeweils eng verwandten BMPs 5 und 7 bzw. 6 und 7 dagegen verlief erst nach Bildung der Herzkammern letal, wobei insbesondere die Bildung der Endokardkissen und damit die Formation der inneren Kammerbegrenzungen (Klappen und Septen) beeinträchtigt war. Der Knockout von BMP5 oder 7 alleine zeigte dagegen, wohl aufgrund der engen Verwandtschaft (Redundanz), keine größeren Abnormalitäten [120].

In der Zusammenschau der bis heute veröffentlichten Literatur lässt sich demnach ableiten, dass BMPs ihre Wirkung eher nicht während der Initiation der Kardiogenese, sondern vielmehr im Laufe der späteren Bildung des Herzens (Verlängerung des Herzschlauches, Kammerformation, Formation der Endokardkissen) und der Differenzierung der Kardiomyozyten entfalten [124].

Ein weiterer interessanter Aspekt der BMPs findet sich im Zuge der Differenzierung embryonaler Stammzellen. Analog der Entwicklung *in vivo* zeigen sich die Bone Morphogenetic Proteins hier mitverantwortlich für die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Kardioblasten und ausdifferenzierten Kardiomyozyten, wobei die Signaltransduktion über die oben beschriebenen SMAD- und MAPK-Signalwege erfolgt. Interessant dabei ist jedoch, dass eben dieselben BMPs in Kombination mit dem etablierten Cytokin LIF (Leukemia inhibitory factor; s. 2.2.5.1) in der Lage sind, murine ES-Zellen ohne den sonst notwendigen Serum-Zusatz (vgl. 2.2.5.1) im undifferenzierten, pluripotenten Zustand zu konservieren (s. Abb. 1-11) [125].



**Abb. 1-11 Rolle der BMPs in der Differenzierung von Embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten**

Im Pluripotenzstadium sind BMPs wichtig für die Selbsterneuerung der immortalen Stammzellen. Diese erfolgt durch Herunterregulation der MAP-Kinase 1 (ERK) und der MAP-Kinase 14 (p38) sowie durch Stimulation der Expression der Pluripotenzmarker Oct4, SOX2, NANOG und ID. Durch transiente Exposition gegenüber Noggin ist es deshalb möglich, die Entwicklung der undifferenzierten ES-Zellen in Richtung einer kardialen Differenzierung zu bahnen. Dieses Stadium wird als Prä-Kardioblastenstadium bezeichnet. Durch nachfolgende BMP-Stimulation über die SMAD- und MAP3K7-Signalwege werden u. a. die kardiomyozytären Transkriptionsfaktoren Nkx2.5, GATA4 (Kardioblastenstadium) und schließlich die Sarkomerproteine exprimiert, was schließlich zu einer Ausdifferenzierung zu rhythmisch kontrahierenden Kardiomyozyten führt.

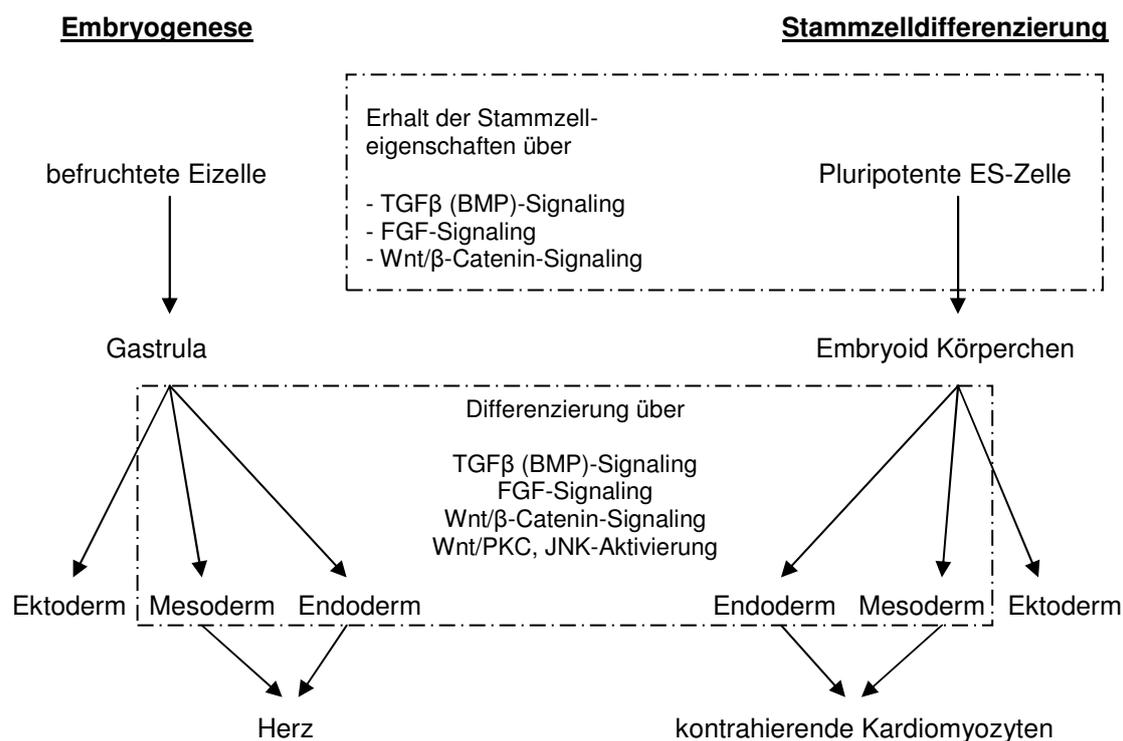
Abb. modifiziert nach [120]

### 1.3.2.3 FGF-Signaling

Beim letzten hier zu beschreibenden Signalweg handelt es sich um die FGF-Signaltransduktion. Ähnlich den BMPs werden die Fibroblast Growth Factors für eine normale Herzentwicklung benötigt. Eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Kardiogenese, wie sie dem Wnt-Signaling zugeschrieben wird, konnte jedoch auch hier bis heute nicht eindeutig nachgewiesen werden. Erwähnenswert ist jedoch, dass FGF-2 und 4 in Kombination jeweils mit BMP-2 oder 4 in der Lage sind, in nichtkardiogenem posteriorem Mesendoderm des Huhns die Bildung von kontraktilem Gewebe zu induzieren [110, 126, 127]. Ein ähnlicher kooperativer Effekt zwischen BMPs und FGFs konnte ebenfalls für FGF-8 in Huhn und Zebrafisch gezeigt werden [110], so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch in vivo eine Kooperation beider Signalwege von Bedeutung ist. Genauere Untersuchungen über die Synergieeffekte zwischen BMP- und FGF-Signaling stehen jedoch noch aus.

Bezüglich der Kardiogenese in Embryonalen Stammzellen hat sich gezeigt, dass das FGF-Signaling für die Ausbildung von kontraktilem Kardiomyozyten auch hier unabdingbar ist. Nach knockout des FGF-Rezeptors 1 in ES-Zellen war eine Bildung von Herzmuskelzellen nämlich nicht mehr möglich, wobei die Effekte einer blockierten FGF-Signaltransduktion, bei unveränderter Expression hämatopoietischer und endothelialer Marker, dabei spezifisch die Herzentwicklung zu betreffen scheinen [128].

Zusammenfassend konnte in den vorangegangenen Abschnitten die jeweilige Relevanz der verschiedenen Signaltransduktionswege an der Kardiogenese beschrieben werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch bei der Untersuchung von Pluripotenz-Genen in ES-Zellen, dass die eben beschriebenen Signalwege (Wnt, BMP und FGF) auch in undifferenzierten Zellen eine Rolle spielen, hier aber offensichtlich zur Erhaltung der Stammzeleigenschaften [129-131]. Daraus lässt sich ableiten, dass augenscheinlich dieselben Signalwege zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung aktiv sind und, vermutlich abhängig vom jeweiligen Stadium und der Linienzugehörigkeit der entsprechenden Zelle, eine unterschiedliche Wirkung erzielen (s. Abb. 1-12).

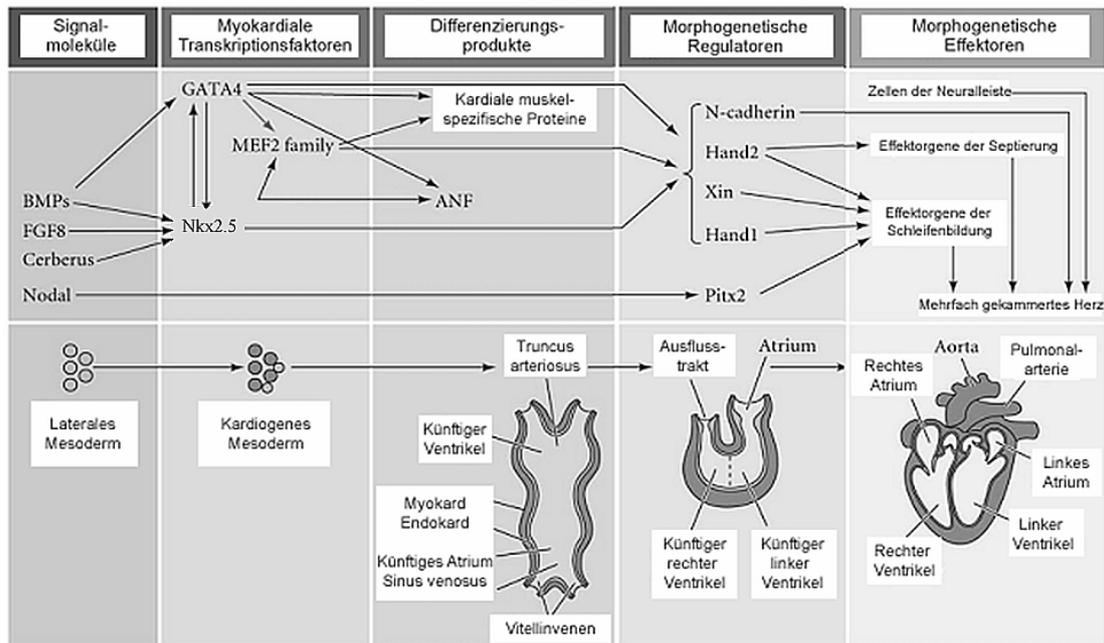


**Abb. 1-12 Schematische Darstellung der Kardiogenese in Embryos und embryonalen Stammzellen**

Die Bildung von Kardiomyozyten in ES-Zellen (rechte Spalte) spiegelt den Prozess der Kardiogenese in Embryos (linke Spalte) auf in-vitro-Ebene wieder, wobei die Wachstumsfaktoren, die u. a. auch die essentiellen Interaktionen zwischen Endoderm und Mesoderm vermitteln, identisch sind. Interessanterweise sind diese Faktoren nicht nur dafür zuständig, die Differenzierung der ES-Zellen zu modulieren, sondern auch um deren Pluripotenz im undifferenzierten Zustand zu erhalten.

Abb. modifiziert aus [110]

Nach der oben beschriebenen frühen Herzentwicklung und deren Induktion folgt die weitere Differenzierung zum Vier-Kammer-Herz. Die molekularen Mechanismen dieser späten Herzentwicklung sind bei der Arbeit mit embryonalen Stammzellen und deshalb für die vorliegenden Untersuchungen nur von untergeordneter Relevanz und werden deshalb in folgender Abbildung nur kurz zusammengefasst.

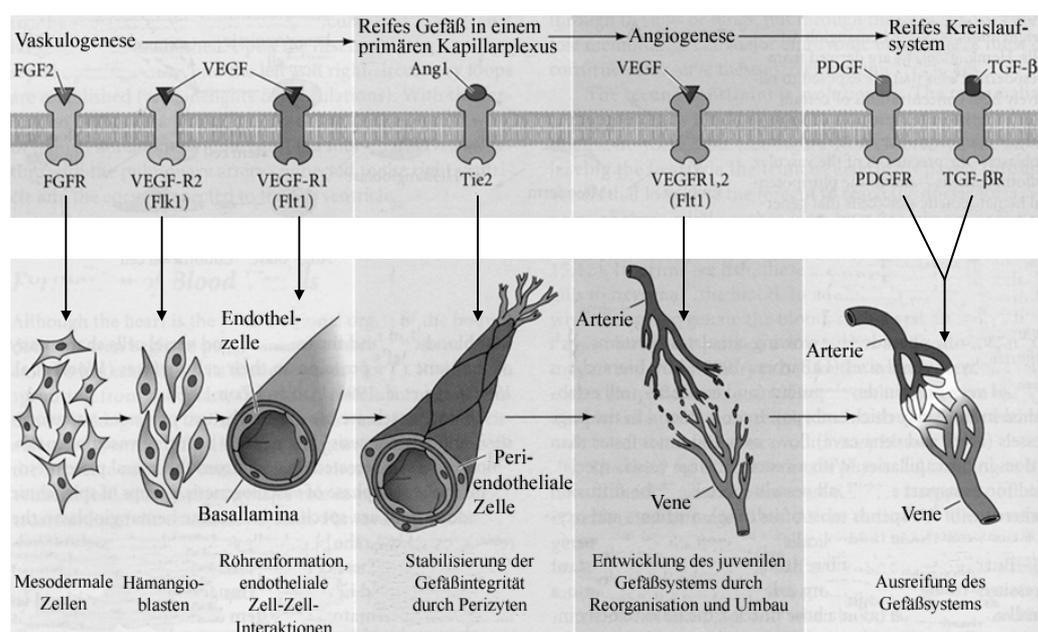


**Abb. 1-13 Kaskade der Herzentwicklung – Korrelation von Morphologie und Markerexpression während der Herzentwicklung**

Nach Induktion der Herzentwicklung über verschiedene Signalmoleküle (s. o. im Text) werden die ersten kardialen Transkriptionsfaktoren (Nkx2.5, GATA4, Mef-Familie) exprimiert und dadurch die Bildung herzmuskelspezifischer Proteine induziert. Durch lokal einwirkende morphogenetische Regulatoren erfolgt die Bildung und Verlängerung des Herzschlauches, die Formation der Herzscheife und schließlich des Vier-Kammer-Herzens [132-135].

Abb. modifiziert nach [105]

Die Entwicklung der Gefäße erfolgt auf molekularer Ebene weitgehend unabhängig, jedoch zeitlich parallel zur Kardiogenese. Sie wird unterteilt in eine embryonal frühere Vaskulo- und eine spätere Angiogenese (s. Abb. 1-14 aus [105]). Stimuliert über die Faktoren basic-fibroblast-growth-factor (FGF2) und vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) formen sich aus mesodermalen Vorläuferzellen (sog. Hämangioblasten) die ersten Blutinseln. Diese differenzieren sich in hämatopoietische Stammzellen (HSCs) und Angioblasten, die in Form von Endothelzellen de novo primäre kapillare Netzwerke bilden (Vaskulogenese). Durch Stimulation mittels Angiopoietin (Ang 1) und VEGF erfolgt anschließend durch Um- und Anbau die sogenannte Angiogenese, also die Ausbildung von Venen, Arterien und Kapillarnetzen aus und an den primären Gefäßnetzen [108, 136]. Der platelet-derived-growth-factor (PDGF) und der transforming-growth-factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) u. a. fördern dabei schließlich die Weiterentwicklung zum reifen Gefäßsystem mit stabilisierten Gefäßwänden und funktionsfähigem Kapillarsystem [105].



**Abb. 1-14 Vaskulogenese und Angiogenese – Korrelation von Morphologie und Markerexpression während der Gefäßentwicklung**

Abb. modifiziert nach [105]

## 1. 4 DER MESODERM POSTERIOR 1 (MESP1) TRANSKRIPTIONSFAKTOR

In der vorliegenden Arbeit soll nun durch Überexpression des Transkriptionsfaktors *mesoderm posterior 1* (MesP1), einem vergleichsweise unbekanntem Faktor der molekularen Herzentwicklung, dessen Einfluß auf die eben beschriebene Kardiovaskulogenese (s. 1.3) in embryonalen Stammzellen untersucht werden. Dabei wurde hier die humane Variante des Faktors (hMesP1) in murine ES-Zellen der Linie GSES (s. 2.1) transfiziert. Im Folgenden ist der aktuelle Wissensstand über MesP1 zusammengestellt.

### 1. 4. 1 Charakterisierung von Gen und Protein

Bei *mesoderm posterior 1* handelt es sich um ein Mitglied der Atonal-Subfamilie der *basic-helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktoren (bHLH). Wie alle Angehörigen dieser Familie enthält MesP1 eine charakteristische bHLH-Sekundärstruktur, d. h. eine hoch-affin DNA-bindende basische Region (*basic*), die N-terminal von zwei, durch eine variable Schleifen-Region (*loop*) getrennten, amphipathischen Helices (*helix*) gelegen ist. bHLH-Faktoren bilden Homo- und Heterodimere und können die Transkription von Genen, und damit deren Expression,

über verschiedene Mechanismen regulieren: Aktivierung oder Hemmung durch Bindung an Hexa- oder Pentanukleotide der DNA, Bindung weiterer Signalmoleküle über spezifische Domänen außerhalb des bHLH-Motivs oder Vermittlung verschiedener Protein-Protein-Interaktionen. Der genaue Regulationsmechanismus des MesP1 selbst ist dabei noch nicht im Detail geklärt (vgl. 1.4.3 und 4.2.4).

Wie MesP2, dem zweiten Mitglied der MesP-Familie, liegt MesP1 nur wenige Kilobasen von diesem entfernt, auf Chromosom 7 der Maus und auf dem langen Arm von Chromosom 15 des Menschen kodiert. Beide MesP-Proteine weisen mit 94% (Maus) bzw. 98% (Mensch) Übereinstimmung ein fast identisches bHLH-Motiv auf, unterscheiden sich jedoch in der sonstigen Primärstruktur ihrer Aminosäuren erheblich [137].

Das humane MesP1-Gen (Länge des ORF: 807 Basenpaare incl. Stop-Codon) enthält neben zwei Exons ein 281 bp langes Intron (272 bp bei der Maus [137]) zwischen dem 722. und dem 723. Basenpaar des offenen Leserasters und kodiert damit für ein 268 Aminosäuren enthaltendes Protein. Der ORF des murinen MesP1-Gens dagegen enthält lediglich 732bp und kodiert abzüglich des Stop-Codons für insgesamt 243 Aminosäuren.

Die Übereinstimmung der Basensequenz von muriner und humaner gespleißter MesP1 mRNA beträgt lediglich 68%, jedoch sind im Bereich der bHLH-Motive 88% der Basenpaare identisch (s. Abb. 1-15).

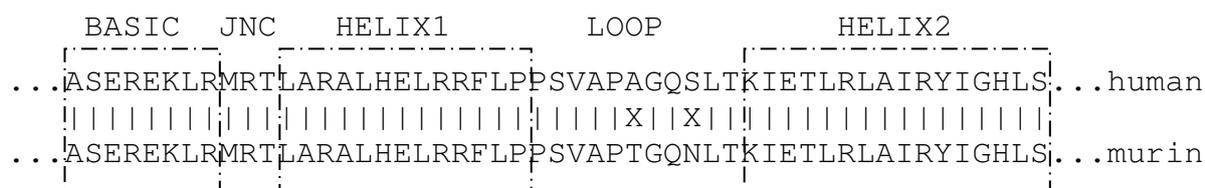
BASIC	JNC	
5'-gccagtgagcgggagaaactgcgcatg	gcgacagptggcccgcgccctgc	h-307
3'-gccagcgagcgggagaagctacgtatg	cgcacactcgcccgcgcgctgc	m-289
-----		
HELIX 1	LOOP	
acgagctg	cgccgctttctaccgbcg	h-359
acgagctg	cgccgctttcttgcggp	m-341
-----		
HELIX 2		
gacp	aagatcgagacgctg	h-408
gacp	aagatcgagacgctg	m-390
-----		

**Abb. 1-15 Vergleich des bHLH-Motivs von humaner (jeweils obere Zeile) mit muriner (jew. untere Zeile) MesP1 mRNA (Übereinstimmung = | in der jew. mittleren Zeile)**

Das bHLH-Motiv ist mit Kästen markiert, die jeweils letzte Base jeder Zeile ist dem offenen Leseraster entsprechend nummeriert (JNC=Verbindungssegment).

Sequenzen entnommen aus [138] und [139]

Noch deutlicher wird die Konservierung dieser für die DNA-Bindung und die Transkriptions-Regulation erforderlichen Abschnitte auf Protein-Ebene. Bei nur 58% insgesamt übereinstimmender Aminosäuresequenz sind die bHLH-Bereiche von MesP1 bei Mensch und Maus zu 96% identisch, wobei die zwei ausgetauschten Aminosäuren im *loop*-Bereich liegen. (s. Abb. 1-15) [137] Dies erklärt die in dieser Arbeit beschriebene Funktionalität des humanen MesP1-Proteins auch in murinen ES-Zellen (s. 1.5, 3.1, 3.3 und 4.2).



**Abb. 1-16 Vergleich des bHLH-Motivs von MesP1 in Mensch (obere Zeile) und Maus (untere Zeile) auf Proteinebene (Übereinstimmung = | in der jew. mittleren Zeile)**

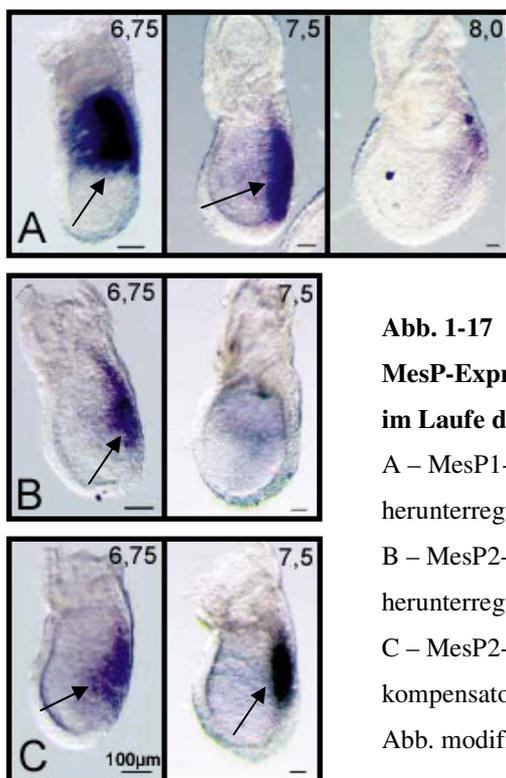
Es zeigt sich eine annähernd komplett identische Aminosäuresequenz, lediglich zwei Aminosäuren im Loop-Bereich sind ausgetauscht (JNC=Verbindungssegment).

Sequenzen entnommen aus [138] und [137]

#### 1. 4. 2 Expressionsmuster und Funktion während der Embryonalentwicklung

Die Bildung eines *mesoderm posterior*-Transkriptionsfaktors konnte in der Vergangenheit in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden – sowohl im Urochordaten *Ciona intestinalis*, als auch in niederen (z. B. Zebrafisch, *Xenopus*) und höher entwickelten Vertebraten (z. B. Maus, Mensch). Dabei scheint das Vorhandensein des MesP-Gens auf den Stamm der Chordaten beschränkt zu sein [140-143]. Stellvertretend für die primitiven Chordaten wurde die Seescheide *Ciona intestinalis* in der Vergangenheit genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass Cs-MesP (in *Ciona* existiert nur ein einzelnes Protein der MesP-Familie) während der Entwicklung kurz vor Beginn der Gastrulation in zwei Ursprungszellen gebildet – und dann beständig in den sich daraus entwickelnden Progenitorzellen des Herzens exprimiert wird [141]. Cs-MesP ist dabei essentieller Bestandteil einer geordnet ablaufenden Herzentwicklung und spielt eine bedeutende Rolle bei der Migration und Spezifizierung von Herzvorläuferzellen, was die gestörte Entwicklung des juvenilen Herzens im Cs-MesP-Knockdown-Embryo zeigt [143]. In weiteren Versuchen konnte zudem gezeigt werden, dass ein Fusionsprotein, bestehend aus Cs-MesP und der konstitutiv transaktivierenden VP16-Domäne, tatsächlich in der Lage ist, die Kardiogenese in *Ciona* unabhängig von der Migration der kardialen Vorläuferzellen zu induzieren [142].

Wie oben angedeutet, spielt MesP1 eine ähnliche Rolle in einer Untergruppe der Chordaten, den Vertebraten, zu denen auch Maus und Mensch gehören. Auch hier ist MesP1 einer der frühesten im Rahmen der Kardiovaskulogenese exprimierten Faktoren [6, 137, 144-147]. Bereits während der Gastrulation wird er von Tag 6,5 bis Tag 7,5 post conceptionem (p. c.) der Mausentwicklung im kranio-kardialen Mesoderm von initial durch den Primitivstreifen gewanderten Zellen und im extraembryonalen Mesoderm gebildet und danach jedoch schnell herunterreguliert (s. Abb. 1-17 A) [146]. Eine Expression von MesP1 im axialen oder frühen paraxialen Mesoderm findet dagegen nicht statt [6]. Neben der Beteiligung an der Induktion von Herz, Somiten und Darm ist der Transkriptionsfaktor dabei auch hier für die Migration der Herzvorläuferzellen mitverantwortlich [6, 145]. In der MesP1<sup>-/-</sup>-Knockout-Maus findet man deshalb Herzfehlbildungen bis hin zur Cardia bifida und eine Retardierung des Embryonalwachstums mit Arrest in einem Stadium, das dem Tag 9-Wildtyp entspricht [146]. Dabei werden die phänotypischen Auswirkungen dieses Gendefekts durch eine starke Heraufregulation (s. Abb. 1-17 B und C) des im gleichen Expressionsmuster ebenfalls während der Gastrulation gebildeten, zu MesP1 verwandten MesP2 noch teilweise kompensiert (s. Abb 1-17 C).



**Abb. 1-17**

**MesP-Expression in der posterioren Region des Embryos (↑)  
im Laufe der Entwicklung, Whole-mount in situ hybridization**

A – MesP1-Expression im Wildtyp-Embryo,

herunterreguliert am Tag 8 p. k.

B – MesP2-Expression im Wildtyp-Embryo,

herunterreguliert am Tag 7,5 p. k.

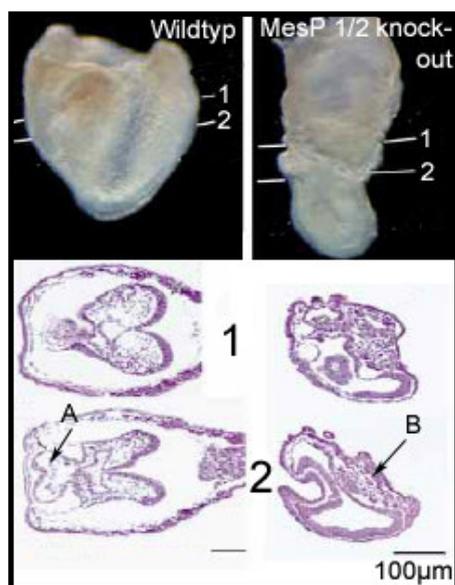
C – MesP2-Expression im MesP1<sup>-/-</sup>-Knockout-Embryo,

kompensatorisch gesteigert am Tag 7,5 p. k.

Abb. modifiziert nach [6]

Ein Knockout beider MesP-Gene schließlich bedingt das Fehlen jeglicher posteriorer Strukturen wie Herz, Somiten oder Darm im sich entwickelnden Embryo [6]. Hinsichtlich der Kardiogenese lässt sich damit feststellen, dass die Bildung einer Herzanlage ohne die

Expression von MesP1 behindert ist und bei Ausschaltung beider MesP-Gene überhaupt nicht mehr stattfinden kann (s. Abb. 1-18).



**Abb. 1-18**

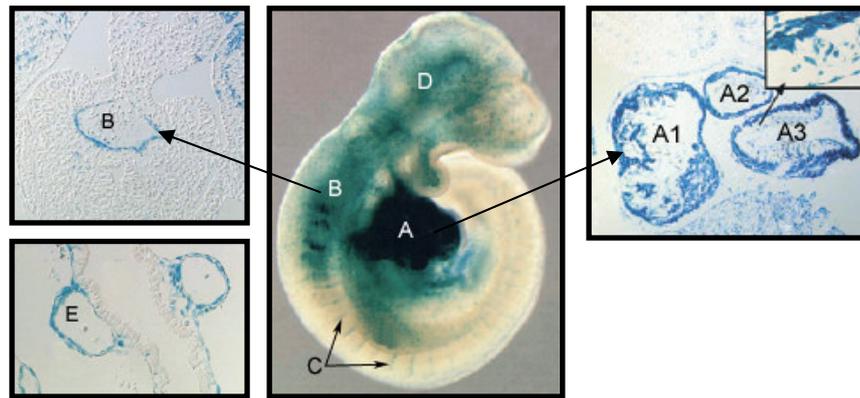
**Schnitte (1, 2) durch Wildtyp- (links) und MesP1/2-Doppelknockout Embryo (rechts) der Maus am Tag 8,5 p. k.**

Bildung des Herzschlauches (A) im Wildtyp-Embryo und abnorme Gastrulation im Knockout-Tier: Akkumulation mesodermaler Zellen in der posterioren Region (B) aufgrund ausbleibender Zell-Migration

Abb. modifiziert nach [6]

Des Weiteren wurde in MesP1-defizienten Tieren eine aberrante Expression von Flk-1, einem frühen Marker von Endothelvorläuferzellen beschrieben [146], was für eine Beteiligung des MesP1-Faktors auch an der embryonalen Gefäßentwicklung spricht.

Nachdem MesP1 nur in einem kurzen Zeitraum während der Embryonalentwicklung exprimiert wird und damit eine Markierung von MesP1<sup>+</sup>-Zellen mittels direktem MesP1-Nachweis in der in-situ-Hybridisierung zeitlich nur sehr begrenzt möglich ist, wurden Untersuchungen zur weiteren Entwicklung MesP1-positiver Zellen während der Embryogenese („fate map“) in doppelt transgenen Embryonen durchgeführt. Diese hatten zum einen das Cre/loxP-System unter Kontrolle des MesP1-Promotors und zum anderen das CAG-CAT-LacZ-Reporter-Konstrukt stabil in das Genom integriert [145, 146]. Die kontinuierliche Markierung der MesP1<sup>+</sup>-Zellen erfolgte dabei nach folgendem Prinzip: Bei Aktivierung der MesP1-Expression in den entsprechenden mesodermalen Zellen wurde unter Kontrolle des transgenen MesP1-Promotors die Cre-Rekombinase exprimiert, die aus dem Reporter-Konstrukt das CAT-Gen eliminierte, wodurch das CAG-LacZ-System aktiviert wurde. Der ubiquitär aktive CAG-Promotor markierte nun mittels  $\beta$ -Galaktosidase die entsprechenden Zellen auch über die Zeit der tatsächlichen MesP1-Expression hinaus und ermöglichte so eine Verfolgung der ehemals MesP1<sup>+</sup>-Zellen während der weiteren Embryonalentwicklung [145]. Dabei fanden sich markierte Zellen im Tag 9,5-Embryo vor allem im Herz (Endo-, Myo- und Epikard) und den Endothelzellen der dorsalen Aorta sowie in den intersomitären und anderen Gefäßen (s. Abb. 1-19).



**Abb. 1-19  $\beta$ -Galaktose-Färbung eines MesP1-Cre/CAG-LacZ-Embryos. Gefärbt ist das von MesP1<sup>+</sup>-Zellen abstammende Gewebe:**

Herz (A) mit primitivem rechten Ventrikel (A1), Ausflusstrakt (A2) und atrioventrikularem Endokardkissen (A3), die dorsale Aorta (B), die intersomitären (C) und kranialen Gefäße (D) sowie die extraembryonalen Gefäße des Dottersacks (E)

Abb. modifiziert nach [145]

Nachdem in den oben beschriebenen Vorarbeiten durch MesP-knockout die Kardiovaskulogenese sowohl in Ciona- als auch in Maus-Embryonen behindert oder sogar unterdrückt werden konnte, ist damit gezeigt, dass die *mesoderm posterior*-Transkriptionsfaktoren einen notwendigen Bestandteil während der Kardiovaskulogenese darstellen. Zu klären bleibt nun, ob MesP im Umkehrschluss auch hinreichend für eine Induktion der Herz- und Gefäßentwicklung im Vertebraten-Embryo wäre, was ihn zu einem interessanten Instrument bei der Amplifikation von Kardiomyozyten in der ES-Zellkultur machen könnte (vgl. 1.2.2.1.3 und 1.5).

### 1. 4. 3 Regulationsmechanismus des MesP1

Derzeit existieren noch keine exakten Angaben darüber, welche Stellung MesP1 innerhalb der komplexen Regulationsmechanismen der Embryonalentwicklung einnehmen könnte und welche Interaktionsmöglichkeiten diesem Faktor zugesprochen werden sollten. Erste Hinweise können bereits aus den oben genannten Veröffentlichungen entnommen werden, die möglicherweise eine grobe Einordnung in die molekularen Zusammenhänge ermöglichen.

Es hat sich gezeigt, dass die Funktion des Primitivstreifens für die Bildung des kranio-kardialen Mesoderms (s. 1.4.2) und damit auch für die Entstehung des Seitenplattenmesoderms, aus dem sich schließlich das Herz entwickelt, von essentieller Bedeutung ist [6, 105]. Dabei stellen u. a. die FGF-Signalwege (vgl. 1.3.2.3) eine wichtige

Komponente zur Steuerung des Primitivstreifens dar [148, 149], wobei die MesPs hier als Interaktionspartner von FGF beschrieben werden. Von MesP1 ist dabei z. B. bekannt, dass der Faktor wie auch FGF-8 in der Lage ist, die Expression von FGF-4 im Primitivstreifen zu verstärken [149], um so indirekt die Bildung des kranio-kardialen Mesoderms zu fördern [6]. In der vorliegenden Arbeit soll nun die induktive Wirkung von MesP1 auf die Kardiogenese gezeigt werden. Vermutlich spielt dabei die Interaktion des Faktors MesP mit dem FGF-Signalweg tatsächlich eine Rolle. Es bleibt jedoch fraglich, ob diese alleinige Interaktion bereits ausreicht (vgl. 1.3.2.3), oder ob nicht noch weitere Signalwege von vielleicht größerer Bedeutung sein könnten.

## 1. 5 ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Auf der Suche nach einer geeigneten Quelle für die Gewinnung von kardialem Ersatzgewebe für den therapeutischen Einsatz im geschädigten menschlichen Myokard könnten embryonale Stammzellen in Zukunft große Möglichkeiten bieten. Aufgrund ihrer günstigen Eigenschaften Immortalität, kardiale Differenzierung und potentielle Steuerungsfähigkeit der ES-Zell-Entwicklung, würden sie sich dafür in besonderem Maße eignen (vgl. 1.2.2.1).

Wie berichtet wurden deshalb bereits enorme Anstrengungen unternommen, um die Kardiogenese in embryonalen Stammzellen zu fördern und so den nur geringen Anteil an Kardiomyozyten an der Gesamtzellpopulation zu erhöhen – mit bereits respektablem Erfolg, wie die zahlreichen Versuche zur Beeinflussung der Kardiogenese in vitro eindrucksvoll belegen (vgl. 1.2.2.1.3). Tatsächlich ist es jedoch noch nicht gelungen, die ES-Zell-Differenzierung weit genug zu verstehen, um die Entwicklung der Zellen kontrollieren und so z. B. Kardiomyozytenreinkulturen aus vorher hoch proliferativen kardialen Vorläuferzellen generieren zu können. Dies nämlich würde die notwendigen Voraussetzungen bieten, um das angestrebte Ziel des „tissue engineering“ effizient, d. h. Gewinnung ausreichend hoher Zellzahlen (s. 1.2.2.1.3), und sicher, d. h. keine Kontamination durch organfremde oder undifferenzierte Zellen (Teratombildung, s. 1.2.2.1.2) sowie Unterbindung einer Abstoßungsreaktion (s. 1.2.2.1.1), erreichen zu können. Deshalb fragte auch Petra Pandur in ihrer Übersichtsarbeit über die kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen: „What does it take to make a heart?“ Und beantwortete ihre Frage gleich selbst: Viele extrazelluläre Wachstumsfaktoren für viele intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, die schließlich ein Netzwerk aus Signalen bilden, das das Programm zur Kardiogenese in ES-Zellen aktiviert – und eine große Zahl an ambitionierten Wissenschaftlern, die das Netzwerk entziffern... Molekül für Molekül [110].

Als eines dieser Moleküle wurde der hier beschriebene Faktor *mesoderm posterior 1* (MesP1) bearbeitet – ein bisher wenig untersuchter Faktor in der frühen Kardiogenese von Vertebraten. (s. 1.4) Zuerst sollte dabei untersucht werden, ob es möglich wäre, durch alleinige MesP1-Überexpression, also einer verstärkten und zeitlich verlängerten, ubiquitären Bildung dieses frühen mesodermalen Transkriptionsfaktors, in sich entwickelnden embryonalen Stammzellen eine verstärkte Herz- und Gefäßentwicklung zu induzieren.

Nach Quantifizierung und objektivem Nachweis der vergrößerten Kardiomyozyten- und Endothelzellpopulationen in der Kulturschale, sowie der Charakterisierung der generierten Zellpopulation, sollten anschließend die zugrunde liegenden Mechanismen analysiert werden. Dazu sollte neben der Quantifizierung der verschiedenen Zelltypen und dem Nachweis von proliferativen Vorläuferzellen *in vitro* insbesondere die durch die genetische Manipulation veränderte molekulare Signalkaskade untersucht werden, um festzustellen, ob und wenn ja welche Faktoren zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung verändert exprimiert würden. So sollte schließlich eine Zuordnung des Faktors MesP1 zu den bereits bekannten Komponenten des für die Herz- und Gefäßentwicklung verantwortlichen Signaltransduktionsnetzwerks ermöglicht und damit letztendlich ein Beitrag zum Verständnis der hochkomplexen Regulationsmechanismen während der Stammzelldifferenzierung hin zum kardiovaskulären System geleistet werden.

---

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid, Bisacrylamid	Serva
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Grünenthal
Bromphenolblau	Merck
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
DL-Dithiothreitol	ICN Biomedicals Inc.
EDTA	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Glycin	Roth
Harnstoff	Sigma
Hefeextrakt	Remel
Kanamycin	Gibco
Magermilchpulver	Heirler
NP40 (IGEPAL CA-630)	Sigma
Phenol	Roth
PMSF	Roche
Ponceau S	Serva
Propidiumjodid (PI)	Sigma
SDS	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
TEMED	Sigma
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Biorad
Allgemeine Laborchemikalien und Lösungsmittel in p. a. Qualität	

## 2. 1. 2 Enzyme und Proteine

Alkalische Phosphatase (CIP)	Biolabs
BSA (Bovines Serumalbumin)	Biolabs
Herculase-DNA-Polymerase	Stratagene
Lysozym	Sigma
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Merck
Protein-Molekulargewichtsstandard Low	Pharmacia
Restriktionsendonukleasen	Biolabs
Reverse Transkriptase und Random Primer	Amersham
RNase-Inhibitor	Stratagene
T4 DNS-Ligase	Biolabs
Taq-DNA-Polymerase	Amersham

## 2. 1. 3 Antikörper

R-Phycoerythrin (R-PE)-Conjugated Rat Anti-Mouse CD31 (PECAM-1) Monoclonal Antibody	BD Pharmingen
R-PE-Conjugated Rat IgG <sub>2a,κ</sub> Monoclonal Immunoglobulin Isotype Control	BD Pharmingen

**CD31** (platelet endothelial cell adhesion molecule-1; PECAM-1) ist ein 130-kD schweres integrales Membranprotein, ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, das Zell-Zell-Adhäsionen vermittelt [150]. CD31 wird konstitutiv auf der Oberfläche von **adulten und embryonalen Endothelzellen** und schwach auf vielen peripheren Leukozyten und Plättchen exprimiert [150-153]. Es wurden multiple splice-Varianten während der frühen Embryonalentwicklung beobachtet, die u. a. für die Regulation der Ligandenspezifität verantwortlich sind [151, 154]. Außerdem sind CD31-vermittelte endotheliale Zell-Zell-Interaktionen an der **Angiogenese** beteiligt [155].

Peridinin Chlorophyll-a Protein (PerCP)- Conjugated Rat Anti-Mouse CD45 Monoclonal Antibody	BD Pharmingen
PerCP-Conjugated Rat IgG <sub>2b,κ</sub> Monoclonal Immunoglobulin Isotype Control	BD Pharmingen

**CD45** (Leukocyte Common Antigen (LCA), Ly-5, T200) ist ein Transmembran-Glykoprotein, ein Mitglied der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Familie, und findet sich auf hämatopoietischen Stammzellen und auf allen **Zellen hämatopoietischen Ursprungs**, jedoch nicht auf Erythrozyten. CD45 wird als Unterscheidungsmerkmal von **Leukozyten** zu Nicht-hämatopoietischen Zellen verwendet [156, 157]. Die CD45-Isoformen der Maus sind spezifisch für Zellart, Reifungsgrad und Aktivierungszustand [158].

Monoclonal Mouse Anti- $\alpha$ -Aktinin (Sarcomeric) antibody	Sigma
Purified Mouse IgG <sub>1,κ</sub> Isotype Control	BD Pharmingen
R-PE-Conjugated Goat Anti-Mouse Immunoglobulin Specific Polyclonal Antibody (Multiple Adsorption)	BD Pharmingen

Der verwendete Anti- $\alpha$ -Aktinin-Antikörper bindet spezifisch an **skelettales und kardiales Muskel- $\alpha$ -Aktinin** und färbt weder glatte Muskulatur, noch Nerven, Reizleitungsstrukturen oder Epithel.  $\alpha$ -Aktinin selbst bildet die Verknüpfungsstellen (Z-Scheiben) der Aktinfilamente zwischen den Sarkomeren.

unkonjugierter Erstantikörper: Kaninchen-AK gegen humanes MesP1 Rabbit-Anti-hMesP1 (AS 55-69)	Eurogentec
Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper: Ziegen-AK gegen Kaninchen Immunglobulin HRP-Goat-Anti-Rabbit (ab6721)	Abcam

**2. 1. 4 Zellkultur-Materialien**

Bakterienkulturschalen	Greiner
Carbamylcholin (Carbachol)	Sigma
DMSO	Sigma
Dulbecco`s Modified Eagle Medium containing 4,5 g/l Glucose	Gibco
FCS	Biochrom
Gelatine, porcine	Sigma
Geneticinsulphat (G418)	Gibco
Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium	Sigma
Isoproterenol (Isoprenalin)	Sigma
Kollagenase II (205 U/mg)	Worthington
Kryo-Tube Einfrier-Röhrchen	Nunc
L-Glutamin	Gibco
LIF (ESGRO)	Chemicon International
MEM	Gibco
Pancreatin	Invitrogen
PBS (ohne Calcium, Magnesium, Natriumbicarbonat)	Gibco
Penicillin(U/ml)/Streptomycin (µg/ml)	Gibco
β-Mercaptoethanol	Merck
Trypsin-EDTA	Gibco
Zellkulturschalen (24-Loch-Platten, 6-Loch-Platten, 10cm-Kulturschalen)	Greiner
α-Monothioglycerol	Sigma
murine Embryonale Stammzellen der Linie GSES aus Agouti 129/SV-Mäusen	ISREC, Lausanne, Schweiz [86]

**2. 1. 5 Bakterienkultur-Materialien**

Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
E.coli-Bakterien TOP 10	Invitrogen
Hefeextrakt	Difco

**2. 1. 6 Kits**

ECL-Western-Blot-Detektions-System	Amersham
Gel-Extraktions-Kit	Qiagen
Plasmidpräparations-Kit	Qiagen
Realtime RT-PCR Polymerase-Mix	Biorad IQ SYBR Green Super Mix kit
RNA-Extraktions-Kit	Qiagen
TNT SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System, in vitro Transkriptions- und Translations-Kit	Promega

**2. 1. 7 Sonstige Labormaterialien**

Filmmaterial	Amersham Hyperfilm ECL
Fotokassette Hyperscreen	Amersham
Gelelektrophorese Marker 100 bp-Ladder	Biolabs
Gelelektrophorese Marker 1 kb-Ladder	Biolabs
Gelelektrophorese Marker $\lambda$ -HindIII	Biolabs
Sterilfilter	Nalgene
Whatman-Papier	Whatman
$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham
$\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]-dATP (3000 Ci/mmol)	Amersham
[ <sup>35</sup> S]-Methionin (1000 Ci/mmol)	Amersham

**2. 1. 8 Laborgeräte**

Brutschrank	Jouan IG 150
Einfrierbehälter	Nalgene
Elektroporationsgerät	Biorad Gene Pulser II
FACS (Analysegerät)	Beckman Coulter Epics XL
FACS-Analysesoftware	EXPO 32 ADC
FACS (Analysegerät)	Becton Dickinson FACSCalibur
FACS (Sortiergerät)	Becton Dickinson FACSVantage SE
Filmentwickler	AGFA Du Pont DP 250 Daylight Processor
Gelelektrophoresekammer	Biorad
Gel-Videokamera	Biorad Gel Doc 2000

Heizblock	HLC HBT 130
Mikroskop	Zeiss Axiovert 200
Mikroskop-Videokamera	Sony DCR-TRV19E
Mikroskop-Photokamera	Carl Zeiss Axio Cam HRc
Phosphor-IP	BAS-SR Imaging Plate (IP)
Phosphor-IP-Eraser	Raytest ERASER
Phosphor-Imager	FujiFilm BAS-1500
Realtime RT-PCR Cycler	Biorad iCycler und MyiQ detection system
Rundschüttler	Certomat K
Sterilbänke	Jouan MSC 12 Heraeus HERA Safe
Thermocycler	Biometra T personal
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 1065
UV-Lampen	Osram Mercury Short Arc Photooptic Lamp HBO
Wasserbad	Medingen W 12
Zentrifugen	Jouan BR 4 Hettich-Zentrifuge Mikro 20

## 2. 1. 9 Medien, Puffer und Lösungen

### 2.1.9.1 ES-Zellkultur und -analyse

Kultivierungsmedium undifferenzierter Zellen („Kultivierungsmedium“)	500 ml Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose 10 Vol% FCS 100 U/ml Penicillin, 0,1µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 x MEM Nichtessentielle Aminosäuren 1000 U/ml LIF 0,1mM $\beta$ -Mercaptoethanol zur Selektion: 0,4 g/l G418
Kultivierungsmedium differenzierter Zellen („Differenzierungsmedium“)	500 ml Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium 10 Vol% FCS 100 U/ml Penicillin, 0,1µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 x MEM Nichtessentielle Aminosäuren 0,004 Vol% $\alpha$ -Monothioglycerol
Kryomedium (auf Eis)	50 Vol% FCS 40 Vol% Kultivierungsmedium

	10 Vol% DMSO
Zellvereinzellungslösung für FACS	PBS 30µM CaCl <sub>2</sub> Kollagenase II 0,5 mg/ml Pancreatin 0,6 mg/ml
FACS-Puffer	PBS 2 g% BSA
MACS-Puffer (pH 7,2)	PBS 0,5 g% BSA 2 mM EDTA

### 2.1.9.2 Bakterienkultur und Plasmidpräparation

YT-Medium mit Kanamycin (pH 7,2)	85 mM KCl 30 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mM MgSO <sub>4</sub> 1 mM EGTA 2 mM Na <sub>2</sub> ATP 5 mM Na-Pyruvat 5 mM Kreatin 20 mM Taurin 20 mM Glucose 50µg/ml Kanamycin
YT-Platten	YT-Medium mit Kanamycin (pH 7,2) Bacto-Agar 15 g/l
TELT-Puffer (pH 7,5)	50 mM Tris 62,5 mM EDTA 2,5 M LiCl 0,4 Vol% Triton X-100
TE-Puffer	1 mM EDTA (pH 8,0) 10 mM TrisHCl (pH 8,0) 20µg/ml RNase
Phenol	Gepuffert in TE, pH 8,0 0,1 Vol% Hydroxychinolin
Phenol/Chloroform	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol 25:24:1
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Acetat (pH 8,0) 950 mM Essigsäure 50 mM EDTA

2.1.9.3 Proteinbiochemische Methoden

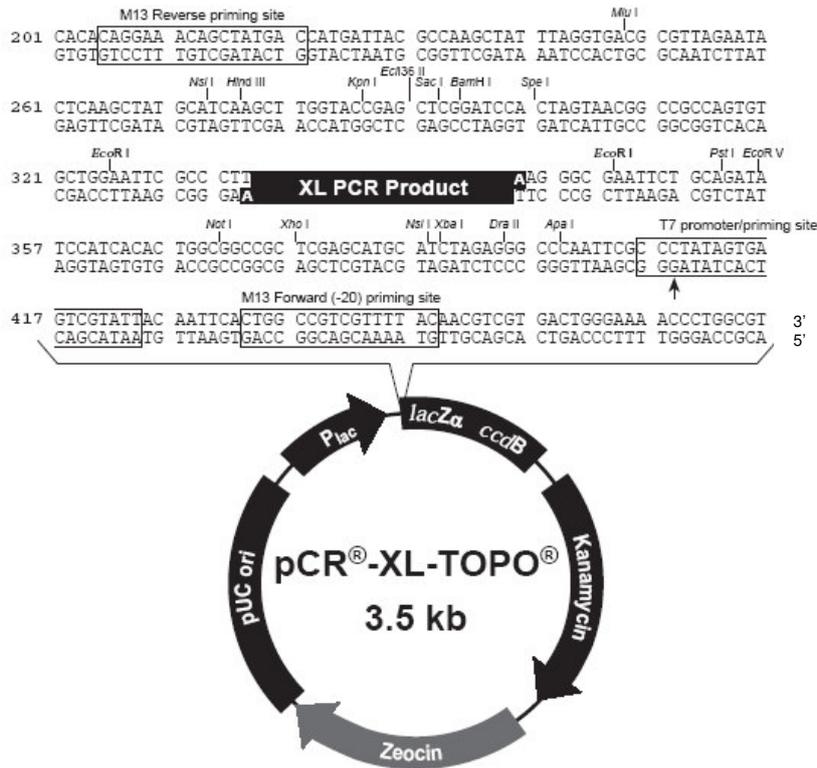
Auftragspuffer Sole 2x für SDS-PAGE	100 mM TrisHCl, pH 6,8 40 Vol% Glycerin 6 Vol% SDS 0,02 Vol% Bromphenolblau 200 mM DTT
Blotpuffer für Western Blot	25 mM Tris 200 mM Glycin 0,1 % SDS 20 Vol% Methanol
Lysepuffer für Proteinextraktion	2 Vol% NP40 120 mM NaCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 Proteinaseinhibitoren
Proteinaseinhibitoren (Sigma)	2 µM Pepstatin 2 µM Leupeptin 2 mM PMSF 1 mM Jodacetamid 1 mM Aprotinin 1 mM N-Ethylendiamid
Block-Puffer für Immunmarkierung	PBS, pH 7,2 10 g% Magermilchpulver 0,05 Vol% Tween 20

## 2. 1. 10 Plasmide

### 2.1.10.1 Klonierungsvektor pCR-XL-TOPO

Vektor pCR-XL-TOPO

Invitrogen



Lac promoter/operator region: bases 95-216  
 M13 Reverse priming site: bases 205-221  
 Lac Za ORF: bases 217-576  
 Multiple Cloning Site: bases 248-399  
 TOPO® Cloning site: bases 336-337  
 T7 promoter priming site: bases 406-425  
 M13 Forward (-20) priming site: bases 433-448  
 Fusion joint: bases 577-585  
 ccdB lethal gene ORF: bases 586-888  
 Kanamycin resistance ORF: bases 1237-2031  
 Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612  
 pUC origin: bases 2680-3393

**Abb. 2-1 Klonierungsvektor pCR-XL-TOPO mit „multiple cloning site“ und Insertionsstelle für das zu klonierende PCR-Produkt (hier: MesP1-cDNA)**

Abb. Invitrogen (modifiziert)

Der pCR-XL-TOPO-Vektor enthält den konstitutiv aktiven Lac-Promotor, nachgeschaltet die „multiple cloning site“ mit Insertionsstelle für das zu klonierende DNA-Fragment (XL PCR Product), das lacZα-Gen zur Markierung der transformierten Bakterien, sowie das letale ccdB-Gen, das gewährleistet, dass alle Bakterien abgetötet werden, die mit einem Vektor ohne Insert transformiert wurden. Außerdem sind in den Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen für die Selektion der Bakterien und der „pUC origin of replication“ für die Amplifikation des Vektors integriert.

Die Funktionsweise der TOPO TA-Klonierung beruht auf der Topoisomerase I aus dem Vaccinia-Virus, die kovalent an das 3' lokalisierte Thymidin der Insertionsstelle gebunden ist. Sie ermöglicht die Integration auch von längeren Inserts in den Klonierungsvektor und vermittelt deren Ligation. Wichtig bei Verwendung des hier gezeigten Vektors ist, dass aufgrund der 3'-endständigen Tymidine an der Insertionsstelle nur adenylierte Inserts (Adenosin am 5' Ende) integriert werden können. Dies gewährleistet die vorherige Inkubation des Inserts mit der Polymerase Taq [159].

### 2.1.10.2 Expressionsvektor pIRES2-EGFP

Vektor pIRES2-EGFP

Clontech

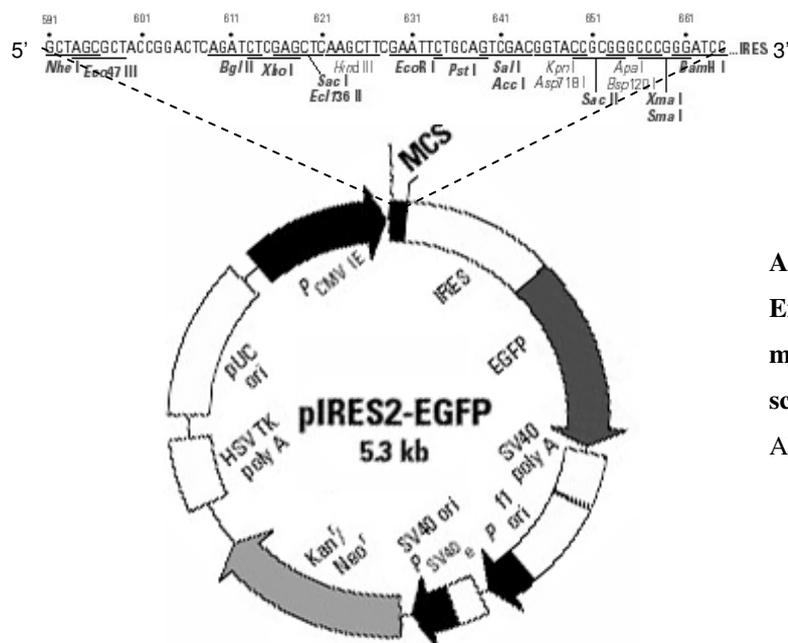


Abb. 2-2

Expressionsvektor pIRES2-EGFP mit multiple cloning site (Sequenzausschnitt)

Abb. Clontech (modifiziert)

Der verwendete Vektor enthält die „Internal ribosomal entry site“ (IRES) des Enzephalomyokarditisvirus (ECMV) zwischen der MCS und der kodierenden Region des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). [160, 161] Dies ermöglicht die Expression sowohl des hMesP1-Gens, das in die MCS kloniert wurde s. Abb. 3-2), als auch des EGFP-Gens von einer einzigen bicistronischen mRNA. Bei EGFP handelt es sich um ein Fluoreszenzprotein, das nach Translation im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist und bei Exzitation mit Licht der Wellenlänge 488nm grünes Licht emittiert (Maximum bei ca. 530nm), was für eine Detektion lebender transfizierter Zellen unter dem Lichtmikroskop und im FACS genutzt werden kann (s. 3.2). Dabei handelt es sich bei EGFP um die ins rote verschobene Variante des Wildtyp-GFP, die hinsichtlich der Fluoreszenzintensität und der

Expressionsstärke in Säugetierzellen optimiert wurde. [162-164] Die MCS befindet sich zwischen dem direkten frühen Promotor des Cytomegalievirus ( $P_{CMV IE}$ ) und der IRES-Sequenz. Der integrierte CMV-Promotor ist konstitutiv aktiv und damit für eine sofortige und andauernde Expression der unter seiner Kontrolle stehenden Gene verantwortlich. Das SV40-Polyadenylierungssignal, das dem EGFP nachgeschaltet ist, gewährleistet die korrekte Prozessierung des 3'-Endes der bicistronischen mRNA. Durch die Gene für Neomycin- und Kanamycin-Resistenz aus Tn5 [165] unter dem Promotor des Affenvirus 40 (simian virus; SV40) und dem Polyadenylierungssignal aus der Herpes-Simplex-Virus Thymidin-Kinase (HSV TK) wurde die Selektion stabil transfizierter Klone unter G418 ermöglicht.

Die Vermehrung des Vektors in *E. coli* unter Antibiotika-Selektion wurde durch das integrierte Kanamycin-Resistenzgen unter der Kontrolle eines Bakterienpromotors und den *pUC origin of replication* gewährleistet.

2.1.10.3 Kontrollvektor pEGFP-N1

Vektor pEGFP-N1

Clontech

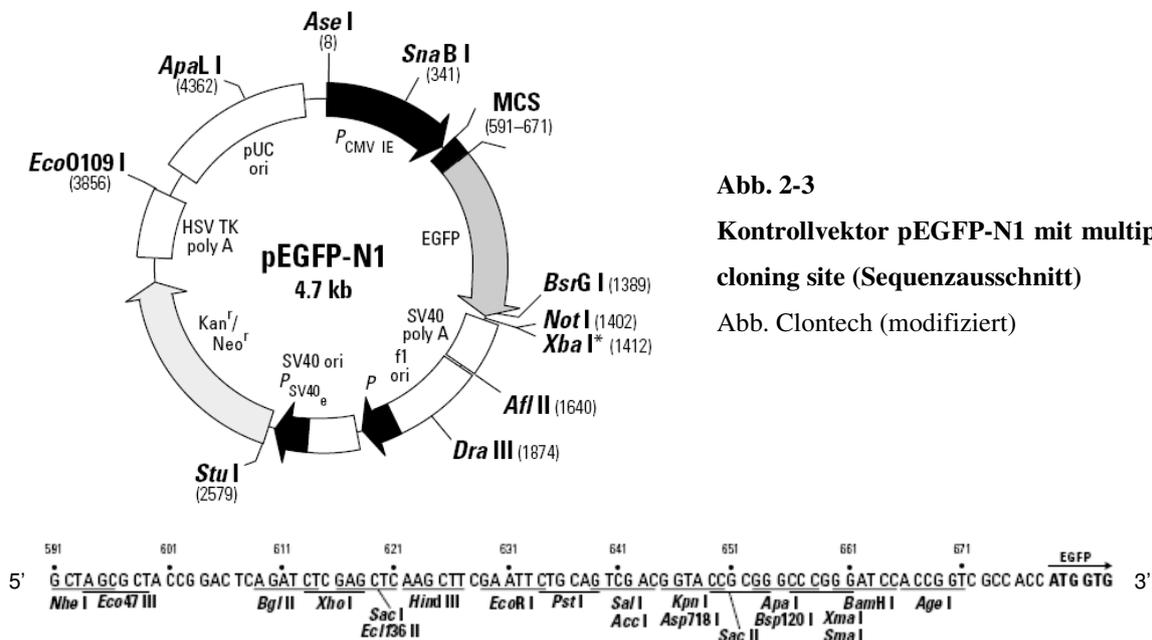


Abb. 2-3  
 Kontrollvektor pEGFP-N1 mit multiple cloning site (Sequenzausschnitt)  
 Abb. Clontech (modifiziert)

Der pEGFP-N1-Vektor ermöglicht die Expression des EGFP-Gens unter Kontrolle des CMV-Promotors mit Unterstützung der sog. „Kozak consensus translation initiation site“ und enthält außerdem eine Neomycin-Resistenz-Kassette zur stabilen Transfektion von Säugetierzellen. Damit besitzt er alle relevanten Eigenschaften, um in ES-Zellen als

Negativkontrolle für den MesP1-kodierenden Expressionsvektor phMesP1-IRES2-EGFP verwendet werden zu können (vgl. 3.1.2 und 3.2.3.1) [162, 166, 167].

## 2. 1. 11 Oligonukleotide

Die gereinigten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

Folgende Oligonukleotide wurden als PCR Primer zur Klonierung der hMesP1-cDNA genutzt:

Kozak Mesp1mRNAup1-20	5' GCTGCCATGGCCCAGCCCCTGTGCCC 3'
Mesp1mRNAlo3`	5' CAAGGAACCACTTCGAAGGTG 3'

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die PCR zur Sequenzierung des klonierten phMesP1-IRES2-EGFP Plasmids eingesetzt:

pEGFP-1seq4104	5' CCTGCGTTATCCCCTGATTC 3'
IRES2-lo770	5' CAAAAGACGGCAATATGGTGG 3'
Kozak Mesp1mRNAup1-20	5' GCTGCCATGGCCCAGCCCCTGTGCCC 3'
Mesp1mRNAlo3`	5' CAAGGAACCACTTCGAAGGTG 3'

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die RT-PCR zum Nachweis des humanen MesP-1-Gens in der fusionierten cDNA in transfizierten GSES-Zellen eingesetzt (up = sense, lo = anti-sense):

Mesp mRNA up744	5' GTGCTGGCTCTGTTGGAGAC 3'
EGFPseqPrim lo149	5' GTTCAGATGAACTTCAGGG 3'

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die RT-PCR bzw. Nested-RT-PCR zur Quantifizierung der Expression von Markergenen eingesetzt:

### Legende:

up = sense

lo = anti-sense

+ = nested Primer

“Zahl” = Position der ersten bzw. letzten Primerbase im ORF des jeweiligen Gens, z. B. beträgt die Länge eines PCR-Produkts mit den eingesetzten Primern up593 und lo831 demnach 239 bp

<u>Bezeichnung Oligo</u>	<u>Bezeichnung Markergen</u>	<u>Basensequenz</u>
mANF up593	Atriales Natriuretisches	5' TTCCTCGTCTTGGCCTTTTG 3'
mANF lo831	Polypeptid	5' CCTCATCTTCTACCGGCATCTTC 3'
mBrachyury up580	Brachyury	5' GCTGTGACTGCCTACCAGAATG 3'
mBrachyury lo810		5' GAGAGAGAGCGAGCCTCCAAAC 3'
mCx43 up76	Connexin 43	5' CTGTCGGTGCTCTTCATTTTC 3'
mCx43 lo266		5' GTGGGCACAGACACGAATATG 3'
mCx45 up3	Connexin 45	5' GAGTTGGAGCTTCTGACTC 3'
mCx45 lo358		5' GCATGGCATAGGGTTTGCTC 3'
mCytokeratin17 up19	Cytokeratin 17	5' CAGTTTACCTCCTCCAGCTC 3'
mCytokeratin17 lo356		5' CAATCTCGGATCTTACCTC 3'
mDkk-1 up50	Dickkopf-1	5' CAATGATGGCTCTCTGCAGC 3'
mDkk-1 lo435		5' GTCAGAGGGCATGCATATTC 3'
mGATA-4 up641	GATA-4-	5' GAGAGTGTGTCAATTGTGGG 3'
mGATA-4 lo1058	Transkriptionsfaktor	5' GTGGCATTGCTGGAGTTAC 3'
mH4 up64	Histon H4 Ladekontrolle	5' GTTCTCCGCGATAACATCC 3'
mH4 lo189		5' CAGGAACACCTTCAGCACAC 3'
mHex up99	Hex	5' CTACATCGACGACATCTTGG 3'
mHex lo478		5' GAGTCTCGAACTTCTTCTCC 3'
mHNF4 up 66	Hepatozyten-Kernfaktor	5' CTACACCACCCTGGAGTTTG 3'
mHNF4 lo 386		5' GCTTCCTTCTTCATGCCAGC 3'
mMyoD up20	MyoD	5' CACTCCGGGACATAGACTTG 3'
mMyoD lo243		5' CACATGCTCATCCTCACGAG 3'
mMef2c up1326	Mef 2c-	5' CCCCTTCGAGATACCCACAA 3'
mMef2c lo1476	Transkriptionsfaktor	5' GAAGGTCTGGTGAGTCCAATGG 3'
mNeuroD up81	Neuro D	5' CAGTTCTCAGGACGAGGAAC 3'
mNeuroD lo393		5' GTAGCAAGGTACCACCTTGC 3'
mNeurogenin up315	Neurogenin	5' CATGCACAACCTCAACGCTG 3'
mNeurogenin lo625		5' GACTACTGGGGTCAGAGAGT 3'
mNkx2.5 up1314	Nkx 2.5-	5' ACTATGCCCTGTCCCTCGGAT 3'
mNkx2.5 lo1471	Transkriptionsfaktor	5' CTCCCGTCTTAGTGTGGAA 3'
+ mNkx2.5 up1332		5' GATTCACACCCACCCTCG 3'
+ mNkx2.5 lo1454		5' GAATCCGTGAAAGTGCCC 3'
mTbx5 up41	T-Box-5-	5' CTCTGGAGCCTGATTCCAAAG 3'

mTbx5 lo382	Transkriptionsfaktor	5' CTGCTTTGCCAGTTACGGAC 3'
mTTR up5	Transthyretinrezeptor	5' CTTCCCTTCGACTCTTCCTC 3'
mTTR lo349		5' CTGTGAAAACCACATCCGCG 3'
mVECad up65	VE Cadherin	5' CAATGGCAGGCCCTAACTTTC 3'
mVECad lo270		5' GATCTTGCCAGCAAACCTCTC 3'

## 2. 2 METHODEN

### 2. 2. 1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

E.coli-Stämme wurden nach Transformation bei 37°C unter antibiotischer Behandlung mit Kanamycin (Kanamycinselektion 50µg/ml) für 14 – 16 h bei 225 Upm und 37°C inkubiert. Dabei wurden für die Plasmidpräparation zu analytischen Zwecken (s. 2.2.2.1.2) 3 - 4 ml YT-KANA-Medium mit einer Einzelkolonie, für die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA (s. 2.2.2.1.2) 250 ml YT-KANA-Medium mit 1 ml einer Bakterien-Übernacht-Kultur angeimpft.

#### 2.2.1.2 Transformation von Bakterien nach der Hitzeschockmethode

Zur Transformation wurden 50 µl aufgetauter kompetenter TOP10-Zellen mit 7,5 µl des Ligationsansatzes (s. 2.2.2.4) gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Nach einem 30-sekündigen Hitzeschock (42°C) wurden die Zellen zur Expression der Antibiotikaresistenz mit 250 µl SOC-Medium 1h bei 37°C im Schüttler (225 Upm) inkubiert. 90% bzw. 10% des Ansatzes wurden auf YT-KANA-Platten mit einer sterilen gebogenen Glaspipette angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Selektion wurde mit den verwendeten Vektoren stets ein Kanamycin-Resistenzgen in die Bakterien transformiert (s. 2.1.10.1 und 2).

## 2. 2. 2 DNA-Methoden

### 2.2.2.1 Präparation und Reinigung von DNA

#### 2.2.2.1.1 Präparation genomischer DNA

Die Präparation genomischer DNA aus GSES-Zellen erfolgte durch Entnahme eines 37,5 µl Aliquots der nach einem Passagiervorgang in 250µl Kultivierungsmedium resuspendierten Zellen. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (Eppendorf-Zentrifuge, 2500 Upm, 3 min, Raumtemperatur) erfolgte die Resuspension in 10µl Proteinase K (125 µg/ml) und 5µl SDS (17 µM) sowie anschließend eine Inkubation (37°C, 1h; 95°C, 15 min) zur Freisetzung der DNA. Nach Abzentrifugation der gefällten Proteine (13 000 Upm, 5 min, Raumtemperatur) wurde DNA aus dem Überstand für weitere Untersuchungen mittels PCR eingesetzt.

#### 2.2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde entweder zur Gewinnung großer DNA-Mengen mit dem Qiagen MaxiKit nach den Angaben des Herstellers oder als Mini-Präparation zu analytischen Zwecken nach folgender Lyse-Methode (TELT-Präparation) isoliert: Das Bakteriensediment einer 3-4 ml Übernachtskultur (Eppendorf-Zentrifuge, 5000 Upm, 5 min, Raumtemperatur) wurde in 150 µl TELT-Puffer und 15µl Lysozym durch Vortexen resuspendiert. Die anschließende Inkubation über 5 min bei Raumtemperatur diente der Bakterienlyse. Die Denaturierung des Lysozyms erfolgte durch Kochen bei 95°C über 120 s. Chromosomale DNA und Proteine präzipitierten durch Inkubation auf Eis über mindestens 5 min; sie wurden durch Zentrifugation (14 000 Upm, 20 min, 4°C) abgetrennt. Die im Überstand vorhandenen Plasmide wurden durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol gefällt (5 min, Raumtemperatur) und abzentrifugiert (14000 Upm, 10 min, Raumtemperatur). Nach einem Waschschrift mit 70%-igem Ethanol wurde das Plasmid luftgetrocknet (10 min), in 25-30 µl TE resuspendiert und über 5 min bei 65°C zum Abbau der RNA durch die zugesetzte RNase inkubiert. Für analytische Restriktionsverdau wurden 1-2 µl dieser Plasmid-DNA-Lösung eingesetzt.

#### 2.2.2.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Proteine abzutrennen, die spätere Schritte bei der DNA-Verarbeitung beeinträchtigt hätten, wurden die DNA-Lösungen durch Zugabe eines gleichen Volumens Phenol bzw. Phenol/Chloroform und kräftiges Vortexen extrahiert. Nach Zentrifugation (13 000 Upm, 3 min, 4°C) konnte die wässrige, DNA-enhaltende Oberphase abgenommen werden. Die

Entfernung der Phenolreste erfolgte durch zweimaliges Ausschütteln mit Chloroform, die Fällung der DNA im Anschluss mit Ethanol.

#### 2.2.2.1.4 Ethanolfällung

Bei DNA-haltigen Lösungen wurde durch Zugabe von TE (pH 8,0) zunächst ein Volumen von mindestens 150 µl eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 Volumen Ethanol (96%, vorgekühlt auf -20°C) und 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2). Nach kräftigem Vortexen wurde bei -20°C mindestens 30 min gefällt, danach das Präzipitat bei 4°C für 20 min bei 14000 Upm (Jouan-Zentrifuge) abzentrifugiert und mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung (10 min) wurde die DNA im gewünschten Volumen TE (pH 8,0) gelöst.

#### 2.2.2.1.5 Isopropanolfällung

Zur DNA-Lösung wurde 0,7 Volumen Isopropanol gegeben und bei 4°C für 60 min zentrifugiert. Waschen und Lösen des Sediments erfolgte wie für die Ethanolfällung beschrieben.

### 2.2.2.2 Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten

#### 2.2.2.2.1 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Analytische Verdauungen wurden mit ca. 500 ng Plasmid-DNA mit 2,5 U des entsprechenden Restriktionsenzym in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern in einem Volumen von 10 bis 30 µl durchgeführt (37°C, 1-2 h). Die Analyse der entstandenen Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.2.2.2). Für präparative Verdauungen wurden ca. 5 µg DNA und 5-10 U des entsprechenden Restriktionsenzym in einem Volumen von 100 µl inkubiert. Erhaltene Fragmente wurden nach Auftrennung im Agarosegel, wie unter 2.2.2.2.3 beschrieben, isoliert.

#### 2.2.2.2.2 Analytische Gelelektrophorese

Zur Analyse von isolierter DNA (PCR-Produkte, Plasmide nach Restriktionsverdau) wurde diese in Agarosegelen (0,8 bis 2%), abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente) aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in TAE-Puffer unter Kochen gelöst, nach Abkühlung 0,5 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben und die flüssige Agaroselösung in die entsprechende Gelapparatur gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel mit TAE-Elektrophoresepuffer überschichtet, die Proben mit 0,1 Volumen

DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 60-120 Volt. Die Fragmente wurden auf einem Transluminator (260 und 355 nm) sichtbar gemacht und mit einer Videokamera photographiert. Als Größenstandard wurden die 100 bp-Leiter, die 1 kb-Leiter und der  $\lambda$ -HindIII-Marker verwendet.

#### 2.2.2.2.3 Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Elektrophorese und Ausschneiden der gewünschten Bande aus 1%-igen Agarosegelen mit dem QiagenGelExtraktionskit nach Herstellerangaben.

#### 2.2.2.2.4 Sequenzierung der Plasmide

Die hergestellten Plasmide wurden nach der analytischen Gelelektrophorese zur Bestätigung der korrekten Ligation der DNA-Fragmente und zum Ausschluss von Mutationen durch die Fa. MWG-Biotech sequenziert. Dazu wurde neben dem Plasmid jeweils geeignete Sequenzierungsprimer (s. 2.1.11) eingesandt.

#### 2.2.2.3 Subklonierung isolierter DNA-Fragmente

Um bei der Ligation eine Religation der Vektoren zu verhindern, wurde mit dem Enzym CIP („calf intestine phosphatase“) die 5'-Phosphatgruppen entfernt. Dabei wurden zu dem hydrolysierten Vektor 1 Volumen 1x CIP Puffer und 3 U CIP zugegeben. Dieser Ansatz wurde über einen Zeitraum von 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde nach präparativer Gelelektrophorese (s. 2.2.2.2.3) die erwünschte Vektorbande aus der Agarose isoliert und zur Ligation eingesetzt.

#### 2.2.2.4 Ligation

Zur Ligation wurde der entsprechend vorbereitete Vektor (50 – 100 ng) mit einem 2-4-fach molaren Überschuss an Fragment-DNA in 15 $\mu$ l Reaktionspuffer mit 0,5 U T4-DNA-Ligase bei Raumtemperatur über 1 h inkubiert. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde zur Transformation von E.coli-Bakterien eingesetzt (s. 2.2.1.2).

### 2.2.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion [168]

#### 2.2.2.5.1 Analyse der transfizierten Klone mittels RT-PCR

Die aus isolierter Gesamt-mRNA (s. 2.2.3.1) revers transkribierte cDNA (s. 2.2.3.2) wurde für den Nachweis der Transkription des in das ES-Zell-Genom eingebrachten humanen MesP1-Gens genutzt. Basierend auf der hMesP1-cDNA-Sequenz wurden geeignete Primer entworfen (s. 2.1.11). 1 µl DNA wurde bei einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt, wobei Taq-Polymerase (0,625 U) als Enzym verwendet wurde. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primerpaare wurde anhand der folgenden Faustregel errechnet:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times \Sigma (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times \Sigma (\text{G}+\text{C})$$

In der Praxis wurde eine Annealingtemperatur gewählt, die 3 – 4 °C unter der mit oben stehender Formel errechneten Temperatur lag. Für die Enzymreaktion wurden 72 °C gewählt; die Reaktionszeit betrug im Allgemeinen ca. 1 min pro 1000 bp, für Annealing und Denaturierung jeweils 1 min. Vor Beginn jeder PCR wurde eine 2-minütige Denaturierung (94 °C) durchgeführt, um initial eine vollständige Doppelstrangtrennung zu gewährleisten. Nach Abschluss der Zyklen stand eine 7-minütige 72 °C-Phase, um eine Komplettierung aller Doppelstränge sicherzustellen. Nach Abschluss von 35 Zyklen wurden die PCR-Produkte mit 1 µl DNA-Auftragspuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

#### 2.2.2.5.2 RT-PCR mit radioaktiver Markierung zur Quantifizierung der Expression von Markergenen

Gemäß der cDNA-Sequenzen der untersuchten Markergene wurden spezifische Primerpaare konstruiert (s. 2.1.11), wobei die Polymerase-Ketten-Reaktionen wie beschrieben (s. 2.2.2.5.1) durchgeführt wurden. Als Ladekontrolle zur Standardisierung diente Histon H4. 1 µl RT-Ansatz (s. 2.2.3.2), der das cDNA-Template enthielt, wurde direkt für die PCR eingesetzt; als Negativkontrolle diente die entsprechend verdünnte RNA (-RT). Taq-Polymerase (0,625 U) fand als Enzym Verwendung. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielt zusätzlich  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dCTP mit einer Aktivität von 0,5 µCi. Es wurden bis zu 35 Zyklen durchgeführt und der Ansatz nach der Reaktion auf 30 µl verdünnt sowie zusätzlich mit 3,3 µl Auftragspuffer versetzt. Ein Aliquot wurde auf ein 7,5%-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, wobei der Gellauf bei 120 V erfolgte. Nach Abklatschen auf Whatman-Papier wurde das Gel unter Vakuum bei 80 °C getrocknet. Die Quantifizierung der radioaktiv markierten PCR-Produkte im getrockneten Gel erfolgte mittels Phosphor-Imager.

Die Generierung von Abbildungen erfolgte unter variabler Expositionsdauer in Fotokassetten auf Amersham Hyperfilm.

#### 2.2.2.5.3 Nested PCR zur Kontrolle der Expression von Markergenen

Für Markergene, bei welchen das verwendete Primerpaar in der nach 2.2.2.5.2 durchgeführten PCR zu Fehlhybridisierungen und damit zu unspezifischen Banden oder keinem sichtbaren Produkt führte, wurde auf das Prinzip der Nested-PCR zurückgegriffen: Nach einer durchgeführten konventionellen RT-PCR (1µl RT-Ansatz; 0,625 U Taq-Polymerase; 35 Zyklen) wurde aus dem 10µl-Ansatz 1µl als Template für die darauffolgende konventionelle bzw. radioaktive RT-PCR mit neuen Primern entnommen, wobei dieses zweite Primerpaar innerhalb des durch das erste Primerpaar begrenzten Bereiches lag. Auf diese Weise wurden die falschen Amplifikationsprodukte der ersten Runde wegselektiert und eine höhere Sensitivität geschaffen.

### 2. 2. 3 RNA-Methoden

#### 2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus GSES-Zellen

Mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits wurde aus jeweils etwa 40µl Zellmaterial verschiedener Entwicklungsstadien nach Abzentrifugieren (Eppendorfzentrifuge, 2500 Upm, 3 min, Raumtemperatur) die Gesamt-RNA isoliert. Dies erfolgte nach den Angaben des Herstellers entsprechend dem Protokoll für tierische Zellen. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde in 30µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80 °C.

#### 2.2.3.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription zur Herstellung der Gesamt-cDNA wurden je 2µl der isolierten Gesamt-RNA (s. 2.2.3.1.) eingesetzt. Die Reaktion mit 30 U AMV-reverser Transkriptase erfolgte in einem Volumen von 20 µl für 60 min bei 37°C entsprechend der Anleitung, es wurden allerdings zusätzlich 24 U RNase-Inhibitor eingesetzt. Anschließend wurde das Volumen durch Zugabe von 20 µl H<sub>2</sub>O bidest verdoppelt, die Lösung auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Für die PCR konnten von dieser Verdünnung direkt je 1µg des cDNA-Templates eingesetzt werden.

## 2. 2. 4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.4.1 Translation *in vitro*

Translation *in vitro* wurde mit nicht linearisiertem, rekombinanten SP6-hMesP1-Plasmid als DNA-Template gemäß der Anleitung mit einem TNT-Kit (Promega) durchgeführt. Ein SP6-Luciferase-Plasmid diente dabei als Kontrolle. Bei diesem vereinfachten Verfahren können die Transkription und die Translation der DNA-Matrize im selben Reaktionsansatz erfolgen. Das Gesamtvolumen betrug pro Ansatz 50  $\mu$ l, der Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin (1 $\mu$ l; 10 mCi/ml) diente der radioaktiven Markierung, um das *in vitro* translatierte Protein nach SDS-PAGE darzustellen (s. 2.2.4.3).

### 2.2.4.2 Gesamt-Proteinextraktion

Die Embryonalen Stammzellen wurden durch 5x Ultraschallbehandlung (ca. 30s) in Lysepuffer lysiert. Pro  $2 \cdot 10^7$  Zellen wurden 5-10 $\mu$ l des Puffers eingesetzt. Die Proteinextrakte wurden nach Zugabe von 2 Volumen 2x Sole-Auftragspuffer 5 Minuten auf 94 °C erhitzt und zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, 13000 Upm, 5 min, Raumtemperatur). Danach konnten die Proben direkt für die SDS-PAGE eingesetzt werden.

### 2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde mit diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Laemmli (1970) in einer Mini-Gelapparatur durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das 10% Polyacrylamidgel mit dem gleichen Volumen 2x Sole für 5 min bei 95 °C gekocht. Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmolekulargewichtsstandard verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V.

### 2.2.4.4 Western Blot

Nach Auftrennung mit SDS-PAGE wurden die Proteine in einem Naßblotverfahren unter Anlegung eines elektrischen Spannungsfeldes auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert. [169] Hierzu wurde das Gel, auf dem die mit Blotpuffer getränkte Nitrocellulose luftblasenfrei aufgebracht wurde, „sandwichartig“ zwischen je drei feuchte Whatmanpapiere

und einen Schwamm gelegt. Mit Hilfe eines zusammenklappbaren Gitters wurde der Aufbau so in die Blotapparatur gestellt, dass die Nitrocellulosemembranen auf der Seite der Anode lag, da unter den gewählten Pufferbedingungen der Transfer der Proteine in Richtung Anode stattfindet. Bei einer konstanten Stromstärke von 0,5 A wurde bei 4 °C 1,5-2 h transferiert. Im Anschluss daran wurden die transferierten Proteine mit Ponceau S gefärbt und die Markerbanden gekennzeichnet. Die Membran wurde dann direkt für die folgende Immunmarkierung eingesetzt.

#### 2.2.4.5 Immunmarkierung von Proteinen auf Western-Blot-Membranen

Vor der Immunreaktion wurden unspezifische Bindungsstellen auf dem Filter zwei Mal für 15 min in Block-Puffer abgesättigt. Die Filter wurden anschließend mit dem entsprechenden primären MesP1-Antikörper (0,1 – 1 µg/ml) in Block-Puffer 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Filter in PBS/0,05% Tween 20 wurden sie mit Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert. Nach erneutem Waschen (4 x 10 min) wurden die gebundenen Antikörper mit dem ECL-Western-Blot-Detektions-System nachgewiesen. Zur Verstärkung der Signale konnten die auf der Membran immobilisierten Proteine renaturiert werden (15 min 6 M Harnstoff in PBS; 15 min 3 M Harnstoff in PBS; 15 min in PBS). Eine Wiederverwendung von bereits gebrauchten Western Blots erlaubte die Behandlung mit 0,1 M Glycin pH 2,5 für 10 min mit anschließendem 20-minütigem Waschen mit 0,05% Tween 20 in PBS.

### **2. 2. 5 Zellkulturmethoden**

Die Medien und Lösungen für die Zellkultur waren autoklaviert oder steril filtriert und wurden vor Gebrauch i. d. R. auf 37°C vorgewärmt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### 2.2.5.1 Kultivierung der Zellen

GSES (murine embryonale Stammzellen) wurden in undifferenziertem Zustand in oben beschriebenen Kultivierungsmedium (incl. FCS) mit LIF gezogen, wodurch eine spontane Differenzierung der ES-Zellen verhindert wurde. [42-45] LIF wirkt über Aktivierung des JAK/STAT3 Signalweges. [125, 170] Dabei wurde eine Feederzell-freie Kultivierung der undifferenzierten Zellen durchgeführt. Es fanden in der Regel 10cm-Schalen (10 ml Medium)

Verwendung, welche zuvor mit 0,1%-iger denaturiertes Kollagen enthaltender porciner Gelatine beschichtet worden waren, um die Zelladhärenz zu verbessern (mind. 15 min, 37 °C). Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von weniger als 50% passagiert: Nach zweimaligem Waschen mit PBS ohne Calcium (jeweils 8 ml), wurden sie mit 1 ml 1x Trypsin-EDTA im Brutschrank für 1-2 min inkubiert, sodass sie sich durch leichtes Spülen oder Klopfen ablösen ließen. Die Trypsinierung wurde dann durch Zugabe von 10 ml des FCS-haltigen Kultivierungsmediums gestoppt. Nach Zentrifugation (Jouan-Zentrifuge, 1200 Upm, Raumtemperatur, 5 min) und Aufnahme des Sediments in Medium wurden diese in einer Verdünnung von 1:5 - 1:20 erneut ausgesät.

#### 2.2.5.2 Konservierung der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte unter schrittweiser Zugabe des vorgekühlten Kryomediums bei einem Titer von  $1-5 \times 10^6$  Zellen/ml pro Kryo-Tube. Die Zellen wurden langsam (1°C/min) in einem Kryobehälter auf -80°C eingefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff für eine dauerhafte Lagerung überführt.

Zum Wiederauftauen der Zellen wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff direkt für 50 s in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und darin angetaut. Anschließend wurde die noch gefrorene Zellsuspension in ein 15ml-Gefäß überführt, mit 10 ml Kultivierungsmedium verdünnt und sofort zentrifugiert, so dass mit anschließender Abnahme des Überstandes das DMSO-enthaltende Kryomedium zügig entfernt werden konnte. Die Aussaat der Zellen erfolgte auf zwei 10cm-Zellkulturschalen pro Kryo-Tube.

#### 2.2.5.3 Transfektion mittels Elektroporation

Vor der Transfektion wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS bei einem Titer von  $1-2 \times 10^6$  / 800µl aufgenommen und zusammen mit 3µg der Phenol-Chloroform-gereinigten Plasmid-DNA in eine 0,4 cm Elektroden-Küvette pipettiert. Nach mehrmaligem Schwenken der Küvette erfolgte die Elektroporation bei 240 V und 500 µF, wobei die Zeitkonstante zwischen 6,5 und 7,5 s lag. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 90 bzw. 10% der Zellsuspension auf gelatinisierte Zellkulturschalen mit 10 ml Medium ausgesät.

#### 2.2.5.4 Selektion mit Geneticinsulphat und Separation von Einzelklonen

Die Selektion stabiler Klone wurde ca. 24 h nach Elektroporation unter Zugabe von 0,4 mg Geneticinsulphat (G418) pro ml Kultivierungsmedium begonnen [171]. Ermöglicht wurde dies durch das im transfizierten Vektor integrierte G418-Resistenzgen (s. 2.1.10.2 und 3.1.2). Nach täglichem Mediumwechsel konnten Einzelzellklone nach 9 - 11 Tagen separiert werden. Hierfür wurden die Schalen zweimal mit 8 ml PBS ohne Calcium gewaschen und anschließend mit 4 ml PBS überschichtet. Eine Zellkolonie wurde mit einer 1000µl-Eppendorf-Pipette in 40µl PBS aufgenommen, danach in 50µl 1x PBS-EDTA für 5 min inkubiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in einer 200µl-Eppendorf-Pipette vereinzelt. Anschließend erfolgte eine Umsetzung in ein Loch einer 24-well-Zellkulturplatte mit 1 ml G418-Kultivierungsmedium. Vom transfizierten Konstrukt wurden 24 Klone separiert und bis zu ca. 50% Konfluenz weitere 7 - 21 Tage unter Selektion gezogen. Danach erfolgte aus 15% der Zellen eines Klons die Extraktion der genomischen DNA (s. 2.2.2.1.1), um diesen hinsichtlich einer stabilen Integration des transfizierten DNA-Konstrukts mittels PCR zu testen. Die restlichen Zellen wurden wie oben beschrieben passagiert und weiter kultiviert.

#### 2.2.5.5 Differenzierung der Zellen

Die Differenzierung der GSES-Zellen erfolgte in oben beschriebenem Differenzierungsmedium ohne LIF und ohne G418. Nach Abtrypsinierung und Abzentrifugieren der Zellen wurden dabei ca.  $1-5 \times 10^6$  Zellen in 10ml Differenzierungsmedium resuspendiert und in diesem Volumen in 10cm-Bakerischalen gezogen, welche eine Zelladhärenz verhindern und somit eine Suspensionskultur ermöglichen. Dabei bilden die Zellen Aggregate aus, aus denen sich sog. „Embryoid“-Körperchen (EBs) entwickeln. Diese kugelförmigen EBs bestanden nach 6-tägiger Suspensionsphase mit mehrmaligem Mediumwechsel aus etwa jeweils 2500 Zellen und wurden in diesem Entwicklungsstadium in gelatinierte 24-Loch-Zellkulturplatten (ca. 10 - 12 EBs pro Loch) mit Differenzierungsmedium umgesetzt (ausplattiert), wobei die Zellklumpen innerhalb von einem Tagen adhärten und sich nach einigen Tagen spontan kontrahierende Areale bildeten (Adhärenzphase). Der Tag der Entwicklung wird im Folgenden immer differenziert in Suspensionsphase und Adhärenzphase angegeben, z. B. wird mit Tag 6+10 der zehnte Tag nach dem Ausplattieren bezeichnet. Für Experimente mit größerem Bedarf an

Zellmaterial (z. B. FACS) wurden bis zu 50 EBs in 6-Loch-Platten oder 10cm-Zellkulturschalen ausplattiert [30, 32].

#### 2.2.5.6 Pharmakologische Stimulation

Die differenzierten embryonalen Stammzellen wurden in der Adhärenzphase durch Stimulation mit dem direkten Parasympathomimetikum Carbamylcholin (Carbachol [1 $\mu$ M]) und dem direkten  $\beta_{1/2}$ -Sympathomimetikum Isoproterenol (Isoprenalin [0,1 $\mu$ M]) angeregt. Die Zugabe der beiden Stoffe erfolgte jeweils direkt in das Differenzierungsmedium der Zellkulturschale unter Mikroskopkontrolle und Videoaufzeichnung. Nach gründlicher Durchmischung mit der Pipette wurde dabei jeweils die Veränderung der Schlagfrequenz [1/min] der spontan kontrahierenden Areale ermittelt [32, 86, 95, 172].

### **2. 2. 6 FACS**

Zur Analyse der EGFP-Expression (IRES-EGFP-Konstrukt) sowie der Expression von CD31, CD45 und  $\alpha$ -Aktinin wurde eine 3-Farben-Durchflusszytometrie durchgeführt. Zudem wurden MesP1-IRES-EGFP-Zellen mit Hilfe eines FACS-Sortiergerätes entsprechend ihrer EGFP-Expression selektiert.

Sämtliche Verdünnungen und Waschvorgänge während der Vorbereitung der Zellen für das FACS erfolgten im folgenden Protokoll, soweit nicht anders angegeben, mit FACS-Puffer. Isotypenkontrollen wurden in entsprechenden Verdünnungen analog zur spezifischen Antikörperfärbung durchgeführt.

#### 2.2.6.1 Intrazelluläre Färbung

Die adhärente Zellkultur ( $2 \times 10^6$  Zellen) wurde am 10. Differenzierungstag nach dem Ausplattieren in der 10-cm-Zellkulturschale 2 mal mit PBS ohne Calcium (8ml) gewaschen, mit 5x-Trypsin (500 $\mu$ l, 1 min) durch leichtes Spülen gelöst (s. 2.2.5.1) und anschließend für 20 min in der Zellvereinzellungslösung (4 ml, s. 2.1.9) inkubiert. Nach Fixierung in Formaldehyd (3,7 Vol%, 4 ml; 20 min, 20 °C), Renaturierung in Glycin (50 mM, 4 ml; 10 min, 20 °C) und Permeabilisierung in TritonX-100 (0,4 Vol%, 4 ml; 10 min auf Eis) erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Anti- $\alpha$ -Aktinin, Verdünnung 1:1000, 400  $\mu$ l; 60 min, 37 °C). Nach zweimaligem Waschen folgte die Inkubation mit dem Sekundäntikörper (PE-

conjugated-Goat Anti-Mouse, 1:400, 400 µl; 60 min, 37 °C, lichtgeschützt), nach erneutem zweimaligem Waschen die Analyse der Proben im FACS [86, 100].

### 2.2.6.2 Extrazelluläre Färbung

Die schwimmenden Embryoid-Körperchen ( $1 \times 10^6$  Zellen) wurden am 6. Tag der Differenzierung in PBS-EDTA (5mM EDTA; 15 min, 37 °C) vereinzelt, in PBS ohne Calcium gewaschen und mit dem Antikörper (PE Anti-Mouse CD31 bzw. 45, Verdünnung 1:500, 400µl; 60 min, 4°C) inkubiert. Anschließend erneut zwei Mal gewaschen und im FACS analysiert [173].

### 2.2.6.3 EGFP-Detektion

Bei der Analyse auf EGFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen wurden diese im Kultivierungsstadium mit 1x Trypsin-EDTA vereinzelt (s. 2.2.5.1). Analytische Messungen wurden in PBS ohne Calcium (250 – 1000µl pro Probe) nach Zugabe von Propidiumjodid (PI; 0,05 mg/ml.) durchgeführt, sodass eine Beurteilung ausschließlich der lebenden Zellen ermöglicht wurde.

Propidiumjodid diffundiert in nicht-vitale Zellen und färbt diese an, indem es an dsDNA bindet. PI kann jedoch die Zellmembran lebender Zellen nicht überwinden und wird daher als spezifischer Marker für avitale Zellen im FACS genutzt [174, 175].

### 2.2.6.4 Analytisches FACS

Bei den EGFP- und extrazellulären Messungen wurden als repräsentative Auswahl 10.000 Zellen analysiert. Bei intrazellulären Färbungen wurden lediglich 5.000 Zellen untersucht, da hier durch die zahlreichen Waschvorgänge ein hoher Zellverlust auftrat. Die Laser-Exzitation lag für alle drei verwendeten Farbstoffe bei 488 nm, der Emissions-Spektralmessbereich für EGFP bei 515-545 nm, für das Fluorochrom PE bei 564-606 nm und für PI bei > 650 nm. Die Messung der in dieser Arbeit gezeigten Daten erfolgte mit dem Durchflusszytometer „Epics XL“, die Auswertung mit dem Programm „EXPO32 ADC“.

Die Zellen wurden zunächst im Vorwärts- (FS) und im Seitwärtsstreulicht (SS) entsprechend ihrer Größe und Granularität (bei Färbungen) bzw. PI-Fluoreszenz (bei EGFP-Detektion) erfasst und so selektioniert („gated“), dass tote Zellen und Zelldetritus nicht in die Analyse mit eingingen.

Die jeweiligen Achsen der Abbildungen (Abb. 3-5 bis 3-9, 3-18 bis 3-21 und 3-22 bis 3-25) geben die Intensität der Emission der Wellenlängen des Spektralmessbereiches der jeweiligen Fluoreszenz wieder. Dabei waren die Antikörper gegen CD31 direkt, gegen  $\alpha$ -Aktinin indirekt PE-gekoppelt und gegen CD45 direkt PerCP gekoppelt. EGFP-Fluoreszenz der Zellen war direkt ohne Antikörper-Färbung detektierbar soweit die Zellen in nicht-fixiertem Zustand (s. 2.2.7.1 und 2.2.7.2) analysiert wurden.

#### 2.2.6.5 Zellsortierung

Die Zellsortierung mittels des FACS-Sorters „FACSVantage SE“ beruhte wie unter 2.2.7.3 beschrieben ebenfalls auf einer Detektion der EGFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen. Sie diente hier jedoch nicht der Ermittlung stabil transfizierter Zellklone, sondern der Anreicherung transfizierter EGFP<sup>+</sup>-Zellen auf einen Reinheitsgrad nahe 100%. Diese hohe Reinheit war eine Voraussetzung für die Untersuchung der Zellen in vivo nach Transplantation in infarziertes Maus-Myokard, die in einer anderen Arbeit parallel durchgeführt wurde. Die Zellsortierung erfolgte in 2 ml Kulturmedium ohne Zugabe von Propidiumjodid.

## III. ERGEBNISSE

## 3. 1 GENERIERUNG EINES VEKTORS ZUR hMESP1-ÜBEREXPRESSION

## 3. 1. 1 Isolierung und Klonierung der humanen MesP1-cDNA

Die kodierende Sequenz für das humane MesP1-Gen, bestehend aus zwei Exons und einem dazwischenliegenden Intron (Länge: 281 bp, gelegen zwischen 722. und 723. bp des offenen Leserasters), wurde aus humaner genomischer DNA (vgl. 2.1.11) mittels PCR (analog 2.2.2.5.1) gewonnen. Das amplifizierte Fragment wurde nach Aufreinigung mittels präparativer Gelelektrophorese (s. 2.2.2.2.3) durch Inkubation mit Taq-Polymerase adenyliert (analog 2.2.2.5.1), sodass es anschließend in den pCR-XL-TOPO-Klonierungsvektor (s. 2.1.10.1) eingefügt werden konnte. Nach Transformation dieses Konstruktes in kompetente TOP10-Bakterienzellen (s. 2.2.1.2) und Vermehrung unter Kanamycin-Selektion (s. 2.2.1.1) konnte das amplifizierte Plasmid isoliert werden (s. 2.2.2.1.2). Dieser Klonierungsvektor diente dazu, die notwendigen Restriktionsschnittstellen (Sac I und Pst I; s. Abb. 3-1) für die folgende Umklonierung in den Expressionsvektor pIRES2-EGFP (s. 2.1.10.2) zu liefern, der dann schließlich in die Embryonalen Stammzellen transfiziert wurde.

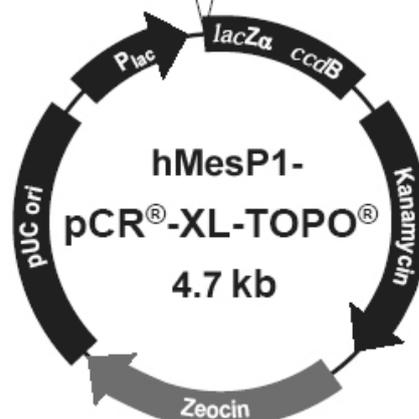
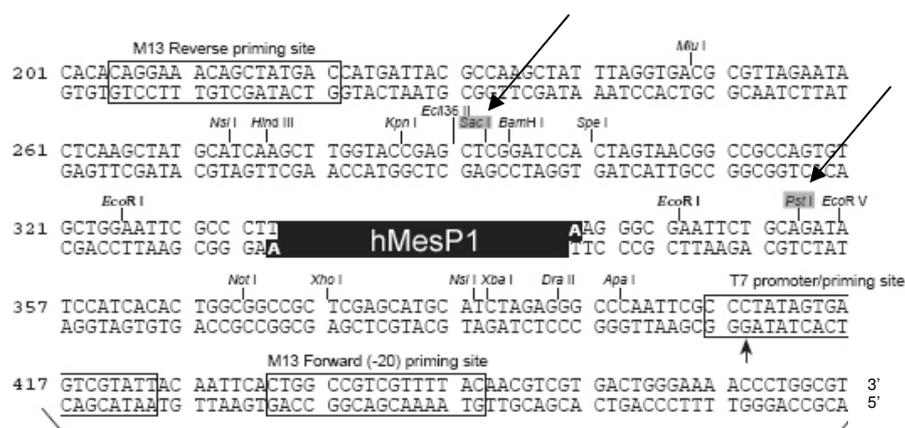


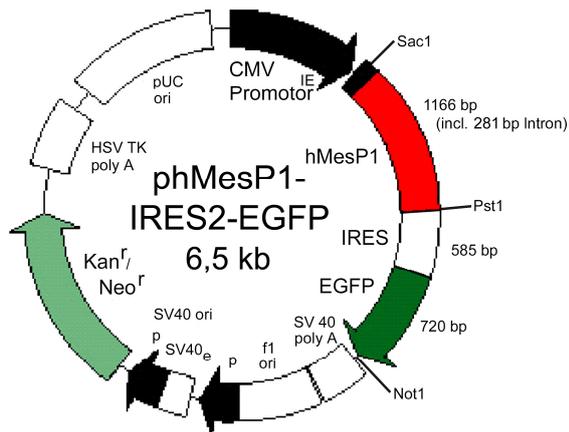
Abb. 3-1

pCR-XL-TOPO-Vektor mit dem integrierten humanen MesP1-Gen und den Schnittstellen Sac I und Pst I (Pfeile)

Abb. Invitrogen (modifiziert)

### 3. 1. 2 Klonierung des Expressionsvektors phMesP1-IRES2-EGFP

Nach erfolgter Plasmid-Präparation wurde die 1166 bp lange hMesP1-Sequenz (incl. Intron) mittels der Restriktionsenzyme Sac I und Pst I aus dem Klonierungsvektor herausgeschnitten (s. 2.2.2.2.1) und mit dem vorbereiteten Expressionsvektor (s. 2.2.2.3) pIRES2-EGFP (s. 2.1.10.2), der ebenfalls mit den Restriktionsenzymen Sac I und Pst I geöffnet worden war, religiert (s. 2.2.2.4 und Abb. 3-2).



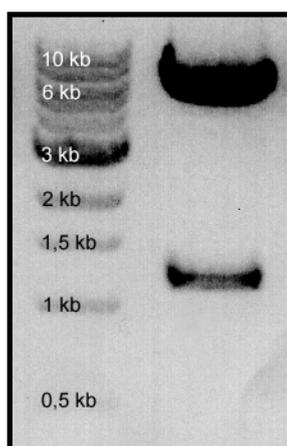
**Abb. 3-2 Expressionsvektor phMesP1-IRES2-EGFP**  
pIRES2-EGFP-Vektor mit integriertem humanem MesP1-Gen und den Schnittstellen Sac I und Pst I (vgl. Abb. 2-2)

Abb. Clontech (modifiziert)

Der Vektor wurde ebenfalls in kompetente TOP10-Bakterienzellen transformiert und diese anschließend wie oben beschrieben unter Kanamycin-Selektion vermehrt. Nach Präparation (s. 2.2.2.1.2) wurde das Plasmid mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.2.2.1.3) gereinigt und nach Kontrollverdau (s. 2.2.2.2.1 und Abb. 3-3) sequenziert (s. 2.2.2.2.4).

Nach Ausschluss von Mutationen und Bestätigung der korrekten Ligation konnte das Plasmid direkt für die Transfektion embryonaler Stammzellen verwendet werden.

Dieser Vektor ermöglichte nach Einbringung in das ES-Zell-Genom mittels Elektroporation zunächst eine Antibiotika-gestützte Selektion stabil-transfizierter Zellklone aufgrund von Expression des Neomycin-Resistenzgens und schließlich die Überexpression des Faktors MesP1 unter der Kontrolle des CMV-Promotors in den gleichzeitig mittels EGFP-Fluoreszenz markierten ES-Zellen (s. 2.1.10.2).



**Abb. 3-3**

**Kontrollverdau des Vektors phMesP1-IRES2-EGFP**  
(geschnitten mit Sac I und Pst I)

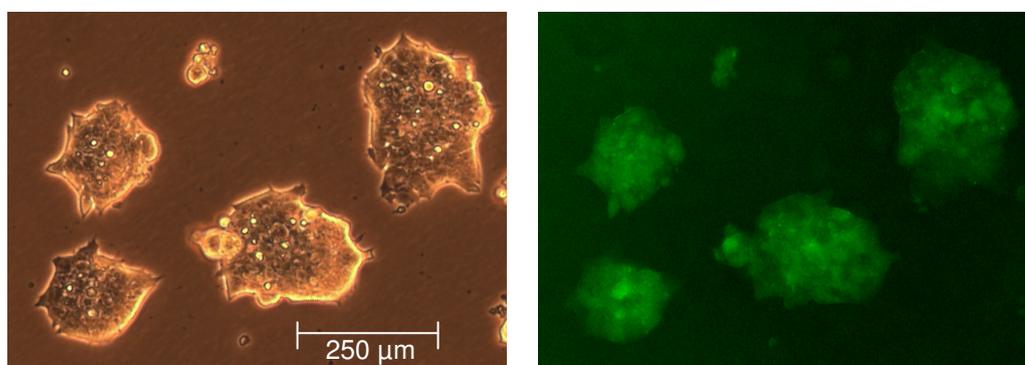
links: Marker 1 kb-Leiter

rechts: MesP1-cDNA (1166 bp) und linearisierter pIRES2-EGFP-Vektor (5,3 kb)

## 3.2 GENERIERUNG STABIL TRANSFIZIERTER KLONE

### 3.2.1. Transfektion und Separation einzelner Zellklone

Murine Embryonale Stammzellen der Linie GSES wurden wie beschrieben (s. 2.2.5.3) mittels Elektroporation mit dem generierten Vektor phMesP1-IRES2-EGFP (s. 3.1.2; Abb. 3-2) transfiziert (s. 2.2.5.3). Während der anschließenden Kultivierungsphase unter G418-Selektion (s. 2.2.5.4) konnten zahlreiche stabil transfizierte Kolonien anhand ihrer EGFP-Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert und isoliert werden (s. Abb. 3-4). Nach Gewinnung mehrerer Klone („MesP1-Klone“) konnten diese kryokonserviert bzw. für die folgenden Analysen vermehrt werden.



**Abb. 3-4 Undifferenzierte, stabil MesP1-transfizierte ES-Zell-Kolonien im Lichtmikroskop**

Aufnahme unter normalem Durchlicht (links) und unter Exzitation bei 488nm mit EGFP-Fluoreszenz (grün) der Kolonien (rechts)

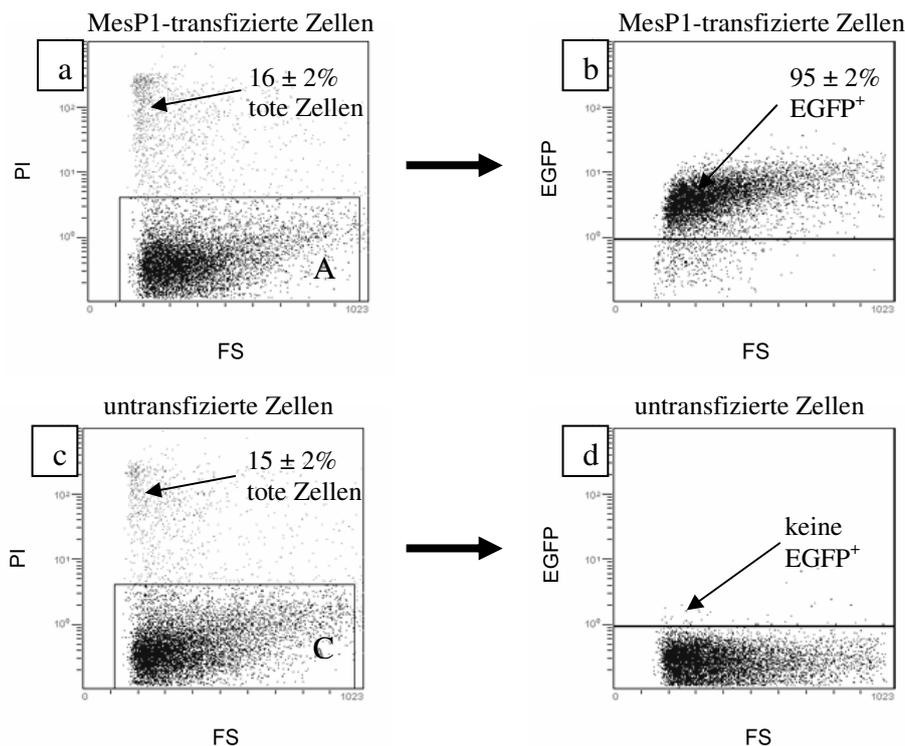
### 3.2.2 Anteil der stabil transfizierten Zellen im analytischen FACS

Nach der Elektroporation wurden die ES-Zellen aus der Küvette (s. 2.2.5.3) auf mehrere Zellkulturschalen mit Kultivierungsmedium (incl. des Differenzierungshemmers LIF; s. 2.2.5.1) ausgebracht. Dabei handelte es sich nicht ausschließlich um mittels Stromstoß transfizierte, und damit Neomycin-resistente und EGFP-positive (EGFP<sup>+</sup>, d. h. grün fluoreszierende), sondern vor allem auch um kontaminierende untransfizierte Zellen, welche in der folgenden Selektionsperiode mit dem Eukaryontenantibiotikum G418 (Aminoglykosid) in den Zelltod getrieben wurden, so dass sich nur einzelne stabil transfizierte, klonale Kolonien entwickeln konnten. Bei G418 handelt es sich um das Aminoglykosid Gentamycin. Die mit dem Neomycin-Resistenzgen (ebenfalls ein Aminoglykosid) transfizierten Zellen sind kreuzresistent. Nach Transfer dieser überlebenden, resistenten Einzelklone in die 24-Loch-

Platte (s. 2.2.5.4) erfolgte eine zweite Selektionsperiode zur vollständigen Abtötung verschleppter, nicht stabil transfizierter Zellen.

Während der Kultivierung im undifferenzierten Stadium zeigte sich, dass trotz lang andauernder Antibiotikaselektion ein bestimmter Anteil der transfizierten Zellen nach Abschluss der Selektions-Phase keine Grün-Fluoreszenz aufwies (s. Abb. 3-5).

Zur genauen Bestimmung dieses Anteils der stabil-transfizierten, grün-fluoreszierenden Zellen (s. 2.1.10.2) an der Gesamtpopulation wurden FACS-Analysen durchgeführt.



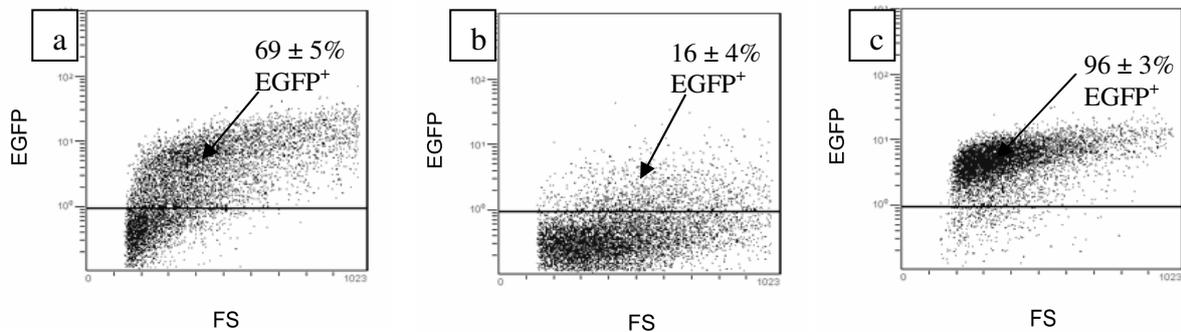
**Abb. 3-5 Detektion EGFP<sup>+</sup>-Zellen im FACS**

In der oberen Zeile sind phMesP1-IRES2-EGFP transfizierte Zellen dargestellt, die unter Zugabe von G418 kultiviert wurden. In Teilbild a der FACS-Analyse zeigt sich ein Anteil von 16% während des Vereinzelungsprozesses abgestorbener Zellen (Propidium-Jodid [PI] gefärbt) und in Teilbild b ein Anteil von 95% EGFP<sup>+</sup>-Zellen in der Fraktion lebender, transfizierter Zellen (Subanalyse von Gate A in Teilbild a).

In der unteren Zeile sind untransfizierte ES-Zellen als Kontrolle dargestellt. In Teilbild c der FACS-Analyse zeigt sich ein vergleichbarer durch den Vereinzelungsprozess verursachter Anfall von Zelldetritus (PI gefärbt) und erwartungsgemäß keine EGFP<sup>+</sup>-Zellen (Teilbild d) in der Fraktion lebender, untransfizierter Zellen (Subanalyse von Gate C in Teilbild c).

Außerdem ließ sich beobachten, dass der Anteil EGFP<sup>-</sup>-Zellen (EGFP<sup>-</sup>, d. h. nicht grün fluoreszierende Zellen) nicht konstant blieb, sondern innerhalb weniger Wochen bis Monate stark zunahm, so dass eine Kultivierung der einzelnen MesP1-Zellklone nur unter ständigem Selektionsdruck mittels G418-Antibiose durchgeführt werden konnte. Dadurch

konnte die spontane epigenetische Maskierung (Inaktivierung durch Methylierung) [176, 177] der transfizierten Viruspromotoren verhindert und der durchschnittliche Anteil an transfizierten, EGFP<sup>+</sup>-Zellen an der Gesamtpopulation konstant über 90% gehalten werden (s. Abb. 3-6).



**Abb. 3-6 Anteil EGFP positiver Zellen (EGFP<sup>+</sup>) im zeitlichen Verlauf ohne Selektionsdruck**

Die stabil transfizierten MesP1-Klone verlieren nach Abschluss der Selektionsphase während der Kultivierung ohne Zugabe des Antibiotikums G418 ihre EGFP-Fluoreszenz. Diese kann durch erneute G418-Selektion reaktiviert werden.

Teilbild a zeigt den Anteil EGFP<sup>+</sup>-Zellen nach drei Wochen Kultivierung ohne G418 (69%), Teilbild b nach sechs Monaten (16%). Teilbild c zeigt den Anteil EGFP<sup>+</sup>-Zellen nach erneuter einwöchiger Zugabe von G418 (96%) ins Nährmedium.

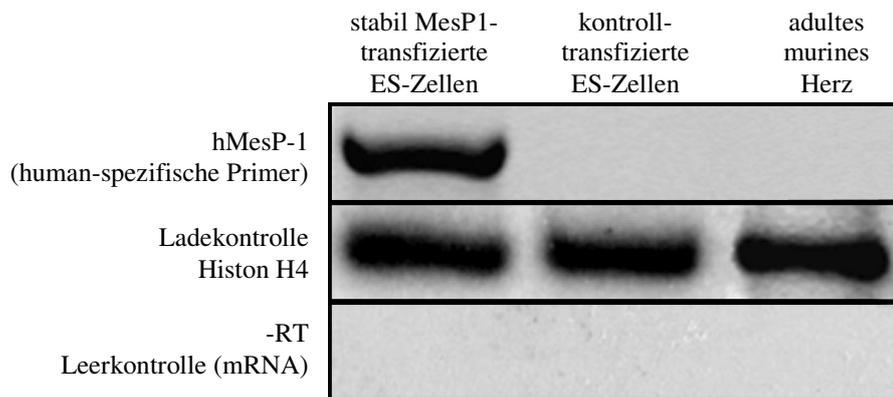
### 3.2.3 Nachweis der hMesP1-Expression

Im Folgenden sollte nun die tatsächliche Expression des eingebrachten humanen MesP1-Gens in den transfizierten murinen ES-Zellen auf verschiedenen Ebenen gezeigt werden. Im transfizierten Konstrukt stehen die kodierenden Sequenzen sowohl des Fluoreszenzproteins EGFP als auch des Transkriptionsfaktors MesP1 unter der Kontrolle des vorgeschalteten CMV-Promotors (s. 2.1.10.2). Aufgrund der im Vergleich zum EGFP-Gen näheren Lokalisation des MesP1-Gens zum Promotor (s. Abb. 3-2) ist eine Expression dieses Faktors bei vorhandener EGFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen, wie sie in den vorangegangenen Abschnitten mittels FACS gezeigt wurde, sehr wahrscheinlich, der sichere Nachweis wird in den folgenden Abschnitten erbracht.

#### 3.2.3.1 Nachweis auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR

Der Nachweis der hMesP1-Transkription erfolgte durch Analyse der Gesamt-mRNA der transfizierten Zellen (s. 2.2.2.5.1). Für die RT-PCR wurden Primer verwendet, die spezifisch

für die humane Variante des MesP1-Faktors waren. So konnte die Expression des in das zelluläre Genom eingebrachten humanen Transgens allein nachgewiesen werden, ohne dass das in den murinen ES-Zellen physiologischerweise gebildete mMesP1 einen Einfluss auf die Messung gehabt hätte. Als Kontrolle diente hier mRNA aus adultem murinem Herz und aus kontroll-transfizierten ES-Zellen, also ES-Zellen, die mit dem Kontrollvektor pEGFP-N1 (s. 2.1.10.3) ohne integrierte MesP1-cDNA transfiziert worden waren (s. Abb. 3-7).



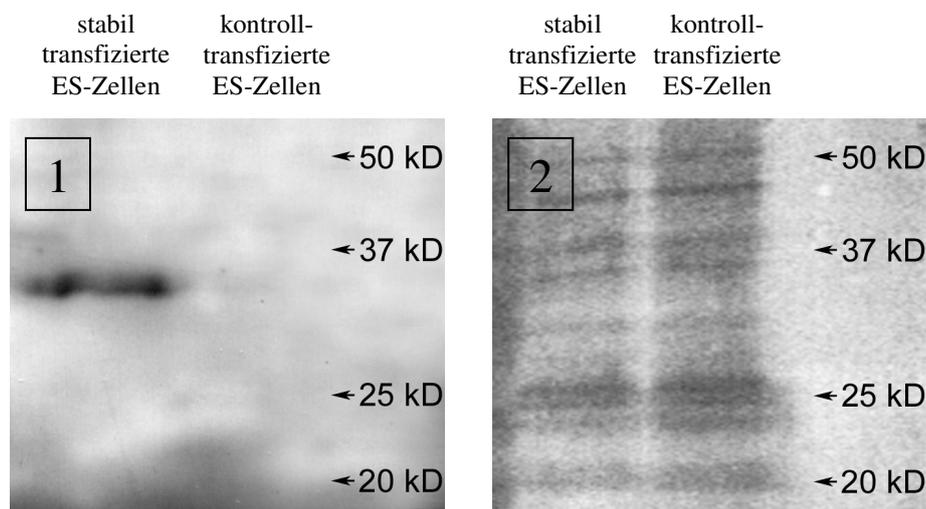
**Abb. 3-7 Spezifischer Nachweis der hMesP1-Expression auf mRNA-Ebene (RT-PCR) in mit dem Vektor phMesP1-IRES2-EGFP stabil transfizierten murinen ES-Zellen mittels RT-PCR**

Zu sehen ist das nachgewiesene Transkriptionsprodukt der in die transfizierten Zellen eingebrachten DNS (obere Zeile, linke Spalte), das in kontroll-transfizierten Zellen (oben, mitte) und in adultem murinem Herz (oben, rechts) erwartungsgemäß nicht zu finden ist. Die mittlere Zeile zeigt die Ladekontrolle, die eine gleiche Beladung aller Taschen mit Gesamt-cDNA anzeigt. Die untere Zeile zeigt die Leerkontrolle.

### 3.2.3.2 Nachweis auf Protein-Ebene im Western Blot

Für den Nachweis des translatierten humanen MesP1-Proteins in den mit phMesP1-IRES2-EGFP transfizierten Zellen wurde ein spezieller, in Vorarbeiten erstmals etablierter Antikörper verwendet.

Nach Gewinnung von Gesamt-Proteinextrakt (s. 2.2.4.2) aus den Zellen und anschließender Auftrennung in der SDS-PAGE (s. 2.2.4.3) und im Western Blot auf der Western-Blot-Membran (s. 2.2.4.4) erfolgte die Immunmarkierung mittels des oben genannten, spezifischen Anti-hMesP1-Antikörpers (s. 2.1.3), wobei hier als Negativkontrolle erneut kontrolltransfizierte embryonale Stammzellen (vgl. 3.2.3.1) dienten. Die Bandenlänge des kompletten hMesP1-Proteins betrug 28,5 kD.



### Abb. 3-8 Nachweis der hMesP1-Expression in phMesP1-IRES2-EGFP stabil transfizierten ES-Zellen

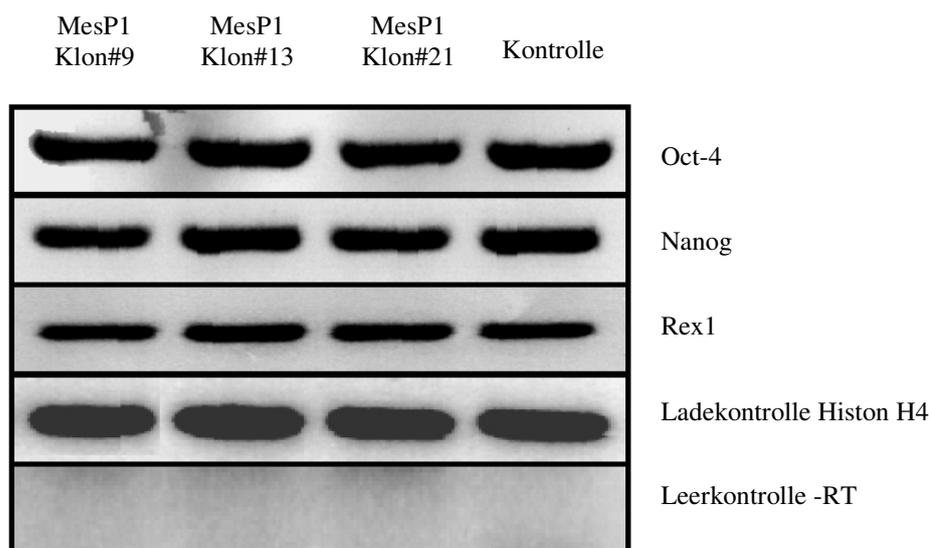
Bild 1: Spezifische Markierung des hMesP1-Proteins durch Anti-hMesP1-Antikörper im Lysat der MesP1-transfizierten Zellen (28,5 kD; linke Spur), dagegen keine Anfärbung in der mit Lysat der kontrolltransfizierten Zellen beladenen Spur (rechte Spur).

Bild 2: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung. Gleichmäßige Beladung beider Spuren mit äquivalenter Proteinmenge

Durch den Nachweis von MesP1-Protein in den transfizierten Zellen, wurde die Translation der vom Vektor transkribierten mRNA bestätigt, und damit die tatsächliche Expression des hMesP1-Transkriptionsfaktors auf Proteinebene als Grundlage dieser Arbeit nachgewiesen.

### 3.2.4 Nachweis unveränderter Stammzeleigenschaften

Im nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass durch die Überexpression von MesP1 in embryonalen Stammzellen deren Kerneigenschaft der Pluripotenz unverändert erhalten bleibt, solange die Zellen weiter in differenzierungshemmendem Kultivierungsmedium gehalten werden (vgl. 1.2.1). Dies bedeutet also, dass MesP1 alleine nicht in der Lage ist, in LIF-enthaltendem Medium eine keimblattspezifische Differenzierung von ES-Zellen zu indizieren. Als Nachweis dafür diente die im Vergleich zu den Kontrollzellen (vgl. 3.2.3.1) gleich bleibende Expression der Stammzellmarker Oct-4, Nanog und Rex-1 in der radioaktiven RT-PCR. Bei den in Abb. 3-9 beschriebenen Faktoren handelt es sich damit um Pluripotenzmarker, d. h. deren unveränderte Expression drückt das trotz genetischer Manipulation weiterhin erhaltene Potential der MesP1-transfizierten ES-Zellen aus, während der Differenzierung Gewebe aller drei Keimblätter inklusive der Keimbahn zu bilden [178, 179].



**Abb. 3-9 Relative Expression von Pluripotenzmarkern in der RT-PCR in MesP1-Überexprimierenden ES-Zellen (Klon #9, #13 und #21) im Vergleich zu kontrolltransfizierten ES-Zellen (Kontrolle)**

Die gleich bleibende Expression der Stammzellmarker Oct-4, Nanog und Rex-1 in embryonalen Stammzellen nach Transfektion mit dem MesP1-Plasmid zeigt deren im Vergleich zu den Kontrollzellen vollständig erhaltene Pluripotenz.

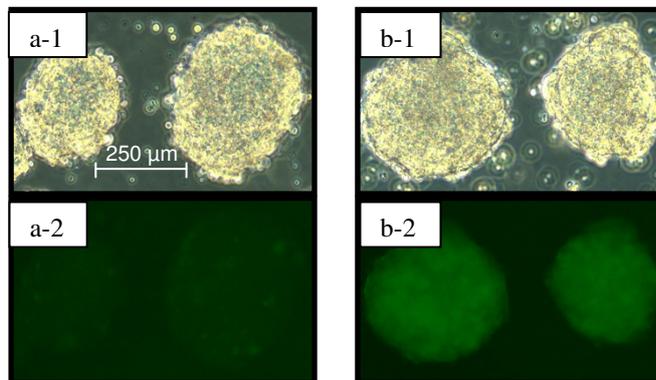
### 3. 3 EINFLUSS DER ÜBEREXPRESSION AUF DIE KARDIOVASKULÄRE ENTWICKLUNG

Mit der Überexpression des frühen mesodermalen Transkriptionsfaktors MesP1 wurde Einfluss auf die Entwicklung der Embryonalen Stammzellen genommen. Dabei wurden im Folgenden insbesondere drei unabhängige Klone (#9, #13 und #21) der mit dem Konstrukt phMesP1-IRES2EGFP (vgl. 3.1.2) stabil transfizierten Zellen („MesP1-Klone“) im Vergleich zu untransfizierten (native GSES) bzw. „kontrolltransfizierten“ (Transfektion mit „leerem“, d. h. keine MesP1-cDNA enthaltendem pEGFP-N1-Vektor, s. 2.1.10.3) embryonalen Stammzellen bezüglich einer veränderten kardiovaskulären Entwicklung während der Differenzierungsphase untersucht.

#### 3.3.1. Auftreten spontan kontrahierender Kardiomyozyten in vitro

Die transgenen Zellklone wurden wie die nicht-transfizierten Kontrollzellen nach Protokoll sechs Tage in Suspension differenziert. Dabei verhielten sie sich augenscheinlich zunächst

analog der Kontrolle bezüglich Form, Größe und Wachstumsgeschwindigkeit der Embryoid-Körperchen (s. Abb. 3-10 und 2.2.5.5).



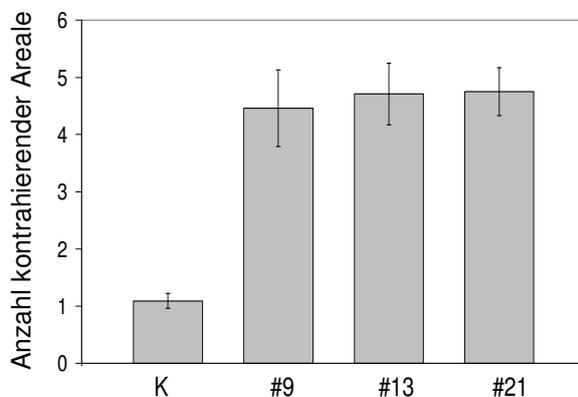
**Abb. 3-10**

**Embryoid-Körperchen (EBs) am Tag 2 der Differenzierung in Suspension**

Keine morphologischen Unterschiede zwischen untransfizierten (a-1) und MesP1-transfizierten (b-1) ES-Zellen im Durchlichtmikroskop.

Spezifische Grünfluoreszenz der transfizierten ES-Zellen nach Exzitation bei 488nm (b-2) im Vergleich zu nativen ES-Zellen (a-2)

Erst nach dem Ausplattieren der Zellen war bei Beobachtungen im Lichtmikroskop am zehnten Tag der Adhärenzphase (nach sechstägiger Suspensionsphase; d. h. Tag 6+10, der Differenzierung, Abb. 3-11) bei den MesP1-Klonen im Vergleich zu den nativen Zellen eine im Mittelwert fast fünfmal höhere Anzahl an spontan kontrahierenden Arealen in den Zellkulturschalen aufgefallen.

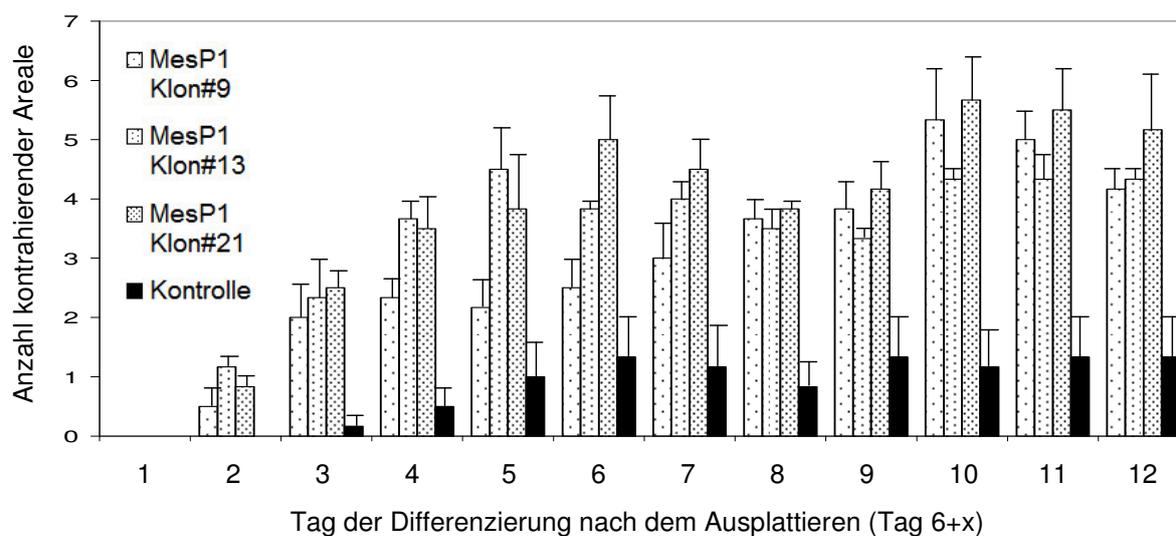


**Abb. 3-11**

**Anzahl spontan kontrahierender Areale in MesP1-transfizierten Zellklonen (#9, #13 und #21) im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen (K) pro 10 adhärenzte EBs.**

Gezählt wurden alle spontan kontrahierenden Areale 10 Tage nach dem Ausplattieren (d. h. Tag 6+10 der Differenzierung).

Bei Wiederholung der Untersuchungen ließen sich die Zählungen auch im zeitlichen Verlauf bestätigen. Dabei konnte nicht nur eine erhöhte Anzahl, sondern auch eine während der Entwicklung frühere Ausbildung (Tag 2 nach dem Ausplattieren) spontan kontrahierender Areale bei den MesP1-transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet werden. Als Kontrolle dienten hier ES-Zellen, die lediglich mit dem „leeren“ pEGFP-N1-Vektor (s. 2.1.10.3) transfiziert worden waren und damit zwar ebenfalls das Fluoreszenzprotein EGFP aber kein MesP1 exprimierten.

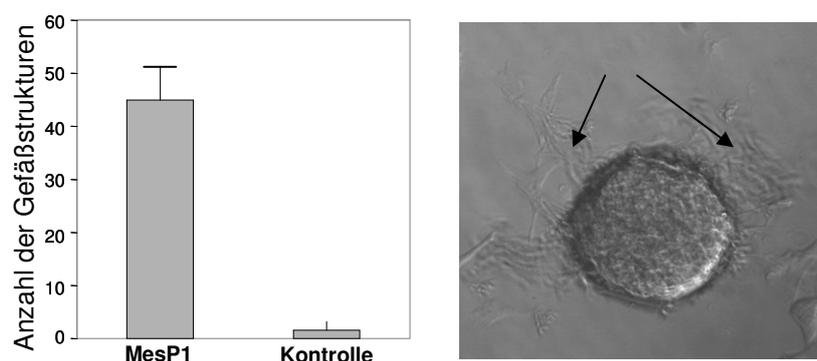


**Abb. 3-12 Anzahl spontan kontrahierender Areale pro 10 ausplattierte EBs in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium**

Gezeigt wird die Differenzierungsphase nach dem Ausplattieren der Zellen. Es wird deutlich, dass die MesP1-transfizierten Zellen sowohl früher (Tag 2 vs. Tag 3-4) als auch verstärkt (Faktor 2-5) spontan kontrahierende Areale ausbilden.

### 3.3.2 Auftreten von Gefäßstrukturen in vitro

Neben der Zunahme kontrahierender Areale in der späten Differenzierungsphase war in den MesP1-transfizierten Zellen unter Zellkulturbedingungen außerdem eine deutlich verstärkte Bildung gefäßähnlicher Strukturen zu beobachten, wie sie sonst in sog. „sprouting assays“ mittels Zugabe der Gefäßwachstumsfaktoren VEGF, FGF2 oder Erythropoietin induziert werden können. [180] Diese traten bereits relativ früh (Tag 3) während der Differenzierung auf, so dass die bestmögliche Darstellung der aus dem Embryoidkörperchen (EB) heraus migrierenden Endothelvorläuferzellen (s. Abb. 3-13 Pfeile) an den primär undifferenzierten Zellnestern durch direkten Entzug des Differenzierungshemmers LIF unter Umgehung der Suspensionsphase (vgl. 2.2.5.5) möglich wurde. In diesem Zustand sind die EBs nicht kugelig und weisen eine relativ große, sichtbare Oberfläche auf.



**Abb. 3-13** Anzahl spontan aussprossender Gefäßstrukturen pro Embryoid-Körperchen MesP1-transfizierter (MesP1) und kontrolltransfizierter Zellen (Kontrolle) während der frühen Entwicklungsphase (Tag 3 der Differenzierung)

Der tatsächliche Nachweis vaskulärer Oberflächenproteine auf den aussprossenden Gefäßstrukturen erfolgte in Folgeversuchen (s. 4.3.2).

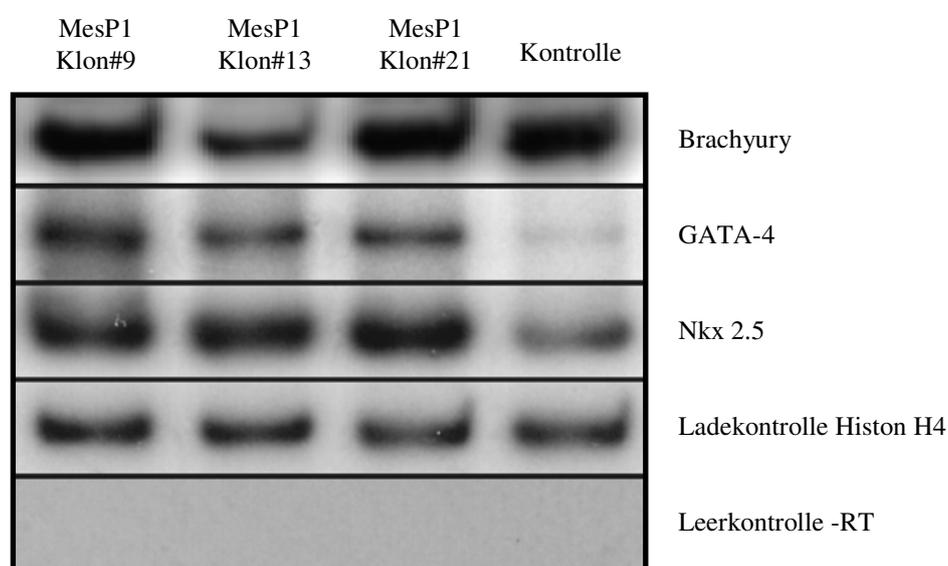
Das hier beobachtete Phänomen, ebenso wie die erhöhte Anzahl kontrahierender Areale, war offensichtlich auf eine veränderte ES-Zell-Entwicklung zurückzuführen und wurde nun in den im Folgenden beschriebenen Versuchen auf verschiedenen Ebenen verifiziert. Neben dem spezifischen Nachweis bestimmter Zelltypen (Muskulatur, Gefäße) im FACS (s. 3.2.2.3) erfolgte die Expressionsanalyse verschiedener Markergene aus allen drei Keimblättern in unterschiedlichen Differenzierungsstadien mittels radioaktiver RT-PCR. Dadurch konnte die Entwicklung der genetisch veränderten Zellen auf molekularer Ebene nachvollzogen werden.

### 3.3.3 Genexpressionsanalyse der Zellklone auf mRNA-Ebene

MesP1 ist ein in der embryonalen Entwicklungsphase des Herzkreislaufsystems physiologischerweise sehr früh exprimierter Marker (s. 1.3). [145] Die durch die konstitutive Überexpression dieses Transkriptionsfaktors verursachten Effekte sind, zumindest auf molekularer Ebene, deshalb bereits in der frühen Differenzierung zu erwarten. Dies ist der Grund dafür, dass die im Folgenden beschriebenen Genexpressionsanalysen mittels semiquantitativer radioaktiver RT-PCR (s. 2.2.2.5.2 und 3) mit Zellmaterial durchgeführt wurden, das vom Tag 3 bzw. 6 der Differenzierung (Suspensionsphase) stammt (vgl. 2.2.3.1 und 2).

### 3.3.3.1 Tag 3 der Differenzierungsphase

Die am Tag 3 der Differenzierung durchgeführten Analysen dienten zum einen dem Nachweis einer verstärkten Herzentwicklung, was anhand der im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöhten Expression der frühen kardialen Marker Nkx2.5 und GATA-4 [181] gezeigt werden konnte. Dabei fiel auf, dass die Menge an Gesamtmesoderm, dem die kardialen und vaskulären Vorläuferzellen zugehörig sind (s. Abb. 1-1), und das hier durch den mesodermalen Marker Brachyury [182] repräsentiert wird, nicht verstärkt exprimiert wurde (Abb. 3-14). Für die Durchführung der Analyse wurden jeweils Marker-spezifische Primer verwendet (s. 2.1.11).

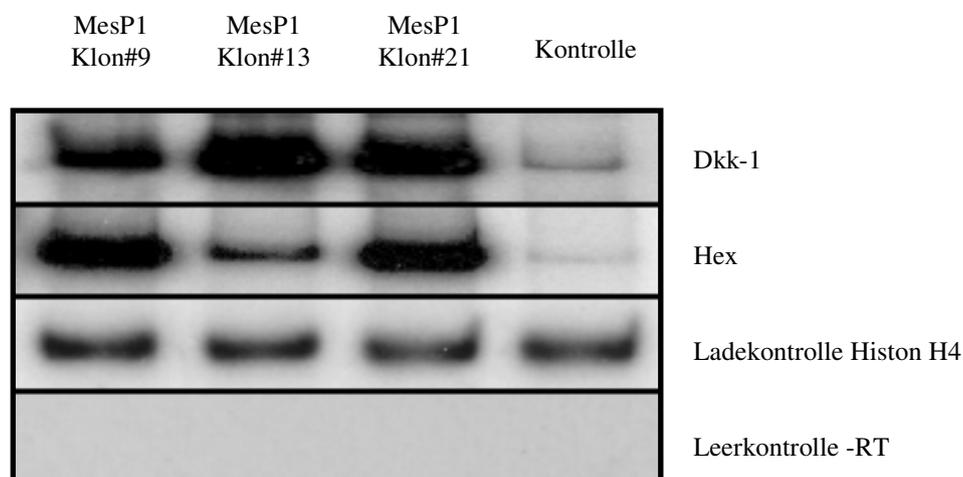


**Abb. 3-14 Radioaktive RT-PCR mit cDNA aus ES-Zell-Klonen (kontrolltransfizierte Zellen (Kontrolle) und MesP1-Klone #9, #13 und #21) am Tag 3 der Differenzierung**

Es zeigt sich eine deutlich verstärkte Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren GATA4 und Nkx2.5 in den MesP1 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Eine erhöhte Expression des frühen gesamtmesodermalen Markers Brachyury ließ sich jedoch nicht beobachten.

Zum anderen dienten diese frühen Versuche bereits der Aufklärung eines möglichen Signalweges, über den MesP1 die Kardiovaskulogenese in ES-Zellen induzieren könnte. Wie unter 1.3 beschrieben ist die Blockade des Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweges Voraussetzung für die Herzentwicklung in Vertebraten, weshalb zunächst einer der bekanntesten Wnt-Inhibitoren, Dkk-1 (vgl. 1.3.2.1), auf seine Expressionsstärke hin untersucht wurde. Dabei fand sich ein mehrfacher Anstieg im Vergleich zu den Kontrollzellen (vgl. 3.2.3.1).

Ebenso fand sich eine verstärkte Expression von Hex mRNA in den MesP1 exprimierenden Zellen. Es ist bekannt, dass Hex (s. 1.3.2.1) durch Blockade des Wnt-Signalweges induziert wird und schließlich selbst die Bildung von kardiogenen Faktoren induziert und damit einen fördernden Einfluss auf die Herzentwicklung hat [119] (s. Abb. 3-15).



**Abb. 3-15 Radioaktive RT-PCR mit cDNA aus ES-Zell-Klonen (kontrolltransfizierte Zellen (Kontrolle) und MesP1-Klone #9, #13 und #21) am Tag 3 der Differenzierung**

Es zeigt sich eine deutlich verstärkte Expression des Inhibitors des Wnt-Signalweges, Dkk-1, in den MesP1-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, ebenso des homeodomain Transkriptionsfaktors Hex.

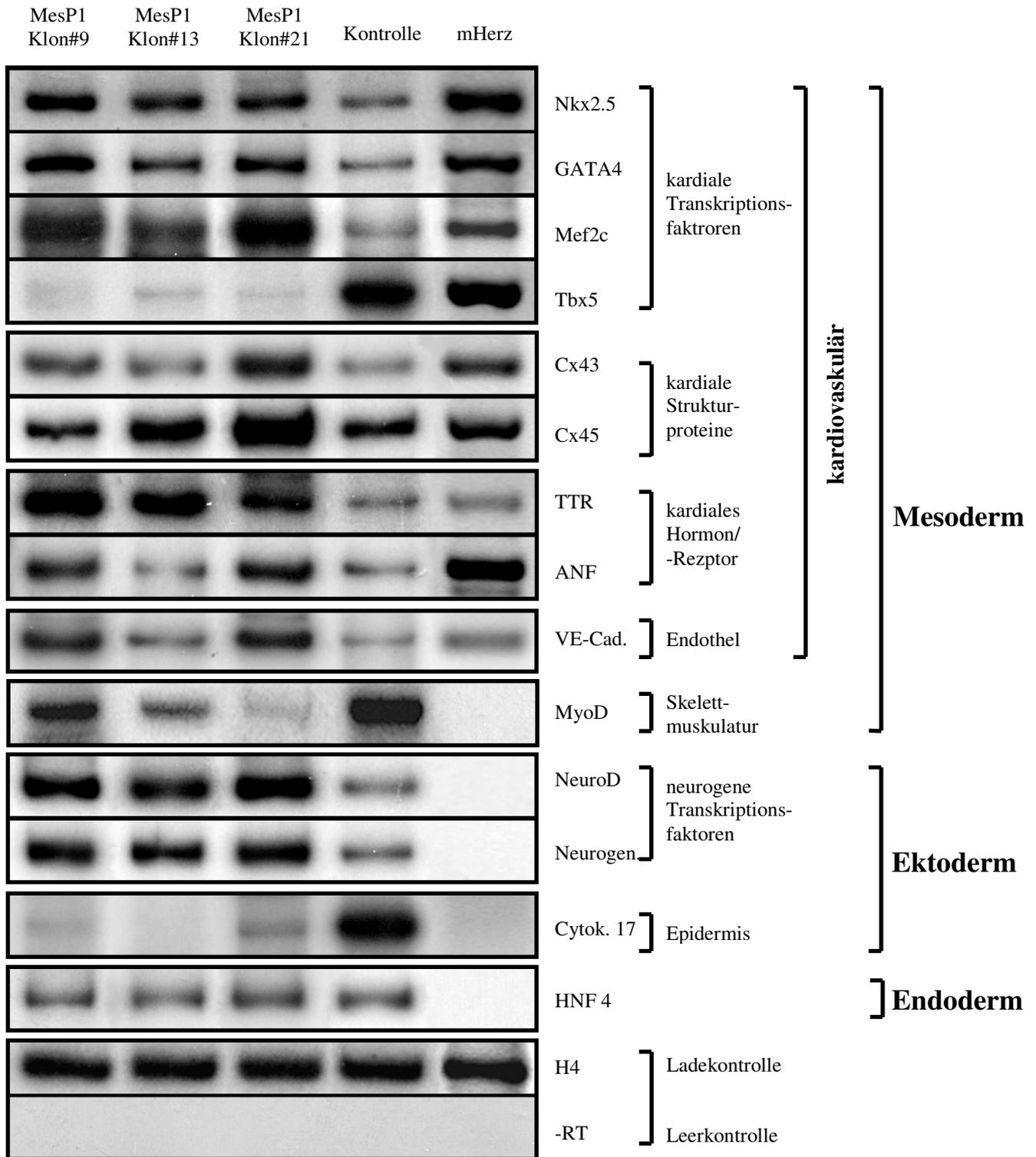
### 3.3.3.2 Tag 6 der Differenzierungsphase

Als nächstes wurde untersucht, ob sich die gerade beschriebene Erhöhung von kardialen Transkriptionsfaktoren (s. 3.3.3.1) auch zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung in einer verstärkten Expression verschiedener kardialer Komponenten widerspiegeln würde. Deshalb wurde am Tag 6 der Differenzierung, also unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen, eine ausführlichere Analyse durchgeführt. Neben den im Schnitt mehrfach erhöhten Transkriptionsspiegeln der Herzmuskelbausteine Connexin 43 (Cx43), Connexin 45 (Cx40), wurden auch das kardiale Hormon ANF (atrialer natriuretischer Faktor) und der Transthyretin-Rezeptor (TTR) verstärkt exprimiert (s. Abb. 3-16). In diesem Differenzierungsstadium war außerdem die Expressionsstärke des kardialen Transkriptionsfaktors Mef2c erhöht, ebenso wie die der bereits am Tag 3 der Differenzierung untersuchten Faktoren Nkx2.5 und GATA4. Dabei war besonders bemerkenswert, dass der T-box-Transkriptionsfaktor Tbx5 in den transfizierten MesP1-Klonen deutlich herunterreguliert war. Tbx5 ist bekannt als Induktor für die Ausreifung juveniler

Kardiomyozyten [183] und ist negativ korreliert mit der kardialen Zellproliferation [184]. Zusätzlich untersucht wurde der Endothelzellmarker VE-Cadherin, der ebenfalls eine mehrfach erhöhte Expression in den MesP1-transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle aufwies, was mit dem oben beschriebenen vermehrten Aussprossen von Gefäßstrukturen aus den transgenen EBs korrelierte (s. 3.3.2). Die parallel dazu beobachtete Herunterregulation des Skelettmuskelmarkers MyoD zeigte dabei eine Verschiebung der mesodermalen Entwicklung in Richtung Seitenplattenmesoderm (u. a. Herz- und Gefäßzellen) zulasten anderer mesodermaler Linien [185].

Außerdem wurden in dieser Analyse auch die Abkömmlinge der nicht-mesodermalen Keimblätter untersucht. Insbesondere zeigte sich hier eine verstärkte neurale Entwicklung in Form einer erhöhten Expression der Marker NeuroD und Neurogenin [186], bedingt durch die vermehrt vorhandenen kardialen Vorläuferzellen. Von kardiogenen Zellen nämlich ist bekannt, dass sie während der Embryonalentwicklung neurale Strukturen induzieren können [187]. Entsprechend dazu konnte eine relativ verminderte Bildung anderer, nicht-neuraler, ektodermaler Strukturen beobachtet werden, was anhand einer verminderten Expression des epidermalen Markers Cytokeratin17 beispielhaft gezeigt werden konnte (s. Abb. 3-16). Die Entwicklung des Endoderms, vertreten durch den Marker HNF4, war unverändert.

Als Kontrolle dienten jeweils die mit dem pEGFP-N1-Vektor kontrolltransfizierten ES-Zellen (vgl. 2.1.10.3).



**Abb. 3-16 RT-PCR-Analyse von Markern der verschiedenen Keimblätter am Tag 6 der Differenzierung.** MesP1-Klone (#9, #13 und #21) im Vergleich zu Kontrollzellen (Kontrolle) und Zellen aus adultem murinen Herz (mHerz).

### 3.3.4 Genexpressionsanalyse der Zellklone auf Protein-Ebene

Nachdem nun die veränderte Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Strukturproteine als Ausdruck einer verstärkten kardiovaskulären Entwicklung auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde, sollte mit den folgenden Versuchen insbesondere gezeigt werden, dass sich diese früh veränderte Markerexpression auch zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung auf zellulärer Ebene widerspiegelte. Die nach spezifischer Antikörperfärbung mittels FACS durchgeführten Untersuchungen sollten dabei die durch das MesP1-Überexpressionskonstrukt bedingte tatsächliche Zunahme an Gefäß-, Gefäßvorläufer- und Herzmuskelzellen in der Zellkultur zeigen.

#### 3.3.4.1 CD31 als vaskulärer Marker und CD45 als leukozytärer Marker

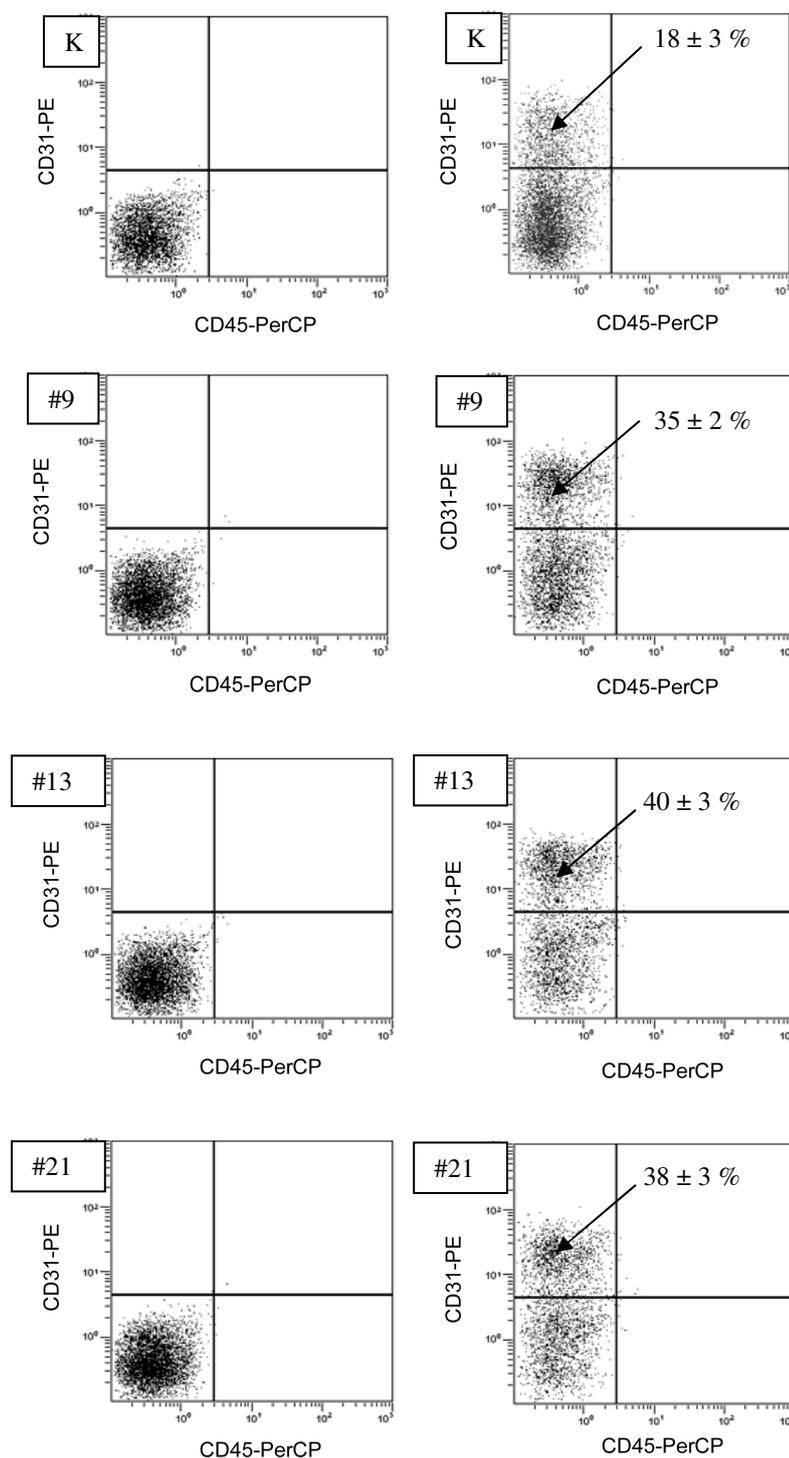
Als Marker für den Nachweis von Endothelzellen wurde das Oberflächenmolekül CD31 (PECAM-1) gewählt. Dabei war von Vorteil, dass CD31 nicht nur auf adulten, sondern ebenfalls auf embryonalen Endothelzellen bereits stark exprimiert ist, so dass eine hochspezifische Färbung mittels Anti-CD31-Antikörper durchgeführt werden konnte (s. 2.1.3).

Nachdem CD31, wenn auch in niedriger Expressionsstärke, ebenfalls auf der Oberfläche peripherer Leukozyten lokalisiert ist, wurden die im Folgenden beschriebenen Analysen zu einem Zeitpunkt (Tag 6 der Differenzierung) durchgeführt (s. 2.2.6.2), an dem noch nicht mit der Bildung von hämatopoetischen Zellen gerechnet werden musste, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch unerwünschte Anfärbung von weißen Blutkörperchen zu verhindern. Zudem wurden die untersuchten Zellen parallel mit einem gegen das Leukozyten-Oberflächenantigen CD45 (s. 2.1.3) gerichteten Antikörper gefärbt. Dabei konnte zu diesem frühen Zeitpunkt der Differenzierung ausgeschlossen werden, dass sich die Messung verfälschende Leukozyten in der untersuchten Zellpopulation befanden.

Als Kontrolle dienten hier wiederum die mit dem pEGFP-N1-Kontrollplasmid (ohne MesP1) transfizierte ES-Zellen (s. 2.1.10.2).

Bei den mehrmals mit allen drei MesP1-Zellklonen (#9, #13 und #21) durchgeführten Messungen zeigte sich dabei im Vergleich zu den kontrolltransfizierten ES-Zell-Klonen durchschnittlich eine Verdopplung der Zellzahl CD31 positiver Zellen ( $CD31^+$ ) innerhalb der verglichenen EGFP positiven Zellpopulationen ( $EGFP^+$ ). Erwartungsgemäß ließen sich keine CD45 positiven Zellen ( $CD45^+$ ) nachweisen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass

es sich bei der im FACS gezeigten  $CD31^+$ -Population praktisch rein um endotheliale Vorläuferzellen handelte (s. Abb. 3-17).



**Abb. 3-17 Anteil der  $CD31^+EGFP^+CD45^-$ -Zellen an der Gesamtpopulation am Tag 6 der Differenzierung, Kontrollzellen (K) im Vergleich zu den MesP1-Klonen (#9, #13 und #21)**

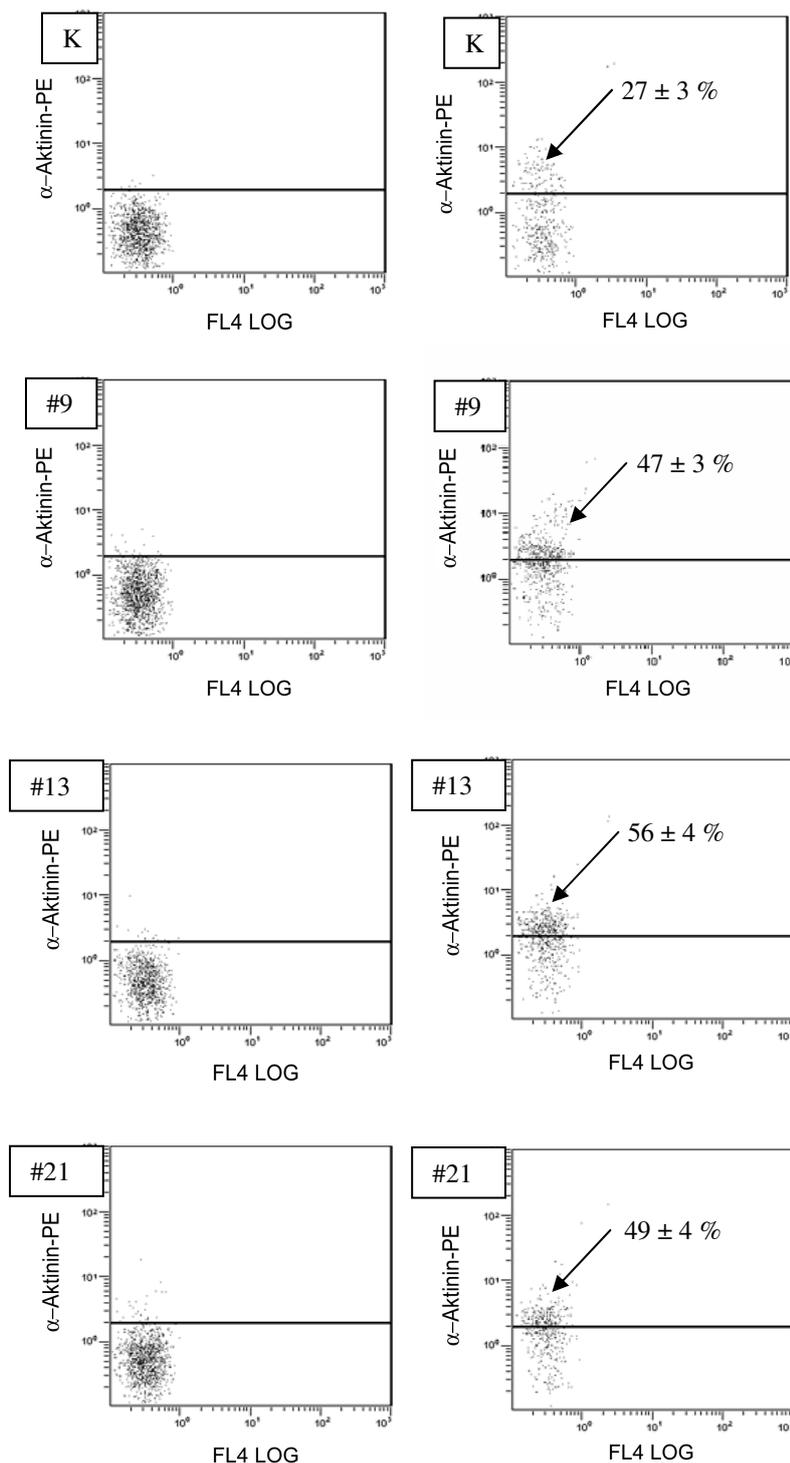
Die linke Spalte zeigt die Isotypkontrollen der verwendeten Antikörper. Die rechte Spalte zeigt jeweils den Anteil  $CD31$  positiver und  $CD45$  negativer Zellen aus der Fraktion der  $EGFP$ -positiven Zellen in der Gesamtpopulation (mit Prozentangaben). In den  $MesP1^+$ -Zellen zeigt sich eine durchschnittliche Verdoppelung der Zahl  $CD31^+$ -Zellen.

### 3.3.4.2 $\alpha$ -Aktinin als muskulärer Marker

Zum Nachweis von frühen Herzmuskelzellen im FACS wurde die intrazelluläre Anfärbung des Muskelproteins  $\alpha$ -Aktinin durchgeführt. Dabei wurden die Zellen 10 Tage nach dem Ausplattieren vereinzelt, Formalin-fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. (s. 2.2.6.1) Die  $\alpha$ -Aktinin-Färbung ist bereits lange Zeit etabliert, wenn auch nicht spezifisch für kardiale Myofibrillen. Ein zusätzlicher, spezifischer Nachweis von Herzmuskelzellen in der Gesamtzellpopulation wurde anschließend in einem Folgeversuch durchgeführt (s. 4.3.4.2).

Im Folgenden sind den drei bereits erwähnten MesP1-Klonen erneut kontrolltransfizierte Zellen gegenübergestellt worden. (vgl. 3.3.4.1) Abbildung 3-18 zeigt dabei den im Vergleich zu den Kontrollzellen durchschnittlich knapp verdoppelten Anteil an  $\alpha$ -Aktinin positiven Myozyten ( $\alpha$ -Aktinin<sup>+</sup>) im FACS der MesP1-Klone.

Bemerkenswert bei der Durchführung der FACS-Analyse ist außerdem, dass nach der Fixierung der Zellen für die Antikörper-Färbung keine Grün-Fluoreszenz mehr nachweisbar war.



**Abb. 3-18 Anteil  $\alpha$ -Aktinin positiver Zellen an der Gesamtpopulation am Tag 6+10 der Differenzierung, kontrolltransfizierte Zellen (K) im Vergleich zu den MesP1-Klonen (#9, #13 und #21)**

Die linke Spalte zeigt die Isotypkontrollen des verwendeten Antikörpers. Die rechte Spalte zeigt jeweils den Anteil  $\alpha$ -Aktinin positiver Zellen an der Gesamtpopulation (mit Prozentangaben). Die  $\alpha$ -Aktinin-Aktivität ist jeweils gegen die indifferente FL4-Achse aufgetragen. In den MesP1<sup>+</sup>-Zellen zeigt sich eine durchschnittlich knappe Verdoppelung der Zahl  $\alpha$ -Aktinin<sup>+</sup>-Zellen.

### 3. 4 PHARMAKOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER TRANSGENEN ZELLEN

Die pharmakologische Stimulation der spontan kontrahierenden Areale in vitro am zehnten Tag der Differenzierung nach dem Ausplattieren diente der Untersuchung der Reaktionen der transgenen Zellverbände auf sympathische und parasymphatische Reize und damit der Beurteilung des Reaktionsvermögens der Zellen auf die physiologischen vegetativen Regulationsmechanismen im Vergleich zu genetisch unveränderten Zellverbänden.

#### 3.4.1 Stimulation mit Isoproterenol

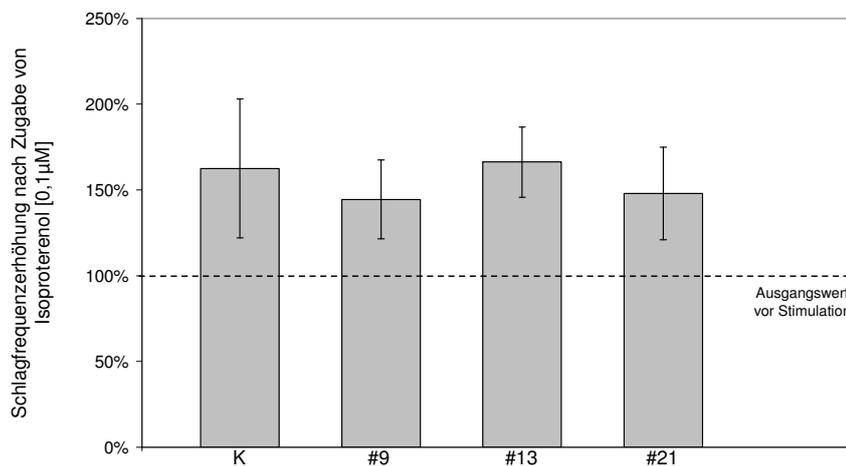
Nach Zugabe von 0,1µM des direkten Sympathomimetikums Isoproterenol (Isoprenalin; s. 2.2.5.6) in die Zellkulturschale erfolgte innerhalb weniger Sekunden eine Zunahme der Schlagfrequenz aller untersuchten spontan kontrahierenden Areale auf einen stabilen, über Minuten konstanten Wert. Dabei wurde bei verschiedenen Grundfrequenzen stimuliert und eine Steigerung des Gesamtdurchschnittswertes auf 156% der Ausgangsfrequenz erreicht (s. Abb. 3-19). Hinsichtlich der Stimulierbarkeit ergaben sich augenscheinlich keine Unterschiede zwischen transfizierten und genetisch unveränderten Zellen.

<b>native GSES</b>	vorher	mit Isoprenalin	Steigerung auf
Areal 1	48	90	188%
Areal 2	38	78	205%
Areal 3	90	123	137%
Areal 4	125	150	120%
			<b>Durchschnitt 163%</b>

<b>MesP1 Klon #9</b>	vorher	mit Isoprenalin	Steigerung auf
Areal 1	252	288	114%
Areal 2	48	70	146%
Areal 3	183	270	148%
Areal 4	162	276	170%
			<b>Durchschnitt 145%</b>

<b>MesP1 Klon #13</b>	vorher	mit Isoprenalin	Steigerung auf
Areal 1	87	159	183%
Areal 2	165	264	160%
Areal 3	102	186	182%
Areal 4	45	63	140%
			<b>Durchschnitt 166%</b>

<b>MesP1 Klon #21</b>	vorher	mit Isoprenalin	Steigerung auf
Areal 1	38	69	182%
Areal 2	48	57	119%
Areal 3	56	76	136%
Areal 4	60	93	155%
			<b>Durchschnitt 148%</b>



**Abb. 3-19 Durchschnittliche Schlagfrequenzen (s. Tabelle) von nativen ES-Zellen (K) und MesP1-transfizierten Zellklonen (#9, #13 und #21) nach sympathomimetischer Stimulation**

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Erhöhung der Schlagfrequenz kontrahierender Areale nach Isoprenalin-Stimulation [0,1 µM].

### 3.4.2 Stimulation mit Carbamylcholin

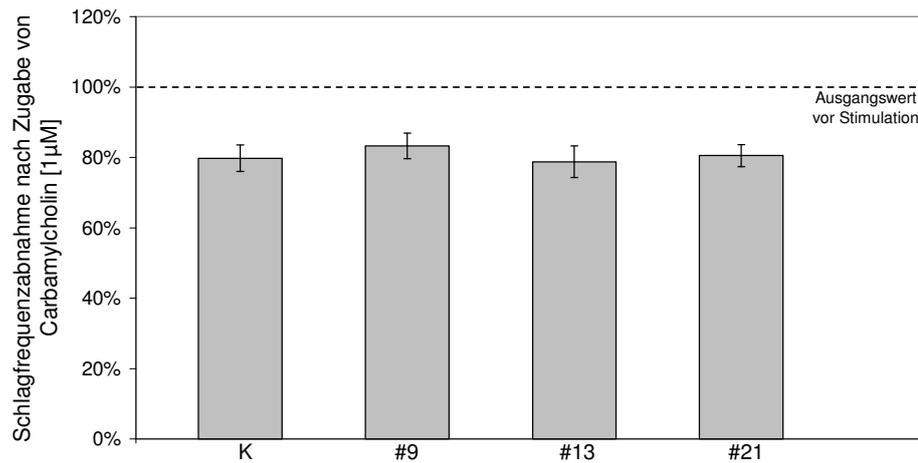
Die pharmakologische Stimulation mit dem direkten Parasympathomimetikum Carbamylcholin (1µM; Carbachol; s. 2.2.5.6) erfolgte analog den Ausführungen unter 3.4.1. Das Resultat hierbei war bei allen untersuchten Zellen eine Verlangsamung der Schlagfrequenz der kontrahierenden Areale auf durchschnittlich 81% der Ausgangsfrequenz. Hinsichtlich der Stimulierbarkeit ergaben sich auch hier offensichtlich keine Unterschiede zwischen nicht transfizierten Zellen und den MesP1-Klonen.

native GSES	vorher	mit Carbachol	Verlangsamung auf
Areal 1	38	30	79%
Areal 2	102	78	76%
Areal 3	165	141	85%
Areal 4	87	69	79%
			<b>Durchschnitt 80%</b>

MesP1 Klon #9	vorher	mit Carbachol	Verlangsamung auf
Areal 1	186	150	81%
Areal 2	240	192	80%
Areal 3	34	30	88%
Areal 4	75	63	84%
			<b>Durchschnitt 83%</b>

MesP1 Klon #13	vorher	mit Carbachol	Verlangsamung auf
Areal 1	132	99	75%
Areal 2	48	39	81%
Areal 3	93	78	84%
Areal 4	60	45	75%
			<b>Durchschnitt 79%</b>

MesP1 Klon #21	vorher	mit Carbachol	Verlangsamung auf
Areal 1	38	32	84%
Areal 2	56	46	82%
Areal 3	48	38	89%
Areal 4	78	60	77%
			<b>Durchschnitt 81%</b>



**Abb. 3-20 Durchschnittliche Schlagfrequenzen (s. Tabelle) von nativen ES-Zellen (K) und MesP1-transfizierten Zellklonen (#9, #13 und #21) nach parasymphomimetischer Stimulation**

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Abnahme der Schlagfrequenz kontrahierender Areale nach Carbachol-Stimulation [1 µM].

## IV. DISKUSSION

### 4.1 GEWINNUNG VON KARDIOMYOZYTEN

#### - LIMITATIONEN BISHERIGER ARBEITEN

Embryonale Stammzellen sind in der Lage, sich zu voll funktionsfähigen, kontraktilen Kardiomyozyten zu entwickeln [28, 29, 34, 67, 68, 188-190]. Deshalb verspricht man sich von ihnen in Zukunft große therapeutische Möglichkeiten bei der Behandlung der ischämischen und anderer Herzkrankheiten. Theoretisch denkbar wäre dabei ein einfacher Ersatz defekter Areale im Myokard durch in der Kulturschale gezüchtete Herzmuskelzellen [191]. Die dahingehend anfangs durchgeführten Versuche, in denen undifferenzierte, pluripotente ES-Zellen in Gewebe von Versuchstieren transplantiert wurden unter der Annahme, dass diese Zellen sich spontan in einen dem Empfängergewebe entsprechenden Zelltyp entwickeln würden, verliefen jedoch enttäuschend, da die implantierten Zellen in der Regel kein funktionelles Gewebe, sondern Teratome bildeten [192-195]. Dagegen zeigten Transplantationen von differenzierten ES-Zellen mit enthaltenen kontraktilen Kardiomyozyten bereits deutlich positivere Ergebnisse mit teilweise funktioneller Integration in das Empfängermyokard und einer Verbesserung der Pumpfunktion [19, 20, 22, 72, 196-199].

Parallel dazu wurden in der Vergangenheit auch Transplantationsversuche mit Kardiomyozyten durchgeführt, die nicht aus Stammzellen, sondern aus tierischen Herzen gewonnen worden waren. Hierbei zeigten sich adulte Herzmuskelzellen erstaunlicherweise nicht mehr in der Lage, in das Empfängermyokard zu integrieren und die Pumpfunktion zu verbessern [92, 200]. Vielmehr scheint diese Eigenschaft nur den noch nicht ausdifferenzierten, fetalen Kardiomyozyten vorbehalten zu sein [201, 202], die nicht nur im Laufe der Embryonalentwicklung, sondern auch während der Differenzierung von ES-Zellen entstehen [28, 30, 32, 67-70].

Entscheidend dabei ist, dass eine Gewinnung von Kardiomyozyten aus menschlichen Embryonen aus ethischen Gründen nicht durchführbar ist (s. 1.2.1.2), weshalb zum gegenwärtigen Zeitpunkt lediglich die pluripotenten ES-Zellen als Quelle für Zellersatzgewebe zur Verfügung stehen (vgl. 1.2.1.1). Ziel der embryonalen Stammzellforschung sollte deshalb sein, die ideale(n) kardiale(n) Progenitorzelle(n) zu identifizieren, um sie für die Zelltherapie in hoher Zellzahl und in Reinkultur gewinnen zu können. Als „ideal“ wäre eine Herzmuskelvorläuferzelle dann zu bezeichnen, wenn sie voll

funktionell und damit kontraktile wäre, sich in das Empfängergewebe integrieren und sich mit vorhandenen Kardiomyozyten elektrochemisch koppeln könnte und dabei gleichzeitig vom Immunsystem des Empfängerorganismus toleriert werden würde [92].

In der Vergangenheit wurden deshalb bereits verschiedene Wege beschritten, um kardiale Vorläuferzellen aufzureinigen, z. B. mittels Promotorgesteuerter Expression von Selektionsgenen (EGFP,  $\Delta$ CD4, G418-Resistenzgen, s. 1.2.2.1.2) [86-90] und durch Selektion nach spezifischen Oberflächenrezeptoren (CD31, VE-Cadherin, Flk1, CXCR4, c-kit, Pleiotrophin und Podocalyxin) [203-209]. Die gewonnenen Zellen enthielten zwar meist zu einem hohen Prozentsatz kontraktile Kardiomyozyten, jedoch handelte es sich auch bei diesen Populationen um keine Reinkulturen, vielmehr bestanden die selektierten Zellen aus einer Mischung unterschiedlicher Zelltypen, zumindest aus Herz- und Gefäßzellen verschiedener Entwicklungsstadien und Linienzugehörigkeit. Um jedoch den „idealen“ Zelltyp isolieren und für einen therapeutischen Einsatz im Menschen genau charakterisieren zu können, wird auch in Zukunft nicht die Aufreinigung mithilfe einiger weniger, willkürlich gewählter Marker ausreichend sein. Vielmehr wird es vonnöten sein, die Herz-Kreislauf-Entwicklung in embryonalen Stammzellen auch auf molekularer Ebene bis ins Detail verstanden zu haben. Denn erst die Kenntnis der verschiedenen an der Kardiovaskulogenese beteiligten Faktoren und das Wissen über ihr zeitliches und räumliches Expressionsmuster könnte eine Gewinnung standardisierter Ersatzzellen für die klinische Applikation ermöglichen. So erhofft man sich, in Zukunft einmal in der Lage zu sein, bei genauer Kenntnis der Signalvermittlung, durch externe Stimulation und ohne genetische Manipulation in der ES-Zell-Kultur gezielt die Entwicklung von spezifischen Herzmuskelzellen induzieren, sie vermehren und isolieren zu können [92].

Die Entschlüsselung der molekularen Herzentwicklung gleicht jedoch einem Mosaik, in dem jeder beteiligte Faktor einzeln erforscht und seine Einordnung in das komplexe Signaltransduktionsnetzwerk sorgfältig durchgeführt werden muss (vgl. 1.3) [91, 95-98, 101, 110, 114, 119, 127, 181, 183, 184, 203, 210, 211].

Eine wichtige Komponente dieses Mosaiks stellt hier der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Faktor *mesoderm posterior 1* (MesP1) dar, der während der Embryonalentwicklung nicht nur notwendig, sondern unter bestimmten Voraussetzungen auch hinreichend zu sein scheint, die Herz-Kreislauf-Entwicklung in Vertebraten zu induzieren (s. 3.3) [6, 137, 140-143, 145, 146, 212-214]. Die Analyse der MesP1-vermittelten Effekte und seiner Interaktionspartner während der Kardiogenese ist deshalb ein wichtiger Schritt für die Entschlüsselung der molekularen Herzentwicklung.

## 4. 2 FUNKTION VON MESP1 WÄHREND DER KARDIOVASKULOGENESE

Um die Funktion von MesP1 während der Kardiovaskulogenese zu untersuchen, wurde der Transkriptionsfaktor in murinen embryonalen Stammzellen überexprimiert und die daraus folgenden Effekte während der ES-Zell-Differenzierung analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde trotz Verwendung muriner Zellen das humane MesP1-Gen transfiziert, um bei erfolgreichem Versuchsverlauf in Folgeversuchen eine praktischere Übertragung auf das humane ES-Zell-System zu gewährleisten. Bei der hohen Konservierung des entscheidenden bHLH-Motivs (s. 1.4) [137-139] war in diesem xenogenen System eine Funktionalität sehr wahrscheinlich und konnte im Versuchsverlauf auch bestätigt werden (vgl. 3.3).

### 4. 2. 1 Verstärkte Kardiovaskulogenese in vitro

Bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Differenzierung zeigte sich in den MesP1-Klonen im Vergleich zu Kontrollzellen eine deutlich erhöhte Anzahl spontan aussprossender Endothelzellen und eine verstärkte Expression früher kardialer Transkriptionsfaktoren (GATA-4 und Nkx2.5, s. Abb. 3-14), die sich später im zeitlichen Verlauf in einer erhöhten Anzahl an Kardiomyozyten sowie CD31<sup>+</sup>-Endothelzellen (FACS) und folglich auch einer verstärkten Bildung kardiovaskulärer Strukturproteine (RT-PCR) in der Zellkultur widerspiegelte. Diese Daten zeigen, dass MesP1 nicht nur, wie Kitajima et al. es im Jahr 2000 beschrieben, einen essentiellen Faktor für die Herzentwicklung darstellt [6], sondern vielmehr auch das Potential besitzt, unter bestimmten Bedingungen in Säugetieren die Bildung von Herz- und Gefäßgewebe selbst zu induzieren (vgl. 3.3.3.1 und 4.2.3) [215]. Dabei überstieg die MesP1-vermittelte, verstärkte Ausbildung von Kardiomyozyten die Ausbeute der in der Vergangenheit durchgeführten Experimente zur Vermehrung von Herzmuskelzellen in der ES-Zell-Kultur (z. B. durch Behandlung mit Retinsäure, Ascorbinsäure oder Stickoxid) deutlich [94, 95, 100]. Die parallele Vermehrung von Herz- und Gefäßzellen ist dabei auf gemeinsame embryonale Vorläuferzellen im Seitenplattenmesoderm zurückzuführen. Aufgrund der zeitlich sehr frühen Wirkung des Faktors MesP1 innerhalb dieser Keimblattstruktur (vgl. 4.2.4) erscheint es dabei plausibel, dass die während der ES-Zell-Entwicklung durch die MesP1-Überexpression verändert ablaufenden Signalkaskaden die Induktion von Progenitorzellen bereits zu einem Zeitpunkt stimulieren, an dem die Entwicklung von Herz- und Gefäßzellen noch gemeinsam und nicht wie in späteren Entwicklungsphasen weitgehend unabhängig voneinander verläuft [216]. Nicht umsonst

schließlich wurde MesP1 bereits in den bisherigen Publikationen als frühester spezifischer Marker für die Gefäß- und Herzentwicklung beschrieben. (vgl. 1.3.1) [145, 146].

Erweitert werden die Beobachtungen durch im Anschluss an diese Arbeit durchgeführte Überexpressionsversuche im Froschemryo (*Xenopus*), in denen nachgewiesen werden konnte, dass eine Induktion von Herzmuskelgewebe durch MesP1 auch in niederen Vertebraten möglich ist. Dies zeigte sich hier in der ektopten Bildung von kontraktilen Gewebe, teils mit und teils ohne elektrische Koppelung zum orthotop gelegenen Herz, mit dem Nachweis von kardialer Myosin-Leichtkette (MLC) in der *Whole mount in situ Hybridisierung* [215].

Ferner konnte die vermehrte Bildung von proliferativen Herzmuskelzellen durch Analyse des kardialen T-box-Transkriptionsfaktors Tbx5 bestätigt werden, der in der MesP1-transgenen Zellkultur deutlich vermindert exprimiert war. Was auf den ersten Blick paradox erscheint, klärt sich mit den Arbeiten von Hatcher et al. (2001) und Fijnvandraat et al. (2003), die zeigen konnten, dass es sich bei Tbx5 um ein Zellzyklusarrestsignal von Kardiomyozyten handelt und der Transkriptionsfaktor damit nicht-proliferative, differenzierte Zellen markiert [183, 184]. Diese sind jedoch in der MesP1-Zellkultur im Verhältnis zu juvenilen, proliferativen Herzmuskelzellen vermindert vorhanden, was in später zusätzlich durchgeführten patch-clamp-Analysen ebenfalls bestätigt werden konnte.

#### 4. 2. 2 Funktionelle Analyse der MesP1-transfizierten Zellkultur

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktionalität der transgenen Herzmuskelzellen im Zellverband untersucht. Für die Untersuchungen zur MesP1-Signaltransduktion waren diese Datenerhebungen nicht von vorrangiger Bedeutung sondern sollten vielmehr zeigen, dass die durch MesP1 induzierten Kardiomyozyten auch funktionstüchtig waren. Die Änderung der Schlagfrequenz der kontraktilen Areale auf die vegetativen Reize Isoprenalin und Carabachol (s. 3.4) zeigte dabei ein erhaltenes Reaktionsvermögen auf diese physiologischen Stimuli und keinen Unterschied zu den Kontrollzellen [32, 86, 95, 172]. Im Anschluss an diese Arbeit durchgeführte, zusätzliche Analysen zum Expressionsmuster sarkomerer Strukturen ( $\alpha$ MHC) unter dem Confocal-Mikroskop zeigten ebenfalls keine Abweichungen von der Norm, ebensowenig wie ultrastrukturelle Untersuchungen im Elektronenmikroskop, die regelrecht angeordnete myofibrilläre Bündel zeigen konnten [215]. In der Zusammenschau der Daten ist deshalb von keinerlei Funktionseinbußen auszugehen, die durch die genetische Manipulation bedingt wären.

### 4. 2. 3 Potential des Faktors MesP1

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen eine kardiovaskulär-induktive Wirkung von MesP1 in der ES-Zell-Kultur. Diese scheint in Chordaten hoch konserviert zu sein [6, 137, 142-146, 217], ist jedoch nicht universell, sondern zeigt vielmehr deutliche Limitationen. Der Faktor allein nämlich ist nicht in der Lage, in jeder Art von Gewebe eine kardiovaskuläre Differenzierung zu induzieren. Vielmehr bedarf es offensichtlich einer speziellen Umgebung bzw. speziellen Bedingungen, um die induktive Wirkung des *mesoderm posterior 1* entfalten zu können. Deutlich wurde dies zuerst in undifferenzierten ES-Zellen, die trotz MesP1-Transfektion und -Expression über viele Passagen hinweg keine (kardiale) Differenzierung zeigten, sondern weiter im pluripotenten Zustand verblieben (s. 3.2, Abb. 3-9), da offenbar die zusätzlich benötigten Voraussetzungen fehlten. Bei der Analyse der Keimblattentwicklung dann zeigte sich, dass während der Differenzierung der transgenen Zellklone die Menge an Gesamtmesoderm, bestimmt anhand des Markers Brachyury (s. 3.3) [182], im Vergleich zu differenzierten Kontrollzellen nahezu unverändert blieb. Beide Beobachtungen bestätigen, dass MesP1 eine kardiovaskuläre Induktion nur innerhalb dieses Keimblattes vermitteln kann und selbst nicht in der Lage ist, die Bildung des Mesoderms in undifferenzierten ES-Zellen zu induzieren [6, 218]. Gestützt wird diese Annahme zudem durch die Beobachtung, dass die verstärkte Entwicklung von Herz- und Gefäßzellen im Seitenplattenmesoderm (s. 3.3, Abb. 3-16) ausschließlich zu Lasten anderer mesodermaler Strukturen, wie z. B. der Skelettmuskulatur, erfolgte (Marker MyoD in Abb. 3-16), während die Entwicklung des Endoderms unbeeinträchtigt war und die Verschiebungen innerhalb des Ektoderms (s. 3.3.3.2) auf sekundäre Effekte zurückzuführen waren (s. 4.2.4). Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass MesP1 eine starke kardial-induktive Wirkung besitzt, die jedoch u. a. abhängig von der Präsenz einer mesodermalen Umgebung bzw. bisher unbestimmter mesodermaler Faktoren zu sein scheint [215].

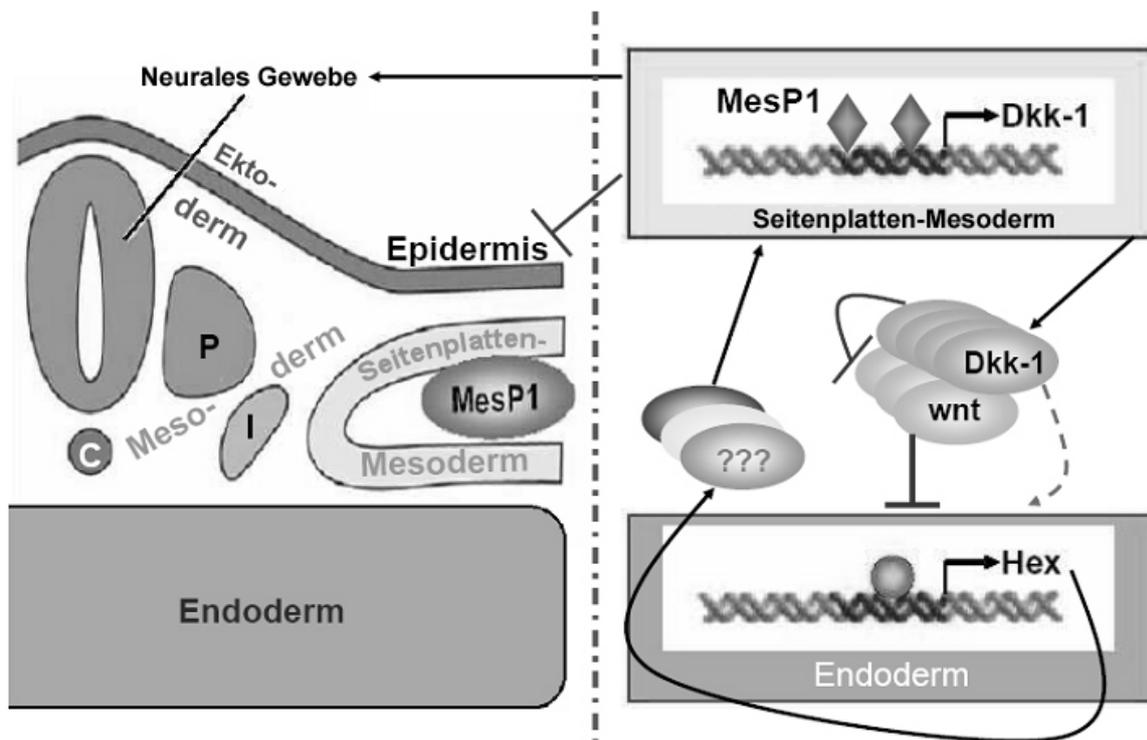
### 4. 2. 4 MesP1-Signaltransduktion

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Wirkung des Faktors MesP1 auf die Kardiovaskulogenese in embryonalen Stammzellen erörtert. Was noch zu klären bleibt, ist die Frage nach einem möglichen molekularen Wirkmechanismus dieses *basic-helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktors. Kitajima et al. haben in einer ihrer frühen Arbeiten eine Interaktion von MesP1 mit dem FGF-Signaling und dem Faktor Nodal postuliert. [6, 148] Jedoch erscheint eine Induktion der Herzentwicklung allein über diese Signalwege eher unwahrscheinlich

(vgl. 1.3.2.3) [110, 126, 127]. Vielmehr wird angenommen, dass für die Initiierung der Kardiogenese in Vertebraten u. a. die Blockade des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges, z. B. durch den Faktor Dickkopf-1, der auch in MesP1<sup>+</sup>-Zellen verstärkt exprimiert wird (s. 3.3.3.1), von entscheidender Bedeutung ist [118]. Erst kürzlich konnte dazu im *Xenopus*-Embryo gezeigt werden, dass Wnt-Antagonisten die Kardiogenese nicht-Zellautonom stimulieren, und zwar in bis zu mehreren Zellen Entfernung von den Wnt-blockierten Zellen, was auf einen indirekten Wirkmechanismus hinweist [114, 219]. Entsprechend zeigte sich auch in Mausembryonen durch Inaktivierung des downstream im Wnt-Signaling gelegenen  $\beta$ -Catenin im definitiven Endoderm eine Bildung multipler Herzen entlang der anterior-posterioren Achse [117]. Foley et al. schließlich konnten zeigen, dass die, durch den Wnt-Antagonisten Dkk-1, induzierte Kardiogenese durch Hochregulation des *homeodomain*-Transkriptionsfaktors Hex in Teilen des Endoderms vermittelt wird, die während der Embryonalentwicklung dem mutmaßlich kardialen Mesoderm direkt benachbart zu liegen kommen [118, 119]. Über den Faktor Hex selbst, der ebenfalls in den MesP-Klonen verstärkt exprimiert wurde (s. 3.3.3.1), schreiben Foley et al., dass bei dessen Blockade die endogene Herzentwicklung sowie die ektope, Dkk-1-vermittelte Induktion der Kardiogenese gehemmt wird und er ferner in der Lage ist, bei ektope Expression die Bildung kardialer Marker nicht-Zellautonom zu stimulieren [119]. Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass nach der aktuellen Datenlage die folgende Hypothese deutlich belegt ist: Die Kardiogenese in Vertebraten wird durch die Blockade der Wnt-Signaltransduktion initiiert, was im Endoderm eine verstärkte Expression des Faktors Hex bedingt. Dieser wiederum vermittelt die Bildung bisher unbekannter endodermaler, diffusionsfähiger Faktoren, die schließlich für die Induktion der Kardiogenese im Mesoderm verantwortlich sind (vgl. 1.3.2.1 und Abb. 4-1) [119].

Der Faktor MesP1 ist dabei offensichtlich dem gerade beschriebenen Signalweg Dkk-1–Wnt-Blockade–Hex vorgeschaltet. Dies belegen die in der RT-PCR (s. 3.3.3) am Tag 3 der Differenzierung erhobenen Daten, die in den transgenen Zellklonen eine deutliche Heraufregulation des Wnt-Blockierers Dkk-1 sowie konsequenterweise des endodermalen Transkriptionsfaktors Hex zeigen. Das bedeutet, dass sich beide Faktoren in der Signalkaskade unterhalb von MesP1 befinden müssen oder zumindest von diesem über einen *loopback*-Mechanismus in ihrer Expression kontrolliert werden.

Eindeutig bestätigt werden konnte dieses Postulat in Folgeversuchen mittels Chromatin-Immun-Präzipitation (ChiP) und Bandshift-Experimenten (EMSA), die eine direkte Interaktion von MesP1 mit der Promotorregion des Faktors Dkk-1 und damit die direkte Abhängigkeit der Dkk-1-Expression und folglich die Initiation der Kardiogenese von *mesoderm posterior 1* belegen konnten (s. Abb. 4-1) [215].



**Abb. 4-1 Mögliches Modell für eine MesP1-vermittelte Induktion der Kardiovaskulogenese in ES-Zellen**

Der Transkriptionsfaktor MesP1 vermittelt im Mesoderm durch Bindung an die Promotorregion des Faktors Dkk-1 dessen verstärkte Expression. Dkk-1 selbst blockiert dabei den kanonischen Wnt-Signalweg, was im Endoderm die Heraufregulation des Faktors Hex bedingt. Hex wiederum induziert über bisher unbekannte, diffusionsfähige Signalproteine eine kardiale Differenzierung im Seitenplattenmesoderm (rechtes Teilbild) [114, 117-119, 219].

Das vermehrt vorhandene kardiogene Gewebe induziert während der Embryonalentwicklung im Ektoderm eine verstärkte Bildung neuralen Gewebes und hemmt gleichzeitig die Epidermis-Bildung (linkes Teilbild) [187].

C: Chorda dorsali, P: Paraxiales Mesoderm, I: intermediäres Mesoderm

Parallel zur verstärkten Bildung kardiogener Zellen zeigte sich während der ES-Zell-Differenzierung im Ektoderm eine erhöhte Expression neuraler Marker sowie eine verminderte Expression des epidermalen Markers Cytokeratin17 (s. 3.3.3.2) [186, 220]. Die Vermehrung der neuralen Strukturen war dabei auf das neural-induktive Potential der amplifizierten kardiogenen Zellen zurückzuführen [187]. Bei der Suppression der epidermalen Entwicklung könnte es sich dabei um einen sekundären Verdrängungseffekt des proliferativen Nervengewebes im Ektoderm handeln oder um eine bisher nicht näher beschriebene direkte Suppression, vermittelt durch diffusionsfähige Faktoren aus dem vermehrten Seitenplattenmesoderm. Die Entwicklung des Endoderms, untersucht anhand des Markers HNF4, war unbeeinträchtigt, was nochmals belegt, dass die beschriebenen quantitativen Veränderungen während der Entwicklung der transgenen ES-Zellen jeweils auf die entsprechenden Keimblätter beschränkt waren (vgl. 4.2.3).

Die vorliegenden Daten zeigen mit MesP1 damit neben einem Faktor zur Induktion von Kardiomyozyten und Endothelzellen in embryonalen Stammzellen auch dessen zugehörige Signaltransduktion und bieten so einen weiteren wichtigen Einstieg in die detaillierte Erforschung der molekularen Kardiovaskulogenese [215].

## 4. 3 AUSBLICK

### 4. 3. 1 Identifikation vorgeschalteter Faktoren

Die vorgestellten Arbeiten haben gezeigt, dass eine Amplifikation von Kardiomyozyten und Endothelzellen während der Differenzierung muriner ES-Zellen durch Überexpression des Transkriptionsfaktors *mesoderm posterior 1* vermittelt werden kann. Mit den anschließenden Untersuchungen zur MesP1-Signaltransduktion konnte dabei der bisherige Wissensstand über die kardiale Entwicklung auf molekularer Ebene gezielt erweitert werden, insbesondere durch die Identifikation des Wnt-Blockierers Dkk-1 als Zielgen von MesP1. Die Aufklärung möglicher Signalwege nämlich gelang bisher nur in den wenigsten Arbeiten zur Vermehrung von Kardiomyozyten in der ES-Zell-Kultur [91, 94-97, 99-101, 117, 216, 218]. Doch selbst das Verständnis der derzeit etablierten Signaltransduktionskaskaden wird allein, neben einer Übertragung auf das humane ES-Zell-System, zukünftig nicht ausreichend sein, um Kardiomyozyten für die klinische Anwendung gewinnen zu können. Vielmehr wird heute angenommen, dass den noch weiter „upstream“ gelegenen Faktoren in Zukunft eine Schlüsselrolle bei der gesteuerten ES-Zell-Differenzierung zukommen wird [92]. Nach rückwärtiger Verfolgung der heute bekannten Signalwege bis zu ihrem Ursprung hin wird man schließlich, so die Annahme, auf die initialen, extrazellulären Signalmoleküle treffen, die auch in vivo für die Steuerung der Differenzierung im Embryo verantwortlich sind [92].

Nach genauer Identifikation dieser Faktoren könnte ihre Anwendung es einmal auch in der humanen ES-Zell-Kultur ermöglichen, allein durch externe Stimulation die Entwicklung gezielt hin zu den gewünschten kardialen Zelllinien steuern zu können, was genetische Manipulationen entbehrlich machen würde. Denn der Verzicht auf artifizielle Veränderungen im Erbgut der Stammzellen erst würde aus Sicherheitsgründen die therapeutische Anwendung am Menschen erlauben. In Ansätzen für die Gewinnung von Neuronen [221] und pankreatischen  $\beta$ -Zellen [222] aus embryonalen Stammzellen zeigte sich diese Strategie bisher am Erfolg versprechendsten. Die Erschließung dieser extrazellulären Faktoren ist deshalb ein zukünftiges Ziel der aktuellen Stammzellforschung [92]. Die Aufgabe besteht nun

darin, sich, ausgehend von den bekannten Signalkaskaden, von einem Molekül zum nächsten Richtung „upstream“ zu arbeiten, bis zum Erreichen der diffusionsfähigen Ausgangsfaktoren. Auch in diese Richtung konnte in der vorliegenden Arbeit bereits ein Beitrag geleistet werden, indem mit MesP1 der dem Wnt-Blockierer Dkk-1 unmittelbar vorgeschaltete Faktor identifiziert wurde. Die weiteren Schritte bleiben jetzt zukünftigen Arbeiten vorbehalten. Diese könnten es so schließlich einmal ermöglichen aus humanen embryonalen Stammzellen gezielt und kontaminationsfrei genetisch unveränderte Zellen für eine klinische Zelltherapie am Menschen gewinnen zu können.

#### **4. 3. 2 Reprogrammierung adulter Stammzellen**

Nach Abschluss der Analyse der erhobenen Daten wurde die kardial-induktive Wirkung des Faktors MesP1 in der embryonalen Stammzellkultur erstmals in seiner ganzen Tragweite deutlich. Angesichts des in der Vergangenheit immer wieder postulierten, jedoch niemals zweifelsfrei gezeigten, Potentials verschiedener adulter Stammzelllinien, in andere Gewebezellen, wie z. B. Kardiomyozyten, transdifferenzieren zu können [15, 16, 223-225], würde sich deshalb eine Übertragung des hier verwendeten humanen MesP1-Konstrukts in diese Stammzellen anbieten. Die Überexpression von MesP1 und/oder anderer kardiogener Faktoren in diesen Zellen könnte es einmal ermöglichen, die bestehenden Hürden zu überwinden und so eine Gewinnung von kardiovaskulärem Gewebe aus reprogrammierten adulten Stammzellen zu gestatten [215].

In der vorliegenden Arbeit über den Transkriptionsfaktor Mesp1 wurde damit ein weites, aber interessantes Feld eröffnet wurde, dessen weitere Ergründung schließlich einmal einen wertvollen Beitrag zur Verwirklichung der kardialen Zelltherapie am Menschen leisten wird.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen heute in der westlichen Welt die häufigste Todesursache überhaupt dar. In der Vergangenheit wurde deshalb zu deren Therapie bereits eine Vielzahl an medikamentösen und chirurgischen Behandlungsmöglichkeiten entwickelt, die jedoch insbesondere in schweren Erkrankungsfällen keine langfristig zufrieden stellenden Optionen bieten konnten. Von Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) erhofft man sich deshalb ganz neue, zelltherapeutische Möglichkeiten. Durch das Potential, vitales Herzmuskelgewebe aus diesen pluripotenten Zellen in vitro generieren zu können, eröffnen sich dabei für die kausale Behandlung der Herzinsuffizienz bisher ungeahnte Perspektiven.

Zwei der Hauptprobleme bei der Gewinnung von Kardiomyozyten aus der differenzierten ES-Zell-Kultur stellen jedoch zum einen der geringe Anteil von Herzmuskelzellen an der Mischkultur und zum anderen deren schwierige hochselektive Aufreinigung dar. Durch Entschlüsselung der Stammzellentwicklung und der daran beteiligten Faktoren und Signalkaskaden könnte es jedoch in Zukunft möglich werden, die Steuerung für diese Differenzierung zu übernehmen, um so aus den hoch proliferativen, pluripotenten Vorläuferzellen Kardiomyozytenreinkulturen gewinnen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde der früh während der Embryonalentwicklung exprimierte Transkriptionsfaktor *mesoderm posterior 1* (MesP1) als mögliche Schlüsselkomponente der kardiovaskulären Entwicklung detailliert untersucht. Mithilfe eines dafür konstruierten Vektors konnte der Faktor MesP1 in stabil-transfizierten, murinen embryonalen Stammzellen überexprimiert – und so dessen induktive Wirkung auf die Entwicklung von Herz- und Endothelzellen während der ES-Zell-Differenzierung auf molekularer wie auch zellulärer Ebene nachgewiesen werden. So zeigte sich in den transgenen Zellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung eine verstärkte Expression u. a. der frühen kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA-4, die sich später während der Differenzierung in einer mehrfach erhöhten Ausbeute an Kardiomyozyten und Endothelzellen in der Zellkultur widerspiegelte. Die Funktionalität der amplifizierten Kardiomyozyten bezüglich Kontraktionsfrequenz und Reagibilität auf vegetative Reize blieb dabei unverändert erhalten.

Bei der Analyse der Keimblattentwicklung fiel auf, dass durch Überexpression des *mesoderm posterior 1* in den transgenen Zellen die Menge an Gesamtmesoderm unverändert blieb, jedoch innerhalb dieses Keimblattes die Differenzierung deutlich in Richtung kardiovaskulär und zu Lasten der Skelettmuskelentwicklung verschoben war. Im Ektoderm zeigte sich eine verstärkte neurale Entwicklung, induziert durch die vermehrt vorhandenen kardiogenen Zellen. Die Bildung des Endoderms war unbeeinträchtigt.

Im Folgenden konnte schließlich in Untersuchungen zur Signaltransduktion der Mechanismus der MesP1-vermittelten kardiovaskulären Induktion aufgeklärt werden, indem der Faktor Dickkopf-1, ein Inhibitor des Wnt-Signalweges, als Zielgen des Transkriptionsfaktors MesP1 identifiziert und in Folgeversuchen mittels Bandshift auch bestätigt werden konnte. Die Blockade des Wnt-Signalweges ist verantwortlich für die Initiierung der kardiovaskulären Differenzierung während der Embryonalentwicklung.

MesP1 stellt damit einen besonderen Faktor während der Embryogenese dar und einen wichtigen Startpunkt für die weitere Entzifferung der komplexen Signaltransduktionskaskaden der Herz- und Gefäßentwicklung. Das vollständige Verständnis dieses komplexen Netzwerkes sowie die Übertragung auf das humane ES-Zell-System könnte es einmal ermöglichen, Herzmuskelerkrankungen des Menschen mit embryonalen Stammzellen therapieren zu können.

## VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Eurotransplant-International-Foundation, *Annual Report 2005*. 2005.
2. NIH, National Institute of Health, *Scientific Progress and Future Research Directions*, in *Report on Stem Cells*. 2001, NIH: Bethesda (USA).
3. RKI, Robert Koch Institut, *Genehmigungsverfahren nach dem Stammzellgesetz*. In *RKI Stammzellen [World Wide Web site]*. Cited Monday, February 05, 2007, Available at [http://www.rki.de/cln\\_049/nn\\_197444/DE/Content/Gesund/Stammzellen/stammzellen\\_\\_inhalt.html?\\_\\_nnn=true](http://www.rki.de/cln_049/nn_197444/DE/Content/Gesund/Stammzellen/stammzellen__inhalt.html?__nnn=true), in *Stammzellen*. 2007 NIH: Berlin.
4. Reubinoff, B.E., et al., *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. *Nat Biotechnol*, 2000. **18**(4): p. 399-404.
5. Eisenberg, L.M. and C.A. Eisenberg, *Wnt signal transduction and the formation of the myocardium*. *Dev Biol*, 2006. **293**(2): p. 305-15.
6. Kitajima, S., et al., *MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm*. *Development*, 2000. **127**(15): p. 3215-26.
7. DESTATIS, *Herz-Kreislaufkrankung bleibt häufigste Todesursache*. Pressemitteilung 3830092 der Pressestelle des Statistischen Bundesamtes vom 15. September 2006.
8. Kessler, P.D. and B.J. Byrne, *Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications*. *Annu Rev Physiol*, 1999. **61**: p. 219-42.
9. Hunt, S.A., *Current status of cardiac transplantation*. *Jama*, 1998. **280**(19): p. 1692-8.
10. Neumayer, H.H., *Introducing everolimus (Certican) in organ transplantation: an overview of preclinical and early clinical developments*. *Transplantation*, 2005. **79**(9 Suppl): p. S72-5.
11. Boyle, A. and M. Colvin-Adams, *Recipient selection and management*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2004. **16**(4): p. 358-63.
12. Deutsche-Stiftung-Organspende, *Herztransplantation, Online-Beitrag vom 02.01.2007*, [http://www.dso.de/transplantation/organe/herz\\_idx.html](http://www.dso.de/transplantation/organe/herz_idx.html). 2007.
13. Menasche, P., *Skeletal myoblast for cell therapy*. *Coron Artery Dis*, 2005. **16**(2): p. 105-10.
14. Lee, M.S. and R.R. Makkar, *Stem-cell transplantation in myocardial infarction: a status report*. *Ann Intern Med*, 2004. **140**(9): p. 729-37.
15. Balsam, L.B., et al., *Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium*. *Nature*, 2004. **428**(6983): p. 668-73 Epub 2004 Mar 21.

16. Murry, C.E., et al., *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. Nature, 2004. **428**(6983): p. 664-8 Epub 2004 Mar 21.
17. Deindl, E., et al., *G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis*. Faseb J, 2006. **20**(7): p. 956-8.
18. Vieyra, D.S., K.A. Jackson, and M.A. Goodell, *Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow-derived cells*. Stem Cell Rev, 2005. **1**(1): p. 65-9.
19. Klug, M.G., et al., *Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 216-24.
20. Min, J.Y., et al., *Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats*. J Appl Physiol, 2002. **92**(1): p. 288-96.
21. Yamashita, J., et al., *Flkl-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 92-6.
22. Yang, Y., et al., *VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells*. J Appl Physiol, 2002. **93**(3): p. 1140-51.
23. Gerecht-Nir, S., et al., *Human embryonic stem cells for cardiovascular repair*. Cardiovasc Res, 2003. **58**(2): p. 313-23.
24. Gerecht-Nir, S. and J. Itskovitz-Eldor, *Cell therapy using human embryonic stem cells*. Transpl Immunol, 2004. **12**(3-4): p. 203-9.
25. Gerecht-Nir, S. and J. Itskovitz-Eldor, *Human embryonic stem cells: a potential source for cellular therapy*. Am J Transplant, 2004. **4 Suppl 6**: p. 51-7.
26. Conley, B.J., et al., *Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 555-67.
27. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
28. Maltsev, V.A., et al., *Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types*. Mech Dev, 1993. **44**(1): p. 41-50.
29. Mummery, C., et al., *Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells*. J Anat, 2002. **200**(Pt 3): p. 233-42.
30. Wobus, A.M., G. Wallukat, and J. Hescheler, *Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers*. Differentiation, 1991. **48**(3): p. 173-82.

31. Bradley, A., et al., *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines*. Nature, 1984. **309**(5965): p. 255-6.
32. Hescheler, J., et al., *Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis*. Cardiovasc Res, 1997. **36**(2): p. 149-62.
33. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
34. Doetschman, T.C., et al., *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium*. J Embryol Exp Morphol, 1985. **87**: p. 27-45.
35. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
36. Amit, M., et al., *Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture*. Dev Biol, 2000. **227**(2): p. 271-8.
37. Rohwedel, J., et al., *Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects*. Toxicol In Vitro, 2001. **15**(6): p. 741-53.
38. Hubner, K., et al., *Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells*. Science, 2003. **300**(5623): p. 1251-6.
39. Toyooka, Y., et al., *Embryonic stem cells can form germ cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11457-62.
40. Department of Science and Technology, R.o.S.A., *What are experts saying? In Public understanding of biotechnology [World Wide Web site]. Cited Thursday, January 04, 2007, Available at <http://pub.ac.za/issues/stemcells.htm>*. 2006 NIH.
41. Matsui, Y., K. Zsebo, and B.L. Hogan, *Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture*. Cell, 1992. **70**(5): p. 841-7.
42. Pease, S., et al., *Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF)*. Dev Biol, 1990. **141**(2): p. 344-52.
43. Gough, N.M., et al., *LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells*. Reprod Fertil Dev, 1989. **1**(4): p. 281-8.
44. Pease, S. and R.L. Williams, *Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor*. Exp Cell Res, 1990. **190**(2): p. 209-11.

45. Furue, M., et al., *Leukemia Inhibitory Factor as an Anti-Apoptotic Mitogen for Pluripotent Mouse Embryonic Stem Cells in a Serum-Free Medium without Feeder Cells*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2005. **41**(1): p. 19-28.
46. Richards, M., et al., *Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(9): p. 933-6.
47. Xu, C., et al., *Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(10): p. 971-4.
48. Klimanskaya, I., et al., *Human embryonic stem cells derived without feeder cells*. Lancet, 2005. **365**(9471): p. 1636-41.
49. Ludwig, T.E., et al., *Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(2): p. 185-7.
50. Saric, T., L.P. Frenzel, and J. Hescheler, *Immunological Barriers to Embryonic Stem Cell-Derived Therapies*. Cells Tissues Organs, 2008. **in press**.
51. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
52. Aoi, T., et al., *Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells*. Science, 2008.
53. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 101-6.
54. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
55. Stammzellgesetz, *Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen, §4 Abs. 2*. Bundesgesetzblatt, 2002. **Teil I Nr. 42**: p. 2277.
56. Dimmeler, S., *Stammzelltherapie in der Kardiologie – Stand und Perspektiven*. Uni-Med Science. 2005, Bremen.
57. Abbott, A., *German stem-cell law under fire*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 253.
58. Martin, M.J., et al., *Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 228-32.
59. Thomson, J.A., V.S. Marshall, and J.Q. Trojanowski, *Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells*. Apmis, 1998. **106**(1): p. 149-56; discussion 156-7.
60. Guo, X.M., et al., *Creation of engineered cardiac tissue in vitro from mouse embryonic stem cells*. Circulation, 2006. **113**(18): p. 2229-37.

61. McDonald, J.W. and M.J. Howard, *Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination*. Prog Brain Res, 2002. **137**: p. 299-309.
62. Soria, B., et al., *Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice*. Diabetes, 2000. **49**(2): p. 157-62.
63. Lumelsky, N., et al., *Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets*. Science, 2001. **292**(5520): p. 1389-94.
64. Segev, H., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters*. Stem Cells, 2004. **22**(3): p. 265-74.
65. Geron, *Human Embryonic Stem Cell Programs [World Wide Web site]*. Cited Saturday, March 01, 2008, Available at <http://www.geron.com/showpage.asp?code=prodst>. 2008: Menlo Park, California, USA.
66. NIH, National Institute of Health, *Stem Cell Basics: What are embryonic stem cells? . In Stem Cell Information [World Wide Web site]*. Cited Thursday, January 04, 2007, Available at <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics3>, in *Report on Stem Cells*. 2006 NIH: Bethesda (USA).
67. Maltsev, V.A., et al., *Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents*. Circ Res, 1994. **75**(2): p. 233-44.
68. Metzger, J.M., et al., *Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis*. Circ Res, 1995. **76**(5): p. 710-9.
69. Guan, K., D.O. Furst, and A.M. Wobus, *Modulation of sarcomere organization during embryonic stem cell-derived cardiomyocyte differentiation*. Eur J Cell Biol, 1999. **78**(11): p. 813-23.
70. Kehat, I., et al., *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 407-14.
71. Vittet, D., et al., *Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3424-31.
72. Xue, T., et al., *Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers*. Circulation, 2005. **111**(1): p. 11-20.

73. Gerecht-Nir, S., B. Fishman, and J. Itskovitz-Eldor, *Cardiovascular potential of embryonic stem cells*. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004. **276**(1): p. 58-65.
74. Bradley, J.A., E.M. Bolton, and R.A. Pedersen, *Stem cell medicine encounters the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(11): p. 859-71.
75. Odorico, J.S., D.S. Kaufman, and J.A. Thomson, *Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines*. *Stem Cells*, 2001. **19**(3): p. 193-204.
76. Batten, P., N.A. Rosenthal, and M.H. Yacoub, *Immune response to stem cells and strategies to induce tolerance*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007.
77. International-Stem-Cell-Forum-Ethics-Working-Party, *Ethics issues in stem cell research*. *Science*, 2006. **312**(5772): p. 366-7.
78. Stojkovic, M., et al., *Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes*. *Reprod Biomed Online*, 2005. **11**(2): p. 226-31.
79. Hwang, W.S., et al., *Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived from Human SCNT Blastocysts*. *Science*, 2005.
80. Hwang, W.S., et al., *Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst*. *Science*, 2004. **303**(5664): p. 1669-74.
81. Brown, P., *Cloning: do we even need eggs?* *Nature*, 2006. **439**(7077): p. 655-7.
82. Cyranoski, D., *Verdict: Hwang's human stem cells were all fakes*. *Nature*, 2006. **439**(7073): p. 122-3.
83. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2007.
84. Wernig, M., et al., *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*. *Nature*, 2007.
85. Cooke, M.J., M. Stojkovic, and S.A. Przyborski, *Growth of teratomas derived from human pluripotent stem cells is influenced by the graft site*. *Stem Cells Dev*, 2006. **15**(2): p. 254-9.
86. Müller, M., et al., *Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro*. *Faseb J*, 2000. **14**(15): p. 2540-8.
87. Gassanov, N., et al., *Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype*. *Faseb J*, 2004. **18**(14): p. 1710-2.
88. Zweigerdt, R., et al., *Generation of confluent cardiomyocyte monolayers derived from embryonic stem cells in suspension: a cell source for new therapies and screening strategies*. *Cytotherapy*, 2003. **5**(5): p. 399-413.

89. Zandstra, P.W., et al., *Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. Tissue Eng, 2003. **9**(4): p. 767-78.
90. David, R., M. Groebner, and W.M. Franz, *Magnetic cell sorting purification of differentiated embryonic stem cells stably expressing truncated human CD4 as surface marker*. Stem Cells, 2005. **23**(4): p. 477-82.
91. Yuasa, S., et al., *Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(5): p. 607-611.
92. Filipczyk, A.A., et al., *Cardiovascular development: towards biomedical applicability : Regulation of cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by extracellular signalling*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(6): p. 704-18.
93. Li, R.K., et al., *Cardiomyocyte transplantation improves heart function*. Ann Thorac Surg, 1996. **62**(3): p. 654-60; discussion 660-1.
94. Takahashi, T., et al., *Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes*. Circulation, 2003. **107**(14): p. 1912-6.
95. Wobus, A.M., et al., *Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(6): p. 1525-39.
96. Ventura, C., et al., *Butyric and retinoic mixed ester of hyaluronan. A novel differentiating glycoconjugate affording a high throughput of cardiogenesis in embryonic stem cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23574-9.
97. Paquin, J., et al., *Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(14): p. 9550-5.
98. Roggia, C., et al., *Hepatocyte growth factor (HGF) enhances cardiac commitment of differentiating embryonic stem cells by activating PI3 kinase*. Exp Cell Res, 2006.
99. Ventura, C., et al., *Turning on stem cell cardiogenesis with extremely low frequency magnetic fields*. Faseb J, 2005. **19**(1): p. 155-7.
100. Kanno, S., et al., *Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12277-81.
101. Grepin, C., G. Nemer, and M. Nemer, *Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor*. Development, 1997. **124**(12): p. 2387-95.
102. Singh, A.M., et al., *Chibby, an Antagonist of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway, Facilitates Cardiomyocyte Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells*. Circulation, 2007.

103. Hochedlinger, K. and R. Jaenisch, *Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy*. N Engl J Med, 2003. **349**(3): p. 275-86.
104. Menendez, P., C. Bueno, and L. Wang, *Human embryonic stem cells: a journey beyond cell replacement therapies*. Cytotherapy, 2006. **8**(6): p. 530-41.
105. Gilbert, S., M. Tyler, and R. Kozlowski, *Developmental biology*. 6th ed., Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000.
106. Sadler, T., *Medizinische Embryologie - Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. 9th ed. 1998.
107. Larsen, W., *Essentials of human embryology*. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2nd ed. NY: Churchill Livingstone, 1998.
108. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
109. Siegfried, E. and N. Perrimon, *Drosophila wingless: a paradigm for the function and mechanism of Wnt signaling*. Bioessays, 1994. **16**(6): p. 395-404.
110. Pandur, P., *What does it take to make a heart?* Biol Cell, 2005. **97**(3): p. 197-210.
111. Maye, P., et al., *Multiple mechanisms for Wnt11-mediated repression of the canonical Wnt signaling pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24659-65.
112. Brott, B.K. and S.Y. Sokol, *A vertebrate homolog of the cell cycle regulator Dbf4 is an inhibitor of Wnt signaling required for heart development*. Dev Cell, 2005. **8**(5): p. 703-15.
113. Olson, E.N., *Development. The path to the heart and the road not taken*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2327-8.
114. Schneider, V.A. and M. Mercola, *Wnt antagonism initiates cardiogenesis in Xenopus laevis*. Genes Dev, 2001. **15**(3): p. 304-15.
115. Brand, T., *Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis*. Dev Biol, 2003. **258**(1): p. 1-19.
116. Lin, K., et al., *The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11196-200.
117. Lickert, H., et al., *Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm*. Dev Cell, 2002. **3**(2): p. 171-81.
118. Foley, A.C., et al., *Embryonic heart induction*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1080**: p. 85-96.
119. Foley, A.C. and M. Mercola, *Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex*. Genes Dev, 2005. **19**(3): p. 387-96.

120. van Wijk, B., A.F. Moorman, and M.J. van den Hoff, *Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation*. Cardiovasc Res, 2006.
121. Nakajima, Y., et al., *Significance of bone morphogenetic protein-4 function in the initial myofibrillogenesis of chick cardiogenesis*. Dev Biol, 2002. **245**(2): p. 291-303.
122. Schlange, T., et al., *BMP2 is required for early heart development during a distinct time period*. Mech Dev, 2000. **91**(1-2): p. 259-70.
123. Schultheiss, T.M., J.B. Burch, and A.B. Lassar, *A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis*. Genes Dev, 1997. **11**(4): p. 451-62.
124. Walters, M.J., G.A. Wayman, and J.L. Christian, *Bone morphogenetic protein function is required for terminal differentiation of the heart but not for early expression of cardiac marker genes*. Mech Dev, 2001. **100**(2): p. 263-73.
125. Ying, Q.L., et al., *BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3*. Cell, 2003. **115**(3): p. 281-92.
126. Ladd, A.N., T.A. Yatskievych, and P.B. Antin, *Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGFbeta and bone morphogenetic proteins*. Dev Biol, 1998. **204**(2): p. 407-19.
127. Barron, M., M. Gao, and J. Lough, *Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative*. Dev Dyn, 2000. **218**(2): p. 383-93.
128. Dell'Era, P., et al., *Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development*. Circ Res, 2003. **93**(5): p. 414-20.
129. Sato, N., et al., *Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 55-63.
130. Cai, J., M.L. Weiss, and M.S. Rao, *In search of "stemness"*. Exp Hematol, 2004. **32**(7): p. 585-98.
131. Miyabayashi, T., et al., *Wnt/{beta}-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007.
132. Biben, C. and R.P. Harvey, *Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development*. Genes Dev, 1997. **11**(11): p. 1357-69.
133. Linask, K.K., *N-cadherin localization in early heart development and polar expression of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase, and integrin during pericardial coelom formation*

- and epithelialization of the differentiating myocardium.* Dev Biol, 1992. **151**(1): p. 213-24.
134. Srivastava, D., P. Cserjesi, and E.N. Olson, *A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis.* Science, 1995. **270**(5244): p. 1995-9.
135. Tsuda, T., et al., *Left-right asymmetric localization of flectin in the extracellular matrix during heart looping.* Dev Biol, 1996. **173**(1): p. 39-50.
136. Hanahan, D., *Signaling vascular morphogenesis and maintenance.* Science, 1997. **277**(5322): p. 48-50.
137. Saga, Y., et al., *MesP1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation.* Development, 1996. **122**(9): p. 2769-78.
138. NCBI, N.C.f.B.I., *Entrez Nucleotide Homo sapiens mesoderm posterior 1 homolog (mouse) (MESP1), mRNA, NM\_018670.* 2007, NIH: Bethesda (USA).
139. NCBI, N.C.f.B.I., *Entrez Nucleotide Mus musculus mRNA for MesP1, complete cds, D83674.* 2007, NIH: Bethesda (USA).
140. Terasaki, H., et al., *Transgenic analysis of the medaka mesp-b enhancer in somitogenesis.* Dev Growth Differ, 2006. **48**(3): p. 153-68.
141. Davidson, B., et al., *FGF signaling delineates the cardiac progenitor field in the simple chordate, Ciona intestinalis.* Genes Dev, 2006. **20**(19): p. 2728-38.
142. Davidson, B., W. Shi, and M. Levine, *Uncoupling heart cell specification and migration in the simple chordate Ciona intestinalis.* Development, 2005. **132**(21): p. 4811-8.
143. Satou, Y., K.S. Imai, and N. Satoh, *The ascidian Mesp gene specifies heart precursor cells.* Development, 2004. **131**(11): p. 2533-41.
144. Olson, E.N., *Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart.* Science, 2006. **313**(5795): p. 1922-7.
145. Saga, Y., S. Kitajima, and S. Miyagawa-Tomita, *Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development.* Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(8): p. 345-52.
146. Saga, Y., et al., *MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube.* Development, 1999. **126**(15): p. 3437-47.
147. Srivastava, D. and E.N. Olson, *A genetic blueprint for cardiac development.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 221-6.
148. Conlon, F.L., et al., *A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse.* Development, 1994. **120**(7): p. 1919-28.

149. Sun, X., et al., *Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo*. Genes Dev, 1999. **13**(14): p. 1834-46.
150. Vecchi, A., et al., *Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium*. Eur J Cell Biol, 1994. **63**(2): p. 247-54.
151. DeLisser, H.M., P.J. Newman, and S.M. Albelda, *Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31*. Immunol Today, 1994. **15**(10): p. 490-5.
152. Suri, C., et al., *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1171-80.
153. Vanzulli, S., et al., *Detection of endothelial cells by MEC 13.3 monoclonal antibody in mice mammary tumors*. Biocell, 1997. **21**(1): p. 39-46.
154. Famiglietti, J., et al., *Tyrosine residue in exon 14 of the cytoplasmic domain of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) regulates ligand binding specificity*. J Cell Biol, 1997. **138**(6): p. 1425-35.
155. DeLisser, H.M., et al., *Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis*. Am J Pathol, 1997. **151**(3): p. 671-7.
156. Ledbetter, J.A. and L.A. Herzenberg, *Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens*. Immunol Rev, 1979. **47**: p. 63-90.
157. Thomas, M.L., *The leukocyte common antigen family*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 339-69.
158. Johnson, P., A. Maiti, and D.H.W. Ng, *CD45: A family of leukocyte-specific cell surface glykoproteins*. Weir's Handbook of Experimental Immunology, 1997. **2**: p. 62.1-62.16.
159. Shuman, S., *Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32678-84.
160. Jackson, R.J., M.T. Howell, and A. Kaminski, *The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation*. Trends Biochem Sci, 1990. **15**(12): p. 477-83.
161. Jang, S.K. and E. Wimmer, *Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein*. Genes Dev, 1990. **4**(9): p. 1560-72.
162. Cormack, B.P., R.H. Valdivia, and S. Falkow, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. Gene, 1996. **173**(1 Spec No): p. 33-8.
163. Yang, T.T., L. Cheng, and S.R. Kain, *Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(22): p. 4592-3.

164. Haas, J., E.C. Park, and B. Seed, *Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein*. *Curr Biol*, 1996. **6**(3): p. 315-24.
165. Herrmann, R., et al., *Transposition of a DNA sequence determining kanamycin resistance into the single-stranded genome of bacteriophage  $\phi$ d*. *Mol Gen Genet*, 1978. **159**(2): p. 171-8.
166. Kozak, M., *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs*. *Nucleic Acids Res*, 1987. **15**(20): p. 8125-48.
167. Kozak, M., *At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells*. *J Mol Biol*, 1987. **196**(4): p. 947-50.
168. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
169. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
170. Niwa, H., et al., *Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3*. *Genes Dev*, 1998. **12**(13): p. 2048-60.
171. Gorman, C., *A practical approach*. 2nd ed. DNA cloning, ed. D.M. Glover. 1985. p. 143-190.
172. Maltsev, V.A., et al., *Establishment of beta-adrenergic modulation of L-type  $Ca^{2+}$  current in the early stages of cardiomyocyte development*. *Circ Res*, 1999. **84**(2): p. 136-45.
173. Wang, L., et al., *Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties*. *Immunity*, 2004. **21**(1): p. 31-41.
174. Sasaki, D.T., S.E. Dumas, and E.G. Engleman, *Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence*. *Cytometry*, 1987. **8**(4): p. 413-20.
175. Crissman, H.A. and J.A. Steinkamp, *Rapid, one step staining procedures for analysis of cellular DNA and protein by single and dual laser flow cytometry*. *Cytometry*, 1982. **3**(2): p. 84-90.
176. Jahner, D., et al., *De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis*. *Nature*, 1982. **298**(5875): p. 623-8.
177. Stewart, C.L., et al., *De novo methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(13): p. 4098-102.

178. Babaie, Y., et al., *Analysis of OCT4 dependent transcriptional networks regulating self renewal and pluripotency in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2006.
179. Lee, T.I., et al., *Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 301-13.
180. Tillet, E., et al., *N-cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis*. Exp Cell Res, 2005. **310**(2): p. 392-400.
181. Molkentin, J.D., et al., *Direct activation of a GATA6 cardiac enhancer by Nkx2.5: evidence for a reinforcing regulatory network of Nkx2.5 and GATA transcription factors in the developing heart*. Dev Biol, 2000. **217**(2): p. 301-9.
182. Inman, K.E. and K.M. Downs, *Localization of Brachyury (T) in embryonic and extraembryonic tissues during mouse gastrulation*. Gene Expr Patterns, 2006. **6**(8): p. 783-93.
183. Fijnvandraat, A.C., et al., *TBX5 overexpression stimulates differentiation of chamber myocardium in P19C16 embryonic carcinoma cells*. J Muscle Res Cell Motil, 2003. **24**(2-3): p. 211-8.
184. Hatcher, C.J., et al., *TBX5 transcription factor regulates cell proliferation during cardiogenesis*. Dev Biol, 2001. **230**(2): p. 177-88.
185. Berkes, C.A. and S.J. Tapscott, *MyoD and the transcriptional control of myogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2005.
186. Liu, K.J. and R.M. Harland, *Inhibition of neurogenesis by SRp38, a neuroD-regulated RNA-binding protein*. Development, 2005. **132**(7): p. 1511-23.
187. Kinder, S.J., et al., *The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm*. Development, 2001. **128**(18): p. 3623-34.
188. Satin, J., et al., *Mechanism of spontaneous excitability in human embryonic stem cell derived cardiomyocytes*. J Physiol, 2004. **559**(Pt 2): p. 479-96.
189. Snir, M., et al., *Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(6): p. H2355-63.
190. Rubart, M. and L.J. Field, *Cardiac repair by embryonic stem-derived cells*. Handb Exp Pharmacol, 2006(174): p. 73-100.
191. Wang, X., et al., *Scalable producing embryoid bodies by rotary cell culture system and constructing engineered cardiac tissue with ES-derived cardiomyocytes in vitro*. Biotechnol Prog, 2006. **22**(3): p. 811-8.

192. Behfar, A., et al., *Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart*. *Faseb J*, 2002. **16**(12): p. 1558-66.
193. Himes, N., et al., *In vivo MRI of embryonic stem cells in a mouse model of myocardial infarction*. *Magn Reson Med*, 2004. **52**(5): p. 1214-9.
194. Hodgson, D.M., et al., *Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(2): p. H471-9.
195. Swijnenburg, R.J., et al., *Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium*. *Circulation*, 2005. **112**(9 Suppl): p. I166-72.
196. Kehat, I., et al., *Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(10): p. 1282-9.
197. Laflamme, M.A., et al., *Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells*. *Am J Pathol*, 2005. **167**(3): p. 663-71.
198. Menard, C., et al., *Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study*. *Lancet*, 2005. **366**(9490): p. 1005-12.
199. Min, J.Y., et al., *Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003. **125**(2): p. 361-9.
200. Reinecke, H., et al., *Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts*. *Circulation*, 1999. **100**(2): p. 193-202.
201. Leor, J., et al., *Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium?* *Circulation*, 1996. **94**(9 Suppl): p. II332-6.
202. Soonpaa, M.H., et al., *Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium*. *Science*, 1994. **264**(5155): p. 98-101.
203. Iida, M., et al., *Identification of cardiac stem cells with FLK1, CD31, and VE-cadherin expression during embryonic stem cell differentiation*. *Faseb J*, 2005. **19**(3): p. 371-8.
204. Kataoka, H., et al., *Expressions of PDGF receptor alpha, c-Kit and Flk1 genes clustering in mouse chromosome 5 define distinct subsets of nascent mesodermal cells*. *Dev Growth Differ*, 1997. **39**(6): p. 729-40.
205. Kinder, S.J., et al., *The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo*. *Development*, 1999. **126**(21): p. 4691-701.

206. Kouskoff, V., et al., *Sequential development of hematopoietic and cardiac mesoderm during embryonic stem cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13170-5.
207. Nishikawa, S.I., et al., *Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages*. Development, 1998. **125**(9): p. 1747-57.
208. Pfister, O., et al., *CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation*. Circ Res, 2005. **97**(1): p. 52-61.
209. Yamashita, J., et al., *Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 92-6.
210. Yamada, M., et al., *Expression of chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 genes during early heart development: evidence for BMP2 induction of Tbx2*. Dev Biol, 2000. **228**(1): p. 95-105.
211. Nemir, M., et al., *Induction of cardiogenesis in embryonic stem cells via downregulation of Notch1 signaling*. Circ Res, 2006. **98**(12): p. 1471-8.
212. Sawada, A., et al., *Zebrafish Mesp family genes, mesp-a and mesp-b are segmentally expressed in the presomitic mesoderm, and Mesp-b confers the anterior identity to the developing somites*. Development, 2000. **127**(8): p. 1691-702.
213. Haraguchi, S., et al., *Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: differential usage of enhancers during development*. Mech Dev, 2001. **108**(1-2): p. 59-69.
214. Saga, Y., *Genetic rescue of segmentation defect in MesP2-deficient mice by MesP1 gene replacement*. Mech Dev, 1998. **75**(1-2): p. 53-66.
215. David, R., Brenner, C, et al., *MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(3): p. 338-345.
216. Wang, H., et al., *Wnt2 coordinates the commitment of mesoderm to hematopoietic, endothelial, and cardiac lineages in embryoid bodies*. J Biol Chem, 2007. **282**(1): p. 782-91.
217. Srivastava, D. and K.N. Ivey, *Potential of stem-cell-based therapies for heart disease*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1097-9.
218. Liu, Y., et al., *Sox17 is essential for the specification of cardiac mesoderm in embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 3859-64.
219. Monaghan, A.P., et al., *Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages*. Mech Dev, 1999. **87**(1-2): p. 45-56.

220. Schirren, C.G., et al., *Fetal and adult hair follicle. An immunohistochemical study of anticytokeratin antibodies in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue.* Am J Dermatopathol, 1997. **19**(4): p. 335-40.
221. Wichterle, H., et al., *Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons.* Cell, 2002. **110**(3): p. 385-97.
222. Stoffel, M., L. Vallier, and R.A. Pedersen, *Navigating the pathway from embryonic stem cells to beta cells.* Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(3): p. 327-36.
223. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.* Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-9.
224. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.* Nature, 2007. **447**(7146): p. 880-1.
225. Kogler, G., et al., *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential.* J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 123-35.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Vol%	Volumenprozent
g%	Massenprozent
A	Adenosin (Basensequenz)
A	Ampère
Abb.	Abbildung
Ac	Azetat
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
bHLH	basic-helix-loop-helix
BMP	bone morphogenetic proteine
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin (Basensequenz)
CD	Cluster of differentiation
CD31	Endothelzellmarker
CD31 <sup>+</sup>	CD31 positiv, CD31 exprimierend
CD45	Panleukozytenmarker
CD45 <sup>-</sup>	CD45 negativ, nicht CD45 exprimierend
cDNA	Komplementäre DNA
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
c-Myc	Myelocytomatosis cellular oncogene
Dkk-1	Dickkopf 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
Dsh	Dishevelled
DTT	Dithiothreitol
EB	Embryoid Body
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamiotetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein, verbessertes Grün-Fluoreszierendes Protein
EGFP <sup>+</sup>	EGFP positive, EGFP exprimierend
EMSA	Elektrophoretic Mobility Shift Assays
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
F	Farad

---

Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanosin (Basensequenz)
GFP	wild-type green fluorescent protein
GSES	murine Embryonale Stammzellen der Linie GSES
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
G418	Geneticinsulphat (Neomycin)
h	Stunde(n)
HBR	Ester aus Hyaluron-, Butter- und Retinsäure
hMesP1	humaner MesP1-Transkriptionsfaktor
H <sub>2</sub> O bidest	bidestilliertes Wasser
Kana	Kanamycin
KanaR	Kanamycin-Resistenzgen
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
Klf-4	Kruppel-like factor 4
LIF	Leukemia inhibitory factor
LRP5/6	low-density lipoprotein receptor-related protein isoforms 5/6
M	Mol pro Liter
MACS	magnetic cell sorting
mAK	Monoklonaler Antikörper
MCS	Multiple Cloning Site (Sequenzabschnitt im Vektor, an dem verschiedene Restriktionsenzym-Schnittstellen für die Klonierung vorhanden sind)
$\alpha$ -MHC	schwere $\alpha$ -Myosinkette
Mef2c	Myocyte Enhancer Factor 2c
MesP1, MesP-1	Mesoderm posterior 1 Transkriptionsfaktor
MesP1 <sup>+</sup> -Zellen	MesP1-positive Zellen, MesP1 exprimierende Zellen
mg	Milligramm
min	Minute
mMesP1	muriner MesP1-Transkriptionsfaktor
MMTV	mouse mammary tumor virus
mRNA	Messenger RNA
N <sub>2</sub>	flüssiger Stickstoff
ng	Nanogramm
Nt	Nukleotid(e)
Oct-4	Octamer 4
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

PBS	Phosphat-gepufferte Saline
p. c.	post conceptionem
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PE <sup>+</sup>	PE positiv, PE gefärbt
PerCP	Peridinin Chlorophyll-a Protein
PerCP <sup>+</sup>	PerCP positiv, PerCP gefärbt
PI	Propidiumjodid
PI <sup>+</sup>	PI positiv, PI gefärbt
p. k.	post konzeptionem
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	PCR nach RT
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymidin (Basensequenz)
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N`,-Tetramethyldiamin
TNT	in-vitro Transkription und Translation
Tris	Tris-Hydroxy-Aminoethan
U	Einheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

---

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Wolfgang-Michael Franz, Oberarzt der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik im Universitätsklinikum München-Großhadern, für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung meiner Dissertation in seiner Arbeitsgruppe bedanken. Herr Professor Franz hat mir jede erbetene Hilfe zukommen lassen und ist mir die gesamte Zeit über beratend zur Seite gestanden.

Mein besonderer Dank gilt daneben Herrn Dr. rer. nat. Robert David für die vorzügliche Betreuung dieser Arbeit. Mit viel pädagogischem Geschick und wissenschaftlichem Sachverstand hat er mich auch die Hürden dieser Arbeit meistern lassen. Er wird mir stets ein wissenschaftliches Vorbild bleiben.

Herr Professor Dr. Dr. Jürgen Heesemann hat freundlicherweise die Organisation des *Promotionsstudiums Molekulare Medizin* übernommen. Die Aufnahme in dieses Programm hat mir die Durchführung dieser Arbeit sehr erleichtert.

Den Herren Dr. med. Hans Theiss und Dr. med. Stefan Brunner möchte ich für alle wissenschaftlichen Ratschläge und für alle persönlichen Gespräche danken. Durch ihre stetige Hilfsbereitschaft haben sie mir das Arbeiten im Labor oft sehr erleichtert und für eine besonders freundschaftliche Stimmung gesorgt.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle meinen besonders herzlichen Dank an Herrn Dr. med. Michael Gröbner aussprechen, der mich als Co-Doktorand sehr motiviert und in allen Phasen meiner Arbeit nach Kräften unterstützt hat.

Schließlich möchte ich mich noch bei den Technischen Assistentinnen Christiane Groß, Saskia Bangert, Judith Arcifa und Bianka Ksienzyk für die Einführung in alle Laborarbeiten sowie für die freundliche Entlastung gegen Ende meiner Datenerhebungen besonders bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Insbesondere meiner lieben Schwester Michaela für alle Ratschläge und meinen lieben Eltern für das viele Verständnis und die Unterstützung meines Studiums. Ohne sie alle wäre die Durchführung der vorliegenden Arbeit in diesem Rahmen nicht möglich gewesen.

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare Medizin - Förderung für Forschung und Lehre“ der LMU München. Außerdem wurde die Arbeit unterstützt durch die „Deutsche Forschungsgemeinschaft“ (DFG FR-705/11-01/02) und die Fritz-Bender-Stiftung.

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht.

---

# LEBENS LAUF

---

## PERSÖNLICHE ANGABEN

---

Name: Christoph Johannes Brenner

geb. am 11. Oktober 1979

Geburtsort: München

---

## AUSBILDUNG UND STUDIUM

---

- 1990 – 1995 Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium, München  
1995 – 1999 Carl-Orff-Gymnasium, Unterschleißheim b. München  
1999 Allgemeine Hochschulreife  
1999 – 2000 Zivildienst, Ausbildung zum Rettungssanitäter  
2000 – 2007 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München  
2002 Ärztliche Vorprüfung  
2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2003 – 2008 Promotion bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang-M. Franz, 1. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum der Universität München-Großhadern, gefördert im Rahmen des *Promotionsstudiums Molekulare Medizin* der Ludwig-Maximilians-Universität  
2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2006 – 2007 Praktisches Jahr  
2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: sehr gut) und Approbation

---

## ABSTRACTS UND POSTERPRÄSENTATIONEN

---

David R, Gröbner M, **Brenner C**, Brunner S, Franz WM, Stable expression of transgenic truncated human CD4 as surface marker enables MACS purification of differentiated ES cells  
**3rd Dutch-German Joint Meeting of the Molecular Cardiology Groups, Münster, Germany, 24. - 26. Feb. 2005**

David R, **Brenner C**, Franz WM, Overexpression of the transcription factor MesP1 enhances cardiogenesis in ES cells  
**Z Kardiol 2005; 94 (Suppl 1): P477**

David R, Gröbner M, **Brenner C**, Franz WM, Magnetic cell sorting of genetically engineered embryonic stem cells provides a basis for cardiac ES cell therapy

**Keystone Symposia D2, Molecular Biology of Cardiac diseases and Regeneration, Steamboat Springs, Colorado, USA, 3. - 8. Apr. 2005**

David R, **Brenner C**, Franz WM, The bHLH transcription factor MesP1 promotes cardiogenesis in ES cells

**4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society, Munich, Germany, 31. Aug. – 3. Sep. 2005**

David R, **Brenner C**, Brunner S, Franz WM, MesP1 induces cardiovascularogenesis in ES cells

**Clin Res Cardiol 95: Suppl 5 (2006), P429**

David R, **Brenner C**, Stieber J, Brunner S, Schwarz F, Rupp R, Müller-Höcker J, Franz WM, MesP1, a key transcription factor required and sufficient to induce cardiovascular differentiation

**Clin Res Cardiol 96: Suppl 1 (2007); KN777**

David R, **Brenner C**, Stieber J, Brunner S, Schwarz F, Rupp R, Mueller-Hoecker J, Franz WM, MesP1 Induces Vertebrate Cardiovascular Differentiation by Dkk-1 Mediated Blockage Of Wnt-Signaling

**Circulation. 2007; 116:II\_151, Abstract 785**

## ORIGINALARBEITEN

---

David R, **Brenner C**, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Mueller-Hoecker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R, Franz WM, MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling

**Nature Cell Biology, 2008, 10(3): p. 338-345**