

Freie Universität



Berlin

**Analyse von kardialen Wnt/ β -Catenin
Interaktionspartnern bezüglich ihrer Möglichkeit,
die embryonale Kardiogenese zu aktivieren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

ANKE RENGER

(Berlin)

20. Dezember 2011

Die vorliegende Arbeit wurde vom April 2008 bis Dezember 2011 im Labor von Prof. Dr. Rainer Dietz (Molekulare und Klinische Kardiologie) am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch und ab Februar 2011 zusätzlich im Labor der Universitätsmedizin Göttingen Abteilung Pharmakologie unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Simone Spuler

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ali El-Armouche

Tag der Disputation: 15. Mai 2012

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Morphologie der murinen Herzentwicklung	1
1.2. Molekulare Aspekte der murinen Herzentwicklung	3
1.2.1. β -Catenin	4
1.2.2. Wnt	5
1.2.3. Wnt / β -Catenin Signalweg	6
1.2.4. T-Box Transkriptionsfaktoren	7
1.2.5. Weitere Faktoren der Herzentwicklung	8
1.3. Four-and-a-half LIM protein 2 (FHL2)	9
1.3.1. Allgemein	9
1.3.2. Funktionelle Rolle von FHL2	11
1.4. Morphologische und molekulare Veränderungen nach Herzschädigung	11
1.4.1. Herzinsuffizienz / Remodeling	11
1.4.2. Molekulare Aspekte des Remodelings	12
1.5. Embryonale Stammzellendifferenzierung	13
1.5.1. Embryonale Karzinoma-Zellen (embryonic carcinoma cells ECC)	13
1.5.2. Murine embryonale Stamm-Zellen (murine embryonic stem cells mESC)	14
1.6. Zielstellung	15
2. Material	16
2.1. Materialien	16
2.2. Oligonukleotide	21
2.3. Zell-Linien	23
2.4. Vektoren	24
2.5. Lösungen, Medien und Puffer	24
2.5.1. Lösungen und Zusätze	24
2.5.2. Medien	26
2.5.3. Puffer	28
3. Methoden	31
3.1. Hefe-Zwei-Hybrid System	31
3.1.1. <i>Small Scale Screen</i>	32
3.1.2. <i>Large Scale Screen</i>	34

3.1.3.	X-Gal Assay	36
3.1.4.	Re-Transformation	36
3.1.5.	Protein-Extraktion aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.1.6.	Plasmid-DNA-Isolation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
3.1.7.	Herstellung elektrokompetenter XL1-Blue Bakterien	37
3.1.8.	Elektroporation elektrokompetenter XL1-Blue Bakterien	38
3.2.	Molekularbiologische Methoden	38
3.2.1.	Reverse Transkription von RNA	38
3.2.2.	Quantitative realtime PCR (qRT-PCR)	38
3.2.3.	Southern Blot	39
3.2.3.1.	RNA-Sonden Präparation	39
3.2.3.2.	<i>in vitro</i> Transkription DIG-markierter RNA-Sonden	39
3.2.3.3.	Southern Blot zur Hybrdisierung von genomischer DNA mit RNA-Sonden	40
3.2.4.	Sequenzierungen	41
3.3.	Zellkultur	41
3.3.1.	Auftauen , Kultivierung und Einfrieren von Primärzellen und Zell-Linien	41
3.3.2.	HEK 293 und P19	41
3.3.3.	Präparation neonataler Rattenkardiomyozyten (NCM)	42
3.3.4.	Transfektion HEK 293 / P19 / NCM	42
3.3.5.	<i>in vitro</i> Differenzierung von P19 Zellen in Kardiomyozyten	43
3.3.6.	<i>in vitro</i> Assay mit einer murinen embryonalen Stammzell-Linie (mESC)	44
3.3.6.1.	Präparation muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)	44
3.3.6.2.	mESC-Kultivierung	45
3.3.6.3.	Transfektion von mESC zur Herstellung stabiler mESC-Klone	45
3.3.6.4.	Selektion und Vermehrung stabil transfizierter mESC-Klone	46
3.3.6.5.	<i>in vitro</i> Differenzierung von mESC in Kardiomyozyten	47
3.4.	Biochemie	48
3.4.1.	Protein-Isolation (nach Bänderle)	48
3.4.2.	Protein-Fraktionierung	48
3.4.3.	Co-Immunopräzipitation (Co-IP)	48
3.4.4.	Western Blot Analyse von Zell-Lysaten	49
3.4.5.	Luciferase-Reportergen-Assay	49
3.5.	Immunohistologie	50
3.5.1.	Immunofluoreszenzfärbung von Zellen und Gewebe-Paraffin-Schnitten	50
3.5.2.	FACS (<i>fluorescence activated cell sorting</i>) – Analyse	51

3.6. Tierexperimentelle Arbeiten	52
3.6.1. Versuchstiere und Genehmigungen	52
3.6.2. α MHC ^{merCremer} / Tbx5 ^{del/Ex3} <i>in vivo</i> Maus-Modell	52
3.7. Statistik	54
4. Ergebnisse	55
4.1. Hefe-Zwei-Hybrid-System	55
4.1.1. Herstellung einer β -Catenin Expression im AH109 <i>S.cerevisiae</i> –Stamm	55
4.1.2. Untersuchung der Selbstaktivierung des β -Catenin/pDBLeu-Expressions-Plasmids und Titration der 3-Aminotriazol (3AT) - Konzentration	55
4.1.3. Gefundene Interaktionspartner von β -Catenin im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen	57
4.1.4. Validierung der Interaktion zwischen FHL2 und β -Catenin	58
4.1.5. FHL2 Protein-Expression in verschiedenen Organen der Maus	59
4.1.6. Funktionelle Rolle von FHL2 in Bezug auf die nukleäre β -Catenin abhängige Transkription	59
4.2. Einfluss von FHL2 auf die kardiale <i>in vitro</i> Differenzierung im ECC-P19-Assay	61
4.2.1. Morphologie der EB-abgeleiteten Kardiomyozyten	61
4.2.2. Einfluss von FHL2 auf die Genexpression in EB-abgeleiteten Kardiomyozyten	62
4.2.3. Einfluss von FHL2 auf die frühe kardiale Genexpression	64
4.2.4. FHL2 aktiviert das kardiale Programm <i>in vitro</i>	66
4.3. Einfluss von FHL2 auf die kardiale <i>in vitro</i> Differenzierung einer murinen embryonalen Stammzell-Linie (αMHC-GFP / αMHC-NeoR)	68
4.3.1. Herstellung einer stabil transfizierten mES-Zelllinie mit FHL2-Überexpression	68
4.3.2. Analyse der stabil transfizierten FHL2-mESC-Klone	68
4.3.3. Einfluss von FHL2 auf die kardiale <i>in vitro</i> Differenzierung im stabil transfizierten mES-Klon 8	70
4.3.4. Einfluss von FHL2 auf die β -Catenin Regulation während der kardialen <i>in vitro</i> Differenzierung	76
4.3.5. Einfluss von FHL2 auf andere entwicklungsrelevante Zelltypen	77
4.3.6. Einfluss von FHL2 auf die Proliferation	78
4.3.7. Zusammenhang zwischen der verminderten Differenzierung nach stabiler FHL2-Überexpression in Klon 8 und der erhöhten β -Catenin Expression	79
4.4. Einfluss von Tbx5 auf die kardiale Differenzierung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	83
4.4.1. Tbx5-Regulation durch FHL2-Überexpression <i>in vitro</i>	83
4.4.2. Phänotypisierung einer kardialen Tbx5-Depletion <i>in vivo</i>	86
5. Diskussion	91
5.1. Identifikation kardialer β-Catenin Interaktionspartner	91
5.2. FHL2 fördert die frühe Kardiogenese <i>in vitro</i>	92

5.3. Pharmakologische Inhibition der β-Catenin abhängigen Transkription durch Quercetin re-aktiviert die durch FHL2-Überexpression inhibierte finale Differenzierung <i>in vitro</i>	97
5.4. Hypothese zum Einfluss der FHL2-Überexpression auf die Kardiogenese <i>in vitro</i>	97
5.5. Tbx5 beeinflusst die kardiale Differenzierung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	98
5.5.1. FHL2 interagiert mit Tbx5 <i>in vitro</i> und aktiviert den Tbx5-Promotor	98
5.5.2. Induzierte kardiale Tbx5-Depletion verringert die differenzierungsfähige kardiale Progenitorzell-Population <i>in vivo</i>	99
5.6. Ausblick	100
6. Zusammenfassung	102
7. Summary	104
8. Literatur	106
9. Anhang	114
10. Veröffentlichungen	125
11. Lebenslauf	126
12. Danksagung	127
13. Erklärung	128

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AD	Transaktivierende Domäne
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
Ca	caudal
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
cDNA	komplementäre DNA
CM / KM	<i>cardiomyocytes</i> / Kardiomyozyten
CPCs	<i>cardiac progenitor cells</i>
Cr	cranial
d	Tag
DB	DNA bindende Domäne
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	<i>post coitum</i>
EB	<i>embryoid body</i> ; Embryonalkörperchen
ECCs	<i>embryonic carcinoma cells</i> ; embryonale Karzinomazellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHT	<i>Engineered Heart Tissue</i>
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
FCS	fetales Kälberserum
FHF	<i>first heart field</i>
g	Gramm/Erdbeschleunigung
GFP	Green Fluorescent Protein

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HS	<i>horse serum</i> , Pferdeserum
IB	Immunoblot
ICM	<i>inner cell mass</i>
IP	Immunopräzipitation
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
LB	<i>luria broth</i>
LV	<i>left ventricular</i>
M	Molar
max.	maximal
MCS	Multiple Cloning Site
MEF	<i>murine embryonic fibroblasts</i> ; murine embryonale Fibroblasten
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
mESC	<i>murine embryonic stemcells</i> ; murine embryonale Stammzellen
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol/l
n	Anzahl
NCM	<i>neonatal rat cardiomyocytes</i> ; neonatale Rattenkardiomyozyten
NeoR	Neomycinresistenz
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD ₅₉₅	optische Dichte bei 595 nm
p	Wahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
pmol	Pikomolar
PVDF	Polyvinylidenfluorid

qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SC-Medium	<i>synthetic complete medium</i>
SHF	<i>second heart field</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
TG	transgen
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)
U	Unit (Enzymeinheit)
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VE	Volumeneinheit
wt	Wildtyp
yADH	hefespezifischer Alkohol-Dehydrogenase Promotor
z.B.	zum Beispiel
β-ME	β-Mercaptoethanol
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μml	Mikroliter

Abbildung	Titel	Seite
1	murine Herzentwicklung	2
2	<i>first</i> und <i>second heart field</i>	3
3	wichtige Faktoren während der frühen murinen Herzentwicklung	4
4	canonical Wnt/ β -Catenin Signalweg	6
5	multiphasische Rolle von β -Catenin während der Herzentwicklung	7
6	Expression und Funktion verschiedener TBX-Faktoren während der Herzentwicklung	8
7	wichtige Faktoren der unterschiedlichen Entwicklungsstadien von der humanen embryonalen Stammzelle zum vollständig ausgereiften Kardiomyozyten	9
8	Konsensus-Sequenz und Struktur des Zinkfinger-Motivs der LIM-Domäne	10
9	Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-System	31
10	Schema zur Ermittlung der für den <i>HIS3</i> -Phänotyp notwendigen 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) - Konzentration	33
11	Ermittlung und Auswertung der Hefereporter-Gene <i>URA3</i> , <i>HIS3</i> und <i>lacZ</i>	35
12	schematischer Aufbau zur Übertragung der enzymatisch geschnittenen DNA auf eine Nitrocellulosemembran mittels Kapillarkräfte	40
13	zeitlicher Ablauf des ECC (<i>embryonic carcinoma cells</i>) <i>in vitro</i> Assay mit der P19-Zelllinie	43
14	zeitlicher Ablauf des mESC (<i>embryonic stem cells</i>) <i>in vitro</i> Assay der A6- α MHC-NeoR/ α MHC-GFP Zelllinie	47
15	Generierung von Mäusen mit einer induzierbaren kardialspezifischen Tbx5-Depletion (Tbx5 ^{del Ex3/+})	53
16	Nachweis der Proteinexpression des β -Catenin / pDBLeu-Expressionsplasmids im AH109 Stamm von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
17	3-Aminotriazol (3AT) Titration und Untersuchung der Selbstaktivierung des β -Catenin/pDBLeu-Plasmids	56
18	Auswertung der 315 gefundenen vermeintlichen Interaktionspartner	57
19	Validierung der Protein-Interaktion von FHL2 und β -Catenin in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NCM)	58
20	organspezifische Fhl2-Proteinexpression einer adulten BL6/C57-Maus	59
21	Luciferase-Reportergen-Assay in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NCM) 12 h und 48 h nach Transfektion	60
22	Untersuchung des Einfluss von FHL2 auf die Kardiogenese im P19 <i>in vitro</i> Modell	61
23	Runterregulation von pluripotenten Markern bei gleichzeitiger Hochregulation von kardialen Markern	62

24	Immunofluoreszenzfärbung und semi-quantitative Auswertung von cTnT und Nkx2.5	63
25	Western Blot Analyse von Gesamt-Proteinlysaten für β -Catenin	63
26	qRT-PCR Analyse 24 h und Immunofluoreszenzfärbung 48 h nach transienter FHL2 Transfektion	64
27	Analyse der Protein-Expression in cytosolischen und nukleären Fraktionen nach transienter FHL2-Expression für FHL2 und β -Catenin	66
28	qRT-PCR Analyse und Immunofluoreszenzfärbung von 10d EBs nach FHL2- und Kontroll-Transfektionen ohne Differenzierungsmedium	67
29	Herstellung einer stabil transfizierten mES-Zelllinie mit FHL2-Überexpression	68
30	Nachweis der Integration des c-myc-FHL2 Fragments in das Genom der α MHC-GFP/ α MHC-Neo mES-Zelllinie	69
31	Untersuchung des Einfluss von FHL2 auf die Kardiogenese im mESC <i>in vitro</i> Modell	70
32	qRT-PCR- und FACS-Analyse zu Beginn der Differenzierung von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 7 d EBs	72
33	qRT-PCR Analyse vor Beginn der G418 Selektion von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 11 d EBs	73
34	qRT-PCR Analyse und Immunofluoreszenzfärbung nach „milder“ G418 Selektion von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 16 d EBs	73
35	qRT-PCR Vergleich nach „milder“ (200 μ g/ml) und „starker“ (400 μ g/ml) G418 Selektion von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 16 d EBs	74
36	FACS Analyse nach „starker“ G418 Selektion von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 16 d EBs	75
37	densitometrische Auswertung der Protein-Expression in cytosolischen und nukleären Fraktionen in 16 d EB für β -Catenin und FHL2	76
38	qRT-PCR Analyse zu Beginn der Differenzierung von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 3 d und 7 d EBs	78
39	qRT-PCR und FACS Analyse zur Untersuchung des Einfluss von FHL2 auf die Proliferation zu Beginn (7 d) und am Ende der Differenzierung (16 d) von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten EBs	78
40	Dokumentation der GFP-Expression nach Quercetin-Gabe ab Tag 9 (Q1) und Tag 11 (Q2) in wt- und Klon8-EBs	80
41	FACS-Analyse nach Quercetin-Gabe ab Tag 9 (Q1) und Tag 11 (Q2) in wt- und Klon8-EBs	81
42	Inhibition der β -Catenin abhängigen Transkription durch Quercetin-Gabe ab dem 9. Tag des Differenzierungsassays	82

43	regulatorischer Zusammenhang der Überexpression von FHL2 in Klon 8 auf die mRNA-Expression von Tbx5 und seinem Zielgen ANP durch qRT-PCR Analyse in 7 d und 16 d EBs	83
44	Nachweis der Protein-Interaktion zwischen FHL2 und Tbx5 mittels Co-Immunopräzipitation (Co-IP) und Immunfluoreszenzfärbung nach Co-Transfektion	84
45	qRT-PCR Analyse 48 h nach Transfektion eines Tbx5-Expressionsplasmid und Co-Transfektion mit einem FHL2-Expressionsplasmid in P19-Zellen.	85
46	Luciferase-Tbx5-Promotor-Assay	86
47	PCR und qRT-PCR Analyse zur Basal-Charakterisierung eines Tbx5 depletierten Maus-Modells	87
48	Immunfluoreszenzfärbung von Paraffin-Gewebeschnitten	87
49	Echodaten 4 Wochen nach Tamoxifen-Induktion der Tbx5-Depletion	88
50	Echodaten vor und 8 Wochen nach Tamoxifen-Induktion der Tbx5-Depletion	89
51	FACS-Analyse 8 Wochen nach Tamoxifen-induzierter Tbx5-Depletion	90
52	zusammenfassendes Schema der Hypothese des Einfluss von FHL2 auf die kardiale Differenzierung	98

Tabelle	Titel	Seite
1	Transformationsansätze für den <i>Small Scale Screen</i>	33
2	Transformationsansatz für den <i>Large Scale Screen</i>	34
3	Ansatz zur DIG-Markierung der RNA-Sonde	39
4	Transfektionsansatz für mESC mit dem Xfect-Stem® Reagenz von Clontech	46
5	Allgemeiner Transfektionsansatz für das Luciferase-Reportergen-Assay	50
6	Allgemeiner Transfektionsansatz für das Tbx5-Promotor-Assay	50
7	Ausgewählte β -Catenin-Interaktionspartnern	58

1. Einleitung

„Im Herzen eines Menschen ruht der Anfang und das Ende aller Dinge“
- Leo Nikolajewitsch Graf Tolstoi -

Das Herz, das wichtigste Organ im menschlichen Körper, ist von Beginn an unser ständiger Begleiter und reagiert auf unterschiedliche Art und Weise auf innere und äußere Einflüsse. Ist man aufgeregt, so schlägt es schneller. Wenn man traurig ist, so liegt einem sprichwörtlich etwas auf dem Herzen. Unser Herz schlägt während des gesamten Lebens ca. 3 Milliarden Mal. Aber nur, wenn es gesund ist.

Jedes Jahr sterben in Deutschland über 350.000 Menschen an den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung. Damit gehören die Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit 41% seit Jahren zur häufigsten Todesursache in Deutschland. 2010 waren davon 59.107 Fälle auf einen Myokardinfarkt zurückzuführen (Statistisches Bundesamt). Die Auslöser sind im Allgemeinen beruflicher Stress, Zeitdruck, ungesunde Ernährung und mangelnde körperliche Aktivität. Die gute und schnelle medizinische Versorgung der Infarktpatienten konnte in den letzten Jahren positiv dazu beitragen, dass die Zahl der Todesfälle von Infarktpatienten rückläufig ist. Dennoch ist anzumerken, dass viele Patienten aufgrund des Absterbens eines Teils ihres Herzmuskels für den Rest ihres Lebens mit einer verminderten Leistungsfähigkeit (Herzinsuffizienz) leben müssen. Ist es in Folge der oben genannten Faktoren zum Myokardinfarkt gekommen, ist eine schnelle medizinische Versorgung des Patienten notwendig, um das Absterben von Teilen des Herzmuskels und der damit verbundenen Narbenbildung möglichst gering zu halten. Darüber hinaus ist die genaue Aufklärung der molekularen Mechanismen, die während und nach einem Infarkt im Herzen ablaufen, von großer Bedeutung für zukünftige Therapieansätze.

1.1. Morphologie der murinen Herzentwicklung

Bereits kurze Zeit nach Befruchtung der Eizelle beginnt die Zellteilung, wodurch sich ein gesamter Organismus entwickeln wird. Bis zum 8-Zellstadium der sogenannten Morula sind alle Zellen totipotent, d.h. aus ihnen können sich noch sämtliche Zelltypen des adulten Organismus entwickeln. Die ersten Differenzierungsphasen erfolgen im Blastozystenstadium, wobei sich die äußere Zellschicht zunächst in den Trophoblast entwickelt, aus der später die Plazenta entsteht. Diese äußere Zellschicht umschließt den Embryoblast oder auch *inner cell mass* (ICM) bezeichnet, aus dem sich später der gesamte Organismus entwickeln wird. Das gekammerte Herz der Vertebraten ist das erste Organ, das sich während der Embryonalentwicklung bildet. Anhand des Modellorganismus *mus musculus* (gem. Hausmaus) konnten bereits viele entwicklungsbiologische Mechanismen untersucht und geklärt werden. Am Ende der Gastrulation im Mausembryo entstehen drei verschiedene Zellschichten – Endoderm, Ektoderm und Mesoderm. Die myokardialen Zellen stammen aus dem Mesoderm, wo sie zunächst als Herz-Vorläufer-Zellen (Progenitorzellen) auftreten.

Dabei ordnen sich Progenitorzellen zunächst in einer Linie (*primitive streak*) an, die die spätere anterior-posteriore Achse des Embryos bildet. Die erste erkennbare kardiale Struktur nennt sich *cardiac crescent*, das zum Zeitpunkt post coitum (E) 7.5 zu erkennen ist. Etwa um E7.75 beginnt die Migration der Progenitorzellen aus dieser Achse in die anteriore Region des murinen Embryos. Diese Zellen wandern anschließend ventral und bilden den Herzschlauch. Diese Struktur besteht aus einem inneren endothelialen Rohr, das von einer myokardialen Schicht umgeben ist. Danach erfolgt das so genannte Herz-*looping*, wobei der Herzschlauch eine spiralförmige Struktur annimmt. Zum Schluss erfolgt die Trennung der Herzkammern durch das interventrikuläre Septum. Zum Zeitpunkt E12.5 ist das Herz des Embryos wie im adulten Tier angelegt und voll funktionsfähig (Harvey 2002) (**Abb. 1**).

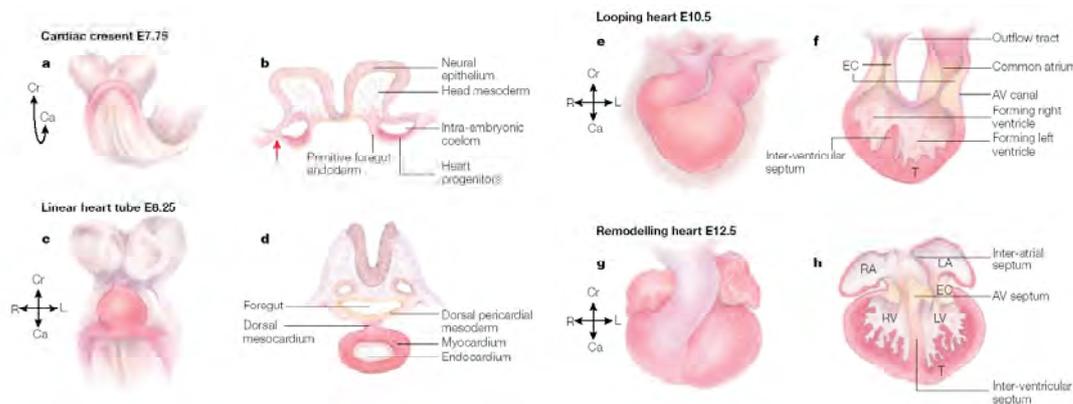


Abb. 1: murine Herzentwicklung

a und b) Die Progenitorzellen wandern *cranial* und *lateral* zum Übergang zwischen embryonaler und extra-embryonaler Region (roter Pfeil in **b**) und ordnen sich sichelförmig unter den Zellen an, die später den Kopf bilden.

c und d) Zur Bildung der Herzröhre wandern die Progenitorzellen *ventral*.

Diese Struktur besteht aus einem inneren endothelialen Rohr, das von einer myokardialen Schicht umgeben ist.

(**a** und **c** zeigen den gesamten Embryo; **b** und **d** zeigen einen *transversalen* Schnitt durch den Embryo innerhalb der Herzregion)

(Harvey 2002)

e und f) Während des Herz-*loopings* verengt sich der Zufluss inklusive der künftigen Atrien *dorsal* und *ventral*, so dass sich der Zufluss nun oberhalb der sich entwickelnden Ventrikel befindet. Im atrio-ventrikular (AV) Kanal bilden sich die künftigen Atrien sowie die Herzklappen aus.

g und h) Zum Schluss erfolgt die Trennung in linke (LV) und rechte (RV) Herzkammer durch das inter-ventrikuläre Septum, sowie die Vervollständigung der Atrien (LA und RA).

(**e** und **g** zeigen das gesamte Herz; **f** und **h** zeigen einen longitudinalen Schnitt durch das Herz)

Cr = cranial; Ca = caudal; R = right; L = left

Neue Studien belegen, dass zwei Progenitor-Zelllinien bei der Herzentwicklung beteiligt sind und als sog. Herz-Felder bezeichnet werden (Buckingham, Meilhac et al. 2005). Diese Bereiche sind dadurch definiert, dass es sich um kleine Regionen handelt, in denen Zellen mit myokardialem Potential lokalisiert sind. Um den Tag E6.5 werden die frühesten Marker der kardialen Progenitorzellen aktiviert – *mesoderm posterior* (**Mesp**) 1 und 2. Diese Progenitorzellen differenzieren sich dann ab E7.5 in zwei unterschiedliche Populationen – dem *first heart field* (FHF) und dem *second heart field* (SHF) (Buckingham, Meilhac et al. 2005), die sich durch die Expression von verschiedenen

Markergenen unterscheiden (Ai, Fu et al. 2007). Die Zellen des FHF, die ab E7.5 durch die Expression von *T-box protein 5* (**Tbx5**), *heart and neural crest derivatives expressed 1* (**ehand(1)**), *fibroblast growth factor 8* (**Fgfs 8**) und *bone morphogenic protein 10* (**Bmp10**) definiert sind, bilden das *cardiac crescent*. Die Progenitorzellen des SHF, die durch die Expression der Progenitor-Marker *insulin gene enhancer protein 1* (**Isl-1**), *heart- and neural crest derivatives-expressed protein 2* (**dhand(2)**) und *fibroblast growth factor 10* (**Fgfs 10**) ab E7.0 definiert sind, ordnen sich hingegen medial zum *cardiac crescent* an. Die Zellen beider Populationen wandern dann zur Mitte, wo die FHF Zellen den linearen Herzschlauch bilden, aus dem später der linke Ventrikel wird (**Abb. 2**). Die SHF Zellen hingegen proliferieren, migrieren und interagieren mit Kardiomyozyten des FHF, das zum Herz-*looping* führt. Darüber hinaus sind die SHF Zellen an der Bildung des rechten Ventrikels, sowie dem Zu- und Abflussbereich des Herzens beteiligt (Buckingham, Meilhac et al. 2005).

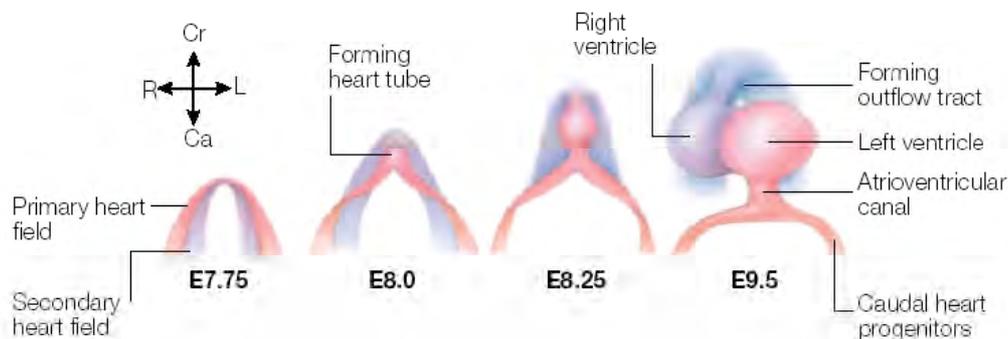


Abb. 2: First und second heart field.

Als *heart-fields* werden Bereiche bezeichnet, in denen Zellen mit myokardialen Potential lokalisiert sind. Die Zellen des *first (primary) heart field* (FHF) bilden das sog. *cardiac crescent*, wohingegen sich die Progenitorzellen des *second heart field* (SHF) medial zum *cardiac crescent* anordnen. Die Zellen beider Populationen wandern dann zur Mitte, wo die FHF Zellen den linearen Herzschlauch bilden, aus dem später der linke Ventrikel wird. Die SHF Zellen hingegen proliferieren, migrieren und interagieren mit Kardiomyozyten des FHF, das zum Herz-*looping* führt. Darüber hinaus sind die SHF Zellen an der Bildung des rechten Ventrikels, sowie dem Zu- und Abflussbereich des Herzens beteiligt. (Harvey 2002)

1.2. Molekulare Aspekte der murinen Herzentwicklung

Kardiale Progenitorzellen unterliegen verschiedenen Einflüssen, um sich der schnellen Veränderung durch Zellmigration und Veränderungen der dreidimensionalen Struktur des sich entwickelnden Herzens anpassen zu können. Die Entwicklung der kardialen Progenitorpopulation ist von verschiedenen molekularen Signalwegen beeinflusst, die von umliegenden endothelialen, endocranialen und mesodermalen Zellen der anfänglichen einfachen Herzstruktur entstammen. Die frühesten kardialen Marker sind **Mesp 1** und **2**, die vorübergehend im sich neubildenden Mesoderm gebildet werden und entscheidend für die Zellmigration sind. Die eigentliche Zellmigration, Proliferation, Spezifikation und Differenzierung ist durch komplexe Prozesse aus positiven und negativen Signalwegen gekennzeichnet, die verschiedene Faktoren wie *bone morphogenic protein* (**BMP**) und *fibroblast growth factors* (**FGFs**) sowie die Regulation der Expression von **Wnt** (*wingless* wg Homolog) und **Notch** beinhalten (**Abb. 3**). Wnt reguliert bereits sehr früh durch Aktivierung oder Inaktivierung die erste Entscheidung für mesodermale Zellen sich zu Blutzellen (Wnt ist aktiviert)

oder kardialen Zellen (Wnt ist inhibiert) zu entwickeln. Zusammen mit BMP, das sowohl für die Entwicklung von Blut- als auch kardialen Zellen notwendig ist, wird somit die Grundlage zur Initiierung der Entwicklung vom Mesoderm in kardiales Gewebe gelegt. FGFs sind neben der frühen kardialen Spezifikation und Differenzierung auch für die Eingrenzung des kardialen Gewebes des sich entwickelnden Embryos verantwortlich (Marguerie, Bajolle et al. 2006); (Rosenblatt-Velin, Lepore et al. 2005).

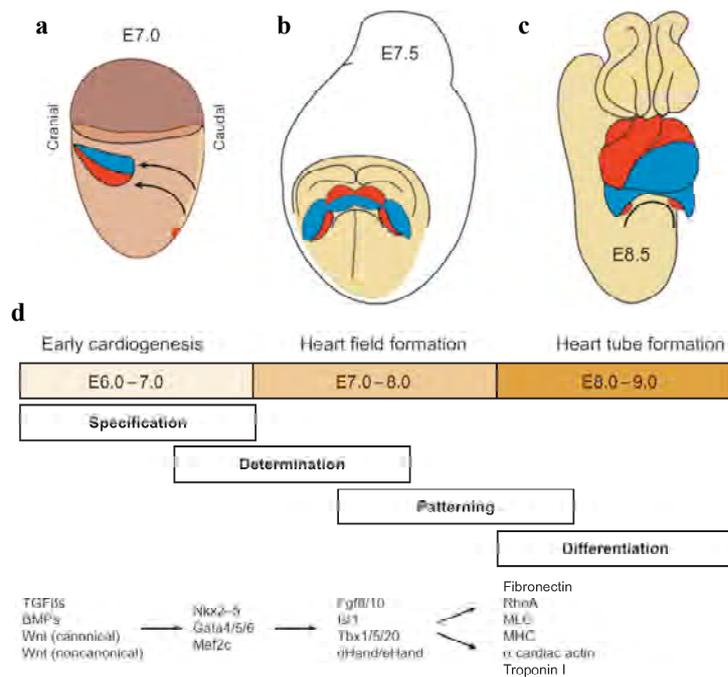


Abb. 3: Wichtige Faktoren während der frühen murinen Herzentwicklung. Der aufsteigende Schenkel der Herzröhre, der später den rechten Ventrikel, *Conus* und *Truncus* bildet, ist in rot dargestellt. Der absteigende Schenkel, der später die Vorhöfe, den Atrioventricular Kanal und den linken Ventrikel bildet, ist blau dargestellt. **(a)** Die Herz-Formung beginnt E7.0 mit der Anordnung beider Herzbereiche in der mittleren Ebene des Embryos. **(b)** Das sog. *cardiac crescent* bildet sich E7.5 und lässt die beiden Herzfelder, die nun übereinander angeordnet sind, erkennen. **(c)** Die Bildung der Herzröhre mit *looping* erfolgt E8.5. **(d)** Die vier signifikanten Stadien der Herzentwicklung (Spezifikation, Determination, Musterung, Differenzierung), die mit der Expression wichtiger entwicklungsspezifischer Gene einhergehen.
 modifiziert nach (Abu-Issa and Kirby 2007)

1.2.1. β-Catenin

Der Wnt/β-Catenin Signalweg spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Herzens. β-Catenin gehört zu den Catenin-Proteinen, die als Verbindungsproteine der cytoplasmatischen Domäne des transmembranen Cadherin entdeckt wurden. (McCrea and Gumbiner 1991) (Kemler 1993) β-Catenin ist bifunktional als Zelladhäsions- und Signaltransduktionsmolekül an verschiedenen Prozessen der Embryonalentwicklung (Clevers 2006) wie zum Beispiel der Kardiogenese (Klaus, Saga et al. 2007) beteiligt. Als Signaltransduktionsmolekül ist β-Catenin bei der Gen-Expression von Zielgenen des *Wnt*-Signalweges beteiligt. Die Primärstruktur von β-Catenin verfügt über eine N-terminale Domäne von 150 Aminosäuren, einer zentralen Region von 550 Aminosäuren, die als 12 Armadillo-Wiederholungen (*arm repeats*) organisiert sind, und einer C-terminalen Domäne von 100 Aminosäuren (Daniels, Eklof Spink et al. 2001). Die N-terminale Region bildet unter anderem die Bindungsstelle für α-Catenin. Die *arm-repeat* Region fungiert als Bindungsstelle für verschiedene Proteine wie zum Beispiel *E-Cadherin*, *T-cell-factor (Tcf)* / *lymphoid-enhancer factor (Lef)*, *Adenomatosis Polyposis Coli (APC)* und *Axin* (Peifer and Polakis 2000). An den C-Term bindet unter anderem das *TATA-binding protein (TBP)*, wodurch β-Catenin eine zentrale Rolle während der Transkription der *Wnt*-Zielgene einnimmt (Hecht, Litterst et al. 1999).

1.2.2. Wnt

Die Wnt-Familie besteht aus verschiedenen Wnt-Proteinen, die unterschiedliche Prozesse sowohl aktivieren, als auch inaktivieren können. Das Drosophila-Gen *wg* (wingless), das die Segment-Polarität während der Larven-Entwicklung kontrolliert, wurde bereits 1980 entdeckt (Nusslein-Volhard and Wieschaus 1980). Das *Wnt1*-Gen der Maus wurde 1982 als Proto-Onkogen identifiziert (Nusse and Varmus 1982). Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass *wg* ein Homolog zu *Wnt1* ist (Rijsewijk, Schuermann et al. 1987). Auch in anderen Tieren wie *Xenopus* (Schneider and Mercola 2001) oder *C. elegans* (Shackleford, Shivakumar et al. 1993) wurden Homologe gefunden, die den Einfluss von *Wnt1* auf Entwicklungsprozesse bestätigt. Das Wnt1-Protein stellt den Hauptsignalgeber für den Wnt/ β -Catenin-Signalweg dar. Für die Herzentwicklung ist die Rolle von β -Catenin als Signalmolekül innerhalb der Wnt-Signalwege entscheidend, wobei man den *canonical* und *non-canonical* Wnt/ β -Catenin-Signalweg unterscheidet. Zum *non-canonical*-Signalweg gehören die nicht β -Catenin vermittelnden Effekte von Wnt und werden daher im Folgenden nicht weiter erwähnt.

Innerhalb des *canonical* Wnt/ β -Catenin-Signalweg stellt β -Catenin einen transkriptionellen Co-Aktivatoren dar (**Abb. 4**). Erhalten die Zellen ein Wnt-Signal, wird β -Catenin in den Zellkern transportiert (**Abb. 4b**). Die Bindung von Wnt-Glykoproteinen an die *frizzled*-Rezeptoren der Zelle hat die Phosphorylierung des cytoplasmatischen Proteins *Dishevelled* (*Dsh*) zur Folge. Das somit aktivierte *Dsh* verhindert durch seine Bindung an *Axin* die *GSK-3 β* -abhängige Phosphorylierung von β -Catenin. Da der Weg zum proteasomalen Abbau von β -Catenin somit inaktiviert wurde, kommt es zunächst zu einer Akkumulation von β -Catenin im Cytosol. Das freie, unphosphorylierte β -Catenin transloziert anschließend in den Zellkern oder wird in der Zellmembran eingebaut. Im Zellkern bindet das unphosphorylierte β -Catenin an Transkriptionsfaktoren der *Tcf* – Familie, wodurch es im Anschluss zur Aktivierung der Transkription spezifischer *Wnt*-Zielgene kommt. Im Gegensatz dazu, erfolgt ohne Wnt-Signal der proteasomale Abbau von β -Catenin im Cytosol (**Abb. 4a**). Dabei wird das frei im Cytosol vorkommende β -Catenin zunächst durch die *Casein-Kinase-I* (*CKI*) phosphoryliert und anschließend von *Axin* und *APC* in einen Multi-Protein-Komplex gebunden. Sowohl *Axin*, als auch *APC* sind Produkte von Tumorsuppressor-Genen. Wird dieser Multi-Protein-Komplex gebildet, kommt es gleichzeitig durch die *glycogen synthase kinase- (GSK-) 3 β* zur Phosphorylierung von *Axin* und *APC*, das zur Stabilisierung des gesamten Komplexes beiträgt. Diese Stabilisierung ermöglicht dann wiederum die weitere Phosphorylierung von β -Catenin. Das vierfach phosphorylierte β -Catenin wird zum Schluss durch die *β -Trcp-Ubiquitin-Ligase* gebunden, ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt.

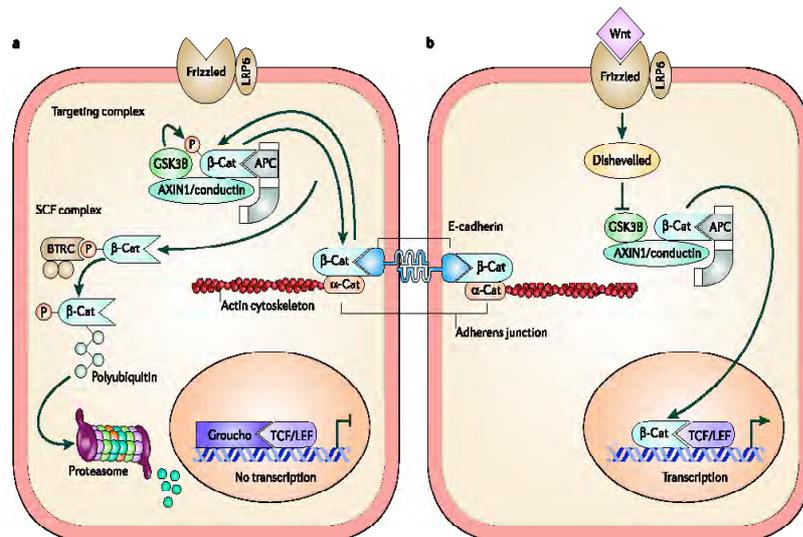


Abb. 4: kanonischer *Wnt/β-Catenin* Signalweg. (Nathke 2006)

(a) In Abwesenheit eines *Wnt*-Liganden, wird das frei im Cytosol vorkommende β -Catenin (β -Cat) zunächst durch die *Casein-Kinase-1* (*CK1*) phosphoryliert, anschließend von *Axin* und *APC* in einem Multi-Protein-Komplex (SCF Komplex) gebunden und es kommt durch die *glycogen synthase kinase-3β* zur Phosphorylierung von *Axin* und *APC*, was zur Stabilisierung des Komplexes beiträgt. Anschließend erfolgt eine weitere Phosphorylierung von β -Catenin. Das vierfach phosphorylierte β -Catenin wird zum Schluss durch die β -*Trcp-Ubiquitin-Ligase* (*BTRC*) gebunden, ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt.

(b) Als Antwort auf die *Wnt*-Bindung an den *frizzled*-Rezeptor, wird das cytoplasmatische Protein *Dishevelled* (*Dsh*) phosphoryliert und bindet an *Axin*, was die *GSK-3β*-abhängige Phosphorylierung von β -Catenin verhindert. Somit kann β -Catenin in den Nucleus translozieren, wo es zusammen mit dem *Tcf/Lef*-Komplex die Transkription der *Wnt*-Zielgene aktiviert.

1.2.3. *Wnt/β-Catenin* während der Herzentwicklung

Während der Herzentwicklung der Vertebraten spielt der *Wnt/β-Catenin* Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle (Naito, Shiojima et al. 2006). Die Aktivierung und Inaktivierung von β -Catenin zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der frühen Embryogenese steuert unter anderem die Entwicklung des Herzens (**Abb. 5**) (Ueno, Weidinger et al. 2007). Zunächst ist die Aktivierung von β -Catenin wichtig für die Ausbildung des Mesoderms. Anschließend erfolgt ein schneller Wechsel zur negativen Signalkaskade, das heißt, zu Beginn der Gastrulation ist β -Catenin inhibiert. Diese Signal-Unterdrückung ist entscheidend damit sich die embryonalen Stammzellen in Richtung kardialer Progenitorzellen entwickeln. Darüber hinaus hilft die Inhibition die in 1.1. beschriebenen Herzfelder in ihrer Größe zu definieren. Zum Ende der Gastrulation kommt es dann erneut zur β -Catenin Aktivierung, wodurch sich die kardialen Progenitorzellen erneuern. Damit aus diesen Progenitorzellen ausdifferenzierte Kardiomyozyten werden, muss das β -Catenin-Signal wieder unterdrückt werden, was über den *Wnt*-Inhibitor *Dickkopf - 1* (**Dkk1**) erfolgt. Es ist allerdings noch unbekannt, welche

Gene „downstream“ von β -Catenin die Proliferation, Spezifikation und Differenzierung der kardialen Progenitorzellen steuern.

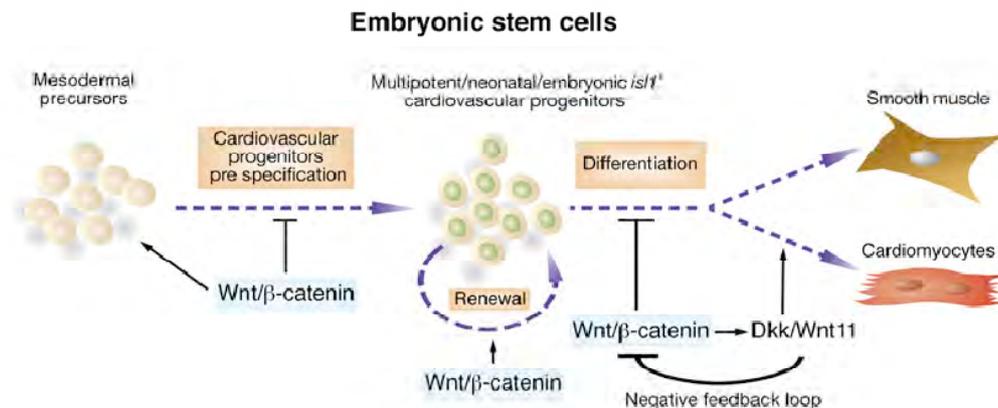


Abb. 5: Multiphasische Rolle von β -Catenin während der Herzentwicklung.

Zur Ausbildung des Mesoderms ist ein positives β -Catenin-Signal notwendig. Es erfolgt ein schneller Wechsel zur Inhibition des Wnt/β -Catenin-Signals, so dass sich aus den embryonalen Stammzellen kardiale Vorläuferzellen bilden. Für die Erneuerung dieser Progenitorzellen ist wiederum ein positives β -Catenin-Signal nötig. Damit aus diesen Progenitorzellen ausdifferenzierte Kardiomyozyten werden, muss das β -Catenin-Signal wieder unterdrückt werden, was über den Wnt -Inhibitor Dickkopf (Dkk) -1 erfolgt. (Tzahor 2007)

1.2.4. T-Box Familie während der Herzentwicklung

Mitglieder der T-box Familie sind neben β -Catenin wichtige Transkriptionsfaktoren, die für die Entwicklung des Herzens essentiell sind. Im Zusammenhang mit dem Holt-Oram-Syndrom (HOS), einer angeborenen Herzschwäche, konnte der Transkriptionsfaktor Tbx5 als genetische Ursache festgestellt werden (Bruneau, Logan et al. 1999). Durch verschiedene entwicklungsbiologische Untersuchungen konnte die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren-Familie (**T-Box Familie; TBX**) zunehmend geklärt werden. Die T-Box Familie besteht sowohl beim Menschen als auch bei der Maus aus 17 verschiedenen Faktoren (Naiche, Harrelson et al. 2005). Speziell die Mitglieder der Tbx1-Untergruppe Tbx1, Tbx18 und Tbx20, sowie der Tbx2-Untergruppe Tbx2, Tbx3 und Tbx5 sind von Bedeutung für die Rekrutierung der richtigen Zellen, deren Spezifikation, Differenzierung und Wachstum und tragen somit entscheidend zur Struktur und Formgebung des sich entwickelnden Herzens bei. Tbx5 ist dabei hauptsächlich für die anterior-posteriore Anordnung des sich entwickelnden Herzens verantwortlich. Zusammen mit Tbx20 und *NK2 transcription factor related, locus 5 (Nkx2.5)* ist Tbx5 darüber hinaus für die Differenzierung der Herzkammer zuständig, in dem es verschiedene Herzkammer-exprimierende Gene (*Connexin 40 Cx40*; *atrial natriuretic peptide ANP*) positiv regulieren kann. Tbx20 selbst steht im Zusammenhang durch die Repression der Tbx2 Expression die Differenzierung der Herzkammer zu gewährleisten. Weitere Tbx-Gene sind in stark separierten Bereichen des sich entwickelnden Herzens zu finden, wie z.B. Tbx1 im Ausfluss-Trakt, sowie Tbx18 am Sinushorn (**Abb. 6**) (Naiche, Harrelson et al. 2005) (Plageman and Yutzey 2005) (Stennard and Harvey 2005). Darüber hinaus war Tbx5 bisher eher dafür bekannt auf transkriptioneller Ebene die Herzentwicklung zu regulieren. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass Tbx5 selbst oder aber eines seiner Zielgene auch beim Ablauf des Zell-Zyklus von entscheidender Bedeutung ist.

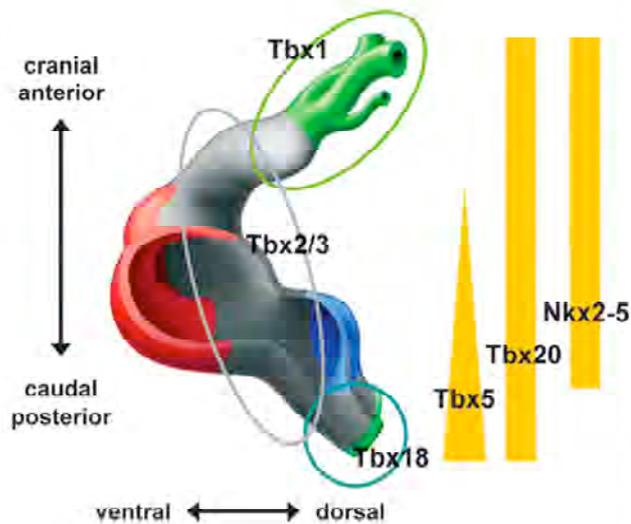


Abb. 6: Expression und Funktion verschiedener TBX-Faktoren während der Herzentwicklung. Die schematische Darstellung eines Mausherzens zum Zeitpunkt E9.5-10.5 zeigt die verschiedenen Expressionsbereiche von TBX-Faktoren. Tbx5 ist zum Einen für die anterior-posteriore Ausrichtung und zum Anderen zusammen mit Tbx20 und Nlx2.5 für die Differenzierung der Herzkammern verantwortlich. Wobei Tbx20 durch die Repression der Tbx2-Expression innerhalb der Herzkammer-Bereiche die Differenzierung unterstützt. Daher ist die Expression von Tbx 2 und Tbx3 nur ausserhalb der Herzkammerbereiche detektierbar. Darüber hinaus ist Tbx1 im Bereich des Ausflusstraktes und Tbx18 am Sinushorn exprimiert. (Hoogaars, Barnett et al. 2007)

Während der ersten Phasen der Migration von kardialen Progenitorzellen, reduzieren diese ihre DNA-Synthese und verlassen zunehmend den Zellzyklus, um die finale Differenzierung einzuleiten. Bereits während der frühen embryonalen Phasen der Zellproliferation werden die ersten kardialen Marker (Tbx5, Tbx20 und Nkx2.5) gebildet. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Tbx5-Depletion einen verlängerten Zellzyklus in der G1/S-Phase zur Folge hat, wodurch es zu einer schwerwiegenden strukturellen Veränderung des Cytoskellets aufgrund einer fehlerhaften extrazellulären Matrix kommt (Goetz, Brown et al. 2006).

1.2.5. Weitere Faktoren während der Herzentwicklung

Neben den bereits erwähnten Faktoren β -Catenin, die T-Box Familie und Nkx2.5 sind weitere wichtige Faktoren an der Entwicklung und Differenzierung der embryonalen Stammzellen in ausgereifte Kardiomyozyten beteiligt und können somit als Marker für die einzelnen Stadien genutzt werden. Im undifferenzierten Stammzellstadium sind die pluripotenten Marker *octamer-binding protein 4* (**Oct4**), *homeobox transcription factor Nanog* und *stage-specific embryonic antigen 1* (**SSEA1**) stark exprimiert (Berrill, Tan et al. 2004). Mit der Spezifikation und der zunehmenden Differenzierung nimmt die Expression dieser Marker sehr stark ab. *Insuline-like growth factor binding protein 5* (**Igfbp5**) ist bereits während der frühen Kardiogenese im Bereich des *cardiac crescent* exprimiert (Prall, Menon et al. 2007). Es ist sowohl an der Regulation des Zell-Schicksals bei der Embryonalentwicklung beteiligt, als auch verantwortlich für die kardiale Zell-Spezifikation (Salih, Tripathi et al. 2004). Seine wichtige Rolle innerhalb der frühen Kardiogenese zeigt darüber hinaus die Tbx5-dosisabhängige Regulation der Igfbp5 Expression (Mori, Zhu et al. 2006), sowie die Regulation von Igfbp5 durch den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 (Prall, Menon et al. 2007). Wie bereits in 1.2.3. erwähnt, führt die Inhibition des Wnt-Signals zur Entwicklung der mesodermale (Genini, Schwalbe et al. 1997) in prä-kardiale mesodermale Zellen. Die Inhibition des Wnt-Signals erfolgt dabei durch die Expression des Wnt-Inhibitor Dkk-1. Darüber hinaus ist die Expression von Brachyury T (**Bry T**) kennzeichnend für dieses mesodermale Stadium. Bry T ist notwendig für die mesodermale Formation

und die Induktion von Genen für die weitere kardiale Differenzierung (David, Jarsch et al. 2011). Kurz nach Beginn der Expression von *BryT* und *Dkk-1* erfolgt die Expression von *Mesp1* und kennzeichnet somit das Stadium der prä-kardialen mesodermalen Zellen. Zum gleichen Zeitpunkt sind *insuline enhancer binding protein 1 (Isl-1)* und *vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2 = Flk-1)* ebenfalls stark exprimiert und dienen somit neben *Mesp1* als Marker für dieses frühe kardiale Stadium. Die weitere Differenzierung in kardiale Progenitorzellen (*cardiac progenitor cells, CPC*) ist durch die Expression der frühen kardialen Marker *Nkx2.5*, *Tbx5*, *Tbx20*, *GATA binding protein 4 (GATA4)*, *myocyte enhancer factor 2C (Mef2c)*, *hand(1)* und *dhand(2)* erkennbar. Ist die Expression von kardialem Troponin T (**cTnT**), sarcomeric-actinin, *myosin heavy chain (MHC)* und *myosin light chain 2 articular / ventricular (MLC2A/V)* detektierbar, ist die Differenzierung zum Kardiomyozyten fast abgeschlossen. Die vollständige Differenzierung in einen ausgereiften Kardiomyozyten zeigt sich dann zusätzlich in physiologischen und strukturellen Merkmalen, wie z.B. vollständig ausgebildeten und organisierten Myofibrillen mit Sarcomerstrukturen (**Abb. 7**).

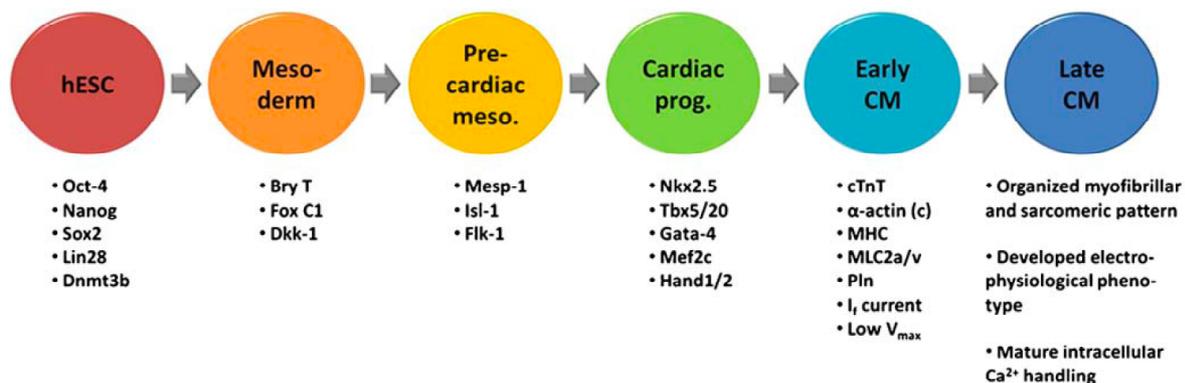


Abb. 7: Wichtige Faktoren der unterschiedlichen Entwicklungsstadien von der humanen embryonalen Stammzelle zum vollständig ausgereiften Kardiomyozyten.

Frühe mesodermale Zellen entwickeln sich über ein prä-kardiales Stadium zu kardialen Progenitorzellen. Frühe und späte Kardiomyozyten (*cardiomyocytes, CM*) können anhand von physiologischen Merkmalen von einander unterschieden werden. Wichtige Markergene der einzelnen Entwicklungs-Stadien sowie physiologische und strukturelle Merkmale sind angegeben. (Vidarsson, Hyllner et al. 2010)

1.3. Four-and-a-half-LIM only protein 2 (FHL2)

1.3.1. Allgemein

Bereits 1988 wurde **MEC-3** in *C.elegans* als neuer Transkriptionsfaktor mit einer Homeodomäne und einer bisher nicht beschriebenen Cystein-reichen Domäne beschrieben. Später wurde diese Domäne auch im *lineage protein 11 (LIN-11)* von *C. elegans* und *ISL-1* der Ratte gefunden. Daher ergab sich für alle Proteine, die über diese Cystein-reiche Domäne verfügen das Akronym LIM-Domäne (LIN-11, ISL-1, MEC-3) (Freyd, Kim et al. 1990) (Karlsson, Thor et al. 1990) (Way and Chalfie 1988). Die LIM-Domäne von 135 humanen LIM-Domänen ergab die in **Abb. 8** gezeigte Konsensus-Sequenz (**Abb. 8a**) und enthält zwei Zinkfinger-Motive (**Abb. 8b**), von denen jeder jeweils ein Zink-Atom bindet. Die Ähnlichkeit des 2. Zinkfingers mit dem DNA-bindenden Zink-Finger von *GATA4* lässt vermuten, dass LIM-Domänen auch mit DNA interagieren können (Bach 2000). Diese Domäne ist

1.3.2. Funktionelle Rolle von FHL2

FHL2 ist bereits sehr früh während der Embryonalentwicklung E7.5 erstmals im *cardiac crescent* exprimiert. Ein Zusammenhang zwischen FHL2 und Nkx2.5 konnte darüber hinaus durch Co-Lokalisation während der frühen Embryonalentwicklung (E7.5) gezeigt werden (Kong, Shelton et al. 2001). Aber auch post-natal ist ein Präferenz von FHL2 besonders im kardialen Bereich des Ventrikularseptums und des AV-Knotens, sowie des vaskulären Systems nachweisbar (Kong, Shelton et al. 2001) (Chu, Ruiz-Lozano et al. 2000). FHL2 spielt bereits bei der Entwicklung des Septums, sowie des gesamten Kreislaufsystems eine entscheidende Rolle und beeinflusst deren Physiologie. Dem gegenüber stehen Untersuchungen an FHL2 knock-out Mäusen, die unter Basalbedingungen weder eine abnormale Herzentwicklung, noch Veränderungen in der Herzfunktion zeigten (Chu, Bardwell et al. 2000). Allein unter Stress-Induktion mit einem β -androgenen Stimulus zeigten die Tiere eine leicht erhöhte Hypertrophie (Kong, Shelton et al. 2001). Es hat sich außerdem gezeigt, dass bei 51 % der Patienten vor einer Bypass-Operation FHL2 im rechten Atrium detektiert werden konnte und es in 65 % der Fälle nach dem Bypass zu einer signifikanten Erhöhung des FHL2-Proteinlevels kam (Wan, Yim et al. 2002). Die genauen regulatorischen Vorgänge sind bisher noch unbekannt, zeigen aber einen Zusammenhang zwischen FHL2 und einer Herzschädigung. Ein wichtiger, bereits bekannter Interaktionspartner, ist β -Catenin (Wei, Renard et al. 2003). So wurden in nicht-kardialen Zelllinien verschiedene Funktionsweisen von FHL2 auf die β -Catenin abhängige Transkription festgestellt. Es konnte eine Aktivierung in HEK293-Zellen und eine Inhibition in C2C12-Zellen gezeigt werden (Martin, Schneider et al. 2002). Das unterstreicht zusätzlich den dualen Charakter von FHL2 und seine Fähigkeit promotor-spezifische Co-Aktivatoren und Repressoren zu rekrutieren. Eine weitere wichtige Funktion von FHL2 ist seine Verbindung zur Zellzyklus-Regulation. Im bereits erwähnten Fhl2 knockout-Mausmodell wurde eine drastische Reduktion der zellzyklisch-spezifischen Gene Cyclin D1 und c-myc in murinen Fibroblasten gefunden. Cyclin D1 und c-myc sind direkte Zielgene von β -Catenin, was zusätzlich die funktionelle Verbindung von FHL2 und β -Catenin bestärkt (McLoughlin, Ehler et al. 2002) (Martin, Schneider et al. 2002). Diese Daten zeigen ausserdem, dass FHL2 bisher nur im Zusammenhang mit Herzschädigung steht, jedoch noch keine direkte Verbindung zwischen FHL2 und der kardialen Differenzierung hergestellt werden konnte.

1.4. Morphologische und molekulare Veränderungen nach Herzschädigung

1.4.1. Herzinsuffizienz / Remodeling

Die ersten Minuten nach einem Herzinfarkt sind sehr entscheidend für den weiteren Verlauf, denn kommt es infolge einer länger als 20 Minuten andauernden Durchblutungsstörung im Herzen (Ischämie), beginnt das irreversible Absterben der Kardiomyozyten. Der Verlust der Kardiomyozyten wird durch nicht-kontraktionsfähige Bindegewebszellen kompensiert, dadurch kommt es jedoch zunehmend zu einer Verhärtung des betroffenen Gewebes bis hin zur Narbenbildung im Infarktbereich (Fibrose). Um die Herzfunktion dennoch wenigstens kurzfristig aufrechtzuerhalten, beginnen die verbliebenen Kardiomyozyten sich in Länge und Breite auszudehnen. Dieser Prozess ist jedoch

begrenzt, wodurch es langfristig gesehen zur Dilatation des Herzens mit zunehmend dünner werdenden Ventrikelwänden (linksventrikuläres (LV) - Remodeling) kommt. Diese Dilatation geht einher mit einem enormen Verlust der Leistungsfähigkeit aufgrund der bestehenden Herzmuskelschwäche (Herzinsuffizienz) (Dorn 2007). Mit Medikamenten und bspw. einem Herzschrittmacher kann die Funktion des Herzens teilweise wiederhergestellt werden, nicht jedoch die abgestorbenen Kardiomyozyten. Neue Studien zeigen, dass das vertebrale Herz ein geringes Potential zur endogenen Regeneration besitzt (Hsieh, Segers et al. 2007) (Porrello, Mahmoud et al. 2011). Die Grundlage dieser und anderer Studien besteht darin, Markergene zu identifizieren, die ähnlich wie bei der embryonalen Herzentwicklung exprimiert sind und somit einen potentiellen kardialen Stammzell-Charakter aufweisen (Messina, De Angelis et al. 2004). Der Gesamtanteil der endogenen Progenitorzellpopulation wird nur auf ca. 1 % geschätzt, es ist in diesem Zusammenhang besonders wichtig die molekularen Mechanismen und Zusammenhänge der embryonalen Kardiogenese zu klären, die zur Rekrutierung der endogenen Stammzellen und deren Differenzierung führen.

1.4.2. Molekulare Aspekte des Remodelings

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die kardial-spezifische Depletion von β -Catenin einen positiven Einfluss auf das LV-Remodeling hat, in dem es zum Anstieg der Population an differenzierungsfähigen Progenitorzellen (*cardiac progenitor cells*; CPCs) führt (Zelarayan, Noack et al. 2008). Das bedeutet, dass β -Catenin vermutlich nicht nur, wie in 1.2.3. erwähnt, während der Herzentwicklung eine entscheidende Rolle spielt, sondern auch an der Reparatur von geschädigtem Herzgewebe infolge des linksventrikulären-Remodelings beteiligt ist. (Haq, Michael et al. 2003; Baurand, Zelarayan et al. 2007; Zelarayan, Gehrke et al. 2007). Darüber hinaus konnte in dem beschriebenen Maus-Modell eine spezifische Hochregulation der frühen Transkriptionsfaktoren Tbx2, Tbx5 und GATA4 beobachtet werden. Aufgrund der Tatsache, dass Tbx5 ebenfalls ein Marker des ersten Herzfeldes ist, wurde vermutet, dass Tbx5 eine wichtige Rolle in der Differenzierung von endogenen Progenitorzellen „downstream“ von β -Catenin im adulten Herzen während des LV-Remodelings spielt (Baurand, Zelarayan et al. 2007) (Zelarayan, Noack et al. 2008). Der Einfluss von Tbx5 auf die finale Differenzierung von adulten kardialen Progenitorzellen in Kardiomyozyten ist bisher noch nicht untersucht worden. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit ein Maus-Modell mit induzierbarer kardialer Tbx5-Depletion untersucht (Bruneau, Nemer et al. 2001). Zusammenfassend aus den Vorarbeiten weisen die Daten darauf hin, dass eine β -Catenin-Depletion im adulten Myokard die Differenzierung von Progenitorzellen zu Kardiomyozyten über die Aktivierung wichtiger Transkriptionsfaktoren wie Tbx5 und GATA4 fördert und folglich spezifische kardiale Strukturgene aktiviert werden, die zur Rekrutierung der CPCs und im weiteren Verlauf zu deren Differenzierung in Kardiomyozyten führt.

1.5. Embryonale Stammzellendifferenzierung

Die Aktivierung der CPCs im adulten Herzen nach einer Herzschädigung ist von essentieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Herzfunktion. Die Rekrutierung dieser kardialen Progenitorzellen ist nach einer Herzschädigung bisher nur unzureichend. Aus diesem Grund ist es erforderlich die Mechanismen zu identifizieren, die zur Spezifikation und Differenzierung von Kardiomyozyten führen. Während der frühen Embryonalentwicklung bilden die Zellen des sogenannten Embryoblast die drei Keimblätter Endo-, Ekto- und Mesoderm aus, in deren fortschreitender Entwicklung und Differenzierung die Pluripotenz und Proliferationsfähigkeit abnimmt. Für Untersuchungen der Embryogenese stehen somit nur begrenzt pluripotente Zellen zur Isolation zur Verfügung. Man hat daher bereits in den 1970er Jahren damit begonnen nach anderen *in vitro* Modellen zu suchen, die eine gute Möglichkeit und auch eine wichtige Grundlage für spätere zellbasierte Therapiemöglichkeiten darstellen. Man begann zunächst mit der Isolation von pluripotenten embryonalen Karzinomazellen (*embryonic carcinoma cells*; ECC) (Martin and Evans) und der Entwicklung der daraus resultierenden P19-Zelllinie. Ab 1980 hat man dann damit begonnen undifferenzierte murine embryonale Stammzellen (*mouse embryonic stem cells*; mESC) aus der ICM des Blastozysten-Stadiums zu isolieren und als permanente Zelllinie zu etablieren (Evans and Kaufman) (Kaufman, Robertson et al. 1983). Die Aufrechterhaltung der Undifferenziertheit wird zum einen durch Verhinderung eines konfluenten Wachstums (P19-Zelllinie) oder durch Zugabe des Hemmfaktors *leukemia inhibiting factor* (**LIF**) in Kombination mit einer Co-Kultivierung der mESC mit Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*; MEF) gewährleistet.

1.5.1. P19-Zelllinie (*embryonic carcinoma cells*; ECCs)

Murine Teratokarzinome sind maligne Tumore, die spontan in den Gonaden von verschiedenen Mausstämmen auftreten können. Diese Tumore beinhalten neben einer Vielzahl verschiedener differenzierter Zelltypen auch undifferenzierte Stammzellpopulationen, die als embryonale Karzinomazellen (*embryonic carcinoma cells*; ECCs) bekannt sind. Diese Population konnte von einem induzierten Testis-Tumor isoliert und im undifferenzierten Stadium als P19-Zelllinie kultiviert werden (McBurney, Jones-Villeneuve et al. 1982). Unter verschiedenen Bedingungen können ECCs in verschiedene Zelltypen differenzieren. ECCs verhalten sich biochemisch, morphologisch und in der Expression von frühen embryonalen Markern ähnlich den ebenfalls pluripotenten embryonalen Stammzellen (*embryonic stem cells*; ESC). Durch die Zugabe von Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) entwickeln sich undifferenzierte P19-Zellen zu differenzierten Zellen des Meso- und Endoderms, aus denen sich vorwiegend kardiale und Skelettmuskelzellen entwickeln (Jasmin, Spray et al. 2010) (Limana, Bertolami et al. 2010). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass zusätzlich eine nicht-adherente Aggregatbildung in Form von Embryonalkörperchen (*embryoid bodies*; EBs) zur vollständigen Differenzierung der P19-Zellen in kontrahierende Kardiomyozyten notwendig ist. Zur Bildung der EBs wird die sog. „hanging drop“ Methode angewendet (siehe Methoden 3.3.5.). Dabei simulieren die

EBs die ICM des sich entwickelnden Embryos, wodurch im Inneren des EBs die Differenzierung induziert wird. Ähnlich wie im Organismus entwickelt sich auch hier die äußere Zellschicht in endoderm-ähnliche Zellen, die einen Kern aus noch undifferenzierten Zellen umschließt. Im weiteren Verlauf und durch die Zugabe von DMSO beginnen sich diese Zellen in kontrahierende Kardiomyozyten zu differenzieren (van der Heyden and Defize 2003). Dass es sich bei den entstandenen Zellen tatsächlich um Kardiomyozyten handelt, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, die die Signalwege *in vitro* während der Differenzierung von P19-Zellen untersucht und mit denen *in vivo* verglichen haben (Anisimov, Tarasov et al. 2002) (Skerjanc, Petropoulos et al. 1998) (Fijnvandraat, Lekanne Deprez et al.) (Jasmin, Spray et al. 2010). Darüber hinaus konnten mit Hilfe der *in vitro* Differenzierung von P19-Zellen auch neue kardiale Gene identifiziert (Hosada 2001) und ihre Rolle während der Kardiogenese untersucht werden (Hu, Chen et al. 2010). Die Möglichkeit ECCs in großer Anzahl als Monolayer *in vitro* zu kultivieren und durch Zugabe spezifischer Substanzen in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, macht die P19-Zelllinie zu einem guten Modell, die Embryonalentwicklung und speziell die Kardiogenese zu untersuchen. Die P19-Zellen haben ihren Ursprung in Tumorgewebe, sodass eine Mutation innerhalb der Zellen nicht auszuschließen ist. Besonders im Hinblick auf eine etwaige spätere Transplantationsmöglichkeit differenzierter Kardiomyozyten in betroffenes murines Herzgewebe, wurden die Daten der vorliegenden Arbeit auf ein *in vitro* Assay mit murinen embryonalen Stammzellen übertragen.

1.5.2. embryonale Stammzelllinie (embryonic stem cells; ESCs)

Die erste murine Stammzelllinie (*mouse embryonic stem cells*; mESCs) wurde bereits 1981 aus dem ICM einer Maus-Blastozyste etabliert (Evans and Kaufman 1981) (Kaufman, Robertson et al. 1983). Im Gegensatz zur verhältnismäßig einfachen Kultivierung der P19-Zelllinie, ist bei den mESC mehr Vorsicht und Pflege notwendig. Undifferenzierte mESCs können entweder in Verbindung mit einer Federschicht (*feederlayer*) aus Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*; MEF) co-kultiviert oder auf Matrigel mit Konditionalmedium kultiviert werden. In der Co-Kultur verhindert der Hemmfaktor LIF die spontane Differenzierung, wohingegen bei der zweiten Methode das Matrigel selbst die Differenzierung inhibieren kann. Zur Differenzierung der mESCs in Kardiomyozyten kommt es ebenfalls durch die Bildung von EBs innerhalb der bereits erwähnten „hanging drop“ Methode. Ähnlich wie bei den P19-Zellen konnte auch bei den mESCs die gesamte Entwicklung und Differenzierung in Kardiomyozyten durch die Expression kardial-spezifischer Gene dokumentiert werden (Robbins, Gulick et al. 1990) (Sanchez, Jones et al. 1991) (Kubalak, Miller-Hance et al. 1994) (Kolossoff, Lu et al. 2005). Verschiedene elektrophysiologische Studien haben ebenfalls die Funktionsweise der mESCs abgeleiteten Kardiomyozyten untersucht und konnten zeigen, dass sich *in vivo* und *in vitro* vorkommende Kardiomyozyten nicht nur in ihrem Expressionsmuster sehr stark ähneln, sondern auch in ihrer Funktionsweise (Wobus, Wallukat et al. 1991) (Wobus, Guan et al. 2002) (Ali, Xu et al.). Darüber hinaus bilden mESCs eine gute Möglichkeit neue kardiale Gene zu

identifizieren (Miller, Christoforou et al. 2008). Eine weitere Einsatzmöglichkeit von mESC abgeleiteten Kardiomyozyten, ist die Transplantation in geschädigtes murines Herzgewebe (Klug, Soonpaa et al. 1996). Dabei führten die transplantierten Kardiomyozyten zu einer signifikant messbaren Verbesserung der Herzfunktion im Vergleich zu Kontrolltieren. Dies konnte sowohl in der Maus (Yang, Min et al. 2002) als auch in Ratten (Min, Yang et al. 2002) nachgewiesen werden.

Beide *in vitro* Modelle (ECCs und ESCs) bilden demnach eine sehr gute Möglichkeit die Prozesse und Zusammenhänge während der frühen Kardiogenese zu untersuchen. Die einfach genetische Manipulation in Form von transienter oder stabiler Expression von Proteinen bietet darüber hinaus eine gute Möglichkeit deren Einfluss auf die normale kardiale Entwicklung zu untersuchen und somit ggf. neue zellbasierte Therapiemöglichkeiten zu entwickeln und beim Menschen anwendbar zu machen.

1.6. Zielstellung

Die grundlegende Hypothese dieser Arbeit basiert auf dem Konzept, dass die Wnt/ β -Catenin-Regulierung der CPC-Aktivierung einen konservierten Entwicklungsmechanismus darstellt, der essentiell für die physiologische Kardiogenese ist, aber im postnatalen Herzen verloren gegangen ist. In dieser Arbeit sollen die zellulären und molekularen Mechanismen, deren Regulation über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Aktivierung der CPCs regulieren, untersucht werden. Zur Klärung des Sachverhaltes sollen im ersten Schritt mit Hilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems kardialspezifische Interaktionspartner von β -Catenin aus einer humanen kardialen cDNA-Bibliothek identifiziert werden. Aufbauend auf diesen Untersuchungen, sollen die gefundenen Interaktionspartner in einem *in vitro* Modell dahingehend untersucht werden, ob und in welchem Maße sie Einfluss auf die embryonale Kardiogenese haben. Dazu sollen die *in vitro* ECC- und mESC-Modelle angewendet werden. Darüber hinaus soll der Einfluss des Transkriptionsfaktors Tbx5 *in vivo* an einem induzierten kardial-spezifischen Tbx5-depletierten Maus-Modell gezeigt werden. Die so gewonnenen Erkenntnisse sollen somit zur Entwicklung neuer Strategien und zellbasierter Therapiemöglichkeiten beitragen, um den Verlauf des adulten Herzremodelings, welches zur Herzinsuffizienz führt, zu vermindern und die regenerative Fähigkeit des adulten Herzens vermehrt zu aktivieren.

2. Material

2.1. Materialien

AMINOSÄUREN	VE	Firma	Kat-No.
Adeninsulfat	25 g	SIGMA	A8626
L-Alanin	25 g	SIGMA	P5482
L-Arginin	25 g	SIGMA	A5131
L-Asparagin	25 g	SIGMA	A0884
L-Asparaginsäure	100 g	SIGMA	A9256
L-Cystein	25 g	SIGMA	30090
L-Glutaminsäure	100 g	SIGMA	G1251
L-Glutamin	25 g	SIGMA	G8540
Glycin (aminoacetic acid)	100 g	SIGMA	G7126
L-Histidin•HCl•H ₂ O	25 g	SIGMA	H8125
L-Isoleucin	25 g	SIGMA	I2752
L-Leucin	25 g	SIGMA	L8000
L-Lysin	100 g	SIGMA	L5626
L-Methionin	25 g	SIGMA	M9625
L-Phenylalanin	100 g	SIGMA	P2126
L-Prolin	10 g	SIGMA	P0380
L-Serin	25 g	SIGMA	S4500
L-Threonin	25 g	SIGMA	T8625
L-Tryptophan	25 g	SIGMA	T0254
L-Tyrosin	100 g	SIGMA	T3754
Uracil	25 g	SIGMA	U0750

Primär-ANTIKÖRPER			
c-myc (9E10) mouse monoclonal IgG ₁	1 ml	Santa Cruz	SC-40
c-myc HRP mouse monoclonal	200 µg	Santa Cruz	SC-40HRP
cTnT mouse monoclonal	200 µg	abcam	ab 10218
DAPI	5 mg	SIGMA	D-9542
ehand(1) rabbit polyclonal	200 µg	Santa Cruz	sc-22817
FHL2 rabbit polyclonal	200 µg	abcam	ab 12327
flag mouse monoclonal	200 µg	SIGMA	A 8592
flag rabbit polyclonal	200 µg	SIGMA	F7425
Flk1-PE	200 µg	eBioscience	12-5821-81
GAL4(DBD) mouse monoclonal IgG _{2a}	1 ml	Santa Cruz	SC-510
Gapdh mouse monoclonal	200 µg	ZYTOMED	RGM2-6C5
Histone H1 mouse monoclonal	200 µg	Santa Cruz	sc-8030
Igfbp5 mouse monoclonal	200 µg	abcam	
Iso-ms	500 µg	BD	55 7273
Iso-PE	200 µg	eBioscience	12-4321-81
Iso-rb	9 mg	ZYMED	08-6199
ki 67 rabbit polyclonal	1 mg	abcam	ab15580
ki67-PE	200 µg	Santa Cruz	sc-7856
Nkx2.5 rabbit polyclonal	200 µg	Santa Cruz	sc-14033
sc. Actinin mouse monoclonal	1 ml	SIGMA	A7811
Sca1-APC	200 µg	eBioscience	17-5981-83
Sca1-FITC	200 µg	eBioscience	11-5981-85
Tbx5 rabbit polyclonal	200 µg	abcam	ab 58253
Tubulin mouse monoclonal	1 mg	SIGMA	T-9026
α-DIG-AP	150 U	Roche	11 093 274 910
αMHC mouse monoclonal	1 mg	abcam	ab 50967-100
β-Catenin mouse monoclonal	0,6 ml	BD	610 154

Sekundär-Antikörper			
Alexa Fluor mouse 488 (grün)	500 µg	INVITROGEN	A 11017
Alexa Fluor mouse 594 (rot)	500 µg	INVITROGEN	A 11032
Alexa Fluor rabbit 488 (grün)	500 µg	INVITROGEN	A 11008
Alexa Fluor rabbit 594 (rot)	500 µg	INVITROGEN	A 11012
Anti - mouse	2 ml	DAKO	P 0260
Anti-rabbit	2 ml	DAKO	P 0448
mouse APC-gekoppelt	500 µg	Jackson Immuno Research	715-176-151
mouse FITC-gekoppelt	500 µg	- " -	115-096-072
rabbit FITC-gekoppelt	500 µg	- " -	711-136-152

CHEMIKALIEN			
20x SSC	1 L	SIGMA	S6639
3-Amino-1,2,4-triazole	10 g	SIGMA	A8056
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	1 g	FERMENTAS	R 0404
Agarose GTQ	1 kg	ROTH	6352.3
Albumine Bovine Serum (BSA)	100 ml (37 %)	SIGMA	A 7409
Alkaline Phosphotase, calf Intestinal (CIP)	1ml	NEB	M 0290S
Ammonium Persulfat (APS)	10 g	BIORAD	161-0700
Ampicillin Sodium Salt, lyophilized	10 g	ROTH	K029.1
Ascorbinsäure	100 ml	SIGMA	A 7506
Blocking Buffer	50 g	ROCHE	1096176
Bovine Albumin Fraction V	25 g	ROTH	8076.2
BRADFORD – Lösung	450 ml	BIORAD	500-0006
BSA 37%	100 ml	SIGMA	A 4709
CDP-Star	1 ml	ROCHE	11 685 627 001
Cytosin	100 ml (100 mM)	SIGMA	C 6645
DEPC	250 ml	SIGMA	D-5758
Desoxynucleotide dNTPs	1000 ml	PROMEGA	U1515
D-Glucose (Dextrose)	1 kg	ROTH	6887.1
DIG Easy Hyb	500 ml	ROCHE	1 603 558
DMEM GlutaMax	500 ml	INVITROGEN	31966-021
DMEM high glucose	500 ml	INVITROGEN	42430-025
DMEM/F12-Medium	500 ml	INVITROGEN	21331-020
DMSO	250 ml	SERVA	20385
dNTPs	1 ml	PROMEGA	C1145
Dream Taq Polymerase	5x500 µl	FERMENTAS	EP0703
DTT	10 ml (1M)	SIGMA	43816
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	4 x 100 ml	SIGMA	E7889
Essigsäure	2,5 L	MERCK	1018302500
Ethanol abs.	2,5 L	ROTH	5054.4
Ethidiumbromid 1%	20 ml	ROTH	2218.2
Eukit	100 ml	FLUKA	03989
FCS für mES-Zellen	500 ml	StemCellTechnology	06952

G418	5 g	GIBCO	11811-031
Gelatine	100 g	SIGMA	G-1890
Glass beads	250 g	SIGMA	G 9268
Glycerol	1L	ROTH	7530
GoTaq qPCR-Mix SYBR Green	10x1 ml	PROMEGA	A600A
HEPES (Ultra Pure)	100 g	ROTH	9105.2
Insulin-Transferin-Sodium Selemite (NST)	100 ml	SIGMA	I 1884
Iscove-Medium	500 ml	Biochrom	F0465
Isopropanol	1L	ROTH	6752.1
Kaliumchlorid	500 g	ROTH	6781.3
Kanamycin Sulfate	5 g	ROTH	T832.1
Kollagenase Typ II		Worthington	LS 04176
LB-Agar	500 g	ROTH	X965.1
L-Glutamin	100 ml (2 mM)	GIBCO	25030-024
LIF	100 µl	Millipore	ESG1106
Lithium Acetate	100 ml (5 M)	SIGMA	73216
Luria Broth Base, powder	500 g	ROTH	X968.1
Magnesiumchlorid 1M	100 ml	SIGMA	M 1028
Magnesiumsulfat	500 g	ROTH	T 888.1
Maleinsäure	500 g	SIGMA	M-0375
Matrigel	5 ml	BD	356234
Methanol	2,5 L	ROTH	P717.2
Milchpulver	500 g	ROTH	T 145.2
Mitomycin C (mmc)	2 mg	SIGMA	M-0503
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	100 ml	ROTH	2367.1
Natrium-Acetat	1 kg	ROTH	6773.2
Natriumchlorid	5 kg	ROTH	2957.2
Natriumdihydrogenphosphat	500 g	ROTH	4984.2
Natriumfluorid	100 g	SIGMA	S-7920
Natriumhydrogenphosphat	500 g	SIGMA	S-8282
Natrium-Pyruvat	100ml (100 mM)	GIBCO	043-1360
Na-Vanadat	50 g	SIGMA	S-6508
NEAA	100 ml	LONZA	BE-114E
NP-40	100 ml	ROCHE	11 754 599 001
Öl		Mazola	
Orange G	25 g	SIGMA	O 3756
Pankreatin		SIGMA	P-3292
PEG 3350	1 kg	SIGMA	P3640
Penicilin-Streptomycin	100 ml	GIBCO	15140-114
Percoll	1 L	AMERSHAM.BIOSCIENCE	17-0891-01
Pferde-Serum	500 ml	GIBCO	16050-98
Phenol: Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v)	100 ml	INVITROGEN	15593-031
Phusion - Polymerase	500 U	NEB	F 350S
PMSF	5 g	SIGMA	P7626
Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat (TWEEN® 20)	100 ml	BIORAD	170-6531

ProLong Gold Eindeck-Medium	10 ml	INVITROGEN	P36930
Protease-Inhibitoren-Cocktail (PIC)	30Tabletten	ROCHE	04 693 159 001
Puromycin		INVITROGEN	A11138-03
Quercetin	10 g	Acro Organics	174 070 100
Reverse Transkriptase M-MLV RnaseH-	10.000 U	PROMEGA	M3681
Roti®-MagBeads Protein G	1 ml	ROTH	HP60.1
Rotiphorese Gel 30	1 L	ROTH	3029.1
S.O.C. Medium	10 x 10 ml	INVITROGEN	15544-034
Salmon Sperm DNA Solution	5 x 1 ml	INVITROGEN	15632-011
Saponin		Fluka	47036
SELECT Agar, powder	500 g	BD	214010
SELECT Peptone 140	500 g	BD	211677
SELECT Yeast Extract, powder	500 g	BD	212750
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	100 g	ROTH	5136.1
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	5 kg	ROTH	4855.3
Triton X-100	1 L	GERBU	2000
Trypsin/EDTA 0.25%	100 ml	INVITROGEN	25200-056
0.05%	100 ml		25300-054
WGA-FITC	2 mg	SIGMA	L4895
Xfect Stem	50 µl	Clontech	PT5004-2
Yeast Nitrogen Base	100 g	BD	29190
αMEM-Medium	500 ml	INVITROGEN	
β-Mercaptoethanol (β-ME)	50 ml	MERCK	S1863906

Restriktionsenzyme	Units / ml		
Apal	50.000	NEB	R0114S
BamHI	20.000	NEB	R0136S
Clal	5.000	NEB	R0197S
EcoRI	100.000	NEB	R0101M
Sall	20.000	NEB	R0138S
XhoI	20.000	NEB	R0146S

kompetente Zelle			
Chemisch kompetente One Shot® TOP10 <i>E.coli</i>	10 x 50 µl	INVITROGEN	C 4040-10
Chemisch kompetente MAX EFFICIENCY DH5α <i>E.coli</i>	5 x 0,2 ml	INVITROGEN	18258-012
Chemisch kompetente SUBCLONING EFFICIENCY DH5α <i>E.coli</i>	10 x 0,2 ml	INVITROGEN	18265017
Electroporation-Competent XL1-Blue Cells <i>E.coli</i>	5 x 0,1 ml	Agilent Technologies	200228

KITS			
DIG RNA Labeling Kit		ROCHE	11 175 025 910
Dneasy Blood&Tissue Kit	250	QIAGEN	69506
Dual Luciferase Reportergen Assay	10x100	PROMEGA	E1910
ECL plus Western Blotting Detection System		AMERSHAM BIOSCIENCE	RPN2132

Gel-Extraktion	50	QIAGEN	28704
Mini Kit	250 Reaktionen	Invitak	1010140300
Plasmid Midi Kit	10	Machery&Nagel	740.955.250

MATERIALIEN			
10 cm Zellkulturplatten	240	Peske	9310-00
12-Loch-Zellkulturplatten	126	Peske	9212-40
5 cm Zellkulturplatten	900	Peske	9340-00
6-Loch-Zellkulturplatten	126	Peske	9206-40
Bioline Marker IV	200 lines	BIOLINE	BIO-33025
Chemilumineszenz Film (Röntgenfilm)	50	AMERSHAM BIOSCIENCE	RPN 1674K
Deckgläschen	50	ROTH	H878
FUGENE [®] HD Transfection Reagent	0,4 ml	ROCHE	04 709 691 001
Full range Rainbow molecular weight marker	250 ml	AMERSHAM BIOSCIENCE	RPN 2131
Kryoröhrchen	100	ROTH	E292.1
Küvetten	100	TPP	MDC-Lager
Nitro-Cellulose-Membran	50	Stratagene	420 112
Objektträger	72	ROTH	H867.1
Optical Tape	100	BIORAD	2239444
Parafilm			MDC-Lager
Puromycin Selektionsmarker (linear)	40 µl	CLONTECH	631626
PVDF-Membran	1 Rolle	ROTH	T 830.1
Reaktionsgefäße 0,5 ml		BIOZYM	710988
Reaktionsgefäße 1,5 ml 2,0 ml		EPPENDORF	MDC-Lager
Replica bloc 10 cm	1	LabScientific	LS 400
15 cm	1		LS 404
Thermofast 96-Loch qPCR Platten	25	Abgene	AB-0900
Velveteen 15 cm	50	LabScientific	LS 401
20 cm	50		LS 403
Whatman [®] Quantitative Grade Papers	100 Stk 125 mm 1541-125	Fisher Scientific	09-851D
Zell-Sieb 30 µM	50	Partec	04-004-2326
Zell-Sieb 40 µM	50	BD Falcon	352340
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml		BD Falcon	MDC-Lager

GERÄTE	Firma
Blot Kammer	SIGMA
Drehrad	Bioblock Scientific
Elektroporator	Eppendorff
FACS Calibur	BD
Färbekammer	ROTH
Gel-Dokumentationsanlage	Phase GmbH
Gelkammer	BIORAD
Gradient Cykler	EPPENDORF
iCykler	BIORAD

Kryo-Container	Nalgene
Mikroskop	Leica
NANODROP	peqlab
PCR Maschine	Biometra
Photometer	Amersham Bioscience
T3 Thermocycler	BIOMETRA
Thermoblock	EPPENDORF
Tischzentrifuge (biofuge fresco)	HERAEUS
Wasserbad	GFL
Zentrifuge mit Rotor SS-34	SORVALL RC 50

2.2. Oligonucleotide

qRT-PCR

Gen	Species	GenBank	Primer	Sequenz (5' --> 3')	Position	Fragment länge (bp)	Annealing Temperatur
Axin2	mouse	NM_015732	F	AGC CGC CAT AGT C	1508	145	55 °C
			R	GGT CCT CTT CAT AGC	1652		
CD31 (Pecam1)	mouse	NM_008816	F	AAC CCG TGG AGA TGT CCA GGC CAG C	2094	240	60 °C
			R	ACA CCG TCT CTG TGG CTC TCG TTC CC	2333		
Ctnnb1 (β - Catenin)	mouse	NM_007614	Ex5s	ACT GCT GGG ACT CTG	852	130	55 °C
			Ex6as	TGA TGG CGT AGA ACA G	981		
Cx40 (Gja5)	mouse	NM_008121	F	GGG AGG AGG AAA GGA AGC AGA AGG	51	145	60 °C
			R	ATG AAC AGG ACA GTG AGC CAG ACC	195		
Cx43 (Gja1)	mouse	NM_010288	F	CAC CAC TTT GGC GTG CCG GCT T	178	180	60 °C
			R	TCA ACC GCTGTC CCC AGG AGC C	357		
CyclinD1	mouse	NM_007631	F	CAC CAA TCT CCT CAA CGA C	289	149	60 °C
			R	CAC AGA CCT CCA GCA TCC	437		
Fhl2	mouse	NM_010212	F	GTG CCG ATC CTT GTA GGA CA	174	117	60 °C
			R	AAG GAG GAG AAC CCA CAC TG	58		
Flk1 (Kdr)	mouse	NM_010612	F	GGA TGT GGA CTG GGA GGA AG	4751	286	60 °C
			R	AGA GAT GAG GAA GGA GCA AGC	5036		
Gapdh	mouse	NM_00100 1303	F	ATG TTC CAG TAT GAC TCC ACT CAC G	188	171	60 °C
			R	GAA GAC ACC AGT AGA CTC CAC GAC A	358		
Gata4	mouse	NM_008092	F	CTG GAG GCG AGA TGG	1285	157	60 °C
			R	GGT GGT GGT AGT CTG G	1441		

Hand1 (eHand)	mouse	NM_008213	F	GTG GCA AGT CCG CAG AAG	123	291	60 °C
			R	GGT GTG AGT GGT GAT GAT GG	413		
Hand2 (dHand)	mouse	NM_010402	F	GCC GAC ACC AAA CTC TCC AAG	1315	106	60 °C
			R	CCT CCG CCT CTC CGT TCT G	1420		
Igfbp5	mouse	NM_010518	F	AGG TGG TGA CAG AGC AGG TG	126	130	60 °C
			R	GCC GCA GAA CAG GTA AGA GG	255		
Islet1 (1)	mouse	NM_021459	1F	CGG CAC AGA GCG GAA GAA ACC	1801	178	60 °C
			1R	AGG ATG GGA GGA GAG GCA AAC G	1978		
Lef1	mouse	NM_010703	F	GTC CCT TTC TCC ACC CAT C	1382	108	60 °C
			R	AAG TGC TCG TCG CTG TAG	1489		
Mef2a	mouse	NM_0010337 13	F	ACA CCA ACC AGA ACA TC	1514	203	60 °C
			R	GTC ACT GCC ATC ATA GG	1716		
Mesp1	mouse	NM_008588	F	GGT AGC GGA CAG CGG CAG AG	305	102	60 °C
			R	CAC GGA TGG CGG CAA GAA GC	406		
Nkx2.5	mouse	NM_008700	F	CGA CAG CGG CAG GAC CAG AC	790	133	60 °C
			R	CGT AGG CGG GAG CGT AGG C	922		
Nppa (ANP)	mouse	NM_008725	F	CAT CAC CCT GGG CTT CTT CCT	104	405	60 °C
			R	TGG GCT CCA ATC CTG TCA ATC	508		
Nppb (BNP)	mouse	NM_008726	F	AAG TCC TAG CCA GTC TCC AGA GC	277	268	60 °C
			R	CTT CAG TGC GTT ACA GCC CAA AC	544		
Oct4 (Pou5f1)	mouse	NM_013633	F	GCT TCA GAC TTC GCC TCC TCA CC	77	191	60 °C
			R	GCC ATC CCT CCG CAG AAC TCG	267		
Tbx2	mouse	NM_009324	F	TGG ATG GTG GCA GGC AAA GC	1006	286	60 °C
			R	GGT AGG CAG TGA CAG CGA TGA AG	1291		
Tbx5	mouse	NM_011537	F	GCA AGC AAT CCC CAG CAC AAA C	502	183	60 °C
			R	GCC AAA GCC CTC ATC TGT ATC GG	684		
Tbx20	mouse	NM_194263	F	AGA AGG AGG CAG CAG AGA ACA C	549	149	60 °C
			R	GCA CAG AGA GGA TGA GGA TGG G	697		

Tcf4	mouse	NM_0010839 67	F	AAC GGA ACA GAC AGT ATA ATG G	1137	147	60 °C
			R	CAC AGG AGT TGA AGG ATT GG	1283		
Tnnt2 (cTnT)	mouse	NM_011619	3F	AAG CAG CAG AAA TAC GAA ATC AAC G	819	183	60 °C
			3R	GCC AAG GAG GAC CCA GAG C	1001		
Mlc2a	mouse	NM_022879	fwd	TCA GCT GCA TTG ACC AGA AC	140	148	60 °C
			rev	AAG ACG GTG AAG TTG ATG GG	288		
Mlc2v	mouse	NM_010861	fwd	AAA GAG GCT CCA GGT CCA AT	434	176	60 °C
			rev	CCT CTC TGC TTG TGT GGT CA	258		
Ncam	mouse	NM_010875	s	GTC TGT CAC CCT GGT GTG TG	1027	63	60 °C
			as	ATC CTT TGT CCA GCT CAT GG	1090		
Brachyry y T	mouse	NM_009309	s	CCG GTG CTG AAG GTA AAT GT	325	274	60 °C
			as	CCT CCA TTG AGC TTG TTG GT	599		

Sequenzierung

Name	Sequenz
pDBLeu s	GA ATA AGT GCG ACA TCA TCA TC
pDBLeu as	G TAA ATT TCT GGC AAG TGA GAC
Sp6	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
T7	T AAT ACG ACT CAC TAT AGG
pEXP-AD502 s	TAT AAC GCG TTT GGA ATC ACT
pEXP-AD502 as	GTC TAC CTT GCC AGA AAT TTA
PCR	
Tbx5 F	GCA GCG CAG TCC TCA CCA G
Tbx5 R	AAA TTC CAA CCC CTT CCA CAG AT
Tbx5 del s	ACC TGA GAG TGC TCT GGG GC
Tbx5 del as	TCT CTG TGC CCA CTT CGT GGA ACT
Fhl2-c-myc s	ACT GCC TGA ACT GCT TCT GTG
Fhl2-c-myc as	G CTC AGT GAA TTC TTG CTC CAT

2.3. Zell-Linien

Name	Zelltyp	Referenz / Firma
P19	embryonale Karzinomazelllinie, die unter DMSO-Zugabe in kardiale und Skelettmuskel-Zellen differenziert	(McBurney, Jones-Villeneuve et al. 1982) gcstandards-atcc
HEK293	humane embryonale Nierenzell-Linie mit triploiden Karyotyp und ca. 6% Polyploidie	(DuBridge, Tang et al. 1987), (Graham, Smiley et al. 1977)
mESC	α MHC-eGFP/ α MHC-Neo doppelt-transgene mES-Zelllinie und entstammt der Blastozysten-Isolation von superovulierten weiblichen DBA/2J Mäusen	zur Verfügung gestellt von Dr. med. Alexander Markus Becker (Labor L. Field), Indianapolis

2.4. Vektoren

Name	Basis-Vektor	Selektion	Funktion
Tbx5-flag/pcDNA3.1	pcDNA3.1 (+)	• Ampicilin (<i>E. coli</i>)	Expressionsvektor
β -Catenin c-myc/pcDNA3.1	pcDNA3.1(+)	• Ampicilin (<i>E. coli</i>)	Expressionsvektor
β -Catenin/pDBLeu	pDBLeu	• Kanamycin (<i>E. coli</i>) • ohne Leucin (<i>S. cerevisiae</i>)	Köder (= bait) -Vektor
humane kardiale cDNA-Bibliothek	pEXP-AD502	• Ampicilin (<i>E. coli</i>) • ohne Tryptophan (<i>S. cerevisiae</i>)	Library (= prey) -Vektor
c-myc-FHL2/pCS-MT	pCS-MT	• Ampicilin (<i>E. coli</i>)	Expressionsvektor
Tbx5 Pro 500/pGL3	pGL3-Basic	• Ampicilin (<i>E. coli</i>)	Luciferase-Reportergen-Assay zur Analyse der Aktivierung des Tbx5-Promotors
Tbx5 Pro 1000/pGL3	pGL3-Basic	• Ampicilin (<i>E. coli</i>)	- " -
	pTOPflash	• Ampicilin (<i>E. coli</i>)	Luciferase-Reportergen-Assay zur Analyse der β -Catenin abhängigen Transkription
	pFOPflash	• Ampicilin (<i>E. coli</i>)	- " -
	pRL CMV (Renilla)	• Ampicilin (<i>E. coli</i>)	Kontrolle in Luciferase-Reportergen-Assay
	pGL3-Control	• Ampicilin (<i>E. coli</i>)	- " -

Die Vektorkarten sind im Anhang zu finden.

2.5. Puffer und Lösungen

2.5.1. Lösungen und Zusätze

NCM Präparationslösungen:

10 x ADS (500 ml) (Gebrauchslösung 1x ADS)

NaCl	58,44 g
HEPES	238,3 g
NaH ₂ PO ₄	120 g
Glucose	198,17 g
KCl	74,56 g
MgSO ₄	246,5 g
	pH 7.35

Enzymlösung

Zu 50 ml vorgewärmten 1x ADS werden 700 μ l Kollagenase II (10 mg/ml in PBS) und 200 μ l Pankreatin (30 mg/ml in PBS) gegeben.

Y2H-Medienzusätze:

Dextrose	40 %
Uracil	20 mM
Histidine-HCl	100 mM
Leucine	100 mM
Tryptophan	40 mM

Die Dextrose wurde anschließend autoklaviert und die Aminosäuren sterilfiltriert. Die Lösungen wurden bei 4 °C dunkel gelagert.

Ausserdem wurde ein Aminosäure-Mix hergestellt. Darin enthalten waren jeweils 2-3 g der folgenden Aminosäuren:

Adeninsulfat, Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Asparagin, Cystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin

Pufferzusätze:

- 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
- 1 M Tris/HCl pH 8,0
- 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
- 1 M Tris/HCl pH 7,6
- 5 M NaCl
- 10 % SDS
- 1 M LiAc (10x)
- 50 % PEG 3350

2.5.2. Medien

Bakterien:

LB – Medium (Luria Broth) (1L in ddH₂O)

- LB-Medium komplett 25 g
- autoklavieren

LB – Agar (1L in ddH₂O)

- LB-Agar komplett 35 g
- autoklavieren

Nach dem Abkühlen wird das entsprechende Antibiotikum hinzugegeben und der Agar in sterile Petrischalen gegossen. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten kopfüber bei 4 °C gelagert.

Für LB – Ampicilin - Medium bzw. -Agar wurde eine Endkonzentration von 50 µg/ml gewählt. Die Endkonzentration für Kanamycin war 25 µg/ml.

S.O.C. – Medium (S.O.B. – Medium plus Glucose) (500 ml in ddH₂O)

Bacto Trypton	10 g
Bacto Yeast Extract	2,5 g
NaCl	0,3 g
KCl	0,09 g
MgCl ₂	1,02 g
MgSO ₄	1,23 g
	autoklavieren
	20 mM Glucose

*Hefe-Zwei-Hybrid-System:*YPAD – Medium (1L in ddH₂O)

Bacto Yeast Extract	10 g
Bacto Peptone	20 g
Dextrose	20 g
Adeninsulfat	100 mg
	autoklavieren

Für Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren 20 g/L Bacto – Agar hinzugegeben und der pH – Wert mit HCl auf 6,0 eingestellt.

SC – Medium (Synthetic Complete Medium) (2 L in ddH₂O)

Yeast nitrogen base ohne Aminosäuren	13.4 g
Aminosäure-Mix	2.7 g
20 mM uracil	8 ml
100 mM histidine-HCl	8 ml
100 mM leucine	8 ml
40 mM tryptophan	8 ml

Vom SC – Grundmedium wurde 1 Liter anschließend auf einen pH von 5.9 mit NaOH eingestellt und autoklaviert. Für 1L SC – Agar wurde vor dem Autoklavieren 20 g/L Bacto Agar mit zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurden für jeweils 1L Selektions – Medium bzw. –Agar die entsprechenden Aminosäure-Lösungen sowie 50 ml/L Glucose hinzu gegeben. Nach dem Autoklavieren

wurde von einer 3-Amino-1, 2, 4-triazole Stammlösung (1 M) die Menge, für die entsprechende Endkonzentration von 0 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM bzw. 100 mM im 3AT – Medium bzw. im 3AT–Agar hinzu gegeben.

*Zellkultur:*P19 Growth-Medium

α-MEM Medium (65 ml abnehmen)

- 50 ml (= 10 %) FCS
- 5 ml Penicilin/Streptomycin
- 5 ml NEAA
- 5 ml L-Glutamin
- 4 µl (= 0,1 mM) β-ME

NCM Medium

DMEM/F12 Medium (120 ml abnehmen)

- 25 ml (= 5 %) Pferde-Serum
- 5 ml Penicilin/Streptomycin
- 5 ml L-Glutamin

P19 Differenzierungsmedium

DMEM/F12 Medium (120 ml abnehmen)

- 100 ml (= 20 %) FCS
- 5 ml (= 1 %) DMSO
- 5 ml Penicilin/Streptomycin
- 5 ml NEAA
- 5 ml L-Glutamin
- 4 µl (= 0,1mM) β-ME

HEK293 Medium

DMEM GlutaMAX (60 ml abnehmen)

- 50 ml (= 10 %) FCS
- 5 ml L-Glutamin
- 5 ml Penicilin/Streptomycin

mESC-Medium

- DMEM „high glucose“ (100 ml abnehmen)
- 75 ml (= 15 %) FCS (für Stammzellen)
 - 5 ml NEAA
 - 5 ml Penicilin/Streptomycin
 - 5 ml L-Glutamin
 - 5 ml Nucleosid-Mix*
 - 5 ml Natrium-Pyruvat
 - 4 µl β-ME

 - LIF 1000U/ml (5 µl / 50 ml)

 - Nucleosid-Mix
 - Adenosin 80 mg
 - Guanosin 85 mg
 - Cytidin 73 mg
 - Uridin 73 mg
 - Thymidin 24 mg

MEF-Medium

- DMEM GlutaMAX (60 ml abnehmen)
- 50 ml (= 10 %) FCS
 - 5 ml NEAA
 - 5 ml Penicilin/Streptomycin

Der Nucleosid-Mix wird in 100 ml sterilem H₂O bei 37 °C gelöst, steril filtriert und anschließend in 5 ml Aliquots eingefroren.

mES-Konditionalmedium

Bei der Co-Kultivierung von mES-Zellen auf inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF_{mmc}) wird beim Mediumwechsel das Medium abgenommen, steril filtriert und eingefroren. Zur Kultivierung der transfizierten mES-Zellen auf Matrigel wird das Konditionalmedium im Verhältnis 1:1 mit frischem mESC-Medium gemischt und mit dem Differenzierungsinhibitor LIF entsprechend versetzt.

mESC-Differenzierungsmedium

- ISCOVE Medium (vorher 115 ml abnehmen)
- 100 ml (= 20 %) FCS (für Stammzellen)
 - 5 ml NEAA
 - 5 ml Penicilin/Streptomycin
 - 5 ml L-Glutamin
 - 4 µl β-ME
 - Ascorbinsäure 100 mM (50 µl / 50 ml)

Einfrier-Medium

- 50 % Kultivierungsmedium
- 40 % FCS (entsprechend des Zell-Typs)

- 10 % DMSO

2.5.3. Puffer

50 x TAE 1 L in ddH₂O
(Gebrauchslösung = 1xTAE)

Tris	242,2 g
EDTA	18,6 g
Essigsäure	57,1 ml

6xLaufpuffer (Orange G) (100 ml in ddH₂O)

Glycerin (100%)	50 ml
EDTA (0.5M)	5 ml
Orange G	0,2 g

Hypotonischer-Puffer
(Protein-Fraktionierung) 250 ml in ddH₂O

10 mM	HEPE S	0,596 g
10 mM	KCl	0,186 g
2 mM	MgCl ₂	0,102 g
0.1 mM	EDTA	0,009 g
1 mM	DTT	0,039 g

Hypertonischer-Puffer

50 mM	HEPES	0,596 g
50 mM	KCl	0,186 g
300 mM	NaCl	0,102 g
0.1 mM	EDTA	0,009 g
1 mM	DTT	0,039 g
10 %	Glycerol	25 ml

Bäuerle-Puffer (pH 7.9) (500 ml in ddH₂O)

HEPES	2,38 g
NaCl (5 M)	35 ml
MgCl ₂ (1 M)	500 µl
EDTA (0,5 M)	600 µl
NP-40	5 ml
Glycerol	100 ml

Protease-Inhibitoren * nur Bäuerle

DTT (1 M) *	10 µl
Na-Vanadat (1 M)	50 µl
Natriumfluorid (1 M)	10 µl
Protease-Inhibitoren-Cocktail	500 µl

Zu 10 ml Bäuerle-Puffer bzw. Hypo- und Hyperpuffer werden Protease-Inhibitoren hinzugegeben.

10 x SDS – Laufpuffer (1 L in ddH₂O)

Tris	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g

10 x Transferpuffer (1 L in ddH₂O)

Tris	75,6 g
Glycin	74,4 g
SDS	15 g

1 x TBS - T (Waschpuffer) (1 L in ddH₂O) Inkubationspuffer für Blockierung und Antikörperlösungen

Tris/HCl pH 7,6 (1 M)	20 ml
NaCl (5 M)	33 ml
Tween® 20	1 ml

- 5 % Milchpulver in TBS-T

4 x SDS – Probenpuffer (Lämli) (9 ml in ddH₂O)

Tris/HCl pH 6,8 (0,5M)	2 ml
Bromphenolblau (0,5%)	0,5 ml
SDS	0,8 g
Glycerin (100 %)	1 ml

Es werden Aliquot à 900 µl hergestellt. Vor dem Gebrauch werden 100 µl β-Mercaptoethanol hinzu gegeben.

Trenngel – Puffer für 2 SDS-PAGE (10 %)

Acrylamid/Bisacrylamid (40 %)	2,5 ml
dd H ₂ O	4,8 ml
Tris/HCl pH 8,8 (1,5 M)	2,5 ml
SDS (10 %)	100 µl
Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)	75 µl
TEMED	7,5 µl

Sammelgel – Puffer für 2 Gele

Acrylamid/Bisacrylamid (40 %)	0,5 ml
dd H ₂ O	3,15 ml
Tris/HCl pH 6,8 (0,5 M)	1,25 ml
SDS (10 %)	50 µl
Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)	40 µl
TEMED	7 µl

Puffer P

Tris/HCl pH 8,0 (1 M)	10 mM
NaCl (5 M)	100 mM
EDTA (0,5 M)	1 mM
Triton X-100	2 %
SDS (10 %)	1 %

Lysispuffer (für Hefe)

Tris/HCl pH 6,8 (0,5 M)	100 mM
Glycerol	10 %
β-Mercaptoethanol (β-ME)	2 %

10 x TE

Tris/HCl pH 7,6 (1 M)	100 mM
EDTA (0,5 M)	10 mM

1xTE/LiAc/PEG

LiAc (10 x)	10 ml
TE (10 x)	10 ml
PEG 3350	80 ml

Z-Puffer (1 L in ddH₂O)

Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O	16,2 g
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	5,5 g
KCl	0,75 g
Mg ₂ SO ₄ * 7 H ₂ O	0,246 g

DIG Southern Blot Lösungen

0,25 M HCl (1L)

HCl	20.66 ml
ddH ₂ O	979.34 ml

1 M Ammonium-Acetat, 0,02 M NaOH (1 L)

Ammonium-Acetat	77.08 g
NaOH	0.8 g

0,5X SSC, 0,1 % SDS (1L)

20X SSC	25 ml
10 % SDS	10 ml
dH ₂ O	965 ml

Wasch-Buffer 3 (30 ml)

Maleic Acid Buffer	30 ml
Tween 20	90 µl

Detektion Puffer (1L)

1M Tris pH 9.5	100 ml
5M NaCl	20 ml
ddH ₂ O	880 ml
autoklavieren	

1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH (1L)

NaCl	87,66 g
NaOH	20 g

2X SSC, 0,1 % SDS (1L)

100 ml	20X SSC
10 ml	10 % SDS

Maleinsäure-Puffer (1L)

11,61 g	Maleinaäure
8,77 g	NaCl
~ 7 g	NaOH-Pellets für pH-Wert von 7,5
	autoklavieren

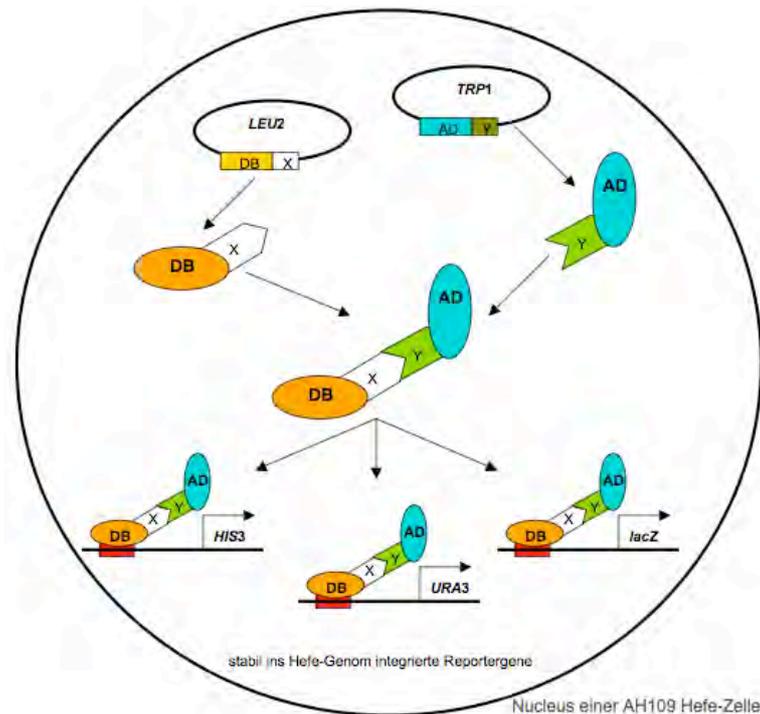
Antikörper-Lösung (30 ml)

3 ml	Blocking Buffer (Roche)
27 ml	Maleinsäure-Puffer
3 μ l	DIG-Antikörper

3. Methoden

3.1. Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast-Two-Hybrid Screen)

Um die Auswirkung von β -Catenin auf das linksventrikuläre Remodeling zu untersuchen, ist es notwendig neue kardialspezifische Interaktionspartner von β -Catenin zu identifizieren. Eine dahingehend häufig angewandte Methode ((Krause, Zacharias et al. 2004) (Thyssen, Li et al.) ist das Hefe-Zwei-Hybrid System (*Yeast Two Hybrid*) (Fields and Song 1989). Die Grundlage dieses Systems bilden zwei verschiedene Fusionsproteine (**Abb. 9**).

**Abb. 9: Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-System.**

Ziel eines Hefe-Zwei-Hybrid (*Yeast Two-Hybrid*) Systems ist der Nachweis der Interaktion zwischen zwei Proteinen. Voraussetzung hierfür sind zwei verschiedene Fusionsproteine. Das Plasmid, welches für das Köder-Protein (X) kodiert, enthält darüber hinaus die DNA-bindende Domäne (DB) des Transkriptionsfaktors *GAL4*. Das Beute-Plasmid enthält die kodierende Sequenz eines unbekannt Proteins (Y) aus einer cDNA-Bibliothek und die transkriptionsaktivierende Domäne (AD) von *GAL4*. Beide Plasmide werden in den *Saccharomyces cerevisiae* Hefestamm AH109 transformiert, der kein funktionierendes *gal4*-Gen hat, dafür jedoch über Reportergene verfügt, denen eine *GAL4*-Bindestelle vorgeschaltet ist. Kommt es zu einer Interaktion zwischen dem Köder-Protein X mit einem unbekannt Protein Y der cDNA-Bibliothek, erfolgt eine Rekonstitution des *GAL4*-Transkriptionsfaktors, was die Expression der Reportergene zur Folge hat. Dadurch können die Hefezellen auch auf Aminosäure-defizienten Platten wachsen, wodurch sich die Interaktion beider Proteine nachweisen lässt. (Fields and Song 1989)

Das Plasmid, welches für das *bait*-Protein (*bait* = Köder) kodiert, enthält darüber hinaus die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors *GAL4*. Das *prey*-Plasmid (*prey* = Beute) enthält die kodierende Sequenz eines unbekannt Proteins aus einer kardialen cDNA-Bibliothek und die transkriptionsaktivierende Domäne von *GAL4*. Beide Plasmide werden in den *Saccharomyces cerevisiae* Hefestamm AH109 transformiert, der kein funktionierendes *gal4*-Gen hat, dafür jedoch über Reportergene (*Ura3*, *His3*, *lacZ*) verfügt, denen eine *GAL4*-Bindestelle vorgeschaltet ist. Kommt es zur Interaktion zwischen dem *bait*-Protein mit einem unbekannt *prey*-Protein der cDNA-Bibliothek, erfolgt eine Rekonstitution des *GAL4*-Transkriptionsfaktors, was die Expression der

Reportergene zur Folge hat. Dadurch kommt es zum Wachstum auf entsprechenden aminosäuredefizienten Nähragarplatten, wodurch sich vermeintliche Interaktionspartner von β -Catenin detektieren lassen.

Die Grundlage für dieses Hefe-Zwei-Hybrid System entstammt dem Protokoll PROQUEST™ Two-Hybrid System (Fa. Gibco; CAT. SERIES 10835), das jedoch modifiziert wurde. Aus diesem Grund wird das für die Arbeit verwendete Protokoll im Folgenden ausführlich erläutert.

3.1.1. *Small Scale Screen*

Der Beginn der Selektion für vermeintliche Interaktionspartner des *bait*-Proteins beinhaltet die Induktion des *HIS3*-Reportergens. Einige Transkriptionsfaktoren oder Proteine ohne Funktion innerhalb der Transkriptionsaktivierung können Abschnitte enthalten, die bei einer Fusion mit dem pDBLeu-Plasmid zu einer Selbst-Aktivierung des *HIS3*-Reportergens führt. Darüber hinaus enthält der AH109-Hefestamm ein geringes basales Level an *HIS3*, wodurch es bei der Fusion von *bait*- und *prey*-Plasmid ebenfalls zu einer Aktivierung kommen kann. Eine effektive Selektion ist nur dann zu gewährleisten, wenn zuvor das basale Level der *HIS3*-Reportergen Expression ermittelt wurde. Dafür wird zunächst ein *Small Scale Screen* mit den in **Tabelle 1** angegebenen Transformationsansätzen in AH109-Zellen durchgeführt. *HIS3* kodiert für das Enzym Imidazol-Glycerol-Phosphat-Dehydratase, das bei der Histidin-Biosynthese eine wichtige Rolle spielt. Dieses Enzym kann dosis-abhängig durch 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) inhibiert werden. Durch die Ermittlung der Schwelle zur Resistenz gegenüber 3AT kann man im anschließenden *Large Scale Screen* selbst eine geringe Aktivierung des *HIS3*-Reportergens anhand von entsprechendem Wachstum auf SC -L/ -T/ -H + 3AT Platten detektieren. Die Inkubation der Hefe-Kulturen bzw. Nähragarplatten erfolgt bei 30 °C. Für den *Small Scale Screen* werden einen Tag vor der eigentlichen Transformation 10 ml YPAD-Medium mit einer Kolonie des *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) Stamm AH109 angeimpft, die zuvor auf einer YPAD-Nähragarplatte ausgestrichen wurden. Diese Vorkultur wird über Nacht (ü.N.) bei 300 rpm inkubiert. Von der Vorkultur wird ein entsprechendes Volumen zu 100 ml YPAD-Medium gegeben, bis eine optische Dichte (OD_{595nm}) von 0,1 erreicht ist. Anschließend wird diese Kultur bei 300 rpm bis zu einer OD_{595nm} von 0,5 inkubiert. Nach Erreichen der genauen optischen Dichte, was ca. fünf Stunden dauert, werden die Zellen bei 2000 rpm und 4 °C für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das gewonnene Pellet in 40 ml ddH₂O resuspendiert und erneut fünf Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wird das so gewonnene Zellpellet in 10 ml 1x TE/LiAc-Puffer aufgenommen, resuspendiert und ein weiteres Mal für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet der kompetenten AH109-Zellen wird in 350 μ l 1x TE/LiAc-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gestellt. Für die Transformationsansätze wird zunächst Hering-Sperma-DNA fünf Minuten bei 95 °C hitze-inaktiviert. Pro Transformationsansatz (**Tabelle 1**) werden im Anschluss zu 50 μ l kompetenten AH109-Zellen jeweils 5 μ l hitze-inaktivierte Hering-Sperma-DNA, sowie 1 μ g Gesamt-DNA gegeben und mit 300 μ l 1xTE/LiAc/PEG-Lösung überschichtet. Die Ansätze werden

zunächst für 30 Minuten bei 30 °C und anschließend 15 Minuten bei 42 °C jeweils im Wasserbad inkubiert.

Tabelle 1: Transformationsansätze für den *Small Scale Screen*

Transformation	Plasmid 1	Plasmid 2	Selektion	Funktion
1	pDBLeu	-	SC* -L	Positive Transformationskontrolle
2	-	-	SC -L und SC -L -T	Negative Transformationskontrolle
3	pDBLeu	pEXP-AD502	SC -L -T	Kontrolle zur Selbstaktivierung beider Plasmide
4	β -Catenin /pDBLeu	pEXP-AD502	SC -L -T	Kontrolle zur Selbstaktivierung des "bait"-Plasmid
5	β -Catenin /pDBLeu	-	SC -L	Vorkultur für Large Scale Screen

* synthetic complete (SC) - Agar

Danach werden die Zellen bei 5000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für eine Minute abzentrifugiert und das Pellet in 500 μ l ddH₂O aufgenommen. Jeweils 100 μ l pro Ansatz werden auf die in Tabelle 1 beschriebenen aminosäure-defizienten Selektionsplatten ausgestrichen und für drei Tage inkubiert (-L = ohne Leucin; -T = ohne Tryptophan). Von den Ansätzen 1, 3, 4 und 5 werden Kolonien nach dem unten stehenden Schema in **Abb. 10** auf zwei neue SC -L -T Platten ausgestrichen (Doppelbestimmung) und für 18 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgt das sogenannte „replica plating“, wobei die gewachsenen Kolonien mithilfe eines Samttuches als Stempel von den SC -L/ -T Platten auf SC -L / -T / -H Platten (-H = ohne Histidin) mit verschiedenen 3-AT-Konzentrationen (0 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM und 100 mM) übertragen werden.

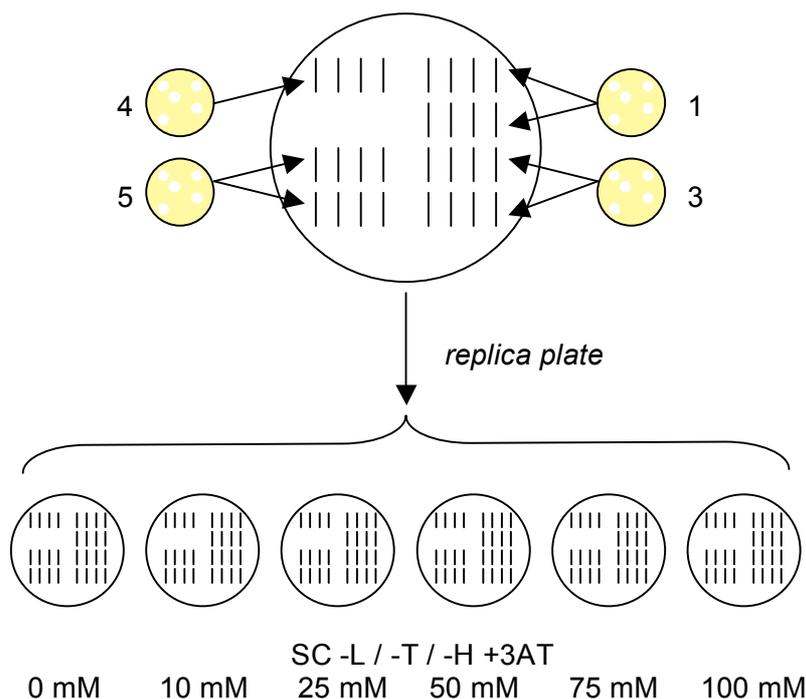


Abb. 10: Schema zur Ermittlung der für den *HIS3*-Phänotyp notwendigen 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) - Konzentration. Die gewachsenen Kolonien der Transformationsansätze 1, 3, 4 und 5 unter den in Tabelle 1 angegebenen Selektionsbedingungen werden auf zwei SC -L / -T - Platten neu ausgestrichen und bei 30 °C für 18 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgt das *replica plating*, wobei die verschiedenen Ausstriche auf SC -L / -T / -H mit 0 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM und 100 mM 3AT übertragen werden. Die Ermittlung der 3AT-Konzentration erfolgt in Doppelbestimmung.

Nach zwei Tagen Inkubationszeit erfolgt das sogenannte „replica clean“, wobei hier ebenfalls mithilfe eines Samttuches als Stempel die gewachsenen Kolonien von der Oberfläche der Selektionsplatte abgenommen werden. Die Platten werden für weitere drei Tage inkubiert. Anschließend wird die 3AT-Konzentration ermittelt, bei der das Wachstum der Hefezellen unter Co-Transformation des β -Catenin/pDBLeu- und des pEXP-AD502-Plasmids (Tabelle 1, Ansatz 4) ohne Histidin fast vollständig inhibiert ist. Die ermittelte 3AT-Konzentration wird im folgenden *Large Scale Screen* eingesetzt.

3.1.2. *Large Scale Screen*

Für die Identifikation von β -Catenin-Interaktionspartnern aus einer humanen kardialen cDNA-Bibliothek (zur Verfügung gestellt von Prof. Norbert Frey, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) wurde zwei *Large Scale Screens* durchgeführt. Zunächst erfolgt eine Co-Transformation des β -Catenin/pDBLeu-Plasmids mit der cDNA-Bibliothek (cDNA Klone im pEXP-AD502 Plasmid). Im zweiten Screen erfolgt die Transformation der kardialen cDNA-Bibliothek in mit β -Catenin/pDBLeu vortransformierten AH109 Hefezellen. Einen Tag vor der Co-Transformation werden 10 ml YPAD-Medium mit einer Kolonie des *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) Stamm AH109 angeimpft. Für die vortransformierte Vorkultur werden 25 ml SC-Leu Medium mit einer Kolonie von Platte 5 (Tabelle 1, Ansatz 5) angeimpft. Die Vorkulturen werden ü.N. bei 300 rpm inkubiert. Von der Vorkultur wird ein entsprechendes Volumen zu 300 ml YPAD-Medium (Co-Transformation) bzw. 500 ml SC-Leu Medium (Vortransformation) gegeben, bis eine optische Dichte (OD_{595nm}) von 0,1 erreicht ist. Für die Transformation werden beide Kulturen im Anschluss gleich behandelt. Nach Erreichen der $OD_{595nm} = 0,5$ bei 300 rpm, werden die Zellen bei 2000 rpm und 4 °C für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das gewonnene Pellet in 60 ml ddH₂O resuspendiert und erneut fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wird das so gewonnene Zellpellet in 10 ml 1x TE/LiAc-Puffer aufgenommen, resuspendiert und ein weiteres Mal für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird in 250 μ l 1x TE/LiAc-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gestellt. Für den Transformationsansatz wird zunächst Hering Sperma DNA fünf Minuten bei 95 °C hitze-inaktiviert. Der Transformationsansatz wird wie in **Tabelle 2** beschrieben in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen angesetzt und 30 Minuten bei 30 °C in einem Wasserbad inkubiert.

Tabelle 2: Transformationsansatz für den Large Scale Screen

250 μ l	AH109 kompetente Zellen
50 μ l	hitze-inaktivierte Hering Sperma DNA
10 μ l (entspricht 10 μ g)	β -catenin/pDBLeu-Plasmid*
10 μ l (entspricht 10 μ g)	kardiale cDNA-Bibliothek
1,5 ml	1x TE/LiAc/PEG

* entfällt bei vortransformierten AH109 Hefezellen

Anschließend erfolgt die Zugabe von 88 μ l DMSO und eine weitere Inkubation für 20 Minuten bei 42 °C im Wasserbad. Danach werden die Zellen für fünf Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 12 ml ddH₂O aufgenommen. Zur Ermittlung der

Transformationseffizienz werden vom Transformationsansatz eine 1:100 und eine 1:1000 Verdünnung angesetzt. Jeweils 100 μ l der beiden Verdünnungen werden auf eine 10 cm SC -L/-T Platte ausgestrichen. Der restliche Transformationsansatz wird jeweils zu 400 μ l auf 15 cm SC -L -T -H +25mM 3AT Nähragarplatten ausgestrichen und für drei Tage inkubiert. Damit die Platten nicht austrocknen, werden sie mit Parafilm umwickelt. Nach der Inkubation wird die Transformationseffizienz ermittelt und alle gewachsenen Klone auf gerasterte SC -L /-T Platten ausgestrichen. Die Platten mit den Klonen werden bei 30 °C inkubiert und nach drei Tagen zur Ermittlung des Phänotypes auf Selektionsplatten umgesetzt (**Abb. 11**).

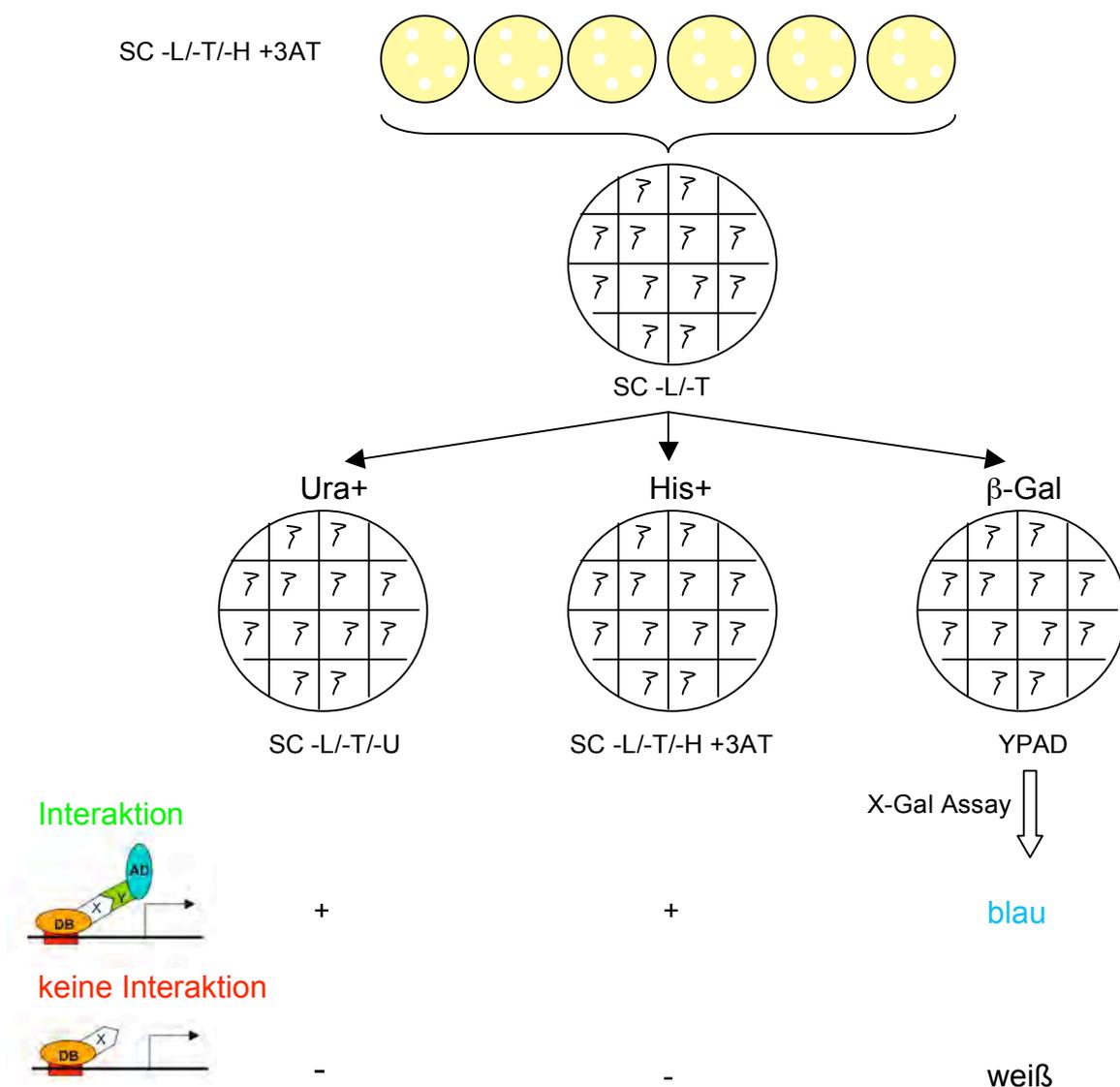


Abb. 11: Ermittlung und Auswertung der Hefereporter-Gene *URA3*, *HIS3* und *lacZ*. Die mit dem β -Catenin/pDBLeu und der cDNA-Bibliothek transformierten Hefezellen werden auf aminosäure-defiziente Selektionsplatten (SC -L/ -T/ -H +25 mM 3AT) ausgestrichen und für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend werden die einzelnen Kolonien auf SC -L /-T rasterförmig ausgestrichen und weitere drei Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Ermittlung der Aktivierung der Hefe-Reportergene *URA3*, *HIS3* und *lacZ*, die durch Fusion von *bait* und *prey* Plasmid erfolgen, werden die ausgestrichenen Kolonien auf entsprechende Selektionsplatten umgesetzt: für *URA3* auf SC -L /-T/ -U, für *HIS3* erneut auf SC -L/ -T/ -H +25 mM 3AT und für *lacZ* zunächst auf YPAD-Platten, von denen nach einem Tag Inkubation bei 30 °C ein X-Gal-Assay angefertigt wird. Liegt eine Interaktion zwischen einem cDNA-Klon und β -Catenin vor, erfolgt durch deren Fusion die Aktivierung der Reportergene, was sich in einem Wachstum der Klone auf den entsprechenden Selektionsplatten zeigt, sowie in einer Blaufärbung im X-Gal-Assay.

Nach einem Tag erfolgt für die SC-Selektionsplatten das oben beschriebene „replica clean“-Verfahren und eine weitere Inkubation für zwei Tage. Die YPAD-Platten werden für das X-Gal-Assay weiterverwendet.

3.1.3. X-Gal-Assay

Dieses Assay dient zur Ermittlung des *lacZ*-Phänotypes und beinhaltet die enzymatische Umsetzung von X-Gal in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo durch das Enzym β -Galaktosidase, welches durch die erfolgreiche Interaktion von Köder- und Beute-Protein in den AH109-Hefezellen exprimiert wird. Pro YPAD-Platte wird zunächst ein rundes Whatman-Papier in eine Petrischale gelegt und mit 2 ml X-Gal/Z-Puffer befeuchtet. Ein zweites rundes Whatman-Papier wird auf die Kolonien der YPAD-Platte gelegt und angedrückt, sodass die Kolonien auf das Whatman-Papier übergehen. Das Papier wird mit einer Kanüle markiert und schnell mit einer Pinzette von der Agarplatte abgezogen. Mit den Kolonien nach oben wird das Whatman für ca. zwei Minuten in flüssigen Stickstoff gelegt, damit die gewachsenen Hefezellen permeabilisiert werden. Anschließend wird das Whatman-Papier zur Trocknung fünf Minuten auf ein Papiertuch gelegt. Zum Schluss wird das Whatman-Papier mit den Kolonien nach oben auf das erste Whatman in der Petrischale mit X-Gal/Z-Puffer gelegt, sodass es sich mit der Flüssigkeit vollsaugen kann. Anschließend erfolgt eine Inkubation bei 37 °C. Nach ca. einer Stunde sind die ersten blauen Kolonien sichtbar. Die vollständige *lacZ*-Bildung ist nach 12 Stunden abgeschlossen und die Whatman-Papiere können getrocknet werden. Zum Schluss erfolgt die Auswertung der Phänotypen nach dem oben beschriebenen Schema (**Abb. 11**).

3.1.4. Re-Transformation

Zur zusätzlichen Überprüfung der Protein-Interaktion erfolgt eine Re-Transformation. Dabei werden die gefundenen cDNA-Klone mit dem β -Catenin/pDBLeu Plasmid co-transfiziert und alle Phänotypen ein weiteres Mal überprüft. Entsprechen diese Ergebnisse den in Abbildung 11 angegebenen Punkten zur positiven Protein-Interaktion, werden diese Klone weiter untersucht.

3.1.5. Protein-Extraktion aus *Saccharomyces cerevisiae*

Um die Expression von β -Catenin im Hefestamm AH109 zu testen, wird vom Ansatz 1 und 5 (**Tabelle 1**), sowie von untransformierten AH109-Zellen eine ü.N.-Flüssigkultur angesetzt und anschließend eine Protein-Isolation aus *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Dazu werden die Zellen fünf Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 50 μ l Puffer P resuspendiert. Nach Zugabe von 300 mg Glaskügelchen werden die Proben für zwei Minuten gevortext, weitere 400 μ l Puffer P hinzugegeben und für drei Minuten auf 95 °C erhitzt. Nach fünf Minuten Zentrifugation bei 13.000 rpm, wird der Überstand abgenommen und für ein SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot (**3.4.4.**) verwendet.

3.1.6. Plasmid-DNA-Isolation aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Analyse der gefundenen Klone aus der cDNA-Bibliothek, werden die Klone zur Selektion von der YPAD-Platte auf gerasterte SC-T Agarplatten ausgestrichen und für zwei Tage inkubiert. Anschließend werden von den Klonen 3 ml SC -L Flüssigkulturen angeimpft und ü.N. bei 300 rpm inkubiert. Von der Flüssigkultur werden am nächsten Tag 1,5 ml bei 13.000 rpm für 30 Sekunden abzentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und 300 mg Glaskügelchen, werden die Proben für ca. eine Minute unter dem Abzug gevortext. Danach werden die Proben für fünf Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und die obere Phase in ein neues 1,5 ml Eppendorff-Gefäß überführt. Dabei muss das Volumen der oberen Phase ermittelt werden, da die anschließende Fällung mit 0,1 Volumen-Einheiten (VE) 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 VE EtOH absolut durchgeführt wird. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C. Das entstandene Pellet wird mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der überschüssige Alkohol wird abgesaugt und das Pellet kopfüber getrocknet. Zum Schluss wird das Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur weiteren Analyse wird die gewonnene DNA in elektrokompetente Bakterien (XL1-Blue) transformiert.

3.1.7. Herstellung elektrokompetenter XL1-Blue Bakterien

Von bereits vorhandenen XL1-Blue Bakterien wird 1 µl in 100 µl LB-Medium gelöst und auf eine LB-Nähragarplatte ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden 10 ml LB-Medium mit einer Kolonie von dieser Platte angeimpft und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag werden 600 ml LB-Medium mit einem entsprechenden Volumen dieser Vorkultur angeimpft, sodass eine optische Dichte (OD_{595nm}) von 0,1 erreicht wird. Anschließend wird diese Kultur bis zu einer OD_{595nm} von 0,5 bei 37 °C und 300 rpm inkubiert, um die Bakterien während ihrer logarithmischen Wachstumsphase zu ernten. Zunächst wird der Kolben mit der Bakterien-Suspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend auf zwei Zentrifugen-Becher verteilt und für 20 Minuten bei 4000 rpm abzentrifugiert. Die entstandenen Pellets werden in jeweils 20 ml eiskaltem ddH₂O gelöst, dann auf 400 ml mit eiskaltem ddH₂O aufgefüllt und erneut für fünf Minuten zentrifugiert. Zunächst erfolgt wieder das Resuspendieren der Pellets in jeweils 20 ml eiskaltem ddH₂O, die Suspensionen werden vereinigt, mit eiskaltem H₂O auf 400 ml aufgefüllt und erneut fünf Minuten zentrifugiert. Zur weiteren Komprimierung des Volumens wird das entstandene Pellet in 20 ml eiskalter 10 % Glycerin-Lösung resuspendiert und 20 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert. Das Pellet wird dann in 5 ml eiskalter 10% Glycerin-Lösung resuspendiert und erneut fünf Minuten zentrifugiert. Zum Schluss wird das Pellet in 2 ml eiskalter 10 % Glycerin -Lösung resuspendiert und in Aliquots à 50 µl in 1,5 ml *safe-lock* Reaktionsgefäße überführt. Nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff werden die kompetenten Bakterienzellen bei -80 °C gelagert. Mit einem Aliquot wird anschließend die Transformationseffizienz mit Hilfe des pcDNA3.1-Leervektors ermittelt.

3.1.8. Elektroporation elektrokompetenter XL1-Blue Bakterien

Die gewonnene Plasmid-DNA der Y2H Klone wird zur weiteren Analyse in elektrokompetente XL1-Blue Bakterien transformiert. Dazu werden zu 50 µl XL1-Blue Zellen 3 µl der gewonnenen Plasmid-DNA gegeben und die Suspension in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation erfolgt bei 1350 mA in zwei Pulsen. Anschließend werden die elektroporierten Bakterien zügig mit 1 ml vorgewärmten SOC-Medium aus der Küvette gespült und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Inkubation (37 °C; 300 rpm) für eine Stunde, werden 250 µl auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten (100 µg/ml) ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

3.2. Molekularbiologische Methoden

Die folgenden molekularbiologischen Standardmethoden wurden der Protokollsammlung von SAMBROOK et al. (Joseph Sambrook) entnommen und entsprechend den Herstellerangaben in den angeführten *Kits* durchgeführt.

- Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* (Mini Präparation mit *Mini Prep Kit* von Invitex) (Midi Präparation mit *NucleoBond® Midi Kit* von Macherey-Nagel)
- Isolierung genomischer DNA aus Gewebe und Zellen (*Qiagen® Dneasy Blood & Tissue Kit*)
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mit NANODROP (Fa. peqlab)
- Photometrische Proteinbestimmung (nach BRADFORD)
- Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) (Lowry, Rosebrough et al. 1951) für Proteine und Agarose-Gelelektrophorese)
- PCR-Analysen (Standard-PCR, quantitative realtime-PCR (qRT-PCR))
- Gelextraktion und Reinigung von DNA (*Qiagen® Gel Extraction Kit*)
- Isolierung von RNA aus Gewebe und Zellen (*NucleoSpin RNA II Kit* von Macherey-Nagel)

3.2.1. Reverse Transkription von RNA

Für die Analyse mittels quantitativer *realtime* PCR (qRT-PCR) wird die gewonnene RNA mit Reverser-Transkriptase der Fa. Promega in cDNA umgeschrieben (Beispiel-Schema siehe Anhang). Die Synthese erfolgt in der PCR-Maschine der Fa. Biometra. Die so synthetisierte cDNA hat eine Konzentration von 1 µg/µl und wird für die anschließende qRT-PCR 1:10 in ddH₂O verdünnt.

3.2.2. quantitative realtime-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR nutzt die herkömmliche molekularbiologische Methode der spezifischen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten (Polymerasekettenreaktion), ermöglicht jedoch zusätzlich eine Quantifizierung der entstandenen PCR-Produkte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green™ (Fa. Promega). SYBR-Green™ lagert sich dabei an die entstehenden doppelsträngigen PCR-Fragmente, somit nimmt die Fluoreszenz mit der Menge an PCR-Produkten zu. Anhand einer gleichzeitig mit zu untersuchenden Standardreihe kann somit während der exponentiellen Phase der

PCR eine Quantifizierung, d.h. die Anzahl an Kopien der entstehenden PCR-Fragmente, ermittelt werden. Dazu wird am Ende der qRT-PCR eine Schmelzkurve durchgeführt, bei der das Reaktionsgemisch ab 55 °C bzw. 60 °C jeweils um 1 °C erhöht wird, bis eine Temperatur von 95 °C erreicht ist. Der Schmelzpunkt der doppelsträngigen DNA ist dann durch einen starken Abfall der Fluoreszenz erkennbar. Dieser Wert geht dann in die anschließende Berechnung für die relative mRNA Expression der Proben ein. Die zu untersuchenden Gene werden durch die *housekeeping*-Gene Gapdh und β -Aktin normalisiert. Der Ansatz bzw. das qRT-PCR-Programm sind im Anhang aufgeführt. Die Anlagerungstemperaturen (55 °C oder 60 °C) sind **2.2.** (Material/Oligonukleotide) zu entnehmen.

3.2.3. Southern Blot

3.2.3.1. RNA Sonden-Präparation

Zur Linearisierung der Vektor-DNA aus der die RNA-Sonde gewonnen werden soll, wird die Vektor-DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen versetzt. Die Enzyme werden dabei so gewählt, dass ein Enzym nach dem Fragment schneidet und zur RNA-Synthese die Sp6 RNA-Polymerase verwendet werden kann (*sense* Probe). Das zweite Enzym schneidet vor dem Fragment, sodass die T7 RNA-Polymerase zur Synthese genutzt werden kann (*anti-sense* Probe). Zur analytischen Spaltung der Plasmid-DNA mittels Restriktionsenzymen wird jeweils 2 μ g *Template*-DNA eingesetzt und mit dem entsprechenden Enzym über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.3.2. *in vitro* Transkription DIG-markierter RNA-Sonden

Nachdem mittels Agarosegelelektrophorese der vollständige Verdau der Vektor-DNA gezeigt wurde, wird die ü.N. linearisierte *Template*-DNA mit den verschiedenen Bestandteilen des DIG-Labeling Kit von Roche vermengt (**Tabelle 3**) und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 3: Ansatz zur DIG-Markierung der RNA-Sonde

Template DNA	8 μ l
10x DIG-labeling Mix	2 μ l
10x Transkriptionspuffer	2 μ l
RNasin	1 μ l
RNA-Polymerase (T7 oder Sp6)	2 μ l
ddH ₂ O	5 μ l
Σ	20 μ l

Zur Entfernung der *Template*-DNA werden pro Ansatz anschließend 2 μ l DnaseI hinzugegeben und für weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion und zur Aufreinigung der RNA wird zum Ansatz 100 μ l ddH₂O, 10 μ l 4M LiCl und 300 μ l 100 % EtOH (-20 °C) gegeben und durch vortexen vermischt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei -80 °C erfolgt die Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C in einer HAEREUS Tischzentrifuge. Das Pellet wird nach dem Waschen mit 70 % EtOH (-20 °C) luftgetrocknet und zum Schluß in 50 μ l DEPC-H₂O aufgenommen. Die

Überprüfung der RNA-Sonde erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese. Zum Schluss erfolgt die RNA-Konzentrationsbestimmung.

3.2.3.3. Southern Blot zur Hybridisierung von genomischer DNA mit einer DIG-markierten RNA-Sonde

Zur Fragmentierung der genomischen DNA für den Southern Blot (Murray M. G. 1992) wird eine enzymatische Spaltung von 20 µg genomischer DNA mit drei Restriktionsenzymen (EcoRI, BamHI und XhoI) durchgeführt und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese bei 100 V die Auftrennung der geschnittenen DNA. Anschließend wird das Gel in einer 1 % EtBr-Lösung für 15 Minuten gefärbt. Im Anschluss wird unter UV-Licht ein Foto des Gels gemacht. Zusätzlich wird als Maßstab und zur späteren Quantifizierung ein fluoreszierendes Lineal mit angelegt. In Vorbereitung auf den Transfer wird die DNA zunächst denaturiert indem das Gel 2 x 15 Minuten in 1,5 M NaCl / 0,5 M NaOH - Lösung gewaschen wird. Anschließend wird das Gel für 5 Minuten in 0,1 % DEPC-H₂O gewaschen. Zur Neutralisierung der DNA wird das Gel im Anschluss 2 x 20 Minuten in 1 M Ammoniumacetat / 0,02 M NaOH - Lösung gewaschen. Zum Schluss wird das Gel für 10 Minuten in 20XSSC-Lösung inkubiert. Alle Schritte werden auf einem Schüttler bei mittlerer Geschwindigkeit durchgeführt. Der Transfer der DNA auf die Nitrocellulosemembran erfolgt ü.N. bei Raumtemperatur in einem mit 20XSSC gefüllten Puffertank nach dem unten stehenden Schema (**Abb. 12**).

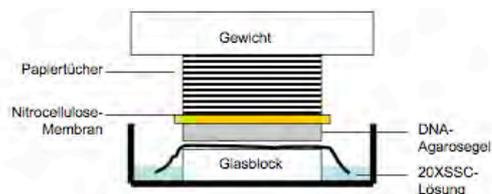


Abb. 12: Schematischer Aufbau zur Übertragung der enzymatisch geschnittenen DNA auf eine Nitrocellulosemembran mittels Kapillarkräfte.

Am nächsten Tag wird die Membran vom Gel entfernt. Das Gel wird erneut in einer 1 % EtBr-Lösung gefärbt, um den vollständigen Transfer zu überprüfen. Die Membran wird auf ein mit 2XSSC getränktes Whatman-Papier gelegt, das sich auf einer Glasplatte befindet und für drei Minuten mit dem UV-Licht der Gel-Dokumentationsanlage bestrahlt. Damit wird die DNA auf der Membran versiegelt. In der Zwischenzeit sollte der Inkubator und die Hybridisierungslösung auf 65 °C vorgewärmt werden. Nach der UV-Bestrahlung wird die Membran in ein 50 ml Falconröhrchen, das zuvor mit 20 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung gefüllt wurde, überführt und für vier Stunden auf einem Drehrad bei 65 °C prä-hybridisiert. Die in 3.2.3.2. hergestellte anti-sense RNA-Sonde wird mit einer Konzentration von 100 ng / ml Hybridisierungslösung in 50 µl DEPC-H₂O gelöst und für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Parallel wird der Inkubator auf 68 °C erwärmt. Anschließend wird die Sonde auf Eis abgekühlt und in ein 50 ml Falconröhrchen mit 20 ml Hybridisierungslösung gegeben. Zum Schluss wird die Membran in das neue Röhrchen mit Hybridisierungslösung und RNA-Sonde überführt und ü.N. auf einem Drehrad bei 68 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird die

Membran vorsichtig in ein neues Röhrchen mit 2X SSC / 0,1% SDS (= *low-stringency* Puffer) überführt und für zweimal fünf Minuten bei 68 °C auf einem Drehrad gewaschen. Danach wird die Membran in ein weiteres Röhrchen mit 0,5X SSC / 0,1 % SDS (= *high-stringency* Puffer) überführt und für zweimal 15 Minuten bei 68 °C inkubiert. Zur vollständigen Entfernung des SDS von der Membran, wird die Membran in eine Schale mit Maleinsäure-Puffer überführt und auf einem Schüttler bei mittlerer Geschwindigkeit für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Membran in 1x Blockpuffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Der DIG-Antikörper wird im Anschluss 1:10.000 in 1x Blockpuffer verdünnt. Die Membran wird dann für 30 Minuten mit dem Antikörper inkubiert. Zum Schluss wird die Membran zweimal 15 Minuten mit Waschpuffer 3 gewaschen bevor mit der CDP-Star Lösung die Hybridisierung zwischen DNA und RNA-Sonde nachgewiesen wird. Nach einer Belichtungszeit zwischen zwei und fünf Minuten kann ein positives Signal der Hybridisierung auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

3.2.4. Sequenzierungen

Die Sequenzierungen der gefundenen Y2H-Klone erfolgt mittels Stichagarplatten. Die Isolation und anschließende Sequenzierung der DNA, sowie die Sequenzierung von Klonierungsfragmenten wird durch die Firma GATC-Biotech durchgeführt. Zur Analyse von PCR-Fragmenten werden die DNA-Proben von der Firma Invitak GmbH sequenziert. Alle verwendeten Primer sind in 2.2. (Oligonukleotide) aufgelistet.

3.3. Zellkultur

3.3.1. Auftauen, Kultivieren und Einfrieren von Primärzellen und Zelllinien

Sämtliche verwendeten Zell-Linien werden im 37 °C Wasserbad aufgetaut, in 10 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen und fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml Medium resuspendiert und auf eine Zellkulturplatte (P19: mit 1 % Gelatine beschichtet) gegeben. Die Kultivierung aller verwendeten Zellen erfolgt, soweit nicht weiter angegeben bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Inkubator. Das Einfrieren der verwendeten Primärzellen sowie der Zell-Linien erfolgt auf ähnliche Weise wie das Kultivieren. Jedoch werden die Zellen nach dem Abstoppen des Trypsin/EDTA-Verdau für fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert und das Pellet von einer Zellkulturplatte in 1 ml des entsprechenden Einfrier-Mediums resuspendiert, in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt und in einem *Nalgene Freezing Container* eingefroren. Am nächsten Tag werden die Kryoröhrchen zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff umgestellt.

3.3.2. HEK293; P19

Nach dem Auftauen können die Zellen alle zwei bis drei Tage im entsprechenden Verhältnis (HEK293 1:4; P19 1:10) geteilt werden. Hierzu werden die Zellen mit 1x PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) gewaschen und anschließend mit 1 ml 0,25 % Trypsin/EDTA für fünf Minuten bei 37 °C im Brutschrank

inkubiert. Die Reaktion wird mit 10 ml Medium abgestoppt und die abgelösten Zellen auf neue Zellkulturflaschen oder -platten verteilt.

3.3.3. Präparation neonataler Rattenkardiomyozyten (NCM)

Zur Kultivierung neonataler Ratten-Kardiomyozyten werden unter sterilen Bedingungen die Herzen von 2-3 Tage alten Wistar-Ratten entnommen und mit dem Skalpell das Gewebe zerkleinert. 25 ml der Enzymlösung werden im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Zur enzymatischen Auflösung des Herzgewebes wird die Enzymlösung zusammen mit einem Rührstäbchen anschließend zu den zerkleinerten Herzen in einen Glaskolben gegeben, der sich in einem Wasserbad (37 °C) befindet. Das Wasserbad steht auf einem Magnetrührer, wodurch eine kontinuierliche Vermischung der Suspension gewährleistet wird. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten, wird der Magnetrührer ausgeschaltet und kurz gewartet bis sich der Großteil der Gewebestücke sedimentiert hat. Anschließend wird der Überstand abgenommen. Die Gewebestücke werden dann erneut mit vorgewärmter Enzymlösung versetzt und erneut für fünf Minuten verdaut. Der Überstand wird auf 2,5 ml Pferde-Serum (4 °C) gegeben und anschließend bei 4 °C für vier Minuten bei 1.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und die pelletierten Herz-Zellen in 20 % Pferde-Serum aufgenommen und durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Anschließend werden die Zellen auf Eis gestellt. Dieser Verdau wird 12 mal wiederholt, wobei die letzten drei Verdau-Schritte jeweils 15 Minuten durchgeführt werden, um das gesamte Gewebe zu zersetzen. Alle Zell-Fractionen werden vereinigt und erneut bei 4 °C für vier Minuten bei 1.200 rpm zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen einmal mit 1x PBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in 8 ml PBS-Lösung vorsichtig resuspendiert. Jeweils 2 ml der Zell-Suspension werden anschließend auf einen Percoll-Gradienten gegeben. Dazu werden 4 ml Top-Percoll (Fa. Amersham) mit 3 ml Bottom-Percoll (Fa. Amersham) unterschichtet. Der beladene Percoll-Gradient wurde für 30 Minuten bei 20 °C und 3.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird die mittlere Schicht, in der sich die Kardiomyozyten befinden, vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen mit 25 ml PBS überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation von fünf Minuten bei 1.200 rpm und 20 °C, werden die Zellen in 40 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden in 10 ml DMEM/F12 – Medium resuspendiert und anschließend in einer Neubauer-Zellzählkammer gezählt. Die Zellen werden anschließend in zuvor mit 1 % Gelatine beschichtete 5 cm Petrischalen mit einer Dichte von 2.5×10^6 Zellen in DMEM/F12 – Medium plus 5 % Pferde-Serum ausgesät.

3.3.4. Transfektion HEK293 / NCM / P19

Die Methode der Transfektion ermöglicht das Einschleusen von fremder DNA in eukaryotische Zellen. Dabei erfolgt mit Hilfe eines Transfektionsreagenz die Lipofilisierung der DNA zur späteren Aufnahme in die Zellen. Die Transfektion wird mit dem FuGene® HD Reagenz von Roche nach Herstellerangaben für unterschiedliche Zellkulturgefäße durchgeführt. Am Vortag werden dazu die

Zellen mit entsprechender Zellzahl ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70-80 % aufweisen.

3.3.5. *in vitro* Differenzierung von P19-Zellen in Kardiomyozyten

Zur Differenzierung der P19-Zellen in schlagende Kardiomyozyten wird die „hanging drop“-Methode angewendet, wodurch es zur Bildung von sogenannten Embryonalkörperchen (*embryoid bodies*; EBs) kommt. In Abbildung 13 (**Abb. 13**) ist der zeitliche Verlauf des P19 *in vitro* Assays aufgeführt. 48 Stunden nach der Transfektion der P19-Zellen mit dem c-myc-FHL2/pCS-MT (FHL2) und dem Leervektor als Kontrolle (CTL) werden die Zellen geerntet, die Zellzahl bestimmt und eine Verdünnung von 20 Zellen / μl in Differenzierungsmedium angesetzt. Diese Verdünnung entspricht dann in einem 20 μl Tropfen 400 Zellen. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette werden in den Deckel einer Zellkulturschale 20 μl Tropfen der verdünnten Zellsuspension pipettiert, der Deckel anschließend vorsichtig umgedreht und die Platten für zwei Tage inkubiert. Anschließend werden die entstandenen EBs mit einer 5 ml Pipette und frischem Differenzierungsmedium von den Deckeln der Zellkulturplatten gewaschen und in 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Nachdem sich die EBs am Boden abgesetzt haben, wird der Überstand vorsichtig abgesaugt und die EBs mit frischem Differenzierungsmedium versetzt und in sterile Bakterienchalen zum weiteren Wachstum umgesetzt. Die Platten werden für weitere drei Tage inkubiert.

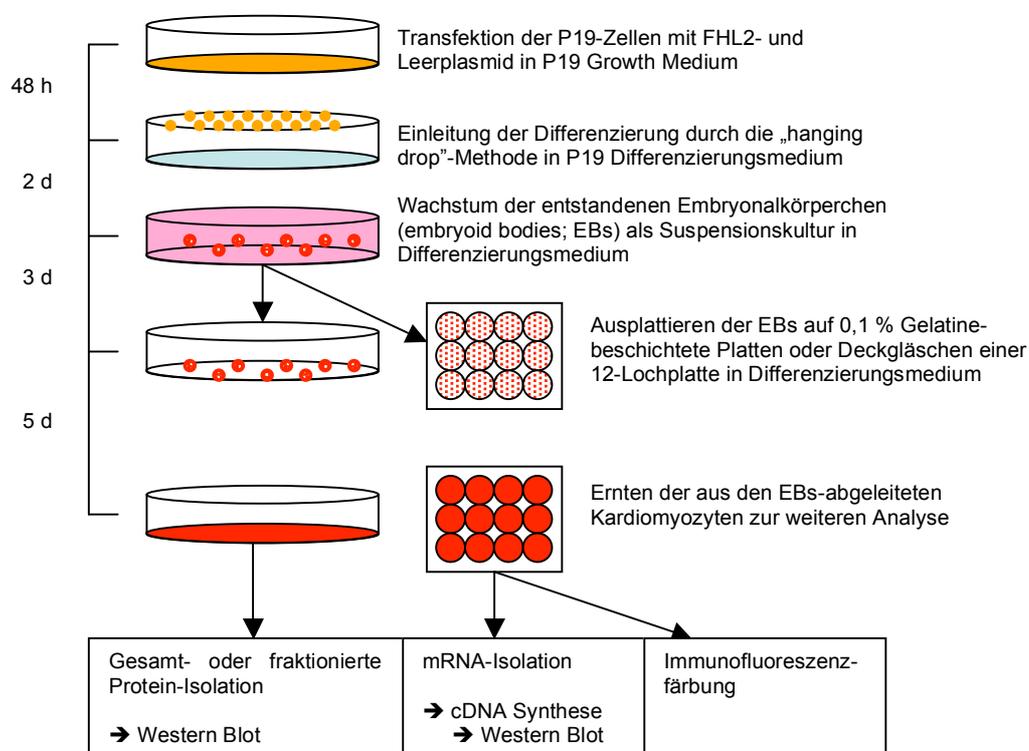


Abb. 13: Zeitlicher Ablauf des ECC (*embryonic carcinoma cells*) *in vitro* Assay mit der P19-Zelllinie. Nach transienter FHL2 Transfektion in undifferenzierte P19-Zellen, wurde die Differenzierung in funktionelle Kardiomyozyten mit DMSO-haltigem Medium und der „hanging drop“-Methode eingeleitet. Die entstandenen Embryonalkörperchen (*embryoid bodies*; EBs) wurden zum weiteren Wachstum in Suspensionskultur genommen und anschließend auf 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturplatten ausplattiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und zur weiteren Analyse mittels Western Blot, quantitativer real-time (qRT) PCR und Immunofluoreszenzfärbung entsprechend aufgearbeitet.

Zur weiteren Analyse werden die EBs auf 0,1 % Gelatine beschichtete Platten bzw. Deckgläschen einer 12-Lochplatte ausplattiert. Die transfizierten P19-Zellen und die gebildeten EBs werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels qRT-PCR, Western Blot, sowie Immunofluoreszenzfärbung untersucht. Darüber hinaus wird über den gesamten Zeitraum des Experiments die Anzahl an kontrahierenden Regionen in den EBs dokumentiert.

3.3.6. mESC *in vitro* Assay

3.3.6.1. wt MEF (murine embrionale Fibroblasten) Präparation

Für die Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen (*murine embryonic stem cells*; mESC) sind murine embryonale Fibroblasten als sogenannter *Feederlayer* notwendig. Die Fibroblasten werden aus E14 Embryonen des CD1-Mausstammes isoliert. Dazu wird dem trächtigen Weibchen der Uterus entfernt und die darin enthaltenen Embryonen freigelegt und in 1x PBS gewaschen. Nach Entfernen des Kopfes, sowie aller weiteren Organanlagen des Herz-Kreislauf-Systems, werden die Embryonen mechanisch mit der Schere zerkleinert und in einer 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung für 10 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur weiteren Dissoziation der Embryonen wird die gesamte Zellsuspension mit einer 5 ml Pipette mehrmals hoch- und runterpipettiert. Anschließend werden erneut 10 ml einer 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben und mehrmals hoch- und runterpipettiert. Es erfolgt eine weitere Inkubation bei 37 °C im Brutschrank, wodurch es zur fast vollständigen Dissoziation des embryonalen Gewebes kommt.

Mit dem gleichen Volumen an MEF-Medium wird die Reaktion abgestoppt, die gesamte Zellsuspension in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und bei 1.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das schleimige Zellpellet in MEF-Medium resuspendiert. Die Zell-Suspension wird pro Embryo auf eine 0,1 % Gelatine beschichtete 10 cm Zellkulturschale mit einem Volumen von 10 ml ausplattiert. Nach Anheften der MEFs am Boden der Zellkulturschale (ca. 4-5 Stunden) wird das Medium aller Platten abgenommen und in 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Die MEFs erhalten 10 ml frisches MEF-Medium. Der Überstand wird bei 1.000 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung resuspendiert und für weitere 10 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur weiteren Dissoziation wird die gesamte Zellsuspension mit einer 5 ml Pipette mehrmals hoch- und runterpipettiert. Anschließend wird die Reaktion mit dem gleichen Volumen an MEF-Medium abgestoppt und die gesamte Zellsuspension in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Nach der Zentrifugation bei 1.000 rpm für fünf Minuten wird der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, das Zellpellet in 10 ml MEF-Medium resuspendiert und auf eine 0,1 % Gelatine beschichtete 10 cm Zellkulturschale ausplattiert.

Einen Tag nach der Präparation werden die MEFs vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und neues MEF-Medium hinzugegeben. Die präparierten MEFs werden in der 1. Passage eingefroren. Werden die MEFs als *feederlayer* für embryonale Stammzellen genutzt, müssen sie zunächst inaktiviert werden, um ihre weitere Zellteilung zu verhindern. Dazu werden die konfluenten MEFs für zwei bis drei

Stunden mit Mitomycin C (mmc; 10 µg/ml) inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen und 10 ml frisches MEF-Medium zugegeben. Am Folgetag können die embryonalen Stammzellen auf den MEF_{mmc} in Kultur genommen werden.

3.3.6.2. mESC-Kultivierung

Auf den wtMEF_{mmc}-*feederlayer* wird die undifferenzierte doppelt-transgene murine embryonale Stammzelllinie A6-αMHC-GFP/αMHC-NeoR (zur Verfügung gestellt von Dr. med. Alexander Markus Becker, Labor von L. Field, Indianapolis, US) in mESC-Medium ausgebracht. Das Medium der mESCs wird täglich gewechselt und als mES-Konditionalmedium gesammelt. Bei einer Konfluenz von 70-80 % können die mESCs im Verhältnis 1:4 bis 1:6 geteilt werden. Dazu werden die Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen und mit 2 ml einer 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung fünf Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Verdau-Reaktion wird mit 10 ml mESC-Medium abgestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Hoch- und Runterpipettieren vereinzelt. Nach dem Zentrifugieren für fünf Minuten bei 1.000 rpm wird das Zellpellet in mESC-Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:4 bis 1:6 neu auf wtMEF_{mmc} ausplattiert.

3.3.6.3. Transfektion von mESC (Xfect-Stem® Reagenz von Clontech)

Die Transfektion der mES-Zelllinie erfolgt auf Matrigel™ (BD). Bei Matrigel handelt es sich um eine Basalmembranmatrix, die aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom isoliert wurde, die eine große Anzahl an Matrixproteinen enthält. Die im Matrigel enthaltenen Proteine und Wachstumsfaktoren dienen der Kultivierung von z.B. mES-Zellen ohne MEF-*feederlayer*. Matrigel polymerisiert bei Raumtemperatur und bildet eine biologisch aktive Matrixstruktur, die der zellulären Basalmembranmatrix von Säugern sehr ähnlich ist (Kleinman and Martin 2005). Matrigel hat darüberhinaus die Eigenschaft die Differenzierung der mESCs zu inhibieren und somit deren Undifferenziertheit aufrechtzuerhalten. Matrigel liegt aliquotiert (2 mg) bei -80 °C vor und wird zur Verwendung als Basalmatrix für die mESCs ü.N. bei 4 °C aufgetaut. Anschließend wird das Matrigel in 6 ml kaltem mESC-Medium resuspendiert und auf eine 6-Lochplatte mit 1 ml pro Vertiefung ausgebracht. Nach der Inkubation für zwei Stunden bei 37 °C im Brutschrank wird die Platte mit 1x PBS gewaschen und 1 ml Konditionalmedium in jede Vertiefung pipettiert. Die mESCs werden wie oben beschrieben trypsinisiert und das Pellet in 12 ml mESC-Konditionalmedium resuspendiert und gleichmäßig auf der 6-Lochplatte verteilt. Die Transfektion der mESCs erfolgt einen Tag später. Die am Vortag auf Matrigel umgesetzten mESCs erhalten zunächst 1 ml frisches mESC-Konditionalmedium pro Vertiefung der 6-Lochplatte. Das Xfect-Stem Polymer wird wie im Protokoll angegeben verwendet.

Für eine Vertiefung einer 6-Lochplatte werden zwei separate 1,5 ml Reaktionsgefäße nach folgendem Schema vorbereitet:

Tabelle 4: Transfektionsansatz für mESC mit dem Xfect-Stem® Reagenz von Clontech

1. Röhrchen (Plasmid-DNA)	2. Röhrchen (Polymer)
1,5 µl c-myc-FHL2/pCS-MT (= 3 µg DNA)	2 µl Xfect-Polymer
6 µl Puromycin-Selektionsmarker (Clontech) (= 300 ng DNA)	
auf 100 µl mit Xfect Reaktionspuffer auffüllen	

Beide Ansätze werden gut durchmischt und der Inhalt des 2. Röhrchens zum 1. Röhrchen hinzupipettiert. Das Gemisch wird für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss werden die 200 µl des Komplexes auf die mES-Zellen pipettiert. Nach drei Stunden Inkubationszeit wird das Medium gegen frisches mES-Konditional-Medium ausgetauscht.

3.3.6.4. Selektion und Vermehrung der positiven mESC-Klone

Drei Tage nach der Transfektion beginnt die Selektion mit der zuvor titrierten Puromycin-Konzentration von 1 µg/ml, wobei das Medium täglich gewechselt wird. Durch die Zugabe von Puromycin kommt es zur frühzeitigen Termination während der Proteinbiosynthese, was die Entstehung von verkürzten und damit nicht-funktionsfähigen Aminosäureketten zur Folge hat. Zellen, die durch Aufnahme des Puromycin-Selektionsmarkers eine Resistenz aufgebaut haben, vollziehen eine normale Proteinbiosynthese und können sich unter den gegebenen Kulturbedingungen vermehren. Es ist bei der Transfektion davon auszugehen, dass die Zellen, die den linearen Puromycin-Marker aufgenommen haben auch mit großer Wahrscheinlichkeit das Plasmid in sich tragen. Somit können mit Hilfe dieser Methode transfizierte von nicht-transfizierten Zellen selektiert werden.

Nach einer Selektionszeit von sieben Tagen werden die FHL2 mESC-Klone gepickt und auf Vertiefungen einer 96-Loch-Platte umgesetzt, in die am Vortag wtMEF_{mmc} ausplattiert wurden. Nachdem die Kolonie mit einer 10 µl Pipettenspitze aufgenommen wurde, wird die Kolonie in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 µl Trypsin/EDTA (0,25 %) resuspendiert. Nach ca. 10 Minuten werden zusätzlich 100 µl mES-Medium (+Puromycin) hinzugefügt und in die Vertiefung der 96-Lochplatte gegeben. Der Mediumwechsel erfolgt täglich. Nach 2-3 Tagen sind die Klone konfluent und können 1:4 auf weitere Vertiefungen einer 96-Lochplatten umgesetzt werden. Eine Vertiefung wurde zur Gewinnung der genomischen DNA (siehe 3.2.) am Vortag mit 0,1 % Gelatine beschichtet. In die anderen drei Vertiefungen wurde zur weiteren Vermehrung des Klons am Vortag wtMEF_{mmc} ausplattiert. Zunächst wird das alte Medium der einzelnen Klone abgesaugt und anschließend mit 1x PBS gewaschen, bevor 40 µl Trypsin/EDTA (0,25 %) hinzugegeben werden. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 37 °C wird die Reaktion mit 80 µl mES-Medium abgestoppt und zu gleichen Teilen à 30 µl zu 100 µl mES-Medium gegeben. Jeweils 120 µl der Zellsuspension werden dann auf die entsprechenden Vertiefungen verteilt.

Nach weiteren 4 Tagen können die Klone erneut auf eine größere Wachstumsfläche (12-Lochplatten) umgesetzt werden. Das Trypsinieren und Umplattieren erfolgt wie oben beschrieben. Wenn die Klone

80 % Konfluenz erreicht haben, werden sie ein letztes Mal auf 6-Lochplatten umplattiert. Bis zur Analyse der mESC-Klone werden die Zellen eingefroren.

3.3.6.5. *in vitro* Differenzierung der mESC (wt und Klon 8) in Kardiomyozyten

Zur Differenzierung der mESCs in kontrahierende, funktionelle Kardiomyozyten wird die „hanging drop“-Methode angewendet (**Abb. 14**). Dafür werden 20 µl Tropfen der Zell-Suspension á 500 Zellen in den Deckel einer Zellkultur-Platte pipettiert und für fünf Tage inkubiert. Damit es nicht zur Austrocknung der Tropfen kommt, wird in die Schale 5 ml 1x PBS pipettiert. Das anschließende Ernten und Ausplattieren der entstandenen EBs erfolgt wie in **3.3.5.** für die P19-Zelllinie beschrieben. Die embryonale Mauszelllinie besitzt unter dem herzspezifischen α MHC-Promotor eine Antibiotika-Resistenz gegenüber dem Neomycin-Derivat G418. Sechs Tage nach der Ausplattierung der EBs können über die Zugabe der zuvor titrierten G418-Konzentration von 200 bzw. 400 µg/ml die entstandenen Kardiomyozyten von den Nicht-Kardiomyozyten selektiert werden. Zu verschiedenen Zeitpunkten während des Assays, sowie nach einer Differenzierungszeit von 16 Tagen werden die Kardiomyozyten mittels qRT-PCR, Western Blot, FACS-Analyse sowie Immunofluoreszenzfärbung untersucht. Darüber hinaus werden über den gesamten Zeitraum des Experiments die kontrahierenden Regionen der gebildeten Kardiomyozyten dokumentiert.

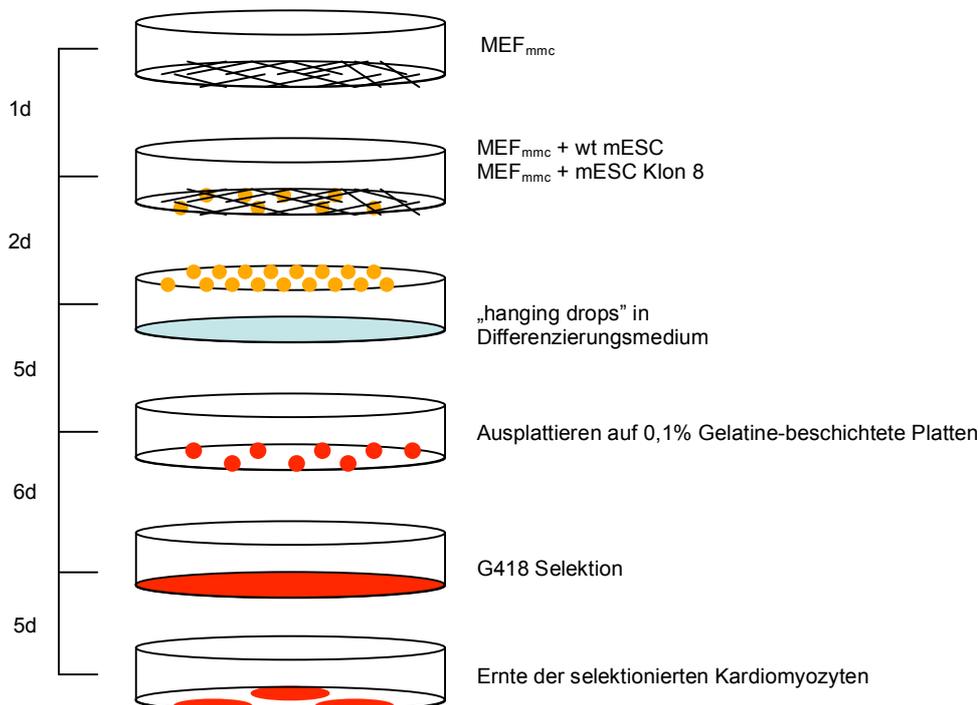


Abb. 14: Zeitlicher Ablauf des mESC (embryonic stem cells) *in vitro* Assay der A6- α MHC-NeoR/ α MHC-GFP Zelllinie. Nach konfluenter Kultivierung der wt mESC und dem Klon 8 wurde mit Hilfe der „hanging drop“-Methode unter Verwendung eines Differenzierungsmediums die Differenzierung eingeleitet. Nach 5 Tagen wurden die entstandenen Embryonalkörperchen (*embryoid bodies*; EBs) auf 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturplatten ausplattiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und zur weiteren Analyse mittels Western Blot, quantitativer real-time (qRT) PCR, FACS und Immunofluoreszenzfärbung entsprechend aufgearbeitet.

3.4. Biochemie

3.4.1. Protein-Isolation (nach BÄUERLE)

Zur Protein-Isolation werden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Zur Lysierung wird anschließend auf die Zellen ein entsprechendes Volumen an Bäuerle-Puffer gegeben und die Zellen von der Petrischale geschabt. Anschließend wird das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation für 30 Minuten bei 4.000 rpm wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es erfolgt die Proteinbestimmung (BRADFORD).

3.4.2. Protein-Fraktionierung

Die Zellen werden zum geeigneten Zeitpunkt mit 1x PBS gewaschen. Das Zellpellet wird anschließend in 500 µl (10 cm Schale) bzw. 250 µl (6 cm Schale) Hypotonischem-Puffer inkl. Protease-Inhibitoren von der Platte geschabt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe des Detergenz NP40 auf eine Endkonzentration von 0,1 % und eine erneute Inkubation von fünf Minuten auf Eis. Nach einer Zentrifugation von fünf Minuten bei 4.000 rpm und 4 °C wird der Überstand vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Dieser 1. Überstand enthält die Cytosol-Fraktion. Das übrige Pellet wird anschließend in 200 bzw. 100 µl Hypertonischem-Puffer inkl. Protease-Inhibitoren resuspendiert und für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von NP40 auf eine Endkonzentration von 0,1 %. Nach dem Vortexen erfolgt eine weitere Inkubation von 10 Minuten auf Eis. Die Zentrifugation erfolgt für fünf Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C. Anschließend kann der Überstand, in dem sich die nukleäre Fraktion befindet, vorsichtig abgenommen werden. Zum Schluss erfolgt die Protein-Bestimmung (BRADFORD).

3.4.3. Co-Immunopräzipitation

Mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation lassen sich Interaktionen von Proteinen in Zell-Lysaten oder aus Organgewebe detektieren. Dafür werden nach Co-Transfektion 250 µg Gesamt-Proteinlysate oder zur Untersuchung von endogenen Protein-Interaktionen 500 µg Gesamt-Proteinlysate verwendet. Die Präzipitation erfolgt mit Roti®-MagBeads Protein G. Es handelt sich hierbei um magnetische Silicagel-Kügelchen, die zur Bindung und Isolierung von Immunglobulinen eingesetzt werden können. Hierzu wird pro Probe 20 µl der MagBeads-Lösung mit 100 µl PBS-T (0,05 %) gewaschen und an einem Magneten gesammelt. Der Überstand wird entfernt und die MagBeads dreimal mit je 100 µl PBS-T gewaschen. Anschließend werden die MagBeads in 120 µl PBS-T aufgenommen und jeweils 1 µg Antikörper gegen den *tag* des einen Plasmids hinzugegeben oder 1 µg Antikörper des einen zu untersuchenden endogenen Proteinpartners. Es erfolgt eine Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Drehrad. Anschließend werden die MagBeads am Magneten gesammelt, dreimal mit je 100 µl PBS-T gewaschen und in 50 µl PBS-T resuspendiert. Nach Zugabe der entsprechenden Proteinmenge (siehe oben) wird die Probe auf ein Endvolumen von 250 µl mit PBS-T aufgefüllt. Es erfolgt eine weitere Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Drehrad.

Im Anschluss werden die MagBeads wieder am Magneten gesammelt und dreimal mit je 100 µl PBS-T gewaschen. Zum Schluss werden die MagBeads in 25 µl 1xLämmli-Probenpuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 65 °C im Heizblock inkubiert, wodurch sich die Proteine von den MagBeads lösen und in den Probenpuffer übergehen. Anschließend werden die MagBeads erneut am Magneten gesammelt und der Probenpuffer mit den darin enthaltenen Proteinen abgenommen und auf ein SDS-Gel geladen.

3.4.4. Western Blot Analyse der Zell-Lysate

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel erfolgt auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran bei 140 mA für 45 Minuten. Anschließend wird die Membran in 5 % Milchpulver/TBS-T für eine Stunde blockiert. Danach erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur oder ü.N. bei 4 °C die Inkubation mit dem Primär-Antikörper in Blockierungslösung. Der erste Antikörper richtet sich jeweils nach dem zu untersuchenden Protein. Anschließend wird die Membran zunächst für dreimal fünf Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor der in Blockierungslösung verdünnte Sekundär-Antikörper auf die Membran gegeben wird. Der Sekundärantikörper richtet sich danach, in welchem Organismus der Primärantikörper hergestellt wurde. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird die Membran erneut für dreimal fünf Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Entwicklung des Blots erfolgte durch ECL plus (Western Blotting Detection System) und anschließender Exposition eines Röntgenfilms.

3.4.5. Luciferase-Reportergen-Assay

Zur Untersuchung, ob die gefundenen Interaktionspartner aus dem Y2H auch einen funktionellen Einfluss auf β -Catenin haben, wird ein Luciferase-Reportergen-Assay durchgeführt. Durch Verwendung des TOPflash-Vektors, der über ein promotorabhängiges Luciferase-Gen verfügt, können Rückschlüsse auf die β -Catenin-abhängige Transkription gezogen werden. Die Luciferase-Expression ist abhängig von der Aktivität des TCF/LEF-abhängigen vorgeschalteten Promotors. TCF und LEF sind Zielgene von β -Catenin. Die Promotorregion, die der Luciferase vorgeschaltet ist, beinhaltet mehrere TCF/LEF-Bindestellen, die zur Aktivierung des Promotors und somit zur Expression der Luciferase führt. Das Maß der Luciferase-Aktivität ist somit ein Zeichen für die β -Catenin-abhängige Transkription. **Tabelle 5** zeigt die allgemeine Zusammensetzung des Transfektionsansatzes und wird in Triplikaten für das Luciferase-Reportergen-Assay verwendet.

Darüber hinaus sollte die Tbx5-Promotoraktivierung durch die im Y2H gefundenen Klone untersucht werden. Für eine funktionelle Analyse der Tbx5-Promotor-Aktivierung wurden pGL3-Konstrukte mit zwei verschiedenen Tbx5-Promotorfragmenten verwendet (zur Verfügung gestellt von Dr. Maria-Patapia Zaferiou). Bei beiden Konstrukten ist die Luciferase-Aktivität des ursprünglichen pGL3-Vektors nun mehr abhängig von den davor klonierten Tbx5-Promotor-Fragmenten. Es wurde ein Konstrukt mit dem Tbx5-Minimalpromotor (bis -500 bp) und ein Konstrukt mit dem Tbx5-Gesamtpromotor (bis -1000 bp) verwendet. Rhetinolsäure ist dafür bekannt den Tbx5-Promotor zu

aktivieren und wurde in dem Assay als Positivkontrolle eingesetzt (**Tabelle 6**). Die Co-Transfektion der Promotor-Konstrukte und des β -Catenin-Interaktionspartners wurde in Triplikaten durchgeführt. Als interner Referenzstandard wird jedem Ansatz ausserdem ein Renilla-exprimierendes Plasmid (pRL-CMV) zugesetzt. Die Transfektion von HEK293 und NCM erfolgt wie in 3.3.4. beschrieben mit dem FuGene® HD Reagenz. Es wird jeweils das Zelllinien-spezifische Medium benutzt.

Tabelle 5: Allgemeiner Transfektionsansatz für das Luciferase-Reportergen-Assay

Ansatz	TOPFlash (1 μ g/ μ l)	FOPFlash (1 μ g/ μ l)	β -Catenin (1 μ g/ μ l)	Plasmid X (1 μ g/ μ l)	Leervektor (1 μ g/ μ l)	pGL3 (1 μ g/ μ l)	Σ DNA in μ g	pRL-CMV (1 μ g/ μ l)
1	-	-	-	-	-	+	2	+
2	+	-	-	-	+	-	2	+
3	+	-	+	-	+	-	2	+
4	+	-	+	+	-	-	2	+
5	-	+	-	-	+	-	2	+
6	-	+	+	-	+	-	2	+
7	-	+	+	+	-	-	2	+

Tabelle 6: Allgemeiner Transfektionsansatz für das Tbx5-Promotor-Assay

Ansatz	Tbx5 Pro 500 (1 μ g/ μ l)	Tbx5 Pro 1000 (1 μ g/ μ l)	RA (1mM)	Plasmid X (1 μ g/ μ l)	Leervektor (1 μ g/ μ l)	Σ DNA in μ g	pRL-CMV (1 μ g/ μ l)
1	+	-	-	-	+	2	+
2	-	+	-	-	+	2	+
3	+	-	+	-	+	2	+
4	-	+	+	-	+	2	+
5	+	-	-	+	-	2	+
6	-	+	-	+	-	2	+
7	+	-	+	+	-	2	+
8	-	+	+	+	-	2	+

Nach entsprechender Inkubationszeit werden die Zellen mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System von Promega nach Herstellerangaben aufgearbeitet und mit einem Luminometer mit Hilfe der Renilla-Aktivität die relative Luciferase-Aktivität bestimmt.

3.5. Immunhistologische Methoden

3.5.1. Immunfluoreszenz von Zellen und Gewebe-Paraffin-Schnitten

Die Zellen werden auf 0,1 % beschichtete Deckgläschen in einer 12-Lochplatte bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend werden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 4 % PFA fixiert. Danach werden die Deckgläschen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgt in Puffer A für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss werden die Proben erneut kurz mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit Puffer B für eine Stunde dunkel blockiert. Die Gewebe-Paraffin-Schnitte werden mit einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 95 %, 90 % und 70 %) de-paraffinisiert und in ddH₂O gewaschen. Um die Quervernetzung der Proteine aufzubrechen werden die Schnitte in Natrium-Citrat-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und

anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Schnitte werden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Antikörper werden entsprechend ihrer Verdünnung in Puffer C (Zellen) bzw. Blockierungslösung (Gewebe-Schnitte) angesetzt. Jeweils 60 µl Antikörper-Lösung werden pro Deckgläschen bzw. Objektträger pipettiert. Die Inkubation des 1. Antikörpers erfolgt ü.N. bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag werden die Proben mit 1x PBS gewaschen. In der Zwischenzeit wird der 2. Antikörper ebenfalls in Puffer C entsprechend des 1. Antikörpers angesetzt. Nach den Waschschritten werden die Deckgläschen mit 60 µl des 2. Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Nach dem Waschen mit 1x PBS, erfolgt eine nukleäre Färbung mit dem DAPI- oder Hoechst-Reagenz. Dieses wird 1:10.000 in 1x PBS verdünnt und die Proben für fünf Minuten dunkel inkubiert. Anschließend werden die Zellen für fünf Minuten zweimal mit PBS und einmal mit ddH₂O gewaschen, bevor die Deckgläschen in Prolong-Gold[®] und die Objektträger mit Eukit eingedeckt werden. Am nächsten Tag können mit dem Leica Fluoreszenz-Mikroskop Fotos der Färbungen gemacht und mit der AxioVisio-Software von Zeiss ausgewertet werden.

3.5.2. FACS – fluorescence activated cell sorting

Zur Feststellung der Zusammensetzung der Zell-Population in den EBs-abgeleiteten Kardiomyozyten sowie in murinem adulten Herzgewebe wurden verschiedene Gene mittels FACS-Analyse untersucht. Da die EBs-abgeleiteten Kardiomyozyten wie in einem Zellverbund gelagert sind, erfolgt zur Vereinzelung ein 30-minütiger Collagenase II / Dnase I – Verdau. Dafür werden die Kardiomyozyten mit einer 10 ml Pipette von der Zellkulturplatte gewaschen, gut resuspendiert und in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen gesammelt. Nach der Zentrifugation für drei Minuten bei 1.200 rpm, wird das Zellpellet pro 10 cm Schale in 1 ml Collagenase II / Dnase I – Lösung resuspendiert und für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Alle 10 Minuten wird die Suspension durch leichtes Schütteln aufgewirbelt, um einen effektiven Verdau in eine Einzelzell-Suspension zu gewährleisten. Die Einzelzell-Bildung wird mikroskopisch in einer Zählkammer überprüft. Die Verdau-Reaktion wird durch das zehnfache Volumen von Differenzierungs-Medium abgestoppt. Die Zellen werden nach der Zentrifugation und dem Waschen in 5 ml PBS aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen entsprechend der Anzahl der Färbungen in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Jede Färbung bei den EBs-abgeleiteten Kardiomyozyten wurde in der Regel mit ca. 50.000 Zellen durchgeführt.

Für die FACS-Analyse von adulten Kardiomyozyten werden die Herzen nach Entnahme und Entfernung der Vorhöfe mit einem Skalpell mechanisch sehr stark zerkleinert und in 3 ml FACS-Puffer (1x PBS + 2 % FCS) aufgenommen. Zur Entfernung größerer Gewebestücke wird die Zell-Suspension in zwei Schritten mit einem 40 µm und 30 µm Sieb gefiltert. Die Zellen werden anschließend in FACS-Puffer aufgenommen und entsprechend der Anzahl der Färbungen in 100 µl

Aliquots aufgeteilt. Jede Färbung bei den adulten Kardiomyozyten wurde in der Regel mit ca. 100.000 Zellen durchgeführt.

Die Oberflächenfärbungen werden vor der Fixierung durchgeführt. Dafür wird der entsprechende Antikörper in 100 µl FACS-Puffer pro Färbung doppelt-konzentriert angesetzt und anschließend zu 100 µl Zellen gegeben. Die 30-minütige Inkubationszeit erfolgt dunkel bei 4 °C. Anschließend werden die Zellen für vier Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert und in PBS aufgenommen. Die 15-minütige Fixierung der Zellen erfolgt mit 1 % PFA mit Ausnahme des ki67-PE Antikörpers bei den EBS-abgeleiteten Kardiomyozyten. In diesem Fall wird mit 70 % Ethanol fixiert. Alle weiteren Schritte sind unabhängig von der Art der Fixierung.

Nach dem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer werden die Zellen in saponin-haltigem FACS-Puffer (= Permeabilisierungspuffer) für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Anschließend werden die Zellen in 100 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen. Die entsprechenden Primär-Antikörper werden doppelt-konzentriert pro 100 µl in Permeabilisierungspuffer angesetzt und zu 100 µl Zell-Suspension gegeben. Die Inkubation erfolgt ebenfalls dunkel und bei 4 °C. Nach dem anschließenden Waschen der Zellen mit Permeabilisierungspuffer werden die Zellen erneut in 100 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen und mit 100 µl der entsprechenden Sekundär-Antikörperlösung (siehe Material 2.1.) dunkel und bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgt zweimal das Waschen der Zellen mit Permeabilisierungspuffer und einmal mit FACS-Puffer. Am Ende werden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und jeweils 10.000 Zellen am FACS-Calibur (BD) analysiert.

3.6. Tierexperimentelle Arbeiten

3.6.1. Versuchstiere und Genehmigungen

Zur Herstellung embryonaler Fibroblastenkulturen (MEF; *mouse embryonic fibroblasts*) wurden tragende CD31-Mäuse (ED 13-16 von Charles River) verwendet. Für die Isolierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten (NCM) wurden neonatale Wistar-Ratten (Tag 1 postnatal von Charles River) verwendet. Die zur Untersuchung der Gen-Expression verwendeten murinen Embryonen wurden durch Verpaarung von Wildtyp C57/Bl6-Mäusen (Eigenzucht vom Max-Delbrück-Centrum) gewonnen. Die Organentnahmen der Wildtyp C57/Bl6-Mäuse, der neonatalen Wistar-Ratten sowie der $\alpha\text{MHC}^{\text{merCreMer}}/\text{Tbx5}^{\text{delEx3/+}}$ Mäuse wurden durch die LaGeSo, Berlin genehmigt (Reg 0202/06; T 0486/09; G 0338/05).

3.6.2. Phänotypisierung der kardialen Tbx5-Depletion im adulten Maus-Herzen

Um eine herzspezifische Tbx5-Depletion im adulten Herzen zu erreichen wurden eine induzierbare, herzspezifische Cre Linie, $\alpha\text{MHC-MerCreMer}$ (Petrich, Molkentin et al. 2003) mit $\text{Tbx5}^{\text{delEx3/+}}$ (Bruneau, Nemer et al. 2001) Mäusen gekreuzt und die homozygoten $\alpha\text{MHC}^{\text{merCreMer}}/\text{Tbx5}^{\text{delEx3/+}}$ -Nachkommen analysiert (**Abb. 15**).

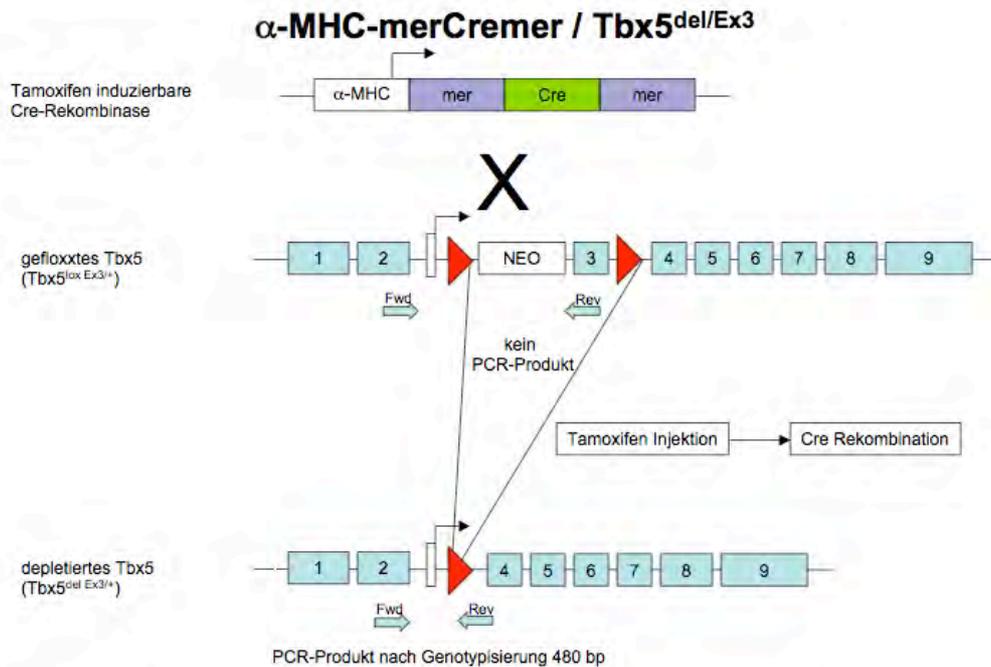


Abb. 15: Generierung von Mäusen mit einer induzierbaren kardialspezifischen $Tbx5$ -Depletion ($Tbx5^{\text{del}/\text{Ex}3/+}$). Dazu erfolgte eine Kreuzung aus Mäusen, die Tamoxifen-induzierbare Cre Rekombinase Expression unter der Vermittlung des kardial spezifischen αMHC -Promotors besitzen (Petrich, Molkentin et al. 2003), und Mäusen, die das gefloxxte Exon3 von $Tbx5$ in sich tragen (Bruneau, Nemer et al. 2001). Durch die Injektion von Tamoxifen, wird im kardialen Gewebe unter Aktivierung des αMHC -Promotors die Cre-Rekombinase aktiviert, wodurch anschließend eine kardial-spezifische Depletion von $Tbx5$ gewährleistet wird.

Um die kardial-spezifische $Tbx5$ -Depletion zu erzielen, erhalten 12 Wochen alte Mäuse eine Woche lang täglich eine intraperitoneale Injektion mit Tamoxifen, was zur Aktivierung der Cre-Rekombinase und letztlich zur kardialen $Tbx5$ -Depletion führt. Die entsprechenden Kontroll-Tiere werden mit dem gleichen Volumen an Öl (Trägerlösung von Tamoxifen) injiziert. Zum Nachweis der erfolgreichen $Tbx5$ -Depletion wurden Primer für die genomische DNA generiert, die innerhalb des depletierten Exon3 binden, sodass es nur bei den Wildtyp-Tieren zu einem PCR-Produkt kommt (siehe 2.2. Oligonucleotide). Die Funktion der Mausherzen wurde *in vivo* durch serielle, echokardiographische Untersuchungen mit einem Echokardiographiegerät Vevo 770 evaluiert (Core-Facility MDC). Zur Auswertung wurden echokardiographischen Daten des Ventrikels (IVSd = *intraventricular septum diastolic*; LVPWd = *left ventricular posterior wall diastolic*), der diastolischen Wanddicken des linken Ventrikels (LVd = *left ventricular diastolic*) sowie der globalen Pumpfunktion (FS = *fractional shorting*; EF = *ejection fraction*) verwendet. Im nächsten Schritt wurden die Herzen der $Tbx5$ -depletierten und der entsprechenden Kontrolltiere zwei Wochen nach Tamoxifen-Injektion entnommen und für weitere Analysen aufgearbeitet. Dazu wurde zunächst die Herzspitze entfernt und für weitere biochemische und molekularbiologische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das restliche Herz wurde paraffinisiert, eingebettet und für immunhistologische Untersuchungen 7 μm -Schnitte angefertigt.

3.7. Statistik

Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Computerprogramms PRISM[®] (GraphPad Software) mit dem 2-seitigen Student-t-Test für verbundene oder unverbundene Stichproben oder per ANOVA mit dem Bonferroni-Test ermittelt. Ein p-Wert niedriger als 0,05 wurde als signifikant angenommen. „n“ bezeichnet die Anzahl der unabhängigen Experimente und ist im Anhang für die einzelnen Experimente aufgeführt.

4. Ergebnisse

4.2. Hefe-Zwei-Hybrid Analyse

4.1.1. Herstellung des AH109 Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* mit β -Catenin

Protein-Expression

β -Catenin spielt sowohl während der Kardiogenese als auch bei der zellulären kardialen Homöostase und Remodeling eine entscheidende Rolle. Der Fokus dieser Arbeit liegt daher in der Identifikation kardialer Interaktionspartner von β -Catenin, um die molekularen Signalwege zu untersuchen, die in der Kardiogenese involviert sind. Eine Möglichkeit zur Untersuchung von Protein-Interaktionen ist die Hefe-Zwei-Hybrid (*Yeast-Two-Hybrid*) Analyse. Dabei wurde ein hefespezifisches β -Catenin/Expressionsplasmid als sogenannter Köder verwendet, um vermeintliche Interaktionspartner von β -Catenin in einer kardialen humane cDNA-Bibliothek zu identifizieren. Die cDNA-Klone sind in dem hefespezifischen pEXP-AD502-Plasmid kloniert. Nach der Transformation des β -Catenin/pDBLeu-Expressionsplasmids, sowie des pDBLeu-Leervektors in den AH109-Hefestamm (*Saccharomyces cerevisiae*), wurden nach entsprechender Inkubationszeit bei 30 °C Hefe-Proteinlysate hergestellt. In einer Western Blot Analyse mit einem β -Catenin Antikörper konnte β -Catenin eindeutig mit einem Molekulargewicht von 88 kDa detektiert werden. In den Kontrollproben mit untransfizierten bzw. pDBLeu-Leervektor transfizierten AH109 Hefezellen konnte hingegen β -Catenin nicht nachgewiesen werden (**Abb. 16**).

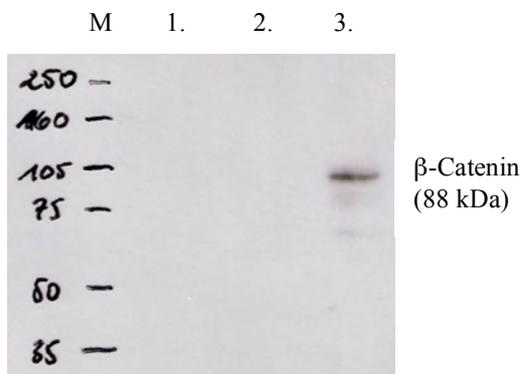


Abb. 16: Nachweis der Proteinexpression des β -Catenin / pDBLeu-Expressionsplasmids im AH109 Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*. Das β -Catenin/pDBLeu-Plasmid wurde in AH109-Hefezellen transformiert und mit den gewonnenen Hefe-Proteinlysaten ein Immunoblot durchgeführt. Dabei wurde ein β -Catenin-Antikörper verwendet, der spezifisch für murines und humanes β -Catenin detektiert. Als Kontrollen dienten Proteinlysate von untransfizierten (1.) und Leervektor-transfizierten (2.) AH109-Zellen. β -Catenin konnte nur in Probe 3 anhand des Protein-Markers (M) mit einem Molekulargewicht von 88 kDa detektiert werden.

4.1.2. Untersuchung der Selbstaktivierung des β -Catenin/pDBLeu-Expressionsplasmids und Titration der 3-Aminotriazol (3AT) – Konzentration

Verschiedene Transformationsansätze (1-pDBLEU; 2-ohne DNA; 3-pDBLEU+pEXP-AD502; 4- β -Catenin/pDBLEU+pEXP-AD502; 5 β -Catenin/pDBLEU) (Tab. 1; Methoden 3.1.1.) wurden auf unterschiedliche aminosäure-defiziente Selektionsplatten ausgestrichen (**Abb. 17a**), für zwei Tage bei 30 °C inkubiert und jeweils vier Kolonien im Doppelansatz auf aminosäure-defiziente Selektionsplatten ausgestrichen (**Abb. 17b**). Durch das sogenannte „replica plate“ wurden die gewachsenen Koloniausstriche auf aminosäure-defiziente Platten mit verschiedenen 3AT-Konzentrationen überführt (**Abb. 17c**). Das daraus resultierende Wachstum ist ausschlaggebend für die titrierte 3AT-Konzentration, die im anschließenden Large Scale Yeast Two Hybrid Screen zur

Ermittlung des Histidin-Phänotyps angewendet werden soll. Die effektivste 3AT-Konzentration, d.h. bei der ein Wachstum der AH109 Zellen mit transfiziertem β -Catenin/pDBLeu-Expressionsplasmid gerade noch möglich ist, wurde nach Doppelbestimmung auf 25 mM ermittelt (**Abb. 17d**).

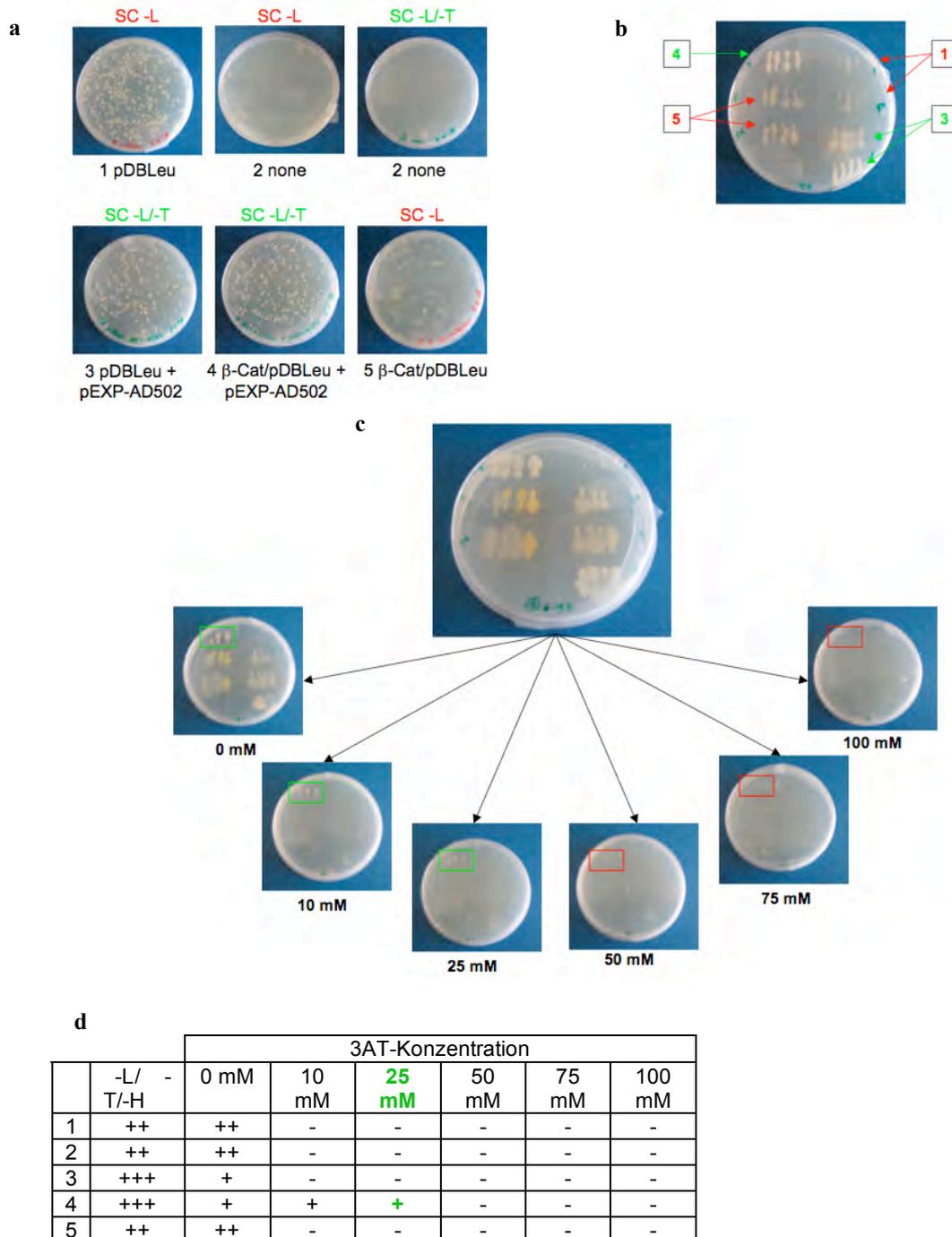


Abb. 17: 3AT-Titration und Untersuchung der Selbstaktivierung des β -Catenin/pDBLeu-Plasmids. (a) Die verschiedenen Transformationsansätze wurden auf unterschiedliche Aminosäure-Selektionsplatten (SC) ausgestrichen. Nach zwei Tagen unter aminosäure-defizienten Bedingungen (-L = ohne Leucin; -T = ohne Tryptophan) konnten die gewachsenen Klone auf weitere Aminosäure-Selektionsplatten (-H = ohne Histidin) übertragen werden (b). Diese Platten wurden für zwei Tage inkubiert und mittels „replica plate“ auf Platten mit verschiedener 3AT-Konzentration überführt (c). Das daraus resultierende Wachstum ist ausschlaggebend für die titrierte 3AT-Konzentration, die im anschließenden *Large Scale Yeast Two Hybrid Screen* zur Ermittlung des Histidin-Phänotyps verwendet wurde. (d) Die Wachstumsanalyse ergab in einer Doppelbestimmung die effektivste 3AT-Konzentration bei 25 mM und es konnte keine Selbstaktivierung der Hefe-Reportergene nachgewiesen werden, weder bei der Co-Transformation beider Expressionsplasmide, noch bei der Co-Transformation des β -Catenin/pDBLeu-Expressionsplasmids mit dem pEXP-AD502-Plasmid.

Darüber hinaus konnte mit Hilfe des Ansatz 3 und 4 gezeigt werden, dass keine Selbstaktivierung der Reportergene bei Co-Transformation beider Expressionsplasmide, sowie von β -Catenin/pDBLeu-Expressionsplasmid und pEXP-AD502-Plasmid vorliegt, wodurch es sonst zu starkem Wachstum der Hefezellen unter 3AT-Selektionsbedingungen gekommen wäre.

4.1.3. Durchführung des Hefe-Zwei-Hybrid Screens und Bestätigung des β -Catenin Interaktionspartners

Die verschiedenen Selektionsbedingungen und Untersuchungen der Phänotypen bezüglich der Aktivierung der Hefereportergene ergaben aus beiden *Large Scale Screens* eine Anzahl von 315 vermeintlichen β -Catenin-Interaktionspartnern. Diese wurden zunächst auf „falsch-positive“-Klone durch Re-Transformation untersucht. Dazu wurde das β -Catenin/pDBLeu-Expressionsplasmid mit den einzelnen identifizierten cDNA-Klonen im pEXP-AD502-Plasmid in AH109-Hefezellen co-transformiert und auf alle Phänotypen untersucht. Nur die positiv-getesteten Klone wurden weiter analysiert. Zur weiteren Untersuchung wurden zunächst mit Hilfe von Hefe-Minikulturen die Plasmide der cDNA-Klone extrahiert und anschließend in elektrokompetente Bakterien (XL1 blue) transformiert. Von den gewachsenen Kolonien der vermeintlichen Interaktionspartner wurden mittels sog. Stichagarplatten (96-Lochplatten) von der Firma GATC BIOTECH die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Die Sequenzen wurde mit der humanen Gen-Datenbank von NCBI abgeglichen und den drei Zellbereichen Membran, Cytosol und Nucleus zugeordnet. Dabei konnte gezeigt werden, dass 26 % aller gefundenen Klone falsch-positive sind und 30 % Prozessen in den Mitochondrien zugeteilt werden können. 44 % der gefundenen Klone sind richtige Interaktionspartner von β -Catenin, wovon 26 % zur Membran gehören, 46 % zum Cytosol und 28 % vorwiegend im Nucleus zu finden sind (**Abb. 18**). Insgesamt konnten 85 verschiedene Interaktionspartner von β -Catenin identifiziert werden, von denen einige mehrmals gefunden wurden (Anhang).

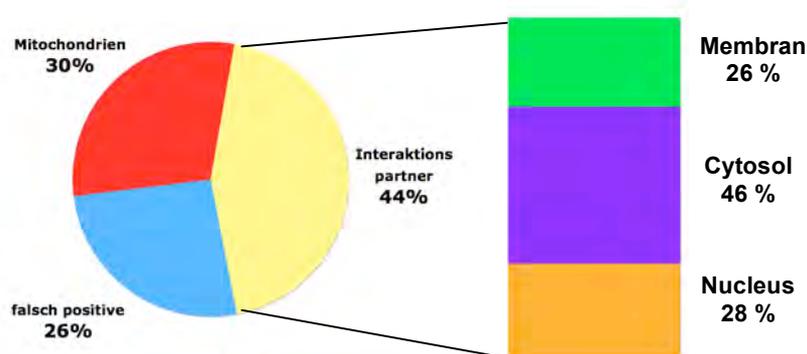


Abb. 18: Auswertung der 315 gefundenen vermeintlichen Interaktionspartner. Bei der Re-Transformationsanalyse zeigten 26 % der 315 gefundenen Klone „falsch-positive“ Merkmale. Die anschließende Sequenzanalyse der Klone ergab ausserdem, dass 30 % der Proteine den Mitochondrien zugeordnet werden können. Von den 44 % richtigen Interaktionspartnern zeigt sich eine Verteilung auf verschiedene Zellbereiche mit 26 % membran-assoziierten Partnern, 46 % zum Cytosol gehörig und 28 % mit hauptsächlich nukleärem Vorkommen.

Es konnten unter anderem four-and-a-half-LIM protein 2 (FHL2), *alpha-kinase 3/myocyte induction differentiation originator* (ALPK3/MIDORI), *basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2* (BZW2), *krueppel-like factor 15* (KLF15) und *insulin-like growth factor binding protein 5* IGFBP5 als interessante β -Catenin Interaktionspartner identifiziert werden, von denen einige bereits bekannt waren, jedoch bisher nicht mit einer kardialen Interaktion in Verbindung gebracht werden konnten (**Tab. 7**).

Tab. 7: Ausgewählte β -Catenin-Interaktionspartner

Name	vollständiger Name	Vorkommen	Funktion
FHL2	<i>four-and-a-half-LIM protein 2</i>	Nucleus / Cytosol	molekularer Transmitter von verschiedenen Signalpfaden mit transkriptioneller Regulation
ALPK3/ Midori	<i>alpha-kinase 3 / myocyte induction differentiation originator</i>	Nucleus	Differenzierung von Kardiomyozyten
BZW2	<i>basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2</i>	Nucleus	Zell-Differenzierung
KLF15	<i>krüppel-like factor 15</i>	Nucleus	Transkriptionsaktivator
IGFBP5	<i>insulin-like growth factor binding protein 5</i>	Nucleus	Aktivierung oder Inhibition der IGF-vermittelten Signale zum Zellwachstum

4.1.4. Validierung der Interaktion von FHL2 und β -Catenin

Zum kardial-spezifischen Nachweis einer Proteininteraktion zwischen FHL2 und β -Catenin wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Dazu wurden neonatale Rattenkardiomyozyten (*neonatal cardiomyocytes*; NCM) einen Tag nach ihrer Präparation mit einem c-myc-FHL2 Expressionsplasmid, sowie zur Kontrolle, mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert. Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurde von den Zellen Proteinlysate hergestellt, in denen mittels Immunopräzipitation (IP) das endogene β -Catenin an G-Sepharose magnetische Beads gebunden hat. In dem entstandenen selektionierten Proteinlysat konnte FHL2 in einem Immunoblot mit einem c-myc Antikörper eindeutig detektiert werden (**Abb. 19**).

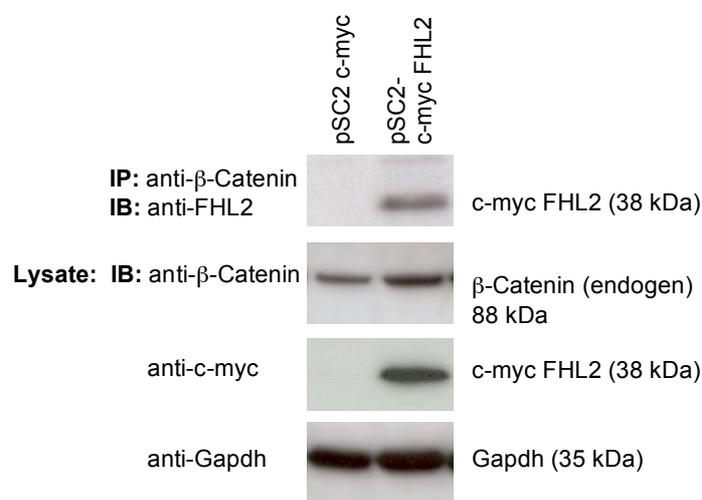


Abb. 19: Validierung der Protein-Interaktion von FHL2 und β -Catenin in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NCM). Mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation (IP) konnte die im Yeast Two Hybrid Screen kardiale Interaktion von FHL2 und β -Catenin nachgewiesen werden. Dazu wurden NCM mit einem c-myc FHL2 Expressionsplasmid und als Kontrolle mit dem Leervektor transfiziert. Die IP erfolgte gegen das endogene hochexprimierte β -Catenin. Im anschließenden Immunoblot konnte FHL2 mit Hilfe eines c-myc Antikörpers eindeutig identifiziert und somit seine Interaktion mit β -Catenin nachgewiesen werden. In den Proteinlysaten konnte sowohl das endogene β -Catenin, als auch das transfizierte c-myc-FHL2 detektiert werden. Als Ladekontrolle wurde in beiden Lysaten Gapdh verwendet.

4.1.5. Fhl2 Protein-Expression in verschiedenen Organen einer adulten Maus

Nach ausreichender Literaturrecherche wurde FHL2 zur weiteren Analyse seines Einflusses auf β -Catenin ausgewählt. Um die kardiale Relevanz von FHL2 zu testen, wurde zunächst das FHL2 Proteinlevel in Gehirn, Leber, Lunge, Niere, Milz, Herz und Skelettmuskel einer adulten Maus ermittelt. Dabei konnte in den Lysaten der einzelnen Organe in einem Immunoblot mit Fhl2-Antikörper eine starke Proteinexpression im Herzen, dem Skelettmuskel, sowie der Niere festgestellt werden. Eine geringere Expression war hingegen im Gehirn und der Leber erkennbar. Nur sehr geringe bis keine Expression konnte in den übrigen Organen gezeigt werden (**Abb. 20**).

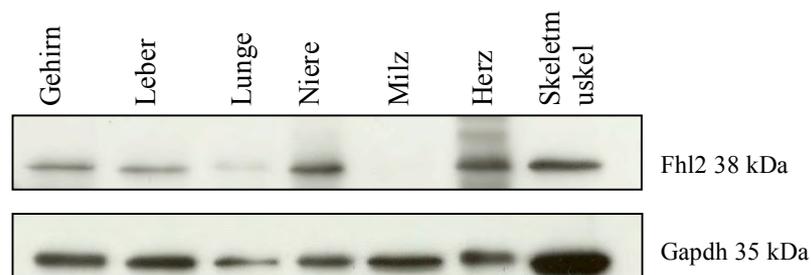


Abb. 20: Organspezifische Fhl2-Proteinexpression einer adulten BL6/C57-Maus. Die Immunoblot-Analyse der Proteinlysate von murinen Organen ergab eine starke Fhl2-Proteinexpression im Herzen, dem Skelettmuskel, sowie der Niere. Eine geringe Expression war im Gehirn und der Leber zu detektieren. Sehr geringe bzw. keine Expression war in der Lunge bzw. der Milz zu finden. Als interne Kontrolle diente die Gapdh-Proteinexpression.

4.1.6. Funktionelle Rolle von Fhl2 in Bezug auf die β -Catenin abhängige Transkription

Zur Untersuchung der funktionellen Rolle von FHL2 auf die Transkriptionsaktivität von β -Catenin wurde eine Luciferase-Reportergen-Assay in NCM durchgeführt (**Abb. 21**). Der verwendete TOPflash-Vektor verfügt über eine β -Catenin abhängige Luciferase-Expression, in deren Promotorregion sich mehrere LEF/TCF-Bindestellen befinden. Ist die β -Catenin abhängige Transkription aktiviert, binden vermehrt LEF und TCF an die Luciferase-Promotorregion, wodurch es zur gesteigerten Luciferase-Aktivität kommt. Der FOPflash-Vektor verfügt über mutierte LEF/TCF-Bindestellen und dient somit als Negativkontrolle, bei der es durch β -Catenin zu keiner gesteigerten Luciferase-Aktivität kommt. Sowohl 12 als auch 48 Stunden nach der Co-Transfektion des TOPflash-Vektors mit einem β -Catenin Expressionsplasmid kommt es zu einer signifikant gesteigerten Luciferase-Aktivität. Bei der zusätzlichen Co-Transfektion eines FHL2-Expressionsplasmids wird die Luciferase-Aktivität 12 h nach der Transfektion signifikant erhöht und bereits 48 h nach der Transfektion signifikant vermindert, sodass FHL2 einen zeitabhängigen, regulatorischen Einfluss auf die β -Catenin abhängige Transkription zu haben scheint.

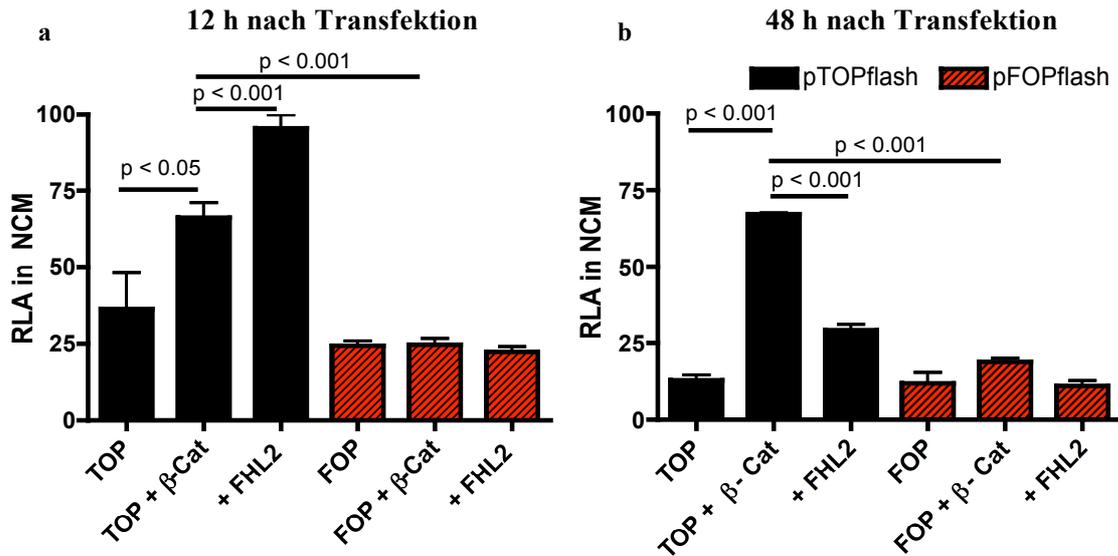


Abb. 21: Luciferase-Reportergen-Assay in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NCM) 12 h und 48 h nach Transfektion. Ein Luciferase-Reportergen-Assay in NCM zeigt eine signifikant erhöhte β -Catenin-LEF/TCF induzierte Luciferase-Expression (a) 12 h nach der Transfektion und eine signifikant verminderte Luciferase-Expression (b) 48 h nach der Transfektion. Der TOPflash-Vektor verfügt über LEF/TCF-Bindestelle in der Promotorregion der Luciferase. Ist die β -Catenin abhängige Transkription durch Co-Transfektion mit β -Catenin aktiviert, binden vermehrt die direkten β -Catenin-Zielgene LEF und TCF an die Promotorregion und erhöhen somit die relative Luciferase-Aktivität (RLA). Kommt es in Folge der Co-Transfektion von β -Catenin und FHL2 zur einer Regulation der β -Catenin abhängigen Transkription, zeigt sich dies in einer veränderten Luciferase-Aktivität. Der FOPflash-Vektor verfügt über mutierte LEF/TCF-Bindestellen, sodass es unter β -Catenin-Expression nur zu einer geringen Aktivierung der Luciferase kommt. Zum Abgleich der Luciferase-Aktivität wurde zusätzlich in jeder Probe ein Renilla-exprimierendes Plasmid co-transfiziert.

4.2. Einfluss von FHL2 auf die kardiale *in vitro* Differenzierung im ECC-P19 Assay

4.2.1. Morphologie der EB-abgeleiteten Kardiomyozyten

Zur Untersuchung des Einfluss von FHL2 auf die Kardiogenese wurde die Differenzierung der P19-Zellen in kontrahierende Kardiomyozyten durch die „hanging drop“-Methode und unter Verwendung eines DMSO-haltigen Mediums eingeleitet (Abb. 13; Methoden 3.3.5.). Zu verschiedenen Zeitpunkten des Assays wurden die Zellen mittels Immunofluoreszenz untersucht oder geerntet und zur weiteren Analyse Voll- und fraktionierte Protein-Lysate und mRNA extrahiert. Durch die Immunoblot-Analyse konnte die Überexpression von FHL2 48 Stunden (48 h) nach Transfektion nachgewiesen werden (Abb. 22a). Die Entwicklung von undifferenzierten transfizierten P19-Zellen in kontrahierende funktionelle Kardiomyozyten wurde anhand von mikroskopischen Aufnahmen dokumentiert. P19-Zellen wachsen zunächst als adherente Einsicht-Kultur (24 h *post-transfection*). Die entstandenen EBs sind zunächst noch kugelförmig (6 d EBs), migrieren nach dem Ausplattieren wieder als adherente Kultur (8 d EB) und bilden kontrahierende Bereiche („*beating areas*“) von unterschiedlicher Größe aus (10 d EB) (Abb. 22b). Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurde der Zeitpunkt und die Anzahl von *beating areas* dokumentiert. Es konnte gezeigt werden, dass die FHL2 transfizierten Zellen zeitlich früher beginnen zu schlagen und darüber hinaus eine signifikant vermehrte Anzahl von *beating areas* pro EBs aufweisen (Abb. 22c).

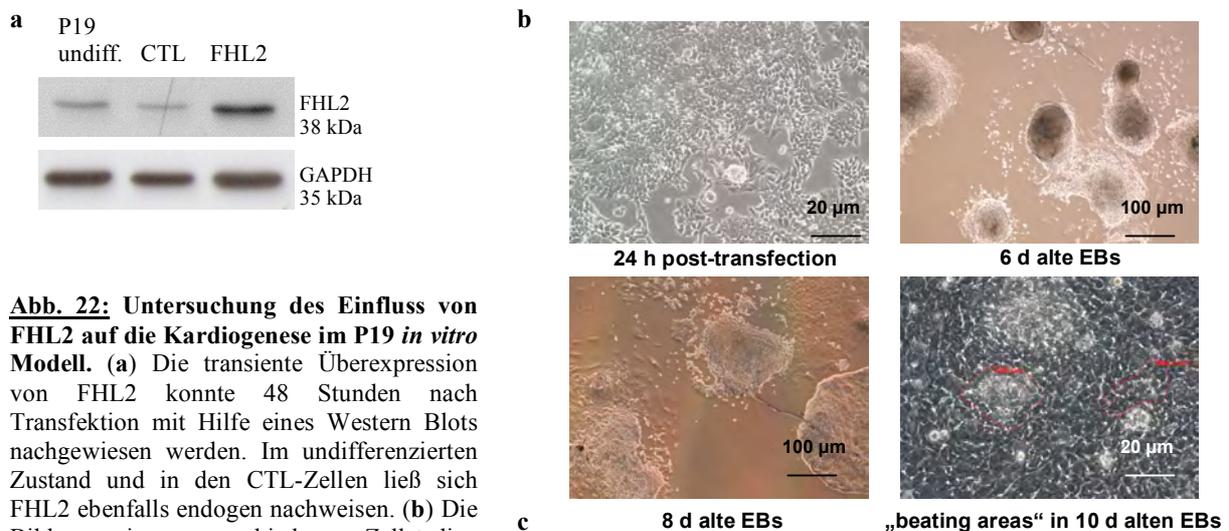
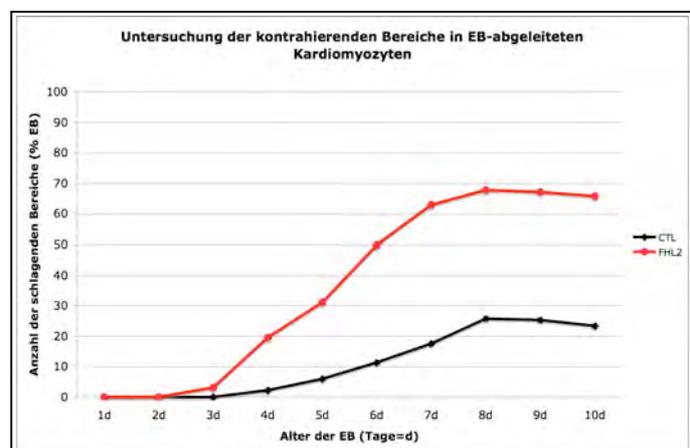
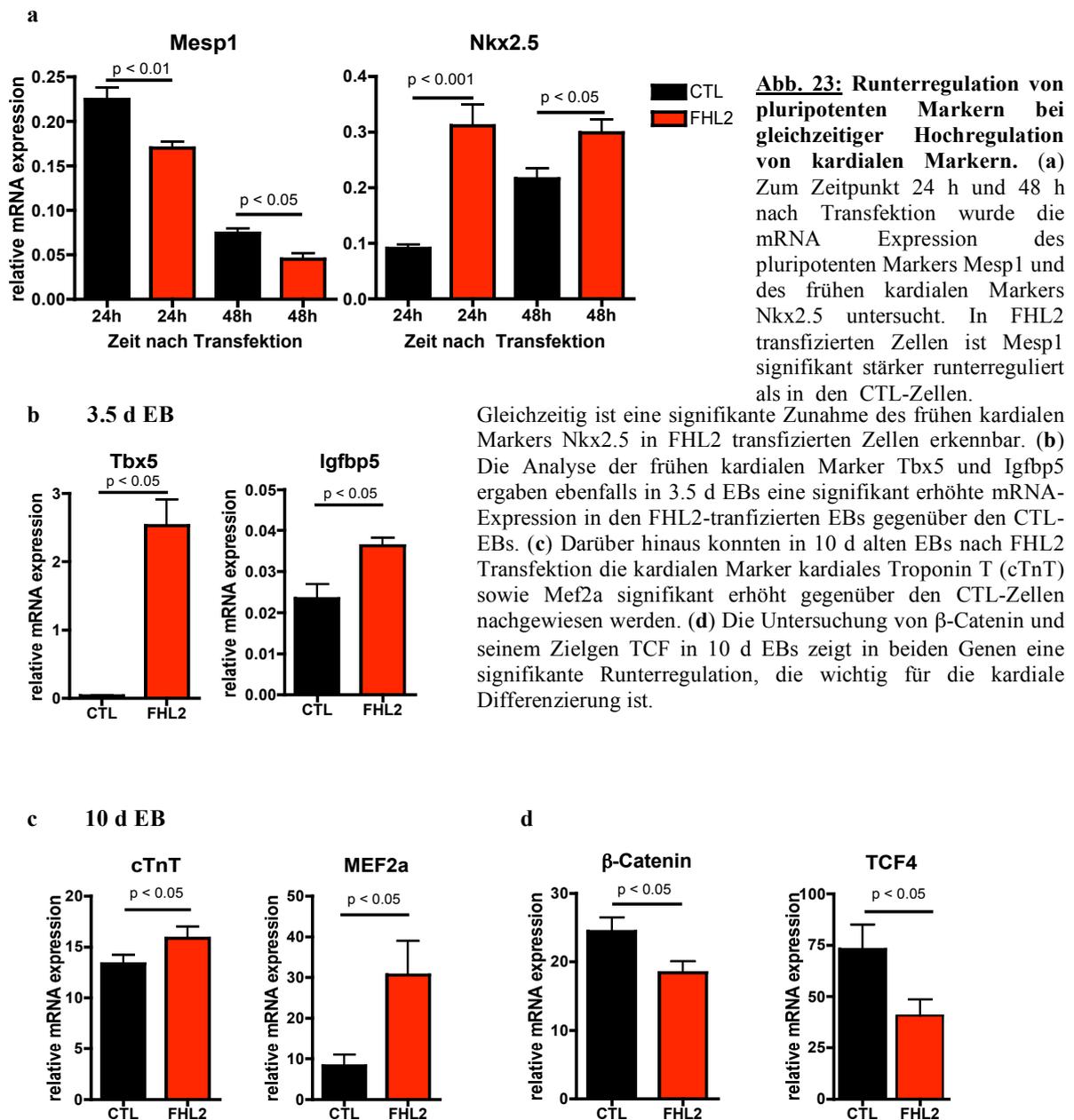


Abb. 22: Untersuchung des Einfluss von FHL2 auf die Kardiogenese im P19 *in vitro* Modell. (a) Die transiente Überexpression von FHL2 konnte 48 Stunden nach Transfektion mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen werden. Im undifferenzierten Zustand und in den CTL-Zellen ließ sich FHL2 ebenfalls endogen nachweisen. (b) Die Bilder zeigen verschiedene Zellstadien während der Differenzierung der transfizierten P19-Zellen 24 h *post-transfection* und vor der EB-Bildung; 6 bzw. 8 Tage alte EBs und 10 Tage alte EBs mit kontrahierenden Bereichen, die funktionelle Kardiomyozyten charakterisieren. (c) Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurde der Zeitpunkt und die Anzahl der *beating areas* pro EBs dokumentiert. Es hat sich gezeigt, dass FHL2 transfizierte EBs eher beginnen zu schlagen und eine Erhöhung in der Anzahl gegenüber den CTL-EBs aufweisen. Die Behandlung mit FHL2 hat einen signifikanten Einfluss auf den Zeitpunkt und die Anzahl der schlagenden EBs.



4.2.2. Einfluss von FHL2 auf die Genexpression in EB-abgeleiteten Kardiomyozyten

Die mRNA Untersuchung mittels qRT-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten nach transientser FHL2 Transfektion konnte zeigen, dass nach 24 Stunden (24 h) und 48 Stunden (48 h) FHL2 zur vermehrten Runterregulation des pluripotenten Markers Mesp1 bei gleichzeitiger Hochregulation des kardialen Markers Nkx2.5 führt (**Abb. 23a**). Um den Einfluss von FHL2 auf die kardiale Differenzierung zu bestärken, wurden ausserdem die frühen kardialen Marker Tbx5 und Igfbp5 untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass zum frühen Zeitpunkt 3.5 d in den FHL2-EBs im Vergleich zur Kontrolle (CTL-EBs) eine signifikante Hochregulation auf mRNA-Ebene stattfindet (**Abb. 23b**).



Darüber hinaus konnten zum späteren Zeitpunkt der Differenzierung (10 d EB) in FHL2-EBs die kardialen Marker kardiales Troponin T (cTnT) sowie Mef2a signifikant hochreguliert gegenüber den CTL-EBs nachgewiesen werden (**Abb. 23c**). Bei der Untersuchung der mRNA-Expression von

β -Catenin und seinem Zielgen TCF4 konnte in 10 d EBs eine signifikante Runterregulation des mRNA-Levels gezeigt werden (**Abb. 23d**).

Die in der Immunofluoreszenzfärbung untersuchte Protein-Expression der kardialen Marker cTnT und Nkx2.5 korreliert mit der in **Abb. 24** dargestellten mRNA-Expression. Die semi-quantitative Auswertung der cTnT- bzw. Nkx2.5 / hoechst – positiven Zellen wurde mit Hilfe der ZEISS Software Axiovision durchgeführt. Es konnte auf Proteinebene eine signifikante Hochregulation von cTnT (**Abb. 24a**) und Nkx2.5 in FHL2-EBs gegenüber CTL-EBs nachgewiesen werden (**Abb. 24b**).

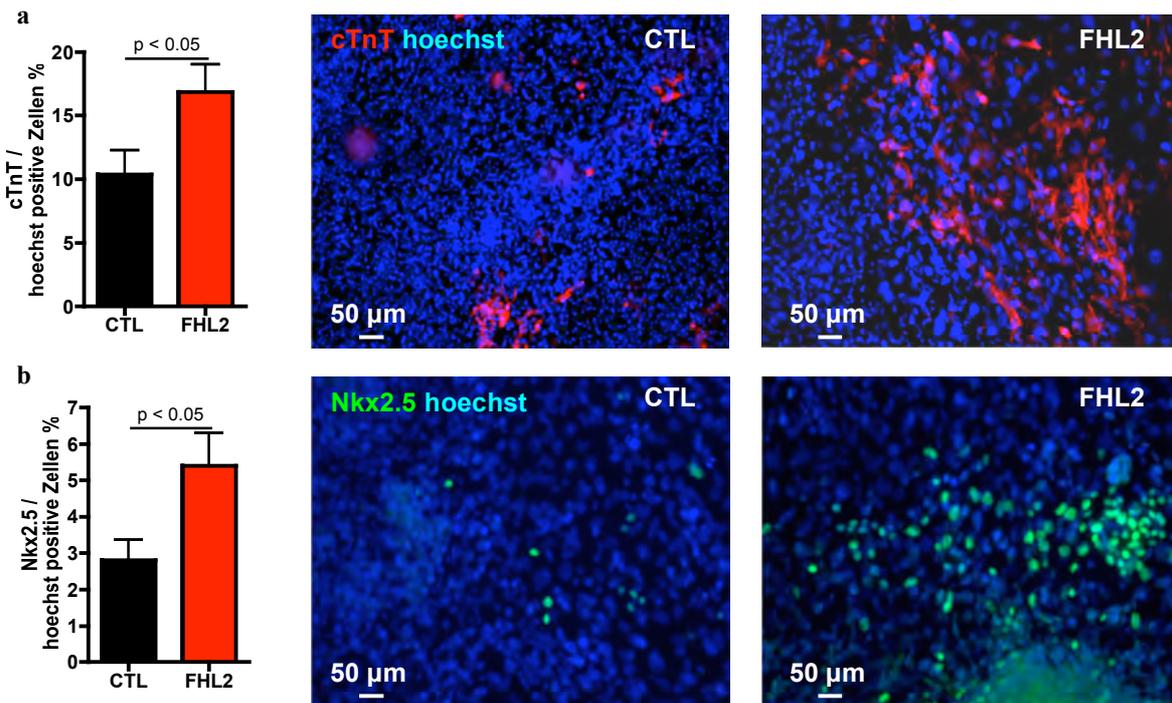


Abb. 24: Immunofluoreszenzfärbung und semi-quantitative Auswertung von cTnT und Nkx2.5. Zur Untersuchung der Protein-Expression von frühen kardialen Markern, wurde in 10 d EBs eine Immunofluoreszenzfärbung für cTnT (**a**) und Nkx2.5 (**b**) durchgeführt. Die anschließende semi-quantitative Auswertung von cTnT- bzw. Nkx2.5 / hoechst-positiven Zellen wurde mit dem Axiovision-Programm der Firma ZEISS durchgeführt und ergab eine signifikante erhöhte Proteinexpression beider kardialer Marker in FHL2-EBs.

Die Protein-Analyse von β -Catenin in 10 d EBs mit Hilfe eines Western Blots von Gesamt-Proteinlysaten ergab eine deutliche Überexpression in CTL-Lysaten gegenüber FHL2-Lysaten und korreliert somit mit den mRNA Daten für β -Catenin (**Abb. 25**).

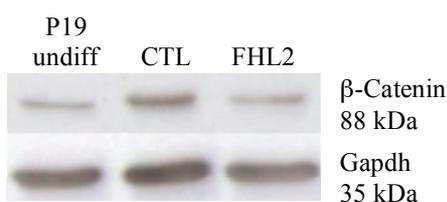
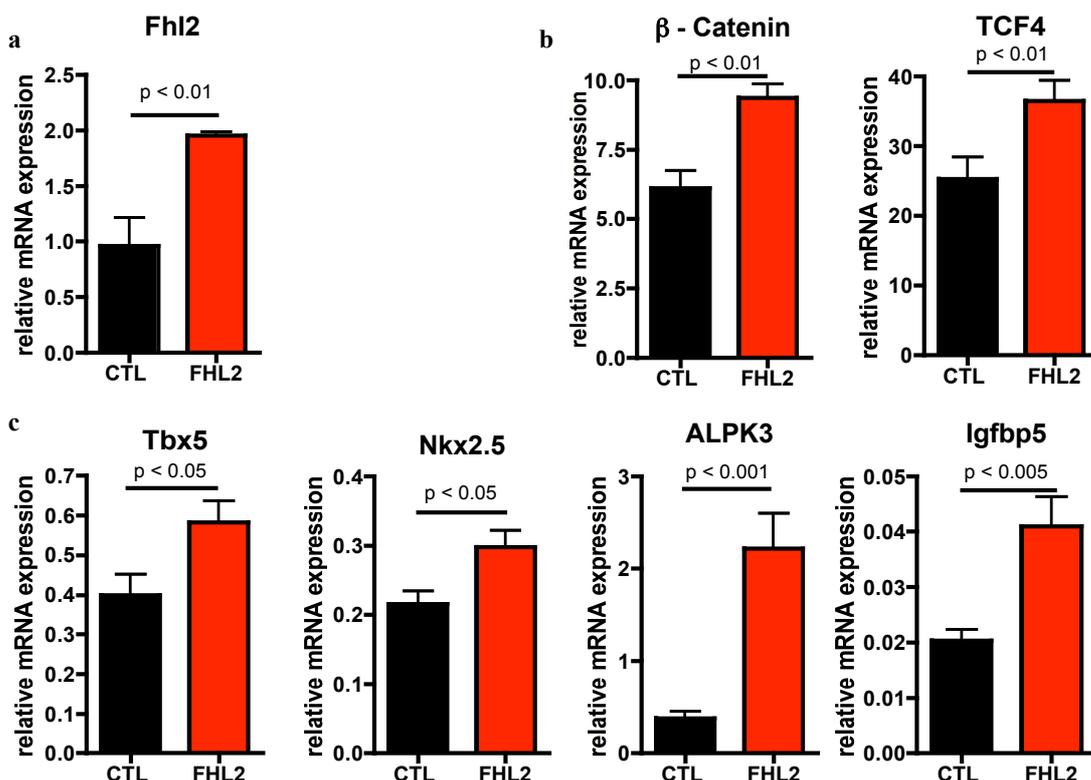


Abb. 25: Western Blot Analyse von Gesamt-Proteinlysaten für β -Catenin. Es ist eine deutlich erhöhte Protein Expression von β -Catenin in den CTL-Lysaten von 10 d EBs erkennbar. Das Protein-Level in den FHL2-EBs ist etwa gleich der Expression von β -Catenin in undifferenzierten P19-Zellen.

4.2.3. Einfluss von FHL2 auf die frühe kardiale Genexpression

Wie bereits einleitend erwähnt, ist die Aktivierung und Inhibierung von β -Catenin für die Kardiogenese von entscheidender Bedeutung. Da die vermehrte Differenzierung der 10 d FHL2-EBs gegenüber den CTL-EBs nicht mehr durch die transiente FHL2-Expression ausgelöst werden kann, lag die Vermutung nahe, dass FHL2 bereits kurze Zeit nach der Transfektion über β -Catenin Einfluss auf die kardiale Spezifizierung nimmt. Um zu überprüfen, ob sich die frühe FHL2 Expression bereits auf Gene der frühen Kardiogenese auswirkt, wurden die transfizierten P19-Zellen bereits 24 h nach der Transfektion geerntet. Nach mRNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde mittels qRT-PCR die mRNA Expression verschiedener Gene untersucht (**Abb. 26**). Es konnte gezeigt werden, dass bereits 24 h nach der Transfektion ein signifikant erhöhtes FHL2 mRNA-Level in den FHL2-transfizierten gegenüber den CTL-Zellen erkennbar war (**Abb. 26a**). Die Untersuchung von β -Catenin und seinem Zielgen TCF4 ergab auch hier eine signifikante Erhöhung in den FHL2 transfizierten P19-Zellen (**Abb. 26b**). Anhand der frühen kardialen Marker Tbx5, Nkx2.5, ALPK3 und Igfbp5, sollte der Einfluss von FHL2 speziell auf die frühe kardiale Spezifikation untersucht werden. Bei allen vier Genen konnte eine signifikante Hochregulation der mRNA-Expression nach FHL2-Transfektion nachgewiesen werden. (**Abb. 26c**) Da FHL2 auch in Verbindung steht die Proliferation zu beeinflussen, wurden darüber hinaus der Proliferationsmarker Cyclin D1 mittels qRT-PCR und ki67 mittels Immunofluoreszenzfärbung (IF) untersucht. Auch hier zeigt sich für Cyclin D1 eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in FHL2-transfizierten Zellen gegenüber den CTL-Zellen (**Abb. 26d**). Die semi-quantitative Auswertung der IF für ki67 ergab ebenfalls eine signifikante Erhöhung von ki67 exprimierenden Zellen nach FHL2-Transfektion gegenüber den CTL-Zellen (**Abb. 26e**).



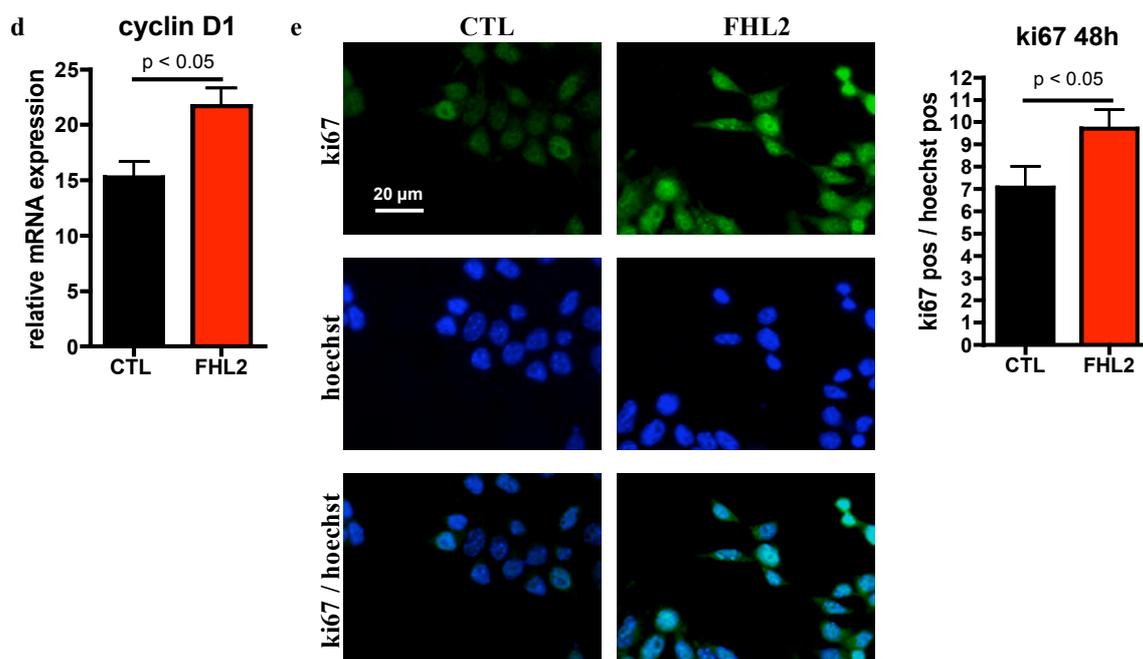


Abb. 26: qRT-PCR Analyse 24h und Immunofluoreszenzfärbung 48h nach transienter FHL2 Transfektion. (a) Bereits 24 h nach Transfektion ist eine deutlich Überexpression von FHL2 erkennbar. Die FHL2-Überexpression führt sowohl bei β -Catenin und seinem Zielgen TCF4 (b), als auch bei den frühen kardialen Markern Tbx5, Nkx2.5, ALKP3 und Igfbp5 (c) zu einer signifikanten Hochregulation gegenüber den CTL-Zellen. (d) Darüber hinaus zeigt auch der Proliferationsmarker Cyclin D1 eine signifikant erhöhte mRNA-Expression nach FHL2-Transfektion. (e) Die semi-quantitative Auswertung nach Immunofluoreszenzfärbung (IF) für den Proliferationsmarker ki67 zeigt eine signifikante ki67-Proteinexpression in FHL2-EBs gegenüber den CTL-EB.

Die Untersuchung der Protein-Expression von FHL2 und β -Catenin in cytosolischen und nukleären Fraktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ergab, dass die FHL2 Expression 6 h nach der Transfektion bereits deutlich vermehrt sowohl im Cytosol als auch im Nucleus exprimiert ist. Im Cytosol nimmt die Expression 48 h nach der Transfektion ab, wohingegen im Nucleus eine Zunahme von FHL2 erkennbar war. Bei der densitometrischen Untersuchung der β -Catenin Proteinexpression 12 h und 48 h nach der FHL2-Transfektion ist erkennbar, dass β -Catenin im Cytosol von FHL2 transfizierten Zellen im Vergleich zu den CTL-Zellen signifikant vermindert vorkommt. Gleichzeitig nimmt in der nukleären Fraktion der FHL2-transfizierten Zellen die Expression von β -Catenin gegenüber den CTL-Zellen signifikant zu (Abb. 27a und 27b).

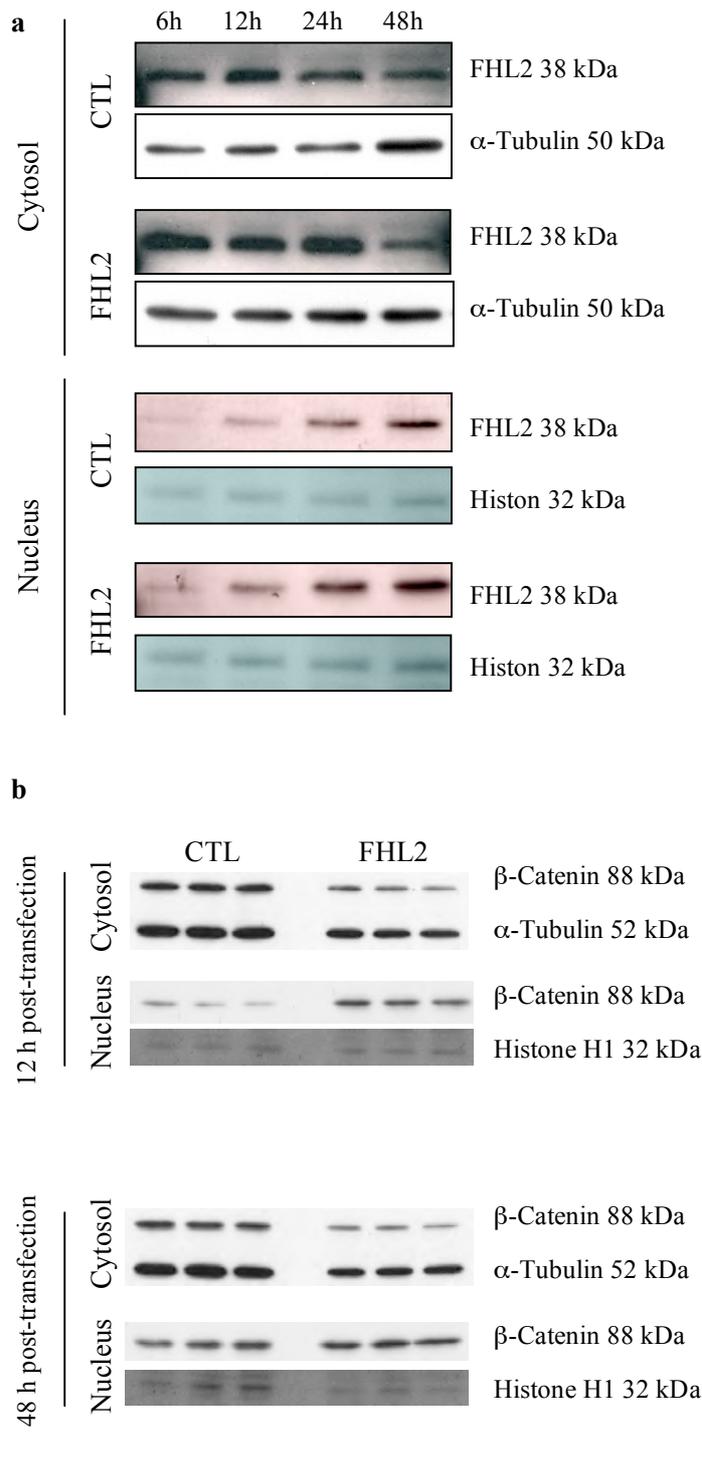


Abb. 27: Analyse der Protein-Expression in cytosolischen und nukleären Fraktionen nach transienter FHL2-Expression für FHL2 (a) und β -Catenin (b). (a) FHL2 ist bereits 6 h nach Transfektion im Cytosol stark exprimiert. Die Expression nimmt dann bis zu 48 h nach der Transfektion etwas ab. Gleichzeitig ist jedoch in den nukleären Fraktionen eine deutliche Erhöhung der FHL2 Expression gegenüber den CTL-Lysaten erkennbar. (b) Die Protein-Expression von β -Catenin ist 12 h und 48 h nach FHL2-Transfektion in der cytosolischen Fraktion der FHL2-Lysate gegenüber den CTL-Lysaten signifikant vermindert. In den nukleären Fraktionen hingegen ist eine signifikante Zunahme von β -Catenin in den FHL2-Lysaten erkennbar. Die Auswertung erfolgte in Triplikaten und wurde densitometrisch ausgewertet.

4.2.4. FHL2 aktiviert das kardiale Programm *in vitro*

Bereits 24 h nach FHL2-Transfektion konnte die Aktivierung früher kardialer Marker gezeigt werden. Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob FHL2 auch ohne Zugabe des zur Differenzierung notwendigen DMSO die kardiale Differenzierung einleiten kann und es zu schlagenden funktionellen Kardiomyozyten kommt. Das *in vitro* Assay wurde dazu wie beschrieben angewendet, mit der Ausnahme, dass statt des DMSO-haltigen Differenzierungsmediums normales P19 *Growth*-Medium verwendet wurde. Um auszuschließen, dass die Differenzierung durch andere mit-transfizierte

Faktoren erfolgt, wurden zusätzlich zum FHL2/pCS-MT Expressionsplasmid (FHL2) verschiedene Kontrollansätze durchgeführt. Dabei wurden der pcDNA3.1- und der pCS-MT-Leervektor, nur das Transfektionsreagenz (Fugene) verwendet bzw. weder das Transfektionsreagenz noch DNA (none) transfiziert. Die entstandenen EBs wurden im Alter von 10 Tagen geerntet und für die qRT-PCR aufgearbeitet (**Abb. 28a**). Für den Kontrollansatz mit dem pCS-MT Leervektor, sowie für den FHL2-Ansatz wurde zudem eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (**Abb. 28b**). Bei der qRT-PCR Analyse zeigten die FHL2-EBs eine signifikant erhöhte mRNA Expression der frühen Marker Nkx2.5 und ALPK3, sowie des kardialen Markers cTnT. Die Proteinexpression von cTnT und Nkx2.5 konnte nur in den FHL2-transfizierten EBs nachgewiesen werden. Die Kontroll-EBs zeigten keine Protein-Expression der untersuchten Gene.

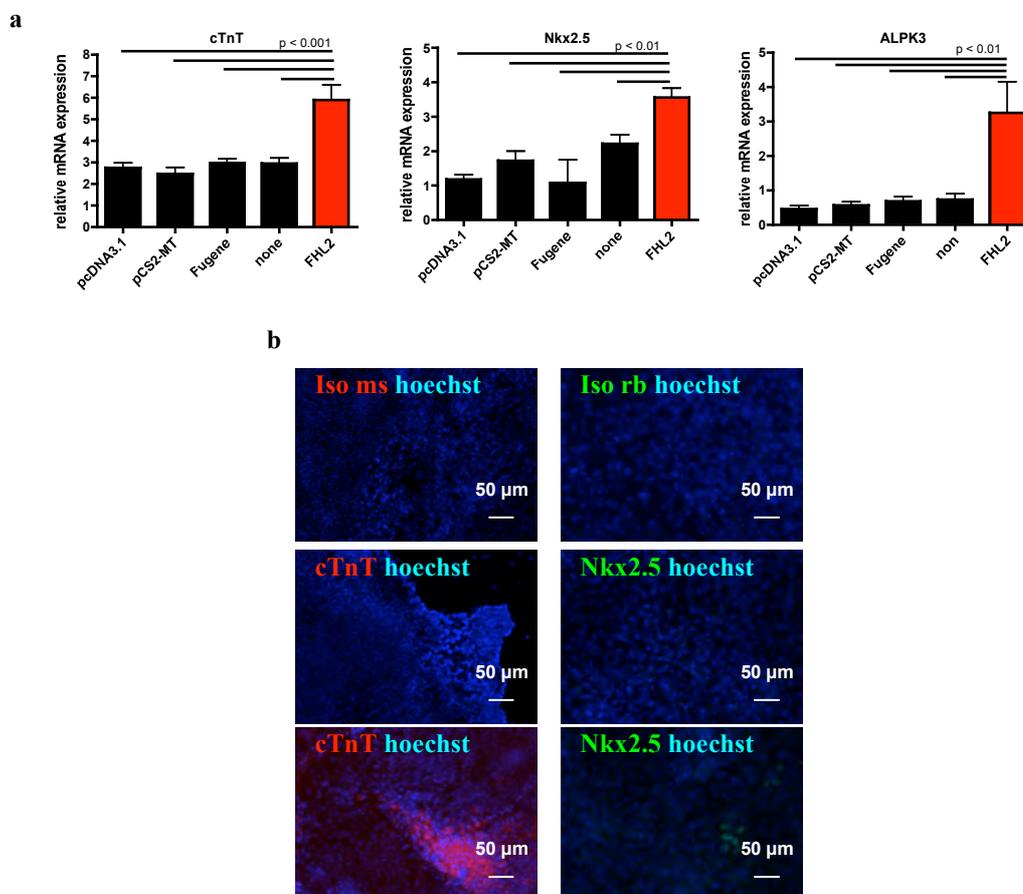


Abb. 28: qRT-PCR Analyse und Immunfluoreszenzfärbung von 10d EBs nach FHL2- und Kontroll-Transfektionen ohne Differenzierungsmedium. (a) Für die Kontrolltransfektionen wurden verschiedene Leervektoren (pcDNA3.1 und pCS-MT), nur das Transfektionsreagenz (Fugene) bzw. nichts (none) transfiziert. Die FHL2-Transfektion wurde wie gehabt durchgeführt. Alle Ansätze wurden zur EB-Bildung gebracht und anschließend ausplattiert. Im Alter von 10d wurden die Zellen geerntet und für die qRT-PCR aufgearbeitet. Die Analyse der kardialen Marker Nkx2.5, ALPK3 und cTnT zeigen eine signifikante Erhöhung in den FHL2-transfizierten EBs gegenüber den Kontrollen. (b) Zur Proteinanalyse wurden von den FHL2- und pCS-MT-transfizierten EBs Immunfluoreszenzfärbungen für cTnT und Nkx2.5 durchgeführt. Für cTnT ist eine deutliche Expression bei den FHL2 transfizierten EBs erkennbar. Die Nkx2.5 Expression ist bei den FHL2-transfizierten EBs z.T. erkennbar (weißer Pfeil). Weder für cTnT noch für Nkx2.5 konnte im Kontrollansatz eine positive Protein-Expression nachgewiesen werden.

4.3. Einfluss von FHL2 auf die kardiale *in vitro* Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen (mESC)

4.3.1. Herstellung einer stabil transfizierten mES-Zelllinie mit FHL2-Überexpression

Zur Herstellung einer stabil transfizierten mES-Zelllinie wurden nach Mitomycin-Inaktivierung der embryonalen Fibroblasten (MEF_{mmc}) die noch untransfizierten mESCs in Co-Kultur genommen (**Abb. 29a**). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die mESC auf Matrigel umgesetzt und mit dem FHL2-Expressionsplasmid und einem Puromycin-Selektionsmarker erfolgreich co-transfiziert. Nach der Selektion mit der zuvor titrierten Puromycin-Konzentration von 1 μ g/ml konnten insgesamt 96 Klone geerntet werden (**Abb. 29b**). Die Klone wurden zur weiteren Vermehrung auf MEF_{mmc}-haltige 96-Lochplatten umgesetzt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Klone 1:3 geteilt und auf neue 96-Lochplatten verteilt. Jeweils zwei Platten wurden dafür nur mit 0,1 % Gelatine beschichtet, um für die anschließende DNA- bzw. Protein-Extraktion eine nahezu reine mESC-Kultur zu erhalten. Zur ausreichenden Versorgung der mESC-Klone wurde hierbei Konditionalmedium verwendet. Die 3. Platte enthielt wiederum MEF_{mmc}, um die mESC-Klone zu vermehren. Mit Erreichen der Konfluenz werden die Klone dann auf größere Zellkulturflächen mit MEF_{mmc} ausplattiert. Ist ein Doppelansatz auf 10 cm Zellkulturschalen erreicht, wurden die mESC-Klone eingefroren und bei flüssigem Stickstoff eingelagert.

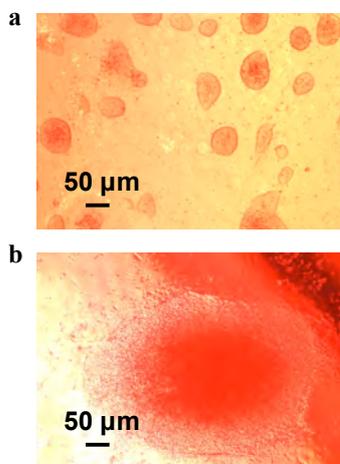
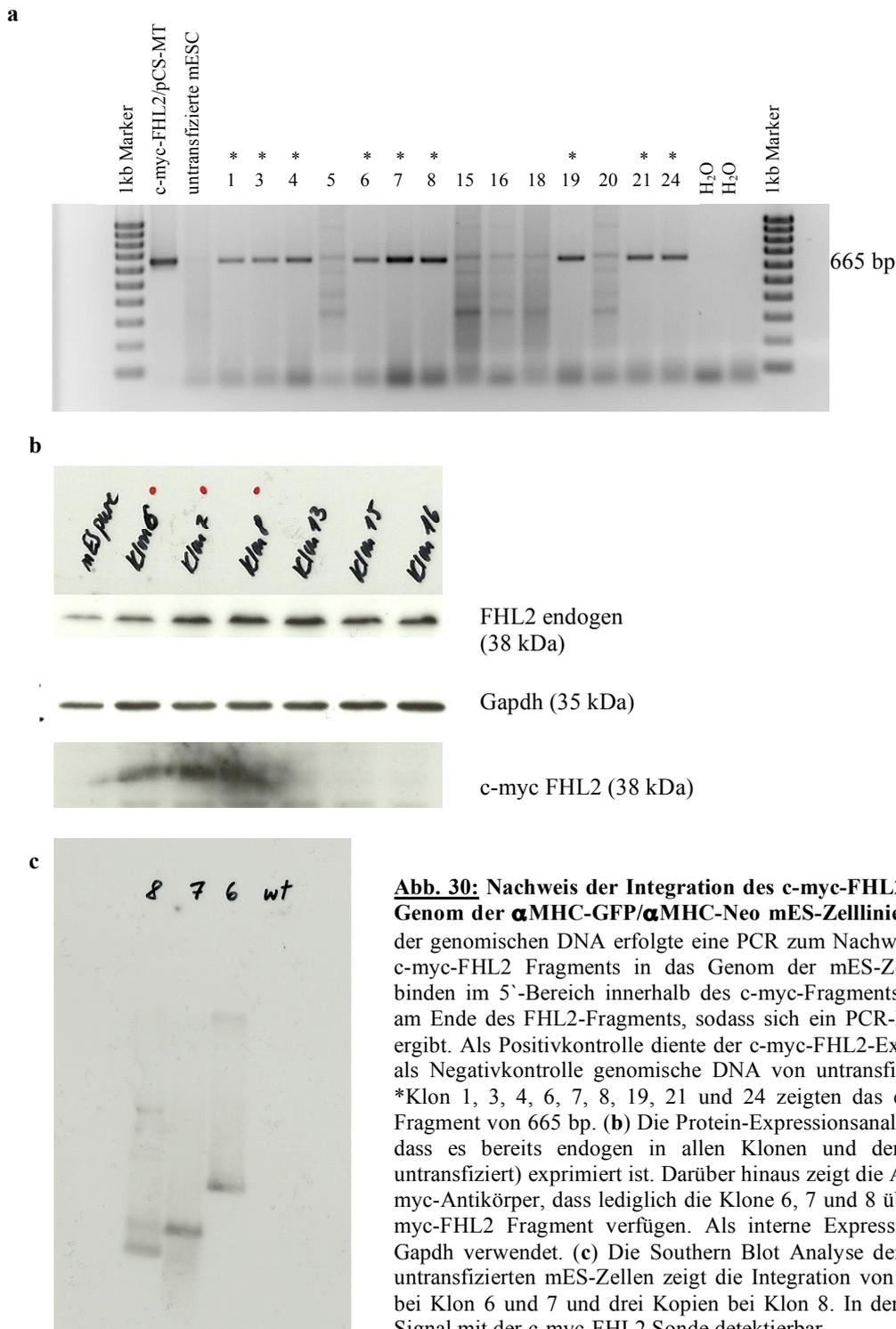


Abb. 29: Herstellung einer stabil transfizierten mES-Zelllinie mit FHL2-Überexpression. (a) Nach Mitomycin Inaktivierung der embryonalen Fibroblasten (MEF_{mmc}) werden die untransfizierten mESCs in Co-Kultur genommen. Nach Erreichen der Konfluenz werden sie auf Matrigel umgesetzt und mit dem FHL2-Expressionsplasmid und einem linearen Puromycin-Selektionsmarker co-transfiziert. Die Selektion mit der zuvor titrierten Puromycin-Konzentration von 1 μ g/ml ergab 96 Klone, die zur weiteren Analyse auf eine 96-Lochplatte umgesetzt und vermehrt werden. (b) Beispiel für selektierten FHL2-mESC-Klon.

4.3.2. Analyse der stabil transfizierten FHL2-mESC-Klone

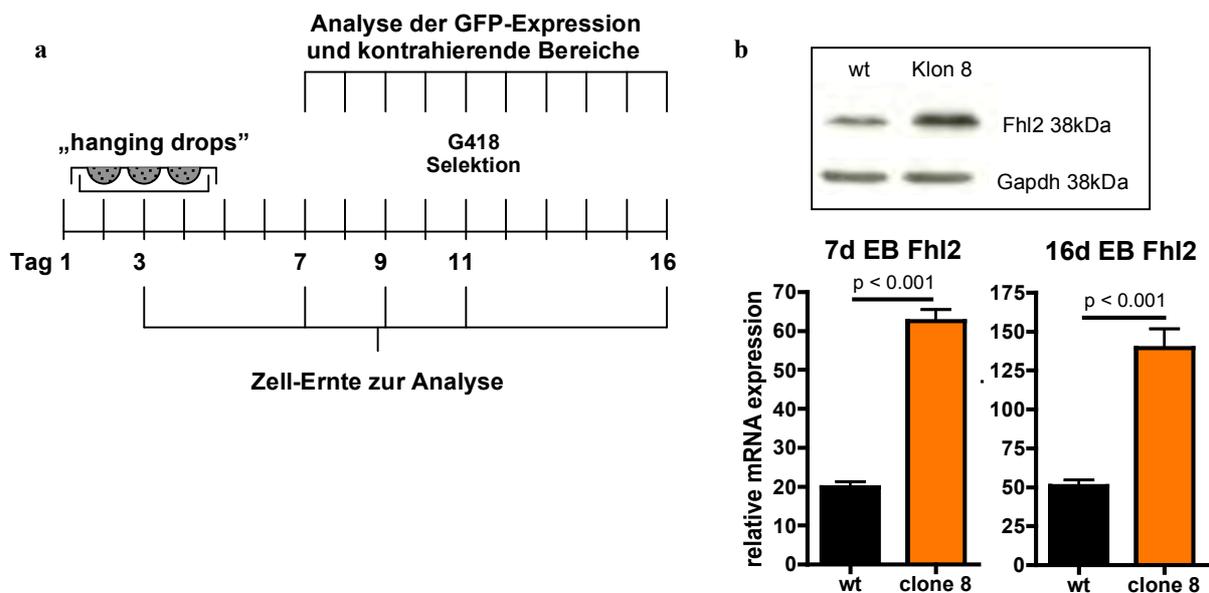
Nach Isolation der genomischen DNA der hergestellten Klone, wurde zunächst eine PCR mit Primern durchgeführt, die 5' innerhalb des c-myc-tag und 3' am Ende des FHL2-Fragments binden (cmyc-FHL2 a und as; Material 2.2.). Somit ergibt sich ein PCR-Produkt von 665 bp. Als Positivkontrolle wurde das c-myc/FHL2-Expressionsplasmid und als Negativkontrolle die genomische DNA von untransfizierten mES-Zellen verwendet. Von den 96 Klonen wurden 48 mit PCR überprüft, davon zeigten 64 % die entsprechende Größe im PCR-Produkt (Beispiel: **Abb. 30a**). Darüber hinaus wurde auch die Protein-Expression von FHL2 durch Western Blot Analyse überprüft (**Abb. 30b**). Dabei hat sich gezeigt, dass FHL2 bereits endogen in den untransfizierten mES-Zellen vorkommt. Anschließend wurde ein Western Blot mit einem c-myc-Antikörper durchgeführt, dabei konnte gezeigt werden, dass

die Klone 6, 7 und 8 über das c-myc-FHL2 Fragment verfügen. Daher wurden diese drei Klone anschließend mit Hilfe einer Southern Blot Analyse auf die Anzahl der integrierten FHL2-Kopien untersucht (**Abb. 30c**). Die RNA-Sonden (siehe 3.2.3.; Methoden) wurden anhand des c-myc/FHL2-Expressionsplasmids hergestellt, um eine größtmögliche Übereinstimmung bei der Hybridisierung zu erzielen. Als Kontrolle diente hierbei die genomische DNA von untransfizierten mES-Zellen. In Klon 6 und 7 konnte jeweils eine Kopie und in Klon 8 drei Kopien nachgewiesen werden. Zur weiteren Analyse des Einflusses von FHL2 auf die frühe Kardiogenese wurde mit Klon 8 weitergearbeitet und seine Ergebnisse mit den gleichzeitig untersuchten untransfizierten (wt) mES-Zellen verglichen.



4.3.3. Einfluss von FHL2 auf die kardiale *in vitro* Differenzierung im stabil transfizierten mESC-Klon 8

Nach Co-Kultivierung der wt mESC und Klon 8 mit MEF_{mnc}, wurde die Differenzierung durch die „hanging drop“-Methode und Differenzierungsmedium eingeleitet. Nach Bildung der Embryonalkörperchen (*embryoid bodies*; EBs) wurden diese auf 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturschalen ausplattiert. Das Neomycin-Resistensgen im Genom der mES-Zelllinie wird durch den kardial-spezifischen α MHC-Promotor reguliert. Ab dem 11. Tag der Differenzierung erfolgt die kardial-spezifische Selektion von Kardiomyozyten durch das Neomycin-Derivat G418. Die selektierten Kardiomyozyten werden an Tag 16 der Differenzierung geerntet. Zur Analyse mittels Western Blot, qRT-PCR, FACS und Immunfluoreszenzfärbungen werden die Proben der Zeitpunkte 3 d, 7 d, 9 d, 11 d und 16 d EB entsprechend aufgearbeitet (**Abb. 31a**). Die FHL2-Überexpression im Klon 8 ist deutlich im Western Blot erkennbar und konnte sowohl zu Beginn der Differenzierung (7 d EB) als auch am Ende (16 d EB) mit qRT-PCR nachgewiesen werden (**Abb. 31b**). Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurde die α MHC-abhängige GFP-Expression (**Abb. 31c**), sowie die dazu korrelierenden kontrahierenden Bereiche dokumentiert. Es hat sich gezeigt, dass die Klon 8 abgeleiteten EBs eher GFP-Expression zeigen und zeitlich eher beginnen zu kontrahieren als die wt-EBs. Jedoch zeigen die Klon 8-EBs im weiteren Verlauf lediglich ein Drittel an GFP-Expression und kontrahierenden Regionen als die wt-EBs, die bereits am 12. Tag der Differenzierung 100 % GFP-Expression und kontrahierende EBs erreichen. Der Unterschied in der GFP-Expression konnte anhand von täglichen Beobachtungen am Immunfluoreszenz-Mikroskop beobachtet werden.



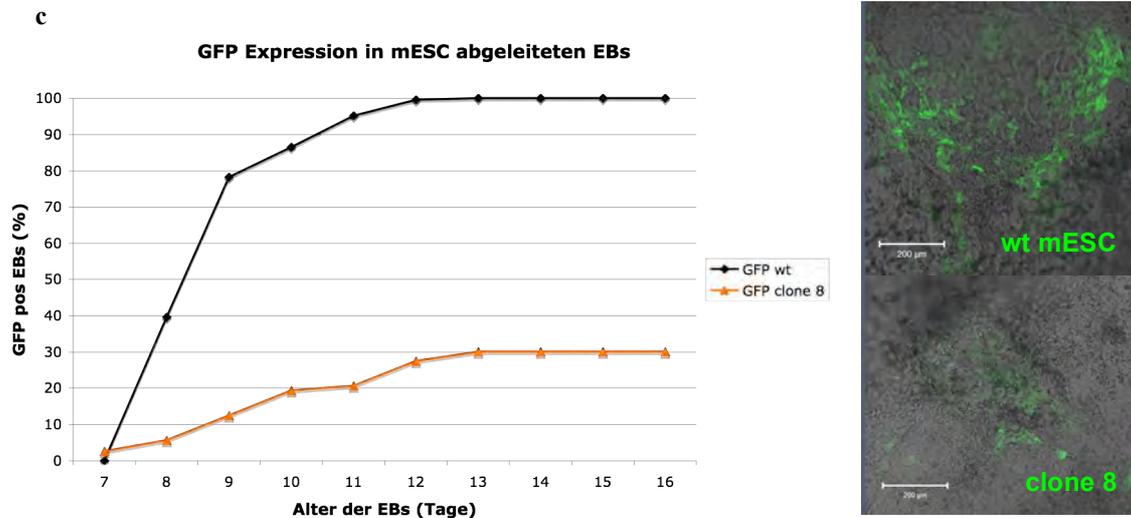


Abb. 31: Untersuchung des Einflusses von FHL2 auf die Kardiogenese im mESC *in vitro* Modell.

(a) Zeitlicher Ablauf des mESC-*in vitro* Assay. Nach konfluenter Kultivierung der wt mESC und dem Klon 8 wurde mit Hilfe der „hanging drop“-Methode unter Verwendung eines Differenzierungsmediums die Differenzierung eingeleitet. Zu verschiedenen Zeitpunkten 3 d, 7 d, 11 d und 16 d EB wurden die Zellen geerntet und zur weiteren Analyse mittels Western Blot, quantitativer real-time (qRT) PCR, FACS und Immunofluoreszenzfärbung entsprechend aufgearbeitet. (b) Die mRNA-Expression von FHL2 im Klon 8 ist sowohl zu Beginn (7 d) als auch am Ende (16 d) der Differenzierung gegenüber den wt mESC signifikant hochreguliert. Die Untersuchung der Proteinexpression konnte ebenfalls eine deutliche FHL2-Überexpression zeigen. (c) Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurde der Zeitpunkt und die GFP-Expression pro EB dokumentiert. Die GFP-Expression läuft unter dem kardial spezifischen α MHC-Promotor, sodass sie als Marker der kardialen Differenzierung verwendet werden kann. Dabei korreliert die GFP-Expression mit der Anzahl der kontrahierenden Bereiche pro EB. Es hat sich gezeigt, dass die Klon 8-EBs einen Tag früher als die wt-EBs bereits GFP-Expression zeigen und eher beginnen zu kontrahieren, aber im Verlauf eine geringere GFP-Expression mit ebenfalls verminderter Anzahl an schlagenden Bereichen als die wt-EBs zeigen.

Zu Beginn der Differenzierung konnte im Klon 8 sowohl für β -Catenin als auch für sein Zielgen TCF4 eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression gegenüber den wt-EBs nachgewiesen werden (Abb. 32a). Die Analyse der pluripotenten Marker Oct4 und Mesp1 zeigt eine deutlich signifikante Reduktion in Klon 8, was den Verlust der Pluripotenz induziert (Abb. 32b). Gleichzeitig zeigen die frühen kardialen Marker *hand1*, *Igfbp5* und *Nkx2.5* eine signifikante Hochregulation in Klon 8-EBs verglichen mit den wt-EBs (Abb. 32c). Darüber hinaus konnte für *Nkx2.5* auch eine größere Population an *Nkx2.5* positiven Zellen verglichen mit den Zellen der wt-EBs in der FACS Analyse in 9 d EBs gezeigt werden (Abb. 32d).

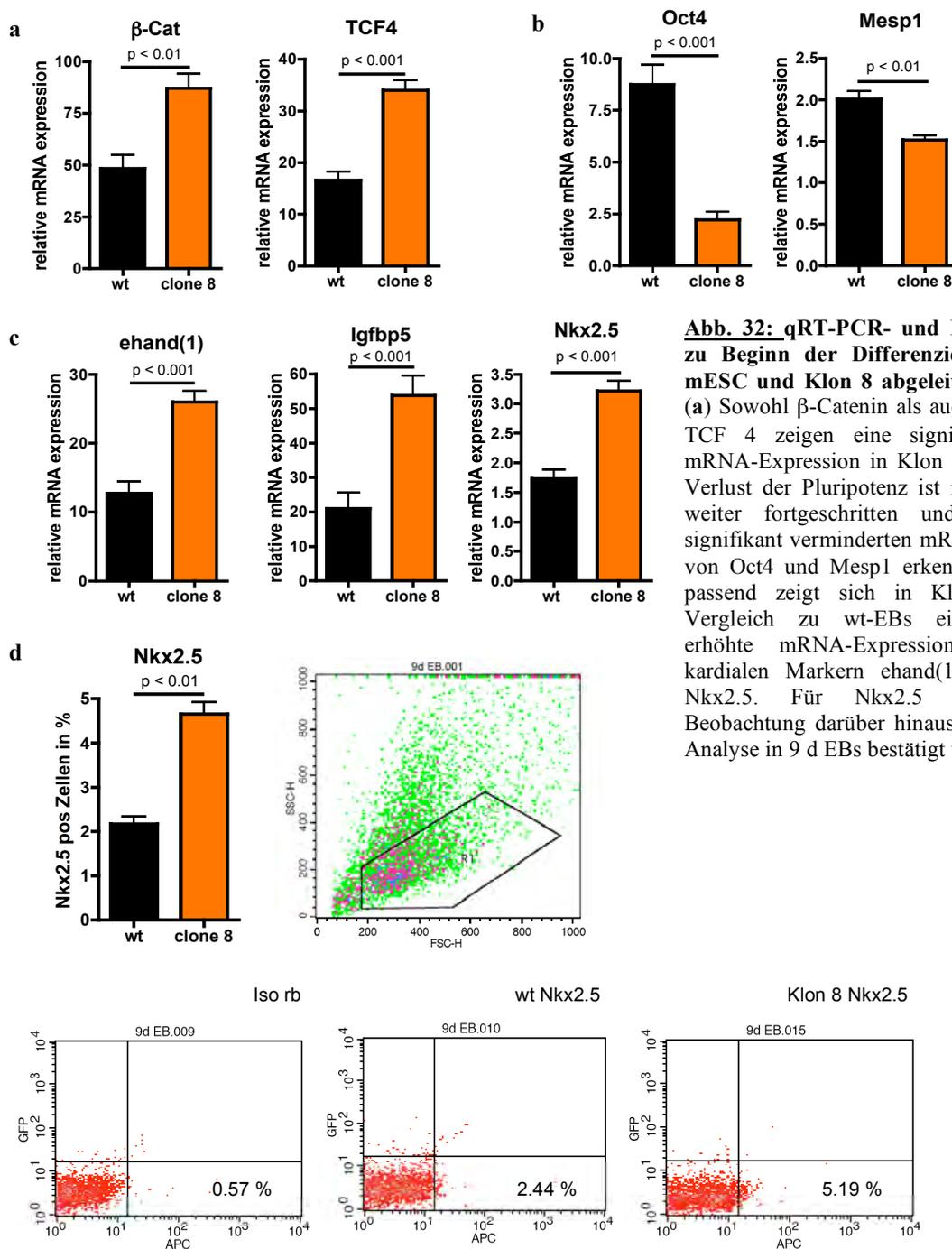


Abb. 32: qRT-PCR- und FACS-Analyse zu Beginn der Differenzierung von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 7 d EBs. (a) Sowohl β -Catenin als auch sein Zielgen TCF 4 zeigen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in Klon 8-EBs. (b) Der Verlust der Pluripotenz ist in Klon 8 EBs weiter fortgeschritten und anhand der signifikant verminderten mRNA-Expression von Oct4 und Mesp1 erkennbar. (c) Dazu passend zeigt sich in Klon 8-EBs im Vergleich zu wt-EBs eine signifikant erhöhte mRNA-Expression der frühen kardialen Marker ehand(1), Igfbp5 und Nkx2.5. Für Nkx2.5 konnte diese Beobachtung darüber hinaus in der FACS-Analyse in 9 d EBs bestätigt werden (d).

Am 11. Tag der Differenzierung ist durch die stabile FHL2-Überexpression im Klon 8 weiterhin eine signifikante Hochregulation von β -Catenin und seinem Zielgen TCF4 erkennbar. Die Analyse des kardialen Markers cTnT zeigt hingegen eine signifikant verminderte mRNA-Expression im Klon 8 im Vergleich zu wt-EBs. Die geringe Expression von cTnT bestärkt die Beobachtungen der verminderten GFP-Expression der Klon 8-EBs zum Zeitpunkt 11 d (**Abb. 33**).

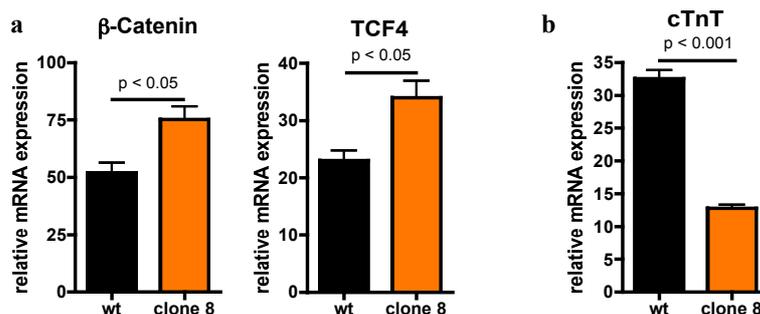
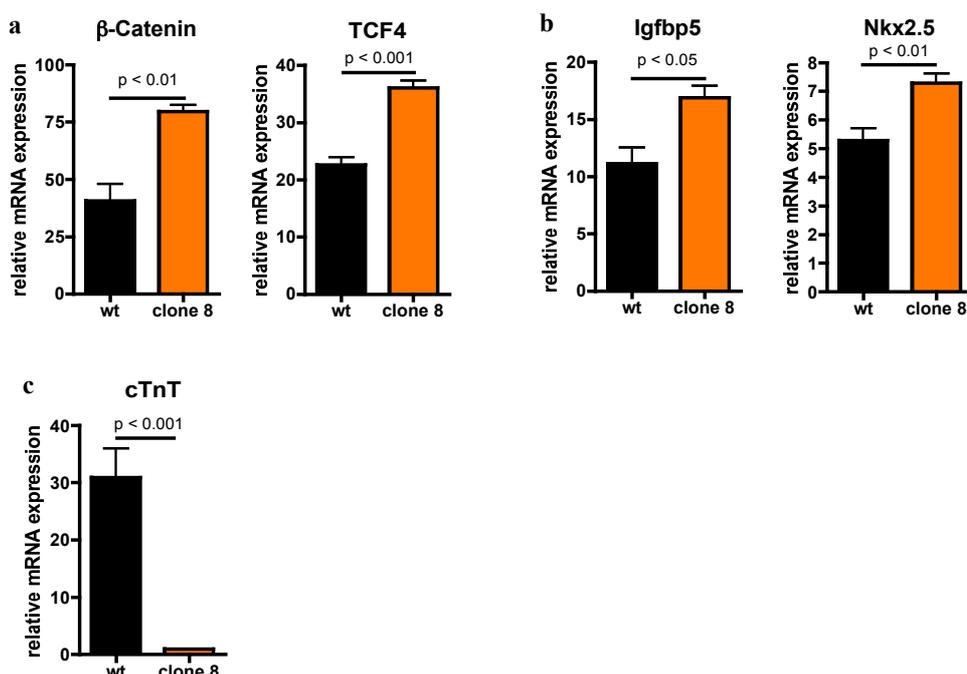


Abb. 33: qRT-PCR Analyse vor Beginn der G418 Selektion von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 11 d EBs. (a) Sowohl β -Catenin als auch seinem Zielgen TCF 4 zeigen in 11 d EBs eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in Klon 8 im Vergleich zu wt-EBs. (b) Die signifikant verminderte mRNA-Expression des kardialen Markers cTnT geht einher mit den Beobachtungen der geringeren GFP-Expression von Klon 8-EBs im Vergleich zu wt-EBs.

Ab dem 11. Tag der Differenzierung wurden die EB-Kulturen mit der bereits etablierten G418-Konzentration von 200 μ g/ml kardial spezifisch selektioniert. Am 16. Tag der Differenzierung ist durch die stabile FHL2-Überexpression im Klon 8 weiterhin eine signifikante Hochregulation von β -Catenin und seinem Zielgen TCF4 nachweisbar (Abb. 34a). Auch die frühen kardialen Marker Nkx2.5 und Igfbp5 sind im Klon 8 signifikant vermehrt exprimiert (Abb. 34b), wohingegen der ebenfalls frühe kardiale Marker ehand(1) keine signifikanten Unterschiede zwischen wt-EBs und Klon 8-EBs zeigt. Die erhöhte mRNA-Expression von Nkx2.5 geht einher mit der stark verminderten cTnT Expression in den Klon 8-EBs im Vergleich zu den wt-EBs (Abb. 34c). Für cTnT wurde darüber hinaus mittels IF die Protein-Expression überprüft. Es ist deutlich erkennbar, dass in den Klon 8-EBs eine verminderte cTnT-Proteinexpression vorliegt (Abb. 34d). Auch diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung einer geringen GFP-Expression in Klon 8-EBs.



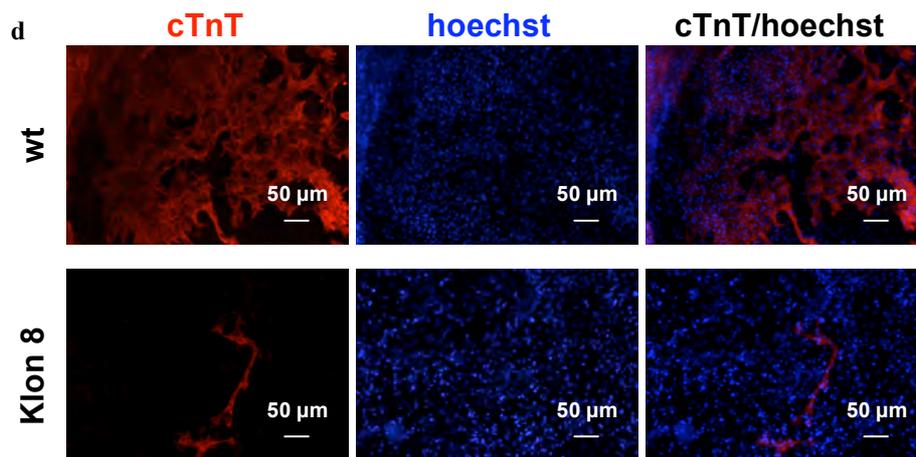
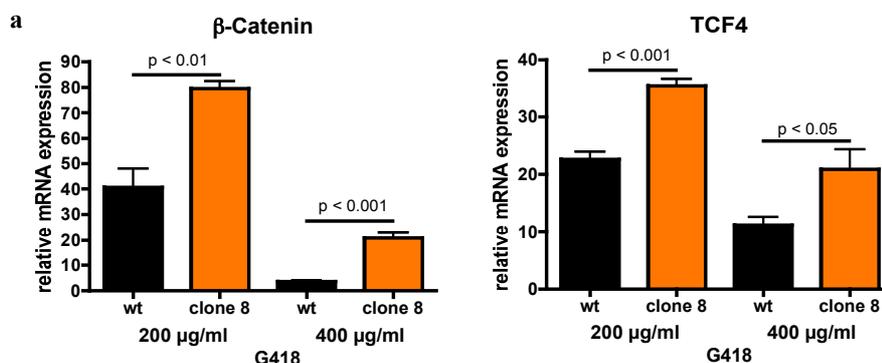


Abb. 34: qRT-PCR Analyse und Immunofluoreszenzfärbung nach „milder“ G418 Selektion von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 16 d EBs. (a) Sowohl β -Catenin als auch sein Zielgen TCF 4 zeigen in 16 d EBs weiterhin eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in Klon 8 im Vergleich zu wt-EBs. (b) Die frühen kardialen Marker Nkx2.5 und Igfbp5 zeigen auch in 16 d EBs weiterhin eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in Klon 8 im Vergleich zu wt-EBs. (c) Die signifikant verminderte mRNA-Expression des kardialen Markers cTnT geht einher mit den Ergebnissen der IF, die eine geringere cTnT-Expression in Klon 8-EBs im Vergleich zu wt-EBs zeigen (d).

Da auch nach G418-Selektion der Anteil an Nicht-Kardiomyozyten relativ hoch war, wurde die G418-Selektion mit einer erhöhten Konzentration von 400 μ g/ml wiederholt. Dies führte bei der Untersuchung von β -Catenin und seinem Zielgen TCF4 zu einer Gesamt-Verminderung gegenüber der milderen Selektion mit 200 μ g/ml, jedoch war β -Catenin und sein Zielgen TCF4 im Klon 8 gegenüber den wt-EBs weiterhin signifikant vermehrt exprimiert (**Abb. 35a**). Speziell beim frühen kardialen Marker ehand(1) zeigt sich die bessere Selektion durch die höhere G418-Konzentration. Die Expression von ehand(1) nimmt in den wt-EBs signifikant ab, was eine selektive Verminderung der noch nicht voll-ausdifferenzierten Zellen zur Folge hat (**Abb. 35b**). Gleichzeitig nimmt die Expression in Klon 8-EBs signifikant zu (**Abb. 35c**). Die Expression des kardialen Markers cTnT ist in den stärker selektionierten Klon 8-EBs deutlich erhöht gegenüber der milderen Selektion, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Selektion mit 400 μ g/ml G418 effektiver ist.



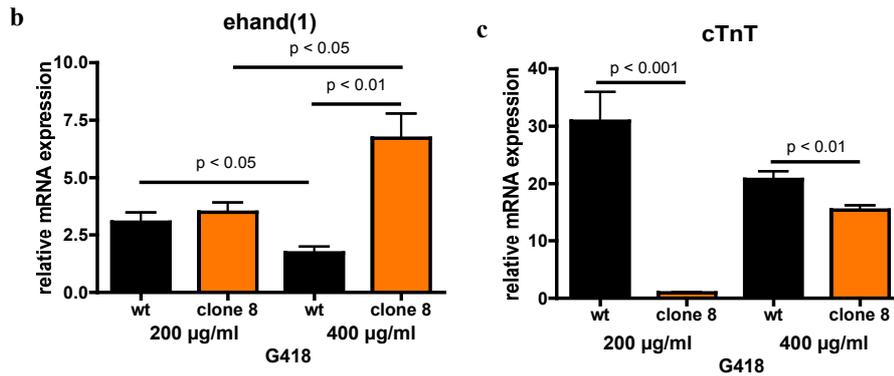
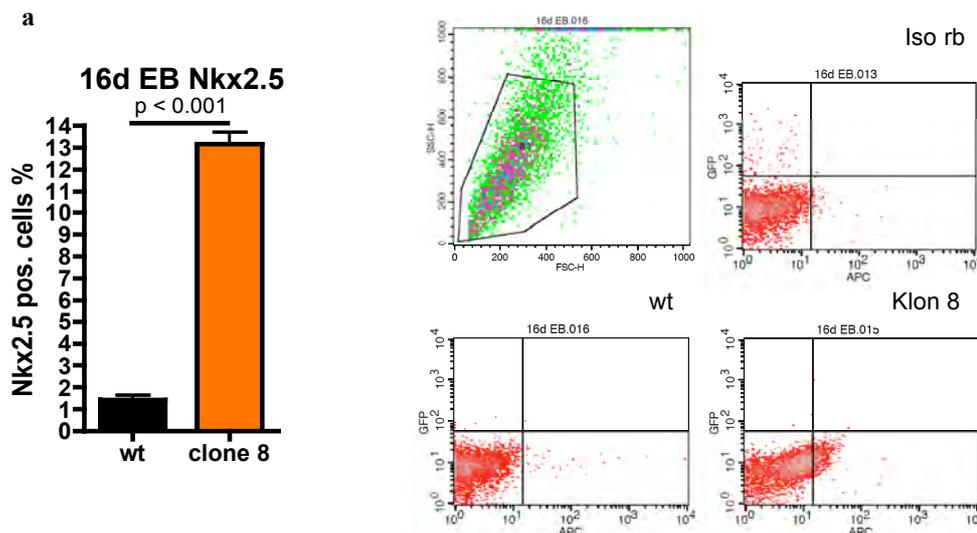


Abb. 35: qRT-PCR Vergleich nach „milder“ (200 µg/ml) und „stärker“ (400 µg/ml) G418 Selektion von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 16 d EBs. (a) Die mRNA-Expression von β -Catenin und seinem Zielgen TCF4 ist durch die stärkere Selektion insgesamt vermindert. Dennoch ist die Expression in Folge der FHL2-Überexpression im Klon 8 gegenüber den wt-EBs weiterhin signifikant erhöht. (b) Die Untersuchung der mRNA-Expression des frühen kardialen Markers ehand(1) zeigte unter „milder“ Selektion keinen signifikanten Unterschied. Die „stärkere“ G418-Selektion führt jedoch zu einem signifikanten Unterschied zwischen Klon8- und wt-EBs. (c) Die stärkere Selektion führt zur verminderten cTnT-Expression in wt-EBs und zu einem Anstieg der mRNA-Expression in Klon 8, wodurch die Effektivität der erhöhten G418-Selektion untermauert wird. Insgesamt ist jedoch die cTnT-Expression in Klon 8-EBs auch unter starker Selektion signifikant vermindert gegenüber den wt-EBs.

Zur Bestätigung der qRT-PCR Ergebnisse wurde für den frühen kardialen Marker Nkx2.5 (Abb. 36a) und den kardial-spezifischen Marker sarcomeres Aktinin (sc. actinin) (Abb. 36b) zusätzlich eine FACS-Analyse in 16 d EB nach starker G418 Selektion durchgeführt. Dabei konnten in Klon 8-EBs mehr Nkx2.5 exprimierende Zellen nachgewiesen werden als in den wt-EBs. Dieses Ergebnis geht einher mit der verminderten Anzahl an sc. actinin / GFP positiven Zellen in Klon 8-EBs gegenüber den wt-EBs.



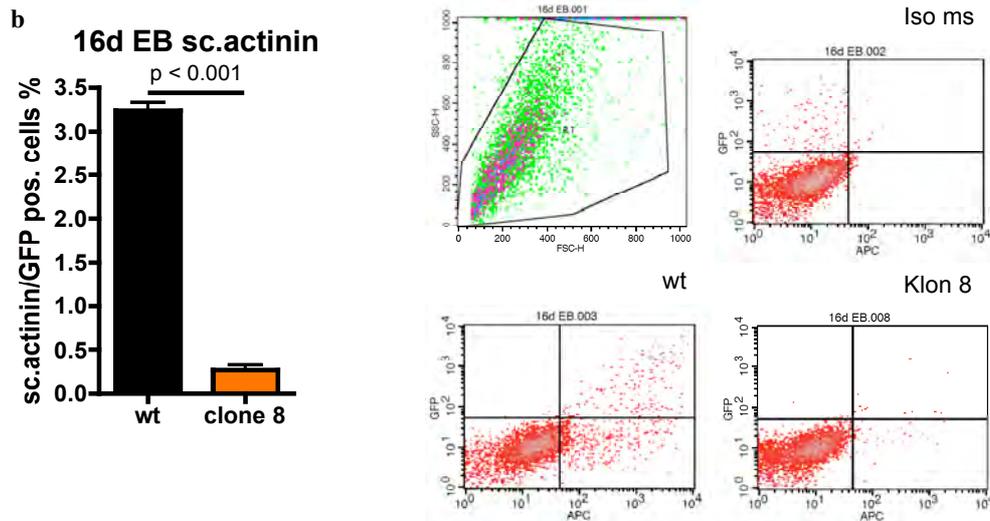
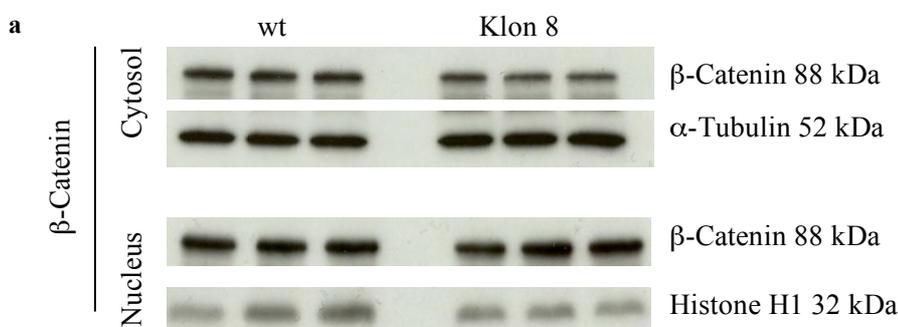


Abb. 36: FACS Analyse nach „starker“ G418 Selektion von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 16 d EBs. (a) Die FACS-Analyse für den frühen kardialen Marker Nkx2.5 zeigt eine signifikant erhöhte Expression in Klon 8 abgeleiteten EBs im Vergleich zu wt-EBs. (b) Die Ergebnisse der FACS-Analyse des kardialen Markers sarcomeres Aktinin (sc. actinin) bestätigen zudem die beobachtete verringerte Differenzierung in Klon 8-EBs. Hier ist eine deutlich verminderte Anzahl an sc. actinin /GFP positiven Zellen in Klon 8 erkennbar.

4.3.4. Einfluss von FHL2 auf die β -Catenin Regulation während der kardialen *in vitro* Differenzierung

Um zu überprüfen, ob FHL2 - ähnlich wie im P19 *in vitro* Assay - auch bei der *in vitro* Differenzierung von mESCs eine regulatorische Wirkung auf das Protein-Level von β -Catenin hat, wurden aus 16 d EBs fraktionierte Protein-Lysate hergestellt. Die Protein-Analyse für β -Catenin (Abb. 37a) und FHL2 (Abb. 37b) wurde in Triplikaten für die cytosolischen und nukleären Fraktionen durchgeführt und anschließend densitometrisch ausgewertet (Abb. 37c). β -Catenin zeigt in 16 d EBs eine signifikante Abnahme im Cytosol bei gleichzeitiger Zunahme im Nucleus. Einhergehend mit diesen Beobachtungen zeigt FHL2 eine signifikant erhöhte Protein-Expression in der cytosolischen und nukleären Fraktion.



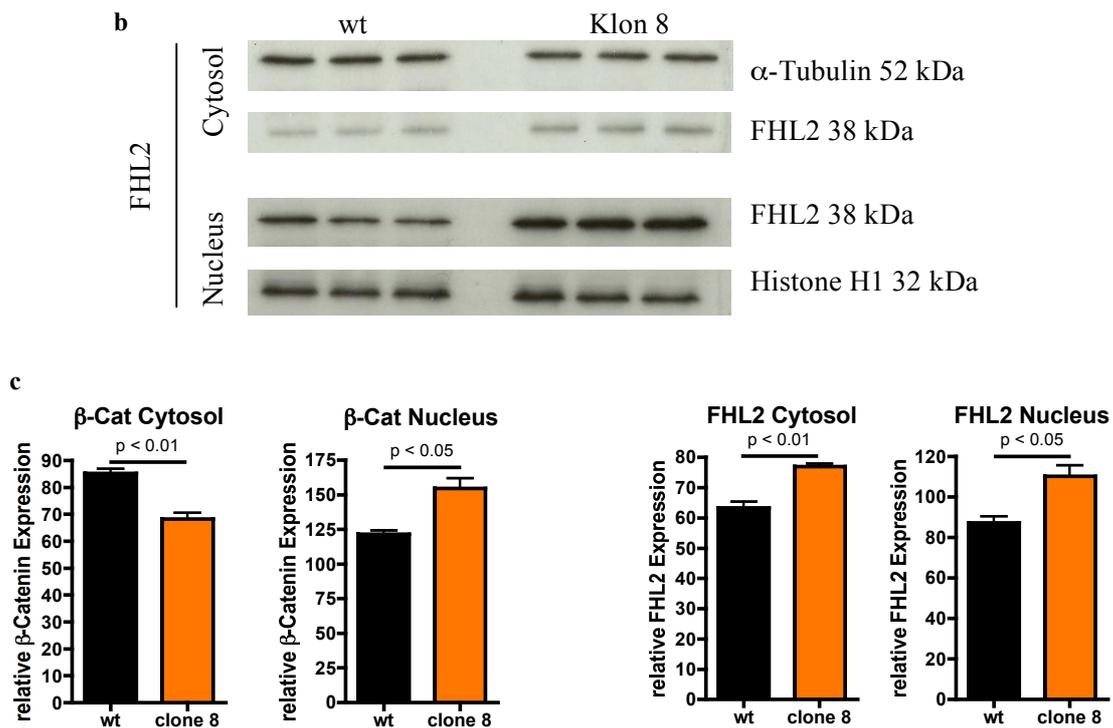


Abb. 37: Densitometrische Auswertung der Protein-Expression in cytosolischen und nukleären Fraktionen in 16 d EBs für β -Catenin und FHL2. (a) Die Protein-Expression von β -Catenin nimmt gegenüber den wt-Lysaten in 16 d EBs in der cytosolischen Fraktion der Klon 8-EB Lysate signifikant ab. In den nukleären Fraktionen hingegen ist eine signifikante Zunahme von β -Catenin in den Klon 8-Lysaten erkennbar. (b) FHL2 ist im Cytosol der Klon 8-Lysate gegenüber den wt-Lysaten signifikant vermehrt exprimiert. Ebenso ist in den nukleären Fraktionen eine deutliche Erhöhung der FHL2 Expression gegenüber den wt-Lysaten erkennbar. (c) Die Auswertung erfolgte in Triplikaten und wurde densitometrisch ausgewertet.

4.3.5. Einfluss von FHL2 auf andere entwicklungsrelevante Zelltypen

Um zu überprüfen, ob die FHL2 Überexpression von Klon 8 auch Einfluss auf andere Zelltypen hat, wurde eine qRT-PCR-Analyse zu Beginn der Differenzierung in 3 d (**Abb. 38a**) und 7 d (**Abb. 38b**) EBs für die Marker des Neuroderms (NCAM1) und des Mesoderms (Brachyury, Mesp1) durchgeführt. Die erhöhte Expression von Brachyury und Mesp1 im Gegensatz zur unveränderten Expression von NCAM1 hat gezeigt, dass eine FHL2-Überexpression die Spezifikation der mesodermalen Zell-Linie zum Differenzierungszeitpunkt 3 d EB fördert. Gleichzeitig kann durch die verminderte Expression von CD31 gezeigt werden, dass die Entwicklung in endodermale Zellen gehemmt ist. Zum Differenzierungszeitpunkt 7 d EB nimmt sowohl der neuronale Marker NCAM1, als auch Brachyury und Mesp1 signifikant ab. Parallel dazu konnte bereits zum gleichen Zeitpunkt die signifikante Zunahme der mRNA-Expression von frühen kardialen Markern gezeigt werden (**Abb. 32**)

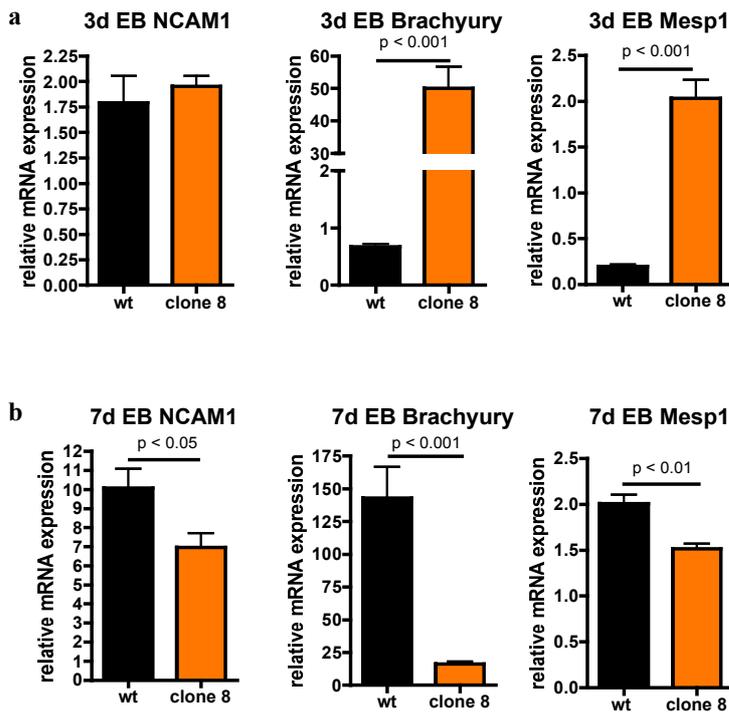
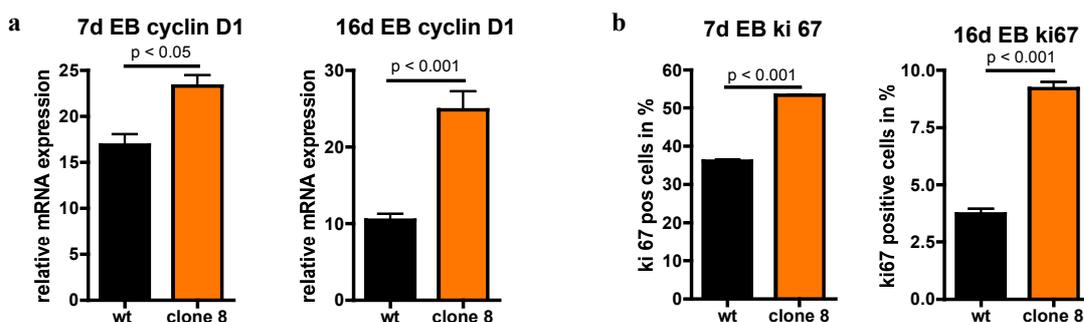


Abb. 38: qRT-PCR Analyse zu Beginn der Differenzierung von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten 3 d (a) und 7 d EBs (b). Der endodermale Marker CD31 zeigt in 3 d EBs einen signifikanten Unterschied zwischen wt-EBs und Klon 8-EBs, wohingegen in 7 d EBs kein signifikanter Unterschied mehr besteht. Beim neuronalen Marker NCAM1 verhält es sich genau anders herum. In 3 d EBs ist kein Unterschied erkennbar, jedoch zeigt sich in 7 d EBs eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in Klon8-EBs. Der mesodermale Marker Brachyury zeigt in 3 d EBs genauso wie der durch ihn induzierte Marker Mesp1 eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in Klon 8-EBs im Vergleich zu wt-EBs. Beide Gene zeigen in 7 d EBs die auch entwicklungsbiologisch vorkommende Abnahme der mRNA Expression, die in Klon8-EBs zusätzlich signifikant vermindert gegenüber den wt-EBs vorliegt.

4.3.6. Einfluss von FHL2 auf die Proliferation

Da FHL2 auch in Verbindung steht die Proliferation über die Regulation von Cyclin D1 zu beeinflussen wurden die wt und Klon 8 abgeleiteten EBs mit Hilfe der qRT-PCR und FACS Analyse für Proliferationsmarker untersucht. Sowohl in 7 d als auch 16 d EBs konnte Cyclin D1 signifikant vermehrt im Klon 8 nachgewiesen werden (**Abb. 39a**). Diese Daten werden durch die FACS-Analyse von 7 d und 16 d EBs für ki67 zusätzlich bestätigt (**Abb. 39b**). Auch hier zeigt sich eine signifikant erhöhte Proliferation in Klon 8-EBs. Die kaum detektierbare GFP-Expression ist auf das hier verwendete FACS-Protokoll zurückzuführen. Dabei wurden die Zellen mit Ethanol fixiert, das bekanntlich zum Quenchen des Fluoreszenzsignals der GFP-Expression führt. Da der Antikörper jedoch unter PFA-Fixierung nur unzureichend funktioniert und die GFP-Expression bei anderen Genen ausreichend detektiert werden konnte, wurde für ki67 vom Standard-Protokoll abgewichen.



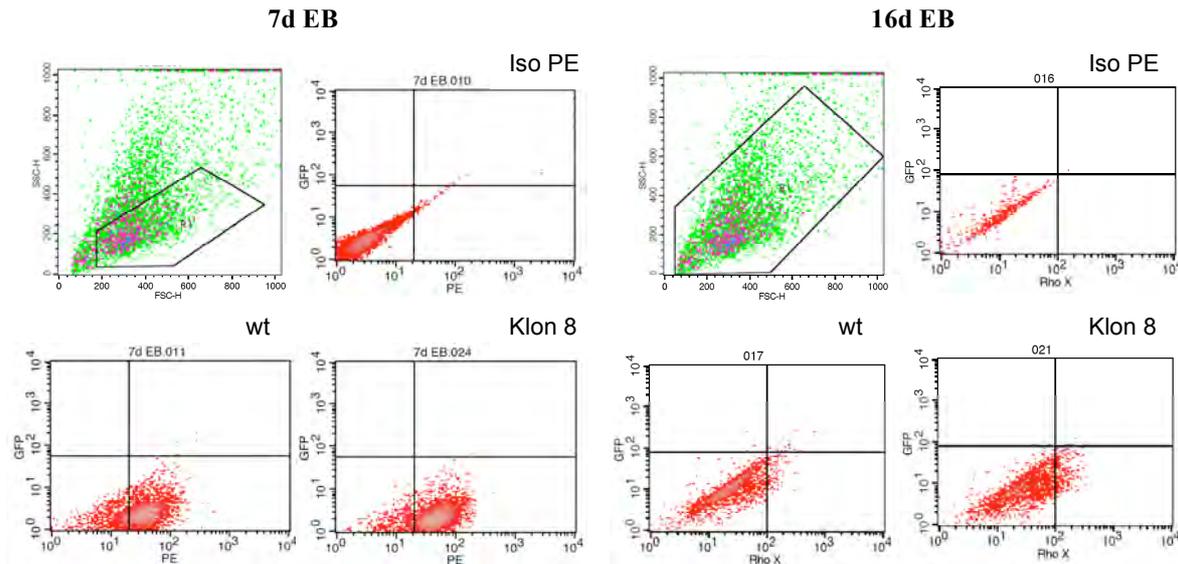
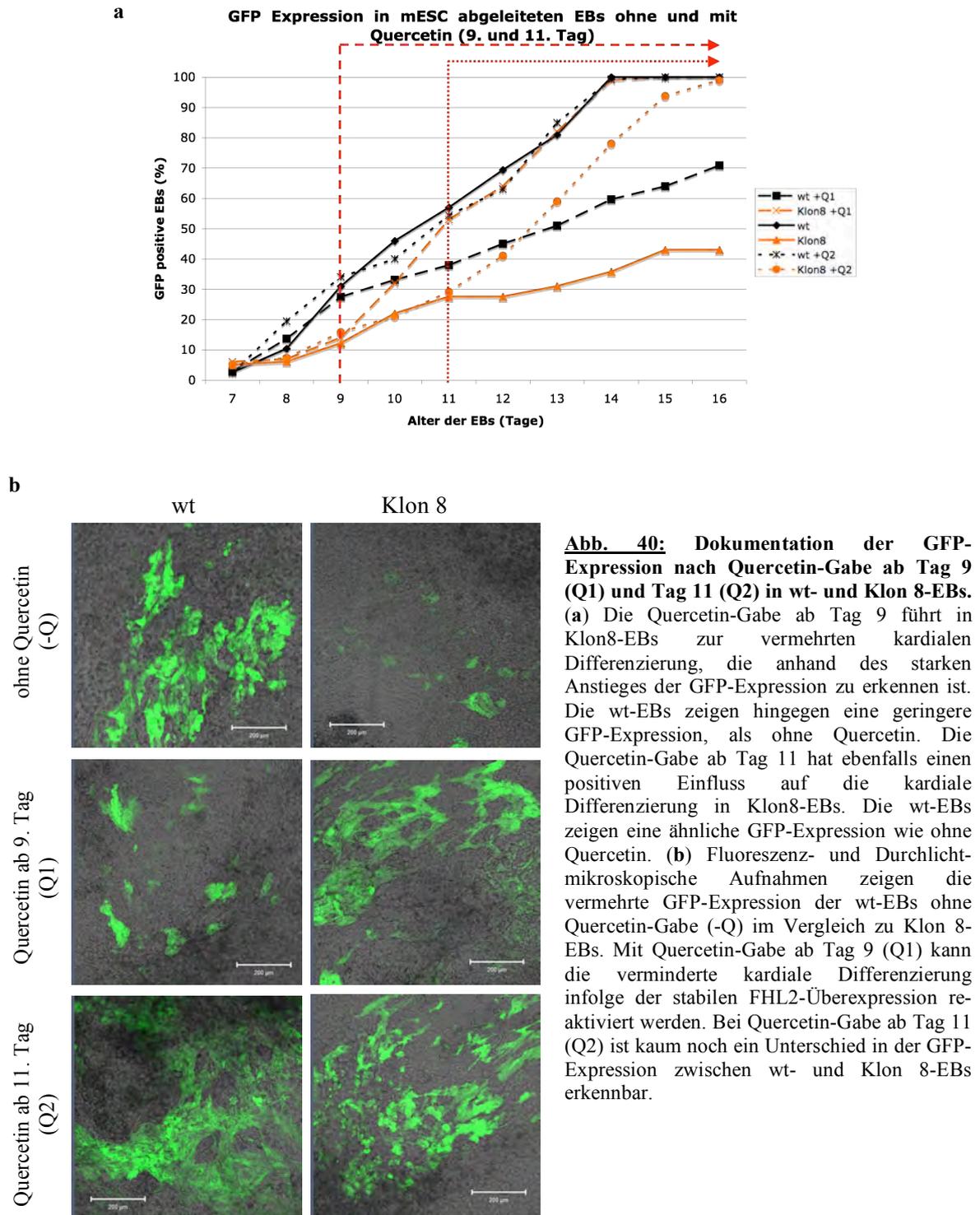


Abb. 39: qRT-PCR und FACS Analyse zur Untersuchung des Einfluss von FHL2 auf die Proliferation zu Beginn (7 d) und am Ende der Differenzierung (16 d) von wt mESC und Klon 8 abgeleiteten EBs. (a) qRT-PCR Analyse für Cyclin D1 in 7 d und 16 d EB zeigt durch stabile FHL2 Überexpression eine signifikant vermehrte mRNA-Expression in Klon 8. (b) Die FACS-Analyse für den Proliferationsmarker ki67 zeigt ebenfalls sowohl in 7 d als auch 16 d EB eine signifikant erhöhte Population an ki67-positiven Zellen in Klon 8-abgeleiteten EBs im Vergleich zu wt-EBs.

4.3.7. Zusammenhang zwischen der verminderten Differenzierung nach stabiler FHL2-Überexpression in Klon 8 und der β -Catenin Expression

Die gewonnenen Daten aus dem mESC *in vitro* Assay deuten darauf hin, dass die Inhibition der Differenzierung in Folge einer FHL2-Überexpression durch die damit verbundene hohe Expression von β -Catenin erfolgt. Um das zu überprüfen, wurde das *in vitro* Assay wiederholt und Quercetin in der zuvor titrierten Konzentration von 5 μ M zu verschiedenen Zeitpunkten zum Medium gegeben. Das vorwiegend in Traubenschalen vorkommende Flavonoid Quercetin hat die nachgewiesene Wirkung die β -Catenin abhängige Transkription im Nukleus zu inhibieren ohne die Expression von β -catenin selbst zu beeinflussen. Es sollte getestet werden, ob die Inhibition der Differenzierung nach stabiler FHL2 Überexpression in Klon 8 durch die erhöhte β -Catenin Expression und der daraus resultierenden erhöhten β -Catenin abhängigen Transkription hervorgerufen wird. Zum Zeitpunkt 9 d EB und 11 d EB wurde Quercetin zum entsprechenden Medium zugegeben. Anhand der GFP-Expression wurden die Unterschiede bei der Behandlung mit bzw. ohne Quercetin unter verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert. Durch die Dokumentation (Abb. 40a) des Zeitpunkts und des prozentualen Anteils von GFP-positiven EBs konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von Quercetin ab Tag 9 der Differenzierung (Q1) ein deutlicher Anstieg in der GFP-Expression von Klon 8 zu verzeichnen ist, der zwischen Tag 11 und 14 sogar größer ist als in den wt-EBs ohne Quercetin. Dem gegenüber steht die inhibitorische Wirkung von Quercetin auf die GFP-Expression der wt-EBs. Sie zeigen eine verminderte GFP-Expression im Gegensatz zu wt-EBs ohne Quercetin. Erfolgt die Quercetin-Gabe ab dem 11. Tag der Differenzierung (Q2) konnte in den Klon 8-EBs ebenfalls ein starker Anstieg der GFP-Expression beobachtet werden, was sich jedoch kaum von der GFP-Expression mit Quercetin-

Gabe ab dem 9. Tag der Differenzierung unterscheidet. Darüber hinaus konnte in den wt-EBs eine ähnliche GFP-Expression wie in den wt-EBs ohne Quercetin-Gabe gezeigt werden. Zur besseren Veranschaulichung wurden zusätzlich fluoreszenz- und durchlicht-mikroskopische Aufnahmen der wt- und Klon8-EBs unter GFP-Expression gemacht (Abb. 40b).



Einher gehend mit den Beobachtungen der GFP-Expression als Marker der kardialen Differenzierung unter Quercetin-Gabe sind die Ergebnisse der FACS-Analyse für den kardialen Marker sc. actinin ohne Quercetin (**Abb. 41a**) und mit Quercetin-Gabe ab dem 9. Tag des Differenzierungsassays (**Abb. 41b**). So konnte die verminderte Population an sc. actinin positiven Zellen unter Normalbedingungen durch die Quercetin-Gabe ab dem 9. Tag in den Klon 8-EBs signifikant erhöht werden. Die auch schon bei der GFP-Expression beobachtete leicht verminderte Differenzierung in wt-EBs bei Quercetin-Gabe ab dem 9. Tag wird durch eine verringerte sc. actinin positiven Zell-Population bestätigt. Bei Quercetin-Gabe ab dem 9. Tag kommt es somit zu einer signifikant erhöhten sc. actinin positiven Zell-Population in Klon 8-EBs im Vergleich zu wt-EBs. Für die wt-EBs ist eine Quercetin-Gabe ab dem 11. Tag effektiver. So wird unter diesen Bedingungen fast die gleiche Anzahl an sc. actinin positiven Zellen erreicht, wie ohne Quercetin-Gabe. Es besteht darüber hinaus bei Quercetin-Gabe ab dem 11. Tag kein signifikanter Unterschied zwischen wt- und Klon 8-EBs. Das Vorhandensein einer weiter fortgeschrittenen kardialen Progenitorzell-Population in Folge der FHL2-Überexpression zeigt sich somit hauptsächlich bei Quercetin-Gabe ab dem 9. Tag des Differenzierungsassays.

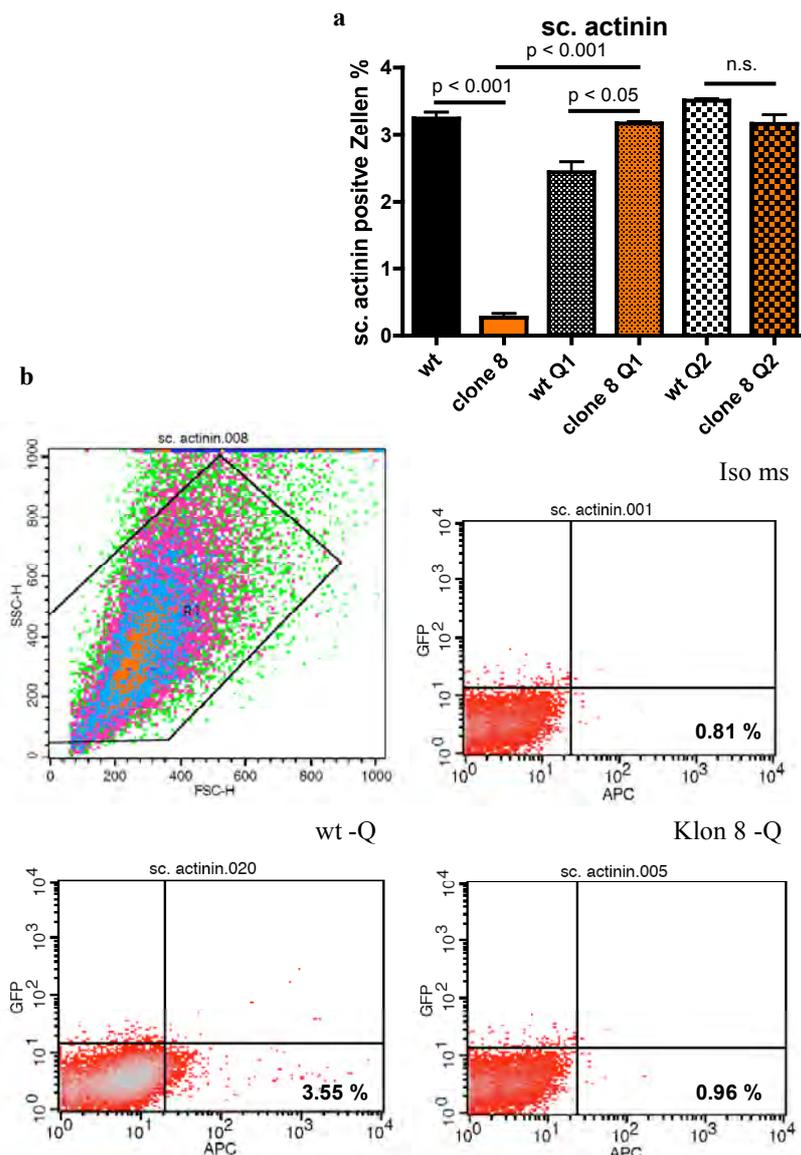
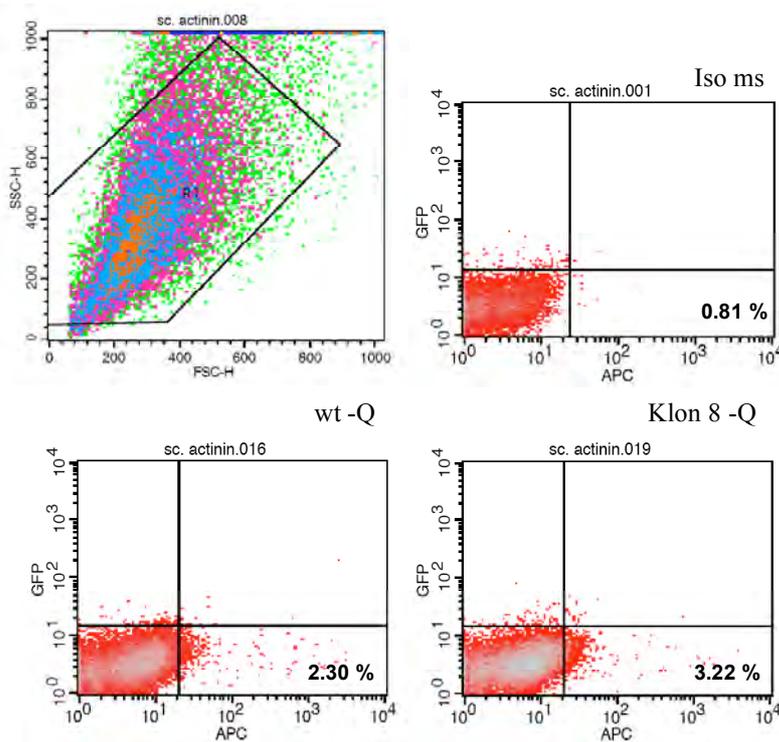


Abb. 41: FACS-Analyse nach Quercetin-Gabe ab Tag 9 (Q1) und Tag 11 (Q2) in wt- und Klon 8-EBs. (a) Auswertung der FACS-Analyse für den kardialen Marker sc. actinin unter normalen Bedingungen und nach Quercetin. Bereits bei Quercetin-Gabe ab Tag 9 zeigt sich eine Re-Aktivierung der inhibierten kardialen Differenzierung unter FHL2-Überexpression anhand einer signifikant erhöhten sc. actinin positiven Zell-Population im Vergleich zur Normalbedingung (-Q). (b) Die FACS-Analyse wurde jeweils in Triplikaten durchgeführt und die hier aufgeführten Abbildungen dienen als Beispiel für normale Bedingung ohne Quercetin (-Q) und ab 9. Tag Quercetin-Gabe (Q1).



Somit scheint die hohe Expression von β -Catenin und der daraus resultierenden erhöhten Transkriptionsaktivität zur Inhibition der Differenzierung zu führen. Die Quercetin-Gabe ab dem 9. Tag beeinflusst nur die β -Catenin abhängige Transkription, was durch die signifikante Verminderung der TCF4-Expression mittels qRT-PCR gezeigt werden konnte (Abb. 42a). Die β -Catenin mRNA-Expression hingegen bleibt nahezu unverändert (Abb. 42b). Des Weiteren konnte sowohl Nkx2.5, als auch Igfbp5 nach Quercetin-Gabe ab Tag 9 signifikant vermindert gezeigt werden (Abb. 42c).

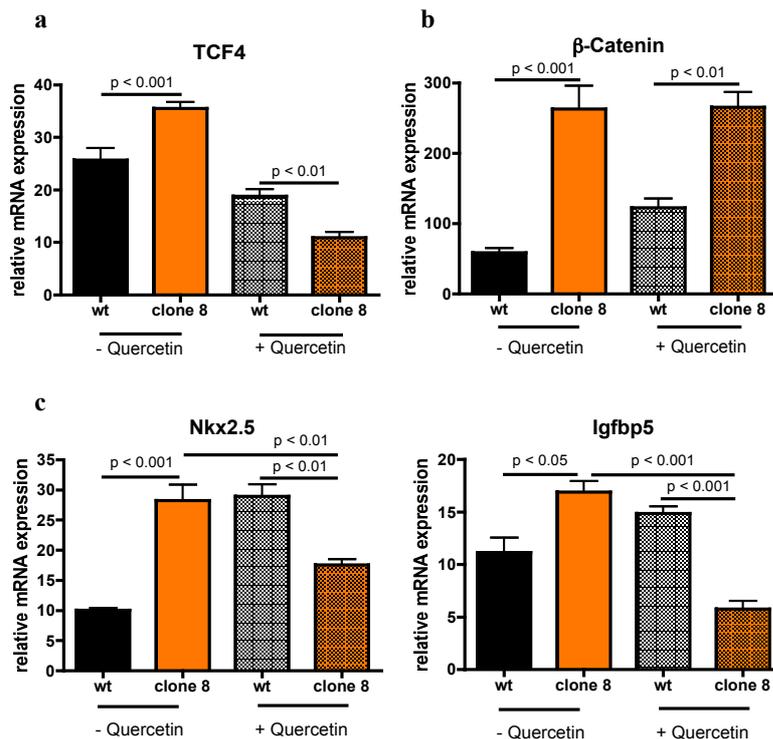


Abb. 42: Inhibition der β -Catenin abhängigen Transkription durch Quercetin-Gabe ab dem 9. Tag des Differenzierungsassays. (a) Die inhibitorische Wirkung von Quercetin auf die β -Catenin abhängige Transkription konnte durch qRT-PCR von TCF4 gezeigt werden. (b) β -Catenin selbst wird durch Quercetin nicht beeinflusst, wodurch die mRNA-Expression keinen Unterschied bei der Quercetin-Behandlung zeigt. (c) Die vermehrte GFP-Expression, sowie die erhöhte Anzahl an sc. actinin-positiven Zellen in den Klon 8-EBs nach Quercetin-Gabe, wird durch den signifikanten Anstieg der mRNA-Expression des kardialen Markers cTnT bestätigt. (d) Darüber hinaus konnte sowohl der frühe kardiale Marker Nkx2.5, als auch Igfbp5 in Klon 8-EBs nach Quercetin-Gabe signifikant vermindert im Vergleich zum Versuch ohne Quercetin gezeigt werden.

4.4. Einfluss von Tbx5 auf die kardiale Differenzierung *in vitro* und *in vivo*4.4.1. Tbx5-Regulation durch FHL2-Überexpression *in vitro*

Wie bereits einleitend erwähnt, ist die Tbx5-Expression während der frühen Embryogenese essentiell für die kardiale Entwicklung. In diesem Zusammenhang konnten bei der qRT-PCR Analyse von 7 d und 16 d EBs für Tbx5 und sein Zielgen ANP ein direkter regulatorischer Zusammenhang zur FHL2-Überexpression in mES-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 43**).

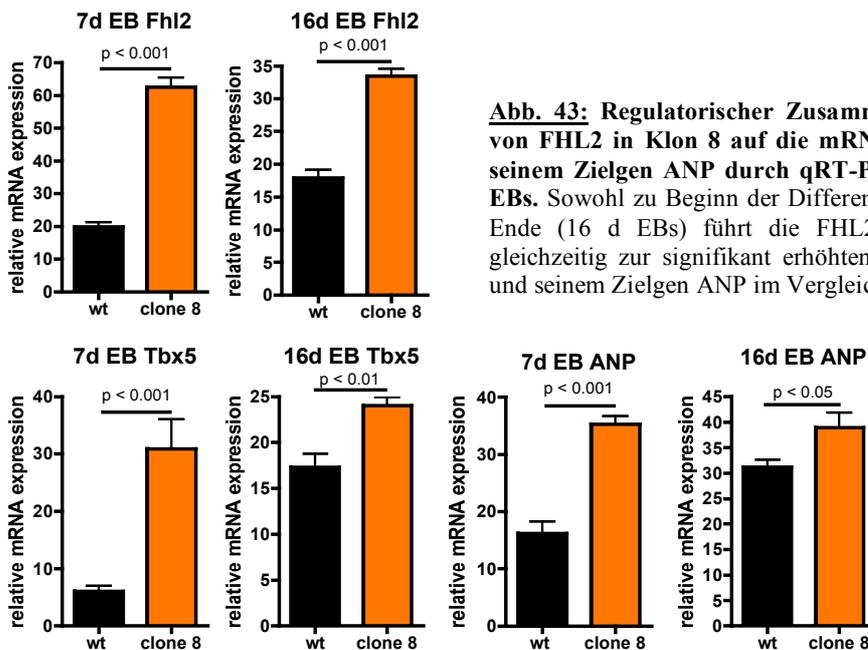


Abb. 43: Regulatorischer Zusammenhang der Überexpression von FHL2 in Klon 8 auf die mRNA-Expression von Tbx5 und seinem Zielgen ANP durch qRT-PCR Analyse in 7 d und 16 d EBs. Sowohl zu Beginn der Differenzierung (7 d EBs) als auch am Ende (16 d EBs) führt die FHL2 Überexpression im Klon 8 gleichzeitig zur signifikant erhöhten mRNA-Expression von Tbx5 und seinem Zielgen ANP im Vergleich zu wt-EBs.

Zur Untersuchung einer möglichen Protein-Interaktion zwischen FHL2 und Tbx5 wurde nach Co-Transfektion des FHL2-Expressionsplasmids mit einem Tbx5-Expressionsplasmid in P19-Zellen eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) durchgeführt. Bei der Co-IP wurde mit einem c-myc Antikörper FHL2 präzipitiert. Im anschließenden Immunoblot konnte Tbx5 eindeutig detektiert werden (**Abb. 44a**). Als Kontrolle diente ein Leervektor-transfiziertes P19-Zell-Lysat. Zuvor wurde in den Lysaten die Proteinexpression von Tbx5 und Fhl2 über die entsprechenden tag-Antikörper nachgewiesen. Als interne Kontrolle diente dabei Gapdh. Um herauszufinden in welchem zellulären Kompartiment die Interaktion zwischen FHL2 und Tbx5 stattfindet, wurde eine Co-Lokalisation mittels Immunofluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Analyse zeigt eine eindeutige Co-Expression von Tbx5 und Fhl2 im Nucleus (**Abb. 44b**).

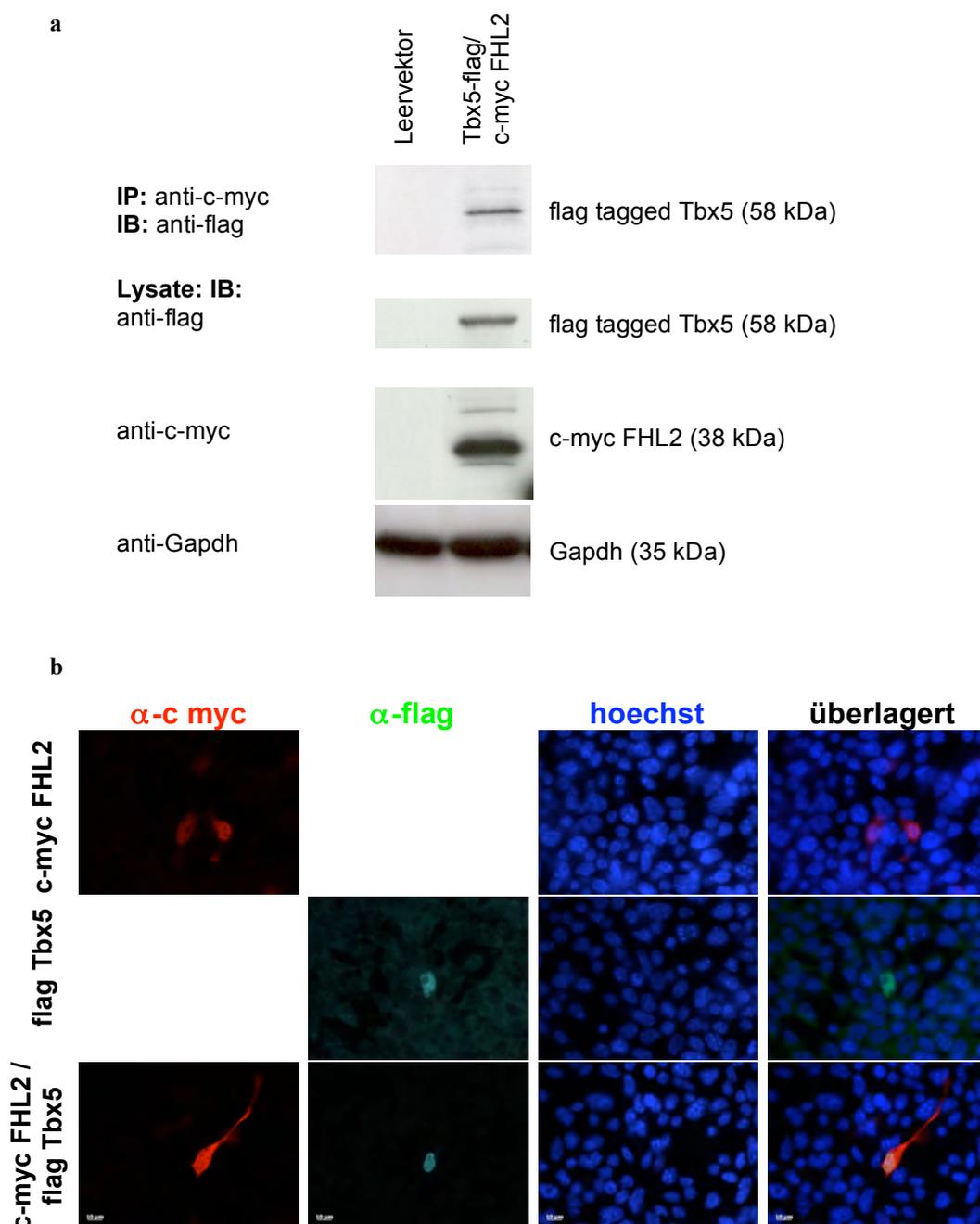


Abb. 44: Nachweis der Protein-Interaktion zwischen FHL2 und Tbx5 mittels Co-Immunopräzipitation (Co-IP) und Immunofluoreszenzfärbung nach Co-Transfektion.

(a) Dazu wurden P19-Zellen mit einem c-myc FHL2 und einem Tbx5-flag Expressionsplasmid co-transfiziert. Als Kontrolle wurden beide Leervektoren co-transfiziert. Die IP erfolgte mit einem c-myc Antikörper, wodurch FHL2 präzipitiert werden konnte. Im anschließenden Immunoblot konnte Tbx5 mit Hilfe eines flag-Antikörpers eindeutig identifiziert und somit seine Interaktion mit FHL2 nachgewiesen werden. In den Proteinlysaten konnte sowohl das FHL2, als auch Tbx5 mit den entsprechenden tag-Antikörpern detektiert werden. Als Ladekontrolle wurde in beiden Lysaten Gapdh verwendet. (b) In weiteren Ansätzen wurde zusätzlich zur Co-Transfektion das c-myc FHL2 und das Tbx5-flag Expressionsplasmid einzeln transfiziert. Die Immunofluoreszenzfärbung mit einem c-myc Antikörper für FHL2 und einem flag-Antikörper für Tbx5 zeigen eine nukleäre Expression der Einzeltransfektionen. Zur Anfärbung des Nucleus wurde hoechst verwendet. In der co-transfizierten Probe ist deutlich die nukleäre Co-Lokalisation von FHL2 und Tbx5 erkennbar.

Um den regulatorischen Einfluss von FHL2 auf die Tbx5 Expression zu untersuchen wurden 48 Stunden nach Transfektion des Tbx5-Expressionsplasmids bzw. der Co-Transfektion mit dem FHL2-Expressionsplasmid die P19-Zellen nach mRNA-Isolation und cDNA Synthese für die qRT-PCR Analyse verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Tbx5-Überexpression bei allen untersuchten Genen (Tbx5, ANP, Fhl2 und Igfbp5) zur signifikant erhöhten mRNA-Expression führte (**Abb. 45**). Als Kontrolle dienten dabei Leervektor-transfizierte Zellen (CTL). Die Co-Transfektion von Tbx5 mit FHL2 hatte lediglich bei Tbx5 selbst eine signifikant verringerte mRNA-Expression zur Folge, die jedoch immer noch signifikant höher war als bei den CTL-Zellen. Bei den anderen untersuchten Genen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den FHL2/Tbx5 co-transfizierten und den Tbx5-transfizierten Zellen nachweisbar.

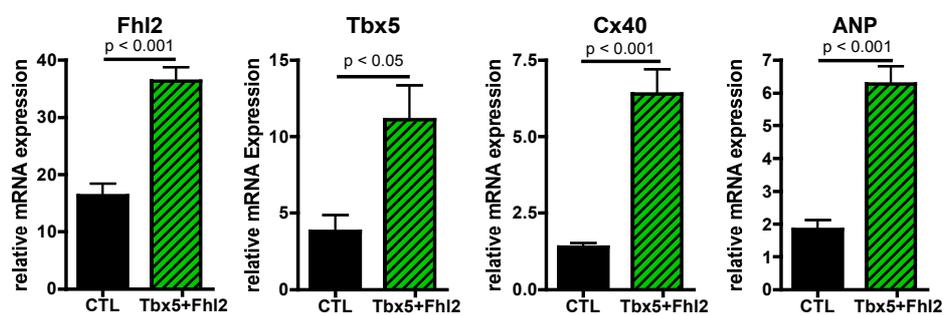


Abb. 45: qRT-PCR Analyse 48 h nach Transfektion eines Tbx5-Expressionsplasmids und Co-Transfektion mit einem FHL2-Expressionsplasmid in P19-Zellen. Die Tbx5 Überexpression führt sowohl bei Tbx5, als auch seinem Zielgen ANP zur signifikant erhöhten mRNA-Expression im Vergleich zur Leervektor-transfizierten Kontrolle (CTL). FHL2 und Igfbp5 zeigen ebenfalls signifikant hochregulierte mRNA-Expression im Vergleich zur CTL. Die Co-Transfektion von Tbx5 und FHL2 hat lediglich bei Tbx5 selbst eine signifikante Verminderung der mRNA-Expression im Vergleich zu Tbx5-transfizierten Zellen zur Folge. Jedoch liegt die Tbx5-Expression insgesamt signifikant erhöht gegenüber den CTL-Zellen vor. Das Tbx5 Zielgen ANP, sowie auch Fhl2 und Igfbp5 zeigen nicht signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression im Vergleich zu Tbx5-transfizierten Zellen.

Zur Untersuchung, ob FHL2 in der Lage ist den Tbx5-Promotor zu aktivieren und somit die Tbx5-Proteinexpression zu regulieren, wurde ein Tbx5-Promotor abhängiges Luciferase-Assay durchgeführt. Die zwei Luciferase-Expressionsplasmide beinhalten statt des normalen CMV-Promotors den Tbx5-Minimalpromotor (500 bp) bzw. den Tbx5-Gesamtpromotor (1000 bp) (siehe Vektoren; Anhang), sodass die Luciferase-Expression abhängig von der Aktivierung des entsprechenden Tbx5-Promotors ist. Da Tbx5 selbst in der Lage ist, seinen Promotor zu aktivieren, musste gewährleistet werden, dass die Promotor-Aktivierung nicht behindert wird. Daher wurde das Assay in HEK293 Zellen durchgeführt, die über keine endogene Tbx5-Expression verfügen. Es konnte gezeigt werden, dass FHL2 in der Lage ist den Tbx5-Promotor zu aktivieren (**Abb. 46**). Wie erwartet, zeigt sich eine effektivere Aktivierung des Tbx5-Minimalpromotors (500 bp) durch FHL2. Retinolsäure verfügt ebenfalls über die Möglichkeit den Tbx5-Promotor zu aktivieren und wurde in diesem Assay als Positiv-Kontrolle verwendet und die daraus resultierende relative Luciferase Aktivität als 100 % gesetzt. Als interner Abgleich wurde zu jedem Ansatz zusätzlich ein Renilla-exprimierendes Plasmid co-transfiziert.

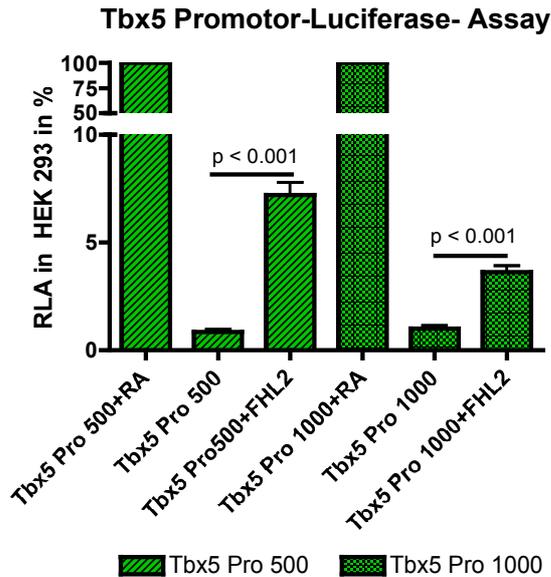
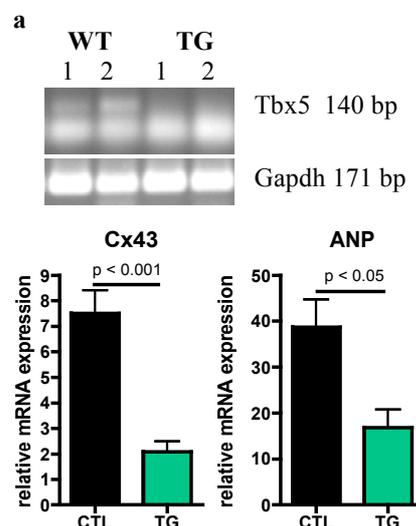


Abb. 46: Luciferase-Tbx5-Promotor-Assay. Die Luciferase-Expression der verwendeten Plasmide läuft unter dem Tbx5-Minimalpromotor (500 bp) und dem Tbx5-Gesamtpromotor (1000 bp). Als Positiv-Kontrolle wurde Retinolsäure verwendet, die den Tbx5-Promotor aktivieren kann. Die daraus resultierende relative Luciferase-Aktivität wurde 100 % gesetzt. Es zeigt sich bei beiden Promotor-Konstrukten eine signifikante Erhöhung der relativen Luciferase-Aktivität bei Co-Transfektion mit FHL2. Dabei scheint der Tbx5-Minimalpromotor effektiver zu sein, als der Tbx5-Gesamtpromotor. Als interner Abgleich wurde zu jedem Ansatz ein Renilla-exprimierendes Plasmid co-transfiziert.

4.4.2. Phänotypisierung einer kardialen Tbx5-Depletion *in vivo* im adulten Maus-Herzen

Um darüber hinaus die Rolle von Tbx5 innerhalb der adulten Progenitorzell-Homöostase zu klären, wurde ein Maus-Modell mit induzierbarer kardialer Tbx5-Depletion (Abb. 15; Methoden 3.6.2.) mittels Echokardiographie, qRT-PCR und FACS analysiert. Durch PCR-Analyse mit spezifischen Primern, die innerhalb des Exon3 binden und der qRT-PCR Analyse der Tbx5 Zielgene Cx43 und ANP konnte die Tbx5-Depletion in den transgenen Tieren (TG) nachgewiesen werden (Abb. 47a). Die qRT-PCR Analyse zur Basal-Charakterisierung der Tbx5-Depletion zeigt hingegen beim Tbx5 Antagonisten Tbx20 eine signifikante Hochregulation in den TG-Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren (CTL) (Abb. 47b). Darüber hinaus konnte die signifikant hochregulierte mRNA-Expression des frühen kardialen Markers Nkx2.5 in TG-Tieren gezeigt werden (Abb. 47c). Die Analyse des ebenfalls früh exprimierten Markers Igfbp5 und Fhl2 ergab hingegen, genauso wie auch für α MHC, eine signifikant verminderte mRNA-Expression in den TG-Tieren gegenüber den CTL-Tieren (Abb. 47d). Keine signifikanten Unterschiede zwischen CTL- und TG-Tieren konnte bei Tbx2, BNP, Cx40, GATA4, dhand(2) und β -MHC nachgewiesen werden.



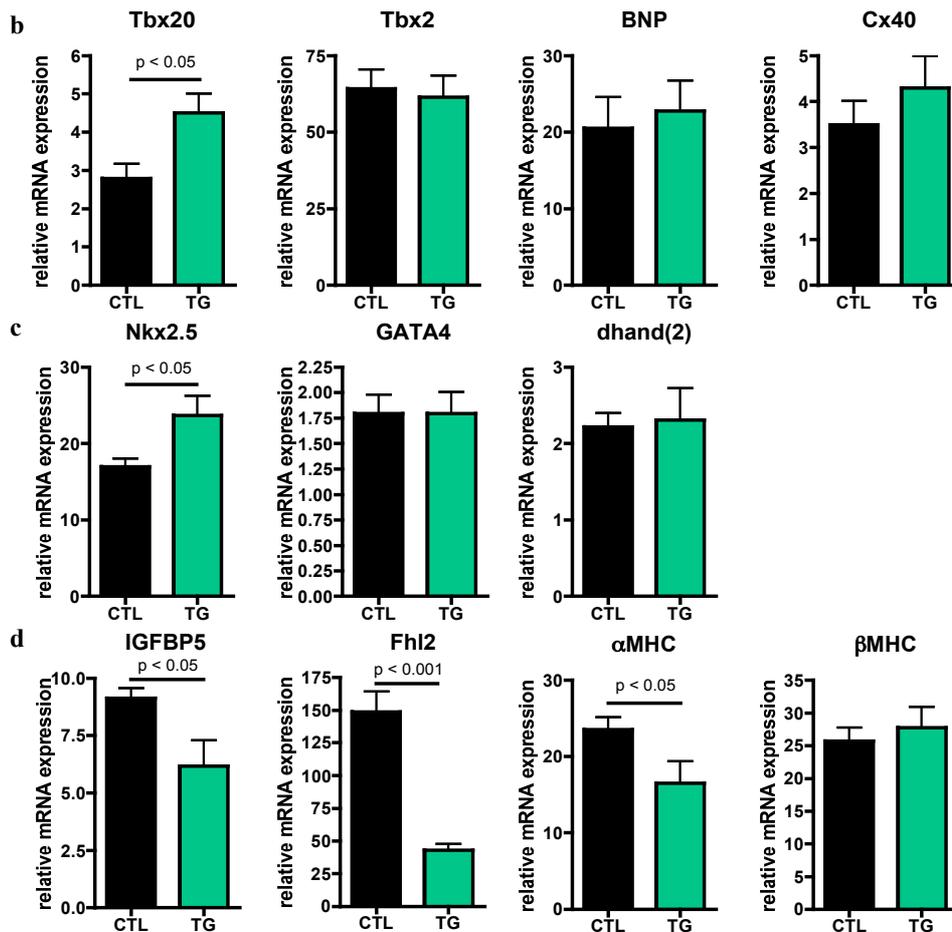


Abb. 47: PCR und qRT-PCR Analyse zur Basal-Charakterisierung eines Tbx5 depletierten Maus-Modells. (a) Die PCR Analyse mit Primern, die innerhalb des Exon3 binden, erzeugt nur bei den TG-Tieren ein PCR-Produkt von 140 bp, wodurch die Tbx5-Depletion in den TG-Tieren nachgewiesen wird. Darüber hinaus zeigt die qRT-PCR Analyse der Tbx5 Zielgene Cx43 und ANP eine signifikante Runterregulation in den induziert Tbx5-depletierten Tieren (TG). (b) Der Tbx5 Antagonist Tbx20 hingegen zeigt eine signifikante Hochregulation in den TG Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (CTL). (c) Die Untersuchung früher kardialer Marker zeigt lediglich bei Nkx2.5 eine signifikant erhöhte mRNA-Expression im Vergleich zu den CTL-Tieren. Bei GATA4 und dhand war hingegen kein Unterschied zwischen TG- und CTL-Tieren erkennbar. (d) Interessanterweise, ist auch bei den Tbx5-depletierten Tieren eine signifikant verminderte Regulation von Igfbp5 und Fhl2 erkennbar. Das mRNA-Level von αMHC war im Gegensatz zu βMHC in den TG Tieren signifikant runterreguliert. Kein signifikanter Unterschied konnte bei der Analyse von Tbx2, BNP, Cx40, GATA4, dhand(2) und β-MHC nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnte mittels Immunfluoreszenz-Färbung von Paraffin-Gewebeschnitten ebenfalls die verminderte kardiale Tbx5-Protein-Expression in den TG-Tieren gezeigt werden (**Abb. 48**).

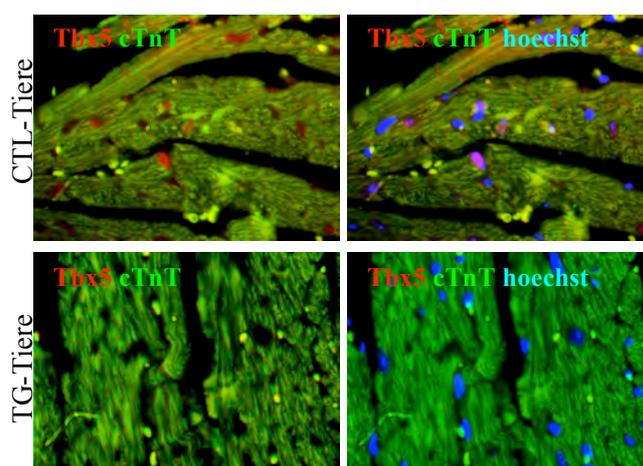


Abb. 48: Immunfluoreszenzfärbung von Paraffin-Gewebeschnitten.

Die Immunfluoreszenzfärbung der Herzgewebeschnitte von CTL- und TG-Tieren zeigt für cTnT (grün) eine gleichmäßige Verteilung im gesamten Schnitt. Die Tbx5-Protein-Expression (rot) war hingegen nur in den CTL-Tieren erkennbar. Aufgrund der induzierten kardialen Tbx5-Depletion konnte im Herzgewebe der TG-Tiere keine Tbx5-Expression nachgewiesen werden. Zur Anfärbung der Nuclei wurde hoechst (blau) verwendet.

Zur Basal-Charakterisierung der Tbx5-depletierten Tiere vor und 14 Tage nach Tamoxifen-Injektion im Vergleich zu entsprechenden CTL-Tieren wurde zunächst die Funktion der Mausherzen *in vivo* durch serielle, echokardiographische Untersuchungen mit einem Echokardiographiegerät Vevo 770 evaluiert. Zur Auswertung wurden echokardiographische Daten des Ventrikeldiameters (IVSd = *intraventricular septum diastolic*; LVPWd = *left ventricular posterior wall diastolic*), der diastolischen Wanddicken des linken Ventrikels (LVd = *left ventricular diastolic*) sowie die globale Pumpfunktion (FS = *fractional shorting*; EF = *ejection fraction*) herangezogen (Abb. 49). Die Auswertung dieser Parameter ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Tbx5-depletierten und entsprechenden Kontrolltieren vor bzw. nach Tamoxifen-Injektion, lediglich das Herz-Körper-Verhältnis nimmt bei den TG-Tieren signifikant ab.

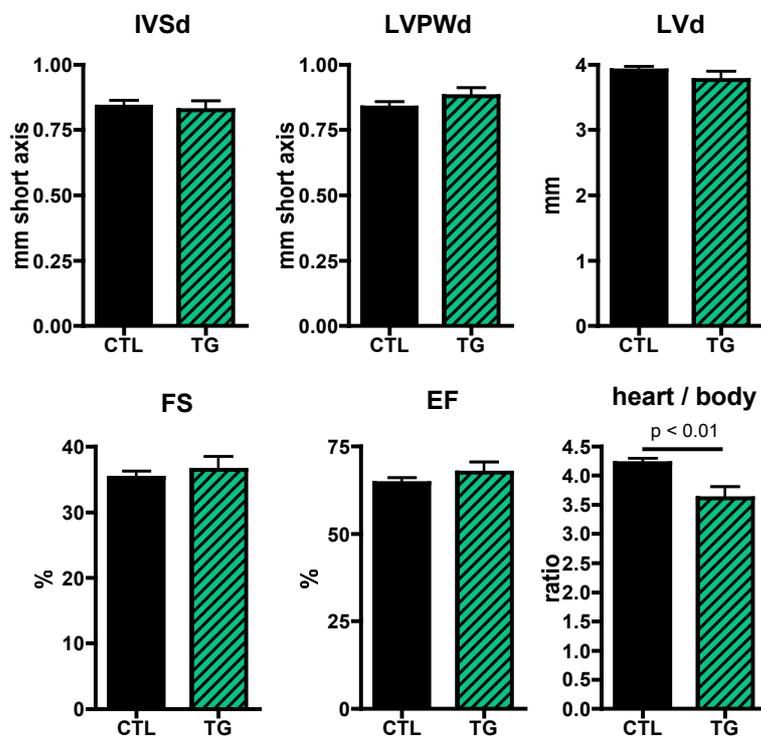


Abb. 49: Echodaten 4 Wochen nach Tamoxifen-Induktion der Tbx5-Depletion. Ausser im Herz-Körpergewicht-Verhältnis konnte durch die Tbx5-Depletion in keinem der untersuchten Werte (Ventrikeldiameter (IVSd = *intraventricular septum diastolic*; LVPWd = *left ventricular posterior wall diastolic*); diastolische Wanddicke des linken Ventrikels (LVd = *left ventricular diastolic*); globale Pumpfunktion (FS = *fractional shorting*; EF = *ejection fraction*)) eine signifikante Veränderung zwischen CTL und TG Tieren festgestellt werden. Jedoch zeigten die TG-Tiere vermehrt starke Herz-Rhythmusstörungen.

Um eine Langzeit-Auswirkung der kardialen Tbx5-Depletion zu untersuchen, wurden 12 Wochen alte Mäuse mit Tamoxifen bzw. Öl injiziert. Die Auswirkungen der Tbx5-Depletion wurden nach einem Zeitraum von 8 Wochen nach Tamoxifen-Injektion mit Echokardiographie und FACS-Analyse untersucht (Abb. 50). Mit Ausnahme des Herz-Körpergewichts zeigt sich auch hier in den restlichen untersuchten Parametern weder ein Unterschied vor und nach Tamoxifen- bzw. Ölgabe, noch zwischen TG- und CTL-Tieren.

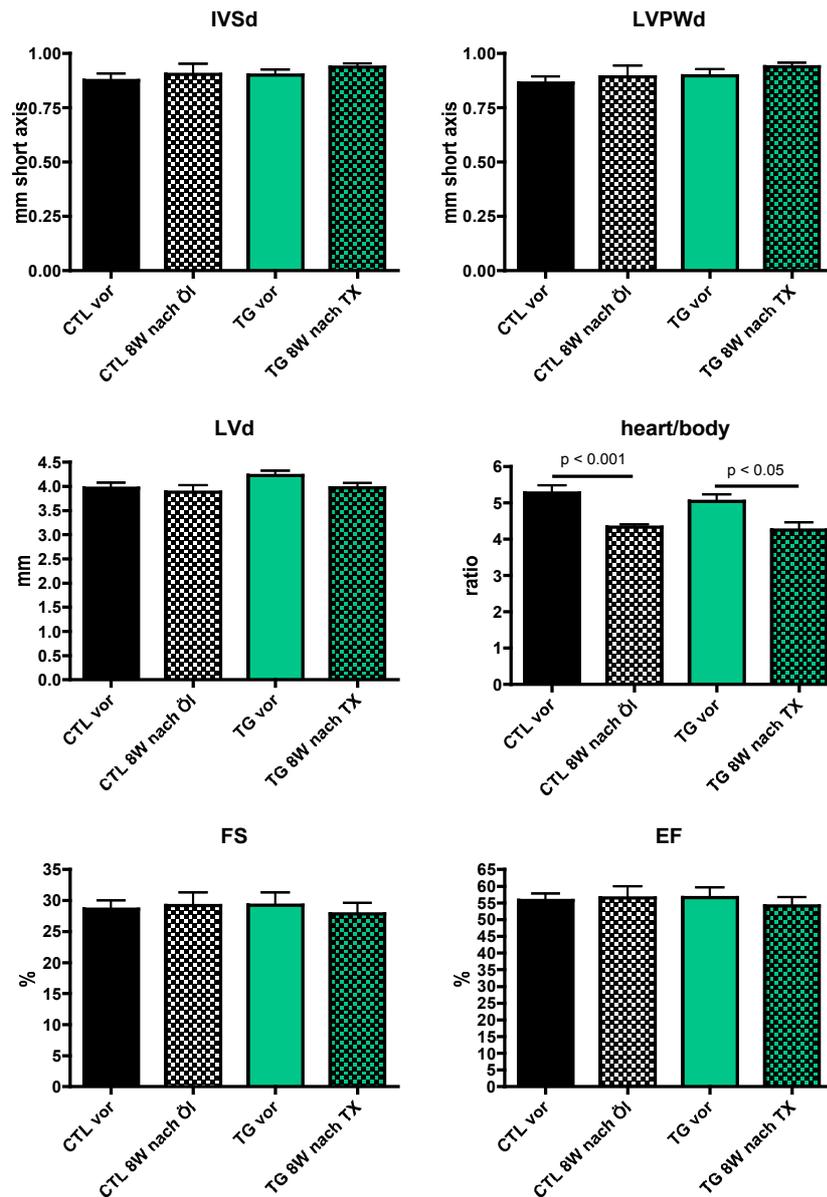


Abb. 50: Echodaten vor und 8 Wochen nach Tamoxifen-Induktion der Tbx5-Depletion. Durch die Tbx5-Depletion konnte nur im Herz-Körper-Verhältnis eine signifikante Verminderung festgestellt werden. Alle weiteren untersuchten echokardiografischen Parameter zeigten keine signifikante Veränderung zwischen CTL und TG Tieren. Jedoch wurden in den TG-Tieren vermehrt starke Herz-Rhythmusstörungen festgestellt.

Die Quantifizierung von adulten kardialen Vorläuferzellen wurde mit der FACS-Analyse durchgeführt (Abb. 51; FACS-Daten im Anhang). Die quantitative, durchflußzytometrische Analyse erfolgt an einer Zellfraktion des Herzens, die durch Zerkleinerung des Herzgewebes und Abtrennung von Kardiomyozyten mittels Filtration gewonnen wird. Die Zellen werden spezifisch gefärbt und die Spezifität der Antikörperbindung durch Isotypkontrollen nachgewiesen. Anschließend werden die gewonnenen Zellen bezüglich ihrer Expression von *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2 = Flk1), *Nkx2.5* und *ehand(1)*, sowie die Co-Färbungen *Sca1/αMHC* und *αMHC/ehand(1)* untersucht, um den Anteil von differenzierten Progenitorzellen in Tbx5-depletierten Maus-Herzen zu

quantifizieren. Die Analyse zeigt eine signifikant verminderte Population an Flk1-positiven Zellen in den TG-Tieren. Einhergehend mit dieser Beobachtung kann in den TG-Tieren eine signifikante Hochregulation der *ehand(1)*- und *Nkx2.5*- Progenitorzellpopulation nachgewiesen werden. Die Doppelfärbungen zeigen sowohl für *Sca1/αMHC*, als auch für *αMHC/ehand(1)* eine signifikant runterregulierte Population in den TG-Tieren. (Beispiele der FACS-Messungen für die einzelnen Färbungen sind dem Anhang zu entnehmen.)

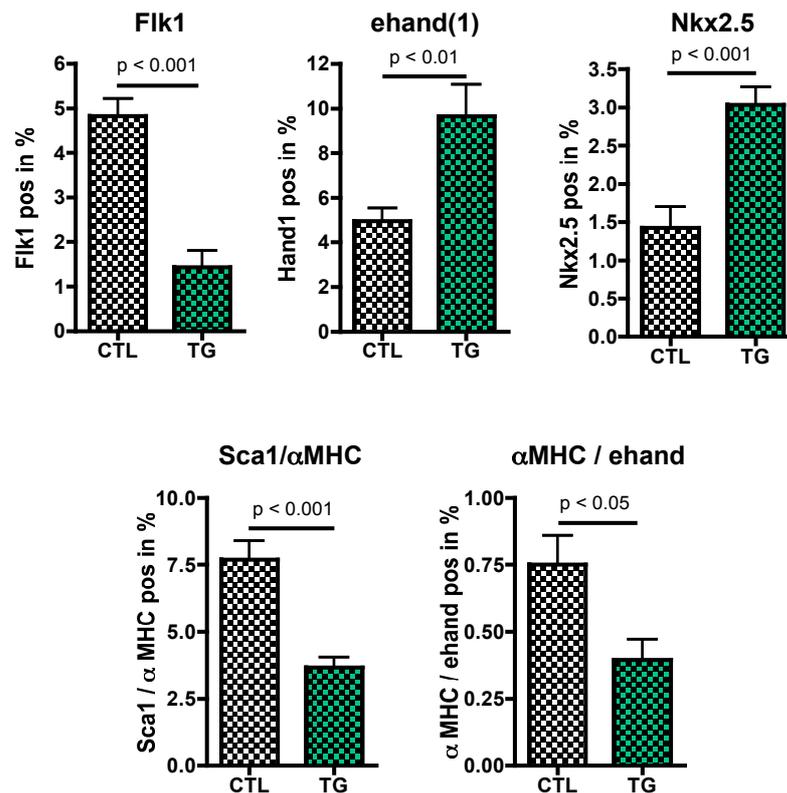


Abb. 51: FACS-Analyse 8 Wochen nach Tamoxifen-induzierter *Tbx5*-Depletion. Die Untersuchung des *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2 = Flk1) ergab in den TG-Tieren eine signifikant verminderte Anzahl an Flk1-positiven Zellen im Vergleich zu den CTL-Tieren. Die frühen kardialen Marker *ehand(1)* und *Nkx2.5* waren hingegen in den Zellen der TG-Tiere signifikant hochreguliert. Doppelfärbungen für *Sca1/αMHC* und *αMHC/ehand(1)* zeigten in den TG-Tieren eine signifikant verminderte Anzahl an doppel-positiven Zellen gegenüber den CTL-Tieren.

5. Diskussion

5.1. Identifikation kardialer β -Catenin Interaktionspartner

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits demonstriert werden, dass eine β -Catenin-Depletion durch die Steigerung der kardialen Progenitorzell-Differenzierung eine positive Wirkung auf das linksventrikuläre (LV)-Remodeling im adulten Herzen hat (Zelarayan, Noack et al. 2008). Um Faktoren zu finden, die durch eine Interaktion mit β -Catenin die Differenzierung von adulten kardialen Vorläuferzellen steigern können, wurde in der vorliegenden Arbeit das Hefe-Zwei-Hybrid System (Fields and Song 1989) angewendet. Mit Hilfe eines hefespezifischen β -Catenin-Expressionsplasmides konnten in einer humanen, kardialen cDNA-Bibliothek (zur Verfügung gestellt von Prof. N. Frey, Kiel) 315 vermeintliche Interaktionspartner von β -Catenin identifiziert werden. Nach erfolgter Re-Transformation, die die gefundene Interaktion zusätzlich bestätigen sollte, und der Sequenzierung der cDNA-Fragmente, konnten 44 % der gefundenen Klone als tatsächliche Interaktionspartner von β -Catenin in der Membran, im Cytosol und im Nucleus festgestellt werden. Der Fokus der Arbeit liegt besonders auf den molekularen Mechanismen der β -Catenin abhängigen Transkription im Nucleus, daher wurden speziell die nukleären Interaktionspartner einer eingehenden Literatur-Recherche unterzogen. So konnten u.a. *myocyte induction differentiation originator* (MIDORI), *krueppel-like factor 15* (KLF15), *insulin-like growth factor binding protein 5* (Igfbp5) und *four-and-a-half-LIM protein 2* (FHL2) identifiziert werden. MIDORI ist bereits sehr früh (E7.5) im murinen Embryo im Bereich des ersten sich entwickelnden Herzbereichs (*cardiac crescent*) exprimiert. In einem P19 *in vitro* Assay konnte HOSODA et al. (Hosoda, Monzen et al. 2001) darüber hinaus zeigen, dass MIDORI essentiell für die kardiale Differenzierung *in vitro* ist. In der vorliegenden Arbeit wurde MIDORI als früher kardialer Marker mit in die Auswertung einbezogen, jedoch nicht als kardialer Interaktionspartner von β -Catenin untersucht.

KLF15 gehört zu der großen Gruppe der Zink-Finger basierenden Transkriptionsfaktoren, die in verschiedenen Prozessen der Zell-Differenzierung, dem kardialen Remodeling, der Angiogenese, der Blutbildung (Hämatopoese) und des Stammzell-Schicksals involviert sind (Kaczynski, Cook et al. 2003). Verschiedene Studien haben außerdem gezeigt, dass speziell KLF15 eine wichtige regulatorische Rolle bei der kardialen Hypertrophie (Fisch, Gray et al. 2007) und der Fibrose-Bildung unter Stress (Wang, Haldar et al. 2008) spielt. KLF15 wurde in einer anderen Arbeit unserer Gruppe weiter untersucht, da bereits dahingehend Vorversuche vorlagen (Noack et al., unpubliziert).

Igfbp5 ist ebenfalls bereits sehr früh im sich entwickelnden Herzen exprimiert (Prall, Menon et al. 2007). Darüber hinaus ist es speziell über den IGF-Signalweg an verschiedenen entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt (Mohan and Baylink 2002) und wurde aufgrund der Komplexität ebenfalls nur als früher kardialer Marker in die Auswertung mit einbezogen.

FHL2 ist als einziger, der hier erwähnten gefundenen β -Catenin Interaktionspartner bereits als solcher bekannt. In einem Hefe-Zwei-Hybrid System konnte β -Catenin als Interaktionspartner von FHL2 in einer Myoblasten cDNA-Bibliothek identifiziert werden (Martin, Schneider et al. 2002). MARTIN et

al. konnte darüber hinaus zeigen, dass durch diese Interaktion von β -Catenin und FHL2 die Differenzierung von Myoblasten stimuliert wird. WEI et al. (Wei, Renard et al. 2003) konnte ausserdem zeigen, dass FHL2 als Co-Aktivatoren von β -Catenin positiven Einfluss auf dessen Transkriptionsaktivität nimmt. Interessanterweise, konnte die stimulierende Wirkung von FHL2 auf die Differenzierung auch in Osteoblasten nachgewiesen werden (Lai, Bai et al. 2006). Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse von MARTIN et al. (Martin, Schneider et al. 2002) bezüglich der Wirkung von FHL2 auf die β -Catenin abhängige Transkription in anderen Zell-Linien. So konnte er in HEK 293-Zellen eine inhibitorische Wirkung von FHL2 nachweisen. Dies unterstreicht zusätzlich die zell-spezifische regulatorische Funktion von FHL2, die von JOHANNESSEN et al. (Johannessen, Moller et al. 2006) zusammenfassend beschrieben wurde. Nach Validierung der gefundenen Protein-Interaktion in kardialen Zellen und der Bestätigung einer stärkeren Expression von FHL2 im adulten Herzen, wurde FHL2 ausgewählt, um seine regulatorische Rolle auf β -Catenin besonders während der kardialen Differenzierung zu untersuchen. Die oben beschriebenen gefundenen Interaktionspartner von β -Catenin spielen sowohl bei der normalen kardialen Embryogenese, als auch beim kardialen Remodeling eine wichtige Rolle. Diese Beobachtungen unterstreichen zusätzlich die Hypothese, dass ähnliche Mechanismen der embryonalen kardialen Vorläuferzell-Differenzierung auch im adulten Herzen re-aktiviert werden (Zelarayan, Noack et al. 2008) (Oh, Bradfute et al. 2003) (Laugwitz, Moretti et al. 2005) (Oerlemans, Goumans et al. 2010). FHL2 ist bisher im adulten Organismus im Bereich der Zell-Adhäsion zu finden (Wixler, Geerts et al. 2000) und fungiert als transkriptioneller Co-Aktivatoren des Androgen-Rezeptors (Muller, Metzger et al. 2002). Diese duale Rolle wird durch die Lokalisation von FHL2 sowohl im Cytosol als auch im Nucleus bestärkt (Scholl, McLoughlin et al. 2000; Wixler, Geerts et al. 2000). Bisher ist für FHL2 keine funktionelle Rolle in der Kardiogenese beschrieben. Ein Maus-Modell mit depletiertem FHL2 zeigt keine Beeinträchtigung der Herzmorphologie oder Herzfunktion im adulten Tier (Chu, Bardwell et al. 2000). Lediglich die Induktion einer kardialen Hypertrophie durch β -adrenerge Stimulation führt zu einer übermäßig starken Hypertrophie-Antwort in den transgenen *knock-out* Tieren (Kong, Shelton et al. 2001). Die strukturelle Veränderung des Herzmuskels in Folge einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) konnte außerdem einer Mutation im *fhl2*-Gen zugeordnet werden, was zum Verlust der Verbindung von FHL2 zum Membran-Protein Titin führt (Arimura, Hayashi et al. 2007).

Bisher ist FHL2 jedoch noch nicht dafür bekannt bei der kardialen Differenzierung eine Rolle zu spielen, sodass sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit neue Erkenntnisse der molekularen Mechanismen der Kardiogenese und der Regulation von β -Catenin gewinnen lassen.

5.2. FHL2 fördert die frühe Kardiogenese *in vitro*

β -Catenin spielt bei der Entwicklung der Vertebraten eine zentrale Rolle (Clevers 2006). Sein Einfluss auf die Kardiogenese ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. Bereits zu Beginn des sich entwickelnden Organismus ist die Aktivierung von β -Catenin essentiell für die Bildung des

Mesoderms. Im weiteren Verlauf sind schnelle Wechsel zwischen Inaktivierung und erneuter Aktivierung entscheidend für die Proliferation der mesodermalen Zellen (Inaktivierung), für die Bildung kardialer Vorläuferzellen (Aktivierung) und für die finale Differenzierung in Kardiomyozyten (Inaktivierung) notwendig (Naito, Shiojima et al. 2006; Tzahor 2007; Gessert and Kuhl 2010). Verschiedene Studien haben außerdem gezeigt, dass β -Catenin eine zentrale Rolle bei der Re-Aktivierung des embryonalen Entwicklungsprogramms nach einer Herzschädigung spielt (Oh, Bradfute et al. 2003; Laugwitz, Moretti et al. 2005; Zelarayan, Noack et al. 2008; Limana, Bertolami et al. 2010). Die vorliegende Arbeit hat die Hypothese überprüft, ob FHL2 durch die Regulation der β -Catenin abhängigen Transkription einen Einfluss auf die Kardiogenese hat. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen darüber hinaus die Grundlage bilden, FHL2 zukünftig im Tier-Modell als möglichen Aktivator des embryonalen Differenzierungsprogramms im adulten Tier einzusetzen. Unter Anwendung der ECC-P19-Zelllinie und mES-Zelllinie, sowie der etablierten „hanging drop“-Methode (Wobus, Wallukat et al. 1991), deutet die vorliegende Arbeit darauf hin, dass FHL2 in der Lage ist das kardiale Programm *in vitro* zu aktivieren. In ähnlicher Weise konnte bereits der Einfluss einer Tbx5-Überexpression (Fijnvandraat, Lekanne Deprez et al. 2003), sowie der Einfluss von β -Catenin auf die kardiale Differenzierung (Nakamura, Sano et al. 2003) in P19-Assays erfolgreich untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand einer signifikant erhöhten Expression der für die frühe Kardiogenese notwendigen Marker Tbx5 (Goetz, Brown et al. 2006), Nkx2.5 (Ai, Fu et al. 2007) und Igfbp5 (Prall, Menon et al. 2007), sowie der Expression des maturen kardialen Markers cTnT (Parmacek and Solaro 2004), die vermehrte kardiale Differenzierung in 10 d alten EBs nach FHL2-Überexpression (c-mycFHL2/pCS-MT Plasmid zur Verfügung gestellt von Prof. V. Wixler, Münster) in P19-Zellen eindeutig gezeigt werden. Die Untersuchung der kardialen Differenzierung in P19-Zellen erfolgte mit einer transiente FHL2-Überexpression. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass der Effekt der vermehrten Differenzierung in den 10 d EBs durch eine FHL2-Überexpression nicht mehr möglich ist und das weitere Faktoren bei der kardialen Differenzierung involviert sind. Es wird daher vermutet, dass FHL2 bereits schon sehr früh einen positiven Einfluss auf die kardiale Differenzierung haben muss. Ein weiteres Indiz dafür war die Untersuchung nach transienter FHL2-Überexpression, die auch ohne Differenzierungsmedium in den FHL2-transfizierten EBs zur kardialen Differenzierung führt. Dabei zeigten die CTL-EBs nur eine sehr geringe bis keine kardiale Gen-Expression und auch keine kontrahierenden Bereiche. Aufgrund der Vermutung, dass FHL2 bereits sehr früh in die kardiale Differenzierung involviert ist, wurden die transfizierten Zellen des *in vitro* Assay bereits 24h nach der Transfektion untersucht. Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt zeigt sich nicht nur eine erhöhte Expression der frühen kardialen Gene, sondern auch eine aktivierende Wirkung von FHL2 auf β -Catenin und sein Zielgen TCF4. Eine Möglichkeit, wie es demnach zur vermehrten kardialen Differenzierung kommt, wäre die Regulation von β -Catenin. So konnte in fraktionierten Protein-Lysaten 12 h und 48 h nach FHL2-Transfektion eine signifikante Abnahme des β -Catenin Protein-Levels im Cytosol bei gleichzeitigem Anstieg im Nucleus gezeigt werden. Es wird daher

vermutet, dass FHL2 die Translokation von β -Catenin in Nucleus und somit auch die β -Catenin abhängige Transkription fördert, wodurch das kardiale Programm aktiviert wird. Während der normalen Kardiogenese sorgt die Aktivierung von β -Catenin zu einem frühen Zeitpunkt zur Vermehrung der mesodermalen kardialen Vorläuferzellen (Tzahor 2007). Die zusätzlich vermehrte Proliferation dieser Zellen, die anhand der erhöhten Expression von Cyclin D1 und ki67 nachgewiesen werden konnte, könnte darüber hinaus ein weiterer Grund für die spätere vermehrte Differenzierung der FHL2-EBs darstellen. In diesem Zusammenhang sei die Rolle von FHL2 während der Proliferation erwähnt. So konnte LABALETTE et al. (Labalette, Nouet et al. 2008) den positiven regulatorischen Einfluss von FHL2 auf Cyclin D1 und die Zell-Proliferation in murinen Fibroblasten zeigen.

Um die gewonnenen Daten aus dem P19 *in vitro* Assay zu bestätigen und den Einfluss einer stabilen FHL2-Überexpression auf die kardiale Differenzierung zu untersuchen, wurde zur spezifischeren *in vitro* Methode mit murinen embryonalen Stammzellen (mESC) übergegangen. EVANS et al. (Evans 2008) hat die Vorteile dieser *in vitro* Methode als Model für die kardiale Entwicklung und darüber hinaus als Basis für die zellulären Therapien zusammenfassend beschrieben. So bietet ein mESC-Assay nicht nur die Möglichkeit kardiale Differenzierungsprozesse oder andere entwicklungsbiologische Prozesse zu untersuchen und neue involvierte Gene zu identifizieren (Miller, Christoforou et al. 2008), sondern auch pharmakologische Substanzen oder andere zellbasierte Therapieformen zu testen. Speziell im Hinblick auf eine zellbasierte Therapie stellen diese embryonalen Stammzellen im Gegensatz zu den embryonalen Karzinoma-Stammzellen (P19) eine sicherere *in vitro* Untersuchungsmethode dar. Unter Verwendung einer doppelt-transgenen α MHC-GFP/ α MHC-NeoR mES-Zelllinie (zur Verfügung gestellt von Dr. Alexander Becker (Prof. L. Field, Indianapolis)) konnte eine stabile FHL2-mES-Zelllinie erfolgreich hergestellt werden. Die kardiale Differenzierung kann anhand der GFP-Expression dokumentiert und die Kardiomyozyten mit Hilfe des Neomycin-Derivats G418 von den Nicht-Kardiomyozyten selektiert werden. Bedauerlicherweise, konnte weder eine G418-Konzentration von 200 μ g/ml noch von 400 μ g/ml eine 100 %ige Selektion gewährleisten. Es wird vermutet, dass aufgrund der kugelförmigen Struktur der EBs das G418-Reagenz vermutlich nicht an die Zellen im Inneren des EBs gelangt, sodass in diesem Bereich auch weiterhin Nicht-Kardiomyozyten auftreten. Sowohl die wt-EBs als auch die FHL2-überexprimierenden EBs wurden mit G418 gleich behandelt, sodass die Daten dennoch miteinander verglichen und ausgewertet werden können. Anhand der GFP-Expression konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum von 16 Tagen (16 d) in den durch die „hanging drop“-Methoden entstandenen ausplattierten EBs die kardiale Differenzierung dokumentiert werden. Im Gegensatz zu den P19-Daten hat sich dabei gezeigt, dass die wt-EBs bereits am 12. Tag der Differenzierung 100 % GFP-Expression zeigten und von den FHL2-EBs auch am Ende der Differenzierung lediglich ca. 30 % GFP-positiv waren. Es wurde daher vermutet, dass eine stabile FHL2-Überexpression im Gegensatz zur transienten zu einer Inhibition der finalen Differenzierung führt. Die Phänotypisierung der Zellen zu

verschiedenen Zeitpunkten hat gezeigt, dass FHL2 bereits sehr früh einen positiven Einfluss auf die Entwicklung der mES-Zellen in die mesodermale Richtung hat. So konnte bereits am 3. Tag der Differenzierung in FHL2-überexprimierenden EBs eine signifikant erhöhte Expression des mesodermalen Markers Brachyury gezeigt werden, der die Expression des pluripotenten Markers Mesp1 induziert (David, Jarsch et al.), der zu diesem Zeitpunkt ebenfalls signifikant erhöht nachgewiesen werden konnte. Mesp1 markiert darüber hinaus den Beginn der kardialen Entwicklung (Saga, Miyagawa-Tomita et al. 1999). Im Gegensatz dazu steht die Expression eines Markers für das Neuroderm NCAM1 (Hortsch 2003), der keine Regulation am 3. Tag der Differenzierung zeigt. Am 7. Tag der Differenzierung nimmt die Expression von Brachyury, Mesp1 und dem pluripotenten Marker Oct4 ab, während die Expression der frühen kardialen Gene (Tbx5, Nkx2.5, Igfbp5 und ehand(1)) in FHL2-überexprimierenden EBs signifikant ansteigt. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass FHL2 die Entwicklung der kardialen mesodermalen Linie spezifisch fördert. Jedoch führt dies im weiteren Verlauf nicht zu einer vermehrten Differenzierung von FHL2-überexprimierenden EBs. Interessanterweise, waren am Ende der Differenzierung in 16 d EBs die frühen kardialen Marker in FHL2-überexprimierenden EBs weiterhin signifikant erhöht gegenüber den wt-EBs. Die verminderte kardiale Differenzierung konnte neben der geringeren GFP-Expression auch anhand der geringen cTnT-Expression in der IF gezeigt werden. Vergleichend mit dem P19 *in vitro* Assay kann auch beim mESC-Assay eine frühzeitige Aktivierung der frühen kardialen Gene beobachtet werden. Jedoch führt die stabile FHL2-Überexpression dementsprechend nicht zur finalen kardialen Differenzierung *in vitro*.

Ähnlich wie zu den frühen Zeitpunkten der Differenzierung im P19 Assay, konnte auch in 16 d EBs im mESC-Assay eine vermehrte Translokation von β -Catenin aus dem Cytosol in den Nucleus in Folge der FHL2-Überexpression gezeigt werden. Die multiphasische Rolle von β -Catenin ist speziell durch dessen Aktivierung und Inaktivierung essentiell während der Kardiogenese (Naito, Shiojima et al. 2006; Kwon, Arnold et al. 2007; Qyang, Martin-Puig et al. 2007). Besonders die Inhibierung von β -Catenin ist notwendig für die vollständige Differenzierung der Kardiomyozyten (Tzahor 2007). Jedoch konnte am 7., 11. und 16. Tag der Differenzierung eine fast gleichbleibend erhöhte Expression von β -Catenin und seinem Zielgen TCF4 in FHL2-überexprimierenden EBs gezeigt werden. Es lag daher die Vermutung nahe, dass die vermehrte nukleäre Expression von β -Catenin und der damit verbundenen erhöhten β -Catenin abhängigen Transkription die finale Differenzierung verhindert. Die stetige Aktivierung der β -Catenin abhängigen Transkription kann jedoch nicht allein für die verminderte Differenzierung verantwortlich sein. Sowohl für Nkx2.5 (Durocher, Charron et al. 1997), als auch für Tbx5 (Fijnvandraat, Lekanne Deprez et al. 2003) konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression die Differenzierung fördert und nicht inhibiert. Im Kontrast dazu, führt eine Igfbp5-Überexpression zur Inhibition der kardialen Entwicklung *in vivo* (Salih, Tripathi et al. 2004). Aus den vorliegenden Ergebnissen wird daher vermutet, dass Igfbp5 „downstream“ von β -Catenin agiert und es dadurch zu einer Überspezifikation der Zellen der kardialen Linien kommt, wodurch die finale

kardiale Differenzierung inhibiert wird. Um diese Hypothese zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen von Igfbp5 notwendig. Einen ersten Zusammenhang zwischen Igfbp5 und β -Catenin konnte unsere Arbeitsgruppe bereits in einem Maus-Modell mit stabilisiertem β -Catenin feststellen (Baurand, Zelarayan et al. 2007), bei dem es in Folge der erhöhten β -Catenin Expression auch zu einer erhöhten Igfbp5-Expression kam. Bei der Untersuchung des Einfluss von FHL2 auf die kardiale Differenzierung konnte Igfbp5 ebenfalls durch FHL2 reguliert gezeigt werden. So konnte 24 h nach transienter FHL2-Überexpression nicht nur β -Catenin signifikant hochreguliert gefunden werden, sondern auch Igfbp5. Der bereits angesprochene Zusammenhang von Igfbp5 und β -Catenin im *in vivo* Maus-Modell (Baurand, Zelarayan et al. 2007) und die Tatsache, dass AMAAR et al. (Amaar, Thompson et al. 2002) eine Protein-Interaktion zwischen Igfbp5 und FHL2 in Osteoblasten zeigen konnte, legt die Vermutung nahe, dass Igfbp5 auch bei der frühen kardialen Differenzierung zusammen mit FHL2 und β -Catenin involviert ist. Den Einfluss der Igfbp5-Expression während der Embryonalentwicklung konnte SALIH et al. (Cobb, Salih et al. 2004) anhand eines *in vivo* Maus-Modells zeigen. Dabei führt die Igfbp5-Überexpression zu einer geringen Anzahl von Nachkommen mit erheblichen physiologischen Dysfunktionen und einer Lebenserwartung von max. drei Wochen. Eine dauerhafte Igfbp5-Überexpression würde vermutlich *in vitro* zu einer verminderten oder inhibierten kardialen Differenzierung führen, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit für FHL2 gezeigt werden konnte.

Darüber hinaus konnte RISEBRO et al. (Risebro, Smart et al. 2006) bei der Untersuchung des Einfluss einer *ehand(1)* - Überexpression auf die kardiale Entwicklung ähnliche Beobachtungen machen, wie sie in der vorliegenden Arbeit in den FHL2-überexprimierenden EBs gezeigt werden konnte. Eine *in vivo* *ehand(1)* - Überexpression führt zu einer gestörten kardialen Morphologie mit abnormaler Ventrikel-Bildung und verlängertem Ausfluss-Trakt des Herzens. *In vitro* Untersuchungen mit *ehand(1)* - Überexpression in mES-Zellen, zeigen darüber hinaus eine verminderte Bildung von kontrahierenden Bereichen in den EBs, was durch die verminderte Expression an muren kardialen Markern bestätigt wird. Ausserdem konnte RISEBRO et al. (Risebro, Smart et al. 2006) in Folge der *in vitro* *ehand(1)* - Überexpression anhand der Cyclin D2 Expression auch eine erhöhte Proliferation nachweisen. Eine erhöhte Cyclin D2 Expression führt *in vivo* zu einer erhöhten Zellzyklus-Aktivität in den vorkommenenden Kardiomyozyten (Pasumarthi and Field 2002) und wirkt sich darüber hinaus nach einem Myokardinfarkt positiv auf die Begrenzung des Infarktgebietes und Aufrechterhaltung der Herzfunktion aus (Rubart and Field 2006). Diese Untersuchungen bestätigen die Hypothese, dass FHL2 ähnlich wie *ehand* positiven Einfluss auf die frühe kardiale Spezifikation hat und es zusätzlich durch eine erhöhte Proliferation zu einer größeren Population an kardialen mesodermalen Zellen kommt.

5.3. Pharmakologische Inhibition der β -Catenin abhängigen Transkription durch Quercetin reaktiviert die durch die FHL2-Überexpression inhibierte finale Differenzierung *in vitro*

Um zu überprüfen, ob die anhaltende β -Catenin abhängige Transkription tatsächlich für die verminderte Differenzierung verantwortlich ist, wurde ein „Rescue“-Experiment durchgeführt. Es sollte getestet werden, ob sich, durch eine gezielte Inhibition der β -Catenin abhängigen Transkription, die inhibierte Differenzierung in FHL2-überexprimierenden EBs aufheben lässt. Dazu wurde ab dem 9. und 11. Tag der Differenzierung das Flavonoid Quercetin in das Differenzierungsmedium gegeben. Quercetin kommt ursprünglich in den Schalen von Beeren vor und hat die Eigenschaft die β -Catenin abhängige Transkription zu inhibieren, ohne β -Catenin selbst zu beeinflussen (Park, Chang et al. 2005). Als „Rescue“-Experiment eignet sich die Quercetin-Gabe ab dem 9. Tag der Differenzierung am effektivsten. Anhand der kardial-spezifischen GFP-Expression konnte bereits einen Tag nach Quercetin-Gabe eine starke Zunahme in FHL2-überexprimierenden EBs dokumentiert werden. Bereits drei Tage nach der ersten Quercetin-Gabe zeigten die FHL2-überexprimierenden EBs mehr GFP-Expression als die wt-EBs ohne Quercetin. Im Kontrast dazu zeigten die wt-EBs eine geringere GFP-Expression als ohne Quercetin, diese lag aber immernoch höher als die GFP-Expression der FHL2-überexprimierenden EBs ohne Quercetin-Gabe. Vermutlich war für die wt-EBs der Zeitpunkt der Quercetin-Gabe zu früh, sodass eine verminderte β -Catenin abhängige Transkription somit auch zur verminderten Differenzierung führt. Die qRT-PCR Analyse bestätigt zusätzlich die Ergebnisse der GFP-Expression. So zeigt sich eine signifikant verminderte TCF4 Expression nach Quercetin-Gabe. Das β -Catenin Level bleibt sowohl in FHL2-überexprimierenden als auch in wt-EBs weitgehend unverändert. Die frühen kardialen Marker Nkx2.5 und Igfbp5 zeigen eine signifikant verminderte Expression in Klon8-EBs im Vergleich zu wt-EBs. Darüber hinaus wird die vermehrte Differenzierung in FHL2-überexprimierenden EBs durch eine signifikant erhöhte Expression von cTnT und sc. Actinin bestätigt. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Quercetin-Gabe die vermehrte Differenzierung in FHL2-überexprimierenden EBs re-aktiviert und bestätigt die Hypothese, dass die Aktivierung der β -Catenin abhängigen Transkription infolge der FHL2-Überexpression die finale kardiale Differenzierung inhibiert.

5.4. Hypothese zum Einfluss der FHL2-Überexpression auf die Kardiogenese *in vitro*

Die Hypothese, wie sich eine FHL2-Überexpression auf die Kardiogenese von mES-Zellen *in vitro* auswirkt, ist in **Abb. 52** dargestellt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine FHL2-Überexpression bereits zu Beginn der kardialen Differenzierung positiven Einfluss auf die mesodermalen Zellen nimmt und diese mehr in die Richtung der prä-kardialen mesodermalen Zellen schiebt. Dies lässt sich eindeutig anhand der Expression von Brachyury und Mesp1 erkennen. Darüber hinaus ist FHL2 vermutlich für eine vermehrte Translokation von β -Catenin vom Cytosol in den Nucleus verantwortlich, was anhand von fraktionierten Protein-Lysaten gezeigt werden konnte. Durch die vermehrte Akkumulation von β -Catenin im Nucleus wird zunächst die β -Catenin abhängige

Transkription und somit das kardiale Differenzierungsprogramm aktiviert. Die erhöhte Expression konnte sowohl von β -Catenin und seinem Zielgen TCF4, als auch von den frühen kardialen Markern Tbx5, Igfbp5, Nkx2.5 und ehand(1) gezeigt werden. Durch die andauernde erhöhte β -Catenin abhängige Transkription im Nucleus wird dann im weiteren Verlauf die finale Differenzierung durch die FHL2-Überexpression inhibiert, was sich durch die verminderte Expression der kardialen Marker sc. Actinin, cTnT, Mlc2a und Mlc2v zeigt.

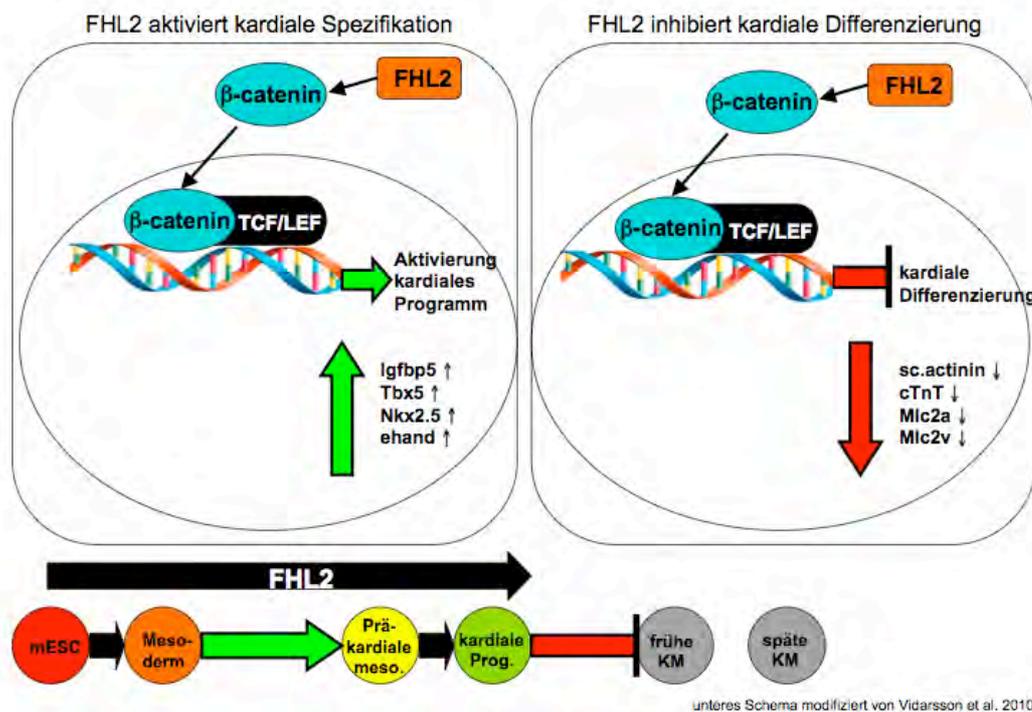


Abb. 52: Zusammenfassendes Schema der Hypothese des Einfluss von FHL2 auf die kardiale Differenzierung. (links) Es wird vermutet, dass die FHL2 Überexpression die frühe mesodermale Entwicklung dahingehend fördert, dass schneller prä-kardiale mesodermale Zellen entstehen. Darüber hinaus führt die FHL2 Überexpression zur vermehrten Translokation von β -Catenin in den Nucleus, wo infolge der β -Catenin abhängigen Transkription das kardiale Differenzierungsprogramm aktiviert wird und sich die Zellen in kardiale Progenitorzellen entwickeln. (rechts) Aufgrund der bestehenden vermehrten β -Catenin abhängigen Transkription wird die finale Differenzierung in vollständig funktionsfähige Kardiomyozyten (KM) durch die FHL2-Überexpression inhibiert.

5.5. Tbx5 beeinflusst die kardiale Differenzierung *in vitro* und *in vivo*

5.5.1. FHL2 interagiert mit Tbx5 *in vitro* und aktiviert den Tbx5-Promotor

Sowohl im P19 als auch im mESC *in vitro* Assay konnte ein Zusammenhang zwischen FHL2 und dem frühen kardialen Transkriptionsfaktor Tbx5 gezeigt werden. Speziell unter stabiler FHL2-Überexpression zeigt sich eine korrelierende hohe Tbx5-Expression, sowie eine erhöhte mRNA-Expression seines Zielgens ANP. Basierend auf diesen Ergebnissen und da bereits andere LIM-Proteine dafür bekannt sind T-Box Proteine vom Cytosol in den Nucleus zu transportieren (Camarata, Bimber et al. 2006; Krcmery, Camarata et al. 2010), wurde vermutet, dass zwischen FHL2 und Tbx5

auch eine bisher noch nicht bekannte Protein-Interaktion vorliegt. In der vorliegenden Arbeit konnte eine nukleäre Protein-Interaktion zwischen FHL2 und Tbx5 nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, dass die funktionelle Verbindung zwischen FHL2 und Tbx5 weniger der Translokation, als viel mehr der Aktivierung der Tbx5 abhängigen Transkription dient. Die Frage war demnach, ob FHL2 in der Lage ist, den Tbx5-Promotor zu aktivieren. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde ein Tbx5 spezifisches Luciferase-Assay durchgeführt. Unter Verwendung von zwei verschiedenen Luciferase-exprimierenden Konstrukten, die entweder den Tbx5-Minimal- oder Gesamtpromotor der Luciferase vorgeschaltet sind, konnte nach Co-Transfektion mit FHL2 eindeutig die Aktivierung des Tbx5-Promotors durch FHL2 gezeigt werden. Wie zu erwarten, zeigte der Minimal-Promotor eine stärkere relative Luciferase-Aktivität als der Gesamt-Promotor. Es konnte somit nicht nur eine bisher unbekannte Protein-Interaktion zwischen FHL2 und Tbx5 gezeigt, sondern auch eine funktionelle Verbindung hergestellt werden, sodass davon auszugehen ist, dass FHL2 über die Aktivierung des Tbx5-Promotors vermehrt die kardiale Entwicklung fördert.

5.5.2. Tbx5-Depletion verringert die differenzierungsfähige kardiale Progenitorpopulation *in vivo*

Den Einfluss, den Tbx5 auf die kardiale Differenzierung hat, konnte FIJNVANDRAAT et al. (Fijnvandraat, Lekanne Deprez et al. 2003) *in vitro* zeigen. So führt eine Tbx5-Überexpression in P19 Zellen zu einer vermehrten kardialen Differenzierung. Ähnlich wie im P19 und mESC-Assay mit FHL2-Überexpression zeigen die Tbx5-überexprimierenden EBs früher und mehr kontrahierende Bereiche. Bisher gibt es jedoch keine Studien, die belegen, dass Tbx5 auch eine Rolle bei adulten Progenitorzellen spielt. Basierend auf den vorliegenden *in vitro* Untersuchungen mit Tbx5, sollte im Anschluss die Rolle von Tbx5 innerhalb dieser Progenitorzell-Population im adulten Herzen *in vivo* untersucht werden. Um den Einfluss einer kardialen Tbx5-Depletion zu untersuchen, wurde das von BRUNEAU et al. (Bruneau, Nemer et al. 2001) generierte Tbx5^(del/+) Maus-Modell genutzt. Das Modell ist angelehnt an das im Menschen sehr selten vorkommende autosomal-dominant vererbte Holt-Oram-Syndrom (HOS), bei dem verschiedene Mutationen im *tbx5*-Gen zum Krankheitsbild führen (Holt and Oram 1960). HOS zeigt Fehlbildungen des Daumens und der Speiche, und besonders Fehlbildungen des Vorhof- und Ventrikel-Septums im Herzen. Die HOS-Patienten zeigen normalerweise keine verringerte Lebenserwartung. Sie können jedoch eine Stress-Belastung wesentlich schlechter kompensieren als vergleichsweise gesunde Menschen. Darüber hinaus besteht bei über 85 % der Fälle eine hohe Wahrscheinlichkeit einer congenitalen Herzschädigung (Basson, Cowley et al.).

Die durch Tamoxifen induzierte kardial-spezifische Tbx5-Depletion wird in 12 Wochen alten transgenen (TG) und Kontroll-Tieren (CTL) durchgeführt. Die Basal-Charakterisierung der TG-Tiere zeigte in Bezug auf die funktionellen Parameter der Echokardiographie keine signifikanten Unterschiede zu den CTL-Tieren. Um die Langzeitwirkung einer induzierten Tbx5-Depletion zu

untersuchen, wurden die Tiere vor der Tamoxifen-Injektion und acht Wochen danach echokardiographisch untersucht. Auch hier zeigten sich in den untersuchten Parametern keine signifikanten Unterschiede. Die bei HOS-Patienten auftretenden Mißbildungen im Herzen bzw. den Händen ist auf die Tbx5-Mutation zurückzuführen, die bereits während der Embryonalentwicklung besteht. Da die induzierte Tbx5-Depletion im Maus-Modell jedoch erst *post-natal* induziert wird, können Mißbildungen in diesen Bereichen nicht mehr auftreten.

Insgesamt scheint eine verminderte bzw. mutierte Tbx5-Expression während der Kardiogenese zur fehlerhaften Ausbildung des Herzens zu führen, was für seine essentielle Rolle während der kardialen Embryogenese spricht (Plageman and Yutzey 2005; Georges, Nemer et al. 2008). Daher wird vermutet, dass Tbx5 auch bei der Re-Aktivierung des embryonalen Programms nach einer Herzschädigung involviert ist. Um das Potenzial von differenzierungsfähigen Progenitorzellen zu untersuchen, wurden die kardialen Progenitorzellen der Tiere aus dem Langzeitversuch mittels FACS-Analyse untersucht. Anhand von Einzelfärbungen für Flk1, ehand(1) und Nkx2.5 und Doppelfärbungen für Sca1/ α MHC und α MHC/ehand(1) konnte in den TG-Tieren eine verminderte Population an differenzierungsfähigen Progenitorzellen gezeigt werden. Dies lässt vermuten, dass Tbx5 nicht nur während der kardialen Spezifikation (Goetz, Brown et al. 2006), sondern auch für die finale Differenzierung von wichtiger Bedeutung ist.

5.6. Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig den Einfluss von Fhl2 auf die frühe kardiale Spezifikation *in vitro*. Es bleibt darüber hinaus zu untersuchen, ob Fhl2 auch in der Lage ist das kardiale Programm nach einer Herzschädigung im adulten Organismus zu re-aktivieren. Da jedoch die Anzahl an kardialen Vorläuferzellen im adulten Organismus begrenzt ist, bleibt abzuwarten, ob sich durch Fhl2 tatsächlich eine Verbesserung der Herzfunktion durch die vermehrte Rekrutierung von kardialen Vorläuferzellen zum geschädigten Bereich erzielen lässt. Darüber hinaus muss die Möglichkeit untersucht werden, in welcher Form durch eine transiente Fhl2-Überexpression ein positiver Effekt nach Herzschädigung erzielt werden kann. Aus den vorliegenden *in vitro* Daten geht hervor, dass eine dauerhafte Fhl2-Expression die finale kardiale Differenzierung inhibiert. Es sollte daher ein Maus-Modell mit induzierbarer kardialer Fhl2-Überexpression im adulten Tier generiert werden. Mit Hilfe dieses Modells ließe sich untersuchen, ob nach induziertem Infarkt oder TAC (*transaortic constriction*) die initiale Fhl2-Überexpression zu einer vermehrten Population an differenzierungsfähigen kardialen Vorläuferzellen führen kann, die sich im weiteren Verlauf zu funktionellen Kardiomyozyten entwickeln.

Eine weitere Möglichkeit von Fhl2 auf das kardiale Remodeling nach einer Herzschädigung Einfluss zu nehmen, wären *in vitro* Versuche mit *Engineered Heart Tissue* (EHT). Dabei handelt es sich um *in vitro* hergestellte Herzgewebestücke, die bereits in Rattenherzen nach einem Infarkt erfolgreich transplantiert wurden und sich somit eine verbesserte Pumpfunktion erzielen lies (Eschenhagen, Didie

et al. 2002). Mit Hilfe dieser Methode ließen sich *in vitro* aus embryonalen Stammzellen mit induzierbarer Fhl2 Überexpression EHTs herstellen. Wie bereits oben erwähnt, führt in der vorliegenden Arbeit eine dauerhafte Fhl2-Überexpression zur Inhibition der finalen kardialen Differenzierung. Aus diesem Grund muss nach Anreicherung einer größeren Population an kardialen Vorläuferzellen der Zeitpunkt für eine Inhibition von Fhl2 experimentell ermittelt werden. Nur so ließe sich die Entwicklung zu vollständig ausdifferenzierten Kardiomyozyten und infolge dessen die Herstellung von funktionellen EHTs gewährleisten. Durch eine anschließende Transplantation in das geschädigte Gewebe könnten diese EHTs somit die begrenzte Anzahl von endogenen kardialen Vorläuferzellen überbrücken und eine verbesserte Herzfunktion hervorrufen.

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Maus-Modell mit induzierbarer kardialer Tbx5-Depletion konnte ausserdem eine neue mögliche Funktionsweise von Tbx5 innerhalb der adulten kardialen Differenzierung aufzeigen. Wenn Tbx5 tatsächlich nicht nur bei der kardialen Spezifikation eine wichtige Rolle spielt, sondern auch bei der finalen Differenzierung essentiell ist, müsste sich dies beim untersuchten Tiermodell nach Stress (MI oder TAC) durch eine verschlechterte Herzfunktion und im Vergleich zur basal untersuchten Population an differenzierungsfähigen kardialen Vorläuferzellen in einem nur geringen Unterschied zeigen.

Sowohl Fhl2 als auch Tbx5 stellen zukunftssträchtige Kandidaten dar. Durch weitere Untersuchungen können neue Erkenntnisse in den molekularen Mechanismen der embryonalen Herzentwicklung und somit auch neue Ansätze bei der Aktivierung des embryonalen Programms im adulten Organismus nach einer Herzschädigung erzielt werden.

6. Zusammenfassung

Eine Herzinsuffizienz ist mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität verbunden. Aus diesem Grund ist die Analyse von Signaltransduktionswegen, die im Herz-Remodeling involviert sind, essentiell zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei Herzinsuffizienz. Eine wichtige Rolle bei der endogenen Regeneration spielen die kardialen Vorläuferzellen (*cardiac progenitor cells*; CPCs). Jedoch sind die molekularen Signalwege, durch die die CPCs positiv auf das kardiale Remodeling wirken, bisher ungeklärt. Die Regulierung der Aktivierung von CPCs durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg stellt einen hochkonservierten Entwicklungsmechanismus dar, der essentiell für die physiologische Kardiogenese ist, aber im postnatalen Herzen verloren gegangen ist. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der β -Catenin abhängigen Signaltransduktion eine positive Wirkung auf das linksventrikuläre Remodeling und die Differenzierung der CPC nach einem Herzinfarkt hat. Demzufolge muss jeglicher Eingriff in die Wnt/ β -Catenin Signalkaskade möglichst spezifisch im Herzmuskel erfolgen, um das linksventrikuläre Remodeling unter Stress positiv zu beeinflussen. Hierfür ist die Identifikation von Effektoren notwendig, die sich innerhalb der Signalkaskade „*upstream*“ oder „*downstream*“ des myokardialen β -Catenins befinden.

Um Faktoren zu identifizieren, die durch Interaktion mit β -Catenin die Differenzierung von CPCs beeinflussen, wurde eine Hefe-Zwei-Hybrid Analyse mit β -Catenin als sogenannten „Köder“ und einer kardialen cDNA-Bibliothek durchgeführt. Bisher konnte FHL2 noch nicht als kardial-spezifischer Interaktionspartner von β -Catenin gefunden werden. Um den Einfluss von FHL2 auf die zellulären und molekularen Mechanismen zu untersuchen, durch deren Regulation es innerhalb des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zur Aktivierung der CPCs kommt, wurden verschiedene *in vitro* Differenzierungsassays durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine transiente FHL2-Überexpression die Differenzierung von P19 Zellen in funktionelle Kardiomyozyten fördert. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse des mESC *in vitro* Assays, bei dem die stabile FHL2-Überexpression die Expression mesodermaler und früher kardialer Marker fördert, aber die finale Differenzierung inhibiert wird. Untersuchungen hinsichtlich des regulatorischen Einflusses von FHL2 auf die β -Catenin abhängige Transkription konnten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der FHL2-Überexpression und einer erhöhten β -Catenin Expression im Nucleus besteht, die die finale Differenzierung inhibiert. Dieser Zusammenhang konnte in einem *Rescue*-Experiment bestätigt werden. Durch die pharmakologische Inhibition der β -Catenin abhängigen Transkription durch Quercetin, konnte die infolge der stabilen FHL2-Überexpression inhibierte finale Differenzierung reaktiviert werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass FHL2 einen positiven Einfluss auf die Spezifikation mesodermaler und kardialer Progenitorzellen durch die Aktivierung der β -Catenin abhängigen Transkription hat.

Darüber hinaus konnte durch eine Regulation des frühen kardialen Transkriptionsfaktors Tbx5 ein weiterer Zusammenhang zwischen FHL2 und der frühen Kardiogenese gezeigt werden. Diese Untersuchungen konnten nicht nur eine bisher unbekannte nukleäre Protein-Interaktion zeigen,

sondern auch die Aktivierung des Tbx5-Promotors durch FHL2. Es wird daher vermutet, dass infolge der FHL2-Überexpression die vermehrte Aktivierung der mesodermalen Zellen in mesodermale kardiale Vorläuferzellen über die Aktivierung von Tbx5 erfolgt.

Der Einfluss von Tbx5 auf die kardiale Homeostasis, sowie auf das linksventrikuläre Herz-Remodelings sollte ausserdem anhand eines Maus-Modells mit induzierbarer kardialer Tbx5-Depletion untersucht werden. In einem Langzeitversuch unter kardialer Tbx5-Depletion konnte gezeigt werden, dass die Tbx5-Depletion unter Normalbedingungen im adulten Herzen keine Rolle spielt. Darüber hinaus konnte eine verringerte Population an differenzierungsfähigen kardialen Vorläuferzellen mittels FACS-Analyse gezeigt werden. Es wird daher vermutet, dass Tbx5 nicht nur, wie bereits bekannt, die frühe kardiale Spezifikation fördert, sondern auch an der finalen Differenzierung beteiligt zu sein scheint.

Die so gewonnenen Erkenntnisse sind essentiell für die Entwicklung neuer Strategien, um den Verlauf des adulten Herzremodelings, welches zur Herzinsuffizienz führt, verhindern zu können und die regenerative Fähigkeit des adulten Herzen zu aktivieren.

7. Summary

Heart failure is nowadays the cause of high morbidity and mortality. Understanding the molecular mechanisms involved in the process of heart remodeling, might open new therapeutical approaches to avoid heart failure. Adult cardiac progenitor cells (CPCs) are known to play an important role in endogenous cardiac regeneration during cardiac remodeling. However, the extent to which these cells contribute to tissue homeostasis and/or repair as well as the signaling pathways controlling their differentiation remains unclear. Regulation of progenitor cell activation during early cardiogenesis through the Wnt/ β -catenin pathway is a highly conserved mechanism, which may become lost in the adult heart. A previous work demonstrated that downregulation of β -catenin may be beneficial for tissue remodeling upon cardiac stress. Therefore, the identification of cardiac interaction partners, modulating the activation of β -catenin dependent gene transcription in the adult heart and their potential to regulate the cardiogenic transcriptional program, may help to elucidate possible candidates to positively influence cardiac remodeling.

Performing a yeast two-hybrid screen with a human heart library, the present study identified and subsequently validated the specific interaction between FHL2 and β -catenin in cardiac cells. Induction of cardiac differentiation employing pluripotent P19 cells as an *in vitro* model of cardiomyogenesis showed that the transient overexpression of FHL2 result in an increased cardiac differentiation. Furthermore, a stable overexpression of FHL2 in mESCs results in an increased mesodermal and cardiac lineage, but in an inhibition of final cardiac differentiation. Mechanistically, FHL2 overexpression promoted high levels of nuclear β -catenin, which finally results in an increased β -catenin transcriptional activity. A rescue-experiment using the pharmacological inhibitor of β -catenin dependent transcription Quercetin, re-activated the inhibited cardiac differentiation *in vitro*. These data suggest that FHL2 promotes stem cells to acquire cardiac identity via modulating nuclear β -catenin expression as described in embryonic cardiogenesis. The ability of FHL2 to re-activate the cardiogenic program in the adult injured heart needs to be further investigated.

Furthermore, the early cardiac transcription factor Tbx5 was found to be regulated by FHL2. A novel nuclear protein-protein-interaction between FHL2 and Tbx5 along with an activation of the Tbx5-promotor via FHL2 is described in the present study. These data suggest that Tbx5 participate in an increased activation of cardiac precursor cells upon FHL2 overexpression. The role of Tbx5 during adult cardiac homeostasis was investigated in an *in vivo* mouse model with inducible cardiac Tbx5-depletion. A long-term analysis of these mice shows no apparent functional defect demonstrated by echocardiography analysis. By meaning of FACS analysis a decreased population of more committed cardiac precursor cells was detected in contrast to an upregulation of early cardiac progenitor cell population. These data suggest, that Tbx5 is not essential during cardiac specification, but also for the final differentiation.

FHL2 is specifically and abundantly expressed in the cardiovascular system, which makes it a promising target for cardiac-specific gene regulation upon cardiac diseases to finally activate CPC

upon cardiac remodeling. The anticipated gain in knowledge may ultimately help to identify new drug targets to unlock the regenerative potential of the adult heart.

8. Literatur

- Abu-Issa, R. and M. L. Kirby (2007). "Heart field: from mesoderm to heart tube." *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 45-68.
- Ai, D., X. Fu, et al. (2007). "Canonical Wnt signaling functions in second heart field to promote right ventricular growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(22): 9319-24.
- Ali, N. N., X. Xu, et al. (2004). "Beta-adrenoceptor subtype dependence of chronotropy in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes." *Basic Res Cardiol* **99**(6): 382-91.
- Amaar, Y. G., G. R. Thompson, et al. (2002). "Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2)." *J Biol Chem* **277**(14): 12053-60.
- Anisimov, S. V., K. V. Tarasov, et al. (2002). "SAGE identification of differentiation responsive genes in P19 embryonic cells induced to form cardiomyocytes in vitro." *Mech Dev* **117**(1-2): 25-74.
- Arimura, T., T. Hayashi, et al. (2007). "Structural analysis of four and half LIM protein-2 in dilated cardiomyopathy." *Biochem Biophys Res Commun* **357**(1): 162-7.
- Bach, I. (2000). "The LIM domain: regulation by association." *Mech Dev* **91**(1-2): 5-17.
- Basson, C. T., G. S. Cowley, et al. (1994). "The clinical and genetic spectrum of the Holt-Oram syndrome (heart-hand syndrome)." *N Engl J Med* **330**(13): 885-91.
- Baurand, A., L. Zelarayan, et al. (2007). "Beta-catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling." *Circ Res* **100**(9): 1353-62.
- Berrill, A., H. L. Tan, et al. (2004). "Assessment of Stem Cell Markers During Long-Term Culture of Mouse Embryonic Stem Cells." *Cytotechnology* **44**(1-2): 77-91.
- Bruneau, B. G., M. Logan, et al. (1999). "Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome." *Dev Biol* **211**(1): 100-8.
- Bruneau, B. G., G. Nemer, et al. (2001). "A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease." *Cell* **106**(6): 709-21.
- Buckingham, M., S. Meilhac, et al. (2005). "Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells." *Nat Rev Genet* **6**(11): 826-35.
- Camarata, T., B. Bimber, et al. (2006). "LMP4 regulates Tbx5 protein subcellular localization and activity." *J Cell Biol* **174**(3): 339-48.
- Chu, P. H., W. M. Bardwell, et al. (2000). "FHL2 (SLIM3) is not essential for cardiac development and function." *Mol Cell Biol* **20**(20): 7460-2.
- Chu, P. H., P. Ruiz-Lozano, et al. (2000). "Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system." *Mech Dev* **95**(1-2): 259-65.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." *Cell* **127**(3): 469-80.

- Cobb, L. J., D. A. Salih, et al. (2004). "Partitioning of IGFBP-5 actions in myogenesis: IGF-independent anti-apoptotic function." J Cell Sci **117**(Pt 9): 1737-46.
- Daniels, D. L., K. Eklof Spink, et al. (2001). "beta-catenin: molecular plasticity and drug design." Trends Biochem Sci **26**(11): 672-8.
- David, R., V. B. Jarsch, et al. (2011). "Induction of MesP1 by Brachyury(T) generates the common multipotent cardiovascular stem cell." Cardiovasc Res **92**(1): 115-22.
- Dorn, G. W., 2nd (2007). "The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy." Hypertension **49**(5): 962-70.
- DuBridge, R. B., P. Tang, et al. (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." Mol Cell Biol **7**(1): 379-87.
- Durocher, D., F. Charron, et al. (1997). "The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors." Embo J **16**(18): 5687-96.
- Eschenhagen, T., M. Didie, et al. (2002). "Cardiac tissue engineering." Transpl Immunol **9**(2-4): 315-21.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-6.
- Evans, T. (2008). "Embryonic Stem Cells as a Model for Cardiac Development and Disease." Drug Discov Today Dis Models **5**(3): 147-155.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-6.
- Fijnvandraat, A. C., R. H. Lekan Deprez, et al. (2003). "TBX5 overexpression stimulates differentiation of chamber myocardium in P19C16 embryonic carcinoma cells." J Muscle Res Cell Motil **24**(2-3): 211-8.
- Fisch, S., S. Gray, et al. (2007). "Kruppel-like factor 15 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(17): 7074-9.
- Freyd, G., S. K. Kim, et al. (1990). "Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*." Nature **344**(6269): 876-9.
- Genini, M., P. Schwalbe, et al. (1997). "Subtractive cloning and characterization of DRAL, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma." DNA Cell Biol **16**(4): 433-42.
- Georges, R., G. Nemer, et al. (2008). "Distinct expression and function of alternatively spliced Tbx5 isoforms in cell growth and differentiation." Mol Cell Biol **28**(12): 4052-67.
- Gessert, S. and M. Kuhl (2010). "The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development." Circ Res **107**(2): 186-99.
- Goetz, S. C., D. D. Brown, et al. (2006). "TBX5 is required for embryonic cardiac cell cycle progression." Development **133**(13): 2575-84.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.

- Haq, S., A. Michael, et al. (2003). "Stabilization of beta -catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4610-5.
- Harvey, R. P. (2002). "Patterning the vertebrate heart." Nat Rev Genet **3**(7): 544-56.
- Hecht, A., C. M. Litterst, et al. (1999). "Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro." J Biol Chem **274**(25): 18017-25.
- Heinemeyer, T., E. Wingender, et al. (1998). "Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL." Nucleic Acids Res **26**(1): 362-7.
- Holt, M. and S. Oram (1960). "Familial heart disease with skeletal malformations." Br Heart J **22**: 236-42.
- Hoogaars, W. M., P. Barnett, et al. (2007). "T-box factors determine cardiac design." Cell Mol Life Sci **64**(6): 646-60.
- Hortsch, M. (2003). "Neural cell adhesion molecules--brain glue and much more!" Front Biosci **8**: d357-9.
- Hosada (2001). "A novel myocyte-specific gene Midori promotes the differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes."
- Hosoda, T., K. Monzen, et al. (2001). "A novel myocyte-specific gene Midori promotes the differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes." J Biol Chem **276**(38): 35978-89.
- Hsieh, P. C., V. F. Segers, et al. (2007). "Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury." Nat Med **13**(8): 970-4.
- Hu, D. L., F. K. Chen, et al. (2010). "GATA-4 promotes the differentiation of P19 cells into cardiac myocytes." Int J Mol Med **26**(3): 365-72.
- Jasmin, D. C. Spray, et al. (2010). "Chemical induction of cardiac differentiation in p19 embryonal carcinoma stem cells." Stem Cells Dev **19**(3): 403-12.
- Johannessen, M., S. Moller, et al. (2006). "The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2." Cell Mol Life Sci **63**(3): 268-84.
- Johannessen, M., P. A. Olsen, et al. (2003). "Activation of the coactivator four-and-a-half-LIM-only protein FHL2 and the c-fos promoter through inhibition of protein phosphatase 2A." Biochem Pharmacol **65**(8): 1317-28.
- Joseph Sambrook, D. R. (2000). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." **3. edition.**
- Kaczynski, J., T. Cook, et al. (2003). "Sp1- and Kruppel-like transcription factors." Genome Biol **4**(2): 206.
- Karlsson, O., S. Thor, et al. (1990). "Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain." Nature **344**(6269): 879-82.
- Kaufman, M. H., E. J. Robertson, et al. (1983). "Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos." J Embryol Exp Morphol **73**: 249-61.

- Kemler, R. (1993). "From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion." Trends Genet **9**(9): 317-21.
- Klaus, A., Y. Saga, et al. (2007). "Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(47): 18531-6.
- Kleinman, H. K. and G. R. Martin (2005). "Matrigel: basement membrane matrix with biological activity." Semin Cancer Biol **15**(5): 378-86.
- Klug, M. G., M. H. Soonpaa, et al. (1996). "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts." J Clin Invest **98**(1): 216-24.
- Kolossov, E., Z. Lu, et al. (2005). "Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes." Faseb J **19**(6): 577-9.
- Kong, Y., J. M. Shelton, et al. (2001). "Cardiac-specific LIM protein FHL2 modifies the hypertrophic response to beta-adrenergic stimulation." Circulation **103**(22): 2731-8.
- Krause, A., W. Zacharias, et al. (2004). "Tbx5 and Tbx4 transcription factors interact with a new chicken PDZ-LIM protein in limb and heart development." Dev Biol **273**(1): 106-20.
- Krcmery, J., T. Camarata, et al. (2010). "Nucleocytoplasmic functions of the PDZ-LIM protein family: new insights into organ development." Bioessays **32**(2): 100-8.
- Kubalak, S. W., W. C. Miller-Hance, et al. (1994). "Chamber specification of atrial myosin light chain-2 expression precedes septation during murine cardiogenesis." J Biol Chem **269**(24): 16961-70.
- Kwon, C., J. Arnold, et al. (2007). "Canonical Wnt signaling is a positive regulator of mammalian cardiac progenitors." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(26): 10894-9.
- Labalette, C., Y. Nouet, et al. (2008). "The LIM-only protein FHL2 regulates cyclin D1 expression and cell proliferation." J Biol Chem **283**(22): 15201-8.
- Lai, C. F., S. Bai, et al. (2006). "Four and half lim protein 2 (FHL2) stimulates osteoblast differentiation." J Bone Miner Res **21**(1): 17-28.
- Laugwitz, K. L., A. Moretti, et al. (2005). "Postnatal is11+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages." Nature **433**(7026): 647-53.
- Limana, F., C. Bertolami, et al. (2010). "Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit(+) cells: role of the pericardial fluid." J Mol Cell Cardiol **48**(4): 609-18.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Marguerie, A., F. Bajolle, et al. (2006). "Congenital heart defects in Fgfr2-IIIb and Fgf10 mutant mice." Cardiovasc Res **71**(1): 50-60.
- Martin, B., R. Schneider, et al. (2002). "The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts." J Cell Biol **159**(1): 113-22.

- Martin, G. R. and M. J. Evans (1975). "Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(4): 1441-5.
- McBurney, M. W., E. M. Jones-Villeneuve, et al. (1982). "Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line." Nature **299**(5879): 165-7.
- McCrea, P. D. and B. M. Gumbiner (1991). "Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin). Characterization and extractability of the protein complex from the cell cytostructure." J Biol Chem **266**(7): 4514-20.
- McLoughlin, P., E. Ehler, et al. (2002). "The LIM-only protein DRAL/FHL2 interacts with and is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein." J Biol Chem **277**(40): 37045-53.
- Messina, E., L. De Angelis, et al. (2004). "Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart." Circ Res **95**(9): 911-21.
- Miller, R. A., N. Christoforou, et al. (2008). "Efficient array-based identification of novel cardiac genes through differentiation of mouse ESCs." PLoS One **3**(5): e2176.
- Min, J. Y., Y. Yang, et al. (2002). "Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats." J Appl Physiol **92**(1): 288-96.
- Mohan, S. and D. J. Baylink (2002). "IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms." J Endocrinol **175**(1): 19-31.
- Mori, A. D., Y. Zhu, et al. (2006). "Tbx5-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis." Dev Biol **297**(2): 566-86.
- Muller, J. M., E. Metzger, et al. (2002). "The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus." Embo J **21**(4): 736-48.
- Murray M. G., P. J. W., DeMars S. J. Harris Cramer J (1992). "Long-Lived Southern Blots Using RNA Probes." Plant Molecular Biology Reporter **10**(2) 173-177.
- Naiche, L. A., Z. Harrelson, et al. (2005). "T-box genes in vertebrate development." Annu Rev Genet **39**: 219-39.
- Naito, A. T., I. Shiojima, et al. (2006). "Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(52): 19812-7.
- Nakamura, T., M. Sano, et al. (2003). "A Wnt- and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5834-9.
- Nathke, I. (2006). "Cytoskeleton out of the cupboard: colon cancer and cytoskeletal changes induced by loss of APC." Nat Rev Cancer **6**(12): 967-74.
- Nusse, R. and H. E. Varmus (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." Cell **31**(1): 99-109.
- Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*." Nature **287**(5785): 795-801.

- Oerlemans, M. I., M. J. Goumans, et al. (2010). "Active Wnt signaling in response to cardiac injury." Basic Res Cardiol **105**(5): 631-41.
- Oh, H., S. B. Bradfute, et al. (2003). "Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12313-8.
- Park, C. H., J. Y. Chang, et al. (2005). "Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **328**(1): 227-34.
- Parmacek, M. S. and R. J. Solaro (2004). "Biology of the troponin complex in cardiac myocytes." Prog Cardiovasc Dis **47**(3): 159-76.
- Pasumarthi, K. B. and L. J. Field (2002). "Cardiomyocyte cell cycle regulation." Circ Res **90**(10): 1044-54.
- Peifer, M. and P. Polakis (2000). "Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus." Science **287**(5458): 1606-9.
- Petrich, B. G., J. D. Molkenkin, et al. (2003). "Temporal activation of c-Jun N-terminal kinase in adult transgenic heart via cre-loxP-mediated DNA recombination." Faseb J **17**(6): 749-51.
- Philippart, U., G. Schratz, et al. (2004). "The SRF target gene Fhl2 antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF." Mol Cell **16**(6): 867-80.
- Plageman, T. F., Jr. and K. E. Yutzey (2005). "T-box genes and heart development: putting the "T" in heart." Dev Dyn **232**(1): 11-20.
- Porrello, E. R., A. I. Mahmoud, et al. (2011). "Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart." Science **331**(6020): 1078-80.
- Prall, O. W., M. K. Menon, et al. (2007). "An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation." Cell **128**(5): 947-59.
- Qyang, Y., S. Martin-Puig, et al. (2007). "The renewal and differentiation of Isl1+ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/beta-catenin pathway." Cell Stem Cell **1**(2): 165-79.
- Rijsewijk, F., M. Schuermann, et al. (1987). "The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." Cell **50**(4): 649-57.
- Risebro, C. A., N. Smart, et al. (2006). "Hand1 regulates cardiomyocyte proliferation versus differentiation in the developing heart." Development **133**(22): 4595-606.
- Robbins, J., J. Gulick, et al. (1990). "Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro." J Biol Chem **265**(20): 11905-9.
- Rosenblatt-Velin, N., M. G. Lepore, et al. (2005). "FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes." J Clin Invest **115**(7): 1724-33.
- Rubart, M. and L. J. Field (2006). "Cell-based approaches for cardiac repair." Ann N Y Acad Sci **1080**: 34-48.
- Saga, Y., S. Miyagawa-Tomita, et al. (1999). "MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube." Development **126**(15): 3437-47.

- Salih, D. A., G. Tripathi, et al. (2004). "Insulin-like growth factor-binding protein 5 (Igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4314-9.
- Sanchez, A., W. K. Jones, et al. (1991). "Myosin heavy chain gene expression in mouse embryoid bodies. An in vitro developmental study." J Biol Chem **266**(33): 22419-26.
- Schafer, K., P. Neuhaus, et al. (2003). "The homeobox gene *Lbx1* specifies a subpopulation of cardiac neural crest necessary for normal heart development." Circ Res **92**(1): 73-80.
- Schneider, V. A. and M. Mercola (2001). "Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*." Genes Dev **15**(3): 304-15.
- Scholl, F. A., P. McLoughlin, et al. (2000). "DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis." J Cell Biol **151**(3): 495-506.
- Schug, J. (2008). "Using TESS to predict transcription factor binding sites in DNA sequence." Curr Protoc Bioinformatics **Chapter 2**: Unit 2 6.
- Shackelford, G. M., S. Shivakumar, et al. (1993). "Two wnt genes in *Caenorhabditis elegans*." Oncogene **8**(7): 1857-64.
- Skerjanc, I. S., H. Petropoulos, et al. (1998). "Myocyte enhancer factor 2C and Nkx2-5 up-regulate each other's expression and initiate cardiomyogenesis in P19 cells." J Biol Chem **273**(52): 34904-10.
- Stennard, F. A. and R. P. Harvey (2005). "T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart." Development **132**(22): 4897-910.
- Thyssen, G., T. H. Li, et al. (2006). "LZTS2 is a novel beta-catenin-interacting protein and regulates the nuclear export of beta-catenin." Mol Cell Biol **26**(23): 8857-67.
- Tzahor, E. (2007). "Wnt/beta-catenin signaling and cardiogenesis: timing does matter." Dev Cell **13**(1): 10-3.
- Ueno, S., G. Weidinger, et al. (2007). "Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(23): 9685-90.
- van der Heyden, M. A. and L. H. Defize (2003). "Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation." Cardiovasc Res **58**(2): 292-302.
- Vidarsson, H., J. Hyllner, et al. (2010). "Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes for in vitro and in vivo applications." Stem Cell Rev **6**(1): 108-20.
- Wan, S., A. P. Yim, et al. (2002). "Expression of FHL2 and cytokine messenger RNAs in human myocardium after cardiopulmonary bypass." Int J Cardiol **86**(2-3): 265-72.
- Wang, B., S. M. Haldar, et al. (2008). "The Kruppel-like factor KLF15 inhibits connective tissue growth factor (CTGF) expression in cardiac fibroblasts." J Mol Cell Cardiol **45**(2): 193-7.
- Way, J. C. and M. Chalfie (1988). "mec-3, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*." Cell **54**(1): 5-16.

- Wei, Y., C. A. Renard, et al. (2003). "Identification of the LIM protein FHL2 as a coactivator of beta-catenin." J Biol Chem **278**(7): 5188-94.
- Wixler, V., D. Geerts, et al. (2000). "The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several alpha and beta integrin chains and is recruited to adhesion complexes." J Biol Chem **275**(43): 33669-78.
- Wobus, A. M., K. Guan, et al. (2002). "Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation." Methods Mol Biol **185**: 127-56.
- Wobus, A. M., G. Wallukat, et al. (1991). "Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers." Differentiation **48**(3): 173-82.
- Yang, Y., J. Y. Min, et al. (2002). "VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells." J Appl Physiol **93**(3): 1140-51.
- Zelarayan, L., C. Gehrke, et al. (2007). "Role of beta-catenin in adult cardiac remodeling." Cell Cycle **6**(17): 2120-6.
- Zelarayan, L. C., C. Noack, et al. (2008). "Beta-Catenin downregulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(50): 19762-7.

9. Anhang

I Tabellen zum Methoden-Teil

Beispiel-Ansatz zur Reversen Transkription von RNA in cDNA

	Beispiel
1. RNA Konz ng/ μ l	281
total RNA 1 μ g in μ l	3,6
Oligo dT (500 μ g/ml)	1 μ l
H ₂ O	9,4 μ l
Σ	14 μ l

2.	5' 70°C
3.	5' 4°C

4. 5x Reaction Buffer	5 μ l
dNTPs	1,25 μ l
M-MLV RT(H-) (10.000Units)	1 μ l
H ₂ O	3,75 μ l
Σ	25 μ l

5.	10' 40°C
6.	50' 42°C
7.	15' 70°C
8.	4°C Pause

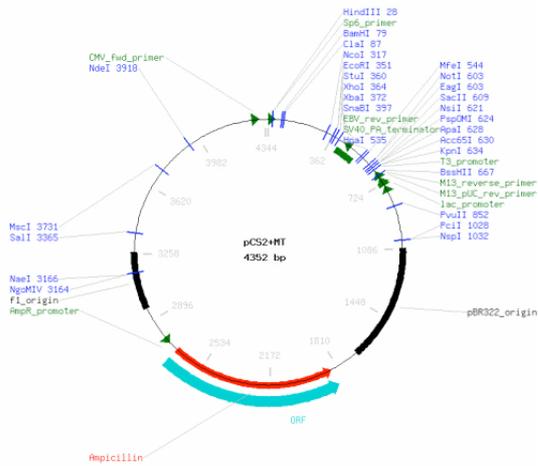
allgemeiner qRT-PCR Ansatz

GoTaq SYBR Green™ Master Mix 2x	10 μ l
sense Primer (3 pmol/ μ l)	2,0 μ l
antisense Primer (3 pmol/ μ l)	2,0 μ l
Calibration Dye	0,2 μ l
Nuclease-freies H ₂ O	4,8 μ l (Standard-DNA) bzw. 3,8 μ l (1:10 Verdünnung)
DNA	1,0 μ l (Standard-DNA) bzw. 2,0 μ l (1:10 Verdünnung)
Σ	20 μ l

qRT-PCR Programm für den iCycler (Fa. Biorad)

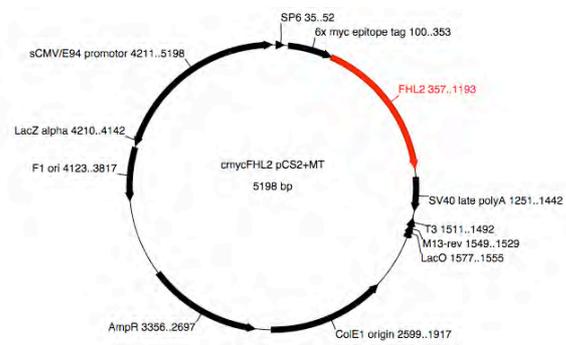
Cycle 1: (1X)		
Step 1:	95,0 °C	15:00
Cycle 2: (40X)		
Step 1:	95,0 °C	00:15
Step 2:	60,0 °C	00:30
Step 3:	72,0 °C	00:20
Cycle 3: (1X)		
Step 1:	95,0 °C	01:00
Cycle 4: (1X)		
Step 1:	55,0 °C bzw. 60,0 °C	01:00
Cycle 5: (80X)		
Step 1:	55,0 °C bzw. 60,0°C -94,5 °C	

pCS2+MT

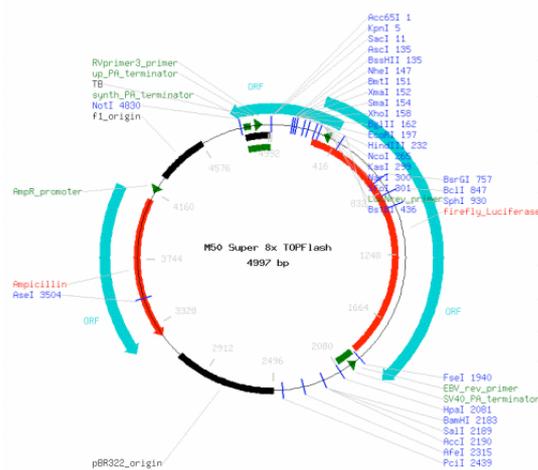


cmycFHL2/pCS2+MT

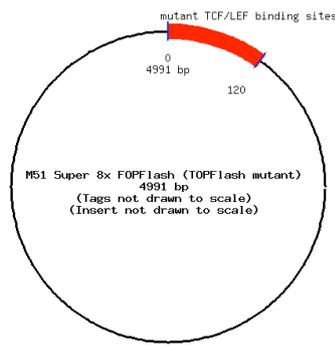
(zur Verfügung gestellt von Dr. Wixler)



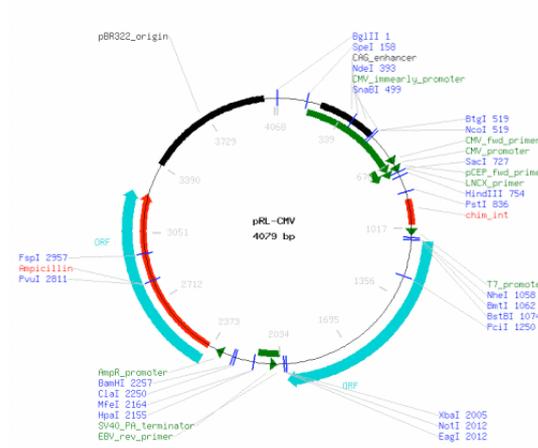
TOPflash



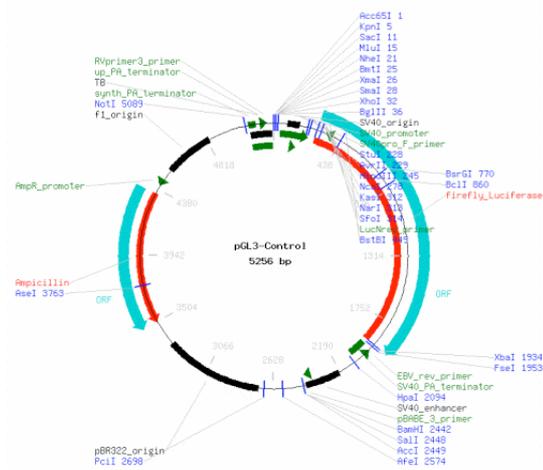
FOPflash



pRL-CMV



pGL3-control



Tbx5-Promotor Konstrukte (zur Verfügung gestellt von Dr. Maria-Patapia Zaferiou (UMG, Göttingen))

Chromosom: NCBI 36:12:113276118:113331630:-1 TBX5

Transkript der 5'-flankierende Region (Minus-Strang)

(5'-)

```

-1000  GGGTTGCGTTCTTGGCATCTGGGAGCAAACACGAGCCTCGGATTTGGGGACATATCGTTA      -941
-940   TTAACAGCTTGGGAAACGAAAGCGAAGCTCGGGGACGCACTGCAGCCTGGCTGAGAGAA      -881
-880   AGGACGCGGGTTGTGCTCTCTGGAAGCAAAGGGTCTGCGGCCAGCTGGCCTGGGAGCT      -821
-820   TGTGGCCGGCGCTGGAAGCTGCCCGCTCTCCCGCGGGCCTGACCTTGGCTCCCGCCGCA      -761
-760   GCTCTGCCGGCCGACTGCCTCCCCTGCACATTTTGTGTCGCGTTCCAGTCCCTTACAGGACCG      -701
-700   GGCCTGGAGCCAGGCCATGCTTCGGAAAGCCCTGGGGTGGGGACGCGCAAACCCAGA      -641
-640   ATCGAACCCGAAGCTGGGGCAAGTCCAGATTCAGACGTCCAGCTCCCTCGGGACCCCT      -581
-580   TGGCGGAGAACTTACCCTTCGGAAGGCCCGACGCTCTCCGGCTCTGTGCTGGGCAGGCC      -521
-520   TAGCTCTTCTCTCGCGCCA CCAGGGCGTCTACGCGGTACGTTTTGCAACTCAACCTAG      -461
-460   TGGGTTTCCAGCGGTGCGCAAAGTTTGCAGCATCCACCCTGCGCTGCTTAGAAATTG      -401
-400   TGCCATTGATCAGACTAAAAATAATAGTCGTCGTATTACAAAACAAAATAGAGTGCCT      -341
-340   CGTGCCCTCGGCGGGCCCTGGTACAATAATTATCTCTACAGAAACCACCTCTCTCCACTC      -281
-280   CCACCCCTACTCCACCACCCTCGCACCCCGCCCTGCCGGCCACTCTGGGACGAATT      -221
-220   GCATCTTTGGACCTTCTCTCCGCAAGGCACATTACGGAGAACTCCCTCTGTCTCGTGTCTC      -161
-160   CCCTCCACGACAACCCAGTAATTATTTCTATGCAAGTCTGCAAGAGGGCACTGAGTTATC      -101
-100   GCATCCAAGCCTAACCAGCTAGAGCGGCGCTCGGTATTCATTTGCCAGAGCTCCTCC      -41
- 40   GCGGGGATTTAAAAATAATAATAATAATAAGGATCCCATGCCTTATGCAAGAGACC      +20
+ 21   TCAGTCCCCCGAACAACCTCGATTTCTTCCAATAGAGGTCTGAGGTGGACTCC CAGGTC      +80
+ 81   CTTCTCGAAGACTT                                          (-3')

```

1st pair from -1000 to +95:

5'-GGGTTGCGTTCTTGGCATCTG-3' + XhoI (ctcgag) = 5'-tatactcgagGGGTTGCGTTCTTGGCATCTG-3'
(5'-CACCTCCCTTCGTGAAGAGTT-3') INVERT

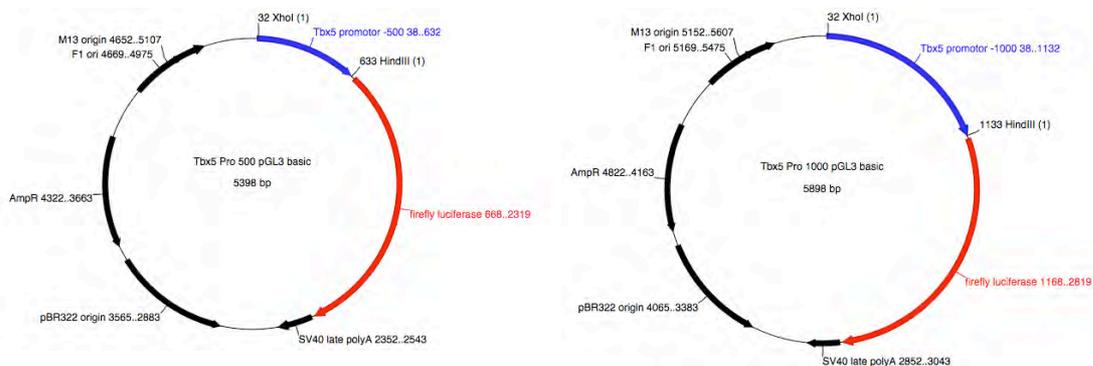
5'-AACTTTCACGAAGGGAGGTG-3' + HindIII (aagctt) = 5'-gcaagcttAACTTTCACGAAGGGAGGTG-3'

3rd pair from -500 to +95:

5'-CCAGGGCGTCTACGCGGTAC-3' + XhoI (ctcgag) = 5'-tatactcgagCCAGGGCGTCTACGCGGTAC-3'

5'-AACTTTCACGAAGGGAGGTG-3' + HindIII (aagctt) = 5'-gcaagcttAACTTTCACGAAGGGAGGTG-3'

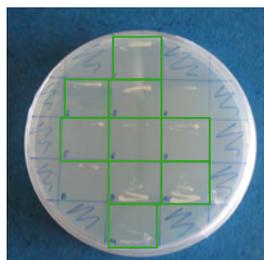
Die Promotorkonstrukte wurden mit XhoI und HindIII vor die firefly-Luciferase in den pGL3-Basisvektor kloniert. Somit ergaben sich die Konstrukte für den Tbx5-Minimalpromotor bis -500 bp und den Tbx5-Gesamtpromotor bis -1000 bp.



III Phänotypisierung der gefundenen Hefe-Zwei-Hybrid Klone (Beispiel)



gewachsene Klone auf SC -L/-T/-H + 25mM 3AT Platten



gepickte Klone auf SC -L/-T Platten
 → nur Klon 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10 und 11 sind gewachsen und werden weiter untersucht

Mittels „replica plate“ werden die gewachsenen Klone auf aminosäure-defiziente und YPAD-Platten ausgebracht. Die Auswertung der Phänotypen richten sich nach dem Wachstum auf den entsprechenden aminosäure-defizienten Platten und der Blaufärbung im X-Gal Assay.

SC -L/-T/-H + 25mM 3AT



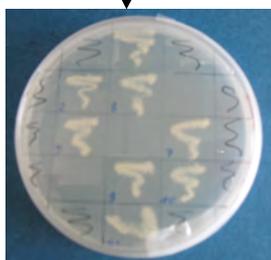
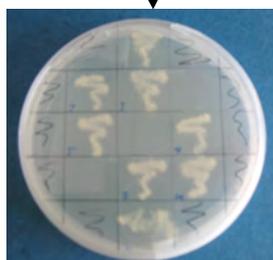
SC -L/-T/-URA



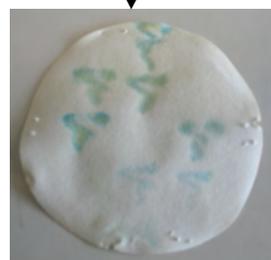
YPAD



„replica clean“



X-Gal Assay



	-L/-T	-L/-T/-H +25mM 3AT	-L/-T/-URA	YPAD	X-Gal	möglicher Interaktionspartner von β -Catenin
1	+	+	+	+	blau	ja
2	+	+	+	+	blau	ja
3	+	+	+	+	blau	ja
4	-	-	-	-	-	nein
5	+	+	+	+	blau	ja
6	-	-	-	-	-	nein
7	+	+	+	+	blau	ja
8	-	-	-	-	-	nein
9	+	+	+	+	blau	ja
10	+	+	+	+	blau	ja
11	+	+	+	+	blau	ja

+ Wachstum

- keine Wachstum

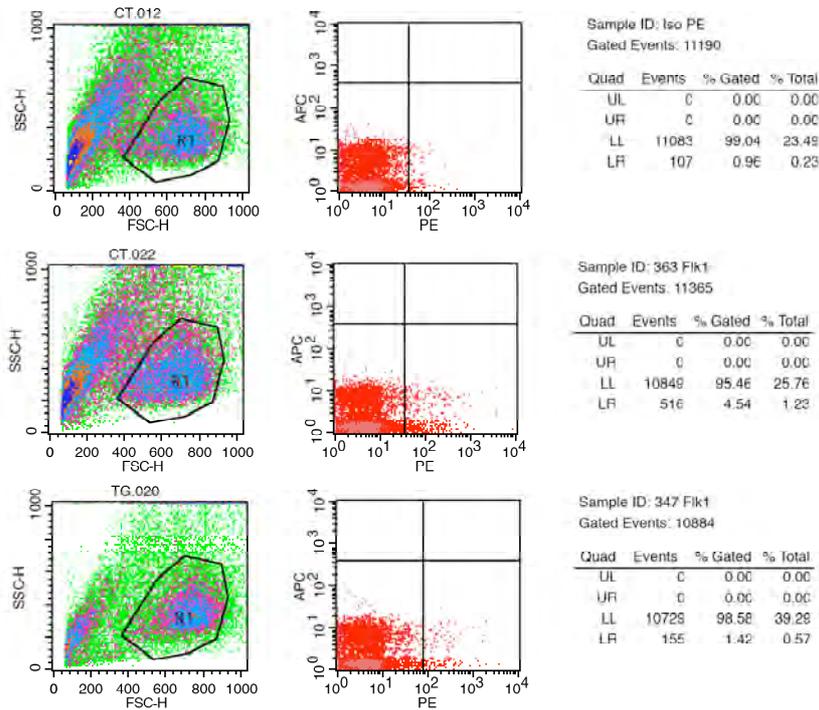
IV gefundene Klone aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System mit β -Catenin als Köder

Abk.	vollständiger Name	Haupt-Vorkommen	Gene-ID NCBI	Anzahl an gleichen Klonen >1
ACTN2	Actinin, alpha 2	Cytosol	88	3
ALDOA	Aldolase A (fructose-biphosphate)	Cytosol	103850	2
AMD1	adenosylmethionine decarboxylase 1	Cytosol	262	
AP3S1	adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit	Cytosol	1176	
APOD	apolipoprotein D	Cytosol	347	
ATIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	Cytosol	471	
CLU	clusterin	Cytosol	1191	
CRIP3	Cystein-rich protein	Cytosol	401262	
CSNK2B	casein kinase 2, beta polypeptide	Cytosol	1460	
EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	Cytosol	1937	
EEF1A2	euk. Translation Elongationsfaktor 1 a 2	Cytosol	1917	
FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1	Cytosol	2495	
HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	Cytosol	3315	2
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	Cytosol	3488	
ITPA	inosine triphosphatase (nucleoside triphosphate pyrophosphatase)	Cytosol	3704	
LDB3	LIM domain binding 3	Cytosol	11155	
LZTS2	leucine zipper, putative tumor suppressor 2	Cytosol	84445	
MB	myoglobin	Cytosol	4151	2
MIB2	mindbomb homolog 2 (Drosophila)	Cytosol	142678	
MYH7	Myosin heavy chain 7	Cytosol	4625	
MRCL3	myosin regulatory light chain MRCL3	Cytosol	10627	
MYH7	myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta	Cytosol	4625	2
MYL2	myosin light chain 2	Cytosol	4633	7
MYL3	myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	Cytosol	4634	
PGK1	phosphoglycerate kinase 1	Cytosol	5230	
PKM2	Pyruvat Kinase Muskel	Cytosol	5315	
PPP1R12B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	Cytosol	4660	
PRDX5	peroxiredoxin 5	Cytosol	25824	
PSMB 10	Proteasom subunit beta type 10	Cytosol	5699	
PTEN	phosphatase and tensin homolog	Cytosol	5728	
RPL15	ribosomal protein L15	Cytosol	6138	
RPLP2	ribosomal protein, large, P2	Cytosol	6181	
RPS14	ribosomal protein S14	Cytosol	6208	
SARS	seryl-tRNA synthetase	Cytosol	6301	
SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	Cytosol	23328	
TESK1	testis-specific kinase 1	Cytosol	7016	
THSD4	thrombospondin, type I, domain containing 4	Cytosol	79875	
TNIP2	TNFAIP3 interacting protein 2	Cytosol	7128	
TNNC1	troponin C type 1 (slow)	Cytosol	7134	
TNNI3	troponin I type 3 (cardiac)	Cytosol	7137	3
TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)	Cytosol	7139	3
TPM1	Tropomyosin 1a	Cytosol	7168	4

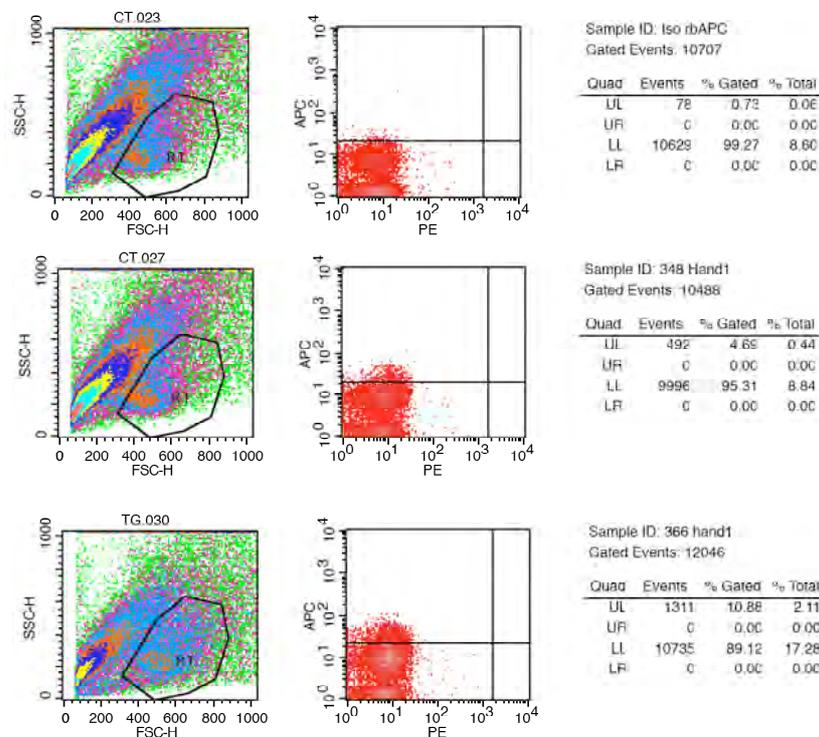
TSG101	tumor susceptibility gene 101	Cytosol	7251	
NPEPPS	aminopeptidase puromycin sensitive	Cytosol / Membran	9520	
CRYAB	crystallin, alpha B	Cytosol / Membran	1410	
PTTG1IP	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	Cytosol / Membran	754	
SERF2	small EDRK-rich factor 2	Cytosol / Membran	10169	
TPI 1	triosephosphate isomerase 1	Cytosol / Membran	7167	
ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1	Membran	70	
AIG1	androgen-induced 1	Membran	51390	
APLP2	Amyloid beta precursor-like protein 2	Membran	334	
ATP5O	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	Membran	539	
B2M	beta-2-microglobulin	Membran	567	
CD63	CD63 molecule	Membran	967	
CDS2	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 2	Membran	8760	
CLIC4	chloride intracellular channel 4	Membran	25932	
DES	Desmin	Membran	1674	7
FAM46A	family with sequence similarity 46, member A	Membran	55603	
FAT1	FAT tumor suppressor homolog 1	Membran	2195	
NINJ1	ninjurin 1	Membran	4814	
PAM	peptidylglycine a-amidating monooxygenase	Membran	5066	
RHOB	ras homolog gene family, member B	Membran	388	
RRAD	Ras-related associated with diabetes	Membran	6236	
SCARB2	scavenger receptor class B, member 2	Membran	949	
SNX1	sorting nexin 1	Membran	6642	
SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	Membran	6711	
SYNGR1	synaptogyrin 1	Membran	9145	
TFRC	transferrin receptor (p90, CD71)	Membran	7037	
TMEM55A	transmembrane protein 55A	Membran	55529	
TTN	titin	Membran	7273	
UBR3	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 3 (putative)	Membran	130507	
ALPK3	alpha-kinase 3/MIDORI	Nucleus	57538	
BZW2	basic leucine zipper and W2 domains 2	Nucleus	28969	
CUL4B	Cullin	Nucleus	8450	
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	Nucleus	2175	2
FHL2	four and a half LIM domains 2	Nucleus / Cytosol	2274	26
GPS 2	G protein pathway suppressor 2	Nucleus	2874	
KLF15	Kruppel-like factor 15	Nucleus	28999	
MKI67IP	(FHA domain) interacting nucleolar phosphoprotein	Nucleus	84365	
MLL2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	Nucleus	8085	
NCOR2	nuclear receptor co-repressor 2	Nucleus	9612	
PNRC1	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	Nucleus	10957	
TNKS	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase	Nucleus	8658	
USP22	ubiquitin specific peptidase 22	Nucleus	23326	
YBX 1	Y box binding protein 1	Nucleus	4904	

V FACS-Analyse der α MHC^{merCremer} / Tbx5^{delEx3/+}-Tiere acht Wochen nach Tamoxifen-Injektion

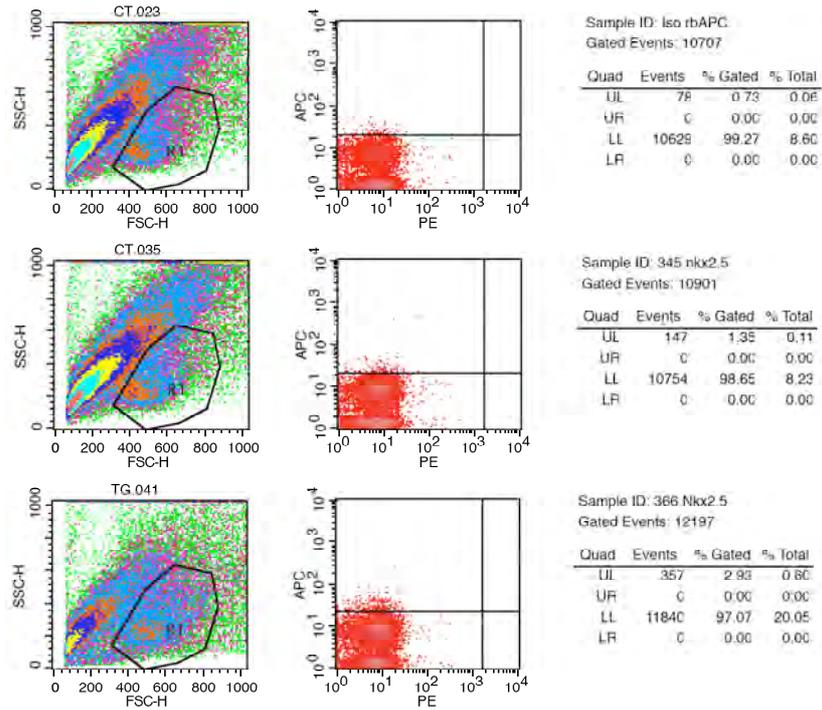
1. Flk1



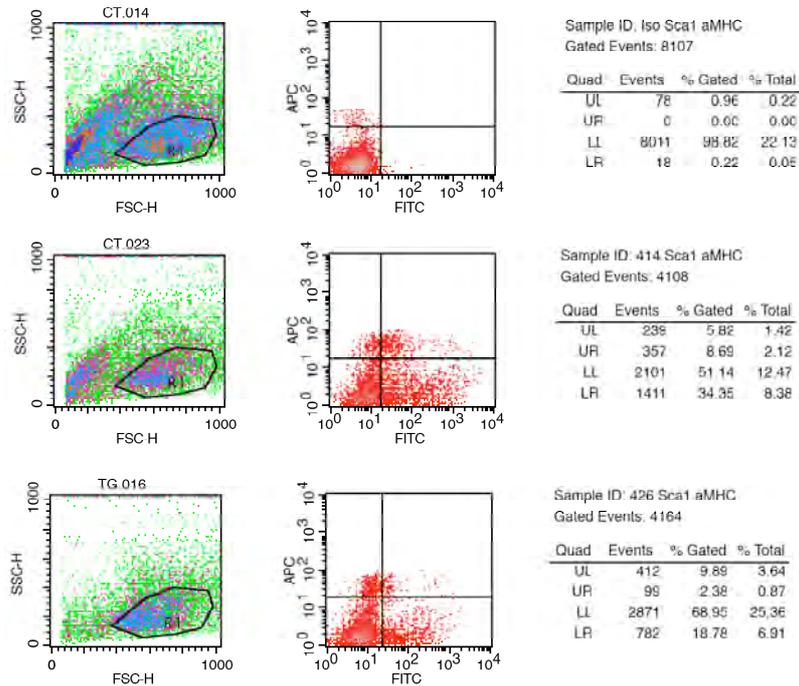
2. ehand(1)



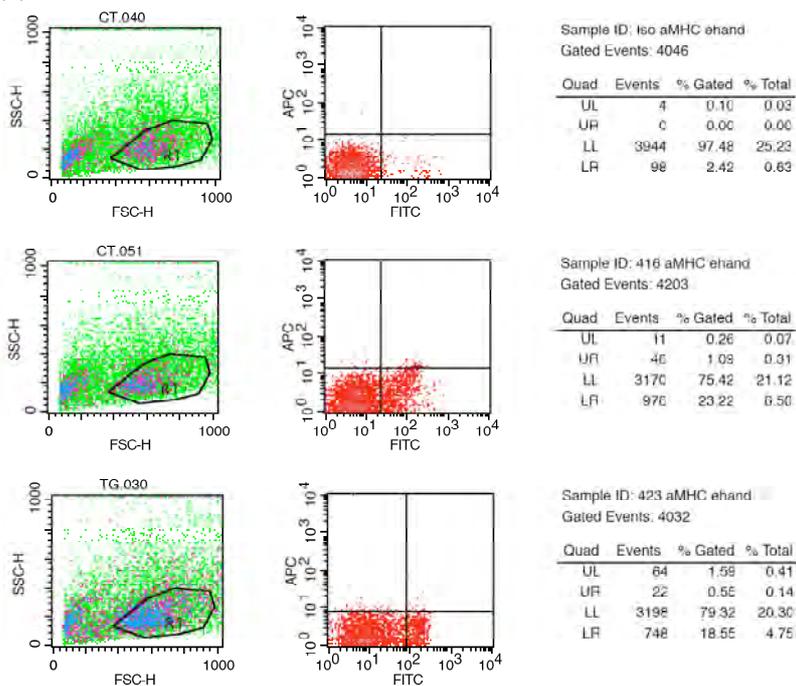
3. Nkx2.5



4. Sca1 / α MHC



5. aMHC / ehand(1)



VI Anzahl der Experimente und untersuchten Proben der ECC- und mESC-Differenzierungsassays,
sowie die Anzahl der α MHC^{merCremer} / Tbx5^{delEx3/+}-Tiere pro untersuchter Gruppe (n-Zahl)

Experiment	Zeitraum	Methode zur Auswertung	n-Zahl der untersuchten Proben
P19 <i>in vitro</i> Differenzierungsassay	24 Stunden	qRT-PCR	6
	48 Stunden	qRT-PCR	6
	3.5 d EB	qRT-PCR	3
	10 d EB	qRT-PCR	12
	10 d EB (ohne Diff. Medium)	qRT-PCR	5
	gesamtes Experiment		10
mESC <i>in vitro</i> Differenzierungsassay	3 d EB	qRT-PCR	6
	7 d EB	qRT-PCR	6
	11 d EB	qRT-PCR	6
	16 d EB	qRT-PCR	6
	gesamtes Experiment		10

Experiment	Methode	untersuchte(s) Gen(e)	n-Zahl der CTL - Tiere	n-Zahl der TG - Tiere
α MHC ^{merCremer} / Tbx5 ^{delEx3/+}	FACS- Analyse (basal)	Flk1	10	10
		ehand(1)	10	10
		Nkx2.5	10	10
		Sca1 / α MHC	12	7
		α MHC / ehand(1)	12	7
	ECHO (basal)	-	8	8

10. Veröffentlichungen

Publikationen:

Zafiriou MP, Zelarayan LC, Noack C, **Renger A**, Nigam S, Siafaka-Kapadai A.: „Hepoxilin A(3) protects β -cells from apoptosis in contrast to its precursor, 12-Hydroperoxy-eicosatetraenoic acid.“ *Biochim Biophys Acta*. **2011** Mar 17. [Epub ahead of print]

Zelarayan L, **Renger A**, Noack C, Zafiriou MP, Gehrke C, van der Nagel R, Dietz R, de Windt L, Bergmann MW: „NF-kappaB activation is required for adaptive cardiac hypertrophy.“ *Cardiovasc Res*. **2009** Dec 1;84(3):416-24. Epub 2009 Jul 20

Zelarayán LC, Noack C, Sekkali B, Kmecova J, Gehrke C, **Renger A**, Zafiriou MP, van der Nagel R, Dietz R, de Windt LJ, Balligand JL, Bergmann MW: „Beta-Catenin downregulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation“; *Proc Natl Acad Sci USA*. **2008** Dec 16;105(50):19762-7. Epub 2008 Dec 10.

Aktive Kongress-Teilnahme:

- „Basic Science Meeting“ anlässlich der Herbsttagung und Jahrestagung der Arbeitsgruppe „Rhythmologie“ der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) **2011**, Düsseldorf, Deutschland (Poster-Präsentation)
- Annual meeting of the Working Groups on "Myocardial Function" and "Cellular Biology of the Heart" **2011**, Varenna, Italien (Poster-Präsentation)
- Heart Failure Association Winter Research Meeting **2011**, Les Diablerets, Schweiz, (Poster-Präsentation)
- PhD Symposium „Horizons in Molecular Biology“ **2010**, Göttingen, Deutschland, (Poster-Präsentation und Vortrag)
- European Society of Cardiology Meeting „Frontiers in Cardiovascular Biology“ **2010**, Berlin, Deutschland, (Vortrag)
- The 8th Annual Meeting of the Dutch-German Molecular Cardiology Working Groups **2010**, Rotterdam, Niederlande, (Poster-Präsentation)
- 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) **2009**, Mannheim, Deutschland (Poster-Präsentation)

Auszeichnungen:

1. Preis „Student Talk“ beim PhD Symposium „Horizons in Molecular Biology“ **2010**, Göttingen, Deutschland

11. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und Chefin Dr. Laura Zelarayán-Behrend, die mich zunächst in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Martin W. Bergmann am Max-Delbrück-Centrum betreut hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihr wissenschaftliches Fachwissen und meine Forscher-Neugier waren immer wieder die Grundlage für neue experimentelle Ideen. Vielen Dank auch für die Möglichkeit, dass ich meine Arbeit in ihrer eigenen Arbeitsgruppe in der Abteilung Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen weiter fortsetzen durfte und dort fachlich ein breites Spektrum an Möglichkeiten hatte, um meine Ideen umzusetzen. Und ich bedanke mich dafür, dass sie speziell in der heißen Phase vor der Abgabe meiner Arbeit (trotz der großen Entfernung) bei Fragen immer zur Verfügung stand!

Darüber hinaus gilt mein Dank PD Dr. Martin W. Bergmann in dessen Arbeitsgruppe ich am Max-Delbrück-Centrum zunächst als studentische Hilfskraft den Einstieg in das spannende Feld der molekularen Kardiologie gefunden habe und der mir die Möglichkeit gegeben hat nach meiner Diplomarbeit meine Forschung auf diesem Gebiet auch in meiner Promotionsarbeit weiter fortzusetzen.

Ausserdem möchte ich mich bei der gesamten Abteilung Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfram H. Zimmermann für die Möglichkeit bedanken mit embryonalen Stammzellen zu arbeiten und mir in dieser Hinsicht fachlich stets zur Seite gestanden haben. Mein besonderer Dank gilt dabei vor allem Prof. Dr. Ali El-Armouche für seine Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Simone Spuler bedanken, die ebenfalls bereit war meine Arbeit zu begutachten.

Meiner „Leidensgenossin“ und Kollegin Claudia Noack möchte ich für die vielen interessanten fachlichen und privaten Gespräche und den Austausch von Wissen und Methoden danken.

Maria-Patapia Zafiriou danke ich ebenfalls für die fachliche Unterstützung während meiner Arbeit sowohl am Max-Delbrück-Centrum als auch in der Abteilung Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Ein ganz großer Dank gilt auch Bärbel Pohl, die stets im Labor alles ordentlich gehalten hat ☺ und mir viel bei Vorbereitungen geholfen hat.

Ein ganz liebes Dankeschön geht an J.J. und T.W., die mir beide in so manch schwieriger Zeit immer beigestanden haben, mich oft ermutigt haben nicht aufzugeben und mir genügend Ablenkung verschafft habe, um nicht gänzlich als Labor-Maus zu enden ☺. Vielen, vielen Dank!

Und ich möchte meinen Eltern, meinen Geschwistern und Familie und meiner lieben Omi danken. Sie alle waren stets an meiner Seite und immer interessiert an meiner Arbeit, auch wenn sie vieles nicht verstanden haben. Aber allein den Versuch rechne ich ihnen hoch an ☺. Auch euch vielen, vielen Dank!

Ich bin stolz, dass ich das geschafft habe!

13. Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die zur Promotion an der Freien Universität Berlin eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Analyse von kardialen Wnt/ β -Catenin Interaktionspartnern bezüglich ihrer Möglichkeit, die embryonale Kardiogenese zu aktivieren“

in der Abteilung „Klinische und Molekulare Kardiologie“ am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin unter der Leitung von Prof. Rainer Dietz, sowie in der Abteilung für Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann und unter Anleitung von Dr. Laura Zelarayán-Behrend selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

.....

Anke Renger

Berlin, den 20.12.2011