

Aus der Klinik für Neonatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wechselwirkungen der Transkriptionsmodulatoren Wt1, Gata4 und Retinsäure  
mit dem Erythropoietin/Erythropoietin-Rezeptor-System  
des embryonalen Herzens der Maus

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Monique Lau  
aus Eisenhüttenstadt

Datum der Promotion: 04.06.2021

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>4</b>
<b>1 ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
2.1 DIE ENTWICKLUNG DES HERZENS .....	7
2.2 GATA4.....	8
2.3 WT1 .....	12
2.4 RETINSÄURE.....	14
2.5 ERYTHROPOIETIN (EPO) UND SEIN REZEPTOR (EPOR).....	16
2.6 ZIELSETZUNG.....	19
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
3.1 <i>EX VIVO</i> ORGANKULTUREN DES SICH ENTWICKELNDEN HERZENS DER MAUS.....	20
3.2 RNA UND CDNA PRÄPARATION .....	21
3.3 QUANTITATIVE PCR .....	21
3.4 PROTEIN-AUFREINIGUNG .....	23
3.5 IMMUNOBLOT.....	23
3.6 STATISTISCHE ANALYSE .....	25
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>26</b>
4.1 DER EINFLUSS VON RETINSÄURE AUF DIE <i>EPO-REZEPTOR</i> -EXPRESSION .....	26
4.2 REGULATION DER <i>EPO-REZEPTOR</i> -EXPRESSION DURCH DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR <i>WT1</i> IM SICH ENTWICKELNDEN MURINEN HERZ .....	27
4.3 REGULATION DER <i>EPO-REZEPTOR</i> -EXPRESSION DURCH DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR <i>WT1</i> IM EPIKARD DES SICH ENTWICKELNDEN MURINEN HERZENS.....	29
4.4 REGULATION DER <i>EPO-REZEPTOR</i> -EXPRESSION DURCH DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR <i>GATA4</i> DES SICH ENTWICKELNDEN MURINEN HERZENS .....	29
4.5 REGULATION DER <i>EPO-REZEPTOR</i> -EXPRESSION DURCH DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR <i>GATA4</i> BEI GLEICHZEITIGER RETINSÄURE-BEHANDLUNG DES SICH ENTWICKELNDEN MURINEN HERZENS.....	30
4.6 EINFLUSS EINER BEHANDLUNG MIT REKOMBINANTEM ERYTHROPOIETIN (rHEPO) AUF DIE <i>WT1</i> - UND <i>GATA4</i> -EXPRESSION DES SICH ENTWICKELNDEN MURINEN HERZENS.....	33
<b>5 DISKUSSION</b> .....	<b>34</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>38</b>
<b>7 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b> .....	<b>43</b>
<b>8 LEBENS LAUF</b> .....	<b>44</b>
<b>9 DANKSAGUNG</b> .....	<b>46</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1.	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VITAMIN A-STOFFWECHSELS .....	15
ABBILDUNG 2.	MURINES HERZ IM ENTWICKLUNGSSTADIUM E12.5. ....	20
ABBILDUNG 3.	EPOR-EXPRESSION IN MURINEN EMBRYONALEN HERZEN NACH RETINSÄURE-BEHANDLUNG.....	27
ABBILDUNG 4.	EPOR-EXPRESSION IN MURINEN EMBRYONALEN HERZEN E12.5 IN ABHÄNGIGKEIT DER WT1- EXPRESSION .....	28
ABBILDUNG 5.	EPOR-EXPRESSION IN MURINEN EMBRYONALEN EPIKARDZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER WT1- KONZENTRATION .....	29
ABBILDUNG 6.	EPOR-EXPRESSION IN MURINEN EMBRYONALEN HERZEN E12.5 IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GATA4-KONZENTRATION .....	30
ABBILDUNG 7.	EPOR-EXPRESSION IN MURINEN EMBRYONALEN HERZEN E12.5 IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GATA4-KONZENTRATION BEI GLEICHZEITIGER RETINSÄURE-BEHANDLUNG.....	32
ABBILDUNG 8.	WT1- UND GATA4-EXPRESSION IN MURINEN EMBRYONALEN HERZEN E12.5 BEI BEHANDLUNG MIT UNTERSCHIEDLICHEN rHEPO-KONZENTRATIONEN .....	33

### TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1:	TYPISCHE BZW. HÄUFIGE BEISPIELE BEKANNTER PHÄNOTYPEN BEI MUTATION DER HUMANEN GATA-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN (16).....	10
TABELLE 2.	PRIMER FÜR DIE QUANTITATIVE PCR MIT SYBR GREEN (MWG EUROFINS) .....	22
TABELLE 3.	PRIMER UND HYBRIDISIERUNGSSONDEN FÜR DIE QUANTITATIVE PCR. DER FIRMA TIB MOLBIOL GEBÜHRT DANK FÜR DAS DESIGN DES BETA-AKTIN-ASSAYS. ....	23
TABELLE 4.	VERWENDETE PRIMÄRE UND SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER .....	25

## Abkürzungsverzeichnis

atRA	<i>all-trans</i> Retinsäure (Synonym RA)
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-X	<i>B-cell lymphoma X</i>
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CYP	<i>Cytochrom P450</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dpc	<i>days post coitum</i>
Epo	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietin-Rezeptor
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
FW	<i>Forward</i>
GATA	Gata-Transkriptionsfaktor
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
Nkx2.5	<i>NK2 Homeobox 5</i>
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	<i>not significant</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RA	<i>(all-trans)</i> Retinsäure
RALDH2	Retinaldehyd-Dehydrogenase 2
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
RARE	<i>Retinoic Acid Response Element</i>
RBP	<i>Retinoic Binding Protein</i>
rhEpo	<i>recombinant human</i> Erythropoietin
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RV	<i>Reverse</i>
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VSD	Ventrikelseptumdefekt
WT1	Wilms-Tumorsuppressor 1

## 1 Abstract

**Einleitung:** Die kausale Therapie herzkranker Patienten ist Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte. Eine Strategie ist die Reaktivierung embryonaler kardialer Entwicklungsprogramme, die durch molekulare Faktoren wie beispielsweise die Transkriptionsfaktoren Gata4 und Wt1 sowie das Erythropoietin (Epo)/Erythropoietin-Rezeptor (EpoR)-System dominiert und möglicherweise durch gleichzeitige Retinsäure-Behandlung verstärkt werden.

**Fragestellung:** Das Herz aktiviert bei hypoxisch-ischämischer Schädigung unterschiedliche endogene Schutzmechanismen, die jedoch alleine nicht vor einem ungünstigen *Remodeling* bewahren. In dieser Arbeit soll die Interaktion von kardialen Transkriptionsfaktoren mit dem Epo/EpoR-System in Abhängigkeit von einer Retinsäure-Behandlung untersucht werden.

**Material und Methoden:** Hierzu wurde das Modell einer *ex vivo* Organkultur des embryonalen Herzens der Maus zum Entwicklungszeitpunkt E12.5 verwendet. Mit Hilfe von *Knockdown*-Technik wurde der Einfluss der Transkriptionsfaktoren Gata4 und Wt1 sowie einer Retinsäure-Behandlung auf die *EpoR*-Expression untersucht.

**Ergebnisse:** Zum Entwicklungszeitpunkt E12.5 konnte nach Retinsäure-Behandlung eine signifikante Zunahme der *EpoR*-mRNA-Expression gemessen werden. Eine durch *Knockdown* reduzierte Wt1-Expression führte zu keiner Veränderung in der *EpoR*-Expression. Ein *Knockdown* von Gata4 führte zu einer signifikant verminderten *EpoR*-Expression. Dieser Effekt war unabhängig von der Wirkung einer alleinigen Retinsäure-Behandlung. Eine Behandlung mit rekombinantem humanem Epo (rhEpo) führte zu keiner Änderung der Wt1- bzw. Gata4-Expression.

**Fazit:** Die *EpoR*-Expression im embryonalen Herzen scheint nicht Wt1-abhängig reguliert zu sein. Sowohl Retinsäure als auch Gata4 regulieren die *EpoR*-Expression, jedoch unabhängig voneinander. Eine exogene rhEpo-Applikation hatte keinen Einfluss auf die Expression der Transkriptionsfaktoren Gata4 und Wt1. Insgesamt zeigte sich, dass der Transkriptionsfaktor Gata4 für die basale *EpoR*-Expression im embryonalen Herzmuskel essenziell ist, sich dieser Effekt jedoch nicht durch Retinsäure-Behandlung verstärken ließ.

## Abstract

**Introduction:** Many research projects focus on causative therapeutic strategies for patients with heart disease. One of these strategies is the reactivation of developmental programs of the embryonic heart. On the molecular level, these programs are regulated by transcription factors like Gata4 and Wt1 as well as the erythropoietin (Epo)/erythropoietin receptor (EpoR) system. Their individual effects might even be enhanced by parallel application of retinoic acid.

**Research aim:** The heart activates endogenous protective mechanisms after hypoxic-ischemic damage but on their own, those are unable to prevent unfavorable *Remodeling*. Therefore, the interplay between the Epo/EpoR system and the cardiac transcription factors Wt1 and Gata4 and their dependence on retinoic acid treatment was investigated.

**Materials and methods:** An *ex vivo* organ culture model of the embryonic mouse heart at the gestational age of E12.5 was used. The influence of the transcription factors Gata4 and Wt1 and retinoic acid treatment on *EpoR* expression was studied by knockdown of the transcription factor proteins.

**Results:** Retinoic acid treatment at E12.5 lead to a significant increase in *EpoR* mRNA expression. This was unaffected by knockdown of Wt1. A Gata4 knockdown, in contrast, significantly reduced *EpoR* expression. This effect was independent from the effect of retinoic acid treatment alone, which resulted in a significantly increased *EpoR* expression in cardiac organ cultures. Treatment with recombinant human Epo (rhEpo) did not change the expression of the transcription factors Gata4 and Wt1.

**Conclusions:** *EpoR* expression in the embryonic heart does not seem to be regulated in a Wt1-dependent manner. Retinoic acid and Gata4 regulate *EpoR* expression independently from each other. Treatment with rhEpo did not modulate Gata4 nor Wt1 levels.

In summary, the data show that normal expression levels of the transcription factor Gata4 are essential for embryonic cardiac *EpoR* expression, but this effect can not be further enhanced by retinoic acid treatment.

## 2 Einleitung

Die Therapie herzkranker Patienten nach endo- oder exogener kardialer Schädigung ist von enormer klinischer Relevanz. Gängige Therapiestrategien sind nach wie vor interventionelle oder operative Verfahren sowie die Pharmakotherapie basierend auf unterschiedlichen Wirkmechanismen am Herzmuskel und dessen Gefäßen.

Neben der extremen Frühgeburt und dem *Sudden Infant death Syndrome* als Haupttodesursachen im ersten Lebensjahr machen angeborene Herzerkrankungen mit schätzungsweise 1-2 % weitere Todesursachen aus (1). Im adulten Herzen spielen unterschiedliche Faktoren eine wichtige Rolle bei Regenerationsprozessen nach endogener Schädigung, z.B. bei Myokardinfarkt, oder exogener Schädigung, z.B. aufgrund einiger Chemotherapeutika. Nach heutigem Stand der Wissenschaft sind humane Kardiomyozyten nach deren Schädigung nicht in der Lage sich zu regenerieren. Stattdessen werden nekrotische Kardiomyozyten durch nicht-kontraktilen Narbengewebe ersetzt (2). Diesem Mechanismus mit einer kausalen Therapiestrategie zu begegnen, ist Ziel vieler Forschungsansätze, mit denen ein pathologisches kardiales *Remodeling* vermindert werden soll.

Gegenstand der Forschung sind u.a. molekulare Mechanismen, die für die Herzentwicklung maßgeblich sowie nach kardialer Schädigung an Regenerationsprozessen beteiligt sind (3). Ein grundlegendes Prinzip für die Regeneration nach abgeschlossener Kardiogenese scheint die Reaktivierung embryonaler transkriptioneller Entwicklungsprogramme zu sein (2). Einige daran beteiligte und bereits identifizierte Faktoren sind beispielsweise der Transkriptionsfaktor Gata4 und dessen Kofaktor Nkx2.5, deren Mutation mit Fallot-Tetralogie, Septumdefekten, persistierendem Truncus arteriosus sowie Leitungsanomalien des Herzens assoziiert werden (1, 3-5). Versteht man nicht nur die strukturellen, sondern auch die molekularen Mechanismen der normalen Herzentwicklung, könnten diese Erkenntnisse zur Entwicklung neuer Therapiestrategien beitragen.

### 2.1 Die Entwicklung des Herzens

Das Herz-Kreislaufsystem ist während der humanen Embryonalentwicklung sehr früh funktionsfähig und arbeitet bereits am Ende der dritten Entwicklungswoche. Das Herz entwickelt sich aus kardiogenem Mesoderm, welches zunächst als paarige Herzanlagen jeweils

vor und seitlich der Neuralplatte liegt. Mit beginnender kraniokaudaler sowie seitlicher Abfaltung des Embryos wandern und fusionieren sie ventral zur unpaaren Herzanlage. Dieser embryonale Herzschlauch besteht aus drei Gewebeschichten: Endokard, Extrazellulärmatrix und Myokard. Das Epikard, also das viszerale (innere) Blatt des Herzbeutels (Perikard) wird von Zellen des Septum transversum (Trennwand zwischen embryonalem Thorax und Abdomen) gebildet, welche von dort auswandern und das Myokard überziehen. Durch Längenzunahme ab der vierten Entwicklungswoche krümmt sich dieser tubuläre Herzschlauch zur sog. Herzschleife, die sich durch lokale Aussackungen und Einschnürungen in die Vorstufen der später definitiven Herzabschnitte gliedert. Durch Septierungen im Bereich der Ventrikel, Vorhöfe und der Ausflussbahn erfolgt die definitive Unterteilung der Strombahn in die des „rechten“ und „linken“ Herzens, wodurch vier Kammern entstehen. Die Trennung des Atrioventrikularkanal erfolgt durch Bildung sog. Endokardkissen, lokale Verdickungen der Extrazellulärmatrix, die mittig auf Höhe des atrioventrikulären Übergangs von dorsal und ventral kommend verschmelzen und die Strombahn somit gleichzeitig in eine rechte und linke Seite unterteilen. Aus ihnen entwickeln sich später die Atrioventrikular- sowie die Taschenklappen. Durch Einwachsen von Septen erfolgt die Trennung der Vorhöfe und Ventrikel. Erst unmittelbar nach der Geburt, mit Einsetzen des Lungenkreislaufes, erfolgt die endgültige funktionelle Trennung der beiden Vorhöfe durch Verschluss des Foramen ovale, womit der postnatale Blutkreislauf etabliert wird (6, 7).

Da die humane Herzentwicklung im Wesentlichen mit der der Maus vergleichbar ist (8), gilt die Maus in der Grundlagenforschung als geeignetes Modell. Sowohl im Mausmodell als auch bei der humanen Herzentwicklung wurden molekulare Faktoren identifiziert, die maßgeblich an der normalen Herzentwicklung beteiligt sind. Zu diesen Faktoren gehören u.a. die Gata-Transkriptionsfaktoren sowie der ebenfalls als Transkriptionsfaktor wirkende Wilms-Tumorsuppressor 1 (Wt1).

## **2.2 Gata4**

Die Entwicklung des Herzens ist durch zahlreiche signalgebende Faktoren reguliert. Hierbei spielen Transkriptionsfaktoren, wie die Mitglieder der Gata-Familie, eine wesentliche Rolle. Zu



dieser Familie gehören bei den Vertebraten sechs Mitglieder (3, 9). Ihnen gemeinsam ist eine hoch konservierte DNA-bindende Region, bestehend aus zwei Zinkfinger-Motiven, wobei der C-terminale Zinkfinger direkt an die namensgebende Nukleotid-Sequenz (A/T)GATA(A/G), das sogenannte Gata-Motiv, im Promoter ihrer Zielgene bindet (9). Sie spielen als „Masterregulatoren“ eine zentrale Rolle bei der Zelldifferenzierung und Determination in der Gewebeentwicklung (3, 9). Ein Auszug bekannter Phänotypen bei Mutation der humanen Gata-Transkriptionsfaktoren ist in Tabelle 1 dargestellt.

Die Gata-Familie lässt sich in zwei Subgruppen unterteilen: Die Transkriptionsfaktoren Gata1, -2 und -3 sind vor allem bei hämatopoietischen Prozessen wie der Proliferation und Differenzierung erythroider und myeloider Zellen sowie von T-Helferzellen relevant (10). Gata4, -5 und -6 aus der zweiten Subgruppe werden vor allem in endo- und mesodermalen Geweben wie Herz, Leber, Lunge, Gonaden und Darm exprimiert (9, 11-13). Im adulten Herzen wird Gata4 im Endo- sowie im Myokard exprimiert, Gata5 lediglich im atrialen Endokard und Gata6 im Myokard sowie in glatter Gefäßmuskulatur (1, 6, 14). Interessanterweise sind diese drei letztgenannten Gata-Transkriptionsfaktoren zu rund 85 % identisch in ihrer Aminosäuresequenz des DNA-bindenden Zinkfinger Motivs (9, 14). Sie zeigen jedoch unterschiedliche Affinitäten zu Promotoren, Kofaktoren oder anderen Transkriptionsfaktoren (9, 14). Da Gata4 und -6 beide von Myokardzellen exprimiert werden, verwundert es nicht, dass sie beim Ab- bzw. Ausfall eines Faktors dessen Aufgaben teilweise kompensieren können, wohingegen Gata5 beim Ausfall von Gata4 nicht kompensatorisch wirken kann, da es im adulten Herzen nur im Endokard exprimiert wird (3, 14). So wird Gata6 in *Gata4-Knockout*-Mäusen kompensatorisch induziert, und es finden sich auch hier ausdifferenzierte Myokardzellen (14). Allerdings scheint Gata6 vorrangig für die Proliferation kardialer Vorläuferzellen verantwortlich zu sein, während Gata4 auch die terminale Zelldifferenzierung initiiert (14). So können z.B. *Gata4*-defiziente Kardiomyozyten nicht ausdifferenzieren. Sie stehen im Stadium des Kardioblasten unter Zellzyklusarrest und gehen dann in Apoptose (15).

Tabelle 1: Typische bzw. häufige Beispiele bekannter Phänotypen bei Mutation der humanen Gata-Transkriptionsfaktoren (16)

Transkriptionsfaktor	Phänotyp aufgrund unterschiedlicher Genmutationen	OMIM-ID
Gata1	X-chromosomale Anämie mit oder ohne Neutropenie und/oder Thrombozytenfunktionsstörung X-chromosomale Thrombozytopenie mit $\beta$ -Thalassämie X-chromosomale Thrombozytopenie mit oder ohne dyserythroetische Anämie	305371
Gata2	Leukämien und aplastische Anämie Emberger Syndrom Immunschwäche Aktue myeloische Leukämie Myelodysplastisches Syndrom	137295
Gata3	Hypoparathyreodismus Sensorineurale Taubheit Nierendysplasie	131320
Gata4	Atrio-ventrikulärer Kanal Atrium- und Ventrikelseptumdefekte Fallot-Tetralogie Testikuläre Fehlbildungen mit oder ohne angeborene Herzerkrankungen	600576
Gata5	Atrium- und Ventrikelseptumdefekte Fallot-Tetralogie <i>double-outlet right ventricle</i> Aortenstenose	611496
Gata6	Atriumseptumdefekt Atrio-ventrikulärer Kanal Pankreasagenesie und angeborene Herzdefekte Persistierender Truncus arteriosus Fallot-Tetralogie	601656

Gata4 agiert zusammen mit einem weiteren wichtigen Transkriptionsfaktor, Nkx2.5, der für die normale Herzentwicklung ebenfalls essenziell ist (14, 17). Nkx2.5 bindet als Kofaktor am C-terminalen Zinkfingermotiv von Gata4, das dadurch eine Konformationsänderung erfährt und seine Aktivierungsdomäne freisetzt (14, 17). Mutationen des humanen *GATA4*-Gens resultieren in verminderter Bindung an Nkx2.5 und führen zu angeborenen Septumdefekten und Leitungsanomalien des Herzens (4). Eine gestörte Interaktion von Gata4 und Nkx2.5 kann nicht durch Gata6 übernommen werden (14). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb *Gata4-Knockout*-Mäuse trotz Gata6-Induktion während der Embryonalentwicklung zwischen dem 8./9.

Tag *post coitum* aufgrund einer fehlenden Ausbildung eines tubulären Herzschlauches, der fehlenden Ausdifferenzierung kardialer Zellen und einer massiven Apoptose von Vorläuferzellen versterben (6, 9, 14, 18). Gata4 wirkt dosisabhängig und kann selbst bei 50%iger Reduktion noch zu einer normalen Herzentwicklung ohne hämodynamische Nachteile postnatal beitragen (19). Eine Expressionsreduktion unterhalb dieses Niveaus resultiert in o.g. Fehlbildungen (19). Gata4 spielt aber nicht nur während der embryonalen Herzentwicklung eine wichtige Rolle, sondern fungiert auch im adulten Herzen als wichtiger Mediator zur Aufrechterhaltung der Herzfunktion, besonders der Kardiomyozyten nach Schädigungen durch Druck-, Volumenüberladung oder Medikamente (3, 20-22). Die Behandlung mit Chemotherapeutika wie z.B. dem Anthracyclin Doxorubicin bewirkt eine Gata4-Depletion (3, 20-22). Dies kann in Hypertrophie, myokardialer Fibrose, verminderter Anzahl an Myokardzellen und schlussendlich deren Apoptose münden (20-22). Im Mausmodell bedingt die Gata4-Heterozygotie eine verminderte Kardiomyozytenzahl und eine damit verbundene kongenitale myokardiale Hypoplasie, die sich als leichte systolische und diastolische Dysfunktion äußert (20, 21). In Folge dieser Dysfunktion besteht eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Doxorubicin-induzierter Kardiotoxizität und Druck-/Volumenbelastung (20, 21). Die Gata4-Überexpression wirkt schützend, da sie mit verminderter Apoptose von Kardiomyozyten und myokardialer Fibrose einhergeht (20, 21). Dies beruht u.a. auf der Tatsache, dass Gata4 das anti-apoptotische Gen *Bcl-X* induziert und diese Wirkung direkt mit der Gata4-Konzentration korreliert (3, 21, 23). Des Weiteren aktiviert es zahlreiche andere kardiale Promotoren, u.a. Hypertrophie-Agonisten wie *atrial natriuretic factor*, *brain natriuretic peptide* und  *$\beta$ -myosin heavy chain*, was v.a. bei Volumenbelastung eine kompensatorische Hypertrophie der Kardiomyozyten nach sich zieht (24), ebenso wie u.a. *Cardiac troponin C* und  *$\alpha$ -myosin heavy chain* (14, 20, 25). Beim Menschen geht eine *GATA4*-Heterozygotie mit einer Vielzahl kongenitaler Herzfehlbildungen einher: Atrio-ventrikulärer Kanal (durch fehlende Verschmelzung der Endokardkissen), Atrium- und Ventrikelseptumdefekte, *double-outlet right ventricle* (immer in Kombination mit Ventrikelseptumdefekt), Pulmonalstenose oder hypoplastischem Linksherz (1, 12, 26). Ursächlich ist eine Deletion des kurzen Armes von Chromosom 8 (8p23.1), welcher den Genlocus von *GATA4* enthält (12, 26). Eine Haploinsuffizienz des Chromosoms 8p23.1 kann auch extrakardiale kongenitale Fehlbildungen

wie Mikrozephalie, milde Wachstumsretardierung, mentale Retardierung sowie Verhaltensstörungen verursachen, die hier nicht weiter thematisiert werden sollen (12, 26).

Zur Kardioprotektion könnte man therapeutisch versuchen, die Gata4-Konzentration zu erhöhen bzw. eine GATA4-Depletion zu verhindern. Eine Möglichkeit stellt die Behandlung mit Retinsäure (RA) dar, die u.a. die *GATA4*-Expression induziert (3, 11, 27). Eine weitere Möglichkeit ist die Behandlung mit rekombinantem Epo (rhEpo), das ebenfalls einer Reduktion des Gata4-Levels entgegen wirkt (25).

### 2.3 Wt1

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der ebenfalls für die frühe Herzentwicklung wichtig ist, ist der Wilms-Tumorsuppressor (Wt1). Das *WT1*-kodierende Gen wurde zunächst als Tumorsuppressor-Gen bei pädiatrischen Nierentumoren (Nephroblastom, auch Wilmstumor) identifiziert (28-31). Bei dessen Inaktivierung proliferieren die mesenchymalen pluripotenten Vorläuferzellen weiter, statt sich während der embryonalen Nierenentwicklung in Tubuli und Glomeruli zu differenzieren (29).

Das *WT1*-Gen kodiert ein ca. 50 kDa großes Zinkfingerprotein, das aus einer C-terminalen, DNA-bindenden C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingerdomäne und einer N-terminalen Prolin/Glutamin-reichen Domäne besteht (32). Durch translationale und posttranslationale Modifikationen sowie alternatives Spleißen entstehen mehr als zwei Dutzend Isoformen (28, 33). Die Isoform Wt1(-KTS), ohne Lysin-Threonin-Serin-Tripeptid, resultiert in einer gesteigerten DNA-Bindungsaffinität und fungiert als aktivierender Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl von Zielgenen (28, 32), u.a. *Bcl2*, *RARα*, *Vitamin D-Rezeptor* und *Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor p21<sup>Cip1</sup>* (32, 33).

Aufgrund seiner vielfältigen Isoformen ist Wt1 essenziell für eine normale embryonale Organogenese, aber auch in die Entstehung einiger Malignome involviert. Wt1 kann, abhängig vom zellulären Hintergrund und seiner jeweiligen Isoform, Apoptose fördern oder verhindern (34). Dieser Effekt erfolgt über Regulation der Expression von Mitgliedern der Bcl2-Proteine (34). So kann Wt1 die Apoptose durch Induktion pro-apoptotischer Proteine wie Bak und Bax fördern, während es in einem anderen Zellhintergrund die Apoptose durch Induktion anti-apoptotischer Gene wie *Bcl2* und *Bfl1* hemmt (34). Somit fungiert *WT1* für einige Zellen als

Tumorsuppressorgen (z.B. Wilmstumor), für andere als Onkogen (z.B. Brustkrebs und Akute myeloische Leukämie) (34).

Für eine normale embryonale Organogenese ist *Wt1* essenziell. Homozygote *Wt1*-deletierte Mäuse sterben während der frühen Embryonalentwicklung, was u.a. in Myokardhypoplasie, unvollständiger Epikardausbildung (das Myokard wird nur teilweise von der epikardialen Schicht überzogen), Blutungen zwischen den Epikardblättern, Fehlbildungen des Zwerchfells sowie fehlender Nieren- und Nebennierenentwicklung begründet ist (29, 32, 33). *Wt1*-positive Zellen kommen im Epikard, nicht aber im Myokard, vor und spielen eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Herzentwicklung (29, 35). Sie sind durch Aussprossen über die Oberfläche des Myokards für die Entwicklung der epikardialen Schicht verantwortlich (29, 35) und wandern in die subepikardiale Zone, wo sie sich durch sog. epitheliale mesenchymale Transition in subepikardiale Mesenchymzellen umwandeln. Von dort wandern sie ins Myokard, wo sie durch Bildung koronarer glatter Gefäßmuskelzellen zur Gefäßneubildung beitragen, perivaskuläre und intermyokardiale Fibroblasten bilden und sich zum Teil auch in kontraktile Kardiomyozyten differenzieren (29, 33, 35). Letztere machen rund ein Viertel aller Kardiomyozyten aus und exprimieren typische kardiale Transkriptionsfaktoren wie *Gata4* und *Nkx2.5* (29, 33, 35). Den Abschluss der Ausdifferenzierung dieser Zellen markiert eine Reduktion der *Wt1*-Expression (29, 33).

*Wt1* spielt nach hypoxisch-ischämischer Schädigung auch im adulten Herzen eine Rolle. Durch Hypoxie wird das embryonale Entwicklungsprogramm vorübergehend reaktiviert und vermehrt *Wt1* im Epikard sowie in Endothelzellen der Infarktzone und dessen umliegender Randzone exprimiert, was zur Regeneration dieser Zellen beiträgt (36, 37). Die hypoxisch-ischämische *Wt1*-Induktion wird über die Bindung des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF) an die proximale Promotorregion des *Wt1*-Gens vermittelt (28, 33). *Wt1* wiederum kann über direkte Expressionssteigerung des *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) zur Gefäßneubildung beitragen (36). Zudem reguliert *Wt1* die epikardiale Expression des Enzyms Retinaldehyd-Dehydrogenase 2 (RALDH2), ein Schlüsselenzym der Retinsäure, das nach kardialer Ischämie verstärkt exprimiert wird und die Regeneration über epitheliale mesenchymale Transition unterstützt (37). Da Hypoxie gleichzeitig die vermehrte Epo-Expression in der adulten Niere stimuliert, könnte eine systemische Erhöhung des Epo-Levels zur Regeneration des geschädigten Herzgewebes beitragen (38, 39).

Anhand dieser Erkenntnisse scheint eine interessante und gleichzeitig vielversprechende Interventionsoption der Einfluss von Retinsäure auf kardiale Protektions- und Regenerationsprozesse zu sein.

## 2.4 Retinsäure

Vitamin A ist ein fettlösliches Vitamin, dessen Derivat *all-trans* Retinsäure (atRA, hier als RA abgekürzt) die biologisch aktive Form darstellt (40). Sie ist sowohl während der fetalen Entwicklung als auch im adulten Organismus zur Aufrechterhaltung normaler Gewebefunktionen durch Regulation von Zellproliferation, -differenzierung und -apoptose sowie für die kardiale Morphogenese nötig (40). Da sie in humanen Zellen nicht *de novo* synthetisiert werden kann, ist sie ein essenzieller Nährstoff, der als Provitamin A (Carotinoide) in pflanzlichen Lebensmitteln (z.B. Süßkartoffeln, Karotten) und als Retinylester in tierischen Lebensmitteln (z.B. Leber) enthalten ist (40, 41). Diese werden vom Körper durch endogene Rezeptoren und Bindeproteine aufgenommen, transportiert und gespeichert, was einer strengen Regulation unterliegt (40, 41). Einmal vom Körper aufgenommen, wird Vitamin A in unterschiedliche Metabolite umgewandelt, wofür Retinaldehyd-Dehydrogenase 2 (RALDH2) eines der Schlüsselenzyme ist (41, 42). Die Metabolite lassen sich in Retinol als Haupttransportform, Retinylester als Speicherform in der Leber (Hauptspeicherort) und *all-trans* Retinsäure als biologisch aktive Hauptform unterteilen (41). Die hydrophobe RA als aktives Vitamin A-Derivat wird über die Bindung an Bindeproteine *Retinoic Binding Proteins* (RBP) im wässrigen Milieu stabilisiert und mit ihnen im Plasma transportiert (41, 43, 44). Dieser Komplex aktiviert oder inhibiert über die Bindung an Rezeptoren wie *retinoic acid receptors- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$*  (RARs) und *retinoid X receptors- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$*  (RXRs), die ihrerseits als Hetero- oder Homodimer wiederum spezifische DNA-Sequenzen in Promotorregionen ihrer Zielgene, sog. *retinoic acid response elements* (RARE), binden, weitere Gene (41, 43, 44). RARs und RXRs sind nicht spezifisch für RA-Signalwege, sondern entfalten pleiotrope Wirkungen u.a. über Bindung an Vitamin D-Rezeptor, Leber X-Rezeptor und Schilddrüsenhormon-Rezeptor (45). Eine weitere wichtige Interaktion besteht zwischen dem RXR $\alpha$ -Rezeptor und dem Transkriptionsfaktor Nkx2.5. Fehlt diese, wie z.B. durch *Nkx2.5*-Genmutation, führt das ebenfalls zu kardialen

Fehlbildungen (45). Eine schematische Übersicht über den Vitamin A-Stoffwechsel findet sich in Abbildung 1.

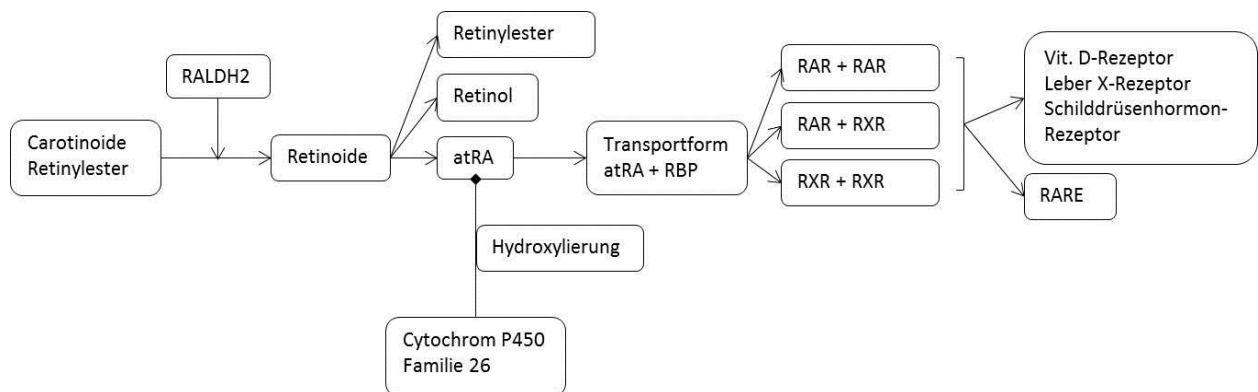


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Vitamin A-Stoffwechsels

Die endogenen RA-Level werden durch Mitglieder der Cytochrom P450 Familie 26 (CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1) reguliert, die RA in eine hydroxylierte, inaktive Form umwandeln können (43). Sie dienen auch als Marker einer erfolgreichen RA-Behandlung, die in einer erhöhten CYP26A1- und CYP26B1-mRNA Expression resultiert (43, 44, 46). Jede Abweichung endogener RA-Level im Sinne einer Hypo- oder Hypervitaminose kann Pathologien bedingen (47, 48). Schon während der Embryogenese kann es aufgrund maternalen Vitamin A-Mangels zu Fehlbildungen kommen, da der Embryo auf eine ausreichende transplazentare Versorgung angewiesen ist (45). Eine Hypovitaminose kann u.a. zur verminderten Stammzellendifferenzierung von Kardiomyozyten, zur Erblindung, erhöhter Infektionsgefahr und sogar zum Tode des Embryos führen (40, 49). Paradoxe Weise bedingt eine Hypervitaminose während der Schwangerschaft toxische und teratogene Effekte, sog. RA-Embryopathien, die u.a. durch Defekte der Neuralleiste charakterisiert sind, aber auch zu kongenitalen Herzfehlbildungen führen können (41, 45).

In seinen strengen endogenen Konzentrationsgrenzen ist Vitamin A essenziell für eine normale Kardiogenese. Es konnte gezeigt werden, dass die endogene Konzentration des Transkriptionsfaktors Gata4 direkt mit einer ausreichenden RA-Konzentration korreliert, da Gata4 im Gegensatz zu anderen für die Herzentwicklung nötigen Genen (wie z.B. *Nkx2.5*) durch RA induziert wird (50). Studien im Tiermodell ergaben, dass eine RA-Behandlung nach Myokardinfarkt das pathologische *Remodeling* vermindert und damit zur Aufrechterhaltung

einer normalen Herzfunktion beiträgt (49, 51). RA-Behandlung könnte also eine zukünftige Therapieergänzung bei der Behandlung kardialer Erkrankungen beim Menschen darstellen.

Klinische Anwendung findet die RA-Behandlung in der Dermatologie zur topischen und systemischen Behandlung unterschiedlichster Krankheitsbilder wie u.a. *Akne vulgaris*, Psoriasis, Lichen (41) sowie in der Hämatonkologie bei der Behandlung einiger Leukämieformen, wo sie eine Ausreifung der Leukämiezellen induziert.

Diese komplexen Zusammenhänge der Kardiogenese und -protektion funktionieren allerdings nur mit Hilfe geeigneter *Downstream*-Gene wie dem Epo/EpoR-System.

## **2.5 Erythropoietin (Epo) und sein Rezeptor (EpoR)**

Erythropoietin (Epo) ist ein ca. 34 kDa großes Glykoprotein-Hormon, das intrauterin primär in der Leber und im reifen Organismus in der Niere gebildet wird und als hämatopoietischer Wachstumsfaktor der Erythropoese wirkt (52, 53). Es vermittelt seine Wirkungen, wie Proliferation und Differenzierung früher erythrozytärer Vorläuferzellen, über die Bindung an den Epo-Rezeptor (EpoR) (31, 52). Epo wird unter Hypoxie vermehrt und bei Hyperoxie vermindert freigesetzt (31, 53).

Die Epo-Expression in der adulten Niere wird über die lokal verfügbare Sauerstoffmenge sowie mittels eines biochemischen Sauerstoffsensing-Mechanismus durch die Bindung von HIF an den 5'-Enhancer des *EPO*-Gens reguliert (54, 55). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse findet rekombinantes Epo (rhEpo) klinische Anwendung bei der Anämiebehandlung, insbesondere bei terminaler Niereninsuffizienz, wo die Erythropoese aufgrund fehlender Epo-Synthese gestört ist, aber auch bei Patienten mit tumorassoziierter Anämie (55-57).

Inzwischen weiß man, dass Epo nicht nur die Hämatopoese beeinflusst, sondern seine zellprotektiven Eigenschaften wie Apoptose-Inhibition und Angiogenese-Induktion auch in Gehirn, Rückenmark, Retina, Skelettmuskelzellen und im Herzen wirken (58, 59). Diese pleiotropen Wirkungen beruhen darauf, dass EpoR nicht nur auf erythroiden Vorläuferzellen, sondern auch von nicht-hämatopoietischen Zellen exprimiert wird (23, 52, 56, 58). Experimentell kann im Herzen eine Epo-Behandlung myokardiale Schäden durch Ischämie/Reperfusion oder Toxine reduzieren, beschleunigt damit die kontraktile Genesung



und bewahrt die Kardiomyozyten vor Apoptose (23, 52, 56, 58). Epo-vermittelte Wachstumssignale scheinen über ein lösliches Mitogen im Epikard für die Proliferation und das Überleben von Myokardzellen nötig zu sein (38). In Herzzellkulturen von Hühnern wurde gezeigt, dass durch selektive Inhibition von Epo-Signalen (durch Anti-EpoR-Antikörper) die Proliferation der Kardiomyozyten unterdrückt und durch externe Epo-Substitution wieder aufgehoben werden kann (29, 38). Endogenes Epo sowie eine exogene rhEpo-Behandlung sind in der Lage, signifikant verminderte Gata4-Level im Myokard, z.B. durch Anthrazyclin- bzw. Doxorubicinbehandlung oder bei Schädigung durch Ischämie/Reperfusion, über eine Gata4-Phosphorylierung wieder signifikant zu erhöhen und vermindern den Abbau von Gata4 durch das Proteasom (23, 25, 60). Dies ist mit einer verminderten kardialen Schädigung assoziiert (23, 60). Der anti-apoptotische Effekt wird u.a. über das Gata4-induzierte, anti-apoptotisch wirkende *Bcl2*-Gen vermittelt (23, 61). Bei zu stark vermindertem oder gar fehlendem Gata4 bleibt der rhEpo-vermittelte kardioprotektive Effekt jedoch aus (23).

Während der Embryonalentwicklung konnte zudem gezeigt werden, dass auch Gata4 die *EPO*-Expression kontextspezifisch regulieren kann (53). Weiterhin ist bekannt, dass Gata4 ebenfalls die Promotorregion des *EPOR*-Gens aktiviert und dessen Expression in Kardiomyozyten induzieren kann (22, 60). In humanen Hepatozyten konnte auch gezeigt werden, dass die transkriptionell aktive Isoform Wt1(-KTS) an die GC-reiche DNA-Sequenz des *EPO*-Promotors bindet und dessen Expression induziert (31). Wt1(-KTS) könnte somit ein weiterer notwendiger Aktivator der basalen fetalen Epo-Produktion sein, da bei *Wt1*<sup>-/-</sup>-Embryos eine verminderte hepatische *Epo*-Expression beschrieben ist (30, 31). Gleichzeitig vermittelt die Bindung über dieselbe GC-reiche DNA-Sequenz an den *EPOR*-Promotor in hämatopoietischen Vorläuferzellen eine Expressionssteigerung des EpoR, weshalb Wt1 auch einen transkriptionellen Aktivator der normalen Hämatopoese darstellt (30). In experimentellen Modellen verbessert eine rhEpo-Behandlung nach Myokardinfarkt die kardiale Funktion über Neovaskularisation, anti-apoptotische Mechanismen und die Aktivierung kardialer Vorläuferzellen (62). Verminderte Sauerstoffpartialdrücke bewirken HIF-vermittelt eine Epo- und VEGF-Expressionssteigerung (39, 55). Epo wiederum induziert eine vermehrte EpoR- und NO-Synthase-Expression in vaskulären Endothelzellen, was die Sensitivität dieser Zellen für Epo-vermittelte Signale steigert, eine

vermehrte NO-Freisetzung bewirkt und durch vermehrte VEGF-Sekretion aus ischämischen Muskelzellen die Angiogenese stimuliert (63).

Der EpoR ist ein ca. 55 kDa großes Membranprotein der Zytokinrezeptorfamilie, das als inaktives Homodimer vorliegt und erst durch Epo-Bindung eine Konformationsänderung erfährt, die eine Signalkaskade aktiviert, welche schlussendlich die transkriptionelle Regulation unterschiedlicher Gene und damit Zellüberleben, Proliferation und Differenzierung vermittelt (59, 62, 63). Ursprünglich wurde eine EpoR-Expression lediglich im Epikard, Perikard und Endokard, nicht aber im Myokard detektiert (64). Sie ist während der massiven Wachstumsphase der Ventrikel *in utero* am stärksten ausgeprägt (64). Neuere Studien zeigen, dass EpoR während der embryonalen Kardiogenese ebenfalls in unreifen, proliferierenden Kardiomyozyten exprimiert wird (62). Postnatal ist die murine kardiale EpoR-Expression signifikant vermindert und in adulten Herzen nur noch in interstitiellen und unreifen, proliferierenden Zellen nachweisbar (62). Epo kann diese unreifen Vorläuferzellen über EpoR-Bindung aktivieren, was zur Ausdifferenzierung in kontraktile Kardiomyozyten und Gefäßneubildung beiträgt, ein kardiales *Remodeling* im pathologischen Kontext vermindert und die kardiale Funktion aufrecht erhält (62). *Epo*<sup>-/-</sup>- und *EpoR*<sup>-/-</sup>-Mäuse versterben während der Embryonalentwicklung aufgrund fehlender Erythropoese, wobei sie ebenfalls eine ventrikuläre Hypoplasie, unvollständige Epikardausbildung und fehlerhafte Gefäßneubildung aufweisen (59, 64). Diese Daten machen deutlich, dass das Epo/EpoR-System auch für eine normale embryonale Kardiogenese essenziell ist.

Tier- und Zellkulturmodelle legen nahe, dass eine rhEpo-induzierte kardioprotektive Behandlung keine lange Vorbehandlung bis zum Wirkeintritt benötigt, sondern schon nach Einmalgabe die Infarktgröße signifikant reduziert und die Apoptose von Kardiomyozyten vermindert, was insgesamt die postischämische ventrikuläre Dysfunktion reduziert (23, 58). Bisher herrscht jedoch Uneinigkeit über die Dosierung und den richtigen Applikationszeitpunkt (23, 58). Klinische Studien am Menschen zeigen bei rhEpo-Einmalgabe bislang keinen signifikanten Effekt einer kardialen Protektion nach Myokardinfarkt, während wiederholte Gaben kleinerer Dosen einen positiven Effekt auf die linksventrikuläre Funktion haben (62, 65).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht mit Sicherheit geklärt, wie das Epo/EpoR-System im Herzen aktiviert wird und inwieweit Gata4 und Wt1 Einfluss darauf nehmen.

## **2.6 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war es daher zu klären, ob es Wechselwirkungen zwischen dem Epo/EpoR-System und den kardialen Faktoren Gata4, Wt1 und RA gibt, die später ggf. therapeutisch nutzbar wären. Zur experimentellen Bearbeitung wurde das Modell einer *ex vivo* Organkultur des embryonalen Herzens der Maus gewählt, um das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren Gata4 und Wt1 in Kombination mit Retinsäure und dem Epo/EpoR-System zu untersuchen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 *Ex vivo* Organkulturen des sich entwickelnden Herzens der Maus

Für die Kultivierung der embryonalen Herzen wurden terminiert verpaarte C57BL/6J-Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen zum jeweils angegebenen Zeitpunkt entnommen (Genehmigungsbescheid durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, T0308/12). Das Entwicklungsstadium (E) wird jeweils als *days post coitum* angegeben. Die Herzen wurden in 96-well Zellkulturplatten in DMEM „High Glucose (4,5 g/l) (PAA Laboratories, E15-009), versetzt mit 10 % (v/v) FKS (Biochrom), 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco, 11548876), bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die isolierten Herzen zeigten über den gesamten Versuchszeitraum (48-72 h) Kontraktionen. Eine typische *ex vivo* Herzkultur im Entwicklungsstadium E12.5 ist in Abbildung 2 dargestellt.

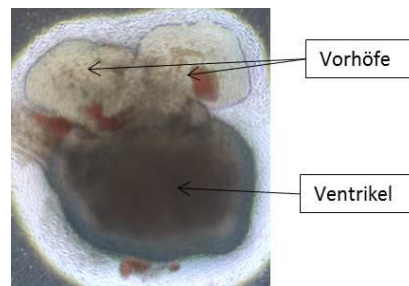


Abbildung 2. Murines Herz im Entwicklungsstadium E12.5.

Für die Behandlung mit Retinsäure wurde Retinsäure (Sigma, R2625) in Ethanol (EtOH) gelöst und im Versuch mit einer Endkonzentration von 10 mMol verwendet. Der Kontrolle wurde das äquivalente Volumen EtOH zugesetzt. Zur Behandlung mit rhEpo wurde NeoRecormon® 500U/ 0,3 ml (Roche) verwendet. Für den *Knockdown* mittels *vivo-Morpholinos* wurden sequenzspezifische *vivo-Morpholinos* (Genetools) mit 10 µM Endkonzentration direkt in das Kulturmedium gegeben. Für WT1 wurden folgende *vivo-Morpholinos* verwendet: Wt1 (5'-CAGGTCCCGCACGTCGGAACCCATG-3') bzw. als Negativkontrolle Wt1 *mismatch* (5'-CAGCTCCGGCACCTCGCAACCGATG-3') (66). Für GATA4 wurden folgende *vivo-Morpholinos* verwendet: Gata4 (5'-GGCCATGGCCAGGCTTTGGTACATC-3') bzw. als Negativkontrolle Gata4 *mismatch* (5'-GGCGATGCCAGCCTTTCGTAGATC-3') (67). Die *Knockdown*-Effizienz wurde im Rahmen eines anderen Forschungsprojekts von Dr. rer. nat. Charlotte Jacobi nachgewiesen und publiziert (68).

### 3.2 RNA und cDNA Präparation

Zur RNA Präparation aus den embryonalen Herzen wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet: Die Aufreinigung mit TRIzol (Invitrogen) und die Aufreinigung mit RNeasy Micro Kit (Qiagen) erfolgte entsprechend der jeweiligen Herstellerangaben. Die Gewebe wurden entweder bei -80 °C zwischengelagert oder sofort aufgereinigt. Nach Aufreinigung mittels Trizol wurde das Pellet mit RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Aufreinigung über das *RNeasy Micro Kit* erfolgte mit QIAshredder-Säulen (Qiagen) zur Lyse und Homogenisation der Gewebe. Die RNA wurde mit 14 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

Für cDNA wurde jeweils die gesamte RNA eines Herzens mit Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primern (Invitrogen, #18418012) und SuperScript III Transkriptase (Invitrogen, #18080093) nach Herstellerangaben umgeschrieben.

### 3.3 Quantitative PCR

Für die quantitative PCR mittels SYBR Green wurde ein Reaktionsansatz mit 2-fach *FastStart Universal SYBR Green Master ROX* (Roche, 4913914001), 100 nM Primermix und 1/50 Vol cDNA pipettiert. Die Proben wurden als Duplikate mit den angegebenen Primern analysiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt. Zusätzlich wurde für jeden Primer eine Negativkontrolle mit destilliertem Wasser anstelle von cDNA verwendet. Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) erfolgte in der StepOnePlus™ *Real-Time PCR* Apparatur (Applied Biosystems) mit folgendem Programm: Zur Denaturierung der cDNA wurden die 10 µl-Ansätze der 96-well Reaktionsplatte 10 min bei 95 °C erhitzt, danach für 45 Zyklen für jeweils 15 s auf 95 °C, für 1 min auf 60 °C, für 30 s auf 77 °C erhitzt. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte immer beim letzten Schritt bei 77 °C, um die spezifischen Produkte von möglichen Primerdimeren zu unterscheiden. Für die Auswertung wurde der *Cycle threshold* (Ct) für alle gemessenen Proben auf 0,1 ΔRn eingestellt. Aus den resultierenden Ct-Werten wurde der Mittelwert der Doppelbestimmungen berechnet. Das normalisierte Transkriptionslevel (ΔCt) des zu untersuchenden Gens wurde bestimmt, indem der Ct-Wert des Referenzgens (Aktin) vom Ct-Wert des zu quantifizierenden Gens subtrahiert wurde.

Tabelle 2. Primer für die quantitative PCR mit SYBR Green (MWG Eurofins)

Zielsequenz	Primersequenz <i>Forward- und Reverse Primer</i>	Ensemble Gennummer
Maus beta-Aktin	FW: ccgcgagcacagcttct RV: gggacttcagggtcaggat	ENSMUSG00000029580
Maus Cyp26A1	FW: gctcctgattgagcactcgt RV: ggaggattcaatcgagggt	ENSMUSG00000024987
Maus Epo-Rezeptor	FW: ggacacctacttggtattgg RV: gacgtttaggctggagtcc	ENSMUSG00000006235

Für die qPCR mit TaqMan-Sonden wurde für den Reaktionsansatz 2-fach *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Roche, 4364338), 1/20 Volumen Sonde/Primer Mix und 1/100 Vol cDNA erstellt. Die Proben wurden als Duplikate mit dem angegebenen Sonden/Primer Mix gemessen (Tabelle 3). Zusätzlich wurde für jede Sonde eine Negativkontrolle mit destilliertem Wasser anstelle von cDNA gemessen. Die PCR-Reaktion erfolgte in einer StepOnePlus™ *Real-Time PCR* Apparatur (Applied Biosystems). Zur Denaturierung der cDNA wurden die 10 µl Ansätze der 96-well Reaktionsplatte 5 min bei 98 °C erhitzt, danach für 40 Zyklen 5 sec auf 98 °C, 5 sec auf 62 °C und 20 sec auf 72 °C. Bei der finalen Extension wurden die Proben 1 min auf 72 °C erhitzt. Für die Auswertung wurde der *Cycle threshold* (Ct) für alle gemessenen Proben auf 0,1 ΔRn eingestellt. Aus den resultierenden Ct-Werten wurde der Mittelwert der Doppelbestimmungen berechnet. Das normalisierte Transkriptionslevel (ΔCt) des zu untersuchenden Gens wurde bestimmt, indem der Ct-Wert des Referenzgens (Aktin) vom Ct-Wert des zu quantifizierenden Gens subtrahiert wurde.

Tabelle 3. Primer und Hybridisierungssonden für die quantitative PCR. Der Firma TIB Molbiol gebührt Dank für das Design des beta-Aktin-Assays.

Zielsequenz	Sondenlabel bzw. Sequenzen selbst designer Assays	Firma, TaqMan-Assay-Nr.	Ensemble Gennummer
Maus Gata4	5'FAM 3'MGB-NFQ	Applied Biosystems, Mm00484689_m1	ENSMUSG00000021944
Maus Wt1	5'FAM 3'MGB-NFQ	Applied Biosystems, Mm01337048_m1	ENSMUSG00000016458
Maus Cyp26A1	5'FAM 3'MGB-NFQ	Applied Biosystems, Mm00514484_g1	ENSMUSG00000024987
Maus EpoR	5'FAM 3'MGB-NFQ	Applied Biosystems, Mm00833882_m1	ENSMUSG00000006235
Maus beta-Aktin	FW: 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3' Sonde: 5'FAM-CAT CCT GCG TCT GGA CCT GGC-MGB-NFQ-3' RV: 5'-GCCACAGGATTCCATACCCA-3'	TIB Molbiol	ENSMUSG00000029580

### 3.4 Protein-Aufreinigung

Die embryonalen Herzen wurden für die Gesamtproteinextraktion zweimal mit PBS (PAA Laboratories) gewaschen und pro Herz in 40 µl Laemmli-Puffer [50 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 M Harnstoff; 1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS); 7,5 mM Dithiothreitol (DTT)] lysiert. Danach erfolgte ein Ultraschallaufschluss mit Hilfe des Labsonic U (B. Braun) und eine Denaturierung für 5 min bei 95 °C. Die OD<sub>260nm</sub> und OD<sub>280nm</sub> zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Warburg-Christian (69) wurden mit Hilfe des Spektrophotometers DU® 730 (Beckman Coulter) gemessen.

### 3.5 Immunoblot

Für die elektrophoretische Größenauftrennung einzelner Proteine in denaturierten Proteingemischen wurden jeweils 20 µg Proteinprobe mit 0,5 µg Bromphenolblau versetzt, auf

ein 10 % Polyacrylamidgel (Trenngel: 0,25 Vol Acrylamid-Bisacrylamid (AA/BA) (w/v: 30/0,8), 0,25 Vol Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8), 0,5 µl/ml Tetramethylethyldiamin (TEMED), 5 µl/ml Ammoniumpersulfat (APS) und Sammelgel: 0,11 Vol AA/BA (w/v, 30/0,8); 0,125 Vol Sammelgelpuffer (1 M Tris-HCl; 0,8 % (w/v) SDS pH 6,8); 1 µl/ml TEMED; 10 µl/ml APS) aufgetragen. Die Proteine wurden mit 11,5-17 V/cm Gellaufstrecke in 1 x SDS-Laufpuffer (0,25 M Tris-Base; 1,92 M Glycin; 1 % (w/v) SDS pH 8,3) aufgetrennt (Mini Protean 2 Cell, Bio-Rad Laboratories). Der Immunoblot erfolgte nach dem *Semidry*-Verfahren in *Semidry*-Transferpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 20 % Ethanol) für 1 Stunde bei 1 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche. Der Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung (0.1 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure) kontrolliert. Anschließend wurde die Membran mit H<sub>2</sub>O gespült. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1-2 Stunden in Blocking-Lösung (5 % Milchpulver in 1x TBST: 20 mM Tris-Base; 137 mM NaCl; 0,05 % Tween 20 [pH 7,6]) inkubiert. Nach dem Blockieren wurde die Membran mit dem primären Antikörper für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran in 1x TBST gewaschen (3 x 10 min) und mit dem sekundären HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Antikörper für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschritten (3 x 10 min) wurden die Proteine mit ECL *Detection Reagents* (Amersham Biosciences, RPN2109) und Hyperfilm™ MP (Amersham Biosciences, 10084764) detektiert. Zur anschließenden Verifikation einer gleichmäßigen Proteinbeladung wurden die gebundenen Antikörper in einer 10-minütigen Inkubation mit 0,2 N NaOH von der Membran entfernt, diese kurz mit TBST-Puffer gewaschen, erneut in Blocking-Lösung und anschließend mit einem Antikörper gegen Pan-Aktin oder Gapdh inkubiert. Die Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der verwendeten Antikörper. Einige repräsentative Blots zur Überprüfung des *Knockdowns* wurden bereits von Jacobi et al. (68) gezeigt.



Tabelle 4. Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Spezies	Spezifität	Klonalität	Konjugation	Hersteller/Bestellnummer
Kaninchen	WT1 Mensch/ Ratte/ Maus/ Schwein	Polyklonaler Antikörper	-	Santa Cruz Biotechnology: sc-192
Ziege	GATA4	Polyklonaler Antikörper	-	Santa Cruz Biotechnology: Sc-1237X
Maus	GAPDH Maus/ Ratte/ Mensch/ Kaninchen/ Katze/ Fisch/ Schwein	Monoklonaler Antikörper	-	Millipore: MAB374
Maus	Aktin Mensch/ Maus/ Ratte	Monoklonaler Antikörper	-	Millipore: MAB1501R
Esel	Ziege	Polyklonaler Antikörper	HRP	Santa Cruz Biotechnology: Sc-2304
Ziege	Kaninchen	Polyklonaler Antikörper	HRP	Santa Cruz Biotechnology: Sc-2004
Ziege	Maus	Polyklonaler Antikörper	HRP	Santa Cruz Biotechnology: Sc-2005

### 3.6 Statistische Analyse

Zur Auswertung der Daten und zur Erstellung der Graphen wurde Excel (Microsoft) verwendet. Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Zur Auswertung von quantitativen RT-qPCR-Daten wurden der ungepaarte bzw. gepaarte *Students* t-Test verwendet. Bei Vergleichen von mehr als zwei Proben untereinander erfolgte eine Auswertung mittels einer multivariaten Varianzanalyse mit Hilfe von SPSS (SPSS Statistics 25, IBM).

In den statistischen Analysen wurden \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  als signifikant bewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Der Einfluss von Retinsäure auf die *Epo-Rezeptor*-Expression

Um zu klären, ob die Expression des *Epo-Rezeptors* durch Retinsäure beeinflusst wird, wurden murine embryonale Organkulturen des Herzen zu den Entwicklungszeitpunkten E11.5 und E12.5 verwendet. Die embryonalen Herzen wurden mit 10  $\mu$ M Retinsäure *ex vivo* kultiviert. Nach 72 h Kultur wurde in der umgeschriebenen cDNA die *EpoR*-Expression mittels TaqMan-qPCR bestimmt (Abbildung 3). Das Experiment zeigt, dass eine RA-Behandlung in Herzen zum embryonalen Entwicklungszeitpunkt E12.5 zu einem signifikanten Anstieg der Transkription des *Epo-Rezeptors* führt ( $p < 0,01$ , Abbildung 3a). Im früheren embryonalen Entwicklungsstadium E11.5 zeigt sich keine Signifikanz, sondern lediglich ein Trend zu gesteigerter *EpoR*-Expression (Abbildung 3a). Zur Überprüfung der Effektivität der Retinsäure-Behandlung wurde neben der *EpoR*-Expression auch die Expression von *Cyp26A1* gemessen, welches ein Zielgen der Retinsäure ist. Die *Cyp26A1*-Expression steigt unter Retinsäure-Behandlung signifikant an ( $p < 0,01/p < 0,001$ , Abbildung 3b).

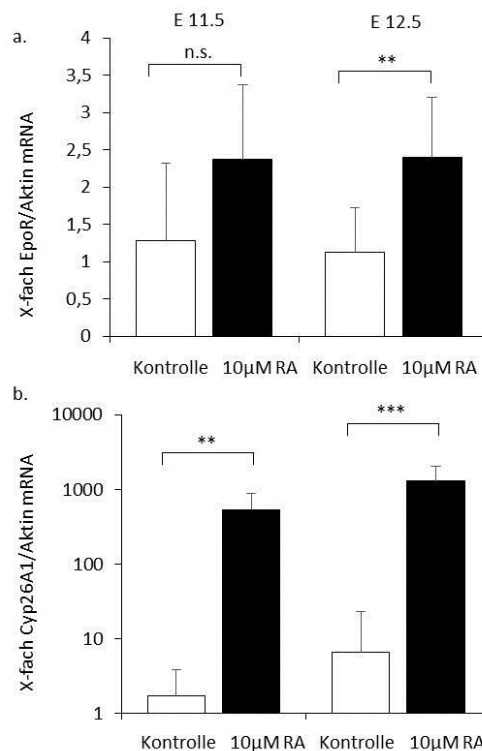


Abbildung 3. *EpoR*-Expression in murinen embryonalen Herzen nach Retinsäure-Behandlung

Murine Herzen wurden zu den embryonalen Entwicklungszeitpunkten E11.5 (n = 7) und E12.5 (n = 8) entnommen, *ex vivo* 72h mit 10 µM RA oder in der Kontrollgruppe mit Vehikel kultiviert. **a.** Die Messung der *EpoR*-Expression erfolgte mittels RT-qPCR und wurde gegen Aktin normalisiert. **b.** Als Kontrolle für eine erfolgreiche RA-Behandlung wurde die Expression für das Retinsäure-abhängige Gen *Cyp26A1* in denselben Proben bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

#### 4.2 Regulation der *Epo-Rezeptor*-Expression durch den Transkriptionsfaktor Wt1 im sich entwickelnden murinen Herz

Wie in Abbildung 3 dargestellt, konnte Retinsäure die Expression des *Epo-Rezeptors* in embryonalen Herzen E12.5 signifikant stimulieren. Hieraus ergibt sich die Frage, welche Transkriptionsfaktoren diesen Expressionsanstieg des *Epo-Rezeptors* durch Retinsäure vermitteln. Da in der Literatur u.a. eine Abhängigkeit der *EpoR*-Expression von den Transkriptionsfaktoren Wt1 und Gata4 beschrieben ist (30, 60), wurde ein *Knockdown* von Wt1 durch *vivo-Morpholinos* durchgeführt. Für alle folgenden Experimente wurde das Entwicklungsstadium E12.5 verwendet, da dieses ein signifikantes Ansprechen der *EpoR*-Expression auf Retinsäure zeigte (Abbildung 3a).

Die embryonalen Herzen wurden für 72 h in Kultur genommen und mit sequenzspezifischen *Wt1 vivo-Morpholino* (Wt1 MO) bzw. einem *mismatch vivo-Morpholino* (Wt1 mis) als Kontrolle behandelt. In der umgeschriebenen cDNA wurde die *EpoR*-Expression mittels TaqMan-qPCR bestimmt (Abbildung 4a). Die *Wt1-Knockdown*-Effizienz wurde mittels Immunoblot überprüft und die Proteinmenge war stark verringert (Abbildung 4b). Das WT1 Gen besitzt zwei Translationsstartstellen, die zur Translation von zwei unterschiedlich großen Proteinen, ca. 47 und 57 kDa, führen (70). Der *Wt1 vivo-Morpholino* ist nur gegen die dominant translatierte kurze Variante des Wt1 gerichtet. Dieses Experiment zeigt keine signifikante Veränderung der *Epo-Rezeptor*-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration des Transkriptionsfaktors Wt1 (Abbildung 4a).

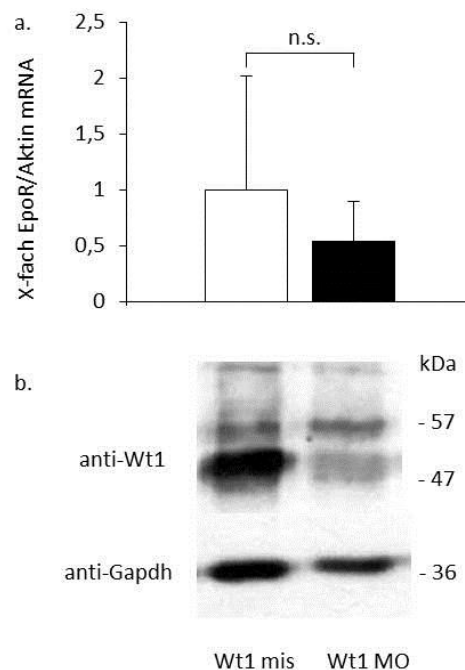


Abbildung 4. *EpoR*-Expression in murinen embryonalen Herzen E12.5 in Abhängigkeit der Wt1-Expression

Murine Herzen wurden zum embryonalen Entwicklungszeitpunkt E12.5 (n = 3) entnommen, *ex vivo* kultiviert und 72 h mit *mismatch* (Wt1 mis) oder mit *Wt1 antisense vivo-Morpholinos* (Wt1 MO) inkubiert. **a.** *EpoR* Transkripte wurden mittels qPCR (TaqMan) gemessen und gegen Aktin normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, die mit Hilfe des gepaarten t-Tests verglichen wurden (n.s.). **b.** Die Effizienz des *Knockdowns* wurde jeweils mittels Immunoblot für Wt1 beurteilt. Die Expression von Gapdh diente als Ladekontrolle.

#### 4.3 Regulation der *Epo-Rezeptor*-Expression durch den Transkriptionsfaktor Wt1 im Epikard des sich entwickelnden murinen Herzens

In der Literatur wurde beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor Wt1 ausschließlich in epikardialen Zellen exprimiert wird (29, 35). Somit stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Wt1-Konzentration und der erhöhten *Epo-Rezeptor*-Expression nur bei Verwendung reiner Epikardzellen nachgewiesen werden kann. Dazu wurden embryonale murine Epikardzellen für 72 h kultiviert und mit sequenzspezifischem *Wt1 vivo-Morpholino* (Wt1 MO) bzw. einem *mismatch vivo-Morpholino* (Wt1 mis) als Kontrolle behandelt. Aus diesen umgeschriebenen cDNAs wurde die *EpoR*-Expression mittels TaqMan-qPCR bestimmt. Auch in reinen Epikardzellen zeigt sich keine signifikante Auswirkung der Wt1-Menge auf die *EpoR*-Expression (Abbildung 5, n.s.).

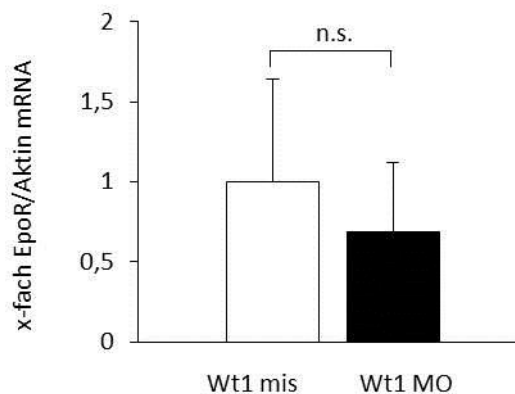


Abbildung 5. *EpoR*-Expression in murinen embryonalen Epikardzellen in Abhängigkeit von der Wt1-Konzentration

Murine epikardiale Zellen wurden zum embryonalen Entwicklungszeitpunkt E12.5 gewonnen, *ex vivo* kultiviert und 72 h mit *mismatch* (Wt1 mis) bzw. mit Wt1 antisense *vivo-Morpholinos* (Wt1 MO) inkubiert (n=5). *EpoR*-Transkripte wurden mittels RT-qPCR gemessen und gegen Aktin normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, die mit Hilfe des gepaarten t-Tests verglichen wurden (n.s.).

#### 4.4 Regulation der *Epo-Rezeptor*-Expression durch den Transkriptionsfaktor Gata4 des sich entwickelnden murinen Herzens

Um zu testen, welchen Einfluss der Transkriptionsfaktor Gata4 auf die *EpoR*-Expression im embryonalen Herzen hat, wurde unter Verwendung von *vivo-Morpholinos* ein *Knockdown* des Transkriptionsfaktors Gata4 durchgeführt. Die embryonalen Herzen wurden für 72 h in Kultur

genommen und mit sequenzspezifischen *Gata4 vivo-Morpholino* (Gata4 MO) oder einem *mismatch vivo-Morpholino* (Gata4 mis) als Kontrolle behandelt. In der umgeschriebenen cDNA wurde die *EpoR*-Expression mittels TaqMan-qPCR bestimmt. Die *Knockdown*-Effizienz von Gata4 wurde mittels Immunoblot überprüft (Abbildung 6b). Dieses Experiment zeigt keine signifikante Veränderung der *Epo-Rezeptor*-Expression in Abhängigkeit von der Gata4-Konzentration (Abbildung 6a, n.s.).

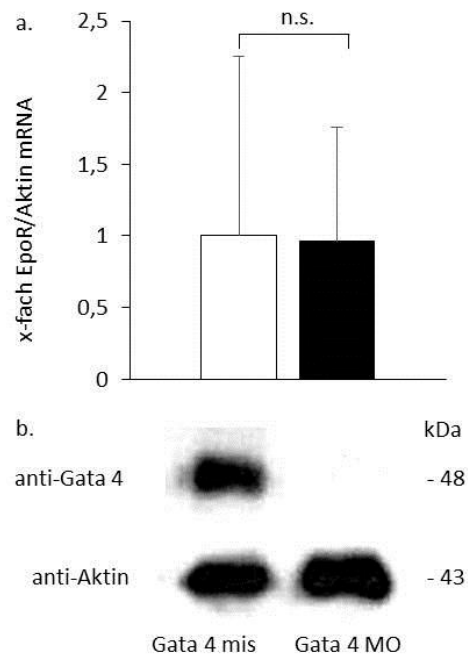


Abbildung 6. *EpoR*-Expression in murinen embryonalen Herzen E12.5 in Abhängigkeit von der Gata4-Konzentration

Murine Herzen wurden zum embryonalen Entwicklungszeitpunkt E12.5 entnommen, *ex vivo* kultiviert und 72 h mit *mismatch* (Gata4 mis) oder mit *Gata4 antisense vivo-Morpholinos* (Gata4 MO) inkubiert (n = 12). **a.** *EpoR*-Transkripte wurden mittels RT-qPCR gemessen und gegen Aktin normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, die mit Hilfe des gepaarten t-Tests verglichen wurden (n.s.). **b.** Die Effizienz des *Knockdowns* wurde jeweils mittels Immunoblot für Gata4 beurteilt. Die Expression von Aktin diente als Ladekontrolle.

#### 4.5 Regulation der *Epo-Rezeptor*-Expression durch den Transkriptionsfaktor Gata4 bei gleichzeitiger Retinsäure-Behandlung des sich entwickelnden murinen Herzens

Da es unter RA-Behandlung zu einer signifikanten Steigerung der *EpoR*-Expression kommt (vgl. Abbildung 3), stellt sich die Frage, ob diese Wirkung auch bei geringerer Gata4-Konzentration nachgewiesen werden kann.

Zur Klärung dieser Frage wurden embryonale Herzen für 72 h in Kultur genommen, zuerst für 24 h mit sequenzspezifischen *Gata4 vivo-Morpholinos* (Gata MO) bzw. mit *mismatch vivo-Morpholinos* (Gata4 mis) und dann für weitere 48 h gleichzeitig mit *Morpholino* und 10  $\mu$ M Retinsäure behandelt. Nach insgesamt 72 h Kultur wurde in der umgeschriebenen cDNA die *EpoR*-Expression mittels SYBR Green-qPCR bestimmt (Abbildung 7a). Zur Überprüfung der Effektivität der Retinsäure-Behandlung wurde die Expression von *Cyp26A1* als Zielgen der Retinsäure gemessen (Abbildung 7b). Wie erwartet steigt die *Cyp26A1*-Expression unter Retinsäure-Behandlung signifikant an (Abbildung 7b). Die *Knockdown*-Effizienz von Gata4 wurde mittels Immunoblot überprüft (Abbildung 7c). Der statistische Vergleich der Mittelwerte erfolgte durch eine multivariate Varianzanalyse mit Hilfe von SPSS.

Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der *EpoR*-Expression unter Retinsäure-Behandlung bei Vergleich aller Proben mit Retinsäure-Behandlung gegenüber der Kontrolle ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 7a). Zudem konnte beim Vergleich aller *Morpholino*-behandelten Proben eine signifikante Abnahme der *EpoR*-Expression mit *GATA4-Morpholino-Knockdown* festgestellt werden ( $p = 0,001$ ). Die differenzierte Analyse des Einflusses von Retinsäure auf die *EpoR*-Expression vor dem Hintergrund einer *Gata4-Mismatch* bzw. *Gata4-Morpholino*-Behandlung zeigte keinen signifikanten Effekt der Gata4-Menge auf die Retinsäure-induzierte *EpoR*-Expression ( $p = 0,181$ ).

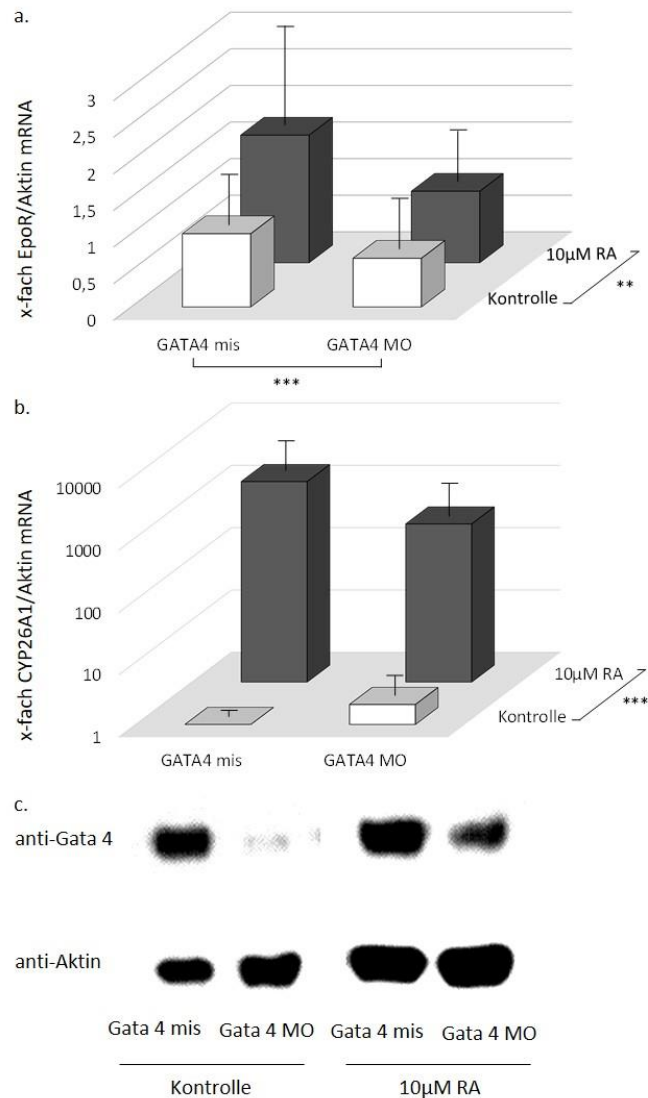


Abbildung 7. *EpoR*-Expression in murinen embryonalen Herzen E12.5 in Abhängigkeit von der Gata4-Konzentration bei gleichzeitiger Retinsäure-Behandlung

Murine Herzen wurden zum embryonalen Entwicklungszeitpunkt E12.5 entnommen und *ex vivo* für 72 h mit *mismatch* (Gata4 mis, n = 30) oder mit Gata4 *antisense vivo-Morpholinos* (Gata4 MO, n = 31) behandelt. 24 h nach Beginn der *vivo-Morpholino* Behandlung wurden 10 µM RA (n = 30) oder als Vehikel-Kontrolle EtOH (n = 31) zugegeben. **a.** *EpoR*-Transkripte wurden mittels RT-qPCR gemessen und gegen Aktin normalisiert. **b.** Als Kontrolle für eine erfolgreiche RA-Behandlung wurde die Expression des Retinsäure-abhängigen Gens *Cyp26A1* bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, die mit Hilfe einer multivariaten Varianzanalyse verglichen wurden. **c.** Die Effizienz des *Knockdowns* wurde jeweils mittels Immunoblot für Gata4 beurteilt. Die Expression von Aktin diente als Ladekontrolle.



#### 4.6 Einfluss einer Behandlung mit rekombinantem Erythropoietin (rhEpo) auf die *Wt1*- und *Gata4*-Expression des sich entwickelnden murinen Herzens

Epo entfaltet seine Wirkung über Bindung an den Epo-Rezeptor (31, 53). Möglicherweise könnte eine Behandlung mit rhEpo die Expression der Transkriptionsfaktoren *Gata4* und *Wt1* erhöhen und so eine positive Rückkopplung auf die *EpoR*-Expression bewirken.

Embryonale Herzen wurden für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an rhEpo kultiviert. In der daraus hergestellten cDNA wurde die *Wt1*- (Abbildung 8a) und *Gata4*- (Abbildung 8b) Expression mittels TaqMan-qPCR bestimmt. Es zeigt sich kein Expressionszuwachs in Abhängigkeit von den hier verwendeten Mengen an exogen zugeführtem rhEpo.

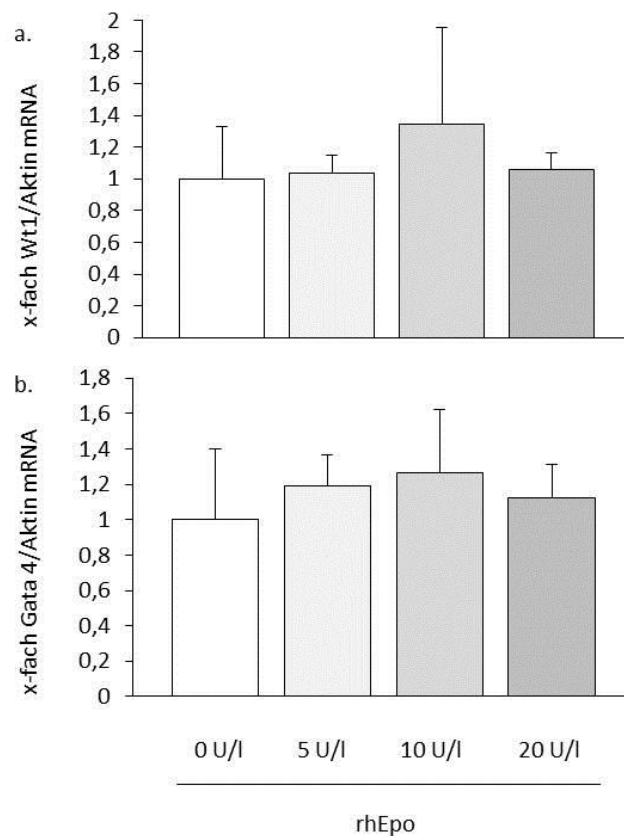


Abbildung 8. *Wt1*- und *Gata4*-Expression in murinen embryonalen Herzen E12.5 bei Behandlung mit unterschiedlichen rhEpo-Konzentrationen

Murine Herzen wurden zum embryonalen Entwicklungszeitpunkt E12.5 entnommen, *ex vivo* kultiviert und 48 h mit verschiedenen rhEpo-Konzentrationen inkubiert ( $n = 4$ ). a. *Wt1*- und b. *Gata4*-Transkripte wurden mittels RT-qPCR gemessen und gegen Aktin normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, die in einer ANOVA verglichen wurden und keine signifikanten Unterschiede zeigten.

## 5 Diskussion

Die in der Literatur beschriebenen kardioprotektiven Effekte aus Tier- und Zellkulturmodellen versprechen einen therapeutischen Nutzen einer rhEpo-Behandlung nach kardialer Schädigung und damit neue Therapieansätze. Ein kausaler Zusammenhang im Sinne einer Reaktionskaskade wurde bis heute nicht beschrieben. Deshalb sollte geklärt werden, ob die Transkriptionsfaktoren Gata4 und Wt1 eine Steigerung der *EpoR*-Expression in Kardiomyozyten bewirken und ob dieser Effekt möglicherweise durch eine gleichzeitige RA-Behandlung verstärkt werden kann. Damit gäbe es einen Mechanismus, der in klinischen Modellen als zusätzliche Therapieoption neben rhEpo-Behandlung getestet werden könnte.

Als Modell wurden murine Herzen im embryonalen Entwicklungsstadium E12.5 gewählt, die *ex vivo* kultiviert, entsprechend der Fragestellung behandelt und mittels RT-qPCR analysiert wurden. Das Modell wurde ausgewählt, da es technisch einfach durch mehrere kombinierte Stimuli zu beeinflussen ist. So kann in diesem System der *Knockdown* der Transkriptionsfaktoren Wt1 und Gata4 mit der Behandlung von Retinsäure kombiniert werden. Zudem hat dieses Modell den Vorteil, dass die Zellen in ihrem funktionellen Zusammenhang belassen werden und eventuelle endogene Interaktionen zwischen Kardiomyozyten sowie Epi- und Myokard weiterhin stattfinden können. Da es sich um eine explorative, hypothesengenerierende Arbeit handelt, wurde ein Modell gewählt, in dem die Expression der zu untersuchenden Faktoren *Epo-Rezeptor* (62, 64), *Gata4* (6, 9) und *Wt1* (29, 33) unter Basalbedingungen hoch ist, da sonst Effekte eines Transkriptionsfaktor-*Knockdowns* eventuell schwer nachzuweisen wären. Das verwendete embryonale Versuchsmodell weist gegenüber adulten Zellen eine deutlich höhere Plastizität sowie ein Regenerationspotenzial auf (2), was unter Umständen die Problematik birgt, dass die erhofften Effekte in klinischen Studien an adulten Herzen nicht reproduziert werden können. Das Alter der Kardiomyozyten scheint ein entscheidendes Kriterium für die Vergleichbarkeit der in der Literatur beschriebenen Aussagen zu sein. So weisen embryonalen Zellkulturen nach Schädigung durch Ischämie/Reperfusion oder wie beispielsweise von Uygur et al. beschrieben, selbst bei kritischer Genmutation eines Allels, eine normale Herzentwicklung und -funktion durch Kompensation des verbliebenen Allels auf (2, 62, 64). Modelle adulter Kardiomyozyten, wie beispielsweise von Wright et al. beschrieben, weisen dagegen nach rhEpo-Behandlung bei Ischämie/Reperfusion zwar eine verminderte

Apoptose der Kardiomyozyten, jedoch keine Regeneration wie die embryonalen Modelle auf (23, 52, 58).

Die hier präsentierten Untersuchungen zeigen eine *EpoR*-Expressionszunahme unter RA-Behandlung (Abbildung 3), die unabhängig von der Menge des Transkriptionsfaktors Gata4 auftritt (Abbildung 7a). Diese RA-Behandlung führt auch zu dem erwarteten signifikanten Anstieg der *Cyp26A1*-Expression als Positivkontrolle. Eine Verstärkung der *EpoR*-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration des Transkriptionsfaktors Wt1 konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4), in Abhängigkeit von der Konzentration des Transkriptionsfaktors Gata4 jedoch schon (Abbildung 7). Damit passen die hier gezeigten Ergebnisse zu der in der Literatur beschriebenen Aktivierung der Promotorregion des *EpoR*-Gens durch Gata4 in murinen adulten Kardiomyozyten (22, 60). Es ist zu bedenken, dass eine Morpholinobehandlung nur einen *Knockdown* bewirkt, so dass eine Restaktivität der Gata4-Zielgene erhalten bleibt. Der durch Gata4 *vivo-Morpholino* erreichte *Knockdown* lag bei 10-30 % Restprotein (Abbildung 6, Abbildung 7). Da bekannt ist, dass selbst bis zu einer 50%-igen Reduktion des Gata4-Expressionsniveaus eine normale embryonale Kardiogenese erhalten bleibt (19), ist es denkbar, dass diese Restaktivität der Transkriptionsfaktoren der Grund für das Ausbleiben eines signifikanten Abfalls der *EpoR*-Expression unter *Knockdown*-Bedingungen in Abbildung 6 ist.

Ferner wurde ein Zusammenhang zwischen der Induktion der *EpoR*-Expression durch Retinsäure und Gata4 untersucht. Die Retinsäure-induzierte *EpoR*-Expression ist unabhängig von der Gata4-Menge bzw. die Gata4-induzierte *EpoR*-Expression ist unabhängig von der Retinsäure-Konzentration (Kapitel 4.5). Gata4 ist also für die Induktion des *EpoR* durch Retinsäure entbehrlich, hat aber alleine das Potenzial, die *EpoR*-Expression zu induzieren. Das steht im Gegensatz zum Ergebnis der Abbildung 6, wonach die Gata4-Menge keinen Einfluss auf die *EpoR*-Expression hat. Das ändert sich jedoch, wenn größere Gruppen wie in Abbildung 7 verglichen werden. Die multivariate Varianzanalyse fasst alle 30 Proben ohne Gata4-Knockdown (Gata4 mis) bzw. 31 Proben mit Gata4-Knockdown (Gata4 MO) zusammen, sodass eine höhere statistische *Power* erreicht wird. Dies spricht dafür, dass der RA-induzierte Effekt auf die *EpoR*-Expression größer ist als der von Gata4. Die geringe Stichprobenanzahl könnte allerdings auch der Grund für das Ausbleiben eines Effekts der Wt1-Menge auf die *EpoR*-

Expression in embryonalen Herzen (Abbildung 4, n = 3) bzw. Epikardzellen (Abbildung 5, n = 5) sein.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Informationen über die biologisch wirksame Dosierung bei der rhEpo-Behandlung und den geeigneten Applikationszeitpunkt nach einer Zellschädigung. In der Studie von Shan et al. (23) wurde in einem Myokardinfarkt-Mausmodell eine Konzentrationszunahme des phosphorylierten Gata4-Proteins nach einer rhEpo-Einmalgabe (1000 U/kg) bei Ischämie kurz vor Reperfusion beschrieben. Dessen Resultat ist die verminderte Apoptose von Kardiomyozyten sowie verbesserte kardiale Funktion. In der Studie von Jun et al. (61) wurde in einem *in vivo*-Versuchsmodell mit Ratten ebenfalls eine rhEpo-Einmalgabe von 4000 IU/kg eine Stunde vor der Ischämie intravenös verabreicht. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Apoptose von Kardiomyozyten sowie insgesamt ein geringeres Ausmaß der Infarktgröße. Diese Mechanismen sind mit einer Zunahme der Gata4-Phosphorylierung sowie einer verminderten Gata4-Ubiquitinierung zu erklären (61). Ein *ex vivo*-Zellkulturmodell von Kardiomyozyten von Ratten zeigte bei einer einstündigen rhEpo-Behandlung von 20 IU/ml unter Hypoxie dieselben signifikanten Effekte gegenüber Normoxie, wobei diese Effekte weniger ausgeprägt waren (25). Dies macht die Hypoxie zu einem entscheidenden Trigger der Epo-Funktionalität.

Die hier gezeigten *ex vivo*-Daten wurden unter Normoxie generiert und zeigen keinen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren *Gata4* oder *Wt1* bei rhEpo-Dosierungen von 0-20 U/l (Abbildung 8). Bei Shan et al. wurde der *Rescue*-Effekt durch rhEpo für das phosphorylierte Gata4-Protein nachgewiesen, die nicht-phosphorylierte Form war - ebenso wie in der vorliegenden Arbeit – ebenfalls nicht verändert.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass embryonale Herzorgankulturen sehr gut auf eine Stimulation durch Retinsäure ansprechen. Die *Knockdown*-Technik für das Modell der embryonalen Herzorgankulturen konnte erfolgreich etabliert werden. Jedoch konnte durch die reduzierte *Wt1*-Expression keine Veränderung in der *EpoR*-Expression nachgewiesen werden, weder in isolierten embryonalen Herzen (Abbildung 4) noch in Epikardkulturen (Abbildung 5). Das könnte bedeuten, dass die *EpoR*-Expression im embryonalen Herzen nicht *Wt1*-abhängig reguliert ist. Die betrachtete Stichprobenanzahl war jedoch auch nicht besonders groß. Ein

*Knockdown* von Gata4 führte gegenüber endogener Gata4-Konzentration zu einer signifikant verminderten *EpoR*-Expression. Dieser Effekt war unabhängig vom Effekt einer alleinigen Retinsäure-Behandlung. Damit konnte die Hypothese einer direkten Wirkung des Transkriptionsfaktors Wt1 auf die *EpoR*-Expression nicht bestätigt werden, die einer direkten Wirkung des Transkriptionsfaktors Gata4 jedoch schon.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Laforest B, Nemer M. GATA5 interacts with GATA4 and GATA6 in outflow tract development. *Dev Biol.* 2011;358(2):368-78.
2. Uygur A, Lee RT. Mechanisms of Cardiac Regeneration. *Dev Cell.* 2016;36(4):362-74.
3. Nemer G, Nemer M. GATA4 in Heart Development and Disease. *Heart Dev.* 2010; 599-616.
4. Garg, V., Kathiriyai, I. S., Barnes, R., Schluterman, M. K., King, I. N., Butler, C. A., Rothrock, C. R., Eapen, R. S., Hirayama-Yamada, K., Joo, K., Matsuoka, R., Cohen, J. C., Srivastava, D. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature.* 2003;424(6947):443-7.
5. Tong YF. Mutations of NKX2.5 and GATA4 genes in the development of congenital heart disease. *Gene.* 2016;588(1):86-94.
6. Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais, C., Leiden, J. M. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 1997;11(8):1048-60.
7. Evans SM, Yelon D, Conlon FL, Kirby ML. Myocardial lineage development. *Circ Res.* 2010;107(12):1428-44.
8. Krishnan A, Samtani R, Dhanantwari P, Lee E, Yamada S, Shiota K, Donofrio, M. T., Leatherbury, L., Lo, C. W. A detailed comparison of mouse and human cardiac development. *Pediatr Res.* 2014;76(6):500-7.
9. Molkenin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem.* 2000;275(50):38949-52.
10. Grépin C, Robitaille L, Antakly T, Nemer M. Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol.* 1995;15(8):4095-102.
11. Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol.* 1993;13(4):2235-46.
12. Pehlivan T, Pober BR, Brueckner M, Garrett S, Slauch R, Van Rheaden R, Wilson, D. B., Watson, M. S., Hing, A. V. GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *Am J Med Genet.* 1999;83(3):201-6.
13. Kelley C, Blumberg H, Zon LI, Evans T. GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development.* 1993;118(3):817-27.
14. Charron F, Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10(1):85-91.
15. Grépin C, Nemer G, Nemer M. Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development.* 1997;124(12):2387-95.
16. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), {30.10.2019}. <https://www.omim.org>
17. Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* 1997;16(18):5687-96.
18. Molkenin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* 1997;11(8):1061-72.

19. Pu WT, Ishiwata T, Juraszek AL, Ma Q, Izumo S. GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis. *Dev Biol.* 2004;275(1):235-44.
20. Bisping E, Ikeda S, Kong SW, Tarnavski O, Bodyak N, McMullen JR, Rajagopal S, Son J. K., Ma Q, Springer Z, Kang P. M., Izumo S., Pu W. T. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(39):14471-6.
21. Aries A, Paradis P, Lefebvre C, Schwartz RJ, Nemer M. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(18):6975-80.
22. Salisch S, Klar M, Thurisch B, Bungert J, Dame C. Gata4 and Sp1 regulate expression of the erythropoietin receptor in cardiomyocytes. *J Cell Mol Med.* 2011;15(9):1963-72.
23. Shan X, Xu X, Cao B, Wang Y, Guo L, Zhu Q, Li J., Que L., Chen Q., Ha T., Li C., Li Y. Transcription factor GATA-4 is involved in erythropoietin-induced cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2009;134(3):384-92.
24. Suzuki YJ. Cell signaling pathways for the regulation of GATA4 transcription factor: Implications for cell growth and apoptosis. *Cell Signal.* 2011;23(7):1094-9.
25. Jun JH, Shin EJ, Kim JH, Kim SO, Shim JK, Kwak YL. Erythropoietin prevents hypoxia-induced GATA-4 ubiquitination via phosphorylation of serine 105 of GATA-4. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(7):1126-33.
26. Bhatia SN, Suri V, Bundy A, Krauss CM. Prenatal detection and mapping of a distal 8p deletion associated with congenital heart disease. *Prenat Diagn.* 1999;19(9):863-7.
27. Ghatpande S, Ghatpande A, Zile M, Evans T. Anterior endoderm is sufficient to rescue foregut apoptosis and heart tube morphogenesis in an embryo lacking retinoic acid. *Dev Biol.* 2000;219(1):59-70.
28. Scholz H, Kirschner KM. Oxygen-Dependent Gene Expression in Development and Cancer: Lessons Learned from the Wilms' Tumor Gene, WT1. *Front Mol Neurosci.* 2011;4:4.
29. Scholz H, Kirschner KM. A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:54-9.
30. Kirschner KM, Hagen P, Hussels CS, Ballmaier M, Scholz H, Dame C. The Wilms' tumor suppressor Wt1 activates transcription of the erythropoietin receptor in hematopoietic progenitor cells. *FASEB J.* 2008;22(8):2690-701.
31. Dame C, Kirschner KM, Bartz KV, Wallach T, Hussels CS, Scholz H. Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood.* 2006;107(11):4282-90.
32. Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res.* 2001;264(1):74-99.
33. Wagner KD, Wagner N, Bondke A, Nafz B, Flemming B, Theres H, Scholz H. The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J.* 2002;16(9):1117-9.
34. Loeb DM. WT1 influences apoptosis through transcriptional regulation of Bcl-2 family members. *Cell Cycle.* 2006;5(12):1249-53.
35. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, Jiang D., von Gise A., Ikeda S., Chien K. R., Pu W. T. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature.* 2008;454(7200):109-13.
36. Duim SN, Kurakula K, Goumans MJ, Kruithof BP. Cardiac endothelial cells express Wilms' tumor-1: Wt1 expression in the developing, adult and infarcted heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;81:127-35.

37. von Gise A, Zhou B, Honor LB, Ma Q, Petryk A, Pu WT. WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through  $\beta$ -catenin and retinoic acid signaling pathways. *Dev Biol.* 2011;356(2):421-31.
38. Stuckmann I, Evans S, Lassar AB. Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol.* 2003;255(2):334-49.
39. Güven Bağla A, İçkin Gülen M, Ercan F, Aşgün F, Ercan E, Bakar C. Changes in kidney tissue and effects of erythropoietin after acute heart failure. *Biotech Histochem.* 2018;93(5):340-53.
40. Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. Transport and storage of vitamin A. *Science.* 1990;250(4979):399-404.
41. Khalil S, Bardawil T, Stephan C, Darwiche N, Abbas O, Kibbi AG, Nemer, G., Kurban, M. Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects. *J Dermatolog Treat.* 2017;28(8):684-96.
42. Moss JB, Xavier-Neto J, Shapiro MD, Nayeem SM, McCaffery P, Dräger UC, Rosenthal, N. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* 1998;199(1):55-71.
43. Bilbija D, Haugen F, Sagave J, Baysa A, Bastani N, Levy FO, Sirsjö, A., Blomhoff, R., Valen, G. Retinoic acid signalling is activated in the postischemic heart and may influence remodelling. *PLoS One.* 2012;7(9):e44740.
44. Gillespie RF, Gudas LJ. Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *J Mol Biol.* 2007;372(2):298-316.
45. Stefanovic S, Zaffran S. Mechanisms of retinoic acid signaling during cardiogenesis. *Mech Dev.* 2017;143:9-19.
46. Orsolits B, Borsy A, Madarász E, Mészáros Z, Kóhidi T, Markó K, Jelítai, M., Welker, E., Környei, Z. Retinoid machinery in distinct neural stem cell populations with different retinoid responsiveness. *Stem Cells Dev.* 2013;22(20):2777-93.
47. Pan J, Baker KM. Retinoic acid and the heart. *Vitam Horm.* 2007;75:257-83.
48. D'Aniello E, Waxman JS. Input overload: Contributions of retinoic acid signaling feedback mechanisms to heart development and teratogenesis. *Dev Dyn.* 2015;244(3):513-23.
49. Yousefi B, Azizzadeh F. The histopathological effects of retinoic acid on the tissues. *Pak J Biol Sci.* 2010;13(19):927-36.
50. Kostetskii I, Jiang Y, Kostetskaia E, Yuan S, Evans T, Zile M. Retinoid signaling required for normal heart development regulates GATA-4 in a pathway distinct from cardiomyocyte differentiation. *Dev Biol.* 1999;206(2):206-18.
51. Paiva SA, Matsubara LS, Matsubara BB, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana AO, Zornoff, L. A. Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nutr.* 2005;135(10):2326-8.
52. Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* 2004;18(9):1031-3.
53. Dame C, Sola MC, Lim KC, Leach KM, Fandrey J, Ma Y, Knöpfle, G., Engel, J. D., Bungert, J. Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J Biol Chem.* 2004;279(4):2955-61.



54. Stockmann C, Fandrey J. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2006;33(10):968-79.
55. Pichon A, Jeton F, El Hasnaoui-Saadani R, Hagström L, Launay T, Beaudry M, Marchant, D., Quidu, P., Macarlupu, J. L., Favret, F., Richalet, J. P., Voituron, N. Erythropoietin and the use of a transgenic model of erythropoietin-deficient mice. *Hypoxia (Auckl)*. 2016;4:29-39.
56. Sanchis-Gomar F, Garcia-Gimenez JL, Pareja-Galeano H, Romagnoli M, Perez-Quilis C, Lippi G. Erythropoietin and the heart: physiological effects and the therapeutic perspective. *Int J Cardiol*. 2014;171(2):116-25.
57. Kiss K, Csonka C, Pálóczy J, Pipis J, Görbe A, Kocsis GF, Murlasits, Z., Sárközy, M., Szúcs, G., Holmes, C. P., Pan, Y., Bhandari, A., Csont, T., Shamloo, M., Woodburn, K. W., Ferdinandy, P., Bencsik, P. Novel, selective EPO receptor ligands lacking erythropoietic activity reduce infarct size in acute myocardial infarction in rats. *Pharmacol Res*. 2016;113(Pt A):62-70.
58. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto, A., Stamler, J. S., Koch, W. J. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004;279(20):20655-62.
59. Dunlop EA, Percy MJ, Boland MP, Maxwell AP, Lappin TR. Induction of signalling in non-erythroid cells by pharmacological Levels of erythropoietin. *Neurodegener Dis*. 2006;3(1-2):94-100.
60. Dame C. GATA4: the missing link between Epo and cardioprotection?! *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013;23(5):e19-20.
61. Jun JH, Jun NH, Shim JK, Shin EJ, Kwak YL. Erythropoietin protects myocardium against ischemia-reperfusion injury under moderate hyperglycemia. *Eur J Pharmacol*. 2014;745:1-9.
62. Zafeiriou MP. The Erythropoietin System Protects the Heart Upon Injury by Cardiac Progenitor Cell Activation. *Vitam Horm*. 2017;105:233-48.
63. Kimáková P, Solár P, Solárová Z, Komel R, Debeljak N. Erythropoietin and Its Angiogenic Activity. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).
64. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development*. 1999;126(16):3597-605.
65. Bergmann MW, Haufe S, von Knobelsdorff-Brenkenhoff F, Mehling H, Wassmuth R, Münch I, Busjahn, A., Schulz-Menger, J., Jordan, J., Luft, F. C., Dietz, R. A pilot study of chronic, low-dose epoetin- $\beta$  following percutaneous coronary intervention suggests safety, feasibility, and efficacy in patients with symptomatic ischaemic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(5):560-8.
66. Hartwig S, Ho J, Pandey P, Macisaac K, Taglienti M, Xiang M, Alterovitz, G., Ramoni, M., Fraenkel, E., Kreidberg, J. A. Genomic characterization of Wilms' tumor suppressor 1 targets in nephron progenitor cells during kidney development. *Development*. 2010;137(7):1189-203.
67. Rudigier LJ, Dame C, Scholz H, Kirschner KM. *Ex vivo* cultures combined with *vivo*-morpholino induced gene *Knockdown* provide a system to assess the role of WT1 and GATA4 during gonad differentiation. *PloS one*. 2017;12(4):e0176296.
68. Jacobi CL, Rudigier LJ, Scholz H, Kirschner KM. Transcriptional regulation by the Wilms tumor protein, Wt1, suggests a role of the metalloproteinase Adamts16 in murine genitourinary development. *J Biol Chem*. 2013;288(26):18811-24.

69. Holt A, Wold F. The isolation and characterization of rabbit muscle enolase. *J Biol Chem.* 1961;236:3227-31.
70. Miles CG, Slight J, Spraggon L, O'Sullivan M, Patek C, Hastie ND. Mice lacking the 68-amino-acid, mammal-specific N-terminal extension of WT1 develop normally and are fertile. *Mol Cell Biol.* 2003;23(7):2608-13.

## **7 Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Monique Lau, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Wechselwirkungen der Transkriptionsmodulatoren Wt1, Gata4 und Retinsäure mit dem Erythropoietin/ Erythropoietin-Rezeptor-System des embryonalen Herzens der Maus“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **8 Lebenslauf**

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei jenen bedanken, die mit ihrem unermüdlichen Engagement maßgeblich zum Gelingen der hier vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. Christof Dame nicht nur für die Vergabe dieses spannenden Forschungsauftrages sowie der zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Materialien für alle Experimente, sondern vor allem möchte ich mich ganz herzlich für die vielen hilfreichen Gespräche, wertvollen Tipps, die gewissenhaften Korrekturen sowie der konstruktiven Kritik an dieser Arbeit bedanken. Ich schätze mich glücklich, dass ich als Doktorandin Teil seines Forschungsteams sein durfte und immer die nötige Unterstützung erfahren habe, um diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Zweitbetreuerin Dr. Karin Kirschner für Ihre permanente Unterstützung bei all meinen unzähligen Fragen. Auf ihre Hilfe durfte ich mich stets verlassen, vor allem während der tollen Zusammenarbeit bei der Durchführung der Experimente, bei der statistischen Datenauswertung, aber auch und erst recht beim Schreiben und Formulieren dieser Arbeit. Sobald ich um Hilfe bat, hat sie sich Zeit für mich genommen und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Damit hat sie mir das Schreiben unwahrscheinlich erleichtert.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Lina Sciesielski für die ebenfalls so gewissenhaften Korrekturen und konstruktiven Anmerkungen bedanken, die diese Arbeit maßgeblich mitgeprägt und vor allem verbessert haben. Vielen Dank für die geduldige Hilfe und Beantwortung meiner vielen Fragen. Selbst, wenn ich spontan angerufen oder eine Mail geschrieben habe, hat sie sich sofort Zeit genommen, um mich zu unterstützen, dafür bin ich sehr dankbar.

Nicht zuletzt möchte ich Dr. Martin Klar danken, der mich vor allem zu Beginn der Arbeit nicht nur bei der Einarbeitung in das Thema, sondern auch bei der Planung und Durchführung der Experimente mit seinem technischen und organisatorischen Knowhow unterstützte.

Für die stete liebevolle mentale Unterstützung danke ich meiner Familie von ganzem Herzen. Dank eurem unerschütterlichen Glauben an mich und eurer schier grenzenlosen Geduld mit mir, während der vielen Stunden des Recherchierens und Schreibens bei euch, seid ihr für mich ein wichtiger Teil dieser Arbeit.