

# **Interaktion des Transkriptionsfaktors Krüppel-like factor 15 mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin- Signaltransduktionsweg in adulten Mausherzen**

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Claudia Noack**  
aus Berlin

2012

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2008 bis Dezember 2011 am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), Berlin-Buch unter der Leitung von PD Dr. Martin Bergmann (Molekulare und Klinische Kardiologie) und von Januar bis November 2012 an der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Dr. Laura C. Zelarayán (Pharmakologie und Toxikologie) angefertigt.

Erstgutachter: PD Dr. Martin W. Bergmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Markus Wahl

Tag der Disputation: 17. Juni 2013

**– Einer neuen Wahrheit ist nichts schädlicher als ein alter Irrtum. –**

Johann Wolfgang von Goethe

Wilhelm Meisters Wanderjahre, Aus Makariens Archiv

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1	Die Herzinsuffizienz .....	- 1 -
1.1.1	Die kardiale Remodellierung .....	- 1 -
1.1.2	Mögliche Therapieansätze bei der Herzinsuffizienz .....	- 3 -
1.2	Das endogene Regenerationspotential im adulten Herzen .....	- 4 -
1.2.1	Endogene kardiovaskuläre Progenitorzell-Populationen des adulten Maus-herzens .....	- 6 -
1.3	Die embryonale Herzentwicklung .....	- 6 -
1.4	Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg .....	- 8 -
1.4.1	Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg während der Kardiogenese .....	- 11 -
1.5	Die <i>Krüppel-like factor</i> -Transkriptionsfamilie.....	- 12 -
1.5.1	Vertreter der <i>Krüppel-like factor</i> -Familie im Herzen .....	- 13 -
1.6	Zielstellung .....	- 14 -
<b>2</b>	<b>Material .....</b>	<b>- 15 -</b>
2.1	Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien.....	- 15 -
2.2	Färbelösungen .....	- 16 -
2.3	Größenmarker .....	- 17 -
2.4	Kits .....	- 17 -
2.5	Enzyme .....	- 17 -
2.6	Zellkulturmedien und Zusätze.....	- 17 -
2.7	Pharmaka .....	- 18 -
2.8	Plasmide.....	- 18 -
2.9	Oligonukleotide .....	- 19 -
2.9.1	Genotypisierungsprimer.....	- 19 -
2.9.2	Klonierungsprimer .....	- 19 -
2.9.3	Sequenzierungsprimer .....	- 19 -
2.9.4	Qrt-PCR-Primer .....	- 20 -
2.10	Antikörper .....	- 21 -
2.11	Chemisch kompetente Bakterien.....	- 22 -
2.12	Maus- und Rattenstämme .....	- 22 -
2.13	Zell-Linien .....	- 23 -
2.14	Geräte und Software .....	- 23 -
2.15	Zusammensetzung von Puffer, Lösungen und Medien.....	- 24 -
2.15.1	Lyse-Puffer .....	- 24 -
2.15.2	Gelelektrophorese-Lösungen .....	- 24 -

---

2.15.3	Bakterien-Lösungen.....	- 24 -
2.15.4	Zellkultur-Lösungen.....	- 25 -
2.15.5	Zellanalyse-Puffer.....	- 25 -
2.15.6	Mausinjektionslösungen.....	- 25 -
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>- 26 -</b>
3.1	Peptid-SPOT-Array.....	- 26 -
3.1.1	Peptidmembran-Synthese.....	- 26 -
3.1.2	Herstellung rekombinanter Proteine.....	- 26 -
3.1.2.1	Klonierung.....	- 26 -
3.1.2.2	Proteinexpression und -aufreinigung.....	- 28 -
3.1.3	Protein-Overlay und Detektion.....	- 28 -
3.2	Zellkultur.....	- 29 -
3.2.1	Kultivierung von HEK293- und SW480-Zellen.....	- 29 -
3.2.2	Primärkultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	- 29 -
3.2.3	Primärkultur von murinen kardialen Fibroblasten.....	- 30 -
3.2.4	Kultivierung von murinen kardiovaskulären Vorläuferzellen.....	- 31 -
3.2.4.1	CPC-Isolation durch enzymatischen Gewebeverdau.....	- 31 -
3.2.4.2	Nicht-enzymatische CPC-Isolation.....	- 31 -
3.2.4.3	CPC-Kultivierung auf einer Proteinmatrix.....	- 31 -
3.2.4.4	CPC-Kultivierung auf Feeder-Layer.....	- 32 -
3.2.5	Quercetin-Behandlung von kultivierten Zellen.....	- 32 -
3.2.6	Plasmid-Transfektion.....	- 32 -
3.3	Tierexperimentelle Arbeiten.....	- 33 -
3.3.1	Tierhaltung und Tierversuchsgenehmigung.....	- 33 -
3.3.2	Induktion der $\beta$ -Catenin-transgenen Mäuse.....	- 33 -
3.3.3	Maus-Genotypisierung.....	- 34 -
3.3.4	Induktion von kardialer Belastung.....	- 35 -
3.3.4.1	Angiotensin II-Infusion.....	- 35 -
3.3.4.2	Transverse Aortenkonstriktion.....	- 35 -
3.3.5	Echokardiographie.....	- 36 -
3.3.6	Organentnahme und Morphometrie.....	- 37 -
3.4	Zellanalysen.....	- 38 -
3.4.1	Magnetische Zellsortierung mittels MACS.....	- 38 -
3.4.2	Zellanalysen mittels Durchflusszytometrie.....	- 38 -
3.4.3	Zellzyklus-Analyse.....	- 39 -
3.5	Molekularbiologische Methoden.....	- 40 -
3.5.1	Luziferase-Reportergen-Assay.....	- 40 -
3.5.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	- 41 -

---

---

3.5.3	Plasmid-DNA-Isolation .....	- 41 -
3.5.4	DNA-Sequenzierung .....	- 41 -
3.5.5	RNA-Expressionsanalyse mittels quantitativer real-time PCR.....	- 41 -
3.6	Proteinbiochemie.....	- 42 -
3.6.1	Gesamtzell-Proteinextraktion.....	- 42 -
3.6.2	Zellfraktionierung.....	- 42 -
3.6.3	Proteinquantifizierung .....	- 43 -
3.6.4	Ko-Immunpräzipitation .....	- 43 -
3.6.5	Nachweis von ubiquitiniertem TCF4.....	- 43 -
3.6.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	- 44 -
3.6.7	Western Blot .....	- 44 -
3.7	Immunzytochemie .....	- 45 -
3.8	Histochemie von Gewebeschnitten .....	- 45 -
3.8.1	Anfertigung von Gewebeschnitten .....	- 45 -
3.8.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	- 46 -
3.8.3	Fibrose-Nachweis .....	- 46 -
3.8.4	Zellflächen-Querschnitt-Quantifizierung.....	- 47 -
3.8.5	Apoptose-Nachweis.....	- 47 -
3.8.6	Endothelzell-Quantifizierung .....	- 47 -
3.9	Statistische Auswertung.....	- 48 -
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>- 49 -</b>
4.1	<i>Krüppel-like factor 15</i> (KLF15) als neuer Bindungspartner von nuklearen Regulatoren des Wnt-Signalweges in Herzzellen identifiziert .....	- 49 -
4.2	KLF15-Interaktion mit $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 erfolgt über verschiedene Proteindomänen.....	- 50 -
4.2.1	KLF15 interagiert über N-terminale Domänen mit $\beta$ -Catenin und NLK und über den C- Terminus mit TCF4.....	- 50 -
4.2.2	KLF15 interagiert mit der katalytischen Kinasedomäne von NLK und der DNA- Bindungsdomäne von TCF4 .....	- 54 -
4.3	KLF15 ko-lokalisiert mit $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 im Zellkern .....	- 58 -
4.4	KLF15 fungiert als Inhibitor der $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkription.....	- 59 -
4.4.1	KLF15 beeinflusst den proteasomalen Abbau von TCF4.....	- 61 -
4.5	KLF15 ist vermehrt in adultem Herzgewebe exprimiert .....	- 62 -
4.6	Untersuchung eines konventionellen, systemischen <i>Klf15</i> -Knockout-Mausmodells .....	- 63 -
4.6.1	Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist im Herzgewebe von systemischen <i>Klf15</i> -KO-Mäusen aktiviert.....	- 64 -
4.6.2	Adulte <i>Klf15</i> -KO-Mäuse weisen eine verminderte kardiale Funktion auf.....	- 66 -
4.6.3	Keine Anzeichen von Kardiomyozyten-Hypertrophie, -Atrophie, -Apoptose und Fibrose in <i>Klf15</i> -KO-Herzen.....	- 67 -
4.6.3.1	Untersuchungen auf Hypertrophie oder Atrophie der Kardiomyozyten .....	- 68 -

---

---

4.6.3.2	Untersuchung auf einen Verlust von Kardiomyozyten .....	- 68 -
4.6.3.3	Untersuchung auf Fibrosierung des Herzens .....	- 69 -
4.7	<i>Klf15</i> -KO führt bei chronisch-kardialer Belastung zu vorzeitiger Herzmuskel-Remodellierung .....	- 70 -
4.7.1	<i>Klf15</i> -KO-Mäuse weisen eine verminderte Anpassungsfähigkeit bei mildem kardialen Stress auf .....	- 70 -
4.7.2	<i>Klf15</i> -KO-Mäuse haben eine höhere Mortalität nach stringentem kardialem TAC-Stressmodell .....	- 71 -
4.8	KLF15 beeinflusst endogene kardiovaskuläre Progenitorzellen <i>in vivo</i> .....	- 75 -
4.8.1	KLF15 ist in CPCs exprimiert .....	- 75 -
4.8.2	CPCs von <i>Klf15</i> -KO-Mäusen weisen verstärkte Proliferation und verändertes <i>Cell fate</i> auf .....	- 75 -
4.9	Herzen von <i>Klf15</i> -KO-Mäusen verfügen über mehr Endothelzellen .....	- 79 -
4.9.1	Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beeinflusst den Endothelzell-Gehalt in Herzen .....	- 80 -
4.10	<i>In vitro</i> -Reproduktion des <i>Cell fate</i> von CPCs aus adulten Mauserherzen .....	- 81 -
4.10.1	Blockade des aktivierten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ändert das <i>Cell fate</i> in <i>Klf15</i> -KO-CPCs .....	- 86 -
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>- 90 -</b>
5.1	KLF15 interagiert als Inhibitor mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg .....	- 90 -
5.1.1	KLF15 benötigt den C-Terminus zum Kernimport und unterschiedliche N- und C-terminale Proteininteraktionsdomänen zur Inhibition der $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelten Transkription .....	- 90 -
5.1.2	Gesteigerte TCF4-Ubiquitinierung durch KLF15 trägt zur Repression des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionswegs bei .....	- 93 -
5.2	Systemische <i>Klf15</i> -Knockout-Mäuse weisen kardial-spezifische $\beta$ -Catenin/TCF-Aktivierung und maladaptive Herzfunktion auf .....	- 96 -
5.3	KLF15 beeinflusst die Homöostase von endogenen kardiovaskulären Progenitorzellen über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg .....	- 98 -
5.3.1	Der Verlust von funktionellem KLF15 verschiebt das <i>Cell fate</i> von CPCs auf Seiten der Endothelzellen <i>in vivo</i> .....	- 99 -
5.4	Die <i>in vitro</i> Differenzierung von CPCs aus adulten Herzen .....	- 102 -
5.4.1	Die pharmakologische Blockade des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ermöglicht die Reversion des <i>Klf15</i> -KO-CPC <i>Cell fate in vitro</i> .....	- 104 -
5.5	Fazit und Ausblick .....	- 105 -
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>- 108 -</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>- 110 -</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>- 112 -</b>
<b>9</b>	<b>Referenzen</b> .....	<b>- 114 -</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>- 125 -</b>
10.1	Publikationen .....	- 125 -
10.2	Vorträge .....	- 125 -

---

10.3	Posterpräsentationen mit Auszeichnung .....	- 126 -
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>- 127 -</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>- 128 -</b>
<b>13</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>- 129 -</b>
	I Plasmidkarten .....	- 129 -
	II Durchflusszytometrische Kontrollen .....	- 132 -
	III Echokardiographische Messwerte .....	- 134 -

## 1 Einleitung

- Das Herz der Lebewesen ist der Grundstock ihres Lebens, der Fürst ihrer aller, der kleinen Welt Sonne, von der alles Leben abhängt, alle Frische und Kraft ausstrahlt. –

William Harvey, *De Motu Cordis et Sanguinis*. (Die Bewegung des Herzens und des Blutes.), 17. Jahrhundert.

### 1.1 Die Herzinsuffizienz

Mehr als 17 Millionen Menschen sterben jährlich an Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems, mehr als 40% davon an einem Myokardinfarkt [1]. Somit stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache vor allem in der westlichen Welt. Trotz wachsender Verbesserung der medizinischen Versorgung wird weltweit eine Zunahme der Morbidität und Mortalität verzeichnet, allein in Deutschland wird geschätzt, dass 2-3 Millionen Menschen gegenwärtig unter Herzinsuffizienz leiden [2].

Das Herz erbringt in einem lebenslangen Rhythmus die Leistung zweier parallel, aber miteinander verbundenen Kreisläufe. Durch eine periodische Abfolge von Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole) wird über die rechte Herzhälfte der Lungenkreislauf zum Gasaustausch bedient und mittels der linken und kräftigeren Herzhälfte der Körper mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen über den Blutkreislauf versorgt. Kann diese lebenserhaltende rhythmische Abfolge vom Herzen nicht mehr zur Genüge erbracht werden, liegt das sehr komplexe Krankheitsbild der Herzinsuffizienz vor. Die Anforderungen des Körpers können nur unter einem pathologischen Füllungsdruck aufrechterhalten werden [3]. Ausgelöst wird diese progressive Erkrankung in der Regel durch chronischen Bluthochdruck, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen, Klappenstenose oder genetische Kardiomyopathien, wobei Faktoren wie Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, Fehlernährung, mangelnde Bewegung und Stress das Risiko enorm erhöhen [4]. Unabhängig von der Ursache kommt es zum fortschreitenden Verlust der Herzfunktion und die Patienten zeigen je nach Stadium Anzeichen von Erschöpfung bei Aktivität und/oder sogar bei Ruhe, Kurzatmigkeit, Rhythmusstörungen, periphere Flüssigkeitsstauungen, Lungenödeme und *Angina pectoris*. Die Betroffenen besitzen nur noch ein Minimum an Lebensqualität und sind im Endstadium bettlägerig [5]. Die hohen Mortalitätswerte sprechen für sich selbst.

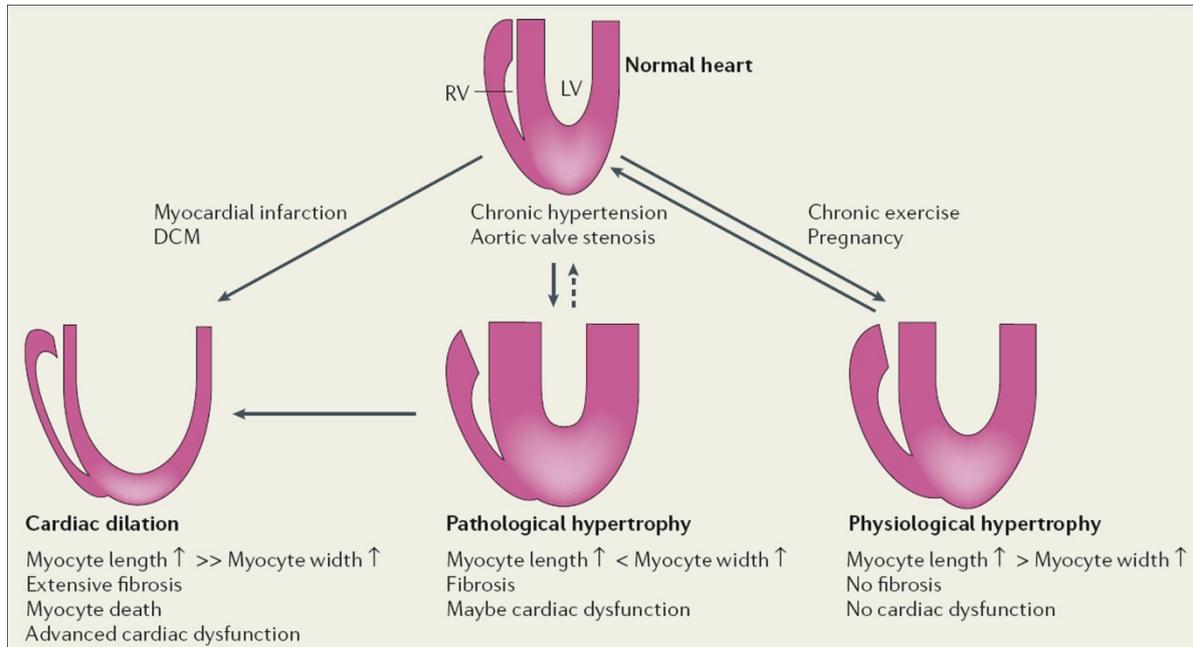
#### 1.1.1 Die kardiale Remodellierung

Betrachtet man den Verlauf der Herzinsuffizienz auf zellulärer und organischer Ebene, so erfolgt ein gradueller Prozess der sogenannten kardialen Remodellierung, bei der das adulte Herz seine Größe,

Geometrie und Funktion mit der Zeit verändert [6]. Zugrundeliegend sind meist akute Verletzungen des Herzmuskels wie nach einem Infarkt oder chronische Druck- oder Volumenüberlast des linken Ventrikels. Zellulär betrachtet ist das Herz nicht nur aus Kardiomyozyten, sondern auch aus Bindegewebszellen, vaskulären Zellen und Zellen des autonomen Nervensystems zusammengesetzt. Obwohl die Kardiomyozyten den größten Anteil an der Organmasse bilden, sind dies nur ca. 30% aller Zellen des Herzens und vor allem die einzigen, die die Kontraktionsfähigkeit des Muskels erbringen. [7]. Ein humaner linker Ventrikel besteht aus ca. 2-4 Mrd. Kardiomyozyten, wovon durch den Verschluss einer wesentlichen Koronararterie und subsequenten Infarkt innerhalb weniger Stunden bis zu 25% absterben, bei chronischer Überlast ist dieser Verlust über mehrere Jahre verteilt [8].

Während das Herz in der Embryogenese durch Proliferation der Kardiomyozyten wächst, wurde lange davon ausgegangen, dass kurz nach der Geburt diese Kapazität verloren geht und die Herzzellen nur über Hypertrophie und nicht durch Neubildung von Kardiomyozyten einen Massenzuwachs erreichen [9]. Diese Sichtweise ist heute weitestgehend revidiert und wird ausführlicher unter Abschnitt 1.2 diskutiert. Dennoch behalten die bisherigen Erkenntnisse zum Remodellierungsprozess ihre Gültigkeit: Auf molekularer Ebene werden durch biomechanische und Stress-sensitive Mechanismen neurohumorale Membranrezeptoren aktiviert, welche über zahlreiche intrazelluläre Signalwege und Mediatoren wie *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK), Kalzium-Signalwege über Calcineurin, *Insulin-like Growth Factors 1* (IGF-1), Phosphatidylinositol-3-Kinase/Protein Kinase B (PI3K/PKB) und Histondeacetylasen (HDACs) zu einer veränderten Transkription und Proteinsynthese führen. Dabei werden im Wesentlichen Transkriptionsfaktoren, die für die embryonale Kardiogenese wichtig sind, z.B. *Myocyte enhancer factor 2* (Mef2), GATA4, *Serum Response Factor* (SRF), Nkx2.5, *Atrial- und B-type natriuretic Peptide* (ANP, BNP) induziert. Es wird hierbei von einer Reaktivierung des fötalen Genprogramms gesprochen [10-12]. Zellulär kommt es dann durch eine vermehrte Proteinsynthese zur Sarkomer-Umstrukturierung und zur Größenzunahme der Kardiomyozyten. Im ersten Schritt handelt es sich hierbei um einen Anpassungsprozess, der zur Erhöhung der kontraktilen Einheiten führt und somit die zusätzliche Belastung bzw. den Verlust von Kardiomyozyten ausgleicht und eine stabile Herzfunktion gewährt. Man spricht vom Stadium der adaptiven, kompensatorischen Hypertrophie, die bis zu einem bestimmten Grad als reversibel angesehen wird. Dauert der Zustand der Belastung allerdings an oder verschlimmert sich noch, wechselt der adaptive Status in ein maladaptives, dekompenziertes Stadium. Zum einen kommt es vermehrt zur Apoptose der Kardiomyozyten und damit zu erneutem Verlust von kontraktiler Kraft [13] und zum anderen zu einem gesteigerten Prozess der Fibrosierung, an denen die Bindegewebszellen des Herzens den größten Anteil haben [14]. Die Fibroblasten produzieren vermehrt Kollagen, das in den interstitiellen Raum eingelagert wird und zur Versteifung des Herzens führt. Dies wirkt in erster Linie der Dilatation und dem Wandstress des linken Ventrikels entgegen, führt aber zu Störung der Kontraktilität und Arrhythmien und ist damit ein klares Zeichen der maladaptiven Remodellierung [15, 16] (**Abb. 1**).

Je nach zugrunde liegender Ursache wird auch oft zwischen physiologischer (z.B. bei Leistungssport) und pathologischer (z.B. bei chronischem Bluthochdruck) Hypertrophie unterschieden, wobei erstere als reversibel und letztere als irreversibel angesehen wird. Allerdings ist die Klassifizierung diffizil, da auch physiologische Hypertrophie in einen dekompensierten Zustand übergehen kann, ebenso wie bei frühem Eingreifen die pathologischen Veränderungen reversibel sind [17].



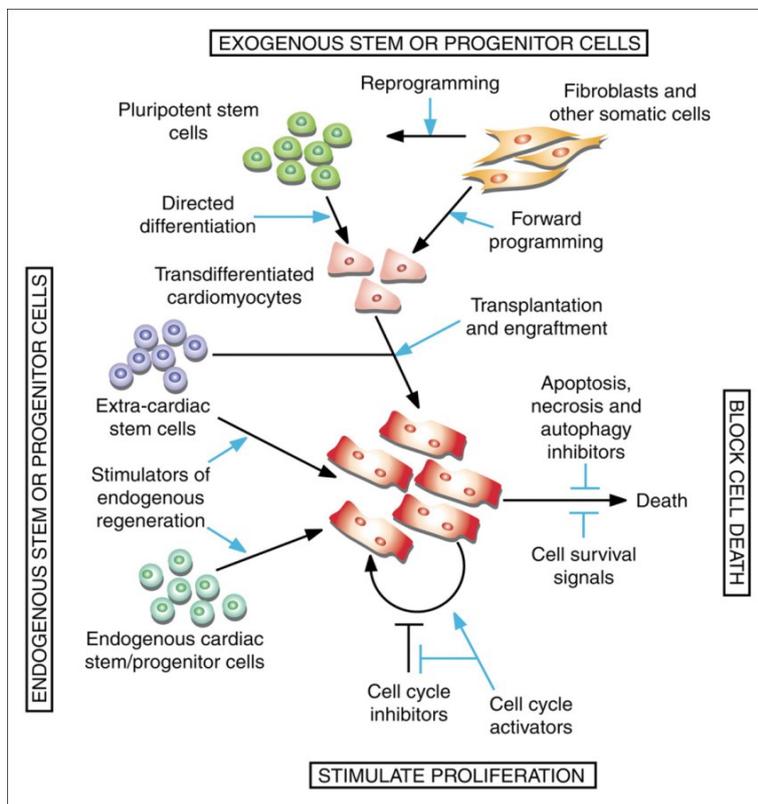
**Abb. 1 Schema der kardialen Remodellierung.**

Das Herz reagiert auf zusätzliche Arbeitslast in einer ersten Phase mit hypertrophem Wachstum der Kardiomyozyten, um die kontraktile Kraft anzupassen. Ist diese zusätzliche Belastung durch Konditionen wie z.B. Schwangerschaft oder Ausdauertraining verbunden, spricht man von kompensatorischer, physiologischer Hypertrophie, die reversibel ist. Liegen pathologische Ursachen zugrunde, wie z.B. chronischer Bluthochdruck oder Aortenklappenstenose, geht der kompensatorische meist in einen dekompensierten Zustand über. Dieser ist mit erhöhter Kardiomyozyten-Apoptose und Kollageneinlagerungen (Fibrose) verbunden; das Herz dilatiert und kann die benötigte Leistung nicht mehr erbringen. Der maladaptive Zustand ist nicht reversibel und kann auch ohne vorherige kompensatorische Phase nach schwerem Myokardinfarkt oder aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) ausgelöst werden. Die Herzinsuffizienz befindet sich im Endstadium. LV: linker Ventrikel, RV: rechter Ventrikel. Übernommen von Heineke und Molkentin (2006) [11].

### 1.1.2 Mögliche Therapieansätze bei der Herzinsuffizienz

Um die Lebensqualität der Patienten zu erhöhen und die Mortalität herabzusetzen, steht derzeit ein breites Spektrum an Methoden zur Verfügung. Neben den oft unumgänglichen Änderungen des Lebensstils und der Essgewohnheiten, werden über Pharmakotherapie mittels Diuretika, *Angiotensin-Converting Enzyme* (ACE)-Hemmer und  $\beta$ -Blocker - um nur die gängigsten zu nennen - die Flüssigkeitsretention und die pathologische Erhöhung des Füllungsdrucks des linken Ventrikels kontrolliert [3]. Im fortgeschrittenen Stadium ist häufig eine invasivmedizinische Intervention notwendig. Hierzu zählen koronare Revaskularisierungen z.B. über Stents oder Bypass-Operationen,

oder im Falle von Arrhythmien die Resynchronisation durch Implantierung von Kardioverter Defibrillatoren. Im Endstadium ist meist nur noch die Transplantation eines Spenderorgans möglich [5]. Bis auf die selten durchführbare Transplantation, zielen diese Methoden insgesamt lediglich auf die Behandlung der Symptome ab. Es erfolgt keine Behandlung des zugrunde liegenden Problems: den Verlust der kontraktilen Einheiten, den Kardiomyozyten. Neue Ansätze verfolgen deshalb Strategien, welche die Anzahl der Herzmuskelzellen erhöht [18]. Hierzu zählen die Reaktivierung des Zellzyklus der Kardiomyozyten, um die Proliferation zu stimulieren; Verhindern des Zelltods bzw. Erhöhen des Überlebens; und neue Kardiomyozyten aus endogener oder exogener Quelle zu erzeugen (**Abb. 2**). Die Verwendung exogener Stammzellen birgt das Problem der Immunkompatibilität, Transplantierbarkeit und anschließende Integration ins Herzgewebe. Deshalb gewinnen besonders Ansätze zur verstärkten Proliferation und Differenzierung endogener Progenitorzellen zu funktionellen Kardiomyozyten an Bedeutung [19].



**Abb. 2 Therapeutische Strategien zur Vermehrung von Kardiomyozyten.**

Das Schema fasst anschaulich die derzeitigen Ansätze zur kausalen Behandlung der Herzinsuffizienz zusammen. Um den Verlust von Kardiomyozyten zu verhindern, gibt es Strategien zur Blockade des Zelltods oder zur Steigerung des Überlebens von Zellen. Um Kardiomyozyten zu ersetzen, wird versucht, die Zellproliferation zu stimulieren, exogene Zellquellen zu funktionellen Kardiomyozyten zu differenzieren und zu transplantieren, oder endogene Stamm-/Progenitorzellen zur gesteigerten Regeneration anzuregen. Übernommen von Mercola *et al.* (2011) [19].

## 1.2 Das endogene Regenerationspotential im adulten Herzen

Um die zuvor beschriebenen Ansätze zur Expansion von endogenen Stamm-/Progenitorzellen umzusetzen, stellt sich zunächst die Frage nach der Regenerationsfähigkeit des adulten Herzens. Lange Zeit herrschte das Dogma vor, dass nicht nur die Kardiomyozyten eines postnatalen Herzens terminal differenziert seien und damit nicht mehr fähig wären, sich zu vermehren, sondern auch keine

Stammzellen vorhanden seien, die eine Erneuerung der kontraktile Zellen ermöglichen. Demnach beruht die Massenzunahme des Herzens, welche bei kardialer Remodellierung beobachtet wird, ausschließlich auf hypertrophem Wachstum. Dies würde bedeuten, dass Kardiomyozyten, die im Laufe des Lebens sterben, nicht durch neue kontraktionsfähige Zellen ersetzt werden und dass alle Kardiomyozyten ebenso alt sind wie der Mensch selbst [20].

Von Zebrafärblingen („Zebrafisch“, *Danio rerio*) und Molchen ist bekannt, dass sie auch im ausgereiften Alter noch eine hohe Regenerationskapazität des Herzens besitzen. Interessante Studien demonstrieren, dass nach Entfernung von ca. 20% des Herzens in 1-2 Jahre alten Zebrafärblingen, diese nach 30-60 Tagen ein vollständig regeneriertes Organ aufwies. Mechanistisch wurde eine De-Differenzierung der adulten Kardiomyozyten, die wieder in den Zellzyklus eintreten, gezeigt [21, 22]. Ähnliche Experimente in Mäusen, deren Herz eher dem humanem entspricht als dem eines Fisches, ergaben dasselbe Ergebnis. Jedoch mit der Einschränkung, dass eine vollständige Regeneration des Herzens mit normaler systolischer Funktion nur funktionierte, wenn die Sektion bis zum P1-Stadium (1 Tag postnatal) erfolgte. Bereits in 7 Tage alten Mäusen war das Potenzial nahezu verloren gegangen und es erfolgte Fibrosierung und Narbenbildung [23]. Darüber hinaus bewiesen *Cell Tracing*-Studien an transgenen Mäusen, bei denen Zellen genetisch markiert und nachverfolgt wurden, dass Kardiomyozyten-Erneuerung fast ausschließlich bei Reparaturbedarf wie nach Myokardinfarkt auftritt und diese anders als bei den Zebrafärblingen nicht durch Wiedereintritt in den Zellzyklus, sondern durch Progenitorzellen erfolgte [19, 24, 25]. Messungen der DNA-Synthese in fötalen Rattenkardiomyozyten ergaben eine 17%ige Replikationsrate, wohingegen nach der Geburt nur noch 13% und in adulten Ventrikeln nur noch 0,1-2% gemessen wurden [7, 26]. Zur Ermittlung einer potentiellen kardialen Regeneration beim Menschen wurde ein eleganter Ansatz verfolgt, bei dem sich die Nuklearbombentests zur Zeit des Kalten Krieges zunutze gemacht wurden. Während dieser Zeit stieg der Anteil von  $^{14}\text{C}$ -Kohlenstoff in der Atmosphäre stark an und wurde über Pflanzen in die Nahrungskette aufgenommen. Nach dem Atomtest-Stopp-Abkommen 1963 sanken die  $^{14}\text{C}$ -Level in der Atmosphäre rapide ab. Mittels Radiokarbonmessungen von  $^{14}\text{C}$  in Kardiomyozyten-DNA konnte eine Altersbestimmung vorgenommen werden und mit dem Alter des Patienten verglichen werden. Daraus ergab sich ein jüngeres Alter der Kardiomyozyten, welches eine Erneuerung der Zellen im Laufe des Lebens beweist. Die Autoren errechneten sogar, dass im Durchschnitt die Hälfte der Kardiomyozyten während eines Lebens durch Neue ersetzt werden. Jedoch betrug der jährliche Umsatz maximal 1% und nahm progressiv mit dem Alter ab [27].

Heute ist weitestgehend akzeptiert, dass das adulte Herz Regenerationspotential besitzt, dieses jedoch nur extrem gering vorliegt. Deshalb werden zahlreiche Ansätze verfolgt, um die Regulationsmechanismen der endogenen Regeneration aufzuschlüsseln, besser zu verstehen und therapeutisch für die Behandlung der Herzinsuffizienz einzusetzen.

### **1.2.1 Endogene kardiovaskuläre Progenitorzell-Populationen des adulten Mausherzens**

Für die regenerative Skelettmuskulatur wurde herausgefunden, dass die Wiederherstellung der Muskulatur nach einem Unfall durch sogenannte Satelliten-Zellen erfolgt, die in der Basallamina der Muskelfasern ruhen [28]. Nach demselben Prinzip wird vermutet, dass im Herzen kardiovaskuläre Progenitorzellen (*Cardiovascular Progenitor Cells*, CPC) in solchen „Stammzell-Nischen“ mit einer Organ-spezifischen Mikroumgebung ruhen, die zur Erhaltung und Reparatur des Gewebes zumindest in geringem Maße reaktiviert werden [29]. In der Kardiogenese konnten einige Faktoren identifiziert werden, die als „Marker“ bestimmter Strukturen und Zellpopulationen gelten. Allerdings ist häufig derselbe Marker auf verschiedenen Zellpopulationen vorhanden. Zudem sind im adulten Herzen viele dieser fötalen Marker entweder noch aktiv oder wurden im Remodellierungsprozess reaktiviert [12], so dass eine Identifikation eines definitiven Stamm-/Progenitorzell-Markers schwierig ist. Heute sind mindestens sechs verschiedene Vorläuferpopulationen im adulten Herzen charakterisiert worden. Am gängigsten sind *Stem cell antigen 1* (Sca1) [30], c-Kit [31], *Cardiac Side Population* Zellen (CSP) [32], *Islet-1* (Isl1) [33], Kardiosphären [34] und epikardiale Progenitorzellen mit *Wilms Tumor 1* (WT1)-Expression [35]. Für nicht alle konnten die Kriterien einer Stammzelle gezeigt werden: Klonogenität, Fähigkeit zur Selbst-Erneuerung und Pluripotenz [36]. Dieses führt in der Fachwelt häufig zu Kontroversen. Beispielsweise wird Isl1 in der Literatur oft als CPC-Marker beschrieben, der die Fähigkeit besitzt, alle Zellen des Herzens bilden zu können [37], wohingegen andere zeigen, dass keine Reaktivierung im adulten Herzen und somit keine Regeneration durch Isl1<sup>pos</sup>-Zellen erfolgte [25, 38]. Zudem handelt es sich oft nicht ausschließlich um kardiomyogene Progenitorzellen, so ist c-Kit z.B. auch ein typischer Marker der hämatopoietischen Zell-Linie und umstritten, ob diese im adulten Organ tatsächlich zu Kardiomyozyten differenzieren können [8, 25]. Einige Populationen zeigen auch überlappende Marker, beispielsweise wurden CSP-Sca1-Zellen gefunden [32], so dass auch die Beziehung der Populationen zueinander unklar ist. Anteilsmäßig werden die Sca1-, CSP- und c-Kit-Population zusammen mit 0,005 bis 2% aller Zellen im adulten Mausherzen angegeben. Jedoch ist noch unklar, ob es sich bei diesen CPCs um jeweils unterschiedliche Zell-Linien handelt oder sie nur verschiedene Stadien innerhalb einer Linie markieren [25, 39]. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit die am häufigsten und besten untersuchten Marker Sca1 und c-Kit zur Identifikation von kardiovaskulären Progenitorzellen in adulten Mausherzen verwendet.

### **1.3 Die embryonale Herzentwicklung**

Es kam die Hypothese auf, dass eine Re-Aktivierung von Signalkaskaden der embryonalen Herzentwicklung helfen wird, die endogenen CPC-Populationen zu aktivieren, um das beschädigte

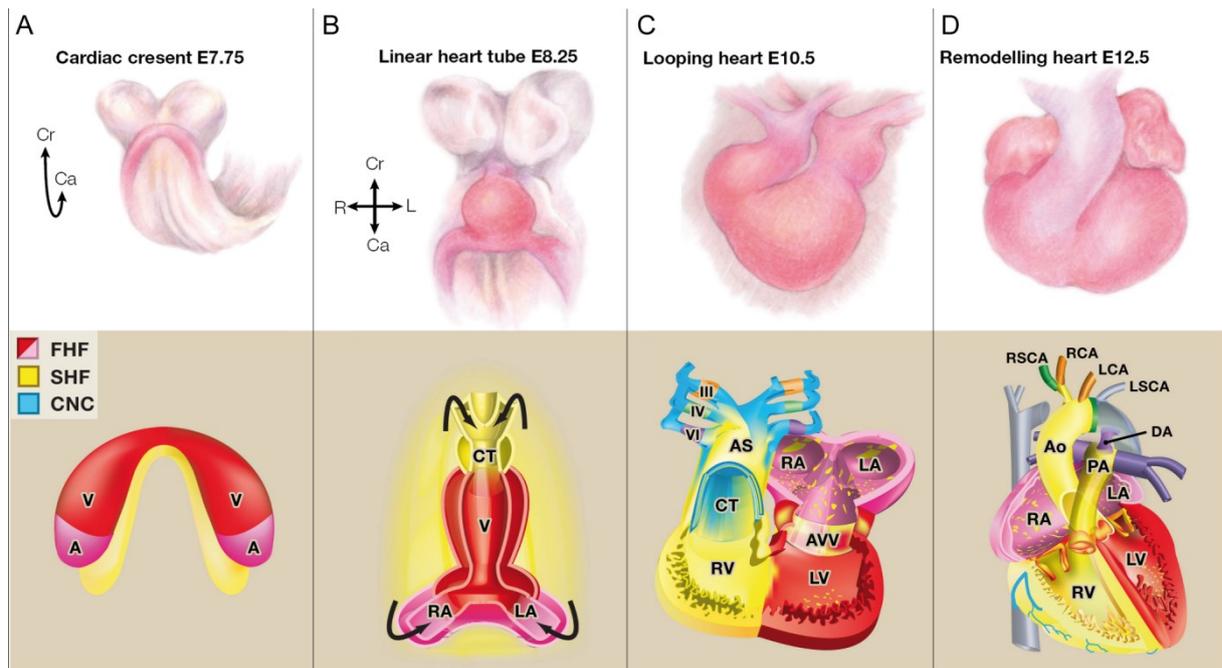
Herz zu regenerieren [40]. Somit liegt der Grundstein für die Entwicklung regenerativer Therapien im Verständnis der exakten Abläufe und den zugrunde liegenden molekularen Signalen während der Kardiogenese. Im Folgenden wird zusammenfassend dargestellt, welche Phasen die embryonale Herzentwicklung durchläuft und welche Gene eine besondere Rolle spielen.

Das Herz ist das erste Organ, das während der Vertebraten-Embryogenese geformt wird, so dass das sich entwickelnde Lebewesen mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt wird. Wenige Tage nach der Befruchtung der Eizelle kommt es im Stadium der sogenannten Gastrulation durch eine erstaunliche zeitliche Koordination und Musterung der Zellbewegung zur Aufteilung der Epiblast-Zellen. Dabei bildet sich der Primitivstreifen und es erfolgt die Aufteilung in die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm [41]. Während sich im Laufe der Entwicklung aus dem Endoderm Darm, Leber, Lunge und Pankreas bilden, entstehen aus dem Ektoderm Haut und Nervensystem. Aus dem Mesoderm bilden sich Skelettmuskel, Knochen, Sehnen, sowie das hämatopoetische und kardiovaskuläre System [42].

Die Kardiogenese kann zusammengefasst in vier wesentliche Stadien unterteilt werden: (1) Formation des *Cardiac Crescent*, (2) Bildung des Herzschlauchs, (3) *Looping* und (4) Herzstrukturierung (**Abb. 3**). Zunächst ist es essentiell, dass die Herz-bildenden Zellen aus der anterioren Region des Primitivstreifens unter die sogenannte Kopffalte cranio-lateral migrieren [43]. Diese Zellen exprimieren den z.Z. frühesten bekannten Marker der kardiovaskulären Entwicklung: *Mesoderm posterior1* (*Mesp1*), der nach der Induktion der kardialen Spezifikation verloren geht [44]. Die Zellen teilen sich dann in zwei Gruppen auf beiden Seiten der Mittellinie. Die erste sich bildende Population wird als *First Heart Field* (FHF) bezeichnet und bildet den sogenannten *Cardiac Crescent*, eine frühe sichelförmige Herzanlage. Die zweite Population, das *Second Heart Field* (SHF), ordnet sich medial dazu an (**Abb. 3A**). Als FHF-Marker werden die Transkriptionsfaktoren *T-Box 5* (*Tbx5*) und *Hand1* genannt. Das SHF ist durch die Marker *Isl1*, *Hand2* und *Fibroblast growth factor 10* (*Fgf10*) gekennzeichnet. Sowohl FHF als auch SHF sind positiv auf *Nkx2.5* und *GATA4*. Zudem sind die Marker *Hand1* und *2* auch jeweils im anderen Herzfeld vorhanden. *Hand1* ist nur stärker im FHF und *Hand2* im SHF exprimiert. Wichtig hierbei ist, dass kein einzelner Faktor allein essentiell für die Kardiogenese ist, sondern ein fein abgestimmtes Zusammenspiel von positiven und negativen Signalen phasenabhängig von FGFs, *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs), Notch und Wnts notwendig ist, welche die Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren regulieren [43, 45].

Aus dem *Cardiac Crescent* wird durch Drehbewegungen der anderen embryonalen Anlagen der Herzschlauchs gebildet. In diesem Stadium beginnt die Expression der kontraktile Marker  $\alpha$ - und  $\beta$ -*Myosin Heavy Chain* (MHC) [46] (**Abb. 3B**). Im nachfolgenden Prozess des *Loopings* kommt es zur Formung einer rechtsseitigen Herzschleife mit einer Spiralförmigkeit des Herzschlauchs, bei der sich die zuvor posteriore Seite zur anterioren Seite bewegt. Gleichzeitig kommt es zur Ausstülpung der Ventrikel, Ausbildung der Trabeculae durch Expansion der Zellen in den Ventrikeln und zur Anlage

der Endokardkissen, aus denen sich die Klappen und Septen bilden. Zusätzlich wandern aus der Neuralleiste Zellen ein, die den Ausflusstrakt, den Aortenbogen und das autonome Nervensystem generieren (**Abb. 3C**). Schließlich erfolgt die finale Ausbildung der Herzstrukturen: Trennung der linken und rechten Vorhöfe und Ventrikel sowie die Aufteilung des Ausflusstrakts in Aorta und Pulmonararterie (**Abb. 3D**). Die FHF-Population bilden den linken Vorhof und Ventrikel, das SHF trägt zu beiden Vorhöfen bei und formt den rechten Ventrikel, den Ausflusstrakt und das Erregungsleitungssystem [36, 37, 43, 45, 47, 48].



**Abb. 3 Die vier Phasen der Herzentwicklung.**

(A) Formation des *Cardiac Crescent*: frühe mesodermale Zellen (FHF, *First Heart Field*) bilden eine sichelförmige Herzanlage und eine zweite Zellpopulation (SHF, *Second Heart Field*) ordnet sich medial dazu an. (B) Bildung des Herzschlauchs: durch Drehbewegungen anderer embryonaler Anlagen wird der Herzschlauch gebildet und SHF-Zellen beginnen zu migrieren (Pfeile). (C) Looping: Der Herzschlauch dreht sich rechtsseitig, wobei sich die posteriore zur anterioren Seite bewegt; die Vorhöfe, Ventrikel, innere Trabeculae und Endokardkissen bilden sich; Zellen der kardialen Neuralleiste (CNC, *Cardiac Neural Crest*) wandern ein und bilden Ausflusstrakt, Aortenbogen und autonomes Nervensystem. (D) Herzstrukturierung: finale Strukturierung durch Septierung der Vorhöfe und Ventrikel, Aufteilung des Ausflusstrakts in Aorta und Pulmonararterie. Es sind jeweils die embryonalen Mausentwicklungsstadien angegeben. A: Atrium (Vorhof), Ao: Aorta, AS: Aortensack, AVV: atrio-ventrikuläre Klappen, Ca: caudal, CT: Konotrunkus, Cr: cranial, DA: Ductus Arteriosus, L: links, LA/RA: linkes/rechtes Atrium, LCA/RCA: linke/rechte Karotis, LSCA/RSCA: linke/rechte Subklavia, LV/RV: linker/rechter Ventrikel, PA: Pulmonararterie, R: rechts, V: Ventrikel. Modifiziert nach Harvey (2002) und Srivastava (2006) [43, 47].

#### 1.4 Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg

Der evolutionär stark konservierte Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg spielt während der Embryogenese und der zellulären Homöostase im gesamten adulten Organismus eine essentielle Rolle.

Sowohl die Morphogenese wie auch Proliferation, Differenzierung und Apoptose werden durch Wnt-vermittelte Signalkaskaden reguliert. Fehlregulationen führen zu zahlreichen Entwicklungsstörungen und sind nicht zuletzt auch bei Krebserkrankungen ein wesentlicher Auslöser [49, 50]. Auch im adulten Herzen hat sich gezeigt, dass eine veränderte Regulation der Wnt-Kaskaden den Verlauf der kardialen Remodellierung beeinflusst. Untersuchungen an verschiedenen transgenen Mausmodellen belegen, dass im adulten Herzen eine Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges einen günstigen Einfluss auf die kardiale Remodellierung ausübt [51, 52]. Arbeiten aus unserer Gruppe zeigen, dass eine kardiale Runterregulation von  $\beta$ -Catenin nach induziertem Myokardinfarkt in Mäusen zu verbesserter kardialer Funktion mit einer erhöhten Überlebensrate führte [53]. Da vor allem der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle einnimmt, wird dieser im Folgenden genauer beschrieben.

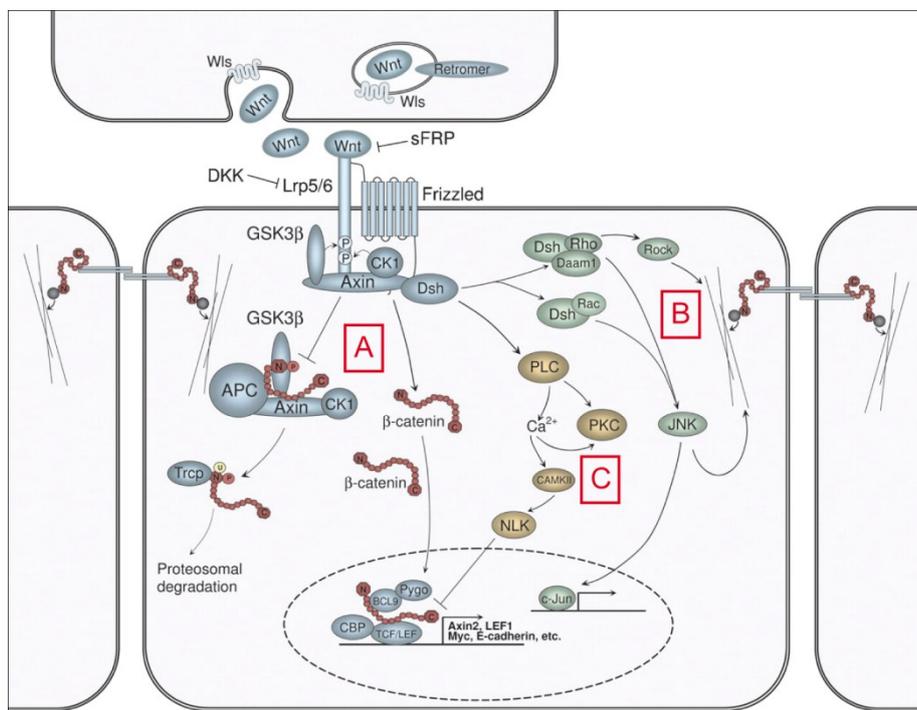
Es werden insgesamt drei Wnt-Signalwege in der Zelle unterschieden (**Abb. 4**): (A) Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, und die nicht-kanonischen Signalketten (B) Planarer Zellpolaritäts-Signalweg und (C) Wnt/Kalzium-Signalweg [50].

Die kanonische Wnt-Kaskade verläuft über den zentralen Mediator  $\beta$ -Catenin. Dieses gehört zu der *Armadillo*-Familie, die sich durch die typischen, zentralen *arm Repeat*-Protein-Interaktionsmotive auszeichnen [54].  $\beta$ -Catenin kommt in der Zelle in unterschiedlichen Kompartimenten vor und füllt zwei unterschiedliche Funktionen aus:

(1) Es ist Bestandteil des Zelladhäsionskomplexes in der Membran. Dort interagiert  $\beta$ -Catenin mit E-Cadherin und wird über  $\alpha$ -Catenin mit den Aktin-Filamenten des Zytoskeletts verbunden [55]. In dieser Funktion hat sich aber gezeigt, dass  $\beta$ -Catenin ohne Einschränkungen durch  $\gamma$ -Catenin ersetzbar ist [56].

(2)  $\beta$ -Catenin ist wesentlicher Bestandteil der Signaltransduktion im kanonischen Wnt-Signalweg. Ohne ein aktives Wnt-Signal wird  $\beta$ -Catenin im zytosolischen Destruktionskomplex durch Casein Kinase Ia (CKIa), *Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$*  (GSK3 $\beta$ ) und *Protein Phosphatase 2A* (PP2A) phosphoryliert und anschließend von  *$\beta$ -Transducin repeat Containing Protein* ( $\beta$ TrCP) ubiquitiniert. Der Destruktionskomplex wird durch das Protein Axin und *Adenomatous polyposis coli* (APC) zusammengehalten.  $\beta$ -Catenin wird daraufhin proteasomal abgebaut. Zur Aktivierung des Signalweges binden kanonische Wnt-Liganden an den 7-Transmembranrezeptor Frizzled und die Ko-Rezeptoren *Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5/6* (LRP5/6). Es kommt zur Destabilisierung des Abbaukomplexes durch Aktivierung von Dishevelled (Dsh), woraufhin  $\beta$ -Catenin im Zytosol akkumuliert und in den Zellkern transloziert wird. Dort fungiert  $\beta$ -Catenin zusammen mit *T-cell factor/Lymphocyte enhancer factor* (TCF/LEF) als transkriptioneller Regulator (**Abb. 4A**) [50]. Da  $\beta$ -Catenin selbst keine DNA-bindende Domäne und TCF/LEF im Gegenzug keine Aktivierungsdomänen besitzt, fungieren nur beide zusammen als Transkriptionsfaktor [57, 58].

Andere durch Wnt-Liganden regulierte Signalketten der Zelle, die ohne  $\beta$ -Catenin auskommen, werden als nicht-kanonische Wnt-Signalkaskaden zusammengefasst. Hierzu zählt der Planare Zellpolaritäts-Signalweg, bei dem durch nicht-kanonische Wnts (z.B. Wnt4, Wnt5a, Wnt 11 [42]) die Frizzled-Rezeptoren aktiviert werden, die über c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) eine asymmetrische Zellteilung auslösen (**Abb. 4B**). Ebenfalls nicht-kanonisch reguliert ist der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Weg. Hierbei werden intrazellulär Phosphokinase C (PKC) und Phospholipase C (PLC) aktiviert, die intrazelluläres Kalzium freisetzen. Dieses aktiviert die *Calmodulin-dependent protein kinase C* (CaMKII), welches zur Aktivierung der *Nemo-Like Kinase* (NLK) führt. Diese agiert als negativer Regulator des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs (**Abb. 4C**) [50].

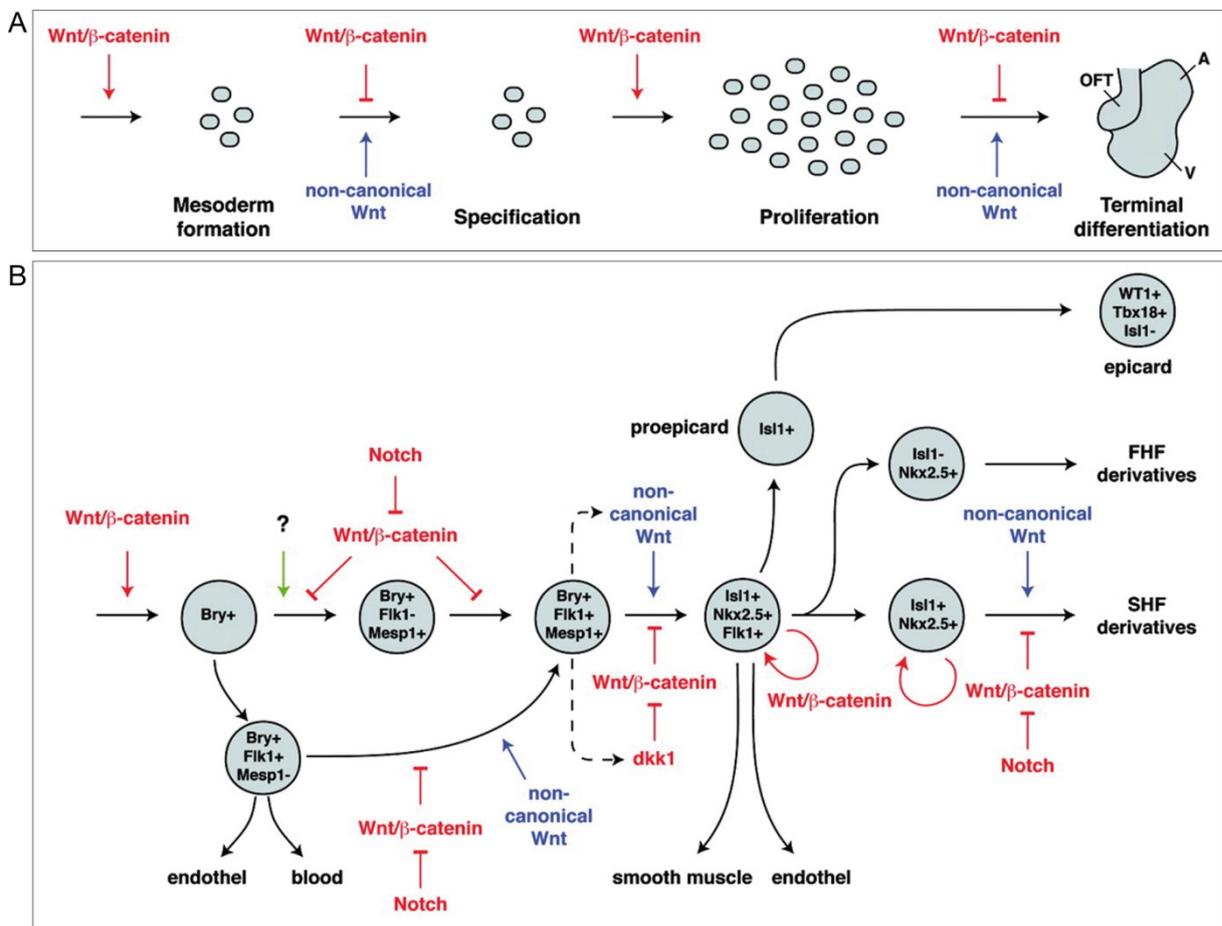


**Abb. 4 Schema der drei Wnt-Signaltransduktionswege.**

(A) Kanonischer Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg (in Blau dargestellt): Im inaktiven Zustand des kanonischen Wnt-Signalweges wird  $\beta$ -Catenin im Zytosol über den Destruktionskomplex, bestehend aus Axin, APC (Adenomatous polyposis coli), CK1 $\alpha$  (Casein Kinase I $\alpha$ ) und GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) phosphoryliert und mittels  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -Transducin repeat Containing Protein) ubiquitiniert. Als Folge wird  $\beta$ -Catenin proteasomal abgebaut. Zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges binden Wnts an die Rezeptoren Frizzled und LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein), welches intrazellulär Dsh (Dishevelled) aktiviert und damit den Destruktionskomplex destabilisiert.  $\beta$ -Catenin wird akkumuliert und in den Zellkern transloziert; durch Interaktion mit TCF/LEF kommt es zur Transkriptionsaktivierung. (B) Planarer Zellpolaritäts-Signalweg (in Grün): Dsh aktiviert im Zytosol JNK (c-Jun N-terminale Kinase) und löst eine asymmetrische Zellteilung aus. (C) Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg (in Braun): PLC (Phospholipase C) und PKC (Phosphokinase C) setzen intrazelluläres Kalzium frei, welches über CaMKII (*Calmodulin-dependent protein kinase C*) NLK (*Nemo-Like Kinase*) aktiviert. Diese inhibiert den aktivierten kanonischen Wnt-Signalweg. Modifiziert von Grigoryan *et al.* (2009) [50].

### 1.4.1 Der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg während der Kardiogenese

Während der gesamten Entwicklung ist eine fein abgestimmte Regulation des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweges von entscheidender Bedeutung. Die Aktivierung und Inaktivierung von  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängiger Transkription bestimmt maßgeblich den Verlauf der Kardiogenese. Bereits im frühen Stadium der Gastrulation ist ein aktives Signal zur Ausbildung der anterior-posterior Achse und zur Induktion des Mesoderms notwendig. Für die anschließende Spezifikation der mesodermalen Zellen in die verschiedenen kardialen multipotenten Linien ist eine Inaktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals nötig, wohingegen die Vermehrung dieser Zell-Populationen erneut ein positives Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signal erfordert. Nach erfolgter Proliferation der Progenitorzellen ist wieder eine Inaktivierung der Signalkette notwendig, um schließlich die Differenzierung der Vorläuferzellen in Kardiomyozyten zu erreichen (**Abb. 5A**) [59-61]. Wie diese exakte Phasen-spezifische Regulation des Wnt-Signals genau gesteuert wird, ist noch nicht vollständig geklärt [62]. **Abb. 5B** fasst den derzeitigen Wissensstand der kardiovaskulären Progenitorzell-Entwicklung und die Beteiligung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade zusammen, welche grundlegend zu den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.



**Abb. 5 Der Einfluss des Wnt-Signalweges auf die frühe kardiale Entwicklung.**

(A) Die vier Hauptphasen der frühen Kardiogenese Mesodermformation, Spezifikation, Proliferation und finale Differenzierung der kardialen Zellen werden durch den zeit-abhängigen Wechsel von Wnt-Signal-Aktivierung und -Inaktivierung erzielt. A: Atrium, OFT: *Outflow tract* (Ausflusstrakt), V: Ventrikel. (B) Im Detail führt eine anfängliche Wnt-Aktivierung zur Induktion des Mesoderms, durch den panmesodermalen Faktor Brachyury (Bry) und Mesoderm posterior 1 (Mesp1) markiert. Über Notch-vermittelte Wnt-Inhibition kommt es zur Spezifikation von multipotenten kardialen Progenitorzellen, wobei sich eine Bry<sup>+</sup>/Flk1<sup>+</sup>/Mesp<sup>-</sup>-Population als Hämangioblast abspaltet, der später das hämatopoetische System bildet. Die Bry<sup>+</sup>/Flk1<sup>+</sup>/Mesp1<sup>+</sup>-Kardioblast-Population wird über zusätzliche negative Wnt-Signale weiter spezifiziert (hier als Beispiel die Marker Nkx2.5 und Isl1). Mittels Wnt-Aktivierung werden diese Zellen zur Proliferation angeregt und eine erneute Wnt-Inaktivierung führt zur Differenzierung in die FHF- und SHF-Derivate, die zu Kardiomyozyten werden. Bleibt die letzte Wnt-Aktivierung aus, entstehen Glattmuskel- und Endothelzellen. Rot: kanonischer Wnt/β-Catenin-Signalweg; Blau: nicht-kanonische Wnt-Signalwege, die als negative Regulatoren fungieren. Modifiziert nach Gessert und Kühl (2010) [61].

### 1.5 Die *Krüppel-like factor*-Transkriptionsfamilie

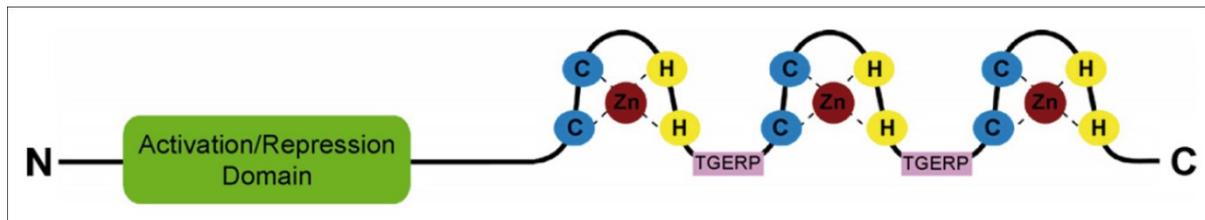
*Krüppel-like factors* (KLFs) gehören zur großen Familie der konservierten Transkriptionsfaktoren mit klassischem Zinkfinger-Motiv. Bisher sind 17 KLF-Mitglieder identifiziert worden, die nicht nur in verschiedenen Organen und Zelltypen sondern auch zu unterschiedlichen Entwicklungsphasen exprimiert sind. Sie regulieren damit ein breites Spektrum von Prozessen, welche die Zellproliferation und -differenzierung, Hämatopoese, Angiogenese, Adipogenese, Muskel- und Lungenentwicklung, Glukoneogenese, Stammzell-Erneuerung und kardiale Remodellierung, aber auch Neoplasie einschließen - um nur einige Beispiele zu nennen. Dabei hat sich gezeigt, dass einige Vertreter ubiquitär und andere nur Gewebe-spezifisch vorkommen. Beispielsweise wurde KLF1 bisher nur in Erythrozyten und KLF2 nur in der Lunge detektiert [63]. In einigen Zelltypen sind auch mehrere Vertreter exprimiert, die gegenteilige Effekte regulieren, z.B. fördert KLF2 die Erhaltung von Prä-Adipozyten und KLF5 die Differenzierung in reife Adipozyten [64].

Mittels der drei C-terminalen Zinkfinger von klassischen Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Typ sind sie in der Lage Interaktionen mit der DNA einzugehen, wobei sie bevorzugt GT-reiche und CACCC-Boxen an verschiedenen Promotoren binden. Es ist auch bekannt, dass die Zinkfinger nicht nur DNA-Interaktionen, sondern auch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen und RNA eingehen können [65]. Unter den verschiedenen KLF-Mitgliedern herrscht im Zinkfinger-Bereich eine starke Sequenzhomologie mit über 65% Aminosäure-Identität und konserviertem Linker zwischen den Zinkfingern. In Gegensatz dazu weisen sie unterschiedliche und z.T. einzigartige N-terminale Bindedomänen auf [66]. Diese ermöglichen die Interaktion mit verschiedensten Ko-Aktivatoren, -Repressoren oder Chromatin-Remodellierungskomplexen, so dass Zell- und Gewebe-spezifische Effekte erzielt werden können [67]. Mittels dieser N-terminalen Domänen wurden die 17 KLF-Mitglieder in drei Hauptgruppen klassifiziert:

- 1) Repressoren, die *C-terminal binding protein* (CtBP)-Interaktionen eingehen: KLF3, 8 und 12
- 2) Aktivatoren, die Histonacetyltransferasen (HAT) binden: KLF1, 2, 4-7
- 3) Repressoren, die mit Sin3A interagieren: KLF9, 10, 11, 13, 14, 16

Die beiden Mitglieder KLF17 und KLF15, welches in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert wird, sind hierzu nur entfernt verwandt und konnten nicht eingruppiert werden [63].

**Abb. 6** zeigt eine schematische Repräsentation der KLF-Proteinstruktur.



**Abb. 6 Schematische Struktur von *Krüppel-like factor* (KLF) Proteinen.**

Alle 17 Mitglieder der KLF-Transkriptionsfamilie besitzen drei Zinkfinger vom Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>-Typ, die je ein Zinkion chelatieren. Die Zinkfinger sind über einen konservierten Linker mit TGERP-Motiv verbunden. Für jedes KLF-Mitglied charakteristisch befinden sich im N-terminalen Bereich Repressions- und/oder Aktivierungsdomänen. Übernommen vom Pearson *et al.* (2007) [64].

### 1.5.1 Vertreter der *Krüppel-like factor*-Familie im Herzen

Nach bisherigem Kenntnisstand sind die KLF-Vertreter KLF4, KLF5, KLF10, KLF13 und KLF15 im Herzen exprimiert [68, 69]. Zu den meisten Vertretern gibt es wenige Daten in Bezug auf die Regulation im Herzen, häufig wurde lediglich ein Phänotyp beobachtet. Da aber in der vorliegenden Arbeit detaillierte Untersuchungen für KLF15 unternommen wurden, sollen im Folgenden auch die Kenntnisse zu den anderen kardialen KLFs gewürdigt werden.

KLF4 wurde erst kürzlich der Liste der im Herzen vorkommenden KLFs hinzugefügt. Dieser Vertreter ist hauptsächlich in Darmepithelien exprimiert und wird in der Stammzellforschung zur Reprogrammierung von somatischen Zellen genutzt, um induzierte pluripotente Zellen (iPS) zu generieren [63]. Untersuchungen an einer Kardiomyozyten-spezifischen KLF4-Knockout-Maus zeigten, dass diese nach hämodynamischer Belastung schneller Hypertrophie entwickelten und eine hohe Mortalität aufwiesen, so dass KLF4 als anti-hypertropher Faktor eingestuft wurde [70, 71].

KLF5 wurde im Herzen nur in Fibroblasten detektiert, wo es als Fibrosierungs-fördernder Faktor eingestuft wurde. Durch Stimulation mit dem Peptidhormon Angiotensin II ließ sich die Expression von KLF5 induzieren. Systemische Knockout-Mäuse verstarben bereits während der Embryogenese. Untersuchungen an haplo-insuffizienten KLF5-Mäusen zeigten eine reduzierte maladaptive Remodellierung der Herzen durch verminderte Kollagen IV-Expression und damit verminderter Fibrose. KLF5 konnte nicht in Kardiomyozyten detektiert werden [72].

KLF10 wurde in nur sehr geringen Expressionsleveln im Herzen gefunden ohne dass Untersuchungen zum speziellen Zelltyp unternommen wurden. Männliche KLF10-Knockout-Mäuse zeigten im Alter von 16 Monaten eine spontane Entwicklung von kardialer Hypertrophie mit starker Zunahme der Wanddicken und des Herzgewichts, wohingegen der Phänotyp bei Weibchen nicht auftrat. Es wurden keine Untersuchungen zum Mechanismus unternommen [73].

KLF13 ist ein hauptsächlich embryonal exprimierter Vertreter der KLF-Familie im Herzen, der postnatal runterreguliert wird. Es wurde gezeigt, dass KLF13 mit dem kardialen Transkriptionsfaktor GATA4 interagiert und beide synergistisch kardial-spezifische Gene in *Xenopus* regulieren [74].

KLF15 ist ein 416 Aminosäure-Protein, das ursprünglich in der Niere gefunden wurde. Es hat sich aber herausgestellt, dass die Expression in Leber, Herz und Skelettmuskel am höchsten ist [75]. Bisher wurde KLF15 im murinen und humanen Herzen in den Kardiomyozyten und den Fibroblasten detektiert und als anti-hypertropher und anti-fibrotischer Regulator identifiziert, der die DNA-Interaktion zu den Transkriptionsfaktoren GATA4 und Mef2 unterdrückt [76, 77]. Die vorliegende Arbeit wird weitere relevante Erkenntnisse zu KLF15 im Herzen hinzufügen.

## 1.6 Zielstellung

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg nimmt sowohl für die embryonale Kardiogenese als auch für die Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts im adulten Herzen eine wesentliche Rolle ein. Untersuchungen in adulten Mausmodellen zeigten, dass eine Inhibition von  $\beta$ -Catenin-abhängigen Signalwegen eine positive Wirkung auf die linksventrikuläre Remodellierung nach Ischämie am Herzen aufweist. Dies war mit der gesteigerten Differenzierung von endogenen kardiovaskulären Progenitorzellen assoziiert. Damit bietet die Modulation des konservierten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges einen neuen Ansatz zur Beeinflussung der endogenen Regeneration des Herzens. Mittels Hefe-2-Hybrid-Screening wurden im Vorfeld verschiedene neue kardiale Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin identifiziert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* und *in vivo* Validierung der Interaktion des Kandidaten *Krüppel-like factor 15* (KLF15) mit  $\beta$ -Catenin. Hierauf aufbauend sollte der Effekt und der Mechanismus der KLF15/ $\beta$ -Catenin-Interaktion auf die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade untersucht werden. In Anschluss wurde die Überprüfung der *in vivo* Relevanz dieser Interaktion in adulten Mausherzen angestrebt. Hierzu wurde ein konventionelles *Klf15*-KO-Mausmodell zur Verfügung gestellt, in dem basal und unter induziertem kardialem Stress der Effekt des KLF15-Verlustes auf die Herzremodellierung und die Progenitorzell-Regulation in Abhängigkeit vom Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ermittelt werden sollten. Grundlegendes Ziel war, molekulare Erkenntnisse zu gewinnen, die helfen, in der Zukunft neuartige Therapieansätze zur Stimulation der endogenen Regeneration zur Behandlung der Herzinsuffizienz zu entwickeln.

## 2 Material

In diesem Abschnitt sind alle verwendeten Materialien der vorliegenden Arbeit mit Bezeichnung und Hersteller bzw. Vertreiber aufgelistet, sofern nicht anders vermerkt.

### 2.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Acrylamide/Bisacrylamide (37,5 %)	Fluka
Agarose GTQ	Carl Roth
Ammoniumchlorid	Carl Roth
Ammoniumpersulfat	BioRad
Ampicillin, Natriumsalz	Carl Roth
5'-Azacytidin	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Bradford Protein Assay	BioRad
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-frei	Roche
DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid)	Sigma-Aldrich
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva
dNTP PCR Nukleotid-Mix (10 mM)	Promega
DTT (Dithiothreitol)	Gerbu
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Eukitt <sup>®</sup> Quick-hardening Medium	Fluka
Fluoreszein-Kalibrierungsfarbstoff	BioRad
Formaldehyd	Carl Roth
FuGENE 6	Roche
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glukose	Carl Roth
Glycerol	Gerbu
Glycin	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Promega
Isopropanol	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumhydrogenkarbonat	Carl Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth
Kalziumchlorid	Carl Roth
LB-Agar und -Medium (nach Miller)	Carl Roth

## Material

---

LumiGLO <sup>®</sup> und Peroxid 20x	Cell Signaling
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Carl Roth
Matrigel	BD Biosciences
Methanol	Carl Roth
Milchpulver, fettarm	Carl Roth
Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumhydrogenkarbonat	Carl Roth
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumzitat	Carl Roth
N-Ethylmaleinimid (NEM)	Sigma-Aldrich
Nonidet-40	Roche
Orange G	Sigma-Aldrich
Paraffin-Paraplast	Carl Roth
Percoll (max. 1,135 g/ml Dichte)	GE Healthcare
Phenolrot	Merck
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roche
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
ProLong <sup>®</sup> Gold	Invitrogen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
Saponin	Sigma-Aldrich
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Gerbu
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth
Toluol	Carl Roth
TransFectin <sup>™</sup>	BioRad
Tris Base und Tris HCl	Carl Roth
TritonX-100	Gerbu
Tween-20	BioRad
Wasserstoffperoxid	Merck
Xylol	Carl Roth
Ziegenserum	Invitrogen

## 2.2 Färbelösungen

---

Accustain <sup>®</sup> Trichrome Stain (Masson)	Sigma-Aldrich
Accustain <sup>®</sup> Weigert's Iron Haematoxylin	Sigma-Aldrich
Direct Red 80	Sigma-Aldrich
Eosin	Sigma-Aldrich
RAPID-Stain <sup>™</sup>	G-Biosciences

---

### 2.3 Größenmarker

DNA Hyperladder I und IV	Bioline
Full-range Rainbow Marker	Amersham Pharmacia
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas

### 2.4 Kits

DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kit	Invitex GmbH
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey-Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
TUNEL ApopTag® Red in situ Apoptosis Kit	Chemicon

### 2.5 Enzyme

BamHI und NotI + NEBuffer 3	New England BioLabs
Benzonase	Novagen
Calf-intestinal alkaline phosphatase	New England BioLabs
DNase I + 10x Inkubationspuffer	Roche
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega
Kollagenase Typ II	Worthington
M-MLV Reverse Transkriptase + 5x M-MLV-RT Puffer	Promega
OptiTaq DNA Polymerase + Puffer B	Roboklon
Pankreatin	Sigma Aldrich
Phusion Polymerase + HF Puffer	Biozym
RNase A	Amersham Pharmacia
T4 DNA Ligase + 5x Rapid Ligation Buffer	Fermentas
Trypsin 2,5 %	Gibco
Trypsin-EDTA 0,25 %	Gibco

### 2.6 Zellkulturmedien und Zusätze

Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin (37 %, BSA)	Sigma-Aldrich
Cytosin-β-o-arabinofuranosid	Sigma-Aldrich
DMEM	Gibco
DMEM/F12	Gibco
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG
L-Glutamin	Gibco

## Material

Mitomycin C	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat	Gibco
NST Supplement-Medium	Sigma-Aldrich
PBS (1x und 10x)	Gibco
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Pferde-Serum	Gibco
RPMI	Gibco

### 2.7 Pharmaka

Angiotensin II	Sigma-Aldrich
Isofluran	Baxter
Ketamin 10 %	Medistar
Mifepriston (RU486)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	Berlin-Chemie AG
Quercetin	Acro Organics
Rompun® 2 % (Xylazin)	Bayer
Tamoxifen	Sigma-Aldrich

### 2.8 Plasmide

Bezeichnung	Insert	Herkunft
pTOPflash	$\beta$ -Catenin/Tcf-abhängiger Luziferase-Reporter	Upstate
pFOPflash	Negativkontrolle für pTOPflash	Upstate
pRL-CMV	<i>Renilla</i> Luziferase-Reporter	Promega
pEGFP-N1	EGFP-Expressionsvektor	Clontech
pcDNA3.1	-	Invitrogen
pCS2+	-	Invitrogen
pGEX-4T-3	GST-Expressionsvektor	GE Healthcare
pcDNA3.1:Flag-KLF15	humanes KLF15 AS 1-416, Flag-Tag	Dr. HJ Schäffer
pcDNA3.1:Flag-KLF15- $\Delta$ N45	humanes KLF15 AS 46-416, Flag-	Dr. HJ Schäffer
pcDNA3.1:Flag-KLF15- $\Delta$ N152	humanes KLF15 AS 153-416, Flag-Tag	Dr. HJ Schäffer
pcDNA3.1:Flag-KLF15- $\Delta$ N260	humanes KLF15 AS 261-416, Flag-Tag	Dr. HJ Schäffer
pcDNA3.1:Flag-KLF15- $\Delta$ C	humanes KLF15 AS 1-319, Flag-Tag	Dr. HJ Schäffer
pcDNA3.1: $\beta$ -Cat-c-Myc	murines $\beta$ -catenin, c-Myc-Tag	Dr. HJ Schäffer
pcDNA3.1:Flag- $\beta$ -Cat- $\Delta$ N	murines $\beta$ -catenin ohne Exon 3, Flag-Tag	selbst kloniert
pcDNA3.1:HA-NLK	murines NLK, HA-Tag	Dr. HJ Schäffer
pCS2+:TCF4E-HA	humanes TCF4, Isoform 2, HA-Tag	Prof. A. Hecht
pGEX-4T-3:GST- $\beta$ -Cat	humanes $\beta$ -catenin, GST-Tag	selbst kloniert
pGEX-4T-3:GST-KLF15	humanes KLF15, GST-Tag	selbst kloniert
pGEX-4T-3:GST-NLK	humanes NLK, GST-Tag	selbst kloniert

Die Plasmidkarten befinden sich im Anhang I.

## 2.9 Oligonukleotide

Oligo(dT)<sub>20</sub> und alle folgenden Primer sind bei der BioTeZ Berlin-Buch GmbH synthetisiert worden.

### 2.9.1 Genotypisierungsprimer

Mausgenotyp	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
Klf15 WT	HS 124	CTCAAAATGCACAAATGCAC
	HS 125	ATACACTCGGGGGAGCAG
Klf15 KO	HS 56	ATCTGGACATTTGGCCACAG
	HS 130b	CTCTTCGCTATTACGCCAGC
αMHC-CrePR1	A5'	CTAGAGCCTGTTTTGCACGTTC
	A3'	GTTCGCAAGAACCTGATGGACA
αMHC-MerCreMer	HgH s	GTCTGACTAGGTGTCCTTCT
	HgH as	CGTCCTCCTGCTGGTATAG
β-Cat-flox <sup>ex3</sup>	ΔNCat483	AGAATCACGGTGACCTGGGTAAA
	ΔNCat1051	CATTCATAAAGGACTTGGGAGGTGT
β-Cat-flox <sup>ex2-6</sup>	5'RM41	AAGGTAGAGTGATGAAAGTTGTT
	3'RM42	CACCATGTCTCTGTCTATTC
αMHC-CrePR1/β-Cat <sup>Δex3</sup>	ΔNCat FW5	GCTGCTGTGACACCGCTGCGTGGAC
	ΔNCat AS5	CACGTGTGGCAAGTTCCGCGTCATCC
αMHC-MerCreMer/β-Cat <sup>Δex2-6</sup>	5'RM68	AATCACAGGGACTTCCATACCAG
	3'RM69	GCCCAGCCTTAGCCCAACT

### 2.9.2 Klonierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Schnittstelle
pGEX-βCat FW	TATA GGATCC CTGGCTACTCAAGCTGATTTGA	BamHI
pGEX-βCat Rev	ATAT GCGGCCGC TTTACAGGTCAGTATCAAACCA	NotI
pGEX-KLF15 FW	TATA GGATCC CTGGTGGACCACTTACTTCCAG	BamHI
pGEX-KLF15 Rev	ATAT GCGGCCGC TTCAGTTCACGGAGCGCACGGA	NotI
pGEX-NLK FW	TATA GGATCC CTGTCTCTTTGTGGCGCAAGAG	BamHI
pGEX-NLK Rev	ATAT GCGGCCGC TTCACTCCCACACCAGAGGAGA	NotI

### 2.9.3 Sequenzierungsprimer

Plasmid	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
pcDNA3.1	T7 FW	TAATACGACTCACTATAGG
	BGHrev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
pCS2+	SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
	EBVrev	GTGGTTTGTCCAAACTCATC
pGEX-4T-3	pGEX5'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
	pGEX3'	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG

## 2.9.4 Qrt-PCR-Primer

Die Primerhybridisierungstemperatur betrug für alle Primerpaare 60 °C mit Ausnahme von  $\beta$ -Catenin und c-myc, die eine Temperatur von 55 °C benötigten. Die Primer wurden mittels der Software Beacon Designer™ entworfen.

Gen		Sequenz 5'→3'	Fragmentlänge
ANP (Nppa)	FW	CATCACCCCTGGGCTTCTTCCT	405 bp
	Rev	TGGGCTCCAATCCTGTCAATC	
$\beta$ -Actin (Acta)	FW	CACACCCGCCACCAGTTC	164 bp
	Rev	CCCATTCCCACCATCACACC	
$\beta$ -Catenin (Ctnnb1)	Ex5s	ACTGCTGGGACTCTG	130 bp
	Ex6as	TGATGGCGTAGAACAG	
$\beta$ MHC (Myh7)	FW	ATGTGCCGGACCTTGGA	170 bp
	Rev	CCTCGGGTTAGCTGAGAGATCA	
BNP (Nppb)	FW	AAGTCCTAGCCAGTCTCCAGAGC	268 bp
	Rev	CTTCAGTGCGTTACAGCCCAAAC	
CD31 (Pecam1)	FW	AACCCGTGGAGATGTCCAGGCCAGC	240 bp
	Rev	ACACCGTCTCTGTGGCTCTCGTTCCC	
CD105 (Endoglin)	FW	ACCCACAACAGGTCTCGCAGAAAG	282 bp
	Rev	TCCGGGGCCTGGAACCTCACGA	
CD133 (Prominin1)	FW	GTGGGCTGCTTCTTTGTATGTGC	183 bp
	Rev	CCGAGTCCTGGTCTGCTGGTTAG	
c-myc	FW	TTCTATCACCAGCAACAG	132 bp
	Rev	ATAGGATGGAGAGCAGAG	
Ctgf	FW	CCGCCAACCGCAAGATCGGA	225 bp
	Rev	CGCAGCATTTCACAGGCAGC	
Flk1	FW	GGATGTGGACTGGGAGGAAG	286 bp
	Rev	AGAGATGAGGAAGGAGCAAGC	
Gapdh	FW	ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG	171 bp
	Rev	GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA	
Hand1 (eHand)	FW	GTGGCAAGTCCGCAGAAG	291 bp
	Rev	GGTGTGAGTGGTGATGATGG	
Klf5	FW	TCTTCATCTCTGTCCCTTCCC	106 bp
	Rev	GGTGTCCATTACTGCCGTCTG	
Klf13	FW	CGGGCTGCGAGAAAGTTTAC	152 bp
	Rev	CGTGTGCGTGCGATAGTG	
Klf15	FW4	GCCTTCTGTTCTGCTAC	120 bp
	Rev4	GCTATCTCCAATACCTCCAC	
Sca1 (Ly6f)	322s	ACTGTGCCTGCAACCTTGCTGAGA	435 bp
	322as	GTCCAGGTGCTGCCTCCATT	
Tcf4 (Tcf7l2)	FW	AACGGAACAGACAGTATAATGG	147 bp
	Rev	CACAGGAGTTGAAGGATTGG	
vWF	FW	AGGTGCCTGCCCTCTGCTTGCA	137 bp
	Rev	TCCTCCACGCGGACACACTCGT	

## 2.10 Antikörper

Primär-Antikörper und Isotyp-Kontrollen	Hersteller	verwendete Verdünnung für		
		IF	WB	FACS
anti- $\alpha$ MHC, Maus IgG <sub>2b</sub> , Klon BA-G5	Abcam	1:500	-	1:500
anti- $\alpha$ -Tubulin, Maus IgG <sub>1</sub> , Klon DM1A	Sigma-Aldrich	-	1:20.000	-
anti- $\beta$ -catenin, Maus IgG <sub>1</sub> , Klon 14	BD Biosciences	1:200	1:2.000	-
anti-CD133, Maus IgG <sub>1</sub>	Miltenyi Biotech	1:100	-	-
anti-CD144, Maus IgG <sub>1</sub> , Klon TEA 1/31	Immunotech	1:50	-	-
anti-CD31, Kaninchen	Abcam	1:50	-	-
anti-CD31-FITC/-PE, Ratte IgG <sub>2a</sub>	eBiosciences	1:200	-	-
anti-CD34-FITC, Ratte IgG <sub>2a</sub>	eBiosciences	-	-	1:200
anti-CD44-FITC, Ratte IgG <sub>2b</sub>	eBiosciences	-	-	1:200
anti-ckit-APC, Ratte IgG <sub>2b</sub>	eBiosciences	-	-	1:200
anti-c-Myc 9E10, Maus IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz	-	1:500	-
anti-cTnT, Maus IgG <sub>1</sub> , Klon 3D6	Abcam	1:500	-	1:500
anti-Cx43, Kaninchen	Millipore	1:200	-	-
anti-FLAG M2 <sup>®</sup> , Kaninchen	Sigma-Aldrich	1:200	-	-
anti-FLAG M2 <sup>®</sup> , Maus IgG <sub>1</sub>	Sigma-Aldrich	1:200	1:2.000	-
anti-FLAG M2 <sup>®</sup> -HRP, Maus IgG <sub>1</sub>	Sigma-Aldrich	-	1:2.000	-
anti-Flk1-PE, Ratte IgG <sub>2a</sub>	eBiosciences	1:200	-	1:200
anti-GAPDH, Maus IgG <sub>1</sub> , Klon 6C5	ImmunoChemical	-	1:10.000	-
anti-GATA4, Kaninchen	Santa Cruz	1:200	-	-
anti-GST, Kaninchen	Chemicon	-	1:3.000	-
anti-HA, Maus IgG <sub>1</sub> , Klon HA-7	Sigma-Aldrich	1:200	1:2.000	-
anti-Hand1 H-100, Kaninchen	Santa Cruz	1:100	-	1:100
anti-Hand2 H-110, Kaninchen	Santa Cruz	-	-	1:100
anti-Histone H1 FL-219, Kaninchen	Santa Cruz	-	1:100	-
anti-Kaninchen IgG, Ziege	Sigma-Aldrich	1:200	-	-
anti-Ki67-PE M-19, Ziege	Santa Cruz	-	-	1:200
anti-KLF15 C14, Ziege	Santa Cruz	1:100	1:100	-
anti-Lamin A/C N-18, Ziege	Santa Cruz	-	1:200	-
anti-NLK, Kaninchen	Bethyl Laboratories	1:200	1:1.000	-
anti-Sca1-FITC/-APC, Ratte IgG <sub>2a</sub>	eBiosciences	1:200	-	1:200
anti-Tbx5, Kaninchen	Abcam	1:200	-	1:200
anti-TCF4, Maus IgG <sub>2a</sub> , Klon 6H5-3	Sigma-Aldrich	1:200	1:1.000	-
anti-Ubiquitin, Maus IgG <sub>1</sub> , Klon P4D1	Cell Signaling	-	1:1.000	-
Lektin-WGA-FITC	Sigma-Aldrich	1:200	-	-
Kaninchen IgG	ImmunoResearch	-	-	1:200
Maus IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences	-	-	1:500
Maus IgG <sub>2b</sub>	eBiosciences	-	-	1:500
Ratten IgG <sub>2a</sub> -FITC/-PE	eBiosciences	-	-	1:200
Ratten IgG <sub>2b</sub> -APC/-FITC	eBiosciences	-	-	1:200
Ziegen IgG-PE	Santa Cruz	-	-	1:500

Sekundär-Antikörper	Hersteller	verwendete Verdünnung für		
		IF	WB	FACS
anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor 594, Ziege	Invitrogen	1:200	-	-
anti-Kaninchen IgG-APC, Esel	ImmunoResearch	-	-	1:250
anti-Kaninchen IgG-HRP, Ziege	Dako	-	1:7.500	-
anti-Kaninchen IgG-PAP	Sigma-Aldrich	1:100	-	-
anti-Maus IgG-Alexa Fluor 488, Ziege	Invitrogen	1:200	-	1:200
anti-Maus IgG-FITC, Esel	ImmunoResearch	-	-	1:250
anti-Maus IgG-HRP, Kaninchen	Dako	-	1:10.000	-
anti-Ratten IgG-Alexa Fluor 594, Ziege	Invitrogen	1:200	-	-
anti-Ziegen IgG-HRP, Esel	Santa Cruz	-	1:5.000	-

## 2.11 Chemisch kompetente Bakterien

BL21 (DE3) *E. coli* + SOC-Medium

New England BioLabs

XL10-Gold<sup>®</sup> Ultracompetent Cells, *E. coli*

Stratagene

## 2.12 Maus- und Rattenstämme

Ratten	Genetische Modifikation	Herkunft
Wistar Han	Wildtyp	Charles River
Mäuse	Genetische Modifikation	Ursprung
C75BL/6N	Wildtyp	Charles River
<i>Klf15</i> -KO	Knock-Out: Exon 2 von <i>Klf15</i> wurde durch eine nicht-funktionelle LacZ-Kassette ersetzt	W. Birchmeier, Berlin
$\alpha$ MHC-CrePR1	Mifepriston-induzierbare CrePR1-Kassette unter Kontrolle des $\alpha$ MHC-Promoters	M.D. Schneider, Houston [78]
$\alpha$ MHC-MerCreMer	Tamoxifen-induzierbare MerCreMer-Kassette unter Kontrolle des $\alpha$ MHC-Promoters	J.D. Molkentin, Cincinnati [79]
$\alpha$ MHC-CrePR1/ $\beta$ -Cat <sup><math>\Delta</math>ex3</sup>	Induzierbare, Herzzell-spezifische Stabilisierung von $\beta$ -Catenin	eigene Anpaarung [80]
$\alpha$ MHC-MerCreMer/ $\beta$ -Cat <sup><math>\Delta</math>ex2-6</sup>	Induzierbarer, Herzzell-spezifischer $\beta$ -Catenin Knock-Down	eigene Anpaarung

## 2.13 Zell-Linien

Bezeichnung	Beschreibung	ATCC-Nummer
HEK293	humane embryonale Nierenzellen, mit DNA des Adenovirus 5 transformiert [81]	CRL-1573
SW480	Darmepithelzellen, aus humanem Adenokarzinom [82, 83]	CCL-228

## 2.14 Geräte und Software

Geräte	Hersteller
ÄKTAexplorer 100 mit Frac-950 Fraktionssammler und GStrap FF-Säule 5 ml, HiLoad™ 16/60 Superdex 75 prep grade	GE Healthcare
Biocero BZ-8100 Fluoreszenzmikroskop	Keyence
FACS-Calibur	BD Biosciences
Geldokumentation	Phase GmbH
iCycler iQ5	BioRad
IX70 Fluoreszenzmikroskop	Olympus
M2 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss
Mastercycler® gradient	Eppendorf
Microfluidizer® M-110L	Microfluidics
Mini-osmotische Pumpen, Model 1002	Alzet
NanoDrop	Peqlab
OctoMACS	Miltenyi Biotech
T3 Thermocycler	Biometra
TD 20/20 Luminometer	Turner Designs
Vevo 2100 Imaging System, 45Hz MS-550D MicroScan Ultraschallsonde	Visual Sonics
Zentrifuge Beckmann Coulter mit Rotor JA-20	Beckmann
Zentrifuge mit Rotor SS-34	Sorvall

Software	Hersteller
AxioVision	Carl Zeiss
Beacon Designer	Premier Biosoft
CellQuest Pro	BD Biosciences
ExPASy	SIB Swiss Institute of Bioinformatics
GraphPad Prism 4	GraphPad Software
ImageJ	Wayne Rasband National Institutes of Health
NCBI BLAST	National Library of Medicine

## 2.15 Zusammensetzung von Puffer, Lösungen und Medien

### 2.15.1 Lyse-Puffer

Vor Gebrauch wurde den Lyse-Puffern Protease- und Phosphatase-Inhibitoren nach Herstellerangaben von Roche hinzugefügt.

IP-Lysepuffer, pH 7,5	150 mmol/L NaCl; 50 mmol/L HEPES; 1,5 mmol/L MgCl <sub>2</sub> ; 1 mmol/L EDTA; 10% Glycerol; 1% TritonX-100
RIPA-Puffer, pH 7,4	150 mmol/L NaCl; 10 mmol/L TrisHCl; 5 mmol/L EDTA; 1% TritonX-100; 0,1% SDS
Fraktionierungspuffer	
Hypotonischer Puffer	10 mmol/L KCl; 10 mmol/L HEPES; 2 mmol/L MgCl <sub>2</sub> ; 100 µmol/L EDTA; 1 mmol/L DTT
Hypertonischer Puffer	300 mmol/L NaCl; 50 mmol/L KCl; 50 mmol/L HEPES; 100 µmol/L EDTA; 1 mmol/L DTT; 10% Glycerol

### 2.15.2 Gelelektrophorese-Lösungen

50x TAE-Puffer, pH 8,0	2 mol/L Tris Base; 1mol/L Essigsäure; 50 mmol/L EDTA
6x DNA-Ladepuffer	50 % Glycerol; 25 mmol/L EDTA; 0,2% Orange G
10x SDS-Laufpuffer, pH 8,6	250 mmol/L Tris Base; 1,9 mol/L Glycin; 1% SDS
10x Transferpuffer, pH 9,2	625 mmol/L Tris Base; 1 mol/L Glycin; 1,5% SDS
1x Transferpuffer, pH 9,2	1:10 10x Transferpuffer; 20% Methanol
TBS-T, pH 7,6	20 mmol/L TrisHCl; 165 mmol/L NaCl; 0,05% Tween-20
4x SDS-Ladepuffer, pH 6,8	120 mmol/L TrisHCl; 30% Glycerol; 10% β-Mercaptoethanol; 8% SDS; 0,025% Bromphenolblau

2 Trenngele	12,5 %	10%	2 Sammelgele	4%
Acrylamide/Bis (37,5 %)	3,3 ml	2,7 ml	Acrylamide/Bis (37,5 %)	0,53 ml
ddH <sub>2</sub> O	4,0 ml	4,6 ml	ddH <sub>2</sub> O	3,12 ml
Tris Base 1,5 mmol/L, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	Tris Base 0,5 mmol/L, pH 6,8	1,25 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	10% SDS	50 µl
10% APS	75 µl	75 µl	10% APS	40 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	TEMED	7 µl

### 2.15.3 Bakterien-Lösungen

LBGA-Medium, pH 7,0	autoklaviertes LB-Medium nach Miller; 20 mmol/L Glukose; 100 µg/ml Ampicillin
<i>E. coli</i> Aufschluss-Puffer, pH 7,4	PBS; 1 mmol/L DTT; 500 µmol/L PMSF; 1 U/ml Benzonase
Glutathion-Elutionspuffer, pH 8,0	200 mmol/L NaCl; 100 mmol/L TrisHCl; 20 mmol/L Glutathion; 0,2% Tween-20

### 2.15.4 Zellkultur-Lösungen

ADS-Puffer, pH 7,35	116 mmol/L NaCl; 20 mmol/L HEPES; 5,6 mmol/L Glukose; 5,4 mmol/L KCl; 0,8 mmol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,8 mmol/L MgSO <sub>4</sub>
HBSS-Puffer, pH 7,3	137 mmol/L NaCl; 5,4 mmol/L KCl; 4,2 mmol/L NaHCO <sub>3</sub> ; 1,3 mmol/L CaCl <sub>2</sub> ; 1 mmol/L MgSO <sub>4</sub> ; 440 µmol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 250 µmol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
HEK293-Medium	DMEM; 10% FCS; 20 µmol/L L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
SW480-Medium	RPMI; 10% FCS; 20 µmol/L L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
NRCM-Medium	DMEM/F12; 2% FCS; 20 µmol/L L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin; 100 µmol/L Ascorbinsäure
Fibroblasten-Medium	DMEM/F12; 5% Pferdeserum; 0,2% BSA; 3 mmol/L Na-Pyruvat; NST; 20 µmol/L L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin; 100 µmol/L Ascorbinsäure; 100 µmol/L Cytosin-β-o-arabinofuranosid
CPC-Medium	DMEM/F12; 10% FCS; 20 µmol/L L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
CPC-Differenzierungsmedium	DMEM/F12; 2% FCS; 20 µmol/L L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin; 100 µmol/L Ascorbinsäure
PBS-Rot	50 ml 1x PBS; 1 mg Phenolrot
Percoll- Stammlösung	10,5 ml Percoll + 4,5 ml 10x PBS
Top-Percoll	18 ml Stammlsg. + 22 ml 1x PBS
Bottom-Percoll	26 ml Stammlsg. + 14 ml 1x PBS-Rot

Für den Percoll-Dichtegradienten werden 4 ml Top-Percoll mit 3 ml Bottom-Percoll unterschichtet.

### 2.15.5 Zellanalyse-Puffer

Ery-Lyse-Puffer, pH 7,4	155 mmol/L NH <sub>4</sub> Cl; 10 mmol/L KHCO <sub>3</sub> ; 1 mmol/L EDTA
FACS-Puffer	PBS; 2% FCS; 1 mmol/L NaN <sub>3</sub>
FACS-Saponin-Puffer	PBS; 2% FCS; 0,5% Saponin; 1 mmol/L NaN <sub>3</sub>
MACS-Puffer	PBS; 2% FCS; 2 mmol/L EDTA
Na-Zitrat-Puffer, pH 6,0	PBS; 10 mmol/L Na-Zitrat; 0,05% Tween-20
Phos-Zitrat-Puffer, pH 7,8	192 mmol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 4 mmol/L Na-Zitrat

### 2.15.6 Mausinjektionslösungen

Narkose	400 µl 0,9% NaCl; 400 µl Ketamin; 200 µl Rompun <sup>®</sup>
Mifepriston	50 mg in 5 ml Pflanzenöl auflösen
Tamoxifen	50 mg in 500 µl 100% Ethanol auflösen, dann 4,5 ml Pflanzenöl dazugeben

### **3 Methoden**

#### **3.1 Peptid-SPOT-Array**

Die Methode beruht auf der Möglichkeit, eine Vielzahl von unterschiedlichen Peptidsequenzen parallel auf Zellulose-Membranen chemisch zu synthetisieren und diese dann für Protein-Protein-Interaktionsstudien oder Bindungsmotiv-Analysen zu verwenden. Ein Protein wird in definiert überlappenden Peptidsequenzen auf die Zellulose-Membran gespottet, der Interaktionspartner als rekombinantes Protein überlagert und die Interaktion über markierte Antikörper detektiert [84].

##### **3.1.1 Peptidmembran-Synthese**

Die gesamte Proteinsequenz von humanen KLF15,  $\beta$ -Catenin, NLK, TCF4 und ITF2 wurde als 25-mer-Peptide jeweils vom C-Terminus beginnend auf Whatman 50 Zellulose-Membranen gespottet. Die Sequenz der einzelnen Peptid-SPOTs ist dabei um jeweils fünf Aminosäuren verschoben, so dass jeder SPOT um 20 Aminosäuren mit dem vorherigen überlappt. Die Peptid-SPOTs wurden von Angelika Ehrlich, AG Peptidsynthese am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), unter Zuhilfenahme eines AutoSpot-Robot ASS 222 (Intavis Bioanalytical Instruments) mittels Fmoc-(Fluorenylmethoxy-carbonyl)-Schutzgruppen-Chemie synthetisiert. Jeder Peptid-SPOT hatte einer Konzentration von 50 nmol Peptid/SPOT. Zur Kontrolle der Aminosäuresequenz und Reinheit wurden Peptid-SPOTs ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und HPLC analysiert. Für die Untersuchung der Relevanz einzelner Aminosäuren von ausgewählten NLK- und TCF4-Peptiden wurden Alanin-Substitutionen auf Peptid-SPOT-Arrays vorgenommen. Wegen Ausfalls der SPOT-Synthesemöglichkeit am FMP wurden diese Peptidmembranen von der Firma Intavis nach gleichem Protokoll synthetisiert.

##### **3.1.2 Herstellung rekombinanter Proteine**

###### **3.1.2.1 Klonierung**

Um rekombinante GST-Tag-Fusionsproteine für die Interaktionsstudien auf synthetischen Peptid-SPOT-Arrays herzustellen, wurden die jeweiligen humanen cDNA-Sequenzen in den *E. coli* Expressionsvektor pGEX-4T-3 kloniert. Dieser zeichnet sich durch eine zur *Multiple Cloning Site* N-terminal gelegene GST-Sequenz, Ampicillin-Resistenz und einen IPTG-induzierbaren Tac-Promoter aus.

Zunächst wurde aus humanen Herzohr-Biopsien RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt 3.5.5). Diese wurde verwendet, um die kodierende Sequenz für KLF15,  $\beta$ -Catenin und NLK mittels PCR zu gewinnen. Die dafür verwendeten Primer wurden so entworfen, dass die PCR-Produkte am 3'-Ende von einer BamHI- und am 5'-Ende von einer NotI-Restriktionsschnittstelle mit flankiert wurden; das Start-Kodon ATG wurde durch CTG ersetzt, um eine GST-Fusion zu erhalten (siehe Abschnitt 2.9.2). Die PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l mit 0,5  $\mu$ l cDNA, 1x Phusion<sup>®</sup>-HF-Puffer, 200  $\mu$ mol/L dNTPs, je 1  $\mu$ mol/L 5'- und 3'-Primer und 0,4 U Phusion<sup>®</sup>-Polymerase, die eine 3'-zu-5'-Exonuklease-Aktivität aufweist und glatte Enden erzeugt. Die PCRs wurden mit einem Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup>-gradient bei 98°C, 3 min Anfangsdenaturierung, 35 Zyklen mit 98°C, 10 s Denaturierung, 61°C, 30 s für KLF15 und 68°C, 30 s für  $\beta$ -Catenin und NLK Primer-Hybridisierung, 72°C, 60 s Primer-Elongation; und abschließende Elongation bei 72°C, 7 min durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden über 2% Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und extrahiert.

Sowohl die PCR-Fragmente als auch der pGEX-4T-3-Vektor wurden mit 20 U BamHI und 10 U NotI bei 37°C ü.N. in NEBuffer 3 und 100  $\mu$ g/ml BSA verdaut. Am nächsten Tag wurden die Enzyme bei 65°C für 25 min inaktiviert und der linearisierte Vektor zusätzlich bei 37°C für 90 min mit 10 U CIP (*calf-intestinal alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Die geschnittenen PCR-Produkte und der Vektor wurden über 2% Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und extrahiert. Anschließend wurden die Inserts mit dem Vektor mittels Rapid DNA Ligation Kit von Fermentas bei 22°C für 30 min ligiert. In einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l wurden 0,25 U T4 DNA Ligase und Inserts in 3-facher DNA-Menge gegenüber dem Vektor eingesetzt.

Je 3  $\mu$ l der Ligationsansätze wurden in 50  $\mu$ l XL10-Gold ultrakompetente *E. coli* nach Herstellerangaben von Stratagene transformiert. 100  $\mu$ l wurden auf LB-Agarplatten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin bei 37°C ü.N. inkubiert. Aus einzelnen Klonen wurde die Plasmid-DNA wie unter 3.5.3 beschrieben extrahiert. Die erhaltenen Plasmide wurden bzgl. Insertion zuerst über PCR und dann auf Sequenzkorrektheit mittels Sequenzierung mit pGEX-Primern (siehe Abschnitt 2.9.3) überprüft. Die PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l mit 2  $\mu$ l Plasmid-DNA, 1x Roboklon Puffer B, 200  $\mu$ mol/L dNTPs, je 1  $\mu$ mol/L 5'- und 3'-Primer und 1 U OptiTaq-Polymerase. Die PCR wurde mittels Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup>-gradient bei 94°C, 3 min Anfangsdenaturierung, 35 Zyklen mit 94°C, 20 s Denaturierung, 60°C, 30 s Primer-Hybridisierung, 72°C, 30 s Primer-Elongation; und abschließende Elongation bei 72°C, 7 min durchgeführt. Eine Amplifikation des Leervektors pGEX-4T-3 führte zu einem 171 bp-PCR-Produkt, bei korrekter Insertion musste die Fragmentgröße der jeweiligen Sequenzen addiert werden (KLF15 1251 bp,  $\beta$ -Catenin 2346 bp, NLK 1584 bp).

### **3.1.2.2 Proteinexpression und -aufreinigung**

Zur Proteinexpression wurden die Expressions-Plasmide in BL21 (DE3) *E. coli* transformiert. Hierzu wurden 50 µl der kompetenten BL21 mit 100 ng Plasmid-DNA auf Eis inkubiert und dann für 10 s bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Nach 5 min auf Eis wurde 950 µl SOC-Medium hinzugegeben und dann bei 37°C für 1 h bei 225 rpm inkubiert. Abschließend sind 50 µl je Ansatz auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C ü.N. inkubiert worden. Am folgenden Tag sind 500 ml LBGA-Medium mit frischen Klonen inokuliert und bei 37°C bei 225 rpm kultiviert worden. Bei einer Zell-Dichte von ca. 0,5 bei OD<sub>600</sub> wurde die Proteinexpression mit IPTG induziert (100 µmol/L GST-β-Catenin; 500 µmol/L für GST-KLF15 und -NLK) und die Bakterien für 4 h weiter kultiviert. Die optimalen Bedingungen sind zuvor in kleinerem Maßstab ermittelt worden. Als nächstes wurden die Bakterien für 10 min bei 7700 × g und 4°C pelletiert und dann in Aufschluss-Puffer auf Eis resuspendiert. Die Bakterien wurden in vier Durchläufen mittels Microfluidizer® M-110L aufgeschlossen und das erhaltene Zell-Lysat 30 min bei 48.000 × g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Spritzen-Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert und die nachfolgende Proteinaufreinigung von Frank Götz, AG Ankerproteine und Signaltransduktion (MDC), vorgenommen. Diese erfolgte in zwei Schritten mittels ÄKTAexplorer 100-System mit einem Frac-950 Fraktionssammler. Als erstes wurden die 50 ml Zellextrakte über eine Affinitätschromatographie mit 5 ml-GSTrap FF-Säule, gepackt mit Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow, gebunden und die GST-Fusionsproteine mit 10 mmol/L reduziertem Glutathion bei pH 8 eluiert. Diesem Schritt folgte eine Gelfiltration mit HiLoad™ 16/60 Superdex 75 prep grade, um Monomere von GST-Dimeren und anderen Aggregaten abzutrennen.

Zur Überprüfung sind von jedem Aufreinigungsschritt Proben entnommen und die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels RAPIDstain™ auf Basis von Coomassie sichtbar gemacht worden. Die Anfärbung der Proteine erfolgte nach Herstellerangaben von G-Biosciences. Eine Proteinquantifizierung erfolgte mit einem NanoDrop über Absorptionsmessung bei 280 nm unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichtes. Die aufgereinigten Proteine GST-KLF15, GST-β-Catenin und GST-NLK wurden in 25% Glycerin bei -80°C gelagert.

Kontroll-GST wurde nach demselben Protokoll gewonnen und freundlicherweise von Jessica Tröger, AG Ankerproteine und Signaltransduktion (MDC), zur Verfügung gestellt. Aufgrund von Klonierungsschwierigkeiten wurde humanes, rekombinantes GST-TCF4 bei Abnova erworben.

### **3.1.3 Protein-Overlay und Detektion**

Die Zellulose-Peptidmembranen wurden 1 min in Ethanol und 5 min in TBS-T äquilibriert und dann für 1 h bei RT in 3% BSA/TBS-T geblockt, gefolgt von einer ü.N.-Inkubation mit 2 µg/ml

rekombinantem GST-Fusionsprotein oder 3 µg/ml GST als Kontrolle in 20 ml 3% BSA/TBS-T bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x mit TBS-T für je 5 min gewaschen und dann mit Kaninchen-anti-GST-Antikörper in 3% BSA/TBS-T für 2 h bei RT inkubiert. Nach drei TBS-T-Waschschritten wurde sekundärer anti-Kaninchen-HRP-Antikörper in 3% BSA/TBS-T für 1 h bei RT dazugegeben und nach weiteren 3x TBS-T-Waschen und ECL-Reagenz-Zugabe sind positive Interaktionen auf ECL-Hyperfilm detektiert worden.

Positive SPOTs wurden den Peptidsequenzen zugeordnet und über BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit dem *blastp*-Algorithmus auf konservierte Domänen oder bekannte Proteinbindungsmotive hin untersucht.

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Kultivierung von HEK293- und SW480-Zellen

Die *Human Embryonic Kidney 293* (HEK293)-Zell-Linie wurde aus menschlichen embryonalen Nierenzellen generiert, die mit DNA des Adenovirus 5 transformiert wurde [81]. Aufgrund der leichten Kultivierung und guten Transfektionseffizienz wurden HEK293 hier für erste biochemische Analysen verwendet.

Epitheliale SW480-Zellen entstammen einem humanem Adenokarzinom des Darms und zeichnen sich u.a. durch eine APC-Mutation aus, die Stabilisierung und vermehrte Anhäufung im Zellkern von  $\beta$ -Catenin bewirkt [82, 83]. Dieses wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der  $\beta$ -Catenin/TCF-anhängigen Transkription genutzt.

HEK293-Zellen wurden in DMEM- und SW480-Zellen in RPMI-Medium, ergänzt mit 10% FCS, 20 µmol/L L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin-/100 µg/ml Streptomycin-Lösung, bei 37°C im 5% CO<sub>2</sub>-Brutschrank kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin-EDTA abgelöst und die Reaktion mit Kulturmedium abgestoppt.

### 3.2.2 Primärkultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Pro Experiment sind 40 Wistar-Ratten im Alter von 2-3 Tagen dekapitiert und die Herzen entnommen worden. Je fünf Herzen wurden gemeinsam mit einem Skalpell zerkleinert und in 25 ml vorgewärmter Enzymlösung (45 U/ml Kollagenase Typ II und 120 µg/ml Pankreatin in ADS-Puffer) bei 37°C unter Rühren für 5 min verdaut. Nach Absetzenlassen des Gewebes wurde der Überstand verworfen, da sich in dieser Fraktion überwiegend Erythrozyten befinden. Mit dem restlichen Gewebe wurde der Vorgang mit frischer Enzymlösung wiederholt und der Überstand mit den dissoziierten Zellen auf 2,5 ml vorgekühltes Pferde-Serum gegeben, bei 4°C und 300 × g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet

in PBS gewaschen und anschließend in DMEM/F12 mit 20% Pferde-Serum auf Eis gestellt. Diese Schritte wurden wiederholt bis das Gewebe nahezu vollständig verdaut war. Anschließend wurden die Zellen pelettiert, in 8 ml PBS aufgenommen und vereinzelt. Je 2 ml der Zellsuspension wurden vorsichtig auf einen diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten gegeben. Nach Zentrifugation bei RT und  $1850 \times g$  für 30 min wurde jeweils die mittlere Schicht mit den Kardiomyozyten gesammelt, mit PBS gewaschen (5 min,  $300 \times g$ ) und in Kultivierungsmedium (NRCM-Medium) aufgenommen. Nachdem die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt worden ist, wurden je  $4 \times 10^5$  Zellen auf mit 1% Gelatine-beschichteten 12-Well-Zellkultur-Platten ausgesät. Die Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  im 5%  $\text{CO}_2$ -Brutschrank kultiviert. Das im Medium enthaltene Cytosin- $\beta$ -D-Arabino-furanosid diente der Hemmung der Proliferation, so dass verbliebene Nicht-Kardiomyozyten die Kulturen nicht überwuchsen.

### **3.2.3 Primärkultur von murinen kardialen Fibroblasten**

Primärkulturen von Fibroblasten aus adulten Mausherzen wurden als *Feeder-Layer* für die Kultivierung von kardiovaskulären Vorläuferzellen genutzt.

Zur Isolation wurden je drei Herzen von adulten C57BL/6-Mäusen vereint, mit einem Skalpell zerkleinert und in 25 ml vorgewärmter Enzymlösung (100 U/ml Kollagenase Typ II und 0,1% Trypsin in HBSS-Puffer) bei  $37^\circ\text{C}$  unter Rühren für 10 min verdaut. Nach Absetzen des Gewebes in Ruhe wurde der Überstand verworfen, da in dieser Fraktion Erythrozyten angereichert waren. Mit dem Gewebe wurde der Vorgang mit frischer Enzymlösung wiederholt und der Überstand mit den dissoziierten Zellen auf 2 ml Fibroblasten-Medium gegeben, bei  $4^\circ\text{C}$  und  $300 \times g$  für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in PBS gewaschen und anschließend in Fibroblasten-Medium auf Eis gestellt. Diese Schritte wurden wiederholt bis das Gewebe nahezu vollständig verdaut war. Anschließend wurden die Zellfraktionen vereint, auf zwei 100 mm Zellkulturschalen aufgeteilt und für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  im 5%  $\text{CO}_2$ -Brutschrank inkubiert. In diesem anreichernden *Pre-Plating*-Schritt setzten sich die größeren Fibroblasten ab, wohingegen andere Zellen im Überstand verblieben. Abschließend wurde der Überstand verworfen, die abgesetzten Zellen 2x mit PBS gewaschen und im Fibroblasten-Medium bei  $37^\circ\text{C}$  im 5%  $\text{CO}_2$ -Brutschrank kultiviert. Nach Erreichen von nahezu 100% Konfluenz wurden die Fibroblasten mit 0,25% Trypsin abgelöst und im Verhältnis 1:3 auf 100 mm Kulturschalen aufgeteilt; die Kulturen wurden bis maximal zur fünften Passage verwendet.

### **3.2.4 Kultivierung von murinen kardiovaskulären Vorläuferzellen**

Zur *in vitro* Untersuchung von endogenen kardiovaskulären Vorläuferzellen (*Cardiovascular Progenitor Cells*, CPCs) wurden zwei unterschiedliche Isolations- und Kultivierungsmethoden angewendet.

#### **3.2.4.1 CPC-Isolation durch enzymatischen Gewebeerddau**

Adulte Mauserherzen sind frisch entnommen in PBS gewaschen, die Vorhöfe entfernt und das Ventrikelgewebe mit einem Skalpell zerkleinert worden. Zum enzymatischen Verdau wurde das Gewebe in 220 U/ml Kollagenase Typ II/HBSS-Puffer bei 37°C für 30 min verdaut und dann sequenziell durch Zellsiebe mit 40 µm und 30 µm Porengröße gefiltert und bei 4°C und 300 × g für 10 min pelettiert. Die vereinzelt Zellen wurden in CPC-Medium aufgenommen und für 2 h bei 37°C im 5% CO<sub>2</sub>-Brutschrank zum *Pre-Plating* inkubiert. Dieser Schritt diente dem Abtrennen von Zelltrümmern und Fibroblasten. Anschließend wurde der Überstand mit den CPCs entnommen und ausgesät.

#### **3.2.4.2 Nicht-enzymatische CPC-Isolation**

Hierbei wurde das frisch präparierte Herzgewebe bis zu einer breiigen Masse mit einem Skalpell zerkleinert, in 2% FCS/PBS aufgenommen und durch 40 µm und 30 µm Zellfilter gedrückt. Die Zellen wurden bei 4°C und 300 × g für 5 min pelettiert, in CPC-Medium aufgenommen und ausgesät. Dieses Protokoll beruht auf dem Prinzip der Explantat-Kultur, bei dem Vorläuferzellen aus einem Zellverband in Kultur heraus migrieren.

#### **3.2.4.3 CPC-Kultivierung auf einer Proteinmatrix**

Da CPCs nicht an Plastik anhaften, sind Zellkulturschalen entweder mit 1% Gelatine oder mit Matrigel beschichtet worden. Zur Gelatine-Beschichtung wurden die Zellkulturschalen mit 1% autoklavierter Gelatine für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und dann unter UV-Licht getrocknet. Das Matrigel ist über Nacht bei 4°C aufgetaut und mit kaltem DMEM/F12-Medium aufgenommen worden. Die Zellkulturschalen wurden für 1 h bei RT mit 0,33 mg/ml Matrigel beschichtet und anschließend mit Medium gewaschen. Auf die so vorbereiteten Zellkulturschalen sind die isolierten CPCs gegeben und drei Tage bei 37°C im 5% CO<sub>2</sub>-Brutschrank zum Anhaften in CPC-Medium inkubiert worden. Daraufhin wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und in Konditionalmedium kultiviert, welches aus dem Überstand von kardialen Fibroblasten-Kulturen gewonnen wurde. Eine Erneuerung des Mediums erfolgte alle zwei Tage.

#### **3.2.4.4 CPC-Kultivierung auf Feeder-Layer**

Der sogenannte *Feeder-Layer* stellt die extrazelluläre Matrix, Zellkontaktdichte und die Sekretion für das Wachstum und Differenzierung benötigte parakrine Faktoren bereit. Um die *in vivo* Bedingungen möglichst genau nachzustellen, sind kardiale Fibroblasten aus adulten Herzen verwendet worden (siehe 3.2.3). Um den Zellzyklus zu arretieren und damit die Proliferation zu unterbinden, wurden die Fibroblasten an Tag vor der CPC-Isolation für 2 h mit 10 µg/ml Mitomycin C behandelt und 2x mit PBS gewaschen. Die isolierten CPCs wurden auf den Fibroblasten ausgesät und drei Tage bei 37°C im 5% CO<sub>2</sub>-Brutschrank zum Anhaften in CPC-Medium gehalten. Dann sind die Kulturen 2x mit PBS gewaschen und in CPC-Differenzierungsmedium für 10-15 Tage kultiviert worden.

#### **3.2.5 Quercetin-Behandlung von kultivierten Zellen**

Zur *in vitro* Inhibition von β-Catenin-abhängiger Transkription ist die Substanz Quercetin verwendet worden [85]. Die 50 mmol/L Stammlösung wurde in DMSO angesetzt und die Endkonzentrationen durch Verdünnen mit Medium erzielt. HEK293-Zellen wurden für 48 h mit 10, 50 oder 100 µmol/L Quercetin, CPC-Kulturen für 10 Tage mit 2,5; 5; 10; 25 oder 50 µmol/L Quercetin in CPC-Differenzierungsmedium behandelt. Die finale DMSO-Konzentration im Medium betrug maximal 0,002% bei HEK293- und 0,001% bei CPC-Kulturen. DMSO-behandelte Kulturen wurden als Kontrollen mitgeführt.

#### **3.2.6 Plasmid-Transfektion**

Für die Untersuchung von Protein-Interaktionen, -Funktionen und subzelluläre Lokalisationen wurden Plasmide, die Tag-gekoppelte Proteine exprimieren, in kultivierten Zellen transient transfiziert. Mit Hilfe von kommerziellen Transfektionsreagenzien auf Basis der Lipofektion wurde Plasmid-DNA in die Zellen eingebracht. Hierbei komplexieren kationische Lipide mit der negativ geladenen DNA und bilden leicht positiv geladene Mizellen, die die Aufnahme durch die Zellmembran erleichtern.

Am Tag vor der Transfektion sind für (Ko-)Immunpräzipitationen  $3 \times 10^6$  HEK293-Zellen auf 100 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit FuGENE 6 von Roche im Verhältnis 1:3 (10 µg DNA:30 µl Reagenz) in Serum-freien Medium transfiziert worden. Für immunzytologische und Genreporter-Experimente wurden auf 12-Well-Platten  $1,5 \times 10^5$  HEK293- oder SW480-Zellen und  $4 \times 10^5$  neonatale Rattenkardiomyozyten je Well ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit dem TransFektin™-Reagenz von BioRad in einem Verhältnis von 1:2 (1,3 µg DNA : 2,6 µl Reagenz) in Serum-freien Medium. Die Zellkonfluenz betrug am Tag der Transfektion bei HEK293- und SW480-Zellen ca. 70% und bei den primären neonatalen Rattenkardiomyozyten nahezu 100%. Bei HEK293-Zellen und der Nutzung von TransFektin™ wurde aufgrund der Toxizität 4 h nach der Transfektion das

Medium gewechselt; ansonsten erfolgte 24 h später ein Mediumwechsel. 48 h nach der Transfektion sind die Zellen den jeweiligen Assays zugeführt worden. Die Transfektionseffizienz wurde mittels EGFP-exprimierendem Plasmid nach 24 und 48 h dokumentiert.

### 3.3 Tierexperimentelle Arbeiten

#### 3.3.1 Tierhaltung und Tierversuchsgenehmigung

Die Mäuse wurden für die Experimente in der Tierhaltungseinrichtung des Max-Delbrück-Centrums (Zeitraum 2008-2011) und der Universitätsmedizin Göttingen (seit 2012) nach Richtlinien der FELASA gezüchtet und versorgt. Die Haltung erfolgte in Barrieren unter sterilen, standardisierten Bedingungen bei konstanter Temperatur (22-23°C) und kontrolliertem 12 h-Tag-/Nachtrhythmus; Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Die durchgeführten Züchtungen unterlagen dem Tierschutzgesetz §11 und alle durchgeführten Eingriffe am lebenden Tier, Tötungen und Organentnahmen wurden durch die LaGeSo Berlin und die LAVES Niedersachsen genehmigt.

#### 3.3.2 Induktion der $\beta$ -Catenin-transgenen Mäuse

Während es sich bei der *Klf15*-Maus um ein konventionelles, systemisches Knockout-Model handelt, sind die Mausmodelle mit  $\beta$ -Catenin-Modulation Zeit- und Herz-spezifisch über das Cre/loxP-Rekombinationssystem induzierbar. Hierbei ist das Gen für die Cre-Rekombinase mit einem Kernlokalisationsignal und einer Liganden-Bindungsdomäne von modifizierten Steroidhormon-Rezeptoren fusioniert worden; gleichzeitig wurde die Expression an den Herzzell-spezifischen  $\alpha$ MHC-Promotor gekoppelt. Zudem ist das  $\beta$ -Catenin kodierende Gen so modifiziert worden, dass bestimmte Bereiche durch loxP-Erkennungssequenzen flankiert worden sind. Erst durch Verabreichung des spezifischen Liganden kommt es zur Aktivierung der Cre-Rekombinase, Transport in den Zellkern und zum Herausschneiden der geflochten Sequenzen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene, konditionale Modelle verwendet:

- $\beta$ -Catenin *Loss-of-function*-Mäuse:  $\alpha$ MHC-MerCreMer/ $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex2-6</sup> [86]

Exon 2-6 von  $\beta$ -Catenin wurden durch loxP-Stellen flankiert [87]. Die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des kardial-spezifischen  $\alpha$ MHC-Promoters wurde an einen modifizierten Estrogen-Rezeptor gebunden und durch Injektionen mit 40 mg/kg/Tag Tamoxifen i.p. für 5 Tage aktiviert [79]. Als Konsequenz wurde kein funktionales  $\beta$ -Catenin mehr exprimiert.

–  $\beta$ -Catenin *Gain-of-function*-Mäuse:  $\alpha$ MHC-CrePR1/ $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex3</sup> [80]

Das Exon 3 von  $\beta$ -Catenin wurde durch loxP-Stellen flankiert [88]. Die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des kardial-spezifischen  $\alpha$ MHC-Promoters wurde an einen veränderten Progesteron-Rezeptor gekoppelt und mittels Injektionen von 30 mg/kg/Tag Mifepriston i.p. für 5 Tage aktiviert [78]. Exon 3 kodiert den Bereich, der für den proteasomalen Abbau von  $\beta$ -Catenin notwendig ist. Das Fehlen führte zu stabilisiertem und damit vermehrt aktiviertem  $\beta$ -Catenin in der Zelle.

Es wurden Mäuse im Alter von mindestens 10 Wochen eingesetzt und zur Ausbildung des Phänotyps wurde nach Induktion mindestens 2 Wochen gewartet. Die Rekombination wurde mittels PCR bestätigt (siehe 3.3.3). Als Kontrollen wurden entweder einfach-transgene Mäuse (nur positiv auf Cre oder loxP-Flankierung) mit dem jeweiligen Steroidhormon-Derivat injiziert oder doppel-transgene Mäuse (positiv für Cre und loxP-Flankierung) nur mit dem Lösungsmittel behandelt.

### 3.3.3 Maus-Genotypisierung

Genomische DNA aus murinen Schwanzspitzenbiopsien und Herzgewebe wurde nach Herstellerangaben des Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit extrahiert. Die Genotypen wurden mittels PCR bestimmt. Diese erfolgten in einem Gesamtvolumen von 15  $\mu$ l mit 2  $\mu$ l genomischer DNA, 1x Roboklon Puffer B, 200  $\mu$ mol/L dNTPs, je 1  $\mu$ mol/L 5'- und 3'-Primer und 1 U OptiTaQ-Polymerase. Die verschiedenen Primer sind unter 2.9.1 aufgeführt. Die Amplifikation erfolgte in einem Biometra T3 Thermocycler unter **Tab. 1** angegebenen Bedingungen.

**Tab. 1 PCR-Programme für Maus-Genotypisierungen**

			Programm 1	Programm 2
PCR-Schritt	Temperatur	Zyklen	Zeit	Zeit
Anfangsdenaturierung	94°C	1x	4 min	2 min
zyklische Denaturierung	94°C	35x	30 s	1 min
Primer-Hybridisierung	T <sub>a</sub> °C		30 s	1 min
Primer-Elongation	72°C		30 s	1 min
finale Elongation	72°C	1x	5 min	10 min

Programm 1 wurde für die Genotypen Klf15,  $\alpha$ MHC-CrePR1,  $\alpha$ MHC-MerCreMer und  $\beta$ -Cat-flox<sup>ex2-6</sup> angewandt; Programm 2 für den  $\beta$ -Cat-flox<sup>ex3</sup>-Genotyp und die Überprüfung der Rekombination nach Induktion von  $\alpha$ MHC-CrePR1/ $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex3</sup> und  $\alpha$ MHC-MerCreMer/ $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex2-6</sup>. Die amplifizierten Produkte wurden mittels DNA-Größenmarker nach 2% Agarose-Gelelektrophorese den Genotypen zugeordnet (**Tab. 2**).

**Tab. 2 PCR-Produkte der verschiedenen Maus-Genotypen**

Maus-Genotyp	Wildtyp	Transgen
Klf15	200 bp	380 bp
$\alpha$ MHC-CrePR1	-	330 bp
$\alpha$ MHC-MerCreMer	-	450 bp
$\beta$ -Cat-flox <sup>ex3</sup>	580 bp	880 bp
$\beta$ -Cat-flox <sup>ex2-6</sup>	221 bp	324 bp
$\alpha$ MHC-CrePR1/ $\beta$ -Cat <sup><math>\Delta</math>ex3</sup>	900 bp	700 bp
$\alpha$ MHC-MerCreMer/ $\beta$ -Cat <sup><math>\Delta</math>ex2-6</sup>	-	631 bp

### 3.3.4 Induktion von kardialer Belastung

Zur Untersuchung der Auswirkungen des transgenen Klf15-Knockouts im Verlauf der Herzremodellierung wurde experimentell ein mildes (Angiotensin II-Infusion) und ein stringentes (TAC-OP) kardiales Belastungsmodell bei Mäusen angewandt. Für alle Eingriffe sind männliche Mäuse im Alter von 12-14 Wochen und einem Gewicht von ca. 25 g untersucht worden. In diesem Alter ist das entwicklungsbedingte Wachstum abgeschlossen. Um zudem bekannte geschlechtsbedingte Unterschiede im Verlauf einer Herzinsuffizienz [89] und beim Vergleich von echokardiographischen Parametern [90] zu umgehen, sind ausschließlich männliche Tiere eingesetzt worden. Die operativen Eingriffe erfolgten aseptisch unter Inhalationsnarkose, eingeleitet mit 4% Isofluran und fortgeführt mit 2,4% Isofluran in Sauerstoff.

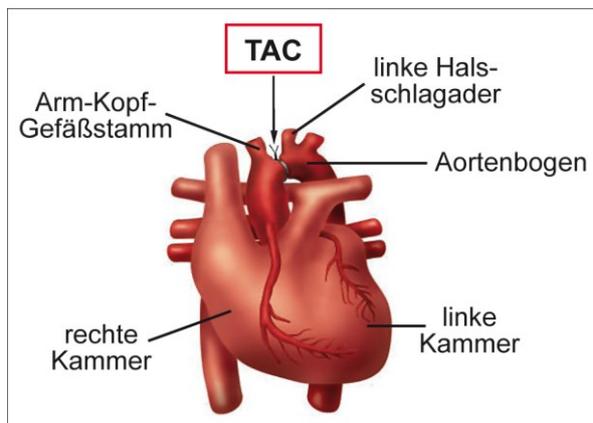
#### 3.3.4.1 Angiotensin II-Infusion

Mittels chronischer Aktivierung insbesondere des AT<sub>1</sub>-Rezeptors über kontinuierliche Angiotensin II-Infusion wurde eine verstärkte Gefäßverengung und anti-diuretische Wirkung erzielt. Dies führt nachweislich zu erhöhtem Blutdruck und somit Belastung des Herzmuskels und erlaubt eine experimentell induzierte kardiale Hypertrophie [91]. Dazu wurde den Mäusen unter Narkose intraperitoneal je eine mini-osmotische Pumpe implantiert. Diese wurden einen Tag zuvor mit entweder 6  $\mu$ g/ $\mu$ l synthetisch hergestelltem Angiotensin II oder dem 0,9% NaCl-Lösungsmittel nach Herstellerangaben von Alzet befüllt und ü.N. bei 4°C in 0,9% NaCl-Lösung bzgl. der Pumprate initiiert. Verwendet wurden das Pumpenmodell 1002 mit einer Pumprate von 25  $\mu$ l/h und 100  $\mu$ l Füllvolumen. Die verabreichte Angiotensin II-Dosis betrug 1,44 mg/kg/Tag. Die Substanzen wurden kontinuierlich für 2 Wochen infundiert.

#### 3.3.4.2 Transverse Aortenkonstriktion

Die transverse Aortenkonstriktion (TAC) ist ein etabliertes Model zur Induktion von chronischer Drucküberlast und somit zur Auslösung von kardialer Hypertrophie, die schnell in das Stadium der Herzinsuffizienz übergeht [92, 93]. Hierzu wurde bei Mäusen unter Narkose die thorakale Aorta

freigelegt und am Aortenbogen zwischen Arm-Kopf-Gefäßstamm (*Truncus brachiocephalicus*) und Halsschlagader (*Arteria carotis communis*) eine Ligatur definierter Größe angelegt (**Abb. 7**). Dazu wurde eine gebogene 26 G Kanüle parallel zur Aorta angelegt, mit nicht-resorbierbaren Prolene® 7-0 Nahtmaterial ligiert, und sofort wieder entfernt; der Durchmesser der Aorta wurde um ca. 50% des Lumens verengt. Als Kontroll-Gruppe wurden Mäuse einer sogenannten Sham-Operation unterzogen. Dabei wurde die beschriebene Prozedur ohne Setzen der Ligatur vollzogen. Die Operationen wurden freundlicherweise von Dr. Andrey da Costa Gonçalves, AG Ankerproteine und Signaltransduktion (MDC), durchgeführt.



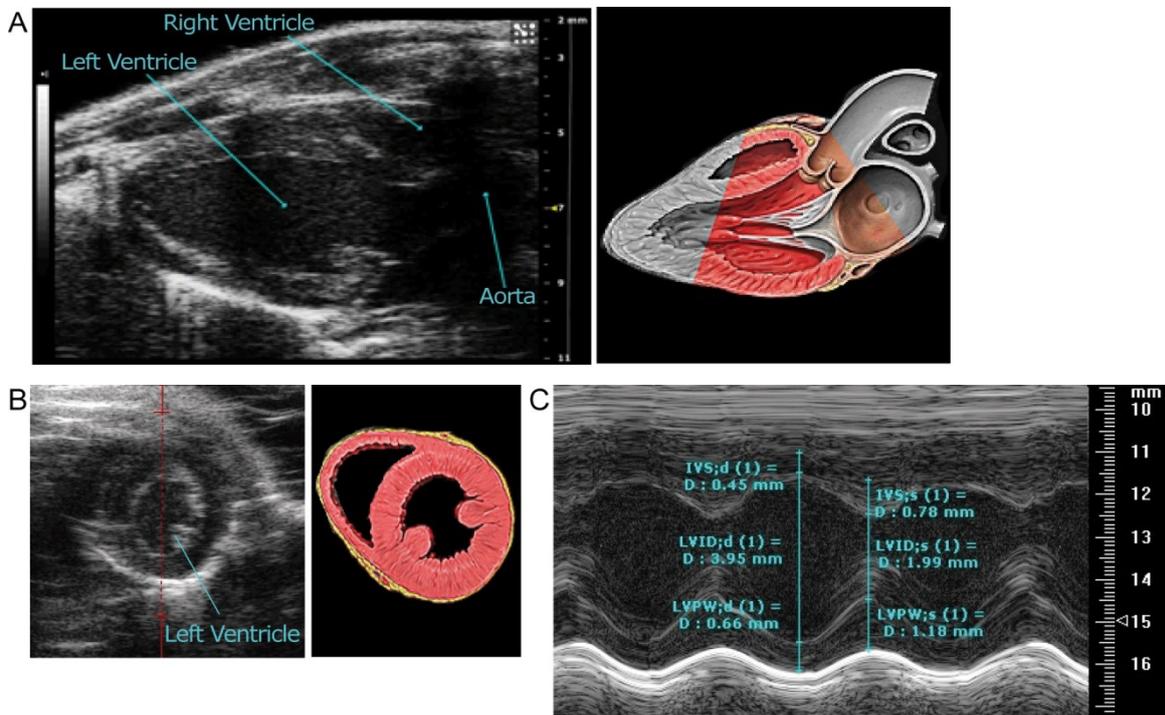
**Abb. 7 Schema der Transversen Aortenkonstriktion.**

Am transversalen Aortenbogen zwischen Arm-Kopf-Gefäßstamm und linker Halsschlagader wurde eine Ligatur gesetzt, mit der der Durchmesser der Aorta um ca. 50% verengt wurde. Modifiziert von van Rooij und Olson (2007) [94].

### 3.3.5 Echokardiographie

Zur Untersuchung des Herzmuskels bzgl. anatomischer Veränderungen und der Funktion wurden die Klf15-Mäuse im Alter von 8, 12, 16 und 40 Wochen einer transthorakalen Echokardiographie unterzogen. Sind die Mäuse einer kardialen Stressinduktion ausgesetzt worden, wurde jeweils eine Messung vor und zwei Wochen nach der Operation zum Vergleich durchgeführt. Die Mäuse wurden mit 2,4% Isofluran narkotisiert und am Brustraum enthaart, um einen optimalen Kontakt zwischen Schallkopf und Körperoberfläche zu erzielen. Die Messungen erfolgten mit einem VisualSonics Vevo 2100 Imaging System ausgestattet mit einer 45 MHz MS-550D MicroScan Ultraschallsonde und wurden von Martin Taube, Service *in vivo* Maus Phänotypisierungsplattform (MDC), durchgeführt. Dabei waren ihm weder der Maus-Genotyp noch die Behandlungsgruppe bekannt. Zur Messung von linksventrikulären Herzwanddicken sowie dem Herzkammerdiameter wurden parasternale B(*brightness*)-Mode- und M(*motion*)-Mode-Aufnahmen auf mittlerer Höhe des Papillarmuskels herangezogen. Hierbei lieferte der B-Modus eine 2-D-Übersicht der anatomischen Strukturen und der M-Modus eine ein-dimensionale, zyklische Abfolge der Herzmuskelbewegung (**Abb. 8**). Gemessen wurden die Herzrate (HR, bpm), systolische (sys) und diastolische (d) Herzwanddicken (IVS: Interventrikuläres Septum, LVHW: Linksventrikuläre Hinterwand; mm) und der linksventrikulärer Innendiameter (LVID, mm). Mittels dieser Werte und der Vevo-Software wurden das Gewicht des

linken Ventrikels (LVmass, mg) und die funktionellen Parameter Auswurfvolumen (EF: *Ejection Fraction*, %) und Verkürzungsfraktion (FS: *Fractional Shortening*, %) berechnet. Nach TAC-Operationen wurde zudem eine Dopplersonographie durchgeführt, um den Blutfluss-Gradienten durch die gesetzte Verengung an der Aorta zu ermitteln (deszendierender Gradient, mm/Hg).



**Abb. 8** Echokardiographische Beispielbilder zu B- und M-Modus-Aufnahmen eines Mauserzens.

(A) B-Mode-Aufnahme der langen Herzachse zur Darstellung der Anatomie und dessen schematische Abbildung. (B) Parasternale Aufnahmen der kurzen Achse und die schematische Repräsentierung. (C) M-Modus-Darstellung der zyklischen Abfolge der Herzmuskelbewegung zur Messung der Kammerdimensionen. IVS: Inter-ventrikuläres Septum, LVID: linksventrikulärer Innendiameter, LVPW: Linksventrikuläre Hinterwand (*posterior wall*). Die Aufnahmen wurden mittels VisualSonics Vevo 2100 Imaging System erhalten. Die schematischen Bilder sind von Lynch 1987 modifiziert.

### 3.3.6 Organentnahme und Morphometrie

Die Mäuse wurden mittels kombinierter i.p. Injektion mit 160 mg/kg Ketamin und 16 mg/kg Rompun<sup>®</sup> narkotisiert. Ketamin diente dabei als Analgetikum und Narkotikum, Rompun<sup>®</sup> mit dem Wirkstoff Xylazin wirkte sedativ, analgetisch und muskelrelaxierend. Die Wirkung wurde mittels Flexor-Reflex getestet, die Maus wurde dann am Brust- und Bauchraum geöffnet und die Organe sofort entnommen. Dieses Vorgehen verhindert besonders bei der Herzentnahme eine Blutkoagulation in den Herzkammern.

Zur Morphometrie wurden die Maus und das präparierte Herz gewogen und die linke Tibia nach Organentnahme freigelegt und mit einem Lineal vermessen. Sowohl Gesamtkörpergewicht als auch Tibia-Länge dienten als Normalisierungsfaktor.

### 3.4 Zellanalysen

#### 3.4.1 Magnetische Zellsortierung mittels MACS

Zur Isolation von Sca1-positiven Progenitorzellen wurde die *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Technologie verwendet. Hierbei werden Oberflächenepitope mit spezifischen magnetisch-gekoppelten Antikörpern markiert und im Magnetfeld aus der Gesamtzellpopulation herausortiert.

Um genügend Zellen zu erhalten, wurden je Ansatz fünf frisch präparierte Herzen von adulten Mäusen mit einem Skalpell manuell minimal zerkleinert. Dieses Gewebe wurde in 30 ml HBSS-Puffer mit 220 U/ml Kollagenase Typ II bei 37°C für 30 min verdaut, die Zellen bei 4°C, 300 × g für 10 min sedimentiert und in MACS-Puffer aufgenommen. Diese wurden zur Vorselektion mittels Zellgröße und zur Erlangung von Einzel-Zellsuspensionen sequenziell durch 40 µm- und 30 µm-Zellsiebe filtriert. Die Zellen sind dann bei 4°C für 15 min mit anti-Sca1-FITC-Antikörper von Miltenyi Biotech (1:10) markiert, anschließend in MACS-Puffer bei 4°C, 300 × g für 10 min gewaschen und mit anti-FITC-MicroBeads (Miltenyi Biotech, 1:5) bei 4°C für 20 min inkubiert worden. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die magnetische Zellseparation mittels OctoMACS Separator auf MS Säulen (maximale Kapazität: 1×10<sup>7</sup> Zellen) von Miltenyi Biotech nach Herstellerangaben. Die Anreicherung von Sca1-positiven Zellen wurde durch zwei aufeinanderfolgende MS-Säulen-Separationen erzielt und die Reinheit mittels Durchflusszytometrie am FACS-Calibur gemessen. Es wurden sowohl die sortierten Zellen als auch der Zelldurchlauf gesammelt und beides sofort der RNA-Extraktion zugeführt.

#### 3.4.2 Zellanalysen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch bekannt als *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS), ist eine Methode zur Quantifizierung von in Suspension vereinzelt Zellen in Bezug auf ihre Eigenschaften. Hierbei werden Zellen durch einen gebündelten Laserstrahl gerichtet und das dabei erzeugte gestreute und angeregte Licht gemessen. Detektoren erfassen zum einen die Vorwärts-Lichtstreuung (*Forward Scatter, FSC*) als Maß für die Zellgröße und zum anderen das Seitwärts-Streulicht (*Side Scatter, SSC*) korrelierend zur Granularität. Sind Oberflächen- oder Intrazellulär-Epitope der Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert worden, wird das durch Laser angeregte, emittierte Licht detektiert. Die Kombination der Informationen gibt Aufschluss über die speziellen Charakteristika von Zellpopulationen, die auch zum Sortieren von Zellen genutzt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Immunphänotypisierung von isolierten kardialen Progenitorzellen *in vivo* und nach *in vitro*-Kultivierung genutzt. Die Zellen wurden wie unter Abschnitt 3.2.4 beschrieben direkt aus Mausherzen isoliert oder nach 14-tägiger Kultivierung mit 0,25% Trypsin-EDTA bei 37°C für 10 min abgelöst. Die vereinzelt Zellen wurden in FACS-Puffer

aufgenommen und zunächst mit direkt Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen Oberflächenproteine bei 4°C für 30 min abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit FACS-Puffer und 1x mit PBS gewaschen und in 1% PFA/PBS bei RT für 15 min fixiert. Nach 2x Waschen mit PBS wurden die Zellen mit FACS-Saponin-Puffer für 5 min permeabilisiert und dann mit Primär-Antikörpern gegen intrazelluläre Proteine bei 4°C für 30 min abgedunkelt inkubiert. Nach 3x Waschen mit FACS-Saponin-Puffer, wurde die entsprechenden mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörper für 30 min bei 4°C hinzugegeben, gefolgt von 2x Waschen mit FACS-Saponin- und 1x FACS-Puffer. Die Antikörpermarkierung erfolgte in 100 µl Zellsuspension und alle Waschschritte sind mit 1 ml Puffer bei 4°C und 300 × g für je 5 min durchgeführt worden. Zu den jeweiligen Antikörpern die Isotyp-Kontrollen mitgeführt worden. Die verwendeten Antikörper- und Isotyp-Verdünnungen sind in Abschnitt 2.10 aufgelistet. Abschließend wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit einem BD FACS-Calibur-Durchflusszytometer analysiert. Es wurden 10.000 Zellen im SSC/FSC-Populations-Gate erfasst und die Auswertung im Quadranten für Doppelfärbungen und im Histogramm für Einzelfärbungen mit der Software CellQuest Pro durchgeführt.

Zur Kontrolle der Antikörper-Spezifität wurden neben Progenitorzellen aus dem Herzen auch Milzzellen isoliert und nach gleichem Protokoll gefärbt. Da es sich bei der Milz um ein stark durchblutetes Organ handelt, wurden nach der Isolation die Erythrozyten mit Ery-Lyse-Puffer für 2 min bei RT entfernt und anschließend mit dem 5-fachen Volumen an FACS-Puffer 3x gewaschen. Die Kontrollen befinden sich im Anhang II.

### 3.4.3 Zellzyklus-Analyse

Als Abwandlung der oben beschriebenen Technik wurde die DNA von isolierten Progenitorzellen mit dem stöchiometrisch interkalierenden Farbstoffen Propidiumiodid markiert und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Hierbei können verschiedene Zellzyklus-Phasen durch den DNA-Gehalt und der daraus resultierenden Fluoreszenz-Intensität unterschieden werden: ruhende Zellen in G0/G1 mit 2 n, Zellen in der Replikationsphase G2/M mit 4 n und in der DNA-Synthesephase S mit 2-4 n.

Die isolierten Progenitorzellen wurden bei 4°C für 30 min mit 70% eiskaltem Ethanol/PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen 2x in Phos-Zitrat-Puffer bei 4°C und 300 × g für je 5 min gewaschen und dann mit 300 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) in Phos-Zitrat-Puffer bei 37°C für 30 min inkubiert. Um die Bindung von Propidiumiodid an RNA zu verhindern, wurden zudem 50 µl RNase A (100 µg/ml) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Messung am FACS-Calibur-Durchflusszytometer mit Anregung durch einen Argon-Ionen-Laser. Um die zu analysierenden Einzel-Zellen von Zellschrott und -aggregaten zu unterscheiden, ist im FL2-585/42-Filter die Zellfläche gegen die Zellweite linear aufgetragen worden. Durch Anlegen eines entsprechenden *Gates* wurden 20.000

Zellen je Probe analysiert und dann in einem Histogramm die Zellnummer gegen Fluoreszenzintensität aufgetragen, um die Zellzyklusphasen zu unterscheiden und quantitativ auszuwerten. Die Analyse erfolgte mittels CellQuest Pro Software.

### 3.5 Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1 Luziferase-Reporter-Gen-Assay

Um den Effekt von identifizierten Interaktionspartnern auf die  $\beta$ -Catenin-abhängige Transkription *in vitro* zu testen, wurde das TCF-Reporter-Plasmid Kit von Upstate verwendet. Hierbei handelt es sich zum einen um das pTOPflash-Plasmid mit drei Kopien der TCF-Bindestelle (CCTTTGATC) und zum anderen um das pFOPflash-Plasmid mit drei Kopien einer mutierten TCF-Bindestelle (CCTTTGGCC), gefolgt von einem minimalen Thymidinkinase-Promoter und dem Leserahmen für das Glühwürmchen (*Photinus pyralis*)-Luziferase-Gen. Eine Aktivierung des Promotors und damit Transkription des Luziferase-Gens erfolgt nach Bindung von  $\beta$ -Catenin mit seinen Kofaktoren TCF/LEF an die Bindestellen; das Plasmid mit mutierten Bindestellen dient als Negativkontrolle. Als Maß für die Luziferase-Aktivität wird die Lumineszenz nach Oxidation des Substrats Luziferin in Gegenwart von ATP,  $Mg^{2+}$  und  $O_2$  gemessen.

Zur Analyse wurden HEK293-, SW480-Zellen und neonatale Rattenkardiomyozyten mit dem pTOPflash bzw. pFOPflash, Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin oder TCF4, KLF15 oder dessen verkürzte Konstrukte und pRL-CMV mit TransFektin™ von BioRad transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.6). Das Plasmid pRL-CMV enthält die Sequenz der Quallen (*Renilla reniformis*)-Luziferase und diente zum Normalisieren von Variationen bzgl. Zellzahl, Transfektions- und Lyseeffizienz. Das optimale Konzentrationsverhältnis der Plasmide wurde zuvor etabliert: pRL-CMV mit 5 ng/Ansatz; die Reporterplasmide wurden aufgrund des schwächeren Thymidinkinase-Promoters in 3-facher Menge (0,75  $\mu$ g) zum Reporter-aktivierenden Plasmid (0,25  $\mu$ g) eingesetzt. Um in jedem Ansatz die gleiche DNA-Menge zu gewährleisten, wurde mit entsprechendem Leervektor kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden mit den Zellen nach Herstellerangaben des Dual-Luciferase® Reporter Assay System von Promega verfahren und die Luziferase-Aktivität mit einem TD-20/20 Luminometer (Turner Designs) ermittelt. Licht-Einheiten sind nach 2 s Verzögerung für 10 s gemessen worden. Jede Bedingung wurde in Triplikaten durchgeführt und in unabhängigen Experimenten wiederholt. Die Plasmide sind in Abschnitt 2.8 aufgelistet und die Plasmidkarten im Anhang I beigelegt.

### **3.5.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Restriktionsverdau- und PCR-Produkte wurden mit Probenpuffer versetzt und in 1-2%igen Agarosegelen in TAE-Puffer elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt; dazu wurde ein DNA-Größenmarker mitgeführt. Aufgrund der negativen Ladung der DNA findet eine Migration durch das Gel im elektrischen Feld statt. Anschließend wurde die DNA 15 min mittels 0,5 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt und im UV-Licht visualisiert. Wurden die DNA-Fragmente weiterhin benötigt, sind diese aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben extrahiert worden.

### **3.5.3 Plasmid-DNA-Isolation**

Bakterienklone aus ü.N.-Kulturen wurden in LBGA-Medium inokuliert und bei 225 rpm und 37°C ü.N. inkubiert. Plasmid-DNA ist unter Verwendung des Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kits der Invitex GmbH oder des Plasmid Maxi Kit von Qiagen entsprechend der Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt worden.

### **3.5.4 DNA-Sequenzierung**

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen wurden der Service der Firmen GATC Biotech und Invitex GmbH genutzt. Die erhaltenen Sequenzen sind mit der online-Datenbank BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mittels megablast-Algorithmus abgeglichen worden.

### **3.5.5 RNA-Expressionsanalyse mittels quantitativer real-time PCR**

Um die Expressionslevel von Gentranskripten zu bestimmen, wurde sich der quantitativen real-time PCR (qrt-PCR) mittels SYBR Green bedient. Diese Methode nutzt die Amplifikation von cDNA und messbare Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I in doppelsträngige DNA während der Polymerase-Ketten-Reaktion.

Zunächst wurde gesamt-RNA aus Mausgewebe bzw. von kultivierten Zellen entsprechend der Herstellerangaben des Macherey-Nagel NucleoSpin RNA II Kits isoliert. Das Aufreinigungsprotokoll beinhaltet den Verdau mittels rekombinanter DNase, um Kontaminationen mit DNA zu vermeiden. Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration bei 260 nm mittels NanoDrop-Photometer bestimmt.

Zur cDNA-Synthese sind jeweils 300 ng RNA mit 0,5 µg Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primer gemischt und bei 65°C für 5 min erhitzt worden. Die Umschreibung erfolgte nach Zugabe von 10 mmol/L dNTP-Mix und 100 U M-MLV Reverse Transkriptase in Gegenwart von 1x M-MLV-RT-Reaktionspuffer einschließlich 10 mmol/L DTT bei 42°C für 1 h. Die gewonnene cDNA wurde mit Nuklease-freien

Wasser 1:10 verdünnt und anschließend je 1 µl mit 10 µl GoTaq® qPCR Master Mix, 400 nmol/L Fluoreszein-Kalibrierungsfarbstoff und jeweils 3 µmol/L 3'- und 5'-Primer gemischt. Die qrt-PCR wurde mittels BioRad-iCycler iQ5 für 95°C, 60 s Anfangsdenaturierung, 35 Zyklen mit 95°C, 15 s Denaturierung, 55 bzw. 60°C, 30 s Primer-Hybridisierung und 72°C, 20 s -Elongation durchgeführt. Der Amplifikation schloss sich eine Schmelzkurvenanalyse in 0,5°C-Schritten von 55 bis 95°C an. Alle Reaktionen wurden als Triplikate ausgeführt. Es erfolgte eine absolute Quantifizierung über eine mitgeführte logarithmische Standardkurve im Bereich von 10<sup>3</sup> bis 10<sup>8</sup> Molekülen/µl der jeweiligen Gene. Zur Anfertigung der Standardreihen wurde cDNA von murinem, embryonalem Gewebe amplifiziert, die PCR-Fragmente mittels 1%iger Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Sequenzierung überprüft, und anschließend die Kopienzahl anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Kopienzahl [Moleküle / } \mu\text{l]} = \frac{\text{DNA-Konzentration [g / } \mu\text{l}]}{\text{Länge des PCR-Fragments [bp]} \times 660} \times 6.022 \times 10^{23}$$

Die Normalisierung der Expressionslevels der untersuchten RNA-Transkripte erfolgte durch Division mit dem geometrischen Mittel der Kopienzahlen der Housekeeping-Gene Gapdh und β-Actin. Die Primer-Sequenzen und -Hybridisierungstemperaturen sind im Abschnitt 2.9.4 aufgeführt.

### **3.6 Proteinbiochemie**

#### **3.6.1 Gesamtzell-Proteinextraktion**

HEK293-Zellen wurden mit PBS gewaschen, in IP-Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren aufgenommen und auf Eis lysiert. Murine Organstücke wurden in flüssigem Stickstoffschockgefroren und gemörsert, in RIPA-Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren aufgenommen und über eine Spritze mit 20 G-Kanüle homogenisiert. Abschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation für 20 min bei 1.500 × g, 4°C entfernt und die Lysate für Immunpräzipitationen oder Western Blots eingesetzt.

#### **3.6.2 Zellfraktionierung**

Zur Untersuchung von subzellulärer Proteinlokalisierung oder zur Anreicherung von Kernproteinen wurden Zellen in zytosolische und nukleare Proteinfractionen unterteilt. Transfizierte HEK293-Zellen bzw. endogene Gewebekomponenten wurden zunächst in 500 µl Hypotonischen Puffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren für 15 min auf Eis schwellen gelassen, dann NP-40 (0,1% für HEK293, 1% für Herzzellen) dazugegeben, gevortext und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1.500 × g, 4°C wurde der Überstand als angereicherte zytosolische Proteinfraction gesammelt. Das Pellet wurde in 250 µl Hypertonischem Puffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren gelöst, für

25 min auf Eis inkubiert, NP-40 (0,1% für HEK29, 1% für Herzzellen) dazugegeben, gevortext und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei  $16.000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  wurde der Überstand mit der nuklearen Proteinfraction gesammelt.

### 3.6.3 Proteinquantifizierung

Proteinkonzentrationen wurden photometrisch bei 595 nm nach Bradford mittels BioRad Protein-Assay über eine BSA-Standardreihe von 1 bis 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bestimmt. Die Methode beruht auf der Komplexierung von Proteinen mit dem kationisch vorliegenden Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G250, wobei dieser eine stabilisierte anionische Form bildet und damit das Absorptionsmaximum von 470 auf 595 nm verschiebt. Alle Proben sind als Duplikate mittels Photometer gemessen worden.

### 3.6.4 Ko-Immunpräzipitation

Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurde mittels Ko-Immunpräzipitation von Tag-gekoppelten Proteinen in HEK293-Zellen und endogenen Proteinen aus adultem Herzgewebe durchgeführt. Als erstem wurde im *Pre-Clearing* je 1 mg Proteinlysate mit 50  $\mu\text{l}$  Protein G Sepharose Beads für 90 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einem Drehrad (10 rpm) inkubiert, um unspezifisch bindende Bestandteile zu entfernen. Die Sepharose wurde 1 min bei  $1.500 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  abgetrennt, der Überstand mit gereinigtem Proteinlysate abgenommen und ü.N. bei  $4^{\circ}$  auf dem Drehrad mit 1,5  $\mu\text{g}$  Antikörper gegen das zu präzipitierende Protein inkubiert. Am folgenden Tag wurden 50  $\mu\text{l}$  Beads je Lysat hinzugegeben und für 2 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  rotiert, um den Antikörper-Protein-Komplex zu binden. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entsorgt und die Bead-Komplexe 4x mit Lysepuffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren gewaschen. Schließlich wurden die Proteinkomplexe mit 30  $\mu\text{l}$  2x SDS-Lade-Puffer bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 min von den Sepharose Beads gelöst und nach Zentrifugation für 2 min bei  $1.500 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  abgenommen. Je 20  $\mu\text{l}$  wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot mit Antikörpern gegen das kopräzipitierte Protein analysiert. Als Kontrollen sind Immunpräzipitationen von Leervektor-transfizierten Zell-Lysaten und IgG-Isotypen mitgeführt worden.

### 3.6.5 Nachweis von ubiquitiniertem TCF4

Zur Detektion von TCF4, das mit Ubiquitin zum proteasomalen Abbau markiert wurde, ist bei der Proteinisolation dem jeweiligen Lysepuffer 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  N-Ethylmaleimid (NEM) als Inhibitor von deubiquitinierenden Enzymen zugesetzt worden. TCF4 wurde dann wie oben beschrieben immunpräzipitiert; die dafür verwendeten Lösungen enthielten ebenfalls 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  NEM. Da dieses

in 100% Ethanol gelöst war, wurde der präzipitierten Probe zum Beschweren vor der SDS-PAGE 10% Glycerin zugesetzt. Die TCF4-Ubiquitinierung wurde im Western Blot mit anti-Ubiquitin-Antikörper detektiert und eine densitometrische Auswertung unter Zuhilfenahme der Software ImageJ vorgenommen.

### 3.6.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels denaturierender Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Proteinproben im elektrischen Feld aufgetrennt. Aufgrund von SDS-Bindung der Proteine liegt eine konstant negative Ladung vor, die eine Migration im Gel ermöglicht; die Auftrennung erfolgt dann entsprechend des Molekulargewichts.

Es wurden 10-30 µg Proteinlysate im SDS-Lade-Puffer für 5 min bei 95°C denaturiert und auf ein 10 oder 15%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Von Proben aus Immunpräzipitationen wurden jeweils 15 µl eingesetzt. Anschließend wurde die Elektrophorese in SDS-Laufpuffer bei 70 V für ca. 20 min gestartet, um die Proteine im Sammelgel aufzukonzentrieren, und nach Migration in das Trenngel bei 110 V fortgeführt bis die gewünschte Auftrennung erzielt worden ist. In jedem Gel wurde ein farbiger Molekulargewichtsmarker zur Größenmarkierung mitgeführt. In Anschluss sind die Proteine mittels RAPIDstain™ auf Basis von Coomassie im Gel angefärbt oder einzelne Proteine über Western Blot immunologisch nachgewiesen worden.

### 3.6.7 Western Blot

Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden diese auf PVDF-Membranen mit 45 µm Porengröße im *Semi-Dry*-Blot-Verfahren transferiert. Hierbei werden die durch das SDS negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran übertragen, wo diese aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an der Oberfläche haften und durch Antikörper detektiert werden können.

Zur Vorbereitung wurde die PVDF-Membran für 10 s in Methanol aktiviert und Whatman-Papier, Membran und Gel für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Zum Transfer wurden Membran und Gel luftblasen-frei zwischen je vier Lagen Whatman-Papier gelegt und der Proteintransfer bei 300 V für 30 bis zu 90 min, abhängig vom Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins, durchgeführt. Anschließend wurde eine Blockierung von unspezifischen Bindestellen auf der Membran für 1 h bei RT in Blocklösung (5% Milch/TBS-T) durchgeführt. Erfolgte die Detektion der Proteine mit direkt HRP-konjugiertem Antikörper, wurde dieser in entsprechender Blocklösung für 90 min bei RT inkubiert. Bei indirektem Nachweis wurde der Primäantikörper in Blocklösung ü.N. bei 4°C dazugegeben und am folgenden Tag nach 3x Waschen für 5 min in TBS-T mit HRP-gekoppelten Sekundäantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Nach 3x TBST-T-Waschen wurde die Membran mit

ECL-Reagenz inkubiert und Protein-Antikörper-Komplexe sind mittels Chemilumineszenz auf ECL-Hyperfilm detektiert worden.

Als Ladekontrolle für Gesamtzell-Lysate wurde GAPDH detektiert, bei Zellfraktionierungen wurde  $\alpha$ -Tubulin für zytosolische und Lamin A/C für nukleare Fraktionen nachgewiesen. Alle verwendeten Antikörper und deren Verdünnung sind unter 2.10 aufgeführt.

### **3.7 Immunzytochemie**

Zur Untersuchung und Visualisierung der subzellulären (Ko-)Lokalisation von Proteinen und zur Identifikation verschiedener Zelltypen wurde die Immunfluoreszenzmarkierung angewendet.

Isolierte neonatale Rattenkardiomyozyten und kardiovaskuläre Progenitorzellen wurden auf 1% Gelatine-beschichteten und HEK293-Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Glas-Deckgläsern in 12-Well-Platten wie unter 3.2 angegeben kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und bei Markierung von Oberflächen-Epitopen zunächst mit 2% BSA/PBS 15 min bei 37°C geblockt. Anschließend wurde mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern für 30 min bei 4°C inkubiert, gefolgt von 3x Waschen mit 2% BSA/PBS. Die Zellen wurden dann mit 4% PFA für 15 min bei RT fixiert und 3x mit PBS (je 5 min) gewaschen. Für intrazelluläre Färbungen wurde dann zunächst mit 0,3% Triton X-100/0,2% BSA/PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Um Hintergrundfärbungen durch Aldehydgruppen des PFA zu reduzieren, wurden die Zellen als nächstes für 30 min mit 50 mmol/L Ammoniumchlorid inkubiert, gefolgt von 1 h Blocken in 5% BSA/0,1% Triton X-100/PBS. Die Zellen sind dann mit Primärantikörper in Färbelösung (2% BSA/0,1% Triton X-100/PBS) ü.N. bei 4°C inkubiert worden. Als nächstes wurde 3x mit PBS gewaschen (je 10 min) und Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper in Färbelösung für 1 h bei RT dazugegeben. Nach erneuten Waschschrritten wurde die Zellkerne mit 1  $\mu$ g/ml DAPI markiert. Abschließend wurden die Deckgläsern mit ProLong<sup>®</sup> Gold auf Objektträgern eingedeckt und die Zellfärbungen mit einem invertierten Olympus IX70 Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

### **3.8 Histochemie von Gewebeschnitten**

#### **3.8.1 Anfertigung von Gewebeschnitten**

Zur histologischen Untersuchung sind adulten Mäusen Herz, Leber, Niere und Lunge entnommen worden, in PBS möglichst vollständig von Blutresten gereinigt und 2 h mit 4% PFA/PBS fixiert worden. Anschließend wurden die Organe drei Tage in 70% Ethanol inkubiert, dann in aufsteigender Ethanol-Reihe (80%, 90%, 96%, 100%; je 1 h) dehydriert, 30 min in Toluol/Ethanol-Gemisch (1:1),

dann 1 h in Toluol inkubiert und ü.N. bei 65°C in Paraffin gelegt. Am nächsten Tag wurden die Organe im Paraffin ausgehärtet und anschließend 3 µm dicke transversale Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt.

Für die folgenden Färbetechniken sind die Schnitte in Xylol und absteigender Ethanol-Reihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%; je 1 min) entparaffinisiert und in dH<sub>2</sub>O rehydriert worden.

### **3.8.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zur morphologischen Übersicht wurden die Gewebeschnitte 5 min mit Hämatoxylin gefärbt, 10 min in laufendem Wasser gewaschen, 2-5 min mit 1% Eosin gefärbt und 5 min mit Wasser gewaschen. Die gefärbten Schnitte wurden mit 100% Ethanol dehydriert, in Xylol geklärt, mit Eukitt<sup>®</sup> Quick-hardening Mounting Medium eingedeckt und im Zeiss Stemi-2000 Mikroskop dokumentiert.

Hämatoxylin liegt im basischen Milieu als Hämalaun vor und färbt die basophilen Zellkerne dunkelblau an; Eosin dient als azidophile Gegenfärbung, die Proteine des Zytoplasmas rosa markiert.

### **3.8.3 Fibrose-Nachweis**

Zur visuellen Unterscheidung von Herzmuskelzellen und fibrotischen Einlagerungen wurden zwei unterschiedliche Färbemethoden angewendet:

– Weigert's Masson-Trichrom-Färbung:

Masson-Trichrom beinhaltet Hämatoxylin zur Anfärbung von Zellkernen (schwarz), Fuchsin für Zytoplasma und Muskelzellen (rot) und Anilinblau zur Markierung von Kollagen (blau). Die Paraffinschnitte wurden nach Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich) zunächst mit Accustain<sup>®</sup>-Weigert's Hämatoxylin und anschließend mit Accustain<sup>®</sup>-Trichrom gefärbt.

– Sirius Red-Färbung:

Diese Färbemethode resultiert in einer roten Färbung von Collagen auf schwach-gelben Hintergrund. Der höhere Kontrast im Vergleich zur Masson-Trichrom-Färbung ermöglicht eine bessere Quantifizierung. Zunächst wurden die Zellkerne für 8 min mit Accustain<sup>®</sup>-Weigert's Hämatoxylin angefärbt und die Schnitte dann 10 min unter laufendem Wasser gewaschen. Anschließend wurden diese 1 h in Direct Red 80/wässrige Pikrinsäure inkubiert und mit 0,5% Essigsäure gewaschen.

Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit 100% Ethanol dehydriert, in Xylol geklärt, mit Eukitt<sup>®</sup> Quick-hardening Mounting Medium eingedeckt und mit einem Keyence BIOCERO BZ-8100 Mikroskop fotografiert. Positive Sirius Red-Färbungen wurden unter Zuhilfenahme von ImageJ quantifiziert.

### 3.8.4 Zellflächen-Querschnitt-Quantifizierung

Die Quantifizierung von Zellflächen-Querschnitten, auch als *Cross Sectional Area* (CSA) bekannt, dient dem Vergleich von Zellgrößen. Diese Methode wird angewendet, um hypertrophe Veränderungen der Herzzellen zu dokumentieren.

Die Schnitte wurden 5 min in PBS gewaschen und abgedunkelt ü.N. bei 4°C mit 20 mg/ml Lektin-WGA (*Wheat Germ Agglutinin*)-FITC inkubiert. Dieses zählt zu den N-Acetylglucosamin-bindenden Lektinen, das genutzt wird, um Zellmembranen zu markieren. Am folgenden Tag wurde 3x mit PBS gewaschen und mit Eukitt® Quick-hardening Mounting Medium eingedeckt. Zufällig verteilte Bereiche wurden mit einem Olympus IX70 Fluoreszenzmikroskop fotografiert, je 150 Zellflächen gemessen und der Zellflächen-Querschnitt mittels der semi-automatischen Software AxioVision von Carl Zeiss berechnet.

### 3.8.5 Apoptose-Nachweis

Die TUNEL (*terminal desoxynucleotidyl transferase [TdT] dUTP nick end labeling*)-Methode zum Nachweis von apoptotischen Zellen bedient sich der Markierung von DNA-Enden, die bei der Apoptose durch Endonukleasen fragmentiert wird. Dabei überträgt das Enzym TdT an die 3'-OH-Gruppen dUTP, welches durch Rhodamine-markiertes anti-Digoxigenin markiert wird und mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann.

Zunächst wurden die entparaffinisierten Herzgewebe-Schnitte zur Antigen-Demaskierung für 10 min in Na-Zitrat-Puffer aufgekocht und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurde das TUNEL ApopTag® Red *in situ* Apoptosis Kit von Chemicon verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die Schnitte wurden anschließend mit 1:200 Maus anti-cTnT-Antikörper in 1% BSA/PBS ü.N. inkubiert und dieser am nächsten Tag nach zwei PBS-Waschschritten mit 1:200 anti-Maus-AlexaFluor488-Antikörper für 1 h Fluoreszenz-markiert, um die kardialen Muskelzellen anzufärben. Weiterhin wurden die Kerne durch 5 min-Inkubation mit 1 µg/ml DAPI markiert und zum Abschluss die Präparate mit ProLong® Gold eingedeckt.

Als Positivkontrolle wurden Schnitte mitgeführt, die zuvor einem 20 minütigem DNase I-Verdau (7.000 U/ml) unterzogen wurden. Zufällig verteilte Bereiche wurden mit einem Olympus IX70 Fluoreszenzmikroskop fotografiert, die TUNEL-/cTnT-positiven Zellkerne ausgezählt und jeweils in Relation zur Anzahl der DAPI-positiven Kerne gesetzt.

### 3.8.6 Endothelzell-Quantifizierung

Um auch neu gebildete Endothelzellen im Herzgewebe quantifizieren zu können, wurden diese mit hochsensitivem anti-CD31-Peroxidase-anti-Peroxidase(PAP)-Komplex markiert. Hierzu sind die

deparaffinisierten Schnitte zunächst zur Antigen-Demaskierung für 10 min in Na-Zitrat-Puffer aufgekocht und dann auf RT abgekühlt worden. Endogene Peroxidase wurde mittels 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% Methanol für 3 min blockiert. Anschließend wurden die Schnitte mit 15% Ziegenerum und 35% FCS in PBS für 1 h geblockt, gefolgt von einer ü.N.-Inkubation mit Kaninchen anti-CD31-Antikörper (1:50 in 10% FCS) bei 4°C. Nach zwei 10 min-PBS-Waschschritten wurde 1 h bei 37°C mit anti-Kaninchen-IgG (1:200 in 10% FCS) inkubiert. Nach erneutem PBS-Waschen wurde für 1 h bei 37°C anti-Kaninchen-PAP-Komplex (1:100 in 10% FCS) hinzugegeben. Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen und mit dem Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB; 0,05%) für 10 min entwickelt. Abschließend wurde 4x mit dH<sub>2</sub>O gewaschen (je 10 min) und mit ProLong<sup>®</sup> Gold eingedeckt. 25 über den gesamten Schnitt verteilte Bereiche wurden mit einem Carl Zeiss M2 Mikroskop dokumentiert die CD31-positiven Bereiche mit ImageJ quantifiziert.

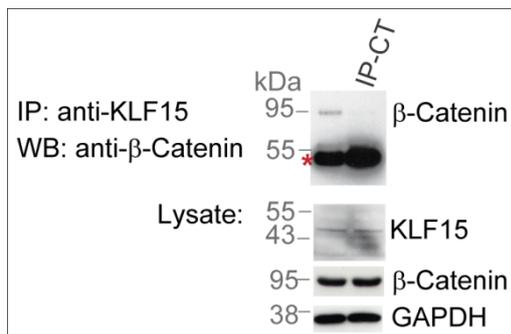
### 3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels des Programms GraphPad Prism4 berechnet. Zur Analyse von zwei Gruppen ist der 2-seitige *Student's t*-Test und bei dem Vergleich mehrerer Experimentgruppen die *1-Way ANOVA*-Analyse mit nachfolgendem *Bonferroni's Multiple Comparison Test* verwendet worden. Zur Ermittlung der Überlebenszeitanalyse von operierten Mäusen wurde sich der Kaplan-Meier-Kurve und dem *Logrank*-Test bedient. P-Werte kleiner 0,05 mit einem Konfidenzintervall von mindestens 95% wurde als statistisch signifikant angenommen. Alle Werte sind als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *Krüppel-like factor 15* (KLF15) als neuer Bindungspartner von nuklearen Regulatoren des Wnt-Signalweges in Herzzellen identifiziert

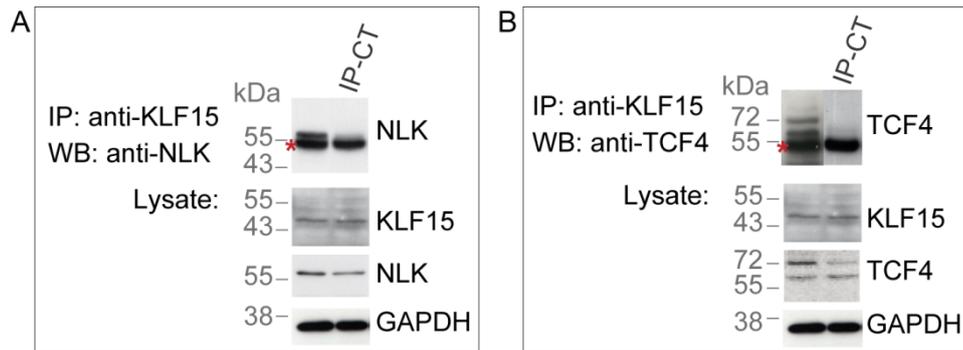
$\beta$ -Catenin ist nicht nur für die Embryonalentwicklung und Kardiogenese, sondern auch im adulten Herzen für das zelluläre Gleichgewicht ein entscheidender Faktor des Wnt-Signalweges. Da es sich bei  $\beta$ -Catenin allerdings um ein ubiquitär vorkommendes Protein mit einer dualen Funktion handelt, sollten zur potentiell therapeutischen Einflussnahme kardial-spezifische Interaktionspartner identifiziert werden. Hierzu wurde als erstes im Rahmen einer anderen Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe ein Hefe-2-Hybrid Screening mit  $\beta$ -Catenin als Köder gegen eine kardiale humane cDNA-Bibliothek durchgeführt [95]. Unter den identifizierten Bindungspartnern befand sich der Transkriptionsfaktor *Krüppel-like factor 15* (KLF15). Um die Bindung zu validieren, wurde endogenes KLF15 aus Herzgewebe von adulten Mäusen immunpräzipitiert und gebundenes  $\beta$ -Catenin über SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen (**Abb. 9**).



**Abb. 9  $\beta$ -Catenin interagiert mit KLF15 in adultem Herzgewebe.**

Endogenes KLF15 wurde immunpräzipitiert (IP) und gebundenes  $\beta$ -Catenin im Western Blot (WB) immundetektiert. IgG Antikörper-Isotyp diente als IP-Kontrolle (IP-CT); (\*) markiert die Schwere IgG-Kette des IP-Antikörpers. Die endogenen Proteine wurden in dem Lysaten mittels WB nachgewiesen; GAPDH diente als Lade-Kontrolle.

Interessanterweise wurde KLF15 auch in einem unabhängigen Hefe-2-Hybrid Screening mit *Nemo-like-kinase* (NLK) als Köder von einem Kooperationspartner (Dr. HJ Schäffer, MDC) identifiziert. Da es sich bei NLK um einen weiteren Regulator des Wnt-Signalweges handelt, der die  $\beta$ -Catenin Kofaktoren TCF/LEF phosphoryliert [96, 97], wurden sowohl NLK als auch das kardial exprimierte *T-cell factor 4* (TCF4) auf eine endogene Interaktion mit KLF15 hin untersucht. Western Blot-Analysen von immunpräzipitierten KLF15 zeigten eine klare Interaktion sowohl mit NLK als auch mit TCF4 (**Abb. 10**).



**Abb. 10 NLK und TCF4 interagieren mit KLF15 in adultem Herzgewebe.**

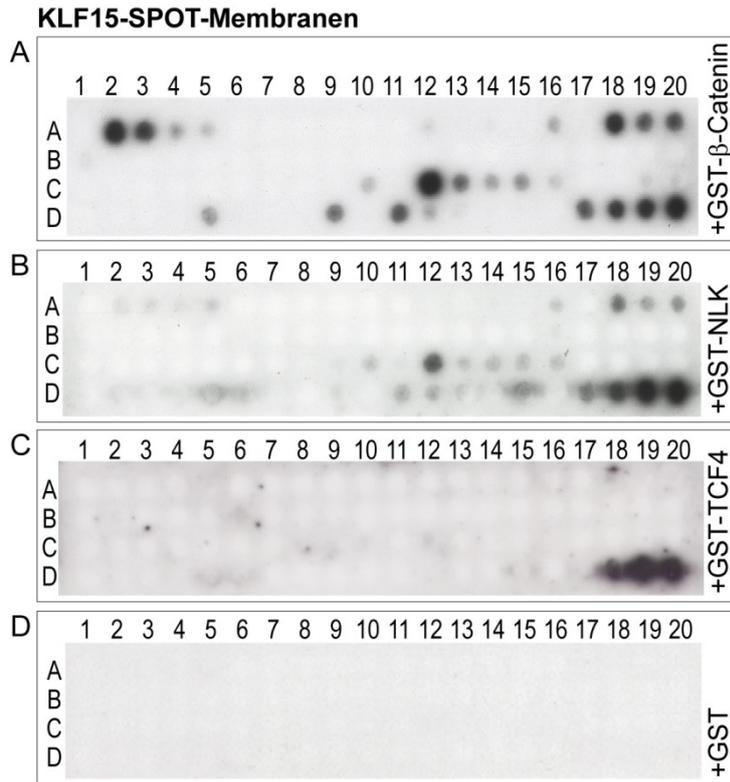
Endogenes KLF15 wurde immunpräzipitiert (IP) und ko-gebundenes (A) NLK und (B) TCF4 im Western Blot (WB) immundetektiert. TCF4 kommt in verschiedenen Isoformen vor und zeigt deshalb mehrere Banden. IgG Antikörper-Isotyp diente als IP-Kontrolle (IP-CT); (\*) markiert die schwere IgG-Kette des IP-Antikörpers. Die endogenen Proteine wurden in dem Lysaten mittels WB nachgewiesen; GAPDH diente als Lade-Kontrolle.

## 4.2 KLF15-Interaktion mit $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 erfolgt über verschiedene Proteindomänen

Um die Protein-Protein-Interaktion von KLF15 mit  $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 mittels einer weiteren Methode und bzgl. der spezifischen Bindedomänen zu untersuchen, wurde ein Peptid-SPOT-Array durchgeführt. Dafür wurden jeweils humanes KLF15,  $\beta$ -Catenin, NLK, TCF4 und als unbeteiligte Kontrolle *Immunoglobulin Transcription Factor 2* (ITF2) in Form von 25-mer Peptiden auf Zellulose-Membranen gespottet (Angelika Ehrlich, FMP). Jeder Peptid-SPOT wies einen N-terminalen 5-Aminosäure-Shift zum vorherigen auf, so dass die Peptide jeweils um 20 Aminosäuren zum vorhergehenden Peptid überlappten. Die zu testenden Interaktionspartner wurden als rekombinante humane Proteine mit N-terminalem GST-Tag wie unter Abschnitt 3.1.2 detailliert beschrieben in *E. coli* produziert und über Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt.

### 4.2.1 KLF15 interagiert über N-terminale Domänen mit $\beta$ -Catenin und NLK und über den C-Terminus mit TCF4

Die KLF15-Peptid-Membranen wurden mit jeweils rekombinantem, humanem GST- $\beta$ -Catenin, -NLK und -TCF4 inkubiert und positive Interaktionen über den gekoppelten GST-Tag immunologisch detektiert. Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen des Proteintags wurde nur rekombinantes GST inkubiert. Positive Interaktionen zwischen den verschiedenen rekombinanten Proteinen mit den KLF15-Peptiden wurden als dunkle SPOTs detektiert (Abb. 11A-C). Diese Methode legt nahe, dass die Interaktion von  $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 direkt mit KLF15 und nicht indirekt über ein Zwischenprotein erfolgt. Die GST-Kontrollinkubation belegt, dass weder der GST-Tag noch der anti-GST-Antikörper unspezifische Bindungen hervorruft (Abb. 11D).



**Abb. 11 Identifikation verschiedener Domänen von KLF15 zur Interaktion von β-Catenin, NLK und TCF4.**

KLF15-Peptid-SPOT-Membranen wurden mit rekombinatem (A) GST-β-Catenin, (B) GST-NLK, (C) GST-TCF4 und (D) GST inkubiert. Die 25-mer-Peptid-SPOTs überlappten jeweils um 20 Aminosäuren mit dem nächsten SPOT. Es konnten unterschiedliche Interaktionsmuster je nach inkubiertem Protein identifiziert werden. β-Catenin zeigt die meisten Interaktionsregionen mit KLF15, NLK fehlen die N-terminalen Binderegionen und TCF4 bindet nur eine Domäne im C-Terminus von KLF15. Rekombinantes GST diente als Kontrolle für den GST-Tag und führte zu keiner unspezifischen Interaktion. n=2/Bedingung.

Insgesamt ergab sich ein Muster von sowohl unterschiedlichen als auch identischen KLF15-Peptidbindungen nach Inkubation mit β-Catenin, NLK und TCF4. Zur besseren Übersicht wurden die Auswertung der verschiedenen positiven Interaktionsregionen inklusive der KLF15-Peptidsequenzen in **Tab. 3** zusammengefasst. Als markant hervorzuheben sind die SPOTs D17-20, die den C-Terminus und den dritten Zinkfinger des KLF15-Proteins bilden. Diese Peptide reagierten positiv bei Inkubation mit allen drei Proteinen, allerdings war es der einzige Bindungsbereich zwischen KLF15 und TCF4 (**Abb. 11C**). Einzigartig zeigten sich zudem die SPOTs A2-3, die dem N-terminalen Bereich von KLF15 abbildeten und nur mit β-Catenin interagierten (**Abb. 11A**). Für NLK zeigte sich keine spezielle Region, die nicht zumindest auch bei β-Catenin positiv auftrat.

**Tab. 3 Peptid-SPOT-identifizierte Interaktionsbereiche von  $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 mit KLF15.**

Zusammenfassung der KLF15-Peptid-SPOT-Ergebnisse nach GST- $\beta$ -Catenin-, -NLK- bzw. -TCF4-Inkubation. Angegeben sind die positiven SPOT-Nr., entsprechender Aminosäureabschnitt und -sequenz bezogen auf die Referenzsequenz NP\_054798 für hKLF15 mit gesamt 416 Aminosäuren. Alle Experimente wurden als Duplikat durchgeführt.

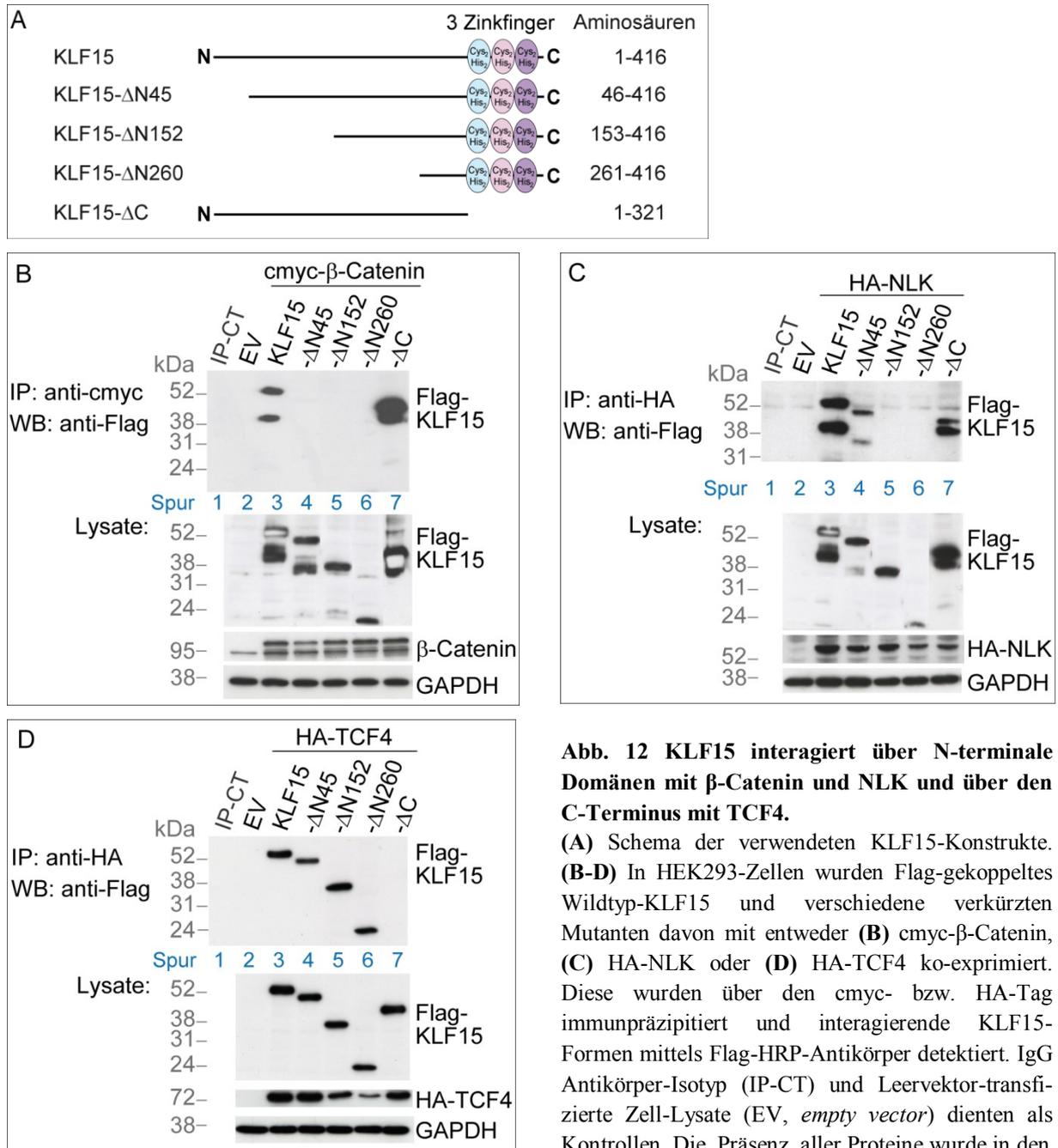
	+ $\beta$ -Catenin	+ NLK	+ TCF4		
SPOT	hKLF15-Aminosäuren			hKLF15-Peptidsequenz	Besonderheit
A2-3	6-35	-	-	LPVDENFSSPKCPVGYLGDRLVG RRAYHML	--
A18-20	86-120	86-120	-	LGSGGGSGSSIGASSGPVAWGP WRRAAAPVKGEHF	Gly-/Ser-reich
C12-15	256-300	256-280	-	QQQTFALVPQVVPSSNLNLPSKF VRIAPVPIAAKPVGSGPLGPGP	--
D9+11	341-375	-	-	HLRRHTGEKPF <del>ACT</del> WPGCGWRF SRSDELSRHRRSH	Zinkfinger 2
D17-20	381-416	381-416	386-416	YQCPVCEKKFARSDHLSKHIKV HRFPRSSRSVRSVN	Zinkfinger 3

Da einige der identifizierten Interaktionsdomänen von KLF15 für  $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 überlappten und die SPOT-Methode keine *in vivo*-Bedingungen nachstellen kann, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, welche der Domänen in der Zelle tatsächlich Relevanz aufwiesen. Dazu wurden von KLF15 unterschiedliche N- und C-terminal verkürzte Mutanten (siehe Schema in **Abb. 12A**) kloniert und für Ko-Immunpräzipitationen (KoIPs) verwendet. HEK293-Zellen wurden entweder mit *cmv*- $\beta$ -Catenin-, HA-NLK- oder HA-TCF4-kodierenden und Flag-KLF15-Wildtyp bzw. Flag-KLF15-Mutanten-Plasmiden transfiziert.  $\beta$ -Catenin, NLK bzw. TCF4 wurden über ihre Tags immunpräzipitiert und gebundenes KLF15 mittels anti-Flag-HRP-Antikörper detektiert. Als Kontrollen wurden Leervektor-transfizierte Zellen und KoIPs mit entsprechenden IgG-Antikörper-Isotypen verwendet. Alle Zell-Lysate wurden hinsichtlich der erfolgreichen Transfektion und Proteinexpression getestet.

Die KoIPs aus den HEK293-Zellen ergaben, dass  $\beta$ -Catenin nur mit dem Wildtyp- und dem C-terminal verkürztem KLF15 interagiert (**Abb. 12B**, Spur 3 und 7), aber die N-terminalen Mutanten keine Bindung mehr ermöglichten (Spur 4-6). Demnach erwies sich eine am N-Terminus gelegene minimale Domäne einschließlich der Aminosäuren 1-45 für KLF15- $\beta$ -Catenin-Bindung als notwendig, obwohl der SPOT-Assay weitere Interaktionsbereiche zeigte.

Für NLK zeigte sich ein anderer Bereich für die Interaktion zu KLF15 als relevant (**Abb. 12C**, Spur 3 und 4). Fehlende Interaktion wurde erst ab einer N-terminalen Deletion der Aminosäuren 1-152 bemerkt (Spur 5 und 6). Das Fehlen des KLF15-C-Terminus hatte keine Auswirkungen auf die Interaktion zu NLK (Spur 7), so dass mittels KoIP ebenfalls eine N-terminale Bindedomäne wahrscheinlich im Bereich der Aminosäuren 46-152 für KLF15-NLK-Interaktion gefunden wurde.

Im Gegensatz dazu und passend zu den SPOT-Ergebnissen zeigte sich für die Interaktion zu TCF4 der KLF15-C-Terminus als unerlässlich (**Abb. 12D**, Spur 7). Anders als bei  $\beta$ -Catenin und NLK waren alle N-terminalen Mutanten in der Lage, mit TCF4 zu ko-präzipitieren (Spur 3-6).



**Abb. 12 KLF15 interagiert über N-terminale Domänen mit  $\beta$ -Catenin und NLK und über den C-Terminus mit TCF4.**

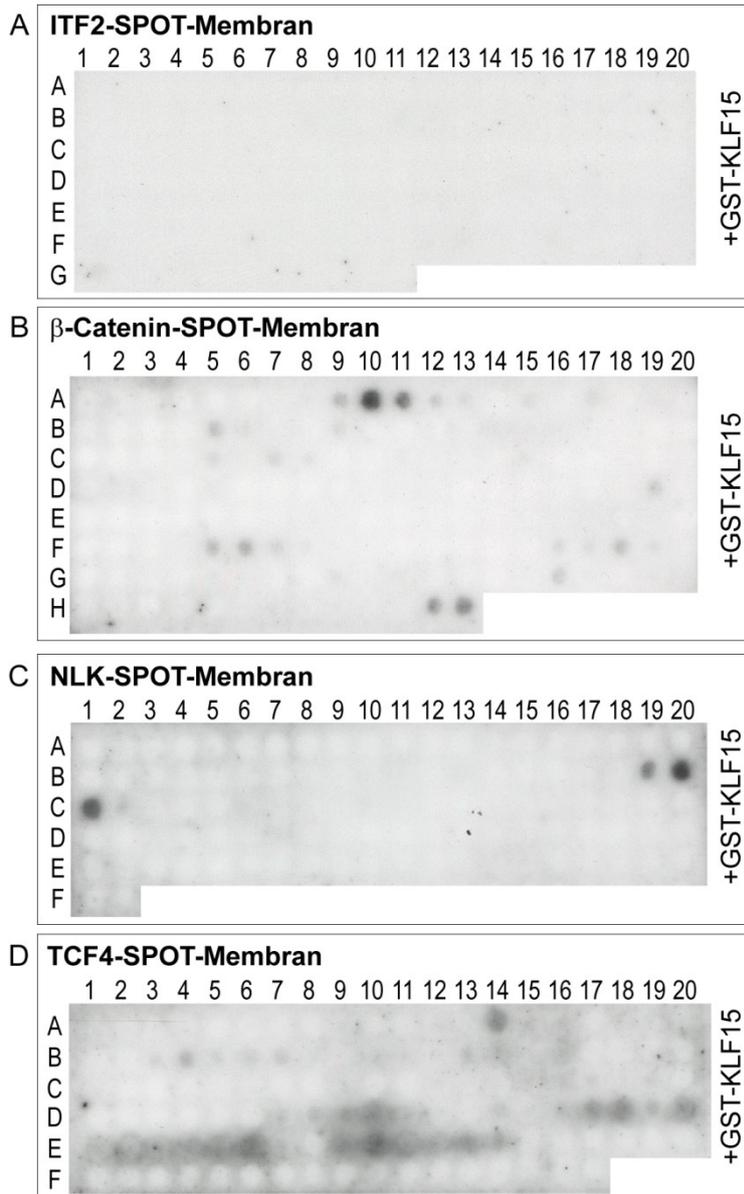
(A) Schema der verwendeten KLF15-Konstrukte. (B-D) In HEK293-Zellen wurden Flag-gekoppeltes Wildtyp-KLF15 und verschiedene verkürzten Mutanten davon mit entweder (B) cmyc- $\beta$ -Catenin, (C) HA-NLK oder (D) HA-TCF4 ko-exprimiert. Diese wurden über den cmyc- bzw. HA-Tag immunpräzipitiert und interagierende KLF15-Formen mittels Flag-HRP-Antikörper detektiert. IgG Antikörper-Isotyp (IP-CT) und Leervektor-transfizierte Zell-Lysate (EV, *empty vector*) dienten als Kontrollen. Die Präsenz aller Proteine wurde in den

Lysaten mittels WB nachgewiesen; GAPDH diente als Lade-Kontrolle. KLF15 benötigt zur Interaktion mit  $\beta$ -Catenin seinen N-Terminus inklusive der ersten 45 Aminosäuren (A), während diese für die Interaktion mit NLK verzichtbar sind (B). Mit TCF4 interagiert KLF15 über eine C-terminale Domäne (C).

Zusammenfassend aus den Peptid-SPOT- und KoIP-Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass KLF15 direkt mit  $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 interagiert und hierzu verschiedene Proteindomänen benötigt wurden. KLF15 interagiert mit  $\beta$ -Catenin über seinen N-Terminus im Bereich der Aminosäuren 6-35, NLK über eine weitere N-terminale Domäne im Bereich der Aminosäuren 86-110 und mit TCF4 über eine C-terminal lokalisierte Region, wahrscheinlich mit Zinkfinger 3 von KLF15.

#### **4.2.2 KLF15 interagiert mit der katalytischen Kinasedomäne von NLK und der DNA-Bindungsdomäne von TCF4**

Die SPOT-Methode wurde ebenfalls angewendet, um wichtige Bindedomänen von  $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 mit KLF15 einzugrenzen und näher zu untersuchen. Hierzu wurden Peptid-SPOT-Membranen von  $\beta$ -Catenin, NLK, TCF4 und als Negativkontrolle ITF2 mit rekombinantem GST-KLF15 inkubiert. Erneut wurden positive Interaktionen über den GST-Tag detektiert. Unspezifische Interaktionen über den GST-Tag konnten mittels GST-Inkubation erneut ausgeschlossen werden; es kam zu keiner Interaktion (ohne Abbildung). Zusätzlich wurde GST-KLF15 mit einem für den Wnt-Signalweg irrelevanten Protein, ITF2, in Form einer Peptidmembran auf Interaktionen getestet. Es erfolgte keine unspezifische Bindung mit KLF15 (**Abb. 13A**). Insgesamt konnte eine direkte Interaktion von KLF15 mit  $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 über die Peptid-SPOTs wie zuvor mittels KLF15-SPOT-Membranen reproduziert werden (**Abb. 13B-C**).



**Abb. 13 Identifikation von Interaktionsdomänen von  $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 mit KLF15.**

(A) Die Inkubation von rekombinantem GST-KLF15 mit gespotteten ITF2-Peptiden diente als Negativ-Kontrolle; es konnte keine unspezifische Bindung mit diesem Protein detektiert werden. (B-D) Mithilfe der 25-mer-Peptid-Membranen von humanem (B)  $\beta$ -Catenin, (C) NLK und (D) TCF4 konnten die KLF15-Interaktionsregionen dieser Proteine identifiziert werden. Eine BLAST-Analyse ergab für  $\beta$ -Catenin keine konservierten Bereiche; für NLK konnte ein Abschnitt der katalytischen Domäne der Ser/Thr-Kinase identifiziert werden; TCF4 zeigte positive Interaktion in der DNA-Binderegion. n=3/Bedingung.

Auch hier wurden die erhaltenen Ergebnisse der Übersichtlichkeit halber tabellarisch zusammengefasst, in der die Peptidsequenzen aller positiven SPOTs aufgeführt sind. Es wurden nur SPOTs berücksichtigt, die bei allen Versuchen (in Triplikaten durchgeführt) detektiert werden konnten. Dabei sind die relevanten Regionen, die durch die Überlappung der Sequenzen näher eingegrenzt werden konnten, hervorgehoben (**Tab. 4**).

Die Interaktion von KLF15 mit  $\beta$ -Catenin zeigte zwei eindeutig positive Domänen, die jeweils am N- und C-Terminus von  $\beta$ -Catenin zu lokalisieren waren. Dabei beinhaltet die N-terminale Domäne eine bekannte Acetylierungs- und Phosphorylierungsstelle (Aminosäure 49 bzw. 64). Für NLK ergab sich klar nur eine Interaktionsregion, die als Teil der katalytischen Domäne der Ser/Thr-Kinase NLK mittels BLAST-Algorithmus identifiziert wurde. Dieser stark konservierte Abschnitt beinhaltet 6 von 20 ATP-Bindestellen. Die TCF4-Peptidmembran zeigte generell etwas mehr Hintergrund, aber auch

insgesamt mehr potentielle Interaktionsstellen zur KLF15-Bindung. Es konnten 3 Bereiche eingegrenzt werden, wobei zwei davon nicht-konservierte Bereiche waren. Die Region um Aminosäure 341-375 (SPOT D9-11) wurde interessanterweise als konservierte HMG-Box und DNA-bindende Domäne von TCF4 identifiziert.

**Tab. 4 SPOT-identifizierte Interaktionsbereiche KLF15 mit  $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4**

Zusammenfassung der Peptid-SPOT-Ergebnisse nach GST-KLF15-Inkubation. Angegeben sind die positiven SPOT-Nr., entsprechender Aminosäureabschnitt und -sequenz bezogen auf die Referenzsequenzen NP\_001895 für  $\beta$ -Catenin mit gesamt 781 Aminosäuren, NP\_057315 für hNLK mit gesamt 527 Aminosäuren, NP\_001139746 für hTCF4 mit gesamt 602 Aminosäuren. In Gelb sind die besonders relevanten Sequenzen hervorgehoben; in Rot sind die Aminosäuren markiert, die unter Besonderheiten in der letzten Spalte aufgeführt sind. Alle Experimente wurden als Triplikat durchgeführt.

<b>Peptidmembran <math>\beta</math>-Catenin + GST-KLF15</b>			
SPOT	Aminosäuren	Peptidsequenz	Besonderheit
A9-11	41-75	TTAPSLSGKGNPEEEDVDTSQVLY EWEQGFQSFT	Lys49 Acetylierungs-, Tyr64 Phosphorylierungsstelle
H12-13	756-781	LGHAQDLMDGLPPGDSNQLAWF DTD	--
<b>Peptidmembran NLK + GST-KLF15</b>			
SPOT	Aminosäuren	Peptidsequenz	Besonderheit
B19-C1	191-225	FFKHDNVL S ALDILQPPHIDYFEEI YVTELMQSD	katalytische Domäne der Ser/Thr-Kinase NLK: 6 von 20 ATP-Bindestellen
<b>Peptidmembran TCF4 + GST-KLF15</b>			
SPOT	Aminosäuren	Peptidsequenz	Besonderheit
A14	66-90	RRPPRSESF RDKSRESLEEAAKR Q	--
D9-11	341-375	KEEEKKKPHIKPLNAFMLYMKE MRAKVVAESTLK	DNA-Bindedomäne: 13 von 13 Stellen der SOX-TCF HMG-Box
D17-20	381-420	NQILGRRWHALSREEQAKYYELA RKERQLHMQLYPGWSAR	
E4-6, E9-13	421-485	DNYGKKKRKRDKQPGETNDANT PKKSRA LFGLDRQTLWSKPSRRK KKS VRYIQGEGSSLSPPSS	Arg/Lys-reich, nur in Isoform 1 vorhanden

Für  $\beta$ -Catenin wurden nur Interaktionsregionen detektiert, die keine konservierten Domänen aufwiesen, so dass diese Bereiche nicht weiter untersucht wurden. Die identifizierten Regionen von NLK und TCF4 wurden in einem weiteren Schritt mittels Alanin-Substitutionen als Peptid-SPOTs untersucht, um die für die KLF15-Interaktion wichtigen Aminosäuren näher eingrenzen zu können und eventuell Rückschlüsse auf die Funktion zu finden.

Für NLK wurde die zuvor identifizierte Region um SPOT B20 analysiert (**Abb. 14**). Der erste Peptid-SPOT beinhaltete zum Vergleich exakt diese NLK-Wildtyp-Sequenz; bei den nachfolgenden SPOTs wurden sequentiell die Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht. Dabei zeigte sich, dass ein Austausch von Asn mit Ala an Position 196 (N196A) keine Bindung zwischen NLK und KLF15 mehr

ermöglichte und besonders relevant für die Interaktion war. Außerdem führte der Austausch der Aminosäuren in Position 205, 215-218 und 220 mit Ala zu einer leicht schwächeren Bindung mit KLF15.

	196	205	215
●	NVLSALDILQPPHIDYFEEIYVVTE		
●	<b>A</b> NVLSALDILQPPHIDYFEEIYVVTE		
●	NVLSALDILQPPHIDYFEEIYVVTE		
●	NV <b>A</b> LSALDILQPPHIDYFEEIYVVTE		
●	NVLSA <b>A</b> LDILQPPHIDYFEEIYVVTE		
●	NVLSA <b>A</b> DILQPPHIDYFEEIYVVTE		
●	NVLSAL <b>A</b> ILQPPHIDYFEEIYVVTE		
●	NVLSALD <b>A</b> LQPPHIDYFEEIYVVTE		
●	NVLSALDI <b>A</b> QPPHIDYFEEIYVVTE		
●	NVLSALDIL <b>A</b> PPHIDYFEEIYVVTE		
●	NVLSALDILQ <b>A</b> PHIDYFEEIYVVTE		
●	NVLSALDILQP <b>A</b> HIDYFEEIYVVTE		
●	NVLSALDILQPP <b>A</b> IDYFEEIYVVTE		
●	NVLSALDILQPPH <b>A</b> DYFEEIYVVTE		
●	NVLSALDILQPPHID <b>A</b> YFEEIYVVTE		
●	NVLSALDILQPPHID <b>A</b> FEIYVVTE		
●	NVLSALDILQPPHIDY <b>A</b> EIYVVTE		
●	NVLSALDILQPPHIDYFEE <b>A</b> IYVVTE		
●	NVLSALDILQPPHIDYFEEI <b>A</b> YVVTE		
●	NVLSALDILQPPHIDYFEEIY <b>A</b> VTE		
●	NVLSALDILQPPHIDYFEEIYV <b>A</b> TE		
●	NVLSALDILQPPHIDYFEEIYVV <b>A</b> E		
●	NVLSALDILQPPHIDYFEEIYVVTE <b>A</b>		

**Abb. 14 Einfluss von Alanin-Substitutionen auf die Interaktion von NLK mit KLF15.**

Die zuvor identifizierte NLK-Domäne zwischen Aminosäure 196 und 220 wurde hinsichtlich der Relevanz der einzelnen Aminosäuren mittels Alanin-Substitutionen im Peptid-SPOT-Format untersucht. Die erste Reihe gibt die Wildtyp-Sequenz an. Der Austausch von Asn mit Ala in Position 196 inhibierte die Interaktion zu KLF15 vollständig (rot markiert). Die Substitution in Position 205, 215 bis 218 und 220 resultierte in schwächerer Bindung zu KLF15 (A unterstrichen).

Für TCF4 wurden zuvor drei Regionen als mögliche Bindungsregionen identifiziert. Der erste Bereich um SPOT A14 wies keine konservierte Domäne auf, hatte aber einen Arg- und Pro-reichen Abschnitt, so dass dieser mit Ala-Substitutionen untersucht wurde. Allerdings konnte hier zwischen dem TCF4-Wildtyp-Peptid und KLF15 keine positive Interaktion mehr bestätigt werden (ohne Abbildung).

Der zweite Bereich um SPOT D10 konnte der DNA-Bindungsdomäne und SOX-TCF-HMG-Box von TCF4 zugeordnet werden. Die weite Region von D17 bis E13 ist im ersten Bereich ebenfalls als Teil der HMG-Box identifiziert worden, wohingegen der Rest nicht-konserviert war. Zudem wurde für die ersten Interaktionsstudien von TCF4 mit KLF15 die längste bekannte Isoform 1 von TCF4 als Peptide gespottet. Ein Großteil des detektierten nicht-konservierten Abschnitts ist nur in der Isoform 1 vorhanden, deshalb wurde dieser Bereich nicht weiter berücksichtigt. Somit wurde für den Bereich der HMG-Box SPOT D10 mittels Ala-Substitutionen untersucht (**Abb. 15**). Kein Alanin-Austausch führte zu einer totalen Inhibition der Bindung mit KLF15. Allerdings kam es zu einer starken Abschwächung der Bindung bei Ala-Substitution der Positionen 347-350, ebenso bei Aminosäure 357, 359 und 369.

	346	355	365
●	KKPHIKK	PLNA	FMLYMKEMRAKVVA
●	<u>A</u> KPHIKK	PLNA	FMLYMKEMRAKVVA
●	K <u>A</u> PHIKK	PLNA	FMLYMKEMRAKVVA
●	KK <u>A</u> HIKK	PLNA	FMLYMKEMRAKVVA
●	KKP <u>A</u> IKK	PLNA	FMLYMKEMRAKVVA
●	KKPH <u>A</u> KK	PLNA	FMLYMKEMRAKVVA
●	KKPHIK <u>A</u> K	PLNA	FMLYMKEMRAKVVA
●	KKPHIKK <u>A</u> P	PLNA	FMLYMKEMRAKVVA
●	KKPHIKK <u>A</u> L	PLNA	FMLYMKEMRAKVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> A	PLNA	FMLYMKEMRAKVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	FMLYMKEMRAKVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	F <u>A</u> MLYMKEMRAKVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	F <u>M</u> LYMKEMRAKVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	F <u>M</u> L <u>A</u> MKEMRAKVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	F <u>M</u> LY <u>A</u> KEMRAKVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	F <u>M</u> LY <u>M</u> AEMRAKVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	F <u>M</u> LY <u>M</u> K <u>A</u> MRAKVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	F <u>M</u> LY <u>M</u> K <u>E</u> <u>A</u> RAKVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	F <u>M</u> LY <u>M</u> K <u>E</u> M <u>A</u> AKVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	F <u>M</u> LY <u>M</u> K <u>E</u> M <u>R</u> <u>A</u> AVVA
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	F <u>M</u> LY <u>M</u> K <u>E</u> M <u>R</u> AK <u>V</u> <u>A</u>
●	KKPHIKK <u>P</u> L	PLNA	F <u>M</u> LY <u>M</u> K <u>E</u> M <u>R</u> AKV <u>A</u>

**Abb. 15 Einfluss von Alanin-Substitutionen auf die Interaktion von TCF4 mit KLF15.**

Die zuvor identifizierte TCF4-Domäne zwischen Aminosäure 346 und 370 wurde hinsichtlich der Relevanz der einzelnen Aminosäuren mittels Alanin-Substitutionen im Peptid-SPOT-Format untersucht. Die erste Reihe gibt die Wildtyp-Sequenz an, die als Abschnitt der DNA-bindenden Domäne zugeordnet werden konnte. Die Bindestellen der SOX-TCF HMG-Box sind durchgängig grün markiert. Der Austausch der Aminosäuren in Position 347 bis 350, 357, 359 und 369 führte zu verminderter Interaktion mit KLF15 (A unterstrichen).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass KLF15 mit einem Abschnitt der katalytischen Domäne der Ser/Thr-Kinase NLK interagiert, wobei sich Aminosäure 196 als besonders wichtig für die Bindung erwies. Die TCF4-KLF15-Interaktion wurde an der DNA-bindenden Domäne von TCF4 detektiert.

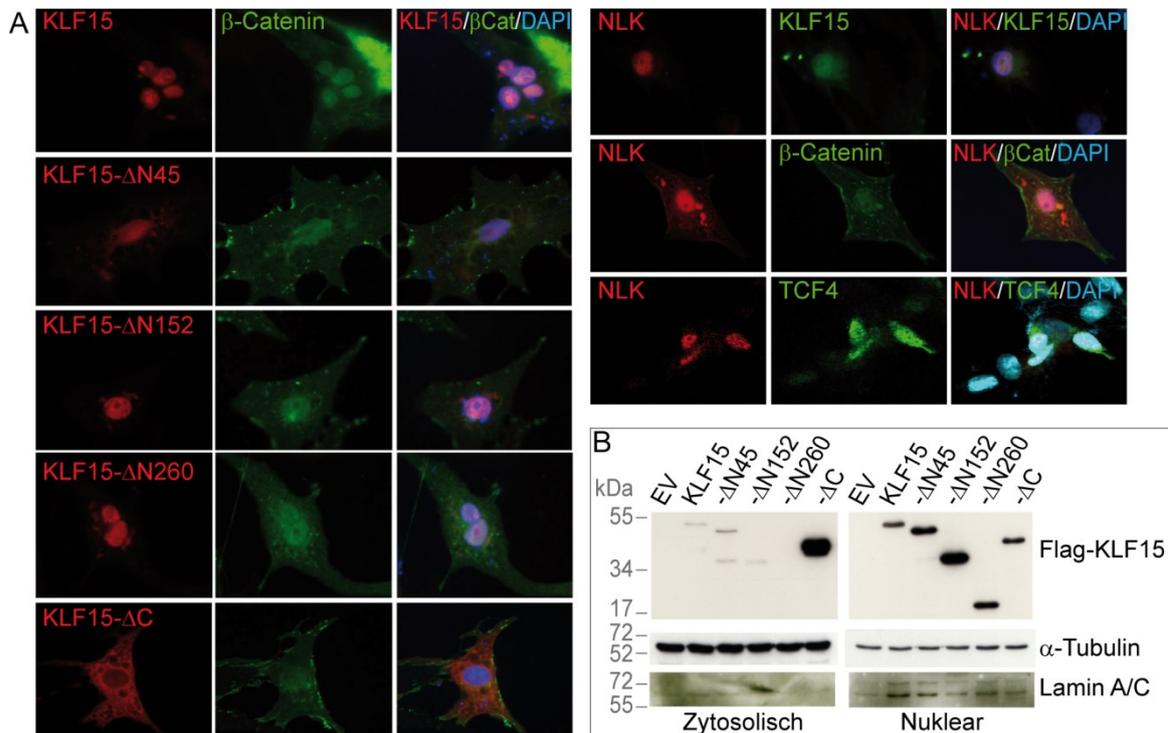
### 4.3 KLF15 ko-lokalisiert mit $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 im Zellkern

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Interaktionen von KLF15 mit  $\beta$ -Catenin und NLK wurden die endogenen Proteine in Kulturen von neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) immunologisch detektiert. KLF15 und  $\beta$ -Catenin bzw. NLK wurden gemeinsam im Zellkern lokalisiert. Zudem wurde NLK auch mit  $\beta$ -Catenin und TCF4 im Zellkern gefunden (**Abb. 16A**).

Um die verschiedenen KLF15-Domänen auf eventuelle funktionelle Relevanz zur subzellulären Lokalisation zuzuordnen, wurden NRCM mit Plasmiden kodierend für die Flag-KLF15-Mutanten transfiziert und diese anhand des Flag-Tags über Immunfluoreszenz detektiert. Die führte zu einer Kern-Lokalisation vom Wildtyp-KLF15 und allen N-terminalen Mutanten. Nur die verkürzte Form ohne C-Terminus war ausschließlich im Zytosol detektierbar (**Abb. 16A**).

Zusätzlich wurden HEK293-Zellen mit den KLF15-Plasmiden transfiziert und fraktionierte Proteinlysate gewonnen. Mittels Detektion über den Flag-Tag im Western Blot wurde die Lokalisation dem Zytosol bzw. dem Kern zugeordnet. Die erfolgreiche zytosolische und nukleare Anreicherung wurde mittels  $\alpha$ -Tubulin bzw. Lamin A/C überprüft. Auch hier zeigte sich, dass die KLF15- $\Delta$ C-Mutante nicht in den Zellkern translokalisiert wird und deshalb in der zytosolisch angereicherten

Fraktion zu finden war (**Abb. 16B**). Somit konnte der C-Terminus von KLF15 als unerlässlich für die Kernlokalisation identifiziert werden.



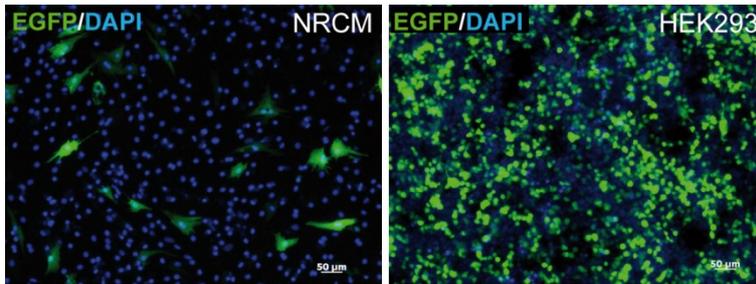
**Abb. 16 KLF15 benötigt den C-Terminus zur Kernlokalisation.**

(A) Ko-Lokalisationsstudien zeigten KLF15 mit  $\beta$ -Catenin und NLK im Zellkern von NRCM, ebenso wie die Ko-Lokalisation von NLK mit  $\beta$ -Catenin und TCF4 im Zellkern. Untersuchungen mit den KLF15-Mutanten ergaben eine eindeutige Relevanz des C-Terminus für die Translokation in den Zellkern; ein Fehlen der C-terminalen Region resultierte in zytosolischer Lokalisation von KLF15. DAPI wurde zur Kernvisualisierung verwendet. (B) Dies konnte durch Western Blot-Analysen von zytosolisch und nuklear angereicherten Proteinfraktionen belegt werden. KLF15 wurde über den Flag-Tag detektiert,  $\alpha$ -Tubulin diente als zytosolische und Lamin A/C als nukleare Lade-Kontrolle.

#### 4.4 KLF15 fungiert als Inhibitor der $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkription

Nachdem festgestellt wurde, dass KLF15 unterschiedliche Bindedomänen zur Interaktion mit  $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 besitzt und eine Ko-Lokalisation im Zellkern mit diesen Faktoren vorliegt, stellte sich die Frage nach dem Effekt von KLF15 auf die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade. Zur Untersuchung wurden Luziferase-Reportergen-Assays mittels pTOP/FOPflash-Systemen angewendet. Dieses beruht auf der Promoteraktivierung und nachfolgende Transkription der Luziferase durch Bindung von  $\beta$ -Catenin und seinen Kofaktoren TCF/LEF an die drei TCF-Bindestellen des Promotors. pFOPflash diente mit seinen mutierten TCF-Bindestellen als Negativkontrolle. Neben dem jeweiligen Reportergen-Plasmiden wurde KLF15 in unterschiedlichen Konzentrationen (in 1:10-Verdünnungsschritten) ko-exprimiert, das Plasmid pRL-CMV kodierend für die Quallen-Luziferase zum Normalisieren ko-transfiziert und die Luziferase-Aktivität nach 48 Stunden ermittelt. Um den

Effekt in kardialen Zellen zu ermitteln, wurden Primärkulturen von NRCM verwendet. Da diese jedoch eine nur minimale Transfektionseffizienz aufweisen, wurde das Experiment parallel in HEK293-Zellen durchgeführt. **Abb. 17** belegt mittels Transfektion eines EGFP-exprimierenden Plasmids trotz CMV-Promoter die geringe Transfektionseffizienz der NRCM gegenüber den HEK293-Zellen, so dass auch nur ein schwacher Effekt des Reportersystems zu erwarten war.

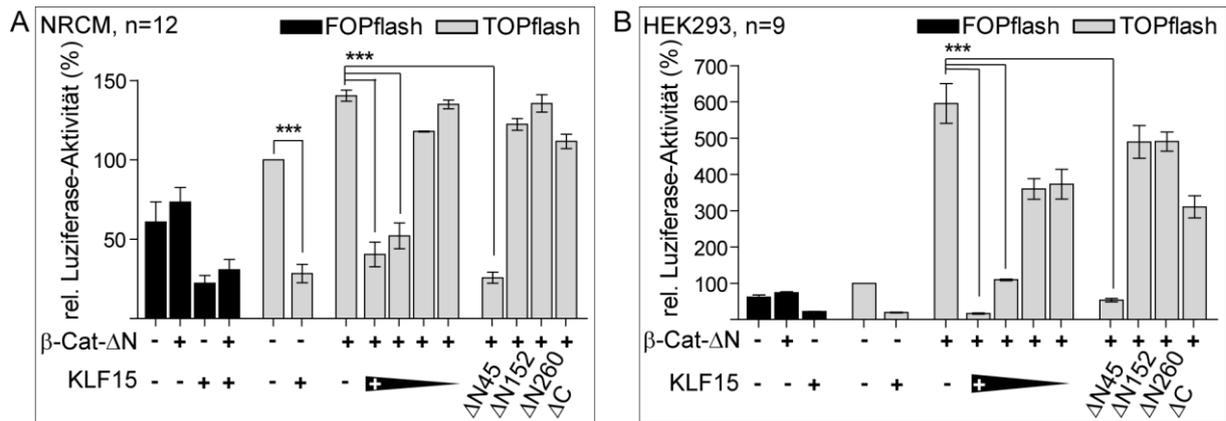


**Abb. 17 Minimale Transfektionseffizienz von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (NRCM).**

Die GFP-Expression 48 h nach Transfektion von einem CMV-EGFP-kodierenden Plasmid zeigt die geringe Transfektionseffizienz von NRCM in Gegensatz zu HEK293-Zellen. Maßstab 50 µm.

Zur Aktivierung des Promotors und als Positivkontrolle wurde eine Abbau-geblockte Form von  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Cat- $\Delta$ N) in den NRCM und HEK293-Zellen ko-exprimiert, die in einer 1,5- bzw. 6-fachen Hochregulation der Luziferase-Aktivität gegenüber der Aktivierung durch Zell-endogenes  $\beta$ -Catenin resultierte. Eine gleichzeitige Expression von KLF15 führte zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Inhibition der Promoteraktivierung ( $p < 0.001$ ), so dass KLF15 als Repressor der  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkription identifiziert wurde (**Abb. 18A-B**). Um unspezifische Wechselwirkungen mit dem Reporter auszuschliessen, sind Versuche mit KLF15 in einem Ras/MAPK-abhängigen Luziferase-Reportergen-System durchgeführt worden. Diese zeigten keinen Effekt auf die Transkription (ohne Abbildung).

Um die verschiedenen Domänen von KLF15 in Bezug auf die Relevanz für den Inhibitionseffekt zu testen, wurde das System zusätzlich mit den verkürzten KLF15-Mutanten ko-exprimiert. Sowohl in den NRCM als auch in den HEK293-Zellen zeigte die KLF15- $\Delta$ N45-Mutante denselben signifikanten inhibitorischen Effekt auf die  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängige Transkription wie das Wildtyp-KLF15 ( $p < 0.001$ ). Bei allen anderen KLF15-Mutanten war dieser Effekt aufgehoben, so dass sowohl der C-Terminus als auch eine N-terminale Domäne jenseits der ersten 45 Aminosäuren als relevant für die Inhibition identifiziert wurden (**Abb. 18A-B**).



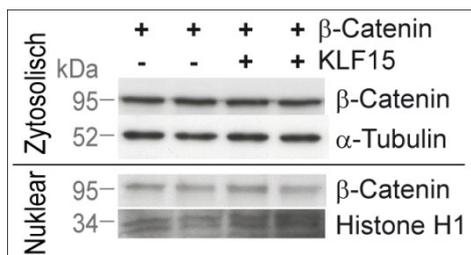
**Abb. 18 KLF15 inhibiert  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängige Transkription.**

Mittels pTOPflash-System, welches durch  $\beta$ -Catenin/TCF-Bindung zur Promotoraktivierung und Expression des Luziferase-Reporters führt, wurde in (A) NRCM und (B) HEK2293-Zellen der Effekt von KLF15 auf die  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelte Transkription untersucht. Die Ko-Expression von stabilisiertem  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Cat- $\Delta$ N) aktivierte das System zusätzlich zu endogen vorhandenem  $\beta$ -Catenin um das 1,5- bzw. 6-fache; KLF15 inhibierte diese Aktivierung konzentrationsabhängig. Zudem konnte über Analyse der KLF15-Mutanten gezeigt werden, dass für die Repressions sowohl ein N-terminaler Bereich zwischen Aminosäuren 46 und 152, als auch der C-Terminus notwendig sind. pFOPflash diente als Negativkontrolle und *Renilla*-Luziferase-Expression zum Normalisieren. NRCM: n=12/Gruppe, HEK293: n=9/Gruppe; ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test, \*\*\*p<0,001.

Dasselbe Experiment wurde zur Bestätigung auch mit SW480-Zellen durchgeführt, für die eine Stabilisierung und verstärkte Konzentrierung von  $\beta$ -Catenin im Zellkern charakteristisch ist. Zur zusätzlichen Aktivierung wurde TCF4 ko-exprimiert. Auch hier konnte dasselbe Ergebnis wie mit den HEK293-Zellen und den NRCM erzielt werden (ohne Abbildung).

#### 4.4.1 KLF15 beeinflusst den proteasomalen Abbau von TCF4

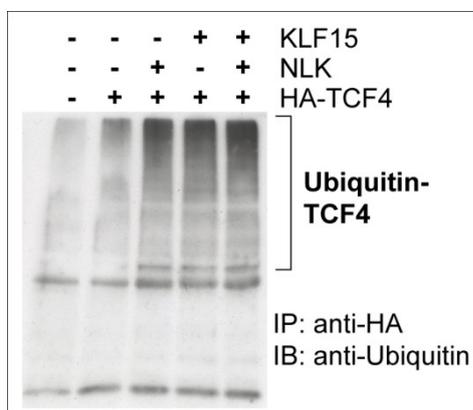
Um als nächstes zu testen, ob KLF15 die inhibitorische Wirkung durch Einflussnahme auf  $\beta$ -Catenin erzielt, wurden zytosolische und nukleare Proteinfractionen mit und ohne KLF15-Überexpression untersucht. **Abb. 19** dokumentiert, dass die  $\beta$ -Catenin-Mengen sowohl im Zytosol als auch im Kern von KLF15 unverändert blieben, so dass weder die Kern-Translokation noch der Gesamtgehalt von  $\beta$ -Catenin beeinflusst wurden.



**Abb. 19 KLF15 hat keinen Effekt auf  $\beta$ -Catenin-Level oder -Translokation.**

Western Blot-Analysen von zytosolisch und nuklear angereicherten Proteinfractionen zeigt, dass KLF15 keinen Effekt auf  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel oder dessen Lokalisation ausübt.  $\alpha$ -Tubulin diente als zytosolische und Histone H1 als nukleare Lade-Kontrolle.

Da KLF15 ebenfalls mit konservierten Domänen von NLK und TCF4 interagiert und für NLK ein Hinweis zur Regulation der TCF4-Ubiquitinierung vorlag [96, 97], wurde der Einfluss von KLF15 auf diese untersucht. Dazu wurden verschiedene Transfektionsansätze in HEK293-Zellen durchgeführt: TCF4 allein, TCF4 mit NLK, TCF4 mit KLF15, und TCF4 mit NLK und KLF15 zugleich; Leervektor-transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden mit NEM, einem Inhibitor von Deubiquitinasen, behandelt und TCF4-Immunpräzipitate im Western Blot auf Ubiquitinierung untersucht. TCF4 allein zeigte lediglich eine minimale Ubiquitinierung, wohingegen eine Ko-Expression von NLK bzw. KLF15 zu einer deutlichen Steigerung der Ubiquitin-Bindung erzielte. Die Ko-Expression von NLK und KLF15 führte zu einer zusätzlichen Steigerung der TCF4-Ubiquitinierung (**Abb. 20**).



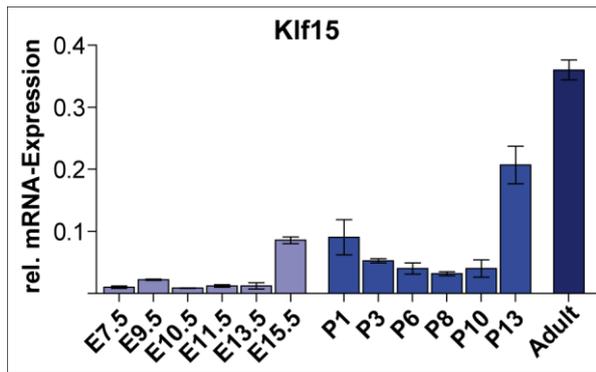
**Abb. 20 KLF15 beeinflusst den proteasomalen Abbau von TCF4.**

Überexprimiertes TCF4 wurde aus NEM-behandelten HEK293-Zell-Lysaten immunpräzipitiert und im Western Blot auf Ubiquitinierung untersucht. Die Ko-Expression von NLK und KLF15 mit TCF4 zeigt eine deutliche Steigerung der TCF4-Ubiquitinierung.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass KLF15 eine inhibitorische Wirkung auf die  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängige Transkription ausübt und dazu sowohl den C-Terminus als auch eine N-terminal gelegene Domäne benötigt. KLF15 beeinflusst zusammen mit NLK den proteasomalen Abbau von TCF4.

#### 4.5 KLF15 ist vermehrt in adultem Herzgewebe exprimiert

Um den identifizierten Interaktionspartner KLF15 auch auf kardiale Relevanz in einem *in vivo* System zu untersuchen, wurde zunächst das Klf15-mRNA-Expressionslevel in Embryonen (E7.5) bzw. Herzen (E9.5 bis adult) von verschiedenen embryonalen, postnatalen und adulten Altersgruppen von Wildtyp-C57BL/6-Mäusen ermittelt. Die qrt-PCR-Analyse ergab eine minimale Expression in den embryonalen Stadien E7.5 bis E13.5, wohingegen ab E15.5 ein leichter Anstieg in der Expression im Herzen und ein starker Anstieg 13 Tage postnatal zu verzeichnen war. Die höchste Klf15-Expression lag im Herz ausgewachsener Mäuse vor (**Abb. 21**), welches auf eine wesentliche Funktion vor allem im adulten Organ hinweist.

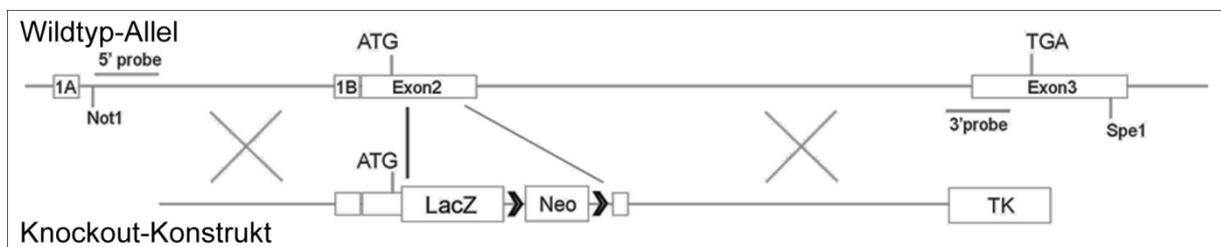


**Abb. 21 Klf15 liegt vermehrt in adultem Herzgewebe vor.**

Qrt-PCR-Analysen von mRNA aus Herzgewebe unterschiedlicher muriner Entwicklungsstadien zeigt eine minimale Klf15-Expression in embryonalen und postnatalen Mausherzen. Eine Hochregulation ist ab 13 Tage nach der Geburt zu verzeichnen und am höchsten in adulten Herzen. Normalisiert gegen  $\beta$ -Aktin; n=5/Altersgruppe.

#### 4.6 Untersuchung eines konventionellen, systemischen *Klf15*-Knockout-Mausmodells

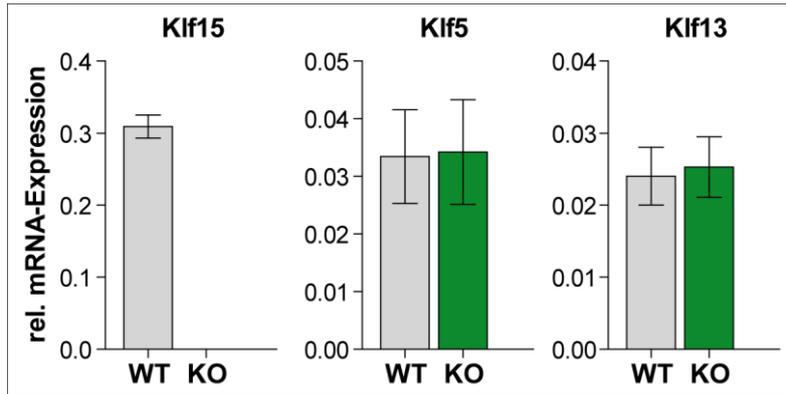
Um die *in vitro* identifizierten Protein-Protein-Wechselwirkungen und den Einfluss von KLF15 auf die Wnt-Signalkaskade auch in einem *in vivo* System zu untersuchen, wurde ein von Dr. Schäffer (MDC) zur Verfügung gestelltes konventionelles, systemisches Klf15-Knockout-Mausmodell (*Klf15*-KO) untersucht. In diesem wurde der Klf15-Genabschnitt für Exon 2 gegen eine nicht-funktionelle LacZ-NeoR-Kassette über homologe Rekombination ausgetauscht (entspricht 86% der kodierenden Sequenz von Klf15; **Abb. 22**). Die Maus besitzt einen genetischen C57BL/6-Hintergrund, Wildtyp-Mäuse (WT) entsprechen dem C57BL/6-Genotyp.



**Abb. 22 *Klf15*-Knockout-Maus-Konstrukt**

Das Schema demonstriert das von Dr. Schäffer konstruierte und zur Verfügung gestellte konventionelle, systemische *Klf15*-KO-Mausmodell. Das kodierende Exon 2 wurde 3 bp nach dem Start-Kodon durch eine nicht-funktionelle LacZ-NeoR-Kassette ersetzt. Es wird kein funktionelles KLF15 mehr gebildet.

Zum Nachweis des homozygoten *Klf15*-Knockouts wurde neben der Genotypisierung aus Schwanzspitzenbiopsien zusätzlich eine qrt-PCR für Klf15 aus Herzgewebe durchgeführt. Um zusätzlich zu überprüfen, ob andere im Herzen ebenfalls exprimierte Mitglieder der KLF-Transkriptionsfamilie durch den Knockout beeinflusst und eventuell kompensierend reguliert werden, wurde das Herzgewebe hinsichtlich Klf5- und Klf13-mRNA-Level analysiert. Die Expression wurde sowohl gegen  $\beta$ -Aktin als auch Gapdh normalisiert. **Abb. 23** zeigt eindeutig das Fehlen der Klf15-Expression in den KO-Mäusen und keine Beeinflussung von Klf5 und Klf13 in kardialen Zellen.

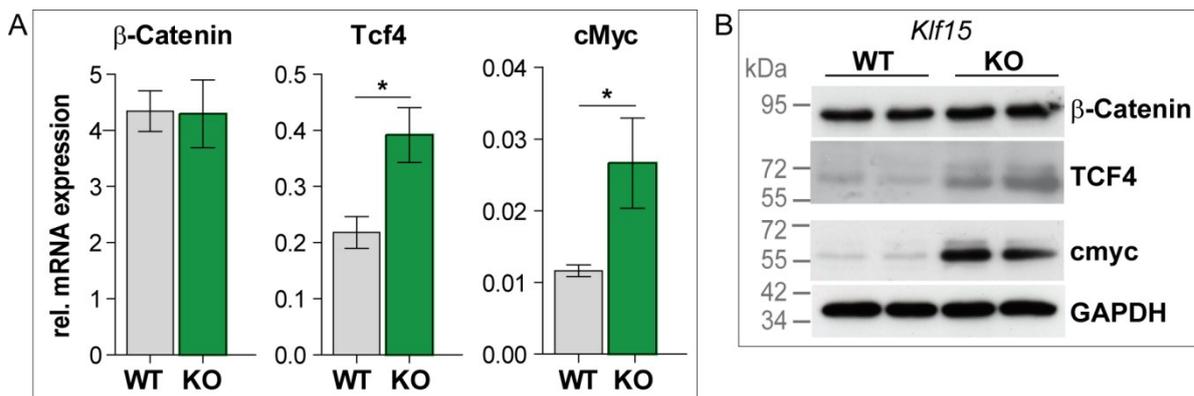


**Abb. 23 Keine Kompensation durch Klf5 und Klf13 in *Klf15*-KO-Herzen.**

Qrt-PCR-Analysen von adultem Herzgewebe aus *Klf15*-KO- und WT-Mäusen belegen, dass kein Klf15 exprimiert wird. Es erfolgt keine Regulation der anderen kardial exprimierten Faktoren Klf5 und Klf13. Normalisiert gegen  $\beta$ -Aktin und Gapdh; n=10/Gruppe, Student's *t*-Test.

#### 4.6.1 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist im Herzgewebe von systemischen *Klf15*-KO-Mäusen aktiviert

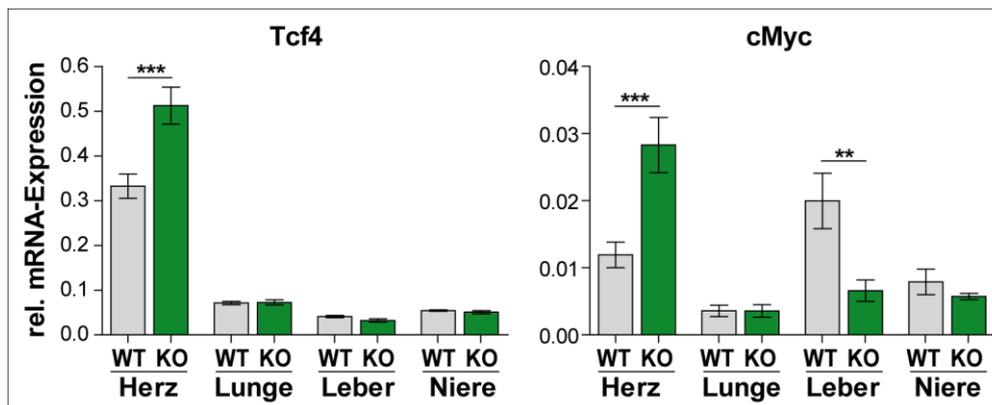
Um zunächst zu überprüfen, ob der in Zellkultur nachgewiesene inhibitorische Effekt von KLF15 auf den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg im lebenden Organismus reproduzierbar wäre, wurde Herzgewebe adulter Mäuse hinsichtlich mRNA- und Proteinexpression von Wnt-Signal-Komponenten untersucht. Wie bereits *in vitro* beobachtet, blieben die  $\beta$ -Catenin-Expressionslevel unbeeinflusst. Dessen transkriptionellen Zielgene Tcf4 und cMyc ergaben allerdings eine signifikante, zweifache Hochregulation im Vergleich zum Wildtyp ( $p < 0,05$ ; **Abb. 24A-B**). Da es sich bei den *in vitro*-Experimenten um eine Überexpression von KLF15 handelte, hier aber ein Knockout vorlag, erklärt sich der gegensätzlich beobachtete aktivierende Effekt auf den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.



**Abb. 24 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist in *Klf15*-KO-Herzen aktiviert.**

Analysen von Herzgewebe aus adulten *Klf15*-KO- und WT-Mäusen demonstrieren unveränderte  $\beta$ -Catenin-Expressionslevel, aber eine Hochregulation der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zielgene Tcf4 und cMyc auf (A) mRNA- und (B) Proteinebene. A: Normalisiert gegen  $\beta$ -Aktin und Gapdh, n=10/Gruppe, Student's *t*-Test, \* $p < 0,05$ ; B: Gapdh diente als Lade-Kontrolle.

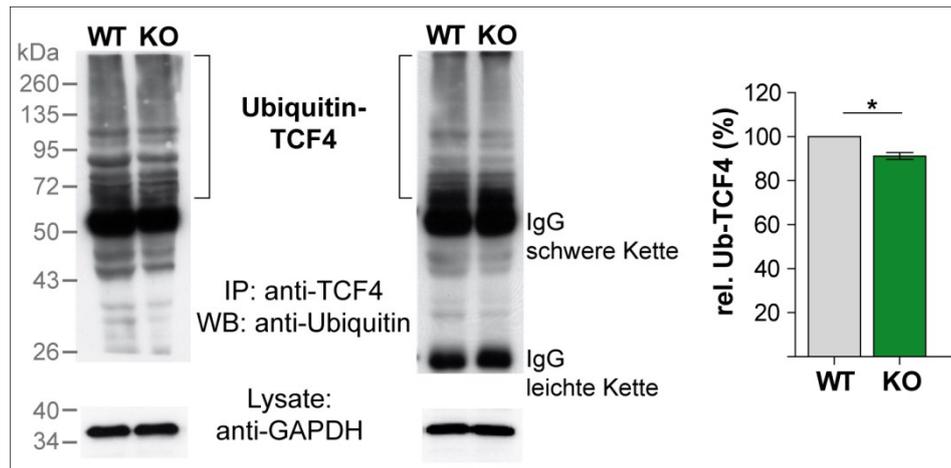
Um zu untersuchen, ob sich die Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade auf das Herz beschränkt oder weitere Organe vom systemischen Knockout betroffen sind, wurden zusätzlich Leber, Niere und Lunge mittels qrt-PCR analysiert. Interessanterweise zeigte sich die signifikante Aktivierung der Zielgene Tcf4 und cMyc im *Klf15*-KO als Herz-spezifischer Effekt ( $p < 0.001$ ). Da Tcf4 in der Leber eindeutig nicht reguliert war, aber cMyc eine geringere Expression zeigte, erscheint noch eine weitere Organ-spezifische Regulation aufgrund des *Klf15*-KO möglich zu sein (**Abb. 25**).



**Abb. 25** Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist in *Klf15*-KO-Mäusen Herz-spezifisch aktiviert.

Qrt-PCR-Analysen von mRNA aus Herz, Lunge, Leber und Niere von *Klf15*-KO- und WT-Mäusen zeigen eine Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zielgene Tcf4 und cMyc nur in Herzgewebe. Zusätzlich konnte eine cMyc-spezifische Runterregulation nur in Lebergewebe beobachtet werden. Normalisiert gegen  $\beta$ -Aktin;  $n=6$ /Gruppe, ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test,  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ .

Im *in vitro* KLF15-Überexpressionsversuch konnte ein Zusammenhang von KLF15 mit vermehrter TCF4-Ubiquitinierung beobachtet werden. Da im *Klf15*-KO eine verstärkte Transkriptionsaktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges nachgewiesen werden konnte, wurde auch die endogene TCF4-Ubiquitinierung in kardialen Gewebe untersucht. Bei der Zell-Lyse wurde NEM als Inhibitor von de-ubiquitinierenden Enzymen hinzugesetzt, endogenes TCF4 immunpräzipitiert und dann ubiquitiniertes TCF4 mittels anti-Ubiquitin-Antikörper im Western Blot detektiert. Die densitometrische Analyse ergab im Mittel einen signifikant geringeren Anteil (-8,8%) an Ubiquitin-TCF4 in Herzen mit *Klf15*-Knockdown ( $p < 0,05$ ; **Abb. 26**).



**Abb. 26 *Klf15*-KO-Herzen weisen eine verminderte TCF4-Ubiquitinierung auf.**

Endogenes TCF4 wurde aus adulten, NEM-behandelten Herzgewebe-Lysaten von *Klf15*-KO- und WT-Mäusen immunpräzipitiert und im Western Blot hinsichtlich Ubiquitinierung untersucht. Eine densitometrische Analyse und Normalisierung zur IgG Schwere Kette resultierte in signifikant verminderter TCF4-Ubiquitinierung in *Klf15*-KO- im Vergleich zu den WT-Herzen. GAPDH-Detektion in den Proteinlysaten demonstriert die korrekte Proteinkonzentrationsbestimmung. n=6/Gruppe, Student's *t*-Test, \**p*<0,05.

Zusammenfassend ließ sich in den *Klf15*-KO- im Vergleich zu WT-Herzen eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges nachweisen, die mit einem verminderten proteasomalen Abbau von TCF4 einherging.

#### 4.6.2 Adulte *Klf15*-KO-Mäuse weisen eine verminderte kardiale Funktion auf

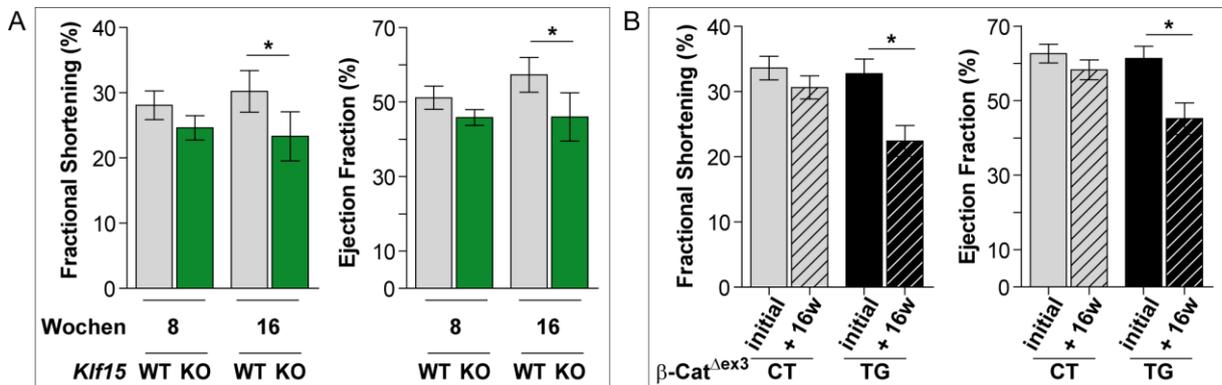
Eine phänotypische Untersuchung der homozygoten *Klf15*-KO-Mäuse ergab keine Unterschiede bezüglich Wachstum, Körperbau, Größe, Gewicht und Verhalten im Vergleich zu den entsprechenden WT-Mäusen. Sie waren gleichermaßen lebensfähig, fertil und zeigten auch im Alter kein Tumorwachstum. Histologische Untersuchungen von Leber, Niere und Lunge ergaben keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine stete Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade in adulten Kardiomyozyten zu einem verschlechterten Verlauf bei experimentell-induziertem kardialen Stress führt [80]. Da eine Aktivierung der  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkription in Herzen von *Klf15*-KO detektiert wurde, sind die Mäuse bezüglich ihrer kardialen Funktion überprüft worden. Dazu wurden *Klf15*-KO- und WT-Mäuse seriell im Alter von 8 und 16 Wochen einer Echokardiographie unterzogen. Eine detaillierte Analyse der Herzwanddicken und dem Durchmesser des linken Ventrikels während der Systole und der Diastole, sowie dem Gewicht des Herzens, normalisiert zum Körpergewicht und der Tibialänge, ergaben keine Unterschiede (Tab. A1 im Anhang III). Allerdings war bei den *Klf15*-KO-Mäusen im Alter von 16 Wochen eine signifikante Reduktion sowohl in der Verkürzungsfraktion (*Fractional Shortening*, FS: WT  $30,2 \pm 3,2$  vs. KO  $23,3 \pm 3,8\%$ ) als auch des Auswurfvolumens (*Ejection Fraction*, EF: WT  $57,3 \pm 4,6$  vs. KO  $46,0 \pm 6,5\%$ ) als Maß

der Kontraktilität und somit der systolischen Herzfunktion zu verzeichnen (**Abb. 27A**). Im Alter von 8 Wochen war bei den Mäusen noch kein Unterschied messbar, so dass mit dieser negativen Progression das klinische Bild der kardialen Seneszenz in den *Klf15*-KO-Mäusen assoziiert werden kann.

Zum Vergleich wurden Langzeit-Experimente an Mäusen mit kardial-spezifischer  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung ohne externen kardialen Stress-Auslöser durchgeführt. Hierzu wurde die  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung in den Herzen induziert ( $\alpha$ MHC-CrePR1/ $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex3</sup>) und der Phänotyp 16 Wochen lang verfolgt. Serielle echokardiographische Analysen ergaben bei den transgenen  $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex3</sup>- (TG) im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen (CT) keine Veränderung der Wanddicken im Interventrikulären Septum (IVS), der Hinterwand (LVHW) und des Innendurchmessers des linken Ventrikels (LVID) (Tab. A2 im Anhang III). Jedoch zeigte sich eine signifikante Verschlechterung der systolischen Herzleistung, gemessen anhand der Verkürzungsfraktion des linken Ventrikels (FS: CT  $32,8 \pm 2,2$  vs. TG  $22,4 \pm 2,4\%$ ) und dem Auswurfvolumen (EF: CT  $61,3 \pm 3,3$  vs. TG  $45,2 \pm 4,2\%$ ) in den TG-Mäusen (**Abb. 27B**). Demnach entwickelten sowohl die  $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex3</sup>-TG-Mäuse als auch die *Klf15*-KO-Mäuse unter basalen Bedingungen eine verschlechterte Pumpfunktion, so dass ein Zusammenhang des kardialen Phänotyps mit der Wnt-Aktivierung zu bestehen scheint.

Alle Messungen wurden verblindet von einem speziell geschulten Mitarbeiter durchgeführt.



**Abb. 27** Adulte *Klf15*-KO-Mäusen weisen eine verminderte kardiale Funktion auf.

(A) Serielle echokardiographische Analysen von adulten systemischen *Klf15*-KO- und WT-Mäusen zeigten bei 16-Wochen alten *Klf15*-KO-Mäusen eine signifikant verminderte systolische Herzfunktion; im Alter von 8 Wochen war noch kein Unterschied zu verzeichnen gewesen. (B) Gleiche Ergebnisse wurden bei transgenen Mäusen mit kardial stabilisiertem  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex3</sup>) 16 Wochen nach Induktion der Transgenität erhalten. Sie wiesen eine signifikant verminderte systolische Herzfunktion im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen auf. Die Herzfunktion wurde anhand der Verkürzungsfraktion (*Fractional Shortening*) und des Auswurfvolumens (*Ejection Fraction*) des linken Ventrikels bestimmt. A: n=10/Gruppe, B: n=7/Gruppe; Student's *t*-Test, \*p<0,05.

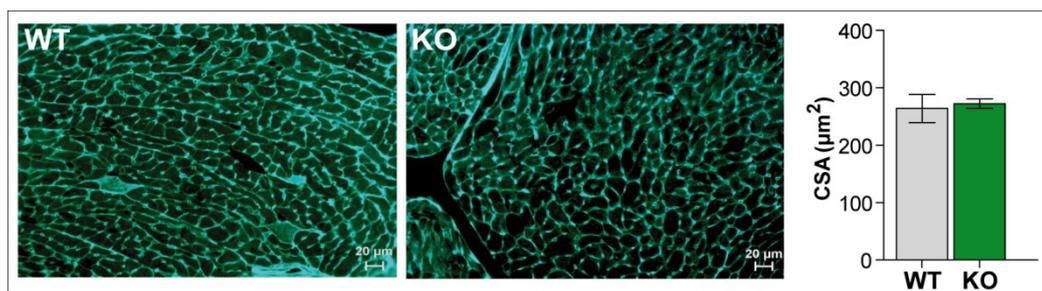
#### 4.6.3 Keine Anzeichen von Kardiomyozyten-Hypertrophie, -Atrophie, -Apoptose und Fibrose in *Klf15*-KO-Herzen

Um die Ursache der vorliegenden verminderten Herzfunktion von *Klf15*-KO-Mäusen zu untersuchen, wurden von 16-Wochen alten *Klf15*-KO- und WT-Mäusen die Herzen entnommen, ein Teil der

Herzspitze zur mRNA-Isolation eingesetzt und das restliche Organ zur Anfertigung von transversalen Paraffin-Gewebeschnitten verwendet. Funktionelle Veränderungen gehen in der Regel mit einer Remodellierung des Herzmuskels und somit veränderter Struktur des Gewebes einher, die sich auf Zellebene nachweisen lässt.

#### 4.6.3.1 Untersuchungen auf Hypertrophie oder Atrophie der Kardiomyozyten

Um eventuelle hypertrophe Veränderungen der Herzzellen als Zeichen eines Kompensationsmechanismus oder atrophe Veränderungen als Anzeichen von Muskelrückbildung zu detektieren, wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Größe quantifiziert. Dazu sind die Zellmembranen in Herzschnitten mit Lektin-WGA-FITC markiert und 150 zufällig ausgewählte Zellen bezüglich der Zellfläche mittels AxioVison Software vermessen worden. Die erhaltenen Zellflächen-Querschnitte (*Cross Sectional Area*, CSA) zeigten keine Unterschiede zwischen den *Klf15*-KO- und WT-Herzen (**Abb. 28**). Es konnten weder Hypertrophie noch Atrophie der Kardiomyozyten festgestellt werden.



**Abb. 28 Keine hyper- oder atropen Veränderungen in Herzen von *Klf15*-KO-Herzen.**

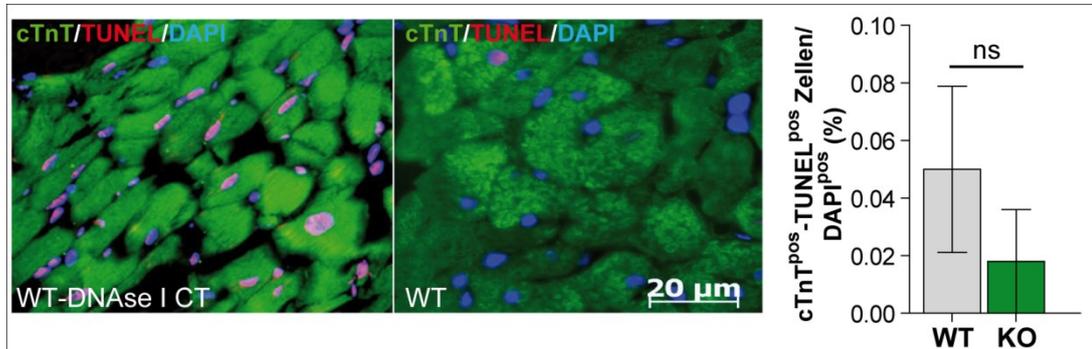
Untersuchungen von transversalen Herzgewebe-Schnitten mittels Anfärben der Zellmembranen und Messung der Zellflächen-Querschnitte (*Cross Sectional Area*, CSA) ergaben keine Unterschiede zwischen adulten *Klf15*-KO- und WT-Herzen im Alter von 16 Wochen. Maßstab 20 µm; n=5/Gruppe, Student's *t*-Test.

Um ein sensibleres Nachweissystem anzuwenden, wurde zusätzlich die kardiale mRNA bezüglich der Expression der Hypertrophiemarker *Atrial Natriuretic Peptid* (ANP), *B-type Natriuretic Peptid* (BNP) und  $\beta$ - $\alpha$ -*Myosin Heavy Chain* ( $\beta/\alpha$ MHC) mittels qrt-PCR untersucht. Auch bei dieser Analyse ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

#### 4.6.3.2 Untersuchung auf einen Verlust von Kardiomyozyten

Eine verminderte kardiale Leistung kann sich auf einen Verlust von Herzmuskelzellen zurückführen lassen. Deshalb wurden Gewebeschnitte der *Klf15*-KO und WT-Herzen mithilfe des TUNEL Apoptose-Kits angefärbt, welches die fragmentierten DNA-Enden markiert. Zusätzlich wurden die Kardiomyozyten über Immunfärbung von kardialem TroponinT (cTnT) und die Zellkerne mittels DAPI visualisiert. Apoptotische, TUNEL-positive Zellkerne wurden ausgezählt und in Relation zu den

DAPI-positiven Kernen gesetzt. Da generell wenig apoptotische Kardiomyozyten vorliegen, wurde eine DNase I-behandelter Kontrollschnitt mitgefärbt. Insgesamt wurden kaum apoptotische Zellen in den Schnitten detektiert und kein Unterschied zwischen *Klf15*-KO- und WT-Herzen festgestellt (**Abb. 29**).



**Abb. 29** Kein Verlust von Kardiomyozyten in *Klf15*-KO-Herzen detektierbar.

Die Analyse von transversalen Herzgewebe-Schnitte angefärbt mittels TUNEL-Apoptose-Kit (rot) und anti-cTnT (grün) zeigten keine Unterschiede in der Apoptose von Kardiomyozyten (cTnT<sup>pos</sup>) zwischen *Klf15*-KO- und WT-Mäusen im Alter von 16 Wochen. DAPI (blau) wurde zur Kernvisualisierung benutzt. Die cTnT- und TUNEL-positiven Zellen wurden zu den DAPI-Kernen/Areal normalisiert. Maßstab 20  $\mu$ m; n=5/Gruppe, Student's *t*-Test. Da kaum TUNEL<sup>pos</sup>-Zellen zu finden waren, ist nur ein repräsentatives Bild für den WT und eine DNase I-behandelte Kontrolle dargestellt.

#### 4.6.3.3 Untersuchung auf Fibrosierung des Herzens

Im Zuge einer Remodellierung des Herzmuskels kommt es zum Umbau des Bindegewebsgerüsts und vermehrter Einlagerung von Kollagen zwischen die Kardiomyozyten. Dies führt zu einem steiferen Muskel mit verminderter Pumpfunktion. Herzschnitte von *Klf15*-KO- und WT-Mäusen wurde zum einen nach Masson-Trichrom gefärbt, welches Muskelzellen rot und Kollagen blau markiert, und zum anderen mit Sirius Red, das Kollagen rot gegen gelben Hintergrund färbt. In beiden Fällen wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin markiert. Mit beiden Färbemethoden konnten weder vermehrte Kollageneinlagerung in den *Klf15*-KO-Herzen noch andere morphologische Unregelmäßigkeiten beobachtet werden.

Zusätzlich wurde die isolierte mRNA mittels qrt-PCR hinsichtlich des profibrotischen Faktors *Connective tissue growth factor* (Ctgf) untersucht. Dieser liegt in fibrotischen Erkrankungen hochreguliert vor. Bei der Analyse der *Klf15*-KO- und WT-Herzen ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

Zusammenfassend liegt basal bei den systemischen *Klf15*-KO-Mäusen eine Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade vor. Ähnlich dem Phänotyp eines Mausmodells mit kardial-spezifisch induzierbarer  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung wurde eine kardiale systolische Dysfunktion in den *Klf15*-KO-Mäusen

gefunden, die weder mit Hypertrophie, Atrophie oder Apoptose der Kardiomyozyten noch mit Fibrosierung des Herzens verknüpft werden konnte.

#### **4.7 *Klf15*-KO führt bei chronisch-kardialer Belastung zu vorzeitiger Herzmuskel-Remodellierung**

Um den bei der Basalcharakterisierung gefundenen kardialen Phänotyp im Verlauf einer Stressbedingten Remodellierung des Herzmuskels verfolgen zu können und somit einen dem klinischen Verlauf vergleichbaren Phänotyp zu simulieren, wurde bei den *Klf15*-KO-Mäusen experimentell eine hämodynamische Belastung des kardiovaskulären Systems ausgelöst.

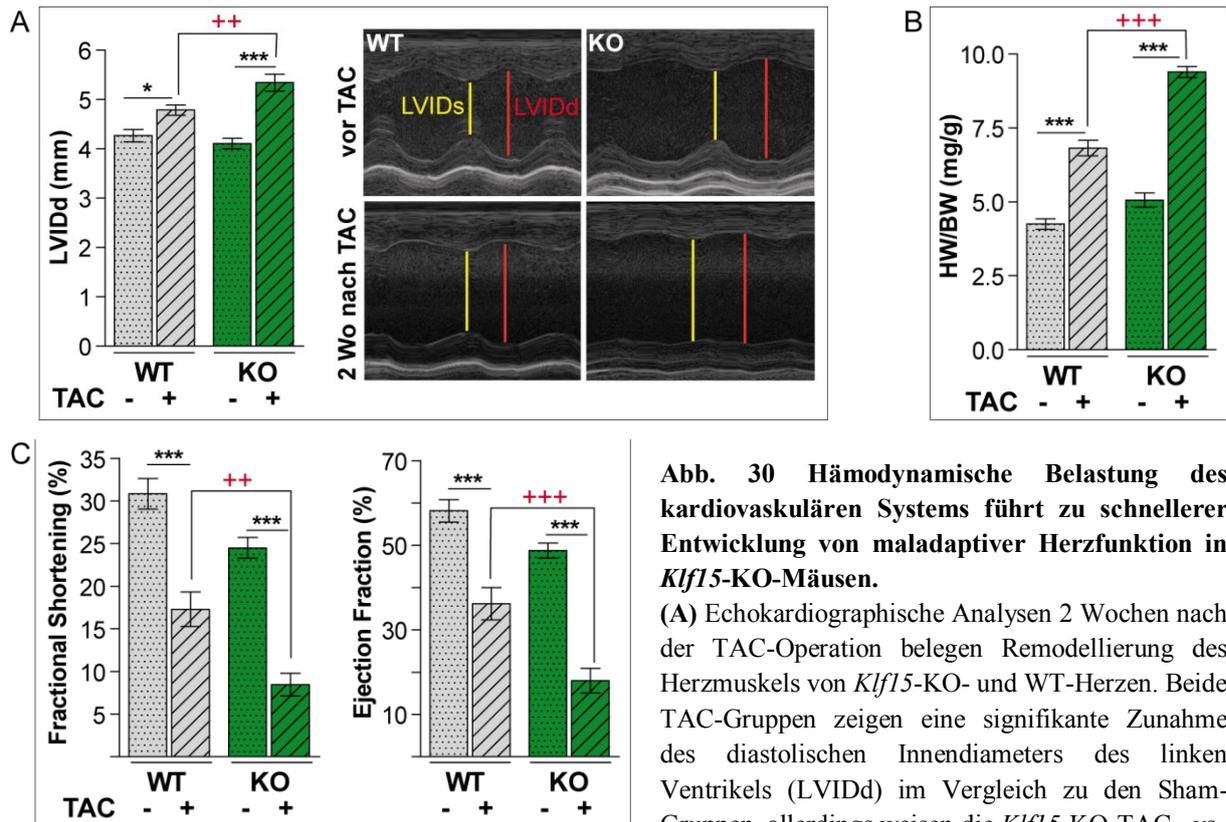
##### **4.7.1 *Klf15*-KO-Mäuse weisen eine verminderte Anpassungsfähigkeit bei mildem kardialen Stress auf**

Zunächst wurden WT- und *Klf15*-KO-Mäuse für zwei Wochen kontinuierlich mit 1,44 mg/kg/Tag Angiotensin II (AngII) über mini-osmotische Pumpen behandelt, Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung. AngII bewirkt über Aktivierung insbesondere des AT<sub>1</sub>-Rezeptors eine anti-Diurese und Gefäßverengung und damit eine Blutdrucksteigerung [91]. Bei diesem Modell handelte es sich um die Induktion einer mild verlaufenden Kompensation. Echokardiographische Analysen zwei Wochen nach der Behandlung ergaben bei den AngII-behandelten WT-Mäusen eine Verdickung des IVSd (WT+NaCl 0,69 ± 0,02 vs. WT+AngII 0,83 ± 0,03 mm) und der LVHWD (WT+NaCl 0,67 ± 0,02 vs. WT+AngII 0,83 ± 0,03 mm) als Anzeichen der induzierten Hypertrophie; beim Durchmesser des linken Ventrikels ließ sich keine Veränderung verzeichnen. In den AngII-behandelten *Klf15*-KO-Mäusen wurden dahingegen keine Veränderungen in den Wanddimensionen, aber ein vergrößerter Durchmesser der linken Herzkammer gemessen (LVIDd: KO+NaCl 4,02 ± 0,13 vs. KO+AngII 4,48 ± 0,14 mm).

Dieses Ergebnis zeigte einen beginnenden Kompensationsmechanismus der WT-Herzen, wohingegen die *Klf15*-KO-Herzen bereits Anzeichen einer Dilatation aufwiesen (Tab. A3 im Anhang III). Zusätzliche qrt-PCR-Analysen der Hypertrophiemarker ANP, BNP,  $\alpha$ - und  $\beta$ MHC ergaben keine signifikanten Veränderungen bei den Ang II-behandelten WT-Herzen, so dass das Modell als zu milder Stimulus betrachtet wurde und das stringenter TAC (*Transverse Aortic Constriction*)-Modell zur Untersuchung herangezogen wurde.

#### 4.7.2 *Klf15*-KO-Mäuse haben eine höhere Mortalität nach stringentem kardialem TAC-Stressmodell

Bei der TAC wurde bei *Klf15*-KO- und WT-Mäusen der transverse Aortenbogen zwischen Arm-Kopf-Gefäßstamm und Halsschlagader um ca. 50% durch eine Ligatur verengt. Dies führte zur Induktion einer chronischen Drucküberlast, die den Verlauf einer zunächst kompensierten Hypertrophie und später maladaptiven Remodellierung bis zur Herzinsuffizienz reproduziert [92]. Zur Kontrolle wurden Mäuse beider Gruppen auf die gleiche Weise operiert, es wurde lediglich keine Ligatur gesetzt (Sham-Gruppe). Die Mäuse wurden vor und zwei Wochen nach dem Eingriff mittels Echokardiographie untersucht. Die Ultraschall-Untersuchung vor der Operation diente der Sicherstellung, dass die eingesetzten Mäuse basal dem Genotyp entsprechend normale Werte aufwiesen. Zur Überprüfung der erfolgreichen TAC-Operation wurde zudem eine Dopplersonographie durchgeführt, um den deszendierenden Gradienten des Blutflusses durch den ligierten Aortenbogen zu bestimmen. Dieser war bei den TAC-operierten Gruppen 10-fach erhöht gegenüber den Sham-Kontrollgruppen (WT: Sham  $4,3 \pm 0,4$  vs. TAC  $42,4 \pm 5,9$ ; KO: Sham  $2,6 \pm 0,4$  vs. TAC  $35,7 \pm 3,6$  mm/Hg) (Tab. A4 im Anhang III). Passend zum bereits basal und nach Ang II-Behandlung beobachteten Phänotyp zeigten die *Klf15*-KO-Mäuse eine wesentlich schlechtere Anpassungsfähigkeit auf die induzierte, kardiale Belastung. Die WT- als auch die KO-TAC-Herzen reagierten gleichermaßen mit signifikanter Zunahme der linksventrikulären Wanddicken IVSd und LVHWd im Vergleich zu den Sham-Gruppen. Allerdings wiesen die *Klf15*-KO-TAC-Mäuse im Vergleich zu den WT-TAC-Mäusen eine zusätzliche signifikante Zunahme sowohl beim Innendiameter des linken Ventrikels (LVIDd: WT-TAC  $4,8 \pm 0,1$  vs. KO-TAC  $5,3 \pm 0,2$  mm) als auch dem Herzgewicht, normalisiert gegen das Körpergewicht (HW/BW: WT-TAC  $6,6 \pm 0,3$  vs. KO-TAC  $9,4 \pm 0,2$  mg/g) (**Abb. 30A-B**) und die Tibia-Länge (HW/TL: WT-TAC  $10,2 \pm 0,4$  vs. KO-TAC  $11,8 \pm 0,2$  mg/mm) auf. Die von den Wanddimensionen abgeleiteten funktionellen Parameter FS und EF ergaben für die KO- und WT-Mäuse nach TAC eine Verschlechterung der systolischen Pumpfunktion als Zeichen der maladaptiven Remodellierung und Herzinsuffizienz, wobei die *Klf15*-KO-Tiere eine zusätzlich signifikant schlechtere Funktion aufwiesen (FS: WT-TAC  $17,3 \pm 2,0$  vs. KO-TAC  $8,4 \pm 1,3\%$ ; EF: WT-TAC  $36,2 \pm 3,8$  vs. KO-TAC  $18,0 \pm 2,9\%$ ) (**Abb. 30C**). Alle echokardiographischen Werte befinden sich tabellarisch im Anhang III.

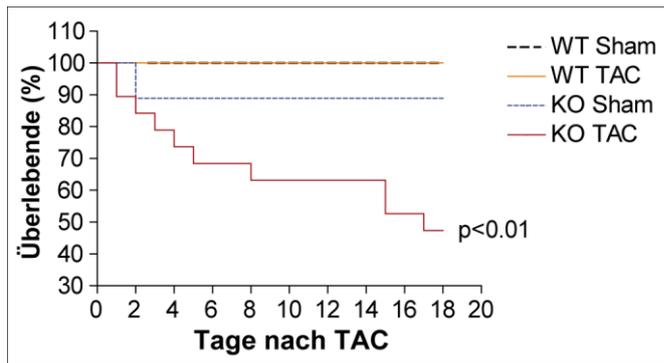


**Abb. 30 Hämodynamische Belastung des kardiovaskulären Systems führt zu schnellerer Entwicklung von maladaptiver Herzfunktion in *Klf15*-KO-Mäusen.**

(A) Echokardiographische Analysen 2 Wochen nach der TAC-Operation belegen Remodellierung des Herzmuskels von *Klf15*-KO- und WT-Herzen. Beide TAC-Gruppen zeigen eine signifikante Zunahme des diastolischen Innendiameters des linken Ventrikels (LVIDd) im Vergleich zu den Sham-Gruppen, allerdings weisen die *Klf15*-KO-TAC- vs.

WT-TAC-Herzen eine zusätzlich signifikante Dilatation auf. (B) Gleiches wurde in Bezug auf das Herzgewicht normalisiert gegen das Körpergewicht (HW/BW) festgestellt. (C) Die systolische Herzfunktion gemessen anhand der Verkürzungsfraktion (*Fractional Shortening*) und Auswurfvolumen (*Ejection Fraction*) ergab eine zusätzlich signifikant verschlechterte Funktion. WT-Sham und KO-Sham: n=8, WT-TAC: n=12, KO-TAC: n=10, ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test, \*p<0,05, ++p<0,01, \*\*\* und +++p<0,001.

Die Daten weisen auf eine beeinträchtigte Kompensationsfähigkeit bei kardialer hämodynamischer Belastung in Mäusen ohne KLF15 hin. Entsprechend wurde in den drei post-operativen Wochen eine signifikant erhöhte Sterblichkeit der *Klf15*-KO-Mäuse beobachtet (WT 100% vs. KO 47% Überlebensrate). Alle operierten WT-Mäuse (Sham: n=8, TAC: n=12) überlebten den beobachteten Zeitraum, wohingegen von den KO-Tieren 1 Sham- (n=9) und 10 TAC-operierte Mäuse (n=19) verstarben (Abb. 31). Die n-Zahl der *Klf15*-KO-Mäuse musste entsprechend erhöht werden, um zum Endpunkt genügend Werte und Gewebeproben zu erhalten.

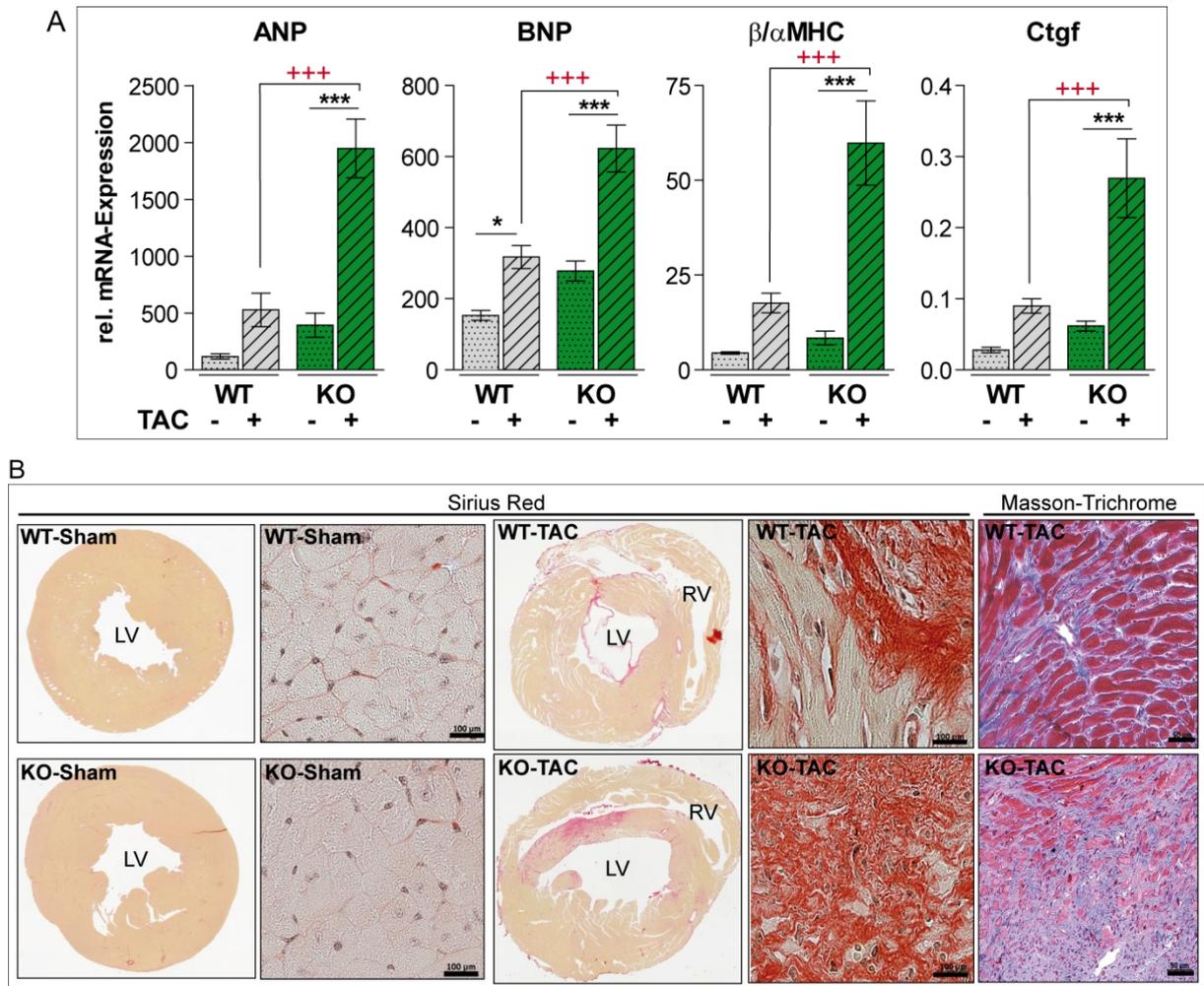


**Abb. 31 Höhere Mortalität von *Klf15*-KO-Mäusen bei kardialer Belastung.**

Die Analyse der Kaplan-Meier-Kurve zeigt signifikant höhere Sterblichkeit nach chronisch-hämodynamischer Belastung bei *Klf15*-KO- vs. WT-Mäusen; alle operierten WT-Mäuse überlebten den beobachteten Zeitraum. WT-Sham: n=8, WT-TAC: n=12, KO-Sham: n=9, KO-TAC: n=19; Logrank-Test: p=0,0034.

Drei Wochen nach TAC-/Sham-Eingriff wurde den Mäusen das Herz entnommen und wie bei der Basalcharakterisierung (Abschnitt 4.6.3) auf Unterschiede bezüglich Hypertrophie, Apoptose und Fibrose untersucht.

Wie zu erwarten wiesen alle TAC-operierten Mäuse eine Hochregulation der untersuchten Hypertrophie-Marker und das Vorhandensein von fibrotischen Einlagerungen als Zeichen der kardialen Remodellierung auf. Ergänzend zu den Daten der Echokardiographie und statistischen Kaplan-Meier Überlebenskurve zeigten die *Klf15*-KO-TAC- im Vergleich zu den WT-TAC-Herzen eine signifikante Erhöhung der mRNA-Transkripte für die Hypertrophie-Marker ANP, BNP und  $\beta/\alpha$ -MHC und den Fibrose-assoziierten Marker Ctgf (p<0,001; **Abb. 32A**). Die Kollagen-Färbung mittels Sirius Red und Masson-Trichrom visualisierte deutlich einen höheren Fibrosierungsgrad in den *Klf15*-KO-Herzen. Zudem zeigten die Zellen der *Klf15*-KO-Herzen eine stärker desorganisierte Anordnung (**Abb. 32B**). Untersuchungen zur Apoptose ergaben keinen signifikanten Unterschied in den einzelnen Gruppen.



**Abb. 32 *Klf15*-KO-Mäuse zeigen beschleunigte Herzmuskel-Remodellierung.**

(A) Qrt-PCR-Analysen von Sham- und TAC-Herzen von *Klf15*-KO- und WT-Herzen zeigten eine signifikant höhere Expression der Hypertrophie-Marker ANP, BNP, dem Quotient aus  $\beta$ - und  $\alpha$ MHC und des Fibrose-assoziierten Markers Ctgf. Normalisiert gegen  $\beta$ -Aktin und Gapdh. Sham-Gruppen: n=8, TAC-Gruppen: n=10, ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test, \*\*\* und +++ p<0,001. (B) Anfärbungen von Kollagen zum Fibrosenachweis mittels Sirius Red und Masson-Trichrome zeit einen deutlich höhere Fibrosierung und stärkere Desorganisation der Zellen in den *Klf15*-KO- vs. den WT-Herzen. LV=linker Ventrikel, RV=Rechter Ventrikel; Sirius Red: rot=Kollagen, schwarz=Zellkerne, Maßstab 100  $\mu$ m; Masson-Trichrom: blau=Kollagen, rot=Muskelzellen, schwarz=Zellkerne, Maßstab 50  $\mu$ m.

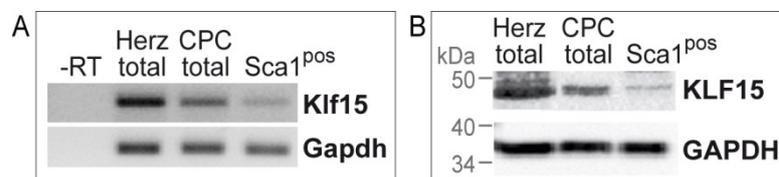
Zusammengefasst zeigen die Daten aus den induzierten hämodynamischen Belastungsmodellen eine verminderte Kompensationsfähigkeit mit beschleunigter Herzmuskel-Remodellierung und erhöhter Sterblichkeit der *Klf15*-KO-Mäuse im Gegensatz zu den WT-Mäusen.

## 4.8 KLF15 beeinflusst endogene kardiovaskuläre Progenitorzellen *in vivo*

Vorangegangene Arbeiten aus der Arbeitsgruppe zeigten, dass in einem induzierbaren Mausmodell mit kardial verminderter  $\beta$ -Catenin-Expression eine gesteigerte kardiomyogene Differenzierung von Sca1-positiven Progenitorzellen (Sca1<sup>pos</sup>) nach Myokardinfarkt erfolgte [53]. Da in kardialem Gewebe der *Klf15*-KO-Mäuse eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges nachgewiesen wurde, sind die endogenen kardiovaskulären Vorläuferzellen (CPCs, *Cardiovascular Progenitor Cells*) auf veränderte Eigenschaften untersucht worden.

### 4.8.1 KLF15 ist in CPCs exprimiert

Als erstes ist überprüft worden, ob KLF15 in den CPCs vorlag. Dazu wurde von adulten C57BL/6-Mäusen mittels enzymatischem Verdau und seriellen Filtern eine CPC-angereicherte Zellfraktion isoliert. Zudem wurden aus dieser mittels MACS-Technologie die Sca1<sup>pos</sup>-CPCs getrennt. Sowohl aus dem gesamten CPC-Pool als auch aus den angereicherten Sca1<sup>pos</sup>-Zellen wurden RNA und Protein isoliert und auf KLF15-Expression untersucht. Tatsächlich konnte KLF15 in den Sca1<sup>pos</sup>-Zellen als Anteil des gesamten CPC-Pools detektiert werden. KLF15 ist aber nicht ausschließlich in diesen vorhanden, welches die stärkere Expression in der Gesamt-CPC-Isolation ergab (Abb. 33).



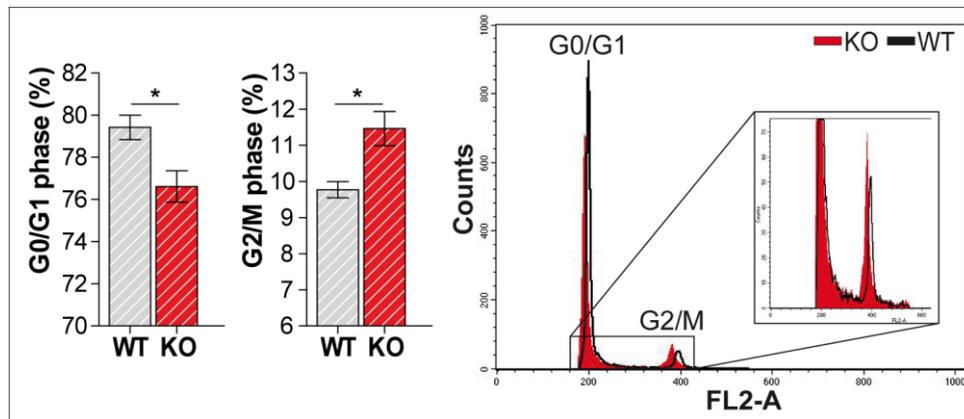
**Abb. 33 KLF15 ist in CPCs exprimiert.**

KLF15-Expression wurde in angereicherten CPC-Isolationen und MACS-isolierten Sca1<sup>pos</sup>-CPC-Fractionen aus adulten Herzen auf (A) mRNA- und (B) Proteinebene detektiert. Der Vergleich erfolgte mit der Expression in Gesamt-Herzextrakten. -RT (minus Reverse Transkriptase) diente als Negativkontrolle bei der cDNA-Synthese und qrt-PCR; GAPDH zeigte die cDNA-Integrität in (A) und diente als Lade-Kontrolle in (B).

### 4.8.2 CPCs von *Klf15*-KO-Mäusen weisen verstärkte Proliferation und verändertes *Cell fate* auf

Da bekannt ist, dass eine Phasen-abhängige Aktivierung und Deaktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges einen entscheidenden Effekt auf Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen hat [98], wurde zunächst eine Zellzyklus-Analyse vorgenommen. Die CPCs von adulten *Klf15*-KO- und WT-Hezen wurden wie unter Abschnitt 3.4.4 beschrieben isoliert, die DNA mit Propidiumiodid markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Anhand der Fluoreszenzintensität resultierend aus dem DNA-Gehalt ergab sich für die *Klf15*-KO-CPCs im Vergleich zu den WT-CPCs ein

signifikant verminderter Gehalt an Zellen in der G0/G1-Ruhephase (WT  $79,4 \pm 0,6$  vs. KO  $76,6 \pm 0,7\%$ ) und gleichzeitig eine vermehrte Anzahl an Zellen in der G2/M-mitotischen Phase (WT  $9,8 \pm 0,2$  vs. KO  $11,5 \pm 0,5\%$ ), welches eine verstärkte Proliferation in den *Klf15*-KO-Vorläuferzellen aufzeigte (**Abb. 34**).



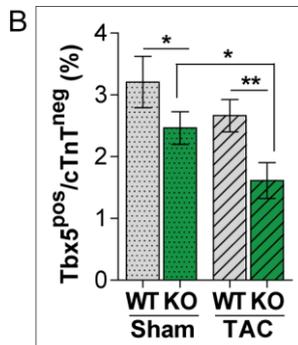
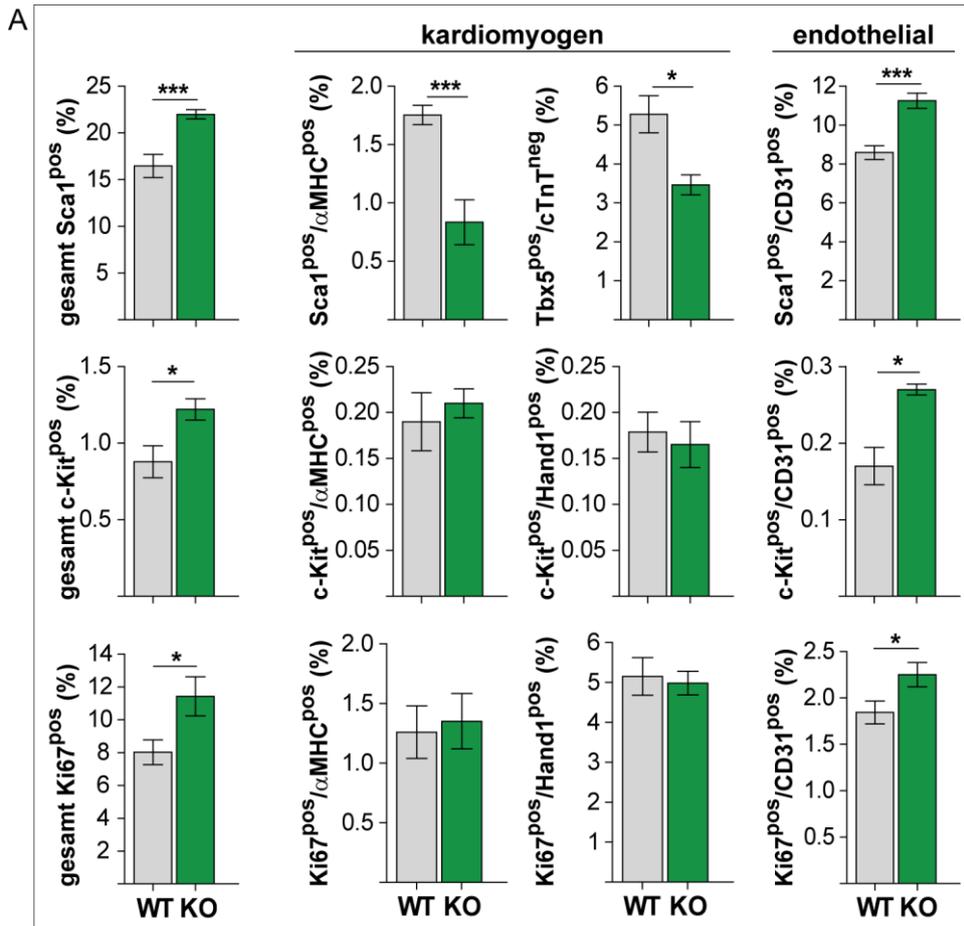
**Abb. 34** CPCs von *Klf15*-KO-Herzen weisen eine höhere proliferative Kapazität auf.

Zellzyklus-Analysen mittels Durchflusszytometrie von CPCs aus adulten Herzen resultierten in signifikant weniger Zellen in der G0/G1-ruhenden-Phase und in einem gleichzeitig erhöhten Anteil an Zellen in der G2/M-mitotischen-Phase von *Klf15*-KO- vs. WT-CPCs. WT n=8, KO n=9, Student's *t*-Test, \* $p < 0,05$ .

Um sicherzustellen, dass nur Populationen von Stamm-/Progenitorzellen analysiert werden, wurden die isolierten Zellen als nächstes mit bekannten Stammzellmarkern quantifiziert. In Ermangelung eines bekannten frühen, definitiven CPC-Markers wurden die allgemeinen Stammzellmarker Sca1 und c-Kit zur Untersuchung verwendet. Erneut wurden CPCs aus adulten *Klf15*-KO- und WT-Herzen isoliert, mittels Antikörper gegen Sca1 und c-Kit markiert und durchflusszytometrisch quantifiziert. Zusätzlich wurde der Proliferationsmarker Ki67 zur Bestätigung der Zellzyklus-Analyse gemessen. Auch diese Messung resultierte in signifikant erhöhter Proliferation der *Klf15*-KO-CPCs im Vergleich zu den WT-CPCs (WT  $8,0 \pm 0,8$  vs. KO  $11,4 \pm 1,2\%$ ). Passend dazu war der Anteil an Sca1<sup>POS</sup>- und c-Kit<sup>POS</sup>-Progenitorzellen (Sca1<sup>POS</sup>: WT  $16,5 \pm 1,2$  vs. KO  $22,0 \pm 0,5\%$ ; c-Kit<sup>POS</sup>: WT  $0,9 \pm 0,1$  vs. KO  $1,2 \pm 0,1\%$ ) in den *Klf15*-KO-CPCs ebenfalls signifikant höher (**Abb. 35A**).

Im nächsten Schritt sollte die Frage beantwortet werden, ob die Proliferation der CPC-Fraktion der zu Kardiomyozyten-differenzierungsfähigen Progenitorzellen beeinflusst sei und/oder welchem Zell-Commitment diese CPCs unterliegen. In der embryonalen Kardiogenese ist, ebenso wie für die Proliferation, auch für die Richtung der Vorläuferzell-Differenzierungen („*Cell fate*“) wichtig, zu welchem Zeitpunkt die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade hoch- bzw. runterreguliert ist. Die Entscheidung liegt im Wesentlichen zwischen der kardialen und hämatopoetischen/vaskulären Zell-Linie [59, 61]. Deshalb wurden die isolierten CPCs mittels Durchflusszytometrie bezüglich der Expression von allgemeinen Stammzell-Markern in Kombination mit kardiomyogenen und endothelialen Markern untersucht. Als frühe kardiale Marker wurden Hand1, Tbx5 und  $\alpha$ MHC verwendet, CD31 (PECAM1)

diente als Endothelzell-Marker. Interessanterweise konnte in den *Klf15*-KO-CPCs nicht nur festgestellt werden, dass die kardiomyogene Progenitor-Population signifikant reduziert ( $\text{Sca1}^{\text{pos}}/\alpha\text{MHC}^{\text{pos}}$ : WT  $1,8 \pm 0,1$  vs. KO  $0,8 \pm 0,2\%$ ;  $\text{Tbx5}^{\text{pos}}/\text{cTnT}^{\text{neg}}$ : WT  $5,3 \pm 0,5$  vs. KO  $3,5 \pm 0,3\%$ ) und zugleich die endotheliale Linie ( $\text{Sca1}^{\text{pos}}/\text{CD31}^{\text{pos}}$ : WT  $8,6 \pm 0,4$  vs. KO  $11,3 \pm 0,4\%$ ;  $\text{c-Kit}^{\text{pos}}/\text{CD31}^{\text{pos}}$ : WT  $0,17 \pm 0,02$  vs. KO  $0,27 \pm 0,01\%$ ) erhöht vorlag, sondern auch dass der Anteil der vermehrt proliferativen Zellen sich nur bei der  $\text{CD31}^{\text{pos}}$  Population ( $\text{Ki67}^{\text{pos}}/\text{CD31}^{\text{pos}}$ : WT  $1,8 \pm 0,1$  vs. KO  $2,3 \pm 0,1\%$ ) fand. Die auf Ki67 und den kardialen Marker Hand1 bzw.  $\alpha\text{MHC}$  doppelt-positive Zellen waren im Vergleich zu den WT-CPCs unverändert (**Abb. 35A**). Die sehr gering vorhandenen  $\text{c-Kit}^{\text{pos}}/\text{Hand1}^{\text{pos}}$  und  $\text{c-Kit}^{\text{pos}}/\alpha\text{MHC}^{\text{pos}}$ -Populationen zeigten keine Unterschiede zwischen *Klf15*-KO und WT, welches darauf schließen lässt, dass diese Zellen im adulten System keine Relevanz besitzen. Der Phänotyp der CPCs zeigte sich auch bei den Mäusen, die experimentell hämodynamischer Belastung ausgesetzt waren. **Abb. 35B** zeigt das Ergebnis der  $\text{Tbx5}^{\text{pos}}/\text{cTnT}^{\text{neg}}$ -Zellpopulations-Quantifizierung. Bemerkenswerterweise lag diese Fraktion bei den *Klf15*-KO-Mäusen nach TAC-Operation nochmals signifikant reduziert vor (KO-Sham  $2,5 \pm 0,3$  vs. KO-TAC  $1,6 \pm 0,3\%$ ). Die Antikörper-Spezifität wurde zuvor mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie in spezifischen Zellen getestet. Das Ergebnis befindet sich im Anhang II.



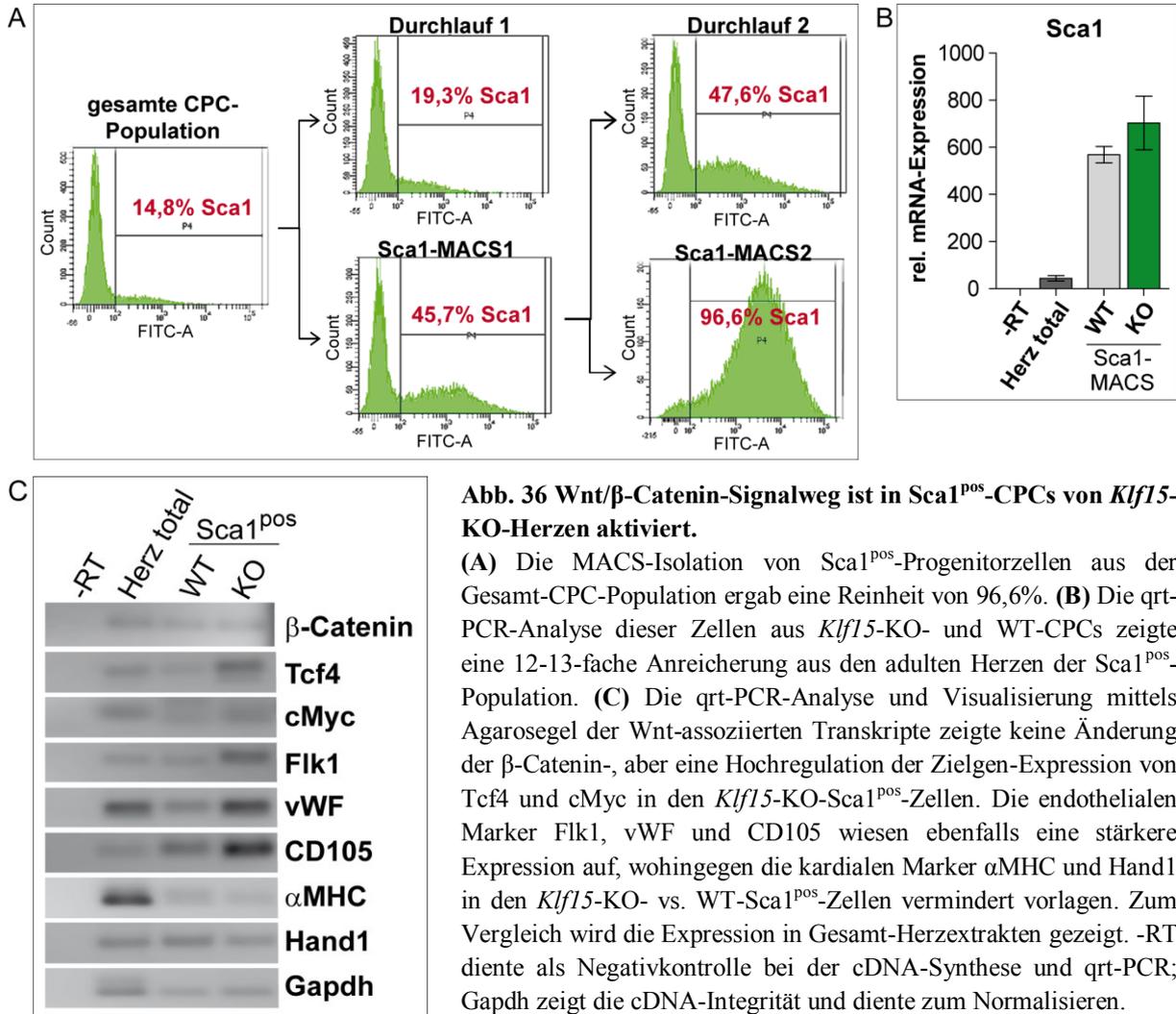
**Abb. 35 *Klf15*-KO-CPCs zeigen eine vermindert kardiomyogene, aber vermehrt endotheliale Zell-Identität.**

(A) Charakterisierung und Quantifizierung der CPCs aus adulten Herzen mittels Durchflusszytometrie resultierten in einem signifikant erhöhten Anteil an Sca1<sup>pos</sup>- und c-Kit<sup>pos</sup>-Stammzellen in den *Klf15*-KO-Herzen, die einen signifikant verminderten kardialen (αMHC<sup>pos</sup>, Hand1<sup>pos</sup>, Tbx5<sup>pos</sup>/cTnT<sup>neg</sup>) und hochregulierten endothelialen (CD31<sup>pos</sup>) Phänotyp aufwiesen. Zusätzlich lagen in den *Klf15*-KO-CPCs vermehrt proliferierende Zellen der endothelialen Linie (Ki67<sup>pos</sup>/CD31<sup>pos</sup>) vor, während die kardialen Zellen (Ki67<sup>pos</sup>/αMHC<sup>pos</sup> bzw. Hand1<sup>pos</sup>) keinen Unterschied in der Proliferation zeigten. n≥9, Student's *t*-Test,

\*p<0,05; \*\*\*p<0,001. (B) Eine Analyse der Tbx5<sup>pos</sup>/cTnT<sup>neg</sup>-Population 2 Wochen nach TAC-Operation zeigte eine zusätzliche Reduktion der kardiomyogenen CPC-Population in den *Klf15*-KO-TAC- vs. WT-TAC-Herzen. n=9/Gruppe, ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test, \*p<0,05; \*\*p<0,01. Um Zell-Bruchstücke adulter Kardiomyozyten auszuschliessen wurden zur Analyse von Tbx5-Populationen nur cTnT<sup>neg</sup>-Zellen berücksichtigt.

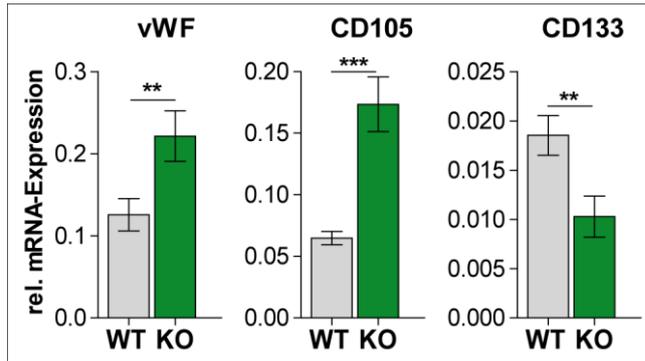
Es ist noch anzumerken, dass der Anteil der c-Kit<sup>pos</sup>-Zellen extrem gering war (weniger als 1%), so dass für die folgenden Analysen nur der Sca1-Marker herangezogen wurde. Um zu untersuchen, ob in den CPCs mit verändertem *Cell fate* auch eine Aktivierung der β-Catenin/TCF-abhängigen Transkription zugrunde lag, wurde die Sca1<sup>pos</sup>-Zellpopulation jeweils aus *Klf15*-KO- und WT-CPCs mittels MACS auf das 12-fache angereichert und die Reinheit von 96,5 ± 0,1% durchflusszytometrisch belegt (Abb. 36A-B). Aus diesen Zellen wurde mRNA isoliert und per qrt-PCR analysiert. Abb. 36C

belegt in den *Klf15*-KO- $Sca1^{pos}$ -CPCs eine höhere Expression der Wnt/ $\beta$ -Catenin Zielgene Tcf4 und cMyc, wobei, wie zuvor beobachtet,  $\beta$ -Catenin selbst nicht reguliert gefunden wurde. Zudem konnte auch hier eine Hochregulation des hämato-kardiovaskulären Markers *Fetal liver kinase 1* (Flk1), der endothelialen Marker vWF (vonWillebrand-Faktor) und CD105 (Endoglin) und gleichzeitige Runterregulation der kardialen Marker  $\alpha$ MHC und Hand1 in diesen Zellen gezeigt werden.



#### 4.9 Herzen von *Klf15*-KO-Mäusen verfügen über mehr Endothelzellen

Da ein größerer Anteil proliferativer  $CD31^{pos}$ -Zellen in den CPCs von *Klf15*-KO-Heizen nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob im gesamten Herzen der KO-Mäuse vermehrt Endothelzellen zu finden wären. Eine qrt-PCR-Analyse von mRNA aus Gesamtherzgewebe ergab bei den *Klf15*-KO-Heizen eine signifikant erhöhte Expression der endothelialen Marker vWF und CD105 ( $p < 0.01$  und  $p < 0.001$ ), wohingegen der frühe Marker undifferenzierter Zellen der hämatopoetischen/endothelialen Linie CD133 (Prominin1) bereits signifikant runterreguliert war ( $p < 0.01$ ; **Abb. 37**).



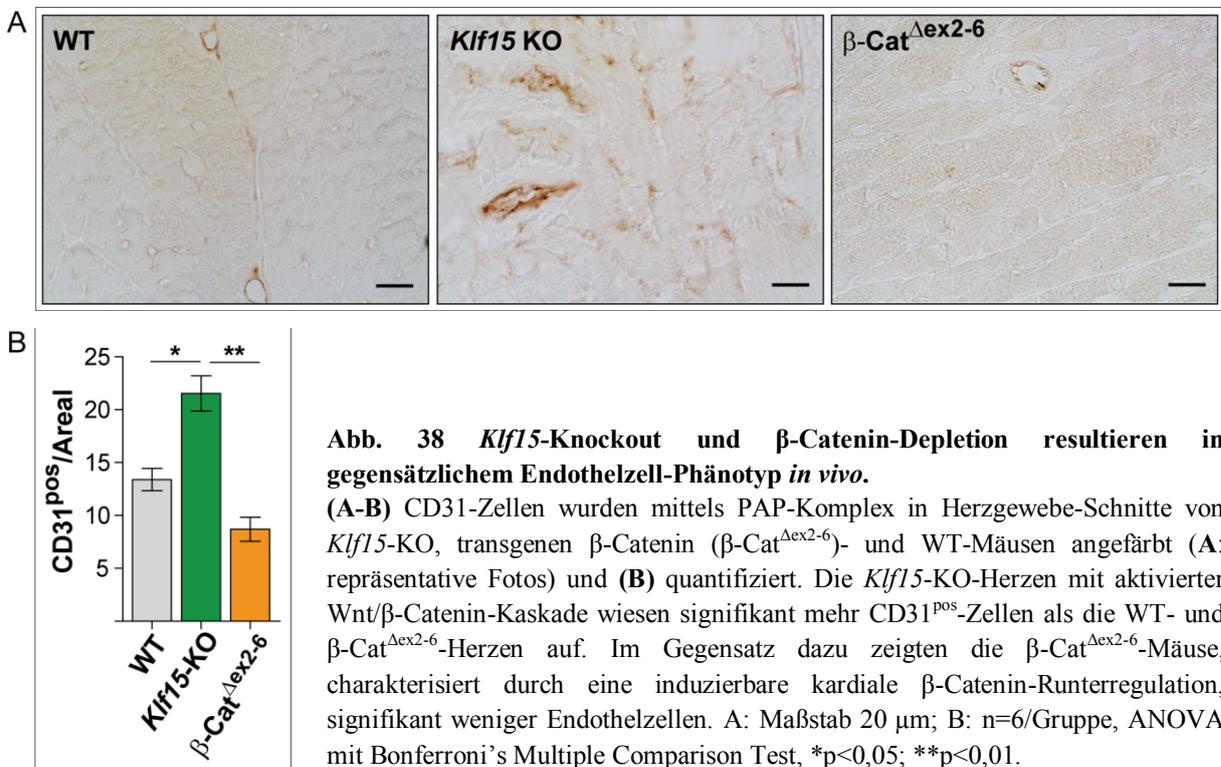
**Abb. 37 *Klf15*-KO-Herzen exprimieren vermehrt Endothelzellen.**

Qrt-PCR-Analysen von Gesamt-Herzextrakten aus *Klf15*-KO- und WT-Mäusen resultierten in signifikant erhöhter Expression der endothelialen Marker vWF und CD105 in *Klf15*-KO-Herzen, wohingegen der frühe Marker von undifferenzierten Endothelzellen CD133 bereits runterreguliert war. Normalisiert gegen  $\beta$ -Aktin und Gapdh, n=13/Gruppe, Student's *t*-Test, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

#### 4.9.1 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beeinflusst den Endothelzell-Gehalt in Herzen

Als nächstes wurde die Quantität der Endothelzellen in den adulten *Klf15*-KO-Herzen untersucht. Paraffin-Gewebeschnitte von *Klf15*-KO- und WT-Herzen wurden auf CD31 immunmarkiert, der ganze Schnitt sequenziell fotografiert und positive Bereiche mit ImageJ semi-quantifiziert. Die *Klf15*-KO-Herzen wiesen eindeutig mehr und intensivere CD31<sup>pos</sup>-Bereiche auf (p<0.05). Es war visuell nicht möglich, auch vermehrt Gefäße in den Herzschnitten zu detektieren.

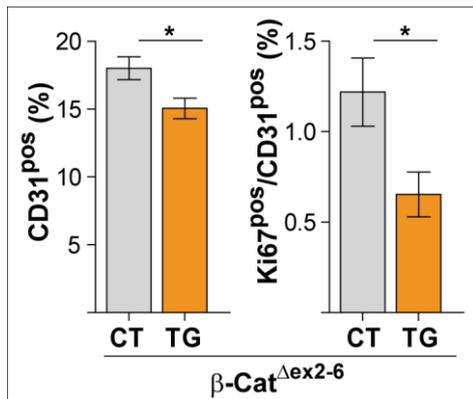
Zusätzlich wurden Herzgewebeschnitte von transgenen Mäusen mit Herz-spezifischer  $\beta$ -Catenin-Depletion ( $\alpha$ MHC-MerCreMer/ $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex2-6</sup>) zum Vergleich herangezogen. Diese wiesen nicht nur im Vergleich zu den WT-, sondern auch zu den *Klf15*-KO-Herzen signifikant weniger CD31<sup>pos</sup>-Zellen auf (p<0,01; **Abb. 38B**); repräsentative Bilder sind in **Abb. 38A** gezeigt.



**Abb. 38 *Klf15*-Knockout und  $\beta$ -Catenin-Depletion resultieren in gegensätzlichem Endothelzell-Phänotyp *in vivo*.**

(**A-B**) CD31-Zellen wurden mittels PAP-Komplex in Herzgewebe-Schnitte von *Klf15*-KO, transgenen  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex2-6</sup>)- und WT-Mäusen angefärbt (**A**: repräsentative Fotos) und (**B**) quantifiziert. Die *Klf15*-KO-Herzen mit aktivierter Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade wiesen signifikant mehr CD31<sup>pos</sup>-Zellen als die WT- und  $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex2-6</sup>-Herzen auf. Im Gegensatz dazu zeigten die  $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex2-6</sup>-Mäuse, charakterisiert durch eine induzierbare kardiale  $\beta$ -Catenin-Runterregulation, signifikant weniger Endothelzellen. A: Maßstab 20  $\mu$ m; B: n=6/Gruppe, ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test, \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Als zweite Quantifizierungsmethode wurden CD31<sup>pos</sup>-Zellen von  $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex2-6</sup>- und CT-Herzen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse bestätigten die signifikant verminderte CD31<sup>pos</sup>-Population in  $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex2-6</sup>-CPCs im Vergleich zu CT-Herzen (CT 18,0  $\pm$  0,8 vs. TG 15,1  $\pm$  0,8%). Zudem wiesen die analysierten CPCs der  $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex2-6</sup>-Mäuse im Vergleich zu denen der CT-Mäuse auch signifikant weniger proliferative CD31<sup>pos</sup>-Zellen auf (Ki67<sup>pos</sup>/CD31<sup>pos</sup>: CT 1,2  $\pm$  0,2 vs. TG 0,7  $\pm$  0,1%) (Abb. 39).



**Abb. 39 Mäuse mit kardialer  $\beta$ -Catenin-Depletion weisen weniger endotheliale Progenitorzellen auf.**

Durchflusszytometrische Analysen von CPCs aus adulten  $\beta$ -Cat <sup>$\Delta$ ex2-6</sup>-TG und CT-Herzen resultierten in einer signifikant geringeren Gesamt-CD31<sup>pos</sup>- und proliferativen Ki67<sup>pos</sup>/CD31<sup>pos</sup>-Population in den TG-CPCs. n=9/Gruppe, Student's *t*-Test, \*p<0,05.

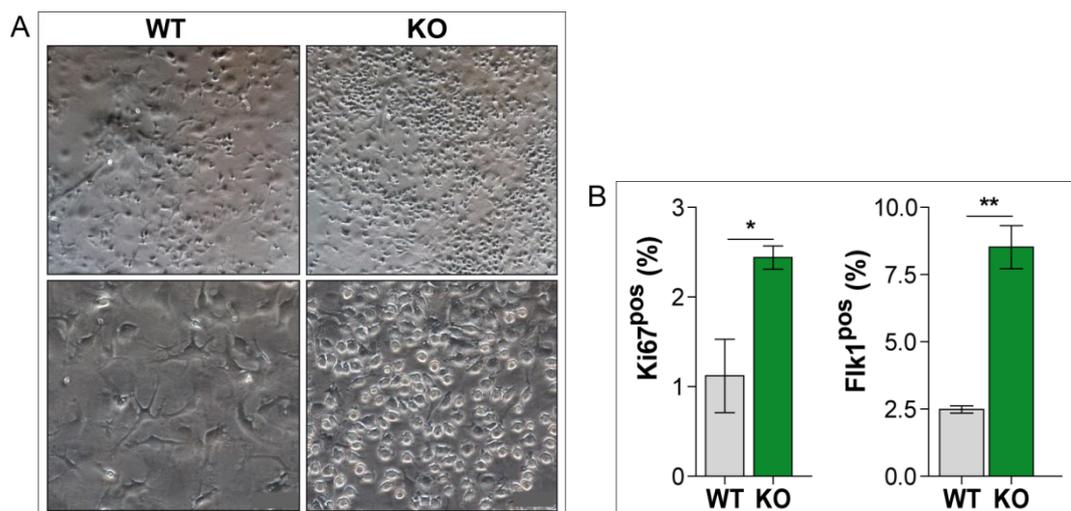
Zusammenfassend wurde gezeigt, dass ein *in vivo* *Klf15*-Knockout mit aktiviertem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in adulten Herzen einen Einfluss auf die Regulation von Vorläuferzellen hat, und auf Kosten der kardiomyogenen Zell-Linie vermehrt Progenitorzellen der endothelialen Linie proliferieren. Im Gesamtherz von *Klf15*-KO-Mäusen konnten ebenfalls mehr CD31<sup>pos</sup>-Zellen nachgewiesen werden, während Mäuse mit kardial runterreguliertem  $\beta$ -Catenin weniger CD31<sup>pos</sup>-Zellen aufwiesen.

#### 4.10 *In vitro*-Reproduktion des *Cell fate* von CPCs aus adulten Mauserherzen

Um das Proliferations- und Differenzierungspotenzial von kardiovaskulären Progenitorzellen *in vitro* nachverfolgen, untersuchen und beeinflussen zu können, wurde zunächst ein Kultivierungssystem etabliert. Die CPCs von adulten C57BL/6-Herzen wurden wie unter Abschnitt 3.3.4 beschrieben entweder enzymatisch unter Verdau der adulten Kardiomyozyten oder nicht-enzymatisch isoliert. Diese wurden dann auf Matrigel- oder 1% Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen ausgesät, für drei Tage absetzen gelassen und der Zellschrott gründlich mit PBS heruntergewaschen. Zur Kultivierung wurde im 1:1 Verhältnis CPC-Differenzierungsmedium mit Konditionalmedium hinzugegeben. Letzteres wurde aus dem Mediumüberstand aus Fibroblasten-Primärkulturen gewonnen.

Aus dem enzymatischen Verdau resultierten vermehrt Einzelzellen, wohingegen die Isolationstechnik ohne vorherigen Verdau zusätzlich Zellaggregate und minimale Gewebestücken ergab, aus denen nach wenigen Tagen Zellen herauswanderten. In beiden Fällen adhärten die Zellen und zeigten eine für

Vorläuferzellen typisch runde Morphologie mit kleinem Zytosol-zu-Zellkern-Verhältnis. Speziell auf Matrigel-beschichteten Zellkulturschalen ergab sich das Problem, dass die Zellen proliferierten, aber keine Differenzierung in Richtung kardialer Zellen zeigten. Die Kulturen wurden nach 10 Tagen trypsiniert, vereinzelt und durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden keine kardialen cTnT- und  $\alpha$ MHC-positiven Zellen detektiert, wohingegen der Proliferationsmarker Ki67 und der frühe hämato-kardiovaskuläre Marker Flk1 nachgewiesen werden konnten. Auch die Zugabe von 5'-Azacytidin in den ersten fünf Kultivierungstagen zur Induktion von kardialer Differenzierung angelehnt an das Protokoll von Oh *et al.* (2003) [30] ergab keinen Unterschied. Trotz fehlender Differenzierung wurden CPCs aus *Klf15*-KO- und WT-Herzen isoliert, für 10 Tage auf Matrigel kultiviert und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert, um Unterschiede in diesem frühen Stadium und dem Proliferationspotential zu untersuchen. Als Ergebnis konnte der *in vivo*-beobachtete Phänotyp nachgestellt werden. Obwohl gleiche Zellzahlen ausgesät worden sind, ergab sich nach 10 Tagen in Kultur eine verstärkte Proliferation (Ki67: WT  $1,1 \pm 0,4$  vs. KO  $2,4 \pm 0,1\%$ ) und höherer Anteil an Flk1<sup>pos</sup>-Zellen in den *Klf15*-KO-CPCs (WT  $2,5 \pm 0,1$  vs. KO  $8,5 \pm 0,8\%$ ) (Abb. 40).

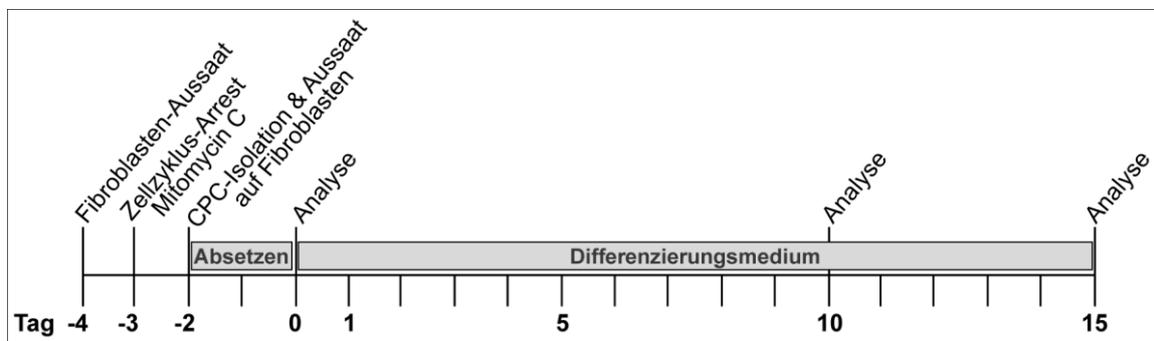


**Abb. 40 *Klf15*-KO- proliferieren stärker als WT-CPCs auf Matrigel.**

(A) Gleiche Zellzahlen isolierter CPCs von adulten *Klf15*-KO- und WT-Herzen wurden 10 Tage auf Matrigel mit Konditionalmedium kultiviert. (B) Anschließende durchflusszytometrische Analysen ergaben eine signifikant höhere Proliferation (Ki67<sup>pos</sup>) und vermehrte hämato-kardiovaskuläre Population (Flk1<sup>pos</sup>) in den *Klf15*-KO- vs. WT-CPCs. Repräsentative Fotos in (A). n=6/Gruppe, Student's *t*-Test, \*p<0,05; \*\*p<0,01.

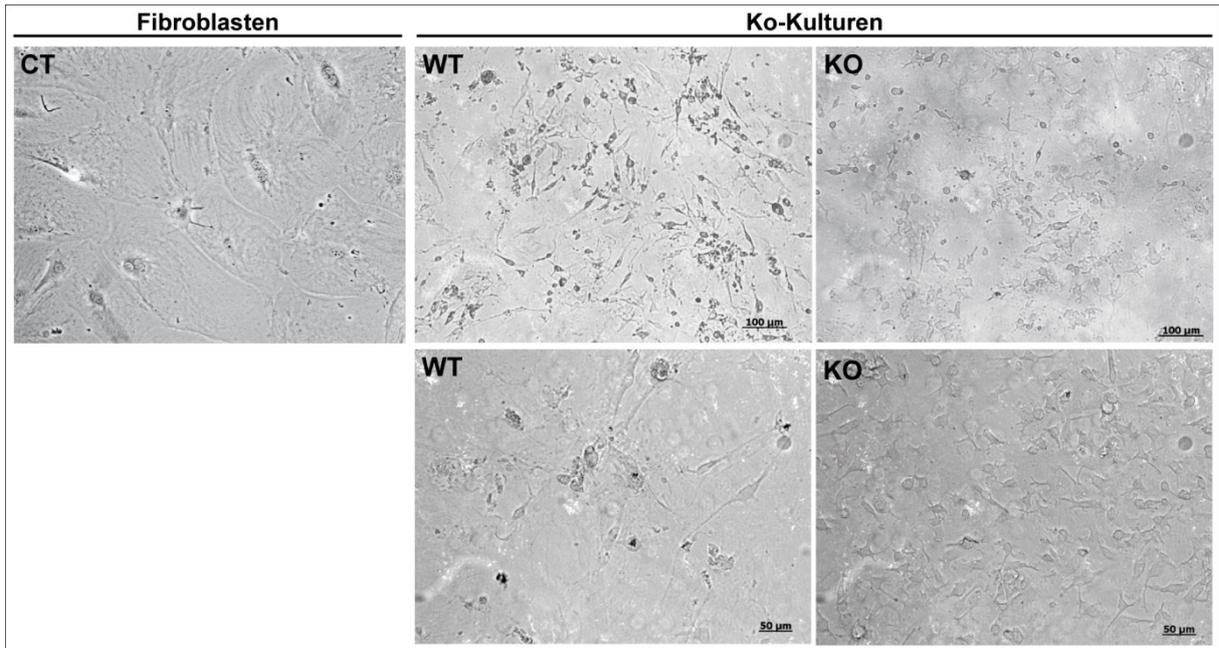
Versuche mit Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen zeigten ähnliche Resultate. Obwohl hier eine geringe kardiale Differenzierung beobachtet werden konnte, mussten hierfür große Mengen an CPCs ausplattiert werden. Bei geringen Zellzahlen und damit geringeren Zell-Zell-Kontakten erschien die Kultivierung im Konditionalmedium problematisch. In diesen Fällen erfolgte weder Proliferation noch Differenzierung der Zellen. Zudem ließen sich die Zellen maximal 20 Tage in Kultur halten.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden Kulturen auf *Feeder-Layer* mit Fibroblasten verwendet. Um die *in vivo*-Bedingungen möglichst realistisch zu reproduzieren, sind Fibroblasten aus adulten Mausherzen isoliert worden. Um aber eine übermäßige Proliferation und das Überwachsen durch die Fibroblasten zu verhindern, wurden diese zuvor im Zellzyklus mittels Mitomycin C-Behandlung arretiert. Zudem sind nur Fibroblasten aus Wildtyp-Herzen verwendet worden, um die Grundbedingungen gleich zu halten und zu beobachtende Effekte den CPCs zuordnen zu können. Die CPCs von *Klf15*-KO- und WT-Herzen wurden ohne enzymatischen Verdau isoliert, um keine Beschädigung von Oberflächenepitopen zu riskieren, zwei Tage auf den Fibroblasten in CPC-Medium adhären lassen und dann für 10-15 Tage in CPC-Differenzierungsmedium ko-kultiviert (Schema in **Abb. 41**).



**Abb. 41** Schema der *in vitro* CPC-Differenzierung auf kardialen Fibroblasten-*Feeder-Layer*.

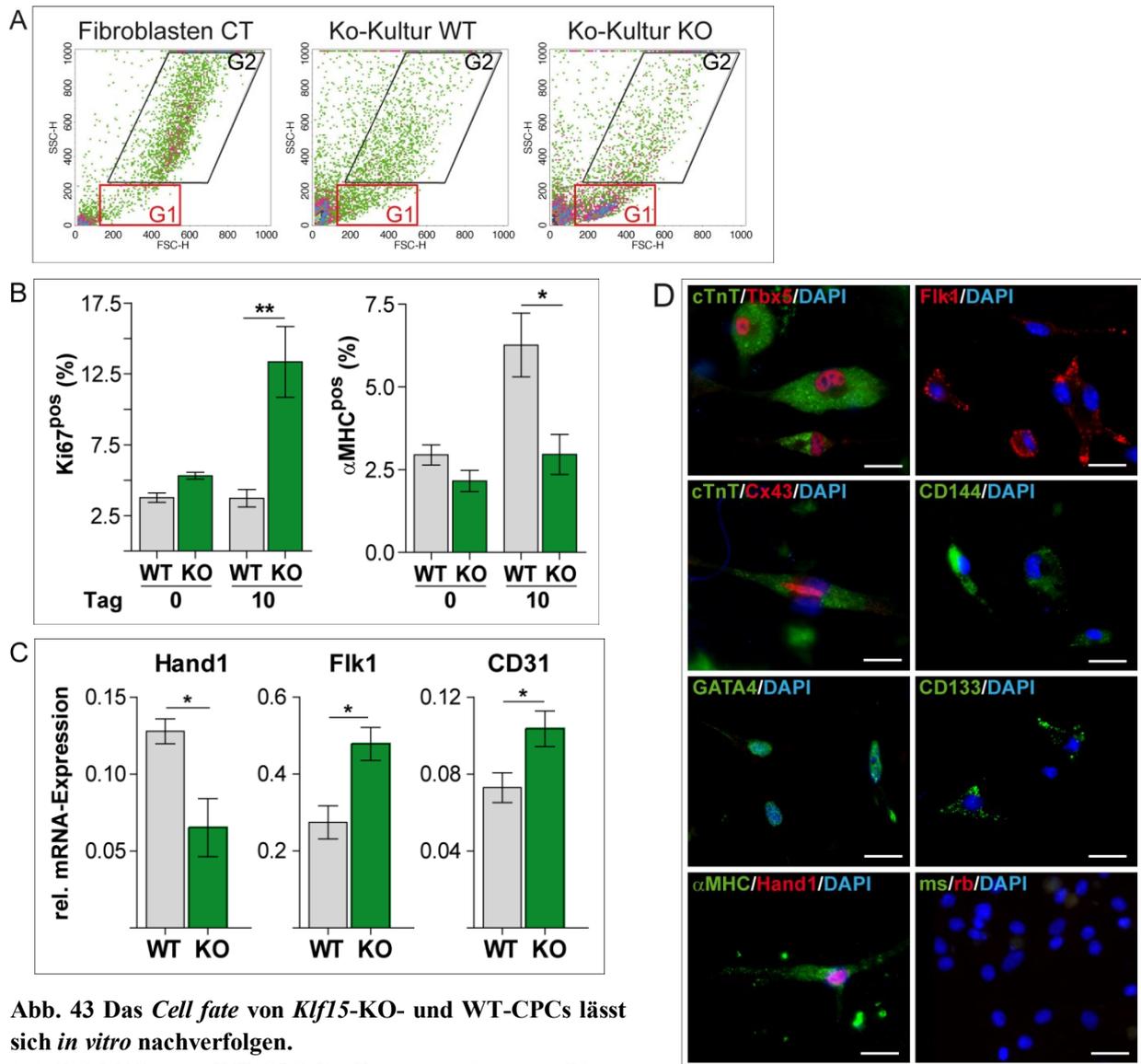
Die Zellen setzten sich gut auf den Fibroblasten ab und begannen nach ca. 5 Tagen Ausläufer zu bilden; nach 10 Tagen unter Differenzierungsbedingungen war bereits ein morphologischer Unterschied zwischen den *Klf15*-KO- und WT-Zellen erkennbar (**Abb. 42**). Zudem wurde beobachtet, dass der Fibroblasten-*Feeder-Layer* bereits reduziert vorlag und vor allem in den *Klf15*-KO-Ko-Kulturen stark vermindert war.



**Abb. 42** *Klf15*-KO- und WT-CPCs differenzieren unterschiedlich *in vitro*.

Repräsentative Fotos von *Klf15*-KO- und WT-CPCs nach 10-tägiger Ko-Kultivierung auf adulten, Zellzyklus-arretierten Fibroblasten. Die WT-CPCs bildeten vermehrt längliche Ausläufer, wohingegen die *Klf15*-KO-CPCs verstärkt proliferierten und eine andere Zellmorphologie aufwiesen. Maßstab 100 µm (obere Reihe) und 50 µm (untere Reihe).

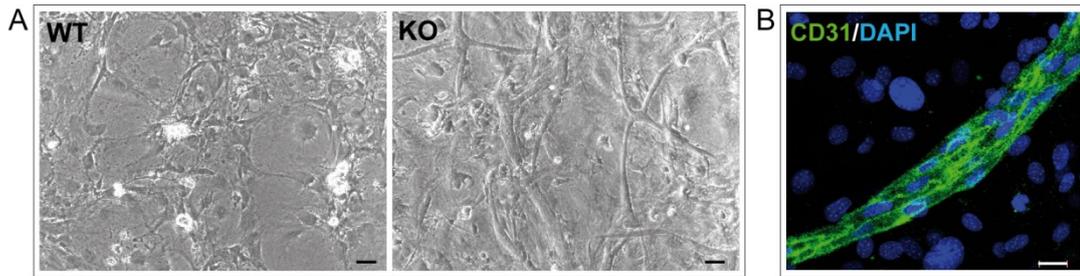
Zur durchflusszytometrischen Analyse sind die Zellen am Kulturtag 0 (vor Wechsel zum Differenzierungsmedium) und am Tag 10 bzgl. des Proliferationsmarkers Ki67 und des Kardiomyozyten-Markers  $\alpha$ MHC quantifiziert worden. Reine Fibroblasten-Kulturen dienten als Kontrolle und konnten bei der Durchflusszytometrie anhand ihrer Größe aus der Analyse ausgeschlossen werden (**Abb. 43A**). Eindeutig konnte mit diesem Kultursystem reproduziert werden, dass die *Klf15*-KO-CPCs stärker proliferierten (Tag 10, Ki67: WT  $3,7 \pm 0,6$  vs. KO  $13,4 \pm 2,5\%$ ) und weniger kardiomyogene Zellen erzeugten (Tag 10,  $\alpha$ MHC: WT  $6,3 \pm 1,0$  vs. KO  $3,0 \pm 0,6\%$ ) (**Abb. 43B**). Zusätzliche qrt-PCR-Analysen vom Kultivierungstag 10 bestätigten eine signifikant reduzierte Expression des kardialen Markers *Hand1* und eine signifikant erhöhte Expression des hämatokardiovaskulären Markers *Flk1* und des Endothel-Markers *CD31* ( $p < 0,05$ ; **Abb. 43C**). Zusätzlich wurden die *in vitro* Zell-Differenzierungen mittels Immunzytochemie hinsichtlich der Expression von weiteren kardialen (*Tbx5*, *cTnT*, *GATA4*, *Connexin43* [*Cx43*],  $\alpha$ MHC, *Hand1*) und endothelialen Markern (*CD133*, *CD144*, *Flk1*) belegt (**Abb. 43D**).



**Abb. 43** Das *Cell fate* von *Klf15*-KO- und WT-CPCs lässt sich *in vitro* nachverfolgen.

(A) *Klf15*-KO- und WT-CPC-Ko-Kulturen auf adulten Fibroblasten wurden vor und nach 10-tägiger Differenzierung mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Fibroblasten konnten aufgrund ihrer Größe aus der Analyse ausgeschlossen werden (Scatterplot Gate G2); im analysierten Gate G1 konnten bei den *Klf15*-KO-CPCs mehr Zellen gefunden werden. (B) Dies konnte durch Quantifizierung des Proliferationsmarkers Ki67 nach 10-tägiger Kultur bestätigt werden. Gleichzeitig wurde eine signifikant vermehrte Differenzierung zu kardialen  $\alpha$ MHC<sup>pos</sup>-Zellen in den WT-CPCs beobachtet, die in den *Klf15*-KO-CPCs ausblieb. (C) Qrt-PCR-Analysen der Zellen nach 10-tägiger Ko-Kultur ergaben eine signifikant geringere Expression von kardialen Hand1-Transkripten und signifikant erhöhte Expression von endothelialen Flk1- und CD31-Transkripten in den *Klf15*-KO- vs. WT-CPCs. (D) Mittels Immunfärbungen der kardialen Marker cTnT, Tbx5, Cx43, GATA4,  $\alpha$ MHC und Hand1 sowie der endothelialen Marker Flk1, CD144 und CD133 konnte die Differenzierung in die verschiedenen Zell-Linien gezeigt werden. B und C: n=9/Gruppe, Student's *t*-Test, \**p*<0,05; \*\**p*<0,01; D: Maßstab 20 $\mu$ m.

Nach 15-tägiger Kultivierung in Differenzierungsmedium wurde in den *Klf15*-KO- im Gegensatz zu WT-CPCs zudem die Ausbildung von Kapillar-artigen, Netzwerk-bildenden Zellstrukturen beobachtet, die positiv auf CD31 immunmarkiert werden konnten (Abb. 44).



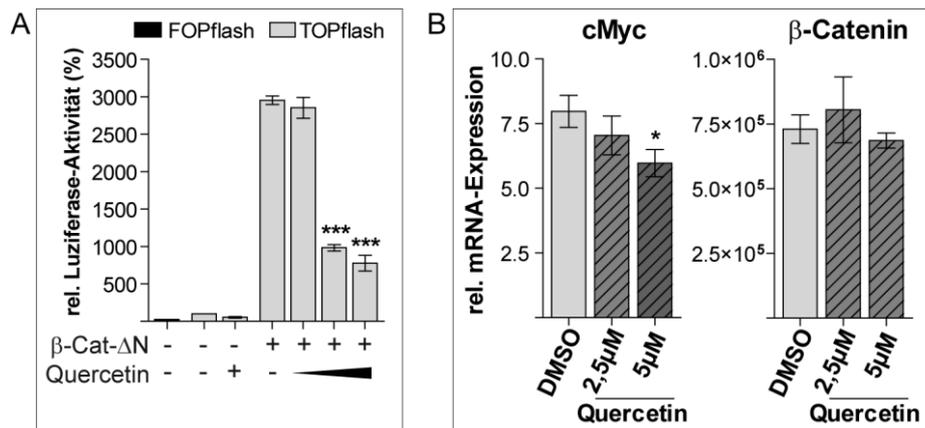
**Abb. 44** *Klf15*-KO-CPCs bilden CD31-positive-, Netzwerk-artige Strukturen *in vitro*.

(A) Bei Ko-Kultivierung von CPCs auf adulten Fibroblasten differenzieren die *Klf15*-KO vermehrt zu endothelialen Zellen. Sie bilden nach 15 Tagen in Kultur im Vergleich zu WT-CPCs große, Kapillar- und Netzwerk-artige Strukturen, (B) die sich positiv mit CD31 markieren lassen. Maßstab A: 50  $\mu$ m, B: 20  $\mu$ m.

Zusammenfassend war es möglich den endothelialen *in vivo*-Phänotyp der *Klf15*-KO-CPCs in einem *in vitro* Ko-Kultivierungssystem zu reproduzieren.

#### 4.10.1 Blockade des aktivierten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ändert das *Cell fate* in *Klf15*-KO-CPCs

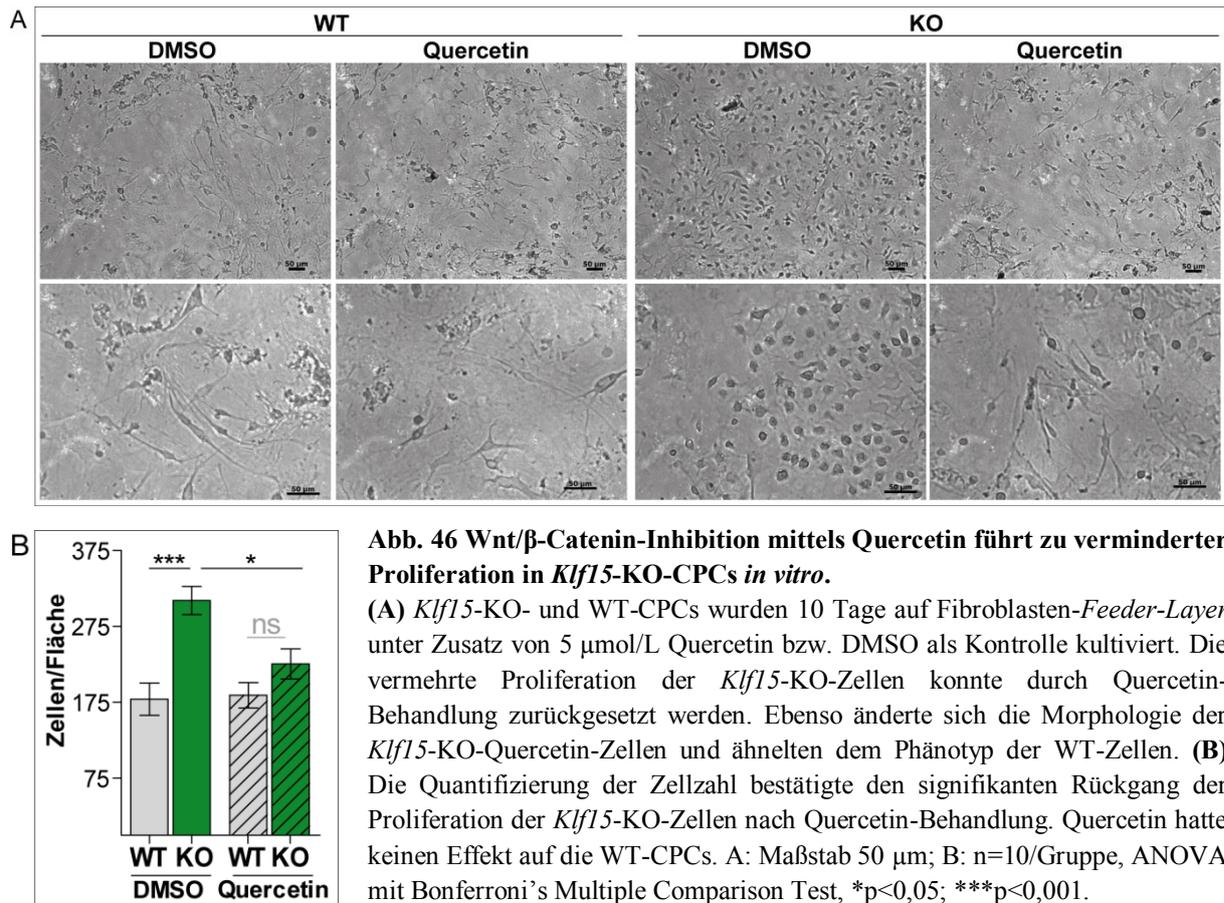
Es konnte bisher gezeigt werden, dass die CPCs aus *Klf15*-KO-Herzen im Vergleich zu denen aus WT-Herzen eine Aktivierung der  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkription aufweisen und dies das *Cell fate* in Richtung verstärkter Differenzierung zu endothelialen Zellen verschiebt. Um zu überprüfen, dass tatsächlich diese transkriptionelle Aktivierung zum veränderten *Cell fate* in den *Klf15*-KO-CPCs führte, sollte das etablierte Ko-Kultursystem für ein *Rescue*-Experiment genutzt werden. Dazu ist das Flavonoid Quercetin eingesetzt worden, von welchem gezeigt wurde, dass es die nukleare Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit TCF4 und somit die Transkriptionsaktivität unterbindet [85]. Diese Eigenschaft wurde zunächst unter Anwendung des pTOPflash- $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen-Luziferase-Reporter-Systems in HEK293-Zellen nachgewiesen (Abb. 45A). Als nächstes wurde die einzusetzende Konzentration im Ko-Kultur-System von WT-CPCs ausgetestet. Konzentrationen zwischen 2,5 und 50  $\mu$ mol/L Quercetin wurden für 10 Tage dem CPC-Differenzierungsmedium zugesetzt, die Zellen täglich morphologisch begutachtet und nach 10 Tagen eine RNA-Isolation vorgenommen. Es konnte festgestellt werden, dass Konzentrationen ab 10  $\mu$ mol/L graduell einen toxischen Effekt auf die Zellen ausübten. Qrt-PCR-Analysen zeigten eine signifikante Reduktion der Expression des Wnt/ $\beta$ -Catenin Zielgens cMyc bei 5  $\mu$ mol/L Quercetin-Behandlung ( $p < 0.05$ ), wobei die  $\beta$ -Catenin-Level selbst nicht beeinflusst wurden (Abb. 45B).



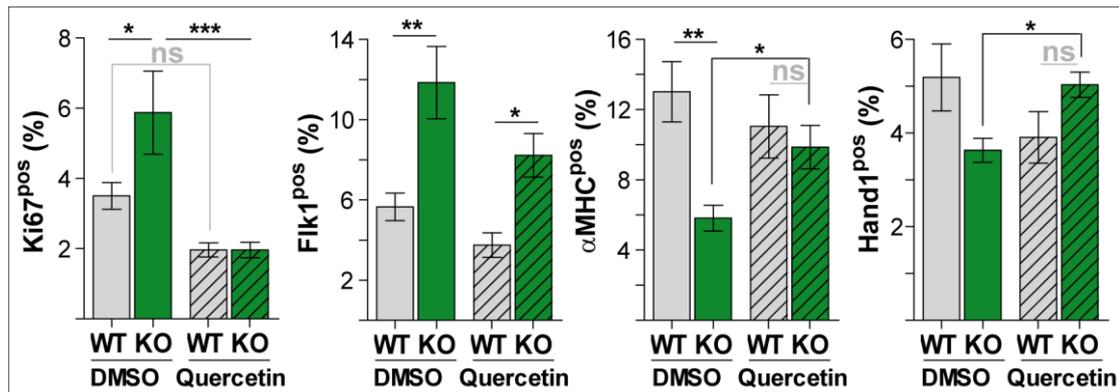
**Abb. 45 Quercetin ist ein potenter Inhibitor der Wnt/β-Catenin-abhängigen Transkription.**

(A) Das pTOPflash-Luziferase-Reportergen-System wurde in HEK293-Zellen mit stabilisiertem β-Catenin (β-Cat-ΔN) aktiviert. Mit Quercetin konnte diese β-Catenin/TCF-abhängige Transkription konzentrationsabhängig signifikant inhibiert werden. pFOPflash diente als Negativkontrolle und *Renilla*-Luziferase-Expression zum Normalisieren. (B) CPC-Fibroblasten-Ko-Kulturen wurden 10 Tage mit Quercetin behandelt und anschließend per qrt-PCR-Analyse analysiert. Es wurde bestätigt, dass kein Effekt auf β-Catenin selbst, aber eine verminderte Expression des Zielgens cMyc konzentrationsabhängig erfolgte. A: n=6/Gruppe, B: n=9/Gruppe, ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test, \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.

Im Folgenden wurden CPCs von *Klf15*-KO- und WT-Herzen auf Fibroblasten-*Feeder-Layer* kultiviert und 10 Tage mit 5 μmol/L Quercetin behandelt. Das Medium wurde alle 2 Tage erneuert und die jeweiligen Kontroll-Kulturen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Visuell konnte eine veränderte Morphologie und eine Reduktion der Proliferation der Quercetin-behandelten *Klf15*-KO-Zellen im Vergleich zu den DMSO-behandelten *Klf15*-KO-Zellen wahrgenommen werden (Abb. 46A), welches auch nach Quantifizierung der Zellzahlen bestätigt werden konnte (Abb. 46B).



Die durchflusszytometrische Analyse zeigte bei den DMSO-behandelten CPCs den bereits festgestellten Phänotyp sowohl der signifikant vermehrten Proliferation (Ki67: WT  $3,5 \pm 0,4$  vs. KO  $5,9 \pm 1,2\%$ ) als auch der vermehrten Flk1<sup>pos</sup>-Population (WT  $5,7 \pm 0,7$  vs. KO  $11,8 \pm 1,8\%$ ). Gleichzeitig lag eine verminderte kardiomyogene Differenzierung ( $\alpha$ MHC: WT  $13,0 \pm 1,7$  vs. KO  $5,8 \pm 0,7\%$ ; Hand1: WT  $5,2 \pm 0,7$  vs. KO  $3,6 \pm 0,3\%$ ) in den *Klf15*-KO- im Vergleich zu den WT-CPCs vor. Während die Behandlung mit Quercetin keinen signifikanten Effekt auf die WT-CPCs im Vergleich zu den DMSO-behandelten WT-CPCs zeigte, ermöglichte die Repression der  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkription mittels Quercetin eine teilweise Umkehrung des Phänotyps in den *Klf15*-KO-CPCs. Die Flk1<sup>pos</sup>-Population war im Vergleich zur *Klf15*-KO-DMSO-Gruppe nach Quercetin-Zugabe reduziert, allerdings lag noch eine signifikant höhere Population im Vergleich zu der WT-Gruppe vor. Jedoch wurde sowohl die signifikant erhöhte Anzahl an Ki67<sup>pos</sup>-Zellen (KO-DMSO  $5,9 \pm 1,2$  vs. KO-Quercetin  $2,0 \pm 0,2\%$ ) als auch die signifikante Reduktion der kardialen  $\alpha$ MHC<sup>pos</sup>- und Hand1<sup>pos</sup>-Populationen in den Quercetin-behandelten *Klf15*-KO-CPCs im Vergleich zu der *Klf15*-KO-DMSO-Kontrollgruppe aufgehoben ( $\alpha$ MHC: KO-DMSO  $5,8 \pm 0,7$  vs. KO-Quercetin  $9,9 \pm 1,2\%$ ; Hand1: KO-DMSO  $3,6 \pm 0,3$  vs. KO-Quercetin  $5,0 \pm 0,3\%$ ). Die Werte erreichten dabei nahezu das Niveau der WT-Kontrollgruppen (Abb. 47).



**Abb. 47 Das *Cell fate* von *Klf15*-KO-CPCs lässt sich durch *in vitro* Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibition umkehren.** *Klf15*-KO- und WT-CPCs wurden 10 Tage unter Zusatz von 5  $\mu$ mol/L des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibitors Quercetin bzw. als Kontrolle mit DMSO kultiviert und dann mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die DMSO-behandelten *Klf15*-KO-CPCs zeigten erhöhte Proliferation (Ki67<sup>pos</sup>), vermehrte endotheliale (Flk1<sup>pos</sup>) und verminderte kardiale ( $\alpha$ MHC<sup>pos</sup>, Hand1<sup>pos</sup>) Zellpopulationen im Vergleich zu den DMSO-WT-CPCs. Dieser Phänotyp konnte durch Quercetin-Behandlung umgekehrt werden: Die Proliferation der *Klf15*-KO-CPCs reduzierte sich auf das Niveau der WT-CPCs; die Flk1<sup>pos</sup>-Population verringerte sich signifikant im Vergleich zur DMSO-*Klf15*-KO-Gruppe; und die kardialen Populationen  $\alpha$ MHC<sup>pos</sup> und Hand1<sup>pos</sup> erhöhten sich signifikant auf das Level der WT-Populationen. Quercetin hatte keinen Effekt auf die WT-CPCs. n=9/Gruppe, ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test, ns: nicht-signifikant; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ein *in vitro*-Zellkultivierungssystem etabliert wurde, dass die *in vivo* detektierten CPC-Charakteristika reproduziert. Mit Hilfe der CPC-Fibroblasten-Ko-Kultur und der pharmakologischen Inhibition der  $\beta$ -Catenin/TCF-gesteuerten Transkriptionsaktivität wurde eine Umkehr des proliferativ-vermehrt endothelialen zum kardiomyogenen *Cell fate* der *Klf15*-KO-CPCs erzielt.

## 5 Diskussion

Umfangreiche Untersuchungen der letzten Jahre belegen eine entscheidende Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweges sowohl für die embryonale Kardiogenese als auch für die Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts des Herzens im ausgewachsenen Organismus. Vorausgegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe auf dem Gebiet des kardialen Remodellierungsprozesses haben einen wesentlichen Zusammenhang zwischen reduzierter  $\beta$ -Catenin/TCF-Transkriptionsaktivität und verbesserter Adaption auf kardialen Stress des adulten Herzens ermittelt [80]. Diese funktionelle Verbesserung konnte mit einer gesteigerten Differenzierung von endogenen kardialen Progenitorzellen in adulten Mäuserherzen nach Infarkt assoziiert werden [53]. Somit bietet eine Modulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ein vielversprechendes, strategisches Ziel zur positiven Einflussnahme auf die kardiale Regeneration.

Im Zentrum der Untersuchung stand das Protein  $\beta$ -Catenin, das jedoch nicht nur in der Zelle eine duale Funktion als Bestandteil des Adhäsions- und des Transkriptionskomplexes einnimmt, sondern auch ubiquitär von allen Zellen exprimiert wird. Deshalb wurde, um den Prozess der kardialen Regeneration im Detail besser zu verstehen und im nächsten Schritt durch gezielte Inaktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals positiv zu beeinflussen, nach Herz-spezifischen Interaktionspartnern von  $\beta$ -Catenin mittels Hefe-2-Hybrid Screening gesucht. In der vorliegenden Arbeit wurde einer der gefundenen Kandidaten, *Krüppel-like factor 15* (KLF15), als neuer kardialer Bindungspartner der Wnt-Signalwegs-Komponenten  $\beta$ -Catenin, NLK und TCF4 beschrieben. Zudem konnte KLF15 nicht nur als Inhibitor der  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkription im Kern, sondern hierin auch als relevanter Faktor der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade für die Regulation der Homöostase der adulten Herzfunktion identifiziert werden [86].

### 5.1 KLF15 interagiert als Inhibitor mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg

#### 5.1.1 KLF15 benötigt den C-Terminus zum Kernimport und unterschiedliche N- und C-terminale Proteininteraktionsdomänen zur Inhibition der $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelten Transkription

KLF15 wurde im Vorfeld in unabhängigen Hefe-2-Hybrid-Systemen sowohl mit dem Köder  $\beta$ -Catenin als auch mit dem nicht-kanonischen Wnt-Regulator NLK als Protein-Interaktionspartner identifiziert. Diese Ergebnisse sind in der vorliegenden Arbeit mittels endogener Ko-Immunitätspräzipitation aus adultem Herzgewebe bestätigt und zusätzlich eine Interaktion mit dem  $\beta$ -Catenin-Ko-Transkriptionsfaktor TCF4 nachgewiesen worden. Die Bindung von KLF15 mit diesen

Wnt-Signalwegs-Komponenten resultierte in eine signifikante Inhibition der  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelten Transkriptionsaktivität und greift somit regulatorisch in den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ein. Untersuchungen der für die Inhibition relevanten Protein-Interaktionsbereiche ergaben eine Notwendigkeit von mindestens zwei unterschiedlichen KLF15-Proteindomänen, die am N- und am C-Terminus lokalisiert werden konnten.

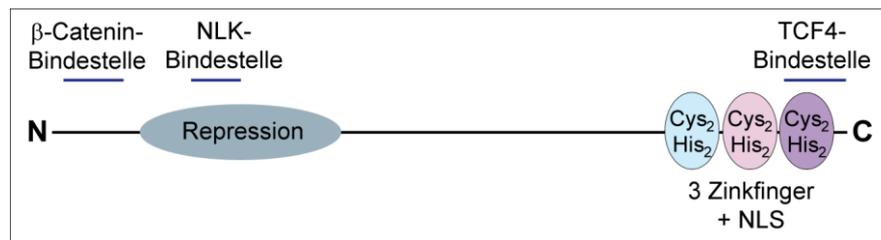
Da es sich bei KLF15 und dem  $\beta$ -Catenin/TCF4-Komplex um Transkriptionsfaktoren handelt, müssen diese im Zellkern ihre Aktivität entfalten. Für NLK ist bekannt und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass es sich um eine überwiegend im Kern vorkommende Kinase handelt [99]. Da für KLF15 zwar eine Kernlokalisierung angegeben wurde [75], aber die hierfür verantwortlichen Domänen unbekannt waren, sind in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen diesbezüglich mittels verkürzter KLF15-Konstrukte vorgenommen worden. Diese zeigten, dass der C-Terminus essentiell für den Kernimport ist. Alle N-terminal verkürzten Bereiche translozierten in den Zellkern, sofern der C-Terminus vorhanden war. Ohne diesen war KLF15 ausschließlich im Zytosol zu finden. Um in den Zellkern zu gelangen, können kleine Proteine passiv durch die Kernmembran diffundieren. Dies kommt allerdings nur für Proteine mit einer Größe von kleiner als 20 kDa in Frage [100]. Da KLF15 eine Größe von 45 kDa aufweist, ist der passive Kerntransport ausgeschlossen. Als zweite Möglichkeit können Proteine aktiv über die Erkennung von einer Nuklearen Lokalisationssequenz (NLS) bestehend aus mindestens vier basischen Aminosäuren über Importin-Rezeptoren transportiert werden [100]. Tatsächlich befindet sich im C-Terminus im zweiten Zinkfinger von KLF15 eine für eine NLS typische Abfolge: Die Aminosäuren 370 bis 375 bilden die Sequenz *Arg-His-Arg-Arg-Ser-His* mit Arginin (*Arg*) und Histidin (*His*) als basische Aminosäuren. Bereits Gray *et al.* (2002) vermuteten durch Sequenzanalysen um Aminosäure 369 eine potentielle NLS ohne dies funktionell überprüft zu haben [101]. Kürzlich publizierte Ergebnisse geben an, dass KLF15 den zweiten und dritten Zinkfinger für den Kerntransport benötigt [69]. Für das am besten untersuchte Mitglied der KLF-Familie KLF1 wurde gezeigt, dass eine zweiteilige NLS innerhalb der 3-Zinkfinger-Sequenz vorhanden ist [100, 102]. Ähnliche Ergebnisse liegen auch für KLF4 und KLF11 vor [63]. Für KLF8 wurden zwei notwendige Regionen im N-Terminus und im Zinkfinger-Bereich lokalisiert, die einen Kerntransport über Importin- $\beta$  vermitteln [103]. Da die Mitglieder der KLF-Transkriptionsfamilie eine hohe Sequenz-Konservierung im Bereich der drei Zinkfinger aufweisen, wird angenommen, dass eine NLS für alle KLFs dort kodiert vorliegt [102]. Passend dazu bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass sich im C-Terminus von KLF15 ebenfalls eine NLS befindet.

Interessanterweise ergab die kombinierte Auswertung der Peptid-SPOT-Array- und *in vitro* KoIP-Untersuchungen zusätzlich im C-Terminus im Bereich des dritten Zinkfingers eine Domäne zur TCF4-Interaktion. Somit ist die C-terminale Region nicht allein zum KLF15-Kernimport notwendig, sondern auch zur Protein-Protein-Interaktion. Dahingegen wurde die Bindestelle für  $\beta$ -Catenin im KLF15-N-Terminus auf den Bereich der Aminosäuren 6-35 eingegrenzt, während sich für die Interaktion zu

NLK eine im KLF15 weiter zentral gelegene Domäne im Bereich der Aminosäuren 86-110 ergab. Somit liegen im KLF15 mindestens drei unterschiedliche Protein-Interaktionsdomänen vor, die sich über weite Bereiche des Proteins verteilen und eine simultane Bindung der Proteine theoretisch ermöglichen. Dies ist nicht ungewöhnlich, da aus Interaktions-Studien bekannt ist, dass Proteine in der Regel mehr als einen Interaktionspartner zur selben Zeit binden [104]. Zudem sind ca. 80% der humanen Proteine Bestandteil eines Proteinkomplexes innerhalb einer Signalkaskade [105].

Mutationsstudien mit verkürzten KLF15-Konstrukten bei  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Reporter-Gen-Assays ergaben, dass sowohl eine N-terminale Domäne im Bereich zwischen Aminosäure 46 und 151 als auch der C-Terminus von KLF15 für die Inhibition notwendig sind. Daraus ergibt sich erstens, dass KLF15 eine repressive Transkriptionsfunktion im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg einnimmt, und zweitens, dass  $\beta$ -Catenin für die Inhibition nicht notwendig zu sein scheint, da auch die KLF15-Mutante ohne die identifizierte  $\beta$ -Catenin-Binderegion eine Inhibition auslöste. Die hier ermittelte Repressionsdomäne im N-Terminus von KLF15 ist kongruent zu Angaben von Uchida *et al.* (2000), dessen Untersuchungen von KLF15 am N-Terminus eine Serin- und Prolin-reiche Sequenz gefolgt von einem Glutaminsäure-Muster als Repressionsdomäne für den CLC-Typ Chloridkanal in Nieren nachwies [75]. In der Maus-Retina konnte KLF15 als Inhibitor des Rhodopsin-Promoters identifiziert werden. Hierbei wurde der Bereich auf die Aminosäuren 66 bis 265 lokalisiert und auch der C-Terminus als notwendig angegeben [106]. Aber KLF15 fungiert nicht nur als Repressor, sondern wurde besonders im metabolischen Kontext als Aktivator in der Leber und in Adipozyten beschrieben [107, 108]. Für die Aktivierung des Insulin-sensitiven Glukosetransporters GLUT4 in Fett- und Glattmuskelzellen wurde die KLF15-Domäne auf die 58 bis 200 Aminosäure-Region eingegrenzt [101]. Diese überlappenden Ergebnisse bezüglich der Repressions- und Aktivierungsdomänen von KLF15 in verschiedenen Zell-Systemen ließ sich auch bei anderen Mitgliedern der KLF-Familie wie z.B. KLF3, KLF4 und KLF11 nachweisen, abhängig davon welche Kofaktoren und/oder post-translationalen Modifikationen vorlagen und somit eine Gewebe-spezifische Reaktionen hervorriefen [109]. Kongruent dazu fügt die vorliegende Arbeit eine kardial-spezifische Regulation der  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkription durch KLF15 hinzu. Eine Identifikation von weiteren Ko-Faktoren wird hilfreich sein, um diesen kardial-spezifischen Mechanismus zu verstehen.

**Abb. 48** fasst die hier identifizierten Domänen zusammen.



**Abb. 48 Schema der bekannten und identifizierten KLF15-Domänen.**

Wie bereits bekannt liegen am C-Terminus von KLF15 die drei Zinkfinger (Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>). Hier wurde gezeigt, dass in dieser Region zusätzlich eine NLS vorhanden sein muss und am dritten Zinkfinger die Proteinbinde-Domäne für TCF4 liegt. N-terminal gelegen wurde eine Repressionsdomäne zur Inhibition der β-Catenin/TCF-abhängigen Transkription identifiziert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass β-Catenin und NLK mittels unterschiedlicher Domänen am KLF15-N-Terminus interagieren.

### 5.1.2 Gesteigerte TCF4-Ubiquitinierung durch KLF15 trägt zur Repression des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs bei

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der KLF15-C-Terminus als auch eine N-terminale Domäne, welche mit der zur NLK-Interaktion relevanten Sequenz übereinstimmt, für die Inhibition der β-Catenin/TCF-vermittelten Transkription notwendig ist. Daraufhin stellte sich die Frage nach dem Repressionsmechanismus. Generell lässt sich die Wnt/β-Catenin-Signalkaskade in jeder Stufe inhibieren. Ein wichtiges Beispiel aus der Kardiogenese bildet die Blockade der Wnt-Rezeptor-Aktivierung durch *Insulin-like Growth-Factor-Binding Protein 4* (IGFBP-4) zur Differenzierung von kardialen Progenitorzellen [110]. Aber auch die Beeinflussung der zytosolischen β-Catenin-Proteinlevel wie z.B. durch Presenilin-1-vermittelte Phosphorylierung und damit Markierung zum proteasomalen Abbau [111] oder die Verhinderung der Kernakkumulation von β-Catenin wie durch Emerin demonstriert [112], sind möglich. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass weder die β-Catenin-Expression auf mRNA-Ebene noch zytosolische oder nukleare β-Catenin-Proteinmengen durch KLF15 verändert wurden, war ein Einfluss auf die Neusynthese, den proteasomalen Abbau und die Translokation vom Zytosol in den Kern auszuschließen.

Als weiterer Inhibitionsmechanismus ist eine Blockade der Interaktion zwischen β-Catenin und TCF/LEF oder zu anderen transkriptionellen Ko-Faktoren möglich. Beispielsweise sind die endogenen Inhibitoren Duplin [113], Reptin52 [114], *Inhibitor of β-Catenin and TCF4* (ICAT) [57, 115] und Chibby [116] bekannt, die mit TCF/LEF um dieselbe Interaktionsregion an den zentralen *arm Repeats* konkurrieren. Hierbei sind vor allem Duplin und Chibby während der Kardiogenese als relevant zur Mesoderm-Induktion [113] bzw. zur kardialen Differenzierung nachgewiesen worden [116]. Analysen der Bindungsdomänen mittels Peptid-SPOT-Array weisen darauf hin, dass KLF15 an den N- oder den C-Terminus von β-Catenin binden kann. Hierbei ist bedeutsam, dass keine Interaktionen von KLF15 an den zentralen *arm Repeats* festgestellt wurde, sondern mit der Region, an der transkriptionelle Ko-Aktivatoren binden [58]. Interessanterweise wurde für den vor allem im Epithelium des Gastro-

Intestinal-Trakts exprimierten Transkriptionsfaktor KLF4 nachgewiesen, dass dieser ebenfalls – wie in der vorliegenden Arbeit KLF15 – an  $\beta$ -Catenin bindet, dessen proteasomalen Abbau unbeeinflusst lässt und die transkriptionelle Aktivität mit TCF4 unterbindet [117]. Die Autoren belegen, dass KLF4 nicht den Komplex zwischen  $\beta$ -Catenin und TCF4 inhibiert, sondern mit dem C-Terminus von  $\beta$ -Catenin interagiert und dort mit der Bindung der Histon-Acetyl-Transferasen CBP/p300 am  $\beta$ -Catenin konkurriert. Weitere Ähnlichkeiten mit dem in der vorliegenden Arbeit untersuchtem KLF15 zeigen die Interaktionsdomänen von KLF4, welches über eine N-terminale Domäne an  $\beta$ -Catenin bindet, und auch über den C-Terminus mit den Zinkfingern eine Proteinbindung zu TCF4 herstellt [118].

Mittels Peptid-SPOT-Arrays konnte gezeigt werden, dass auch KLF15 über seine Zinkfinger-Domäne an die DNA-bindende Domäne (DBD) von TCF4 bindet. Alanin-Substitutions-Arrays der DBD geben einen Hinweis darauf, dass hierfür besonders die vier Aminosäuren N-terminal zur SOX-TCF HMG-Box relevant sind, so dass auch hier ein möglicher Repressionsmechanismus vermutet werden kann. Für das Wilms-Tumor Protein1 (WT1), ein weiteres Zinkfinger Protein, wurde eine Interaktion sowohl mit der DNA als auch mit der HMG-Box des SRY-Transkriptionsfaktors gezeigt [119]. Jedoch lässt sich aus den durchgeführten Reporter-Gen-Analysen mit den verkürzten KLF15-Mutanten ableiten, dass die C-terminale Interaktion von KLF15 mit TCF4 allein nicht zur Inhibition ausreicht, da hierfür gleichzeitig auch eine N-terminale Domäne notwendig ist. Diese konvergiert mit der identifizierten NLK-Bindedomäne.

Die detaillierte Untersuchung der KLF15-Bindestelle am NLK zeigte eine Interaktion in der katalytischen Domäne der Ser/Thr-Kinase. Alanin-Substitutions-Arrays demonstrierten klar, dass ein Austausch der Aminosäure Asparagin an Position 196 (Asn196) keine Bindung zum KLF15 im Peptid-SPOT-Assay mehr erlaubt. Allerdings muss eingeräumt werden, dass eine *in vitro* Validierung mittels Mutationsanalysen zur Bestätigung noch aussteht. Bei dieser NLK-Position handelt es sich um eine polare Aminosäure, die prädestiniert ist, mit anderen polaren Aminosäuren zu interagieren [120]. Passend dazu wurde für die NLK-Interaktion auf Seiten des KLF15 eine Glyzin (Gly)- und Serin (Ser)-reiche Sequenz (Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser) zwischen Aminosäure 87 und 95 detektiert - eine klare Abfolge von polaren Aminosäuren. Es kann vermutet werden, dass NLK eines der Serine phosphoryliert. Allerdings handelt es sich bei NLK um eine Prolin-dirigierte Ser/Thr-Kinase, die nur Serin bzw. Threonin direkt gefolgt von einem Prolin phosphoryliert [121, 122]. Es wurde aber mehrfach gezeigt, dass NLK die  $\beta$ -Catenin Ko-Faktoren LEF1 an Thr155 und Ser166 und TCF4 an Thr178 und Thr179 phosphoryliert (jeweils gefolgt von einem Prolin) und so die  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängige Transkription reguliert. Die Interaktion von TCF4 zu  $\beta$ -Catenin *per se* wird nicht verändert; die Phosphorylierungsstellen sind zwischen der  $\beta$ -Catenin-bindenden Domäne und der HMG-Box lokalisiert [96, 97]. Diese Regulation erfolgt Zelltyp-abhängig; in HeLa- und HEK293-Zellen wurde eine negative und in neuronalen Progenitorzellen eine positive Regulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals vermittelt [122], so dass auch hier weitere interagierende Kofaktoren eine wesentliche

Rolle zu spielen scheinen. Kanei-Ishi *et al.* (2008) identifizierten die E3 Ubiquitin-Ligase *Fbxw7a* zur cMyb-Ubiquitinierung, welches zuvor durch NLK phosphoryliert wurde [123]. Arbeiten von Yamada *et al.* (2006) zeigen, dass der NLK-Interaktionspartner *NLK-associated RING finger protein* (NARF) die Faktoren LEF/TCF nach Phosphat-Modifizierung durch NLK ubiquitiniert und für den proteasomalen Abbau markiert. Auch bei NARF handelt es sich um eine E3 Ubiquitin-Ligase, die ein dem Zinkfinger verwandtes Motiv zur Chelatierung von zwei Zinkionen aufweist [124].

In der vorliegenden Arbeit konnte unter KLF15-Überexpression eine verstärkte TCF4-Ubiquitinierung nachgewiesen werden, die im gegenteiligen Modell einer *Klf15*-Knockout-Maus reduziert im Herzgewebe vorlag. Aus den verschiedenen Interaktionsstudien lässt sich folgern, dass KLF15 mit  $\beta$ -Catenin, TCF4 und NLK einen Protein-Komplex bildet, der mutmaßlich über eine Phosphorylierung von TCF4 mittels NLK die Ubiquitinierung von TCF4 fördert. Auf welche Weise diese Regulation genau erfolgt, konnte mit den durchgeführten Experimenten nicht ermittelt werden. Auch ist die Relevanz der Interaktion von KLF15 zu  $\beta$ -Catenin in diesem Komplex nicht klar, da im  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Reporter-Gen-Assay auch die KLF15-Mutante ohne die identifizierte  $\beta$ -Catenin-Binderegion eine Inhibition auslöste. Ishitani *et al.* (1999) vermuten in ihrer Publikation, dass  $\beta$ -Catenin eine Brückenfunktion zwischen NLK und TCF4 bzw. LEF1 übernimmt [96], konnten dies aber nicht experimentell belegen. Weitere Untersuchungen des Komplexes zwischen KLF15,  $\beta$ -Catenin, TCF4 und NLK werden notwendig sein, um den genauen repressiven Mechanismus auf die  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelte Transkription im Herzen zu klären. Denkbar sind in diesem Zusammenhang siRNA- und/oder Mutationsassays, um einzelne Faktoren aus dem Komplex zu entfernen bzw. nicht-funktionell zu verändern und darüber die Relevanz für den Repressionsmechanismus zu ermitteln. Auch ist keine E3 Ubiquitin-Ligase in diesem Komplex bekannt, welche die Ubiquitinierung von TCF4 durchführt. Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen den Zinkfinger-Domänen von KLF15 und RING-Proteinen sollte eine Untersuchung hinsichtlich einer E3-Aktivität von KLF15 zukünftig durchgeführt werden. Obwohl es sich bei KLF15 um einen Transkriptionsfaktor handelt, ist eine Regulation auf Protein-zu-Protein-Ebene nicht auszuschließen. Sinner *et al.* (2007) zeigten, dass der Transkriptionsfaktor Sox17 direkt mit  $\beta$ -Catenin und TCF4 binden und einen proteasomalen Abbau einleiten kann ohne die Transkription *per se* zu beeinflussen [125]. Nichtsdestotrotz ist auch ein zusätzlicher Regulationsmechanismus durch KLF15 auf Promotorebene von TCF/LEF möglich, welches die starke Inhibition des TCF/LEF-abhängigen Luziferase-Genreporters erklären könnte. Auch für Sox17 wurde zusätzlich zur Protein-Protein-Wechselwirkung eine Regulation am Lef1-Promoter beobachtet [126]. Weitergehende Interaktions- und Promoter-Studien werden Aufschluss über diesen Mechanismus geben und hoffentlich in naher Zukunft Möglichkeiten aufzeigen, diesen Komplex pharmakologisch zu beeinflussen oder Gen-therapeutisch zu nutzen.

## 5.2 Systemische *Klf15*-Knockout-Mäuse weisen kardial-spezifische $\beta$ -Catenin/TCF-Aktivierung und maladaptive Herzfunktion auf

Der identifizierte Komplex aus KLF15,  $\beta$ -Catenin, TCF4 und NLK zur Inhibition der  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkription wurde in der vorliegenden Arbeit auch mittels Untersuchung eines *Klf15*-Knockout-Mausmodells validiert und somit eine Relevanz *in vivo* bestätigt. Während die durchgeführten Interaktionsstudien *in vitro* weitestgehend durch Überexpression von *Tag*-markiertem KLF15 ermittelt wurden, liegt in dem Mausmodell ein funktioneller Verlust von endogenem KLF15 vor. Dieser ist in von Dr. Schäffer durch einen nahezu vollständigen Austausch des kodierenden Bereiches von KLF15 gegen einen nicht-funktionellen Abschnitt eines Rekombinationsvektors generiert worden. Es handelt sich um einen konventionellen Knockout, bei dem ein homozygoter Verlust von KLF15 im gesamten Organismus der Maus vorliegt. Bemerkenswerterweise liegt trotz dieses systemischen *Klf15*-KO eine Anschaltung der  $\beta$ -Catenin/TCF4-vermittelten Transkriptionsaktivität lediglich im Herzgewebe vor, wie *in vitro* beobachtet werden  $\beta$ -Catenin mRNA- und Protein-Level selbst nicht beeinflusst. Eine verminderte TCF4-Ubiquitinierung ist ebenfalls detektierbar gewesen. Sowohl mRNA- als auch Protein-Untersuchungen demonstrierten, dass die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zielgene *Tcf4* und *cMyc* in Herzen signifikant hochreguliert waren, wohingegen Analysen von Leber, Lunge und Niere keinen Unterschied ergaben. Es zeigte sich lediglich in der Leber für die *cMyc*-, aber nicht die *Tcf4*-Expression eine Runterregulierung in den *Klf15*-KO, welches auf eine andere Organ-spezifische Regulation hinweist. Somit liegt bei Verlust von KLF15 im Herzen eine bisher unbekannte Dysregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges vor.

Interessanterweise zeigten die KO-Mäuse zudem nur im Herzen einen offensichtlichen funktionellen Phänotyp, der erst bei ausgewachsenen Mäusen auftrat. Detaillierte Untersuchungen des Mausmodells, von Dr. Schäffer durchgeführt, zeigten keine weiteren Defekte. Der *Klf15*-KO hatte keinen Effekt auf die Embryogenese und Vitalität der Mäuse. Dies lässt sich durch die geringe *Klf15*-mRNA-Expression in embryonalen und postnatalen Entwicklungsstadien von Wildtyp-Mäusen erklären. Wie demonstriert wird KLF15 erst im adultem Alter hoch exprimiert. Ähnliche Ergebnisse an Ratten zeigten 3 Tage postnatal kaum detektierbare *Klf15*-mRNA-Level, während bei 30 Tagen postnatal ein Anstieg zu verzeichnen war [76]. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Echokardiographien zeigten bei den *Klf15*-KO-Mäusen eine mit dem Alter zunehmende Verschlechterung der Herzfunktion, die bereits bei einem Alter von nur ca. 16 Wochen evident wird. Dieser Phänotyp weist bei Verlust von KLF15 auf einen beschleunigten Übergang zur Herzinsuffizienz hin, der auf Organebene klinisch mit einer kardialen Seneszenz gleichgesetzt wird. Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen chronischer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges und beschleunigter Seneszenz, allerdings ist der Mechanismus im Herzen bisher kaum untersucht und beteiligte Faktoren sind weitestgehend unbekannt [127, 128].

Bei 16-Wochen alten *Klf15*-KO-Mäusen zeichnet sich der kardiale Phänotyp im Wesentlichen durch eine Verschlechterung der Pumpfunktion gemessen an der Verkürzungsfraction und dem Auswurfvolumen der linken Herzkammer aus. Es wurden weder funktionell noch morphologisch noch molekular signifikante hypertrophe oder atrophe Veränderungen des Herzens im basalen Zustand gefunden. Weitere Faktoren wie verstärkter Kardiomyozyten-Verlust oder Remodellierung durch Kollageneinlagerungen sind ebenfalls nicht verzeichnet worden. Dies ist kongruent zu Untersuchungen einer Arbeitsgruppe mit einer ähnlich konstruierten *Klf15*-Knockout-Maus. Dabei wurde in diesen 12-16 Wochen alten Mäusen ebenfalls keine Änderung der Wanddicken des linken Ventrikels gemessen, dahingegen aber eine klare Abnahme der Pumpfunktion, ebenfalls mittels Echokardiographie ermittelt. Im Unterschied wird von den Autoren gezeigt, dass diese Mäuse bereits im basalen Stadium eine leichte, aber signifikante Weitung des linken Ventrikels und ein erhöhtes Herzgewicht aufweisen [76]. Allerdings zeigen zusätzlich zur Verfügung gestellte Daten im online-Anhang von derselben Publikation diesbezüglich keine Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen [76], welche mit den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten übereinstimmen. Im Alter von 16 Wochen wurde ein leichter, aber nicht statistisch signifikanter Anstieg im Diameter des linken Ventrikels beobachtet. Die hier präsentierten und von Fisch *et al.* (2007) publizierten Daten ergeben zusammen betrachtet eine Übereinstimmung in der systolischen Dysfunktion von *Klf15*-KO-Mäusen ohne klare Ausbildung einer kardialen Hypertrophie.

Weiterführende Untersuchungen an *Klf15*-KO-Mäusen, die mittels chronischer Angiotensin II-Infusion bzw. transverser Aortenkonstriktion (TAC) hämodynamischer Belastung ausgesetzt worden waren, zeigten deutliche Anzeichen einer Herzinsuffizienz mit stark dilatierten Herzkammern. Besonders *Klf15*-KO-TAC-operierte Mäuse reagierten negativ auf die Drucküberlast, die in einer drastischen Erhöhung der Mortalität gegenüber den Wildtyp-Mäusen resultierte. Fisch *et al.* (2007) unternahmen ähnliche Untersuchungen und setzten ihre *Klf15*-KO-Mäuse der ascendierenden Aortenkonstriktion (AAC) aus. Hierbei wird die Aorta bereits im aufsteigenden Ast verengt, welches im Vergleich zur TAC eine gesteigerte Belastung auslöst und einen schnelleren Verlauf zu kardialer Hypertrophie und Insuffizienz induziert [93]. Nichtsdestotrotz stimmten die Ergebnisse mit denen in der vorliegenden Arbeit gezeigten überein: Die *Klf15*-KO-Mäuse wiesen eine starke Mortalität und einen vorangegangenen rapiden Verlauf zur maladaptiven Herz-Remodellierung auf, gemessen an links-ventrikulären Wanddimensionen, stark dilatierten linken Herzkammern und enorm reduzierten Auswurfvolumina; zudem wurden drastisch erhöhte Hypertrophie-assoziierten Marker und Kollageneinlagerungen in das Herzmuskelgewebe detektiert [76, 77]. Besonders letzteres führt zur Versteifung des Organs und behindert die lebenswichtige Kontraktionsfähigkeit des Herzens [15]. Es wurde gefolgert, dass KLF15 eine anti-hypertrophe und anti-fibrinogene Rolle im adulten Herzen einnimmt. Bemerkenswerterweise zeigten Analysen von humanen Herzbiopsien, dass Patienten mit Hypertrophie des linken Ventrikels, ausgelöst durch eine chronische Aortenstenose, signifikant

reduzierte KLF15-Level im Vergleich zu Patienten ohne Hypertrophie aufwiesen [76]. Diese Ergebnisse zeigen, dass KLF15 eine essentielle Rolle in adulten Herzen einnimmt und ein gestörtes Gleichgewicht sich negativ auf die Herzfunktion auswirkt, nicht nur in Mausmodellen, sondern auch in klinisch relevanten Pathologien beim Menschen und somit ein interessantes pharmakologisches Ziel darstellt.

### **5.3 KLF15 beeinflusst die Homöostase von endogenen kardiovaskulären Progenitorzellen über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg**

Neben der Analyse der *Klf15*-KO-Maus sind auch Untersuchungen eines transgenen Mausmodells, welches sich durch eine auf Kardiomyozyten-spezifische und induzierbare  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung auszeichnet, durchgeführt worden. Diese Mäuse zeigen interessanterweise einen gleichartigen Phänotyp wie die *Klf15*-KO-Mäuse, welche eine kardial chronische Aktivierung der  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelten Transkription aufwiesen. 16 Wochen nach Einleitung der  $\beta$ -Catenin-stabilen Transgenität, zeigten diese Mäuse im Vergleich zu den gleich-behandelten Kontrollmäusen keine Unterschiede in den Wanddicken und Diameter des linken Ventrikels, wohingegen die systolische Herzfunktion signifikant reduziert vorlag. Dieser parallel verlaufende Phänotyp lässt eine weitere Assoziation zwischen KLF15 und der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade zu.

Zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen kardial-spezifischen Mausmodellen mit stabilisierter  $\beta$ -Catenin-Expression haben gezeigt, dass eine aktivierte Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade zwar für das hypertrophe Wachstum der adulten Kardiomyozyten notwendig ist [129, 130], aber eine  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung einen negativen Effekt auf die kardiale Remodellierung ausübt [80, 131]. Insgesamt ist heute akzeptiert, dass eine Inhibition der Wnt-Signaltransduktionskette sich günstig auf die kardiale Remodellierung auswirkt [51, 52]. Arbeiten unserer Gruppe zeigten, dass eine kardiale Runterregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges nach induziertem Myokardinfarkt in Mäusen zu verbesserter kardialer Funktion mit einer erhöhten Überlebensrate führte. Zudem wurde festgestellt, dass die transgenen Mäuse eine vermehrte kardiomyogene Differenzierung von endogenen  $\text{Sca1}^{\text{pos}}$ -Progenitorzellen aufwiesen [53]. Analysen der endogenen kardiovaskulären Progenitorzellen (CPCs) aus adulten *Klf15*-KO-Hezen zeigten eine signifikant erhöhte proliferative CPC-Population und eine Verschiebung des Gleichgewichts der Vorläufer-Zellen zu einem vermehrt endothelialen Zellschicksal (*Cell fate*) auf Kosten der kardiomyogenen Linie im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen. Auch hier liegt ein paralleler Phänotyp zum Mausmodell mit kardial stabilisiertem  $\beta$ -Catenin vor: Die *in vitro* Differenzierung von CPCs dieser Mäuse resultierte in einer verminderten kardiomyogenen Kapazität [53]. An isolierten  $\text{Sca1}^{\text{pos}}$ -Zellen von *Klf15*-KO-CPCs ist entsprechend die bereits im gesamten Herz detektierte Aktivierung der  $\beta$ -Catenin/TCF4-abhängigen Transkription nachgewiesen worden. Die pharmakologische Inhibition der  $\beta$ -Catenin/TCF4-Interaktion in CPCs aus *Klf15*-KO-

Herzen erlaubte eine fast vollständige Wiederherstellung der *Cell fate*-Homöostase *in vitro*, so dass ein klarer Zusammenhang zwischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade und der CPC-Homöostase in den *Klf15*-KO-Herzen demonstriert wurde.

### **5.3.1 Der Verlust von funktionellem KLF15 verschiebt das *Cell fate* von CPCs auf Seiten der Endothelzellen *in vivo***

Aus der embryonalen Kardiogenese ist bekannt, dass während der gesamten Entwicklung eine fein abgestimmte Regulation der Wnt-Signalkaskade von enormer Bedeutung ist. Für die Spezifikation der mesodermalen Zellen in die verschiedenen kardialen multipotenten Linien ist eine Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals notwendig, wohingegen die Vermehrung dieser Zell-Populationen ein positives Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signal erfordert; ein erneutes Abschalten dieser Signalkette fördert schließlich die Differenzierung der Vorläuferzellen in Kardiomyozyten [61]. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass endogene Stammzellen demselben Muster wie in der Embryogenese folgen. Passend dazu wurde nicht nur die Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade in den CPCs aus den *Klf15*-KO-Herzen nachgewiesen, sondern auch eine erhöhte Proliferation dieser Zellen. Diese Selbst-Erneuerung und -Erhaltung ist ein wesentliches Kriterium für Stamm- und Progenitorzellen [36]. Die Wnt-abhängige Proliferation wurde bereits für Stammzellen der kardialen, intestinalen, neuronalen und hämatopoetischen Linie sowie in der Hypophyse und Zähnen belegt [50, 132].

Weitere quantitative Analysen der isolierten CPCs resultierten in einer signifikant erhöhten Stammzell-Population positiv für *Sca1* oder *c-Kit* in den *Klf15*-KO-Herzen. In Ermangelung eines definitiven kardialen CPC-Markers wurde sich deshalb für die Analyse der im adulten Herzen vorhandenen CPC-Population dieser beiden allgemeinen Stammzell-Marker bedient. *Sca1* wurde bisher auf frühen hämatopoetischen Zellen, Vorläufern aus Leber, Lunge, Skelettmuskel, Prostata, Haut und dem kardiovaskulären System gefunden [133]. Andere Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der kardialen Stammzell-Forschung nutzten ebenfalls den *Sca1*-Marker und zeigten das Potential dieser Zellen, *in vitro* zu Kardiomyozyten und endothelialen Zellen zu differenzieren [134, 135]. Oh *et al.* (2003) verwendeten ein vergleichbares Protokoll wie in der vorliegenden Arbeit und isolierten 14-17% *Sca1*<sup>pos</sup>-Zellen aus adulten Mausherzen [30]. Diese Werte entsprechen den hier gezeigten Ergebnissen, die für Wildtyp-Herzen bei ca. 15% liegen. Im Gegensatz dazu wurden weniger als 1% *c-Kit*<sup>pos</sup>-Zellen isoliert. *c-Kit* gehört zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ist im Wesentlichen auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Allerdings ließen sich auch *c-Kit*<sup>pos</sup>-Zellen aus adulten Mausherzen isolieren, die vorhandene Anzahl ist allerdings enorm gering und wird mit 1 auf 10.000 Kardiomyozyten angegeben [25], welches die geringe Isolation erläutert. Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass aus *c-Kit*<sup>pos</sup>-Population im adulten Herzen keine Differenzierung zu Kardiomyozyten erfolgt [136, 137] und nehmen an, dass es sich dabei vielmehr um Mastzellen handelt [8]. Ko-Färbungen von

c-Kit<sup>pos</sup>-Zellen mit kardialen Markern waren in der vorliegenden Arbeit verschwindend gering, so dass diese Stammzell-Population in weiteren Experimenten nicht weiter verfolgt und stattdessen das Sca1-Epitop verwendet wurde.

Über quantitative mRNA-Expressions-Untersuchungen von isolierten Sca1<sup>pos</sup>-Zellen aus *Klf15*-KO und WT-Herzen ist die Hochregulation der  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkription wie zuvor im gesamten Herzen auch für diese Stammzell-Population nachgewiesen worden, so dass gezeigt werden konnte, dass sich der Verlust von KLF15 nicht nur auf differenzierte Zellen des Herzens, sondern auch auf die frühen Vorläuferzellen auswirkt. Zur breiten Analyse dieser CPC-Populationen wurde eine Kombination aus dem generellen Stammzell-Marker Sca1 (und z.T. c-Kit), den hämatokardiovaskulären Markern Flk1 und CD133, sowie verschiedenen Zell-Linien-spezifischen Markern eingesetzt. Hierzu zählen die frühen kardialen Transkriptionsfaktoren Hand1, Hand2 und Tbx5, welche in der embryonalen Kardiogenese eine wesentliche Rolle einnehmen [43, 45], und das Strukturprotein  $\alpha$ MHC, das frühe differenzierte Kardiomyozyten markiert [46]. Um Endothelzellen zu detektieren wurden die klassischen Marker CD31/PECAM1, von-Willebrand-Faktor (vWF) und CD105 verwendet. Während CD31 als Zelladhäsionsprotein auf frühen und reifen Endothelzellen zu finden ist, werden die Faktoren vWF und CD105 häufig genutzt, um Angiogenese zu detektieren [138]. Vor allem CD105 ist ein Marker von frühen proliferierenden Endothelzellen, welcher auch in der Embryogenese hoch exprimiert vorliegt [139]. Zusätzlich wurde der Proliferationsmarker Ki67 benutzt, welcher in allen aktiven Zellzyklus-Phasen nachweisbar ist [140].

In den *Klf15*-Knockout-Herzen ergab sich eine deutliche Verschiebung des CPC-Gleichgewichts auf Seiten der Endothel-Vorläuferzellen. Es lagen nicht nur mehr Zellen der endothelialen Linie vor, sondern gleichzeitig wurde eine verminderte Anzahl von Kardiomyozyten-Vorläufern gemessen. Die anfängliche Zellzyklus-Analyse ließ vermuten, dass die gesamte CPC-Population der *Klf15*-KO-Herzen aufgrund des aktivierten kanonischen Wnt-Signalweges stärker proliferiert. Allerdings belegen die kombinierten Analysen aus Ki67 und verschiedenen kardialen und endothelialen Markern, dass die CPC-Zellen mit Kardiomyozyten-Differenzierungspotenzial nicht stärker als die der Wildtyp-Herzen proliferieren und in den *Klf15*-KO-CPCs speziell die Endothelzell-Linie vermehrt vorliegt. Passend dazu ist die beobachtete signifikant verminderte Expression von CD133 in den *Klf15*-KO- versus Wildtyp-CPCs. CD133 ist einer der frühesten Marker, welcher nur in undifferenzierten hämatopoetischen und endothelialen Progenitorzellen exprimiert wird. Sobald die Differenzierung einsetzt, erfolgt eine rapide Runterregulation dieses Oberflächenmarkers [141, 142]. Infolgedessen exprimieren reife Endothelzellen kein CD133 mehr [143]. Somit kann gefolgert werden, dass ein Großteil der detektierten Endothelzellen in den *Klf15*-KO-Herzen sich bereits im Übergang zur Differenzierung befanden.

Diese Ergebnisse sind kongruent zur bereits oben beschriebenen raum- und zeitabhängigen multiphasischen Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in der Kardiogenese. Hierbei ist der multipotente hämato-kardiovaskuläre Marker Flk1 hervorzuheben, der bereits im primitiven Mesoderm exprimiert wird [144, 145]. Während der kardialen Spezifikation werden – soweit bisher identifiziert – zwei frühe Flk1<sup>pos</sup>-Populationen gebildet. In der ersten Phase bildet sich der Mesp1<sup>neg</sup>-Hämangioblast, aus dem Endothel- und Blutzellen entstehen, und in der zweiten Phase der Mesp1<sup>pos</sup>-Kardioblast, dessen Zellen abhängig von den erhaltenen Signalen zu Kardiomyozyten, kardiovaskulären Endothel- oder Glattmuskelzellen differenzieren können [61]. Somit bilden Flk1<sup>pos</sup>-Populationen einen gemeinsamen Vorläufer sowohl für kardiomyogene als auch endotheliale Zellen. Jedoch bleibt Flk1 nur in Endothelzellen exprimiert, in den anderen Linien erfolgt ein schneller Verlust des Markers zu Beginn der Differenzierung [144]. Damit allerdings die Differenzierung des Kardioblasten in Endothelzellen erfolgen kann, ist ein aktives Wnt-Signal notwendig. Um Kardiomyozyten-Differenzierung einzuleiten, ist während der embryonalen Kardiogenese eine Notch-Signal-vermittelte und lokal beschränkte Blockade des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges nachgewiesen worden [59, 61, 146, 147]. Der in der hier vorliegenden Arbeit beschriebene Phänotyp der *Klf15*-KO-CPCs entspricht mit der aktivierten  $\beta$ -Catenin/TCF-Transkriptionsaktivität und der vermehrten Proliferation und zugleich erhöhten Endothelzell-Marker-Expression zum einen dem Stadium der Expansion und zum anderen der Differenzierung der CPCs zu Endothelzellen. Ergebnisse von Wang *et al.* (2006) zeigten an *in vitro* Versuchen mit embryonalen Stammzellen (ESC) einen ähnlichen Verlauf: Flk1<sup>pos</sup>-Vorläuferzellen proliferierten unter Zugabe von aktivierenden Wnt-Liganden im frühen Stadium, wohingegen bei späterer Zugabe vaskuläre Differenzierung beobachtet wurde [148]. Interessante Parallelen zeigen auch Untersuchungen an sogenannten *Cardiac Side Population* Zellen (CSP), die sich vom allgemeinen CPC-Pool durch ihre Eigenschaft, Hoechst-Farbstoff über einen Transporter auszuscheiden, im Durchflusszytometer abtrennen lassen. CSP-Zellen positiv für Sca1, aber gleichzeitig negativ für CD31 (CSP/Sca1<sup>pos</sup>/CD31<sup>neg</sup>) differenzieren *in vitro* zu funktionellen Kardiomyozyten [32]. Dahingegen wurden in Blutgefäßen CSP/Sca1<sup>pos</sup>/CD31<sup>pos</sup>-Zellen gefunden, die vaskuläre Strukturen ausbildeten und vWF exprimierten [29]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit demonstriert, dass unter KLF15-Verlust und  $\beta$ -Catenin/TCF-Aktivierung ein höherer Anteil an Sca1<sup>pos</sup>/CD31<sup>pos</sup>-CPCs vorhanden sind, die vermehrt Endothelzellmarker exprimieren und *in vitro* Kapillar-artige Strukturen ausbilden.

Darüber hinaus resultierte der Nachweis von CD31<sup>pos</sup>-Epitopen in adulten Herzgewebeschnitten in einem erhöhten Anteil in den *Klf15*-Knockout- versus Wildtyp-Herzen. Mit den verwendeten Techniken war es jedoch nicht möglich, Aussagen über Veränderungen hinsichtlich Morphologie oder Angiogenese von Kapillaren zu treffen. Allerdings zeigte der Vergleich mit Herzen von kardialen  $\beta$ -Catenin-Knockdown-Mäusen bemerkenswerterweise den gegenteiligen endothelialen Phänotyp von signifikant verminderten CD31<sup>pos</sup>-Bereichen. Durchflusszytometrische Analysen der CPC-Fraktion

dieser Mäuse demonstrierten passend dazu eine verminderte proliferative CD31<sup>pos</sup>-Population. Diese Ergebnisse zeigen überzeugend den Einfluss der  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkriptionsaktivität auf das *Cell fate* von endogenen kardiovaskulären Progenitorzellen.

Analysen der beschriebenen CPC-Populationen von TAC-operierten Mäusen resultierten in einer noch weiter reduzierten kardiomyogenen CPC-Population in den *Klf15*-KO-Herzen im Vergleich sowohl zum basalen Zustand als auch im Vergleich zum Wildtyp. Somit lässt sich folgern, dass KLF15 sowohl basal als auch beim Herzremodellierungsprozess nach kardialer Belastung eine wichtige Rolle bei der Regulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges einnimmt und so die Homöostase von Progenitorzellen des adulten Herzens *in vivo* wesentlich beeinflusst. Diese Erkenntnis trägt nicht nur wesentlich zum Verständnis der Biologie von kardiovaskulären Stamm- und Vorläuferzellen und damit zur kardialen Regenerationsfähigkeit bei, sondern zeigt darüber hinaus Auswirkungen auf die Anpassungsfähigkeit des Herzens an pathologische Zustände auf. Wie bereits erwähnt, wurde bei Patienten mit kardialer Hypertrophie und Aortenstenose gezeigt, dass eine Runterregulation von KLF15 vorliegt [76]. Damit ist anzunehmen, dass auch der Pool an endogenen CPCs mit dem Potential zu Kardiomyozyten zu differenzieren, stark beeinträchtigt ist und das Gleichgewicht ungünstig verschoben vorliegt. In diesem Fall wäre ein therapeutischer Ansatz zur Reaktivierung der kardialen Differenzierung interessant und klinisch relevant. Ein Nachweis in humanen Proben steht allerdings noch aus.

#### **5.4 Die *in vitro* Differenzierung von CPCs aus adulten Herzen**

Die Etablierung einer *in vitro* Kultivierungsmöglichkeit der endogenen CPCs stellte eine wesentliche Voraussetzung für die Untersuchung und Einflussnahme der Regulation des beobachteten *Klf15*-KO-Phänotyps dar. Die zu überwindende Schwierigkeit galt dabei den im adulten Herzen vorhandenen Progenitorzellen eine möglichst realitätsnahe Kultivierungsumgebung zu schaffen, ohne die Zellen in ihren Eigenschaften zu verändern und Faktoren einzuschleusen, welche die Analyse der CPCs beeinträchtigen würden. Zahlreiche Laboratorien verwenden heute humane oder murine embryonale Stammzellen (*Embryonic Stem Cells*, ESC), die aus den inneren pluripotenten Zellen (*Inner Cell Mass*, ICM) eines Blastozysten isoliert worden sind [149]. Diese generieren in Kultur sogenannte Embryonalkörperchen (*Embryoid Bodies*, EB), die Zellen aller drei Keimblätter repräsentieren [150]. Hierbei handelt es sich um ein elegantes Modell, um die frühe Entwicklung in Kultur zu reproduzieren und gegebenenfalls neue zellbasierte Techniken zur Therapie zu entwickeln. Wenn auch Protokolle von diesen Kultivierungsbedingungen abgeleitet werden können, so liegen bei den CPC-Kulturen andere Voraussetzungen vor. Die in sogenannten Nischen des Herzens vorliegenden kardiovaskulären Progenitorzellen sind nicht mehr als pluripotent anzusehen, sondern liegen überwiegend in einem multipotenten, bereits einem Commitment unterworfenen Entwicklungsstadium vor. Dies kann vor

allem aus den durchflusszytometrischen und qrt-PCR-Analysen der isolierten CPCs geschlossen werden. Zudem wurde in vorangegangenen Publikationen unserer Arbeitsgruppe demonstriert, dass der Pluripotenz-Marker Oct3/4 [47, 151] in den Sca1<sup>pos</sup>-CPCs nicht mehr exprimiert wird [53].

Der zunächst angedachte Ansatz der Kultivierung von reinen CPCs auf einer Proteinmatrix in Konditionalmedium scheiterte, da keine kardiomyogene Differenzierung erzielt werden konnte. Matrigel wird in der Stammzellforschung häufig verwendet, um eine Adhäsionsschicht für Vorläuferzellen zur Verfügung zu stellen, da diese nicht an Plastikoberflächen adhären. Zudem wurde gezeigt, dass ESC zu endodermalen Zellen auf Matrigel differenzieren [152]. Es handelt sich dabei um eine gelartige Mischung, die unter anderem Wachstumsfaktoren, Laminin und Kollagen enthält [153]. Trotz der zahlreichen Wachstumsfaktoren hat sich inzwischen herausgestellt, dass bestimmte Matrigel-Komponenten die Differenzierung von kardialen Zellen verhindern. Z.B. wurde gezeigt, dass die TGF- $\beta$ -Produktion durch Matrigel inhibiert wird [154], ein wichtiger Faktor bei der Kardiogenese [47], der auch zur *in vitro* Kultivierung von humanen Kardiomyozyten eingesetzt wird [155]. Der Zusatz von Konditionalmedium allein löste das Problem nicht. Auch andere Gruppen beobachteten, dass Konditionalmedium zur Differenzierung von Progenitorzellen in Kardiomyozyten nicht ausreichte und vermuteten, dass entweder der Zell-Zell-Kontakt und/oder die von anderen Zellen sezernierten Faktoren und Signale notwendig sind [28]. Betrachtet man die *in vivo* Mikroumgebung von Kardiomyozyten, so sind diese von einer Basalmembran aus Kollagen, Laminin, Fibronectin und Proteoglykanen eingebettet [153, 156]. Diese Extrazellulären Matrix (ECM)-Proteine werden zusätzlich zu organspezifischen Wachstumsfaktoren hauptsächlich von Fibroblasten sezerniert, die das organische Grundgerüst stellen und wichtig zur Erhaltung der kardialen Funktion sind [39, 157]. Es wurde gezeigt, dass die ECM über Integrine mit den Kardiomyozyten interagiert [152] und besonders die  $\beta$ 1-Integrine für die kardiale Entwicklung notwendig sind [158]. Der Wechsel zu einem Matrix-freien Ko-Kultur-System mit adulten kardialen Fibroblasten als *Feeder-Layer* resultierte letztendlich in eine *in vitro* reproduzierbare *in vivo*-Umgebung für die CPC-Differenzierung. Die Fibroblasten wurden lediglich vor der Aussaat der CPCs mit MitomycinC behandelt, um die Mitose und damit ein Überwachsen der Kulturen zu unterbinden. Das hier etablierte Protokoll verzichtet auf die Zugabe von Substanzen wie Oxytocin oder 5'Azacytidin, die in anderen Gruppen mehr oder weniger erfolgreich zur Differenzierung von Kardiomyozyten eingesetzt werden [30, 134, 159]. Speziell der Einsatz von 5'Azacytidin wird häufig kritisiert, da es sich um ein demethylierendes Cytidin-Analogon handelt, welches Genom-weit, aber nicht Zell-spezifischen Effekte auslöst [39] und zudem als Inhibitor von Zellproliferation identifiziert wurde [160].

Mittels der *in vitro* Kultivierung der CPCs aus *Klf15*-KO- und Wildtyp-Herzen wurde genau der *in vivo* beobachtete Phänotyp reproduziert. Die *Klf15*-KO-CPCs zeigten verstärkte Proliferation und gleichzeitig eine deutliche erhöhte Entwicklung in Richtung endothelialer Zellen mit reduziertem Kardiomyozyten-Anteil. Bei längerer Kultivierung bildeten sich aus den *Klf15*-KO-CPCs für

Endothelzellen typische netzwerkartige Strukturen, die eindeutig CD31-positiv waren. Mittels dieser Kulturen konnte zudem als wesentlicher Aspekt demonstriert werden, dass dieser Effekt intrinsisch bei den CPCs vorliegt und nicht durch parakrine Wechselwirkungen der Fibroblasten ausgelöst worden sein kann, da ausschließlich Fibroblasten aus Wildtyp-Mauserzen als *Feeder-Layer* verwendet wurden.

#### **5.4.1 Die pharmakologische Blockade des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ermöglicht die Reversion des *Klf15*-KO-CPC *Cell fate in vitro***

Um die aus den gewonnen Erkenntnissen abgeleitete Hypothese zu überprüfen, dass in den Herzen der *Klf15*-KO-Mäuse die CPC-*Cell fate*-Homöostase durch die Aktivierung der  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Transkription reguliert wird, ist das etablierte Ko-Kultur-System verwendet worden. Dazu wurde ein so bezeichnetes *Rescue*-Experiment durchgeführt, bei welchem die aktivierte Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade pharmakologisch gehemmt wurde. Durch die Behandlung mit dem Flavonoid Quercetin über die Dauer der Differenzierungszeit der Kulturen, konnte das in den WT-CPC-beobachtete Gleichgewicht in den *Klf15*-KO-CPCs wiederhergestellt werden: Die Proliferation der *Klf15*-KO-Zellen war nicht mehr erhöht und auf dem gleichen Niveau wie bei den WT-CPCs. Das *Cell fate* wurde in Richtung der Kardiomyozyten-Differenzierung angehoben, wohingegen eine Reduktion der Flk1<sup>POS</sup>-Zellen in den *Klf15*-KO-CPCs erfolgte. Somit konnte belegt werden, dass der beobachtete CPC-Phänotyp tatsächlich mit der Dysregulation der  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelten Transkription zusammenhängt und normalerweise durch KLF15 reguliert wird.

Zur Inhibition wurde hier ein pharmakologischer Ansatz gewählt, da die Lipofektion zur Einbringung von siRNA in die Zellen eine zu harsche Methode darstellte, bei der sich viele Zellen ablösten. Nach bestem Wissen konnte auch keine Publikation gefunden werden, die eine anwendbare Methode der transienten Transfektion in isolierten Maus-CPCs gezeigt hat. Bisher sind zahlreiche pharmakologische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Inhibitoren identifiziert worden, die auf verschiedenen Ebenen der Kaskade eingreifen (zusammengefasst auf der offiziellen Wnt-Homepage [161]). Die meisten der aufgeführten Inhibitoren verhindern die Sekretion oder Produktion von Wnt-Liganden, blocken die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade auf Rezeptorebene oder haben einen Effekt auf den zytosolischen Degradationskomplex von  $\beta$ -Catenin. Da die Ergebnisse allerdings immer ein konstantes Level an  $\beta$ -Catenin, aber eine Hochregulation der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zielgene in den *Klf15*-KO-Herzen aufzeigten, wurde dieser Ansatz als ungeeignet angesehen. Die Blockade auf Rezeptorebene kann zu vielfältigen anderen nachgeschalteten Regulationen führen. Das beste Beispiel dafür liefert das Protein Dishevelled, welches direkt dem Frizzled-Rezeptor nachgeschaltet ist und nicht nur die kanonische Wnt-Signalkaskade sondern auch nicht-kanonische Wnt-Signalwege im Zusammenhang mit Herzremodellierung reguliert [20, 52, 131]. Gleiches gilt auch für die Kinase GSK3 $\beta$ , welche nicht nur

ein wesentlicher Bestandteil des  $\beta$ -Catenin Abbau-Komplexes im Zytosol ist, sondern auch andere Proteine phosphoryliert und darüber zahlreiche Signalwege beeinflusst [162]. Über eine ausführliche Literaturrecherche wurde Quercetin ermittelt, für das speziell eine Inhibition auf die  $\beta$ -Catenin-zu-TCF-Interaktion im Kern beschrieben wurde [85]. Für Quercetin wurde mehrfach eine Konzentrationsabhängige Inhibition in verschiedenen Zellsystemen gezeigt, ohne dass vorhandene  $\beta$ -Catenin-Level *per se* verändert wurden [85]. Vor allem Letzteres spiegelt die in den KLF15-Analysen erhaltenen Ergebnisse wieder. Sowohl in der *Klf15*-KO-Maus *in vivo* als auch bei Überexpressionen von KLF15 *in vitro* blieben die zellulären  $\beta$ -Catenin-Mengen und -Verteilungen unberührt. Zudem beobachteten Bartekova *et al.* (2010) in Rattenherzen einen positiven kardialen Effekt in Form eines kleineren Infarktareals bei Quercetin-Gabe [163]. Somit existierten für die Substanz Quercetin bereits Hinweise auf positive Effekte im Herzen und ein toxischer Effekt war für die CPC-Fibroblasten-Kulturen auszuschließen.

Die hier nachgewiesene Änderung des CPC-*Cell fate* durch Beeinflussung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges wurde auch in anderen Stammzell-Kulturen gezeigt. Koyanagi *et al.* (2007) erzielten in humanen endothelialen Progenitorzellen (EPCs) über Notch-Aktivierung eine Induktion von nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen und subsequent eine Differenzierung der EPCs zu Kardiomyozyten [164]. Die Wnt/ $\beta$ -Catenin-abhängige *Cell fate*-Entscheidung ist inzwischen in vielen Organen nachgewiesen worden. Dabei spielen nicht nur bereits beschriebene Prozesse während der Kardiogenese eine Rolle, sondern auch die Zell-Homöostase im adulten Organismus [50]. So konnte gezeigt werden, dass in der Haut ein positives Wnt-Signal zur Differenzierung von Progenitorzellen am Haarschaft zu neuen Haarfollikeln führen und ein negatives Wnt-Signal stattdessen Epidermis bildet [165]. Intestinale Vorläuferzellen differenzieren unter Wnt-Signal zu Enterozyten und ohne dieses zu Becherzellen im Darm [50]. Auch wurden Wnt-abhängige Entscheidungen von Progenitorzellen bezüglich ihrer Proliferation und Selbst-Erneuerung versus ihre Differenzierung beobachtet. Die Aktivierung der  $\beta$ -Catenin/TCF-Transkription führt in neuronalen Vorläuferzellen zu vermehrter Proliferation wohingegen bei niedrigem Signal eine Differenzierung der Zellen einsetzt [166]. Von besonderem Interesse sind dabei nicht so sehr die ähnlichen Abläufe der *Cell fate*-Entscheidung, sondern vielmehr der Mechanismus, wie das Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signal Organ-spezifisch reguliert wird. Vor allem diese spezifischen Regulatoren und deren eventuelle Modulierbarkeit zeigen therapeutisches Potential auf und bilden das hauptsächliche Ziel zahlreicher Screening-Ansätze.

## 5.5 Fazit und Ausblick

Aus einem anfänglichen Kandidaten eines Hefe-2-Hybrid-Screenings zur Auffindung eines kardial-spezifischen Interaktionspartners von  $\beta$ -Catenin hat sich ein potenter Inhibitor des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweges ergeben. Die umfassenden Analysen des Zinkfinger-

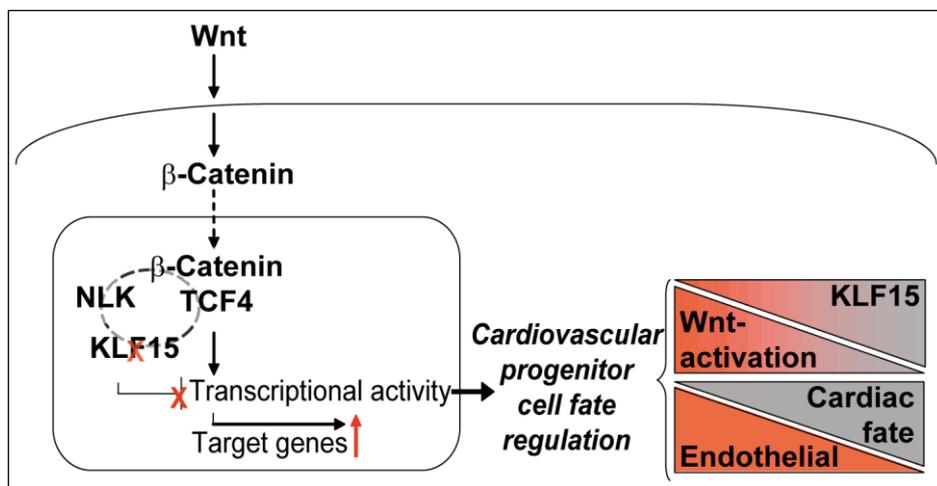
Transkriptionsfaktors KLF15 demonstrierten eine Interaktion nicht nur mit dem zentralen Faktor der Wnt-Kaskade  $\beta$ -Catenin, sondern einen Regulationskomplex aus dessen DNA-bindenden Ko-Faktor TCF4 und dem nicht-kanonischen Wnt-Regulator NLK im Zellkern. Wenn auch noch nicht endgültig geklärt ist, wie dieser Komplex die Inhibition mechanistisch ausführt, so konnte dennoch erstmalig ein Zusammenhang und eine Regulation durch KLF15 zum Wnt-Signalweg in adulten Mausherzen gezeigt werden.

Die durchgeführten Untersuchungen an der systemischen *Klf15*-Knockout-Maus demonstrierten, dass KLF15 eine essentielle Rolle im adulten Herzen einnimmt. Obwohl KLF15 während der Embryogenese keine relevante Funktion einzunehmen scheint und KLF15 auch im adulten Organismus nicht ausschließlich kardial exprimiert wird, zeigt sich ein evidenter Phänotyp vor allem im adulten Herzen. In Kombination mit den Resultaten aus anderen Arbeitsgruppen [76] wird deutlich, dass ein gestörtes Gleichgewicht der KLF15-Expression einen negativen Effekt auf die Herzfunktion ausübt, der sich bei hämodynamischer Belastung des kardiovaskulären Systems potenziert. Mit dem anti-hypertrophen Effekt auf Kardiomyozyten [76] und anti-fibrotischen Effekt auf Fibroblasten [77] wurde in zwei verschiedenen Zelltypen ein Effekt von KLF15 in der Herzremodellierung gezeigt. Die in der vorliegenden Arbeit demonstrierte Regulation von KLF15, die *Cell fate*-Homöostase in CPCs des adulten Herzens zu beeinflussen, stellt keinen Widerspruch dar, sondern fügt vielmehr eine weitere wesentliche Funktion von KLF15 in einem kardialen Zelltyp hinzu, der mehr und mehr an Bedeutung gewinnt. Auf welche Weise KLF15 selbst reguliert wird und welche Zielgene in den jeweiligen Zelltypen von KLF15 reguliert werden, ist bisher noch nicht bekannt und würde sich als wichtige Erkenntnis erweisen. Umso mehr, da auch gezeigt worden ist, dass KLF15 im Prozess der Herzremodellierung herunterreguliert vorliegt und dies auch bei Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie ermittelt wurde und somit auch im Menschen einen Stellenwert einnimmt. Kardiovaskuläre Erkrankungen bilden immer noch die häufigste Todesursache in der westlichen Welt und zeigen trotz verbesserter medizinischer Versorgung zunehmende Mortalität und Morbidität weltweit [2]. Mit der Reaktivierung von KLF15 in den Herzen der Patienten könnte ein gesamt positiver Effekt auf die Kardiomyozyten, den Fibroblasten und den Progenitorzellen bei der Herzremodellierung erzielt werden. Erste unternommene Ansätze mit adenoviraler Überexpression von KLF15 in Mausherzen, die zugleich mit Angiotensin II pro-hypertroph stimuliert wurden, zeigten erste positive Ergebnisse [69]. Die Versuche sind jedoch bisher nur an Wildtyp-Mäusen durchgeführt worden. Eine Reaktivierung in den Herzen der *Klf15*-KO-Mäuse wäre ein weiterer interessanter Ansatz, ebenso wie die Überprüfung eines Effekts von KLF15 auf CPCs im Remodellierungsprozess nach Myokardinfarkt.

Der in der hier vorliegenden Arbeit demonstrierte Einfluss von KLF15 auf die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade in endogenen kardiovaskulären Progenitorzellen und die erfolgreiche Wiederherstellung des *Klf15*-KO-Phänotyps zum Wildtyp-Zustand mittels Quercetin zeigt nicht nur, dass eine Änderung

des *Cell fate* über Beeinflussung der Wnt/ $\beta$ -Catenin/TCF-Kaskade möglich ist, sondern dies auch pharmakologisch durchführbar ist. Bereits eingeleitete weiterführende Interaktom-Analysen werden Aufschluss über die ersten hier demonstrierten komplexen Wechselwirkungen zur transkriptionellen Regulation aufzeigen. Mit detaillierterer Kenntnis über die beteiligten Faktoren und den Regulationsmechanismus wird eine Identifikation einer kardial-spezifischen Substanz wahrscheinlicher. Dies beinhaltet einen klinisch relevanten Aspekt, der zukünftig eine Therapie-Option zur gesteigerten Differenzierung von endogenen kardialen Progenitorzellen *in situ* darstellen kann.

Zum Abschluss sind die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse in **Abb. 49** in einer Hypothese zur *Cell fate*-Regulation in CPCs zusammengefasst.



**Abb. 49** Schematische Darstellung der vermuteten *in vivo* Rolle von KLF15 im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg.  $\beta$ -Catenin, TCF4, NLK und KLF15 formen einen Komplex im Zellkern, der über vermehrte Ubiquitinierung von TCF4 zur Inhibition der Transkriptionsaktivität führt. Liegt ein Verlust von KLF15 vor, unterbleibt die Inhibition und die  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelte Transkription wird dauerhaft angeschaltet. Bisher noch unbekannte Zielgene verschieben das CPC-*Cell fate* in kardiovaskulären Progenitorzellen des adulten Herzens dadurch zur Endothelzell-Linie; es sind weniger kardiomyogene Zellen zur Regeneration des kardialen Gewebes vorhanden. Abbildung aus Noack *et al.* (2012) [86]

## 6 Zusammenfassung

Trotz enormer medizinischer Bemühungen und geleisteter Forschungsarbeit bleiben kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache weltweit. Insbesondere Myokardinfarkte führen aufgrund eines unausgeglichene Verhältnisses von Herzmuskel-Schädigung und -Wiederherstellung zu Herzinsuffizienz. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass das postnatale Herz regeneratives Potenzial besitzt und kein terminal differenziertes Organ ist. Jedoch ist diese Regenerationsfähigkeit nicht ausreichend, um nach kardialen Stress den Verlust von kontraktile Kraft auszugleichen und damit einer fortschreitenden Herzinsuffizienz entgegenzuwirken. Ein Verständnis der molekularen Mechanismen, welche die Remodellierung und den Verlust der Kontraktionsfähigkeit steuern, ist von essentieller Bedeutung zur Entwicklung neuer Therapien.

Wie in der embryonalen Kardiogenese nimmt der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg eine zentrale Rolle bei der Regulation von kardiovaskulären Progenitorzellen (CPCs) ein. Eigene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe belegen, dass eine Inhibition dieser Signalkette bei Mäusen einen positiv-adaptiven Effekt auf die Herzremodellierung ausübt und zu gesteigerter Kardiomyozyten-Differenzierung von endogenen CPCs führt. Daher stellt eine Modulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges einen vielversprechenden Ansatz dar. Da  $\beta$ -Catenin ubiquitär im Organismus vorliegt, wurde mittels Hefe-2-Hybrid Screening nach Herz-spezifischen Interaktionspartnern gesucht, welche die kardiale Differenzierung regulieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Krüppel-like factor 15* (KLF15) als neuer kardialer Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin identifiziert. Mittels Ko-Immunpräzipitationen, Peptid-SPOT-Arrays und *in vitro* Mutationsstudien wurde ein Regulationskomplex aus KLF15,  $\beta$ -Catenin, dessen transkriptionellen Ko-Faktor *T-cell factor 4* (TCF4) und dem nicht-kanonischen Wnt-Regulator *Nemo-like Kinase* (NLK) gefunden.  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängige Luziferase-Genreporter-Studien zeigten einen konzentrationsabhängigen, inhibitorischen Effekt von KLF15 auf diese Transkriptionsaktivität. Mechanistisch wurde gezeigt, dass KLF15 zur vermehrten TCF4-Ubiquitinierung und damit subsequenten proteasomalen Abbau beiträgt. Untersuchungen der hierfür relevanten Protein-Interaktionsbereiche ergaben eine Notwendigkeit von mindestens zwei unterschiedlichen Proteinbindedomänen, die am N- und am C-Terminus von KLF15 lokalisiert werden konnten. Zusätzlich ist der C-Terminus als ausreichende und notwendige Region für die Zellkern-Lokalisation ermittelt worden.

Funktionelle, histologische und molekulare Analysen einer systemischen *Klf15*-Knockout-Maus (*Klf15*-KO) zeigten *in vivo* sowohl eine bisher unbekannte Fehlregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges spezifisch im Herzen als auch einen kardialen Phänotyp, welcher sich bereits basal als systolische Dysfunktion manifestierte. Diese trat progressiv im adulten Tier auf und erfolgte ohne

klare Ausbildung einer kardialen Hypertrophie oder Fibrosierung. Bei hämodynamischer Belastung des kardiovaskulären Systems zeigte sich beim *Klf15*-KO im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine rapide Entwicklung von kardialer Remodellierung mit starker Dilatation der linken Herzkammer, Versteifung des Organs durch Fibrosierung, Verlust der Kontraktilität und hoher Mortalität. Detaillierte quantitative durchflusszytometrische und qrt-PCR Analysen der endogenen CPCs offenbarten eine gestörte Homöostase der *Cell fate*-Regulation in den *Klf15*-KO-Herzen, die mit verstärkter Proliferation von Endothelzell-Vorläufern auf Kosten der frühen Kardiomyozyten-Zell-Linie einherging. Die Etablierung eines *in vitro* Kultivierungssystems der CPCs aus adulten Mausherzen ermöglichte die Durchführung eines pharmakologischen *Rescue*-Experiments mit dem  $\beta$ -Catenin/TCF-Inhibitor Quercetin. Dieses erlaubte eine fast vollständige Wiederherstellung der normalen *Cell fate*-Homöostase der CPCs aus *Klf15*-KO-Herzen und belegte den klaren Zusammenhang zur dysregulierten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade durch den funktionellen KLF15-Verlust.

Die hier gezeigte Regulation der adulten Progenitorzell-Homöostase ergänzt die bereits bekannten und auch z.T. im humanen Herzen nachgewiesenen anti-hypertrophen und -fibrotischen Effekten von KLF15 und belegt damit die essentielle Rolle von KLF15 im adulten Herzen. Diese Erkenntnisse bieten ein neues Potenzial zur Entwicklung neuartiger Therapieansätze, welche nicht nur symptomatische, sondern kausale Behandlungen der Herzinsuffizienz verwirklichen könnten. Weitere detaillierte Untersuchungen dieser KLF15-Regulationsmechanismen werden helfen, um einen kardial-spezifischen Ansatz zu verfolgen.

## 7 Summary

Despite the enormous investigative effort, cardiovascular diseases and in particular myocardial infarction remains one of the major causes of heart failure due to imbalanced myocardial damage and repair. Several studies demonstrated a regenerative capacity of the adult mammalian heart arguing against the notion of it being a terminally differentiated organ. However, this regenerative ability is insufficient to stop loss of contractile function under stress conditions, leading to end-stage heart failure. The elucidation of the precise molecular mechanisms regulating cardiac remodelling and preventing loss of cardiac function is essential to develop novel therapeutical approaches.

Similar to embryonic cardiogenesis, the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway was shown to play a central role in the regulation of progenitor cells of the adult heart (CPCs). Previous work of our group indicated that the downregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling is beneficial for adaptive cardiac remodelling and enhances differentiation of endogenous CPCs. Therefore, *Wnt pathway*-based therapeutic agents are highly attractive for the heart field. Since  $\beta$ -catenin is a ubiquitously expressed protein, a yeast-2-hybrid screen was performed to identify cardiac specific interaction partners of  $\beta$ -catenin with the ability to regulate differentiation of CPCs.

In the present study the zinc finger transcription factor *Krüppel*-like factor 15 (KLF15) was found as a novel cardiac  $\beta$ -catenin interaction partner. Using co-immunoprecipitation, peptide-SPOT arrays and *in vitro* mutation studies a regulatory complex consisting of KLF15,  $\beta$ -catenin, its transcriptional co-factor T-cell factor 4 (TCF4), and the non-canonical Wnt regulator Nemo-like kinase (NLK) was identified.  $\beta$ -catenin/TCF-driven luciferase reporter assays showed a concentration-dependent repressive effect of KLF15 on  $\beta$ -catenin/TCF-mediated transcriptional activity. Mechanistically, KLF15 contributed to enhanced TCF4-ubiquitination and its subsequent proteasomal degradation. A detailed protein-protein interaction analysis revealed two distinct domains at the N- and C-terminus of KLF15 to be required for  $\beta$ -catenin/TCF inhibition. In addition, the C-terminus was found to be sufficient and necessary for nuclear localisation.

Functional, histological and molecular analyses of a global *Klf15*-knockout mouse model (*Klf15*-KO) showed a so far unknown cardiac specific KLF15-dependent de-regulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway *in vivo* as well as progressive systolic dysfunction in adulthood. This dysfunction was not accompanied by cardiac hypertrophy and/or fibrosis at baseline. Under induced hemodynamic stress significant loss of contractile function accompanied with accelerated left ventricular dilation and increased fibrosis resulted in high mortality in *Klf15*-KO vs. wild-type mice. Analyses of the endogenous CPCs by quantitative flow cytometry and qrt-PCR showed increased proliferation of endothelial progenitors at the expense of the cardiomyogenic lineage indicating an imbalanced cell fate regulation in the *Klf15*-KO hearts. The setup of an *in vitro* culture system for adult CPCs enabled

a pharmacological rescue experiment using the  $\beta$ -catenin/TCF inhibitor Quercetin. This resulted in an almost complete restoration of the *Klf15*-KO-CPC cell fate to wild-type CPC levels substantiating that de-repression of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling, upon KLF15 loss, is responsible for the altered CPC homeostasis in *Klf15*-KO mice.

The presented work demonstrates the major impact of KLF15 on adult heart biology at least in part by controlling CPC homeostasis. These observations complement previous studies showing the anti-hypertrophic and anti-fibrotic effects of KLF15, also shown in the human heart. This knowledge opens a new avenue for the development of novel causal therapies of heart failure. Further in-depth elucidations of the KLF15 regulatory mechanisms will reinforce cardiac specific therapeutical approaches.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha/\beta$ -MHC	<i><math>\alpha/\beta</math>-Myosin Heavy Chain</i>
AngII	Angiotensin II
ANP	<i>Atrial Natriuretic Peptide</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
B-Mode	Brightness-Modus
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BNP	<i>B-type Natriuretic Peptide</i>
BW	Body Weight, Körpergewicht
CMV	Cytomegalovirus
cMyc	<i>v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CPC	Cardiovascular Progenitor Cells, kardiovaskuläre Progenitorzellen
CSA	Cross Sectional Area
CSP	Cardiac Side Population
CT	Kontrolle
Ctgf	<i>Connective tissue growth factor</i>
cTnT	<i>cardiac TroponinT</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EF	Ejection Fraction, Auswurfvolumen
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FHF	First Heart Field
Fik1	<i>Fetal liver kinase 1</i>
FS	Fractional Shortening, Verkürzungsfraction
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase</i>
GATA4	<i>GATA binding protein 4</i>
GSK3 $\beta$	<i>Glycogen-Synthase-Kinase 3<math>\beta</math></i>
GST	<i>Glutathion S-Transferase</i>
HA	<i>Hämagglutinin</i>
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HMG	High Mobility Group
HRP	Horseradish Peroxidase
HW	Heart Weight, Herzgewicht
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Isl1	<i>Islet-1</i>
ITF2	<i>Immunoglobulin Transcription Factor 2</i>
IVSd	Interventrikuläres Septum in der Diastole
KLF	<i>Krüppel-like factor</i>
KO	Knockout
KoIP	Ko-Immunpräzipitationen
LBGA	Luria Brühe mit Glukose und Ampicillin
LEF	<i>Lymphocyte Enhancer Factor</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

LVHWd	Linksventrikuläre Hinterwand in der Diastole
LVIDd	Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Diastole
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
Mesp1	<i>Mesoderm Posterior 1</i>
M-Mode	Motion-Modus
neg	negativ
NEM	N-Ethylmaleinimid
NLK	<i>Nemo-Like Kinase</i>
NLS	Nukleare Lokalisationssequenz
NRCM	Neonatale Ratten-Kardiomyozyten
p	Probability, Wahrscheinlichkeit
pos	positiv
RIPA	Radio-Immunpräzipitationsassay
Sca1	<i>Stem cell antigen 1</i>
SHF	Second Heart Field
SOX	<i>SRY-box containing gene 2</i>
TAC	Transverse Aortic Constriction
Tbx5	<i>T-Box 5</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TG	Transgen
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TL	Tibia-Länge
ü.N.	über Nacht
vWF	<i>von Willebrand-Faktor</i>
WB	Western Blot
WGA-FITC	Wheat Germ Agglutinin-Fluoreszeinisothiocyanat
WT	Wildtyp
WT1	<i>Wilms Tumor 1</i>

---

## 9 Referenzen

- [1] C. American Heart Association Statistics, "International cardiovascular disease statistics," 2002.
- [2] T. N. Nichols M, Scarborough P, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Rayner M. (2012). *European Cardiovascular Disease Statistics*.
- [3] J. Gensichen, M. Beyer, C. Kuver, H. Wang, and F. M. Gerlach, "[Case management for patients with congestive heart failure under ambulatory care--a critical review]," *Z Arztl Fortbild Qualitatssich*, vol. 98, pp. 143-54, Mar 2004.
- [4] J. G. Seidman and C. Seidman, "The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms," *Cell*, vol. 104, pp. 557-67, Feb 23 2001.
- [5] K. Swedberg, J. Cleland, H. Dargie, H. Drexler, F. Follath, M. Komajda, L. Tavazzi, O. A. Smiseth, A. Gavazzi, A. Haverich *et al.* "Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology," *Eur Heart J*, vol. 26, pp. 1115-40, Jun 2005.
- [6] R. M. Lang, M. Bierig, R. B. Devereux, F. A. Flachskampf, E. Foster, P. A. Pellikka, M. H. Picard, M. J. Roman, J. Seward, J. S. Shanewise *et al.* "Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology," *J Am Soc Echocardiogr*, vol. 18, pp. 1440-63, Dec 2005.
- [7] M. H. Soonpaa and L. J. Field, "Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis," *Circ Res*, vol. 83, pp. 15-26, Jul 13 1998.
- [8] M. A. Laflamme and C. E. Murry, "Heart regeneration," *Nature*, vol. 473, pp. 326-35, May 19 2011.
- [9] V. P. van Empel and L. J. De Windt, "Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act," *Cardiovasc Res*, vol. 63, pp. 487-99, Aug 15 2004.
- [10] N. Frey and E. N. Olson, "Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly," *Annu Rev Physiol*, vol. 65, pp. 45-79, 2003.
- [11] J. Heineke and J. D. Molkentin, "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 7, pp. 589-600, Aug 2006.
- [12] T. Oka, J. Xu, and J. D. Molkentin, "Re-employment of developmental transcription factors in adult heart disease," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 18, pp. 117-31, Feb 2007.
- [13] A. Khoynzhad, Z. Jalali, and A. J. Tortolani, "A synopsis of research in cardiac apoptosis and its application to congestive heart failure," *Tex Heart Inst J*, vol. 34, pp. 352-9, 2007.
- [14] K. T. Weber, "Fibrosis and hypertensive heart disease," *Curr Opin Cardiol*, vol. 15, pp. 264-72, Jul 2000.
- [15] A. P. Babick and N. S. Dhalla, "Role of subcellular remodeling in cardiac dysfunction due to congestive heart failure," *Med Princ Pract*, vol. 16, pp. 81-9, 2007.
- [16] B. Hinz, S. H. Phan, V. J. Thannickal, A. Galli, M. L. Bochaton-Piallat, and G. Gabbiani, "The myofibroblast: one function, multiple origins," *Am J Pathol*, vol. 170, pp. 1807-16, Jun 2007.

- 
- [17] G. W. Dorn, 2nd, "The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy," *Hypertension*, vol. 49, pp. 962-70, May 2007.
- [18] F. S. Loffredo, M. L. Steinhauser, J. Gannon, and R. T. Lee, "Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair," *Cell Stem Cell*, vol. 8, pp. 389-98, Apr 8 2011.
- [19] M. Mercola, P. Ruiz-Lozano, and M. D. Schneider, "Cardiac muscle regeneration: lessons from development," *Genes Dev*, vol. 25, pp. 299-309, Feb 15 2011.
- [20] B. Nadal-Ginard, J. Kajstura, A. Leri, and P. Anversa, "Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure," *Circ Res*, vol. 92, pp. 139-50, Feb 7 2003.
- [21] A. Lepilina, A. N. Coon, K. Kikuchi, J. E. Holdway, R. W. Roberts, C. G. Burns, and K. D. Poss, "A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration," *Cell*, vol. 127, pp. 607-19, Nov 3 2006.
- [22] C. Jopling, E. Sleep, M. Raya, M. Marti, A. Raya, and J. C. Izpisua Belmonte, "Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation," *Nature*, vol. 464, pp. 606-9, Mar 25 2010.
- [23] E. R. Porrello, A. I. Mahmoud, E. Simpson, J. A. Hill, J. A. Richardson, E. N. Olson, and H. A. Sadek, "Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart," *Science*, vol. 331, pp. 1078-80, Feb 25 2011.
- [24] P. C. Hsieh, V. F. Segers, M. E. Davis, C. MacGillivray, J. Gannon, J. D. Molkentin, J. Robbins, and R. T. Lee, "Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury," *Nat Med*, vol. 13, pp. 970-4, Aug 2007.
- [25] A. C. Sturzu and S. M. Wu, "Developmental and regenerative biology of multipotent cardiovascular progenitor cells," *Circ Res*, vol. 108, pp. 353-64, Feb 4 2011.
- [26] P. Anversa and J. Kajstura, "Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart," *Circ Res*, vol. 83, pp. 1-14, Jul 13 1998.
- [27] O. Bergmann, R. D. Bhardwaj, S. Bernard, S. Zdunek, F. Barnabe-Heider, S. Walsh, J. Zupicich, K. Alkass, B. A. Buchholz, H. Druid, S. Jovinge, and J. Frisen, "Evidence for cardiomyocyte renewal in humans," *Science*, vol. 324, pp. 98-102, Apr 3 2009.
- [28] E. N. Olson and M. D. Schneider, "Sizing up the heart: development redux in disease," *Genes Dev*, vol. 17, pp. 1937-56, Aug 15 2003.
- [29] S. X. Liang, L. M. Khachigian, Z. Ahmadi, M. Yang, S. Liu, and B. H. Chong, "In vitro and in vivo proliferation, differentiation and migration of cardiac endothelial progenitor cells (SCA1+/CD31+ side-population cells)," *J Thromb Haemost*, vol. 9, pp. 1628-37, Aug 2011.
- [30] H. Oh, S. B. Bradfute, T. D. Gallardo, T. Nakamura, V. Gaussin, Y. Mishina, J. Pocius, L. H. Michael, R. R. Behringer, D. J. Garry, M. L. Entman, and M. D. Schneider, "Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 12313-8, Oct 14 2003.
- [31] A. P. Beltrami, L. Barlucchi, D. Torella, M. Baker, F. Limana, S. Chimenti, H. Kasahara, M. Rota, E. Musso, K. Urbanek, A. Leri, J. Kajstura, B. Nadal-Ginard, and P. Anversa, "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration," *Cell*, vol. 114, pp. 763-76, Sep 19 2003.
- [32] O. Pfister, F. Mouquet, M. Jain, R. Summer, M. Helmes, A. Fine, W. S. Colucci, and R. Liao, "CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation," *Circ Res*, vol. 97, pp. 52-61, Jul 8 2005.
-

- 
- [33] Y. Qyang, S. Martin-Puig, M. Chiravuri, S. Chen, H. Xu, L. Bu, X. Jiang, L. Lin, A. Granger, A. Moretti, L. Caron, X. Wu, J. Clarke, M. M. Taketo, K. L. Laugwitz, R. T. Moon, P. Gruber, S. M. Evans, S. Ding, and K. R. Chien, "The renewal and differentiation of Isl1+ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/beta-catenin pathway," *Cell Stem Cell*, vol. 1, pp. 165-79, Aug 16 2007.
- [34] E. Messina, L. De Angelis, G. Frati, S. Morrone, S. Chimenti, F. Fiordaliso, M. Salio, M. Battaglia, M. V. Latronico, M. Coletta, E. Vivarelli, L. Frati, G. Cossu, and A. Giacomello, "Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart," *Circ Res*, vol. 95, pp. 911-21, Oct 29 2004.
- [35] N. Smart, S. Bollini, K. N. Dube, J. M. Vieira, B. Zhou, S. Davidson, D. Yellon, J. Riegler, A. N. Price, M. F. Lythgoe, W. T. Pu, and P. R. Riley, "De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury," *Nature*, vol. 474, pp. 640-4, Jun 30 2011.
- [36] D. J. Garry and E. N. Olson, "A common progenitor at the heart of development," *Cell*, vol. 127, pp. 1101-4, Dec 15 2006.
- [37] K. L. Laugwitz, A. Moretti, L. Caron, A. Nakano, and K. R. Chien, "Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages?," *Development*, vol. 135, pp. 193-205, Jan 2008.
- [38] F. Weinberger, D. Mehrkens, F. W. Friedrich, M. Stubbendorff, X. Hua, J. C. Muller, S. Schrepfer, S. M. Evans, L. Carrier, and T. Eschenhagen, "Localization of islet-1-positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart," *Circ Res*, vol. 110, pp. 1303-10, May 11 2012.
- [39] S. M. Wu, K. R. Chien, and C. Mummery, "Origins and fates of cardiovascular progenitor cells," *Cell*, vol. 132, pp. 537-43, Feb 22 2008.
- [40] J. A. Epstein and M. S. Parmacek, "Recent advances in cardiac development with therapeutic implications for adult cardiovascular disease," *Circulation*, vol. 112, pp. 592-7, Jul 26 2005.
- [41] S. J. Kinder, D. A. Loebel, and P. P. Tam, "Allocation and early differentiation of cardiovascular progenitors in the mouse embryo," *Trends Cardiovasc Med*, vol. 11, pp. 177-84, Jul 2001.
- [42] M. Nosedá, T. Peterkin, F. C. Simoes, R. Patient, and M. D. Schneider, "Cardiopietic factors: extracellular signals for cardiac lineage commitment," *Circ Res*, vol. 108, pp. 129-52, Jan 7 2011.
- [43] R. P. Harvey, "Patterning the vertebrate heart," *Nat Rev Genet*, vol. 3, pp. 544-56, Jul 2002.
- [44] A. Bondué, G. Lapouge, C. Paulissen, C. Semeraro, M. Iacovino, M. Kyba, and C. Blanpain, "Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification," *Cell Stem Cell*, vol. 3, pp. 69-84, Jul 3 2008.
- [45] M. Buckingham, S. Meilhac, and S. Zaffran, "Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells," *Nat Rev Genet*, vol. 6, pp. 826-35, Nov 2005.
- [46] G. E. Lyons, S. Schiaffino, D. Sassoon, P. Barton, and M. Buckingham, "Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle," *J Cell Biol*, vol. 111, pp. 2427-36, Dec 1990.
- [47] D. Srivastava, "Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis," *Cell*, vol. 126, pp. 1037-48, Sep 22 2006.
- [48] A. Klaus, Y. Saga, M. M. Taketo, E. Tzahor, and W. Birchmeier, "Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 18531-6, Nov 20 2007.
- [49] R. van Amerongen and A. Berns, "Knockout mouse models to study Wnt signal transduction," *Trends Genet*, vol. 22, pp. 678-89, Dec 2006.
-

- 
- [50] T. Grigoryan, P. Wend, A. Klaus, and W. Birchmeier, "Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice," *Genes Dev*, vol. 22, pp. 2308-41, Sep 1 2008.
- [51] V. A. van de Schans, J. F. Smits, and W. M. Blankesteyn, "The Wnt/frizzled pathway in cardiovascular development and disease: friend or foe?," *Eur J Pharmacol*, vol. 585, pp. 338-45, May 13 2008.
- [52] M. W. Bergmann, "WNT signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: lessons learned from cardiac development," *Circ Res*, vol. 107, pp. 1198-208, Nov 12 2010.
- [53] L. C. Zelarayan, C. Noack, B. Sekkali, J. Kmecova, C. Gehrke, A. Renger, M. P. Zafiriou, R. van der Nagel, R. Dietz, L. J. de Windt, J. L. Balligand, and M. W. Bergmann, "Beta-Catenin downregulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, pp. 19762-7, Dec 16 2008.
- [54] F. Nollet, G. Berx, F. Molemans, and F. van Roy, "Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1)," *Genomics*, vol. 32, pp. 413-24, Mar 15 1996.
- [55] T. Hagen, J. K. Sethi, N. Foxwell, and A. Vidal-Puig, "Signalling activity of beta-catenin targeted to different subcellular compartments," *Biochem J*, vol. 379, pp. 471-7, Apr 15 2004.
- [56] J. Zhou, J. Qu, X. P. Yi, K. Graber, L. Huber, X. Wang, A. M. Gerdes, and F. Li, "Upregulation of gamma-catenin compensates for the loss of beta-catenin in adult cardiomyocytes," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 292, pp. H270-6, Jan 2007.
- [57] C. J. Gottardi and B. M. Gumbiner, "Role for ICAT in beta-catenin-dependent nuclear signaling and cadherin functions," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 286, pp. C747-56, Apr 2004.
- [58] L. Arce, N. N. Yokoyama, and M. L. Waterman, "Diversity of LEF/TCF action in development and disease," *Oncogene*, vol. 25, pp. 7492-504, Dec 4 2006.
- [59] A. T. Naito, I. Shiojima, H. Akazawa, K. Hidaka, T. Morisaki, A. Kikuchi, and I. Komuro, "Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, pp. 19812-7, Dec 26 2006.
- [60] S. Ueno, G. Weidinger, T. Osugi, A. D. Kohn, J. L. Golob, L. Pabon, H. Reinecke, R. T. Moon, and C. E. Murry, "Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 9685-90, Jun 5 2007.
- [61] S. Gessert and M. Kuhl, "The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development," *Circ Res*, vol. 107, pp. 186-99, Jul 23 2010.
- [62] S. Y. Sokol, "Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling," *Development*, vol. 138, pp. 4341-50, Oct 2011.
- [63] B. B. McConnell and V. W. Yang, "Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases," *Physiol Rev*, vol. 90, pp. 1337-81, Oct 2010.
- [64] R. Pearson, J. Fleetwood, S. Eaton, M. Crossley, and S. Bao, "Kruppel-like transcription factors: a functional family," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 40, pp. 1996-2001, 2008.
- [65] S. Iuchi, "Three classes of C2H2 zinc finger proteins," *Cell Mol Life Sci*, vol. 58, pp. 625-35, Apr 2001.
- [66] J. Kaczynski, T. Cook, and R. Urrutia, "Sp1- and Kruppel-like transcription factors," *Genome Biol*, vol. 4, p. 206, 2003.
- [67] S. K. Swamynathan, "Kruppel-like factors: three fingers in control," *Hum Genomics*, vol. 4, pp. 263-70, Apr 2010.
-

- 
- [68] S. M. Haldar, O. A. Ibrahim, and M. K. Jain, "Kruppel-like Factors (KLFs) in muscle biology," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 43, pp. 1-10, Jul 2007.
- [69] J. J. Leenders, W. J. Wijnen, I. van der Made, M. Hiller, M. Swinnen, T. Vandendriessche, M. Chuah, Y. M. Pinto, and E. E. Creemers, "Repression of Cardiac Hypertrophy by KLF15: Underlying Mechanisms and Therapeutic Implications," *PLoS One*, vol. 7, p. e36754, 2012.
- [70] X. Liao, S. M. Haldar, Y. Lu, D. Jeyaraj, K. Paruchuri, M. Nahori, Y. Cui, K. H. Kaestner, and M. K. Jain, "Kruppel-like factor 4 regulates pressure-induced cardiac hypertrophy," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 49, pp. 334-8, Aug 2010.
- [71] H. J. Kee and H. Kook, "Kruppel-like factor 4 mediates histone deacetylase inhibitor-induced prevention of cardiac hypertrophy," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 47, pp. 770-80, Dec 2009.
- [72] R. Nagai, T. Suzuki, K. Aizawa, T. Shindo, and I. Manabe, "Significance of the transcription factor KLF5 in cardiovascular remodeling," *J Thromb Haemost*, vol. 3, pp. 1569-76, Aug 2005.
- [73] N. M. Rajamannan, M. Subramaniam, T. P. Abraham, V. C. Vasile, M. J. Ackerman, D. G. Monroe, T. L. Chew, and T. C. Spelsberg, "TGFbeta inducible early gene-1 (TIEG1) and cardiac hypertrophy: Discovery and characterization of a novel signaling pathway," *J Cell Biochem*, vol. 100, pp. 315-25, Feb 1 2007.
- [74] G. Lavalley, G. Andelfinger, M. Nadeau, C. Lefebvre, G. Nemer, M. E. Horb, and M. Nemer, "The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development," *EMBO J*, vol. 25, pp. 5201-13, Nov 1 2006.
- [75] S. Uchida, Y. Tanaka, H. Ito, F. Saitoh-Ohara, J. Inazawa, K. K. Yokoyama, S. Sasaki, and F. Marumo, "Transcriptional regulation of the CLC-K1 promoter by myc-associated zinc finger protein and kidney-enriched Kruppel-like factor, a novel zinc finger repressor," *Mol Cell Biol*, vol. 20, pp. 7319-31, Oct 2000.
- [76] S. Fisch, S. Gray, S. Heymans, S. M. Haldar, B. Wang, O. Pfister, L. Cui, A. Kumar, Z. Lin, S. Sen-Banerjee, H. Das, C. A. Petersen, U. Mende, B. A. Burleigh, Y. Zhu, Y. M. Pinto, R. Liao, and M. K. Jain, "Kruppel-like factor 15 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 7074-9, Apr 24 2007.
- [77] B. Wang, S. M. Haldar, Y. Lu, O. A. Ibrahim, S. Fisch, S. Gray, A. Leask, and M. K. Jain, "The Kruppel-like factor KLF15 inhibits connective tissue growth factor (CTGF) expression in cardiac fibroblasts," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 45, pp. 193-7, Aug 2008.
- [78] T. Minamino, V. Gausson, F. J. DeMayo, and M. D. Schneider, "Inducible gene targeting in postnatal myocardium by cardiac-specific expression of a hormone-activated Cre fusion protein," *Circ Res*, vol. 88, pp. 587-92, Mar 30 2001.
- [79] D. S. Sohal, M. Nghiem, M. A. Crackower, S. A. Witt, T. R. Kimball, K. M. Tymitz, J. M. Penninger, and J. D. Molkentin, "Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein," *Circ Res*, vol. 89, pp. 20-5, Jul 6 2001.
- [80] A. Baurand, L. Zelarayan, R. Betney, C. Gehrke, S. Dunger, C. Noack, A. Busjahn, J. Huelsken, M. M. Taketo, W. Birchmeier, R. Dietz, and M. W. Bergmann, "Beta-catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling," *Circ Res*, vol. 100, pp. 1353-62, May 11 2007.
- [81] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn, "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5," *J Gen Virol*, vol. 36, pp. 59-74, Jul 1977.
- [82] V. Korinek, N. Barker, P. J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and H. Clevers, "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma," *Science*, vol. 275, pp. 1784-7, Mar 21 1997.
-

- 
- [83] P. J. Morin, A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler, "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC," *Science*, vol. 275, pp. 1787-90, Mar 21 1997.
- [84] R. Frank, "The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications," *J Immunol Methods*, vol. 267, pp. 13-26, Sep 1 2002.
- [85] C. H. Park, J. Y. Chang, E. R. Hahm, S. Park, H. K. Kim, and C. H. Yang, "Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 328, pp. 227-34, Mar 4 2005.
- [86] C. Noack, M. P. Zafiriou, H. J. Schaeffer, A. Renger, E. Pavlova, R. Dietz, W. H. Zimmermann, M. W. Bergmann, and L. C. Zelarayan, "Krueppel-like factor 15 regulates Wnt/beta-catenin transcription and controls cardiac progenitor cell fate in the postnatal heart," *EMBO Mol Med*, vol. 4, pp. 992-1007, Sep 2012.
- [87] V. Brault, R. Moore, S. Kutsch, M. Ishibashi, D. H. Rowitch, A. P. McMahon, L. Sommer, O. Boussadia, and R. Kemler, "Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development," *Development*, vol. 128, pp. 1253-64, Apr 2001.
- [88] N. Harada, Y. Tamai, T. Ishikawa, B. Sauer, K. Takaku, M. Oshima, and M. M. Taketo, "Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene," *EMBO J*, vol. 18, pp. 5931-42, Nov 1 1999.
- [89] V. Regitz-Zagrosek, S. Oertelt-Prigione, U. Seeland, and R. Hetzer, "Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure," *Circ J*, vol. 74, pp. 1265-73, Jul 2010.
- [90] P. Q. Baumann, B. E. Sobel, A. K. Tarikuz Zaman, and D. J. Schneider, "Gender-dependent differences in echocardiographic characteristics of murine hearts," *Echocardiography*, vol. 25, pp. 739-48, Aug 2008.
- [91] S. D. Crowley, S. B. Gurley, M. J. Herrera, P. Ruiz, R. Griffiths, A. P. Kumar, H. S. Kim, O. Smithies, T. H. Le, and T. M. Coffman, "Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, pp. 17985-90, Nov 21 2006.
- [92] H. A. Rockman, R. S. Ross, A. N. Harris, K. U. Knowlton, M. E. Steinhilper, L. J. Field, J. Ross, Jr., and K. R. Chien, "Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, pp. 8277-81, Sep 15 1991.
- [93] O. Tarnavski, J. R. McMullen, M. Schinke, Q. Nie, S. Kong, and S. Izumo, "Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies," *Physiol Genomics*, vol. 16, pp. 349-60, Feb 13 2004.
- [94] E. van Rooij and E. N. Olson, "MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets," *J Clin Invest*, vol. 117, pp. 2369-76, Sep 2007.
- [95] A. Renger, Dissertation "Analyse von kardialen Wnt/ $\beta$ -Catenin Interaktionspartnern bezüglich ihrer M"oglichkeit, die embryonale Kardiogenese zu aktivieren.," Biologie, Chemie, Pharmazie, FU Berlin, Berlin, 2012.
- [96] T. Ishitani, J. Ninomiya-Tsuji, S. Nagai, M. Nishita, M. Meneghini, N. Barker, M. Waterman, B. Bowerman, H. Clevers, H. Shibuya, and K. Matsumoto, "The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF," *Nature*, vol. 399, pp. 798-802, Jun 24 1999.
-

- 
- [97] T. Ishitani, J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto, "Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling," *Mol Cell Biol*, vol. 23, pp. 1379-89, Feb 2003.
- [98] E. Tzahor, "Wnt/beta-catenin signaling and cardiogenesis: timing does matter," *Dev Cell*, vol. 13, pp. 10-3, Jul 2007.
- [99] B. K. Brott, B. A. Pinsky, and R. L. Erikson, "Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, pp. 963-8, Feb 3 1998.
- [100] K. J. Quadrini and J. J. Bieker, "Kruppel-like zinc fingers bind to nuclear import proteins and are required for efficient nuclear localization of erythroid Kruppel-like factor," *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 32243-52, Aug 30 2002.
- [101] S. Gray, M. W. Feinberg, S. Hull, C. T. Kuo, M. Watanabe, S. Sen-Banerjee, A. DePina, R. Haspel, and M. K. Jain, "The Kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4," *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 34322-8, Sep 13 2002.
- [102] K. Pandya and T. M. Townes, "Basic residues within the Kruppel zinc finger DNA binding domains are the critical nuclear localization determinants of EKLF/KLF-1," *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 16304-12, May 3 2002.
- [103] T. S. Mehta, H. Lu, X. Wang, A. M. Urvalek, K. H. Nguyen, F. Monzur, J. D. Hammond, J. Q. Ma, and J. Zhao, "A unique sequence in the N-terminal regulatory region controls the nuclear localization of KLF8 by cooperating with the C-terminal zinc-fingers," *Cell Res*, vol. 19, pp. 1098-109, Sep 2009.
- [104] M. P. Williamson and M. J. Sutcliffe, "Protein-protein interactions," *Biochem Soc Trans*, vol. 38, pp. 875-8, Aug 2010.
- [105] S. Dwane and P. A. Kiely, "Tools used to study how protein complexes are assembled in signaling cascades," *Bioeng Bugs*, vol. 2, pp. 247-59, Sep-Oct 2011.
- [106] D. C. Otteson, Y. Liu, H. Lai, C. Wang, S. Gray, M. K. Jain, and D. J. Zack, "Kruppel-like factor 15, a zinc-finger transcriptional regulator, represses the rhodopsin and interphotoreceptor retinoid-binding protein promoters," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 45, pp. 2522-30, Aug 2004.
- [107] K. Teshigawara, W. Ogawa, T. Mori, Y. Matsuki, E. Watanabe, R. Hiramatsu, H. Inoue, K. Miyake, H. Sakaue, and M. Kasuga, "Role of Kruppel-like factor 15 in PEPCK gene expression in the liver," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 327, pp. 920-6, Feb 18 2005.
- [108] J. Yamamoto, Y. Ikeda, H. Iguchi, T. Fujino, T. Tanaka, H. Asaba, S. Iwasaki, R. X. Ioka, I. W. Kaneko, K. Magoori, S. Takahashi, T. Mori, H. Sakaue, T. Kodama, M. Yanagisawa, T. T. Yamamoto, S. Ito, and J. Sakai, "A Kruppel-like factor KLF15 contributes fasting-induced transcriptional activation of mitochondrial acetyl-CoA synthetase gene AceCS2," *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 16954-62, Apr 23 2004.
- [109] J. Turner and M. Crossley, "Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger," *Trends Biochem Sci*, vol. 24, pp. 236-40, Jun 1999.
- [110] W. Zhu, I. Shiojima, Y. Ito, Z. Li, H. Ikeda, M. Yoshida, A. T. Naito, J. Nishi, H. Ueno, A. Umezawa, T. Minamino, T. Nagai, A. Kikuchi, M. Asashima, and I. Komuro, "IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis," *Nature*, vol. 454, pp. 345-9, Jul 17 2008.
- [111] D. E. Kang, S. Soriano, X. Xia, C. G. Eberhart, B. De Strooper, H. Zheng, and E. H. Koo, "Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis," *Cell*, vol. 110, pp. 751-62, Sep 20 2002.
- [112] E. Markiewicz, K. Tilgner, N. Barker, M. van de Wetering, H. Clevers, M. Dorobek, I. Hausmanowa-Petrusewicz, F. C. Ramaekers, J. L. Broers, W. M. Blankesteyn, G. Salpingidou, R. G. Wilson, J. A.
-

- Ellis, and C. J. Hutchison, "The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus," *EMBO J*, vol. 25, pp. 3275-85, Jul 26 2006.
- [113] M. Nishiyama, K. Nakayama, R. Tsunematsu, T. Tsukiyama, A. Kikuchi, and K. I. Nakayama, "Early embryonic death in mice lacking the beta-catenin-binding protein Duplin," *Mol Cell Biol*, vol. 24, pp. 8386-94, Oct 2004.
- [114] A. Bauer, S. Chauvet, O. Huber, F. Usseglio, U. Rothbacher, D. Aragnol, R. Kemler, and J. Pradel, "Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity," *EMBO J*, vol. 19, pp. 6121-30, Nov 15 2000.
- [115] T. A. Graham, W. K. Clements, D. Kimelman, and W. Xu, "The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT," *Mol Cell*, vol. 10, pp. 563-71, Sep 2002.
- [116] A. M. Singh, F. Q. Li, T. Hamazaki, H. Kasahara, K. Takemaru, and N. Terada, "Chibby, an antagonist of the Wnt/beta-catenin pathway, facilitates cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells," *Circulation*, vol. 115, pp. 617-26, Feb 6 2007.
- [117] W. Zhang, X. Chen, Y. Kato, P. M. Evans, S. Yuan, J. Yang, P. G. Rychahou, V. W. Yang, X. He, B. M. Evers, and C. Liu, "Novel cross talk of Kruppel-like factor 4 and beta-catenin regulates normal intestinal homeostasis and tumor repression," *Mol Cell Biol*, vol. 26, pp. 2055-64, Mar 2006.
- [118] P. M. Evans, X. Chen, W. Zhang, and C. Liu, "KLF4 interacts with beta-catenin/TCF4 and blocks p300/CBP recruitment by beta-catenin," *Mol Cell Biol*, vol. 30, pp. 372-81, Jan 2010.
- [119] R. Gamsjaeger, C. K. Liew, F. E. Loughlin, M. Crossley, and J. P. Mackay, "Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs," *Trends Biochem Sci*, vol. 32, pp. 63-70, Feb 2007.
- [120] M. J. Betts, R. B. Russell, "Amino acid properties and consequences of substitutions." *Bioinformatics for Geneticists*, Chapter 14, pp. 289-316, 2003, ISBN 0-470-84393-4.
- [121] P. Coulombe and S. Meloche, "Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1773, pp. 1376-87, Aug 2007.
- [122] T. Ishitani and S. Ishitani, "Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator," *Cell Signal*, vol. 25, pp. 190-7, Jan 2013.
- [123] C. Kanei-Ishii, T. Nomura, T. Takagi, N. Watanabe, K. I. Nakayama, and S. Ishii, "Fbxw7 acts as an E3 ubiquitin ligase that targets c-Myb for nemo-like kinase (NLK)-induced degradation," *J Biol Chem*, vol. 283, pp. 30540-8, Nov 7 2008.
- [124] M. Yamada, J. Ohnishi, B. Ohkawara, S. Iemura, K. Satoh, J. Hyodo-Miura, K. Kawachi, T. Natsume, and H. Shibuya, "NARF, an nemo-like kinase (NLK)-associated ring finger protein regulates the ubiquitylation and degradation of T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF)," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 20749-60, Jul 28 2006.
- [125] D. Sinner, J. J. Kordich, J. R. Spence, R. Opoka, S. Rankin, S. C. Lin, D. Jonatan, A. M. Zorn, and J. M. Wells, "Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells," *Mol Cell Biol*, vol. 27, pp. 7802-15, Nov 2007.
- [126] X. Liu, M. Luo, W. Xie, J. M. Wells, M. J. Goodheart, and J. F. Engelhardt, "Sox17 modulates Wnt3A/beta-catenin-mediated transcriptional activation of the Lef-1 promoter," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 299, pp. L694-710, Nov 2010.
- [127] B. D. White, N. K. Nguyen, and R. T. Moon, "Wnt signaling: it gets more humorous with age," *Curr Biol*, vol. 17, pp. R923-5, Nov 6 2007.

- 
- [128] A. T. Naito, I. Shiojima, and I. Komuro, "Wnt signaling and aging-related heart disorders," *Circ Res*, vol. 107, pp. 1295-303, Nov 26 2010.
- [129] X. Chen, S. P. Shevtsov, E. Hsich, L. Cui, S. Haq, M. Aronovitz, R. Kerkela, J. D. Molkenin, R. Liao, R. N. Salomon, R. Patten, and T. Force, "The beta-catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress-induced cardiac hypertrophy," *Mol Cell Biol*, vol. 26, pp. 4462-73, Jun 2006.
- [130] J. Qu, J. Zhou, X. P. Yi, B. Dong, H. Zheng, L. M. Miller, X. Wang, M. D. Schneider, and F. Li, "Cardiac-specific haploinsufficiency of beta-catenin attenuates cardiac hypertrophy but enhances fetal gene expression in response to aortic constriction," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 43, pp. 319-26, Sep 2007.
- [131] P. Malekar, M. Hagenmueller, A. Anyanwu, S. Buss, M. R. Streit, C. S. Weiss, D. Wolf, J. Riffel, A. Bauer, H. A. Katus, and S. E. Hardt, "Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling," *Hypertension*, vol. 55, pp. 939-45, Apr 2010.
- [132] A. Klaus and W. Birchmeier, "Developmental signaling in myocardial progenitor cells: a comprehensive view of Bmp- and Wnt/beta-catenin signaling," *Pediatr Cardiol*, vol. 30, pp. 609-16, Jul 2009.
- [133] C. Holmes and W. L. Stanford, "Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma," *Stem Cells*, vol. 25, pp. 1339-47, Jun 2007.
- [134] K. Matsuura, T. Nagai, N. Nishigaki, T. Oyama, J. Nishi, H. Wada, M. Sano, H. Toko, H. Akazawa, T. Sato, H. Nakaya, H. Kasanuki, and I. Komuro, "Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes," *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 11384-91, Mar 19 2004.
- [135] M. Takamiya, K. H. Haider, and M. Ashraf, "Identification and characterization of a novel multipotent sub-population of Sca-1(+) cardiac progenitor cells for myocardial regeneration," *PLoS One*, vol. 6, p. e25265, 2011.
- [136] M. M. Zaruba, M. Soonpaa, S. Reuter, and L. J. Field, "Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts," *Circulation*, vol. 121, pp. 1992-2000, May 11 2010.
- [137] S. A. Jesty, M. A. Steffey, F. K. Lee, M. Breitbach, M. Hesse, S. Reining, J. C. Lee, R. M. Doran, A. Y. Nikitin, B. K. Fleischmann, and M. I. Kotlikoff, "c-kit+ precursors support postinfarction myogenesis in the neonatal, but not adult, heart," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, pp. 13380-5, Aug 14 2012.
- [138] P. Wikstrom, I. F. Lissbrant, P. Stattin, L. Egevad, and A. Bergh, "Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer," *Prostate*, vol. 51, pp. 268-75, Jun 1 2002.
- [139] J. M. Lopez-Novoa and C. Bernabeu, "The physiological role of endoglin in the cardiovascular system," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 299, pp. H959-74, Oct 2010.
- [140] T. Scholzen and J. Gerdes, "The Ki-67 protein: from the known and the unknown," *J Cell Physiol*, vol. 182, pp. 311-22, Mar 2000.
- [141] S. V. Shmelkov, R. St Clair, D. Lyden, and S. Rafii, "AC133/CD133/Prominin-1," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 37, pp. 715-9, Apr 2005.
- [142] P. K. Goon, G. Y. Lip, C. J. Boos, P. S. Stonelake, and A. D. Blann, "Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer," *Neoplasia*, vol. 8, pp. 79-88, Feb 2006.
- [143] C. Urbich and S. Dimmeler, "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology," *Circ Res*, vol. 95, pp. 343-53, Aug 20 2004.
-

- 
- [144] A. Kappel, V. Ronicke, A. Damert, I. Flamme, W. Risau, and G. Breier, "Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice," *Blood*, vol. 93, pp. 4284-92, Jun 15 1999.
- [145] H. Ishitobi, A. Wakamatsu, F. Liu, T. Azami, M. Hamada, K. Matsumoto, H. Kataoka, M. Kobayashi, K. Choi, S. Nishikawa, S. Takahashi, and M. Ema, "Molecular basis for Flk1 expression in hematocardiovascular progenitors in the mouse," *Development*, vol. 138, pp. 5357-68, Dec 2011.
- [146] V. C. Chen, R. Stull, D. Joo, X. Cheng, and G. Keller, "Notch signaling respecifies the hemangioblast to a cardiac fate," *Nat Biotechnol*, vol. 26, pp. 1169-78, Oct 2008.
- [147] A. Klaus, M. Muller, H. Schulz, Y. Saga, J. F. Martin, and W. Birchmeier, "Wnt/beta-catenin and Bmp signals control distinct sets of transcription factors in cardiac progenitor cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, pp. 10921-6, Jul 3 2012.
- [148] H. Wang, P. C. Charles, Y. Wu, R. Ren, X. Pi, M. Moser, M. Barshishat-Kupper, J. S. Rubin, C. Perou, V. Bautch, and C. Patterson, "Gene expression profile signatures indicate a role for Wnt signaling in endothelial commitment from embryonic stem cells," *Circ Res*, vol. 98, pp. 1331-9, May 26 2006.
- [149] M. J. Evans and M. H. Kaufman, "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos," *Nature*, vol. 292, pp. 154-6, Jul 9 1981.
- [150] V. Kouskoff, G. Lacaud, S. Schwantz, H. J. Fehling, and G. Keller, "Sequential development of hematopoietic and cardiac mesoderm during embryonic stem cell differentiation," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, pp. 13170-5, Sep 13 2005.
- [151] P. P. Tam and D. A. Loebel, "Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation," *Nat Rev Genet*, vol. 8, pp. 368-81, May 2007.
- [152] S. S. Chen, W. Fitzgerald, J. Zimmerberg, H. K. Kleinman, and L. Margolis, "Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions regulate embryonic stem cell differentiation," *Stem Cells*, vol. 25, pp. 553-61, Mar 2007.
- [153] H. Baharvand, M. Azarnia, K. Parivar, and S. K. Ashtiani, "The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 38, pp. 495-503, Mar 2005.
- [154] A. J. LaGier, S. H. Yoo, E. C. Alfonso, S. Meiners, and M. E. Fini, "Inhibition of human corneal epithelial production of fibrotic mediator TGF-beta2 by basement membrane-like extracellular matrix," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 48, pp. 1061-71, Mar 2007.
- [155] A. M. Smits, P. van Vliet, C. H. Metz, T. Korfage, J. P. Sluijter, P. A. Doevendans, and M. J. Goumans, "Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology," *Nat Protoc*, vol. 4, pp. 232-43, 2009.
- [156] W. B. VanWinkle, M. B. Snuggs, and L. M. Buja, "Cardiogel: a biosynthetic extracellular matrix for cardiomyocyte culture," *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, vol. 32, pp. 478-85, Sep 1996.
- [157] W. A. LaFramboise, D. Scalise, P. Stoodley, S. R. Graner, R. D. Guthrie, J. A. Magovern, and M. J. Becich, "Cardiac fibroblasts influence cardiomyocyte phenotype in vitro," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 292, pp. C1799-808, May 2007.
- [158] R. Fassler, J. Rohwedel, V. Maltsev, W. Bloch, S. Lentini, K. Guan, D. Gullberg, J. Hescheler, K. Addicks, and A. M. Wobus, "Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin," *J Cell Sci*, vol. 109 ( Pt 13), pp. 2989-99, Dec 1996.
-

## Referenzen

---

- [159] H. Oh, X. Chi, S. B. Bradfute, Y. Mishina, J. Pocius, L. H. Michael, R. R. Behringer, R. J. Schwartz, M. L. Entman, and M. D. Schneider, "Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1015, pp. 182-9, May 2004.
- [160] P. van Vliet, M. Roccio, A. M. Smits, A. A. van Oorschot, C. H. Metz, T. A. van Veen, J. P. Sluijter, P. A. Doevendans, and M. J. Goumans, "Progenitor cells isolated from the human heart: a potential cell source for regenerative therapy," *Neth Heart J*, vol. 16, pp. 163-9, May 2008.
- [161] R. Nusse. (2012). *Wnt Homepage*. Available: [www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/smallmolecules](http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/smallmolecules)
- [162] M. P. Coghlan, A. A. Culbert, D. A. Cross, S. L. Corcoran, J. W. Yates, N. J. Pearce, O. L. Rausch, G. J. Murphy, P. S. Carter, L. Roxbee Cox, D. Mills, M. J. Brown, D. Haigh, R. W. Ward, D. G. Smith, K. J. Murray, A. D. Reith, and J. C. Holder, "Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription," *Chem Biol*, vol. 7, pp. 793-803, Oct 2000.
- [163] M. Bartekova, S. Carnicka, D. Pancza, M. Ondrejckova, A. Breier, and T. Ravingerova, "Acute treatment with polyphenol quercetin improves postischemic recovery of isolated perfused rat hearts after global ischemia," *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 88, pp. 465-71, Apr 2010.
- [164] M. Koyanagi, P. Bushoven, M. Iwasaki, C. Urbich, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler, "Notch signaling contributes to the expression of cardiac markers in human circulating progenitor cells," *Circ Res*, vol. 101, pp. 1139-45, Nov 26 2007.
- [165] J. Huelsken, R. Vogel, B. Erdmann, G. Cotsarelis, and W. Birchmeier, "beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin," *Cell*, vol. 105, pp. 533-45, May 18 2001.
- [166] D. Zechner, Y. Fujita, J. Hulsken, T. Muller, I. Walther, M. M. Taketo, E. B. Crenshaw, 3rd, W. Birchmeier, and C. Birchmeier, "beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system," *Dev Biol*, vol. 258, pp. 406-18, Jun 15 2003.

## 10 Veröffentlichungen

### 10.1 Publikationen

- **Noack C**, Zafiriou MP, Schaeffer HJ, Renger A, Pavlova E, Dietz R, Zimmermann WH, Bergmann MW, Zelarayan LC. „Krueppel-like factor 15 regulates Wnt/ $\beta$ -catenin transcription and controls cardiac progenitor cell fate in the postnatal heart.” *EMBO Mol Med*. 2012 Sep;4(9):992-1007.
- Zafiriou MP, Zelarayan LC, **Noack C**, Renger A, Nigam S, Siafaka-Kapadai A. “Hepoxilin A(3) protects  $\beta$ -cells from apoptosis in contrast to its precursor, 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid”. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jun; 1811(6):361-9.
- Christian F, Szaszák M, Friedl S, Drewianka S, Lorenz D, Goncalves A, Furkert J, Vargas C, Schmieder P, Götz F, Zühlke K, Moutty M, Göttert H, Joshi M, Reif B, Haase H, Morano I, Grossmann S, Klukovits A, Verli J, Gáspár R, **Noack C**, Bergmann M, Kass R, Hampel K, Kashin D, Genieser HG, Herberg FW, Willoughby D, Cooper DM, Baillie GS, Houslay MD, von Kries JP, Zimmermann B, Rosenthal W, Klussmann E. “Small molecule AKAP-protein kinase A (PKA) interaction disruptors that activate PKA interfere with compartmentalized cAMP signaling in cardiac myocytes”. *J Biol Chem*. 2011 Mar 18; 286(11):9097-96.
- Zelarayan LC, **Noack C**, Zafiriou MP, Renger A, Bergmann MW. “Wnt Signaling Molecules in Left Ventricular Remodeling Focus on Dishevelled 1”. *Hypertension*. 2010 Feb 22.
- 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
- Zelarayan 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.
- Baurand A, Zelarayan L, Betney R, Gehrke C, Dunger S, **Noack C**, Busjahn A, Huelsken J, Taketo MM, Birchmeier W, Dietz R, Bergmann MW. „Beta-catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling”. *Circ Res*. 2007 May 11;100(9):1353-62.

### 10.2 Vorträge

- “Krueppel-like factor 15 controls cardiac progenitor cell fate during aging and stress induced remodeling in the adult heart via inhibition of  $\beta$ -catenin.”  
Annual meeting of the Working Group on Myocardial Function and the Working Group on Cell Biology, Villa Monastero, Italien 2011

### 10.3 Posterpräsentationen mit Auszeichnung

– 1. Platz *Basic-Science-Poster Preis*:

Interaction of Krüppel-like factor (KLF) 15 and Wnt-signaling pathway and its role in adult cardiac precursor cell regulation.

Herbsttagung und Jahrestagung der Arbeitsgruppe Rhythmologie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Düsseldorf, Deutschland 2011

– 2. Platz *Poster Award*:

Krüppel-like factor 15 antagonizes the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway and has a role in adult endogenous cardiac progenitor cell biology.

8<sup>th</sup> Dutch-German Joint Meeting of Molecular Cardiology, Rotterdam, Niederlande 2010

## **11 Lebenslauf**

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

## 12 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Martin W. Bergmann für die vielen und vor allem interessanten Projekte und Herausforderungen der letzten Jahre, die nicht nur meine Dissertation hervorgebracht hat. Ich danke auch für die vielfältigen Möglichkeiten, an den zahlreichen, spannenden nationalen und internationalen Kongressen teilgenommen haben zu dürfen.

Außerordentlicher Dank gilt Dr. Laura C. Zelarayán, die für Probleme jeder Art immer Zeit und ein gutes Wort übrig hatte. Vielen Dank für die Hilfe, die spannenden Diskussionen, den unerschöpflichen Ideenreichtum und vor allem für den Spaß, den wir dabei hatten und haben – ganz egal zu welcher Uhrzeit.

Ganz besondere Anerkennung gilt meinen Kollegen Bärbel Pohl, Anke Renger und Dr. MP. Zafeiriou. Ich empfinde tiefen Dank, dass ich die Gute Laune, den Humor, die Unkompliziertheit, stete Hilfsbereitschaft und Loyalität auch weit außerhalb des Labors erleben durfte!

Dr. Enno Klussmann und seiner gesamten Gruppe bin ich dankbar für die Projekte, an denen ich teilhaben durfte und vor allem für die hervorragenden Anregungen und Ideen für meine Projekte. Ich habe mich immer als einen Teil der Gruppe gefühlt.

Für die Expertise und geduldige Unterstützung bei den Proteinaufreinigungen danke ich besonders Frank Götz. Ebenso danke ich Elena Pavlova für die eifrige Hilfe im Labor, Dr. Andrey Goncalves für die TAC-OPs, Martin Taube für alle Echomessungen, Prof. A. Hecht für die Bereitstellung des TCF4-Plasmids und ganz besonders Dr. HJ Schäffer für die KLF15-Plasmide und -Knockout-Maus – ohne diese Materialien wäre die Dissertation nicht so schnell und erfolgreich voran gegangen.

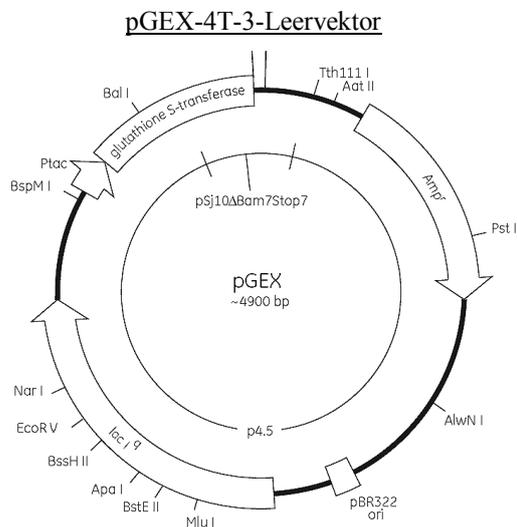
Prof. R. Dietz und Prof. WH. Zimmermann möchte ich für die Möglichkeit danken, in ihren Gruppen an den spannenden Themen arbeiten zu dürfen.

Ich danke Prof. Markus Wahl für die bereitwillige und unkomplizierte Übernahme der Betreuung an der FU Berlin.

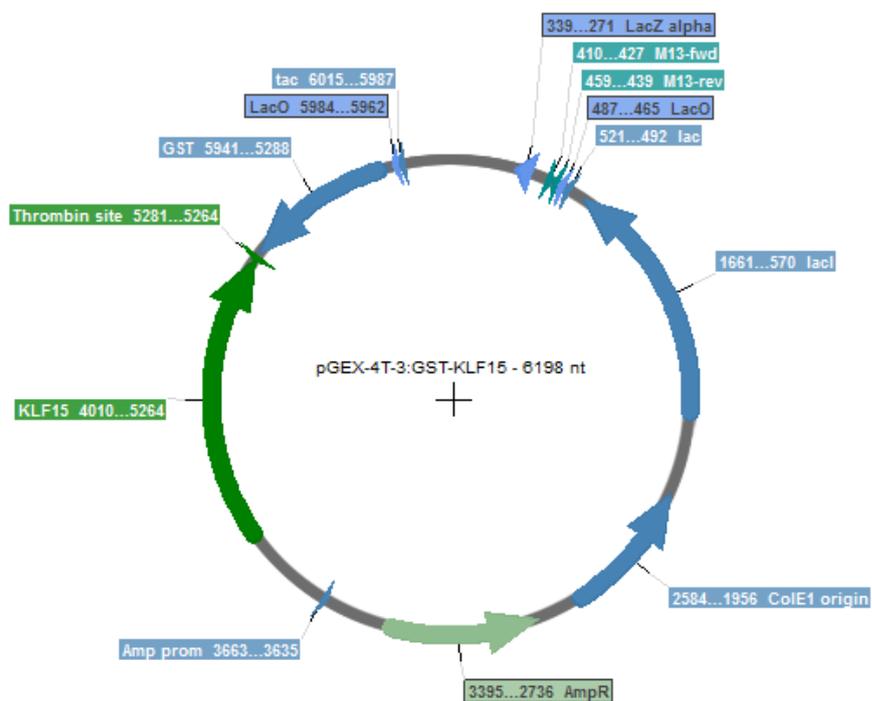
Die größte, nicht mit Worten zu beschreibende Dankbarkeit gilt Michael Tutschek. Danke für die nie endende Geduld, Unterstützung und Rücksichtnahme der letzten Jahre in allen Lebenslagen!

## 13 Anhang

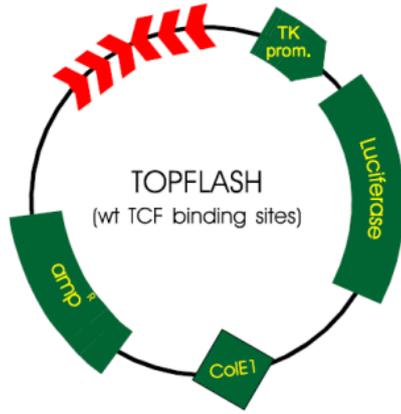
### I Plasmidkarten



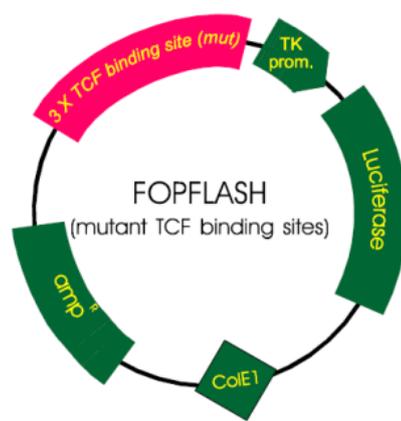
**pGEX-4T3 mit humanem KLF15.** Entsprechende Plasmide mit humanem  $\beta$ -Catenin und NLK sind ebenfalls vorhanden. Alle Konstrukte wurden auf dieselbe Art generiert, deshalb weisen die Plasmide außerhalb der MCS identische Eigenschaften auf.



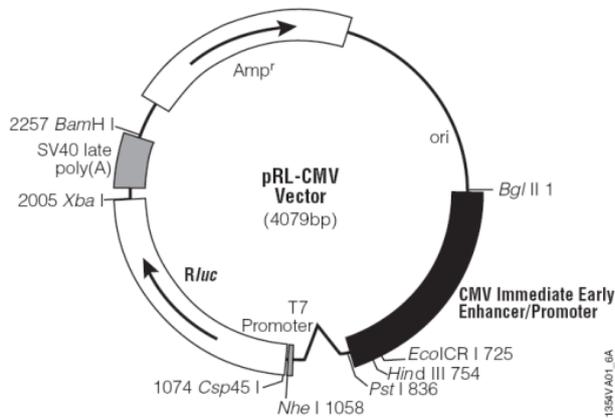
pTOPflash mit 3 TCF-Bindestellen im Promoter des Luziferasegens



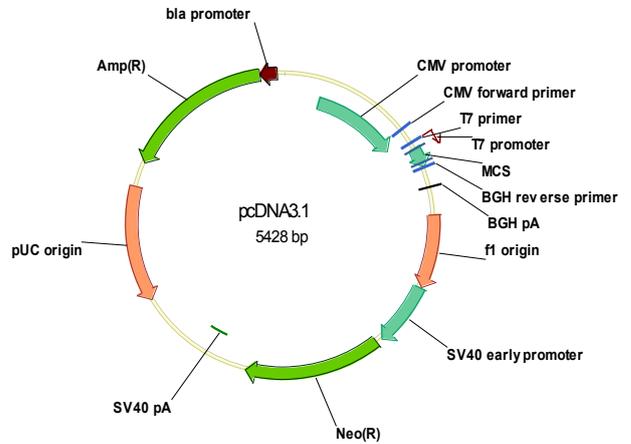
pFOPflash mit 3 mutierten TCF-Bindestellen im Promoter des Luziferasegens



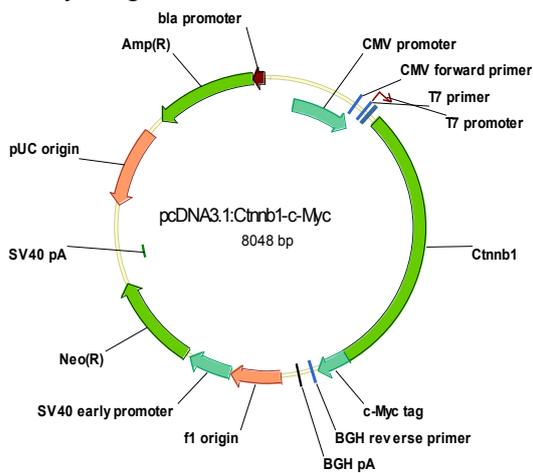
pRL-CMV, kodierend für Renilla-Luziferase



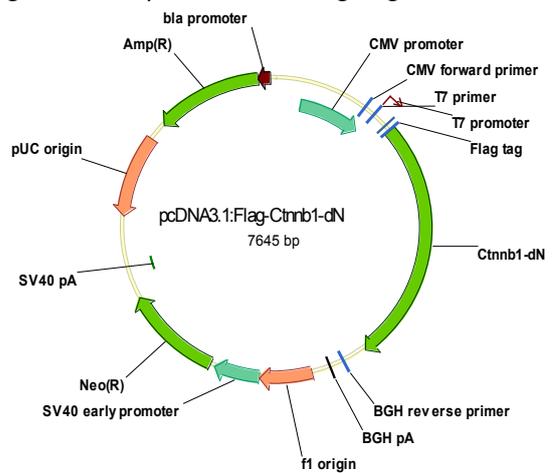
pcDNA3.1-Leervektor



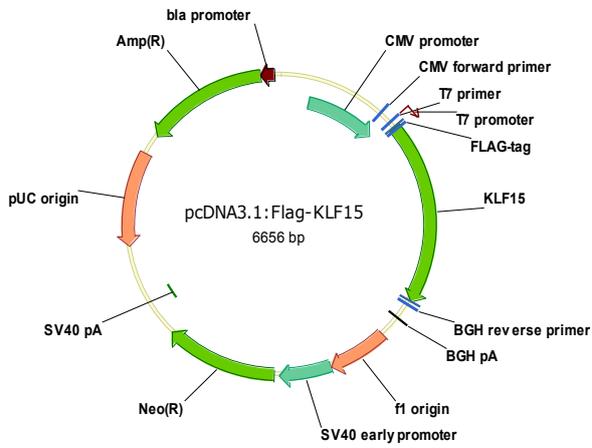
pcDNA3.1:Ctnnb1-c-Myc, kodiert murines  $\beta$ -Catenin mit c-Myc-Tag



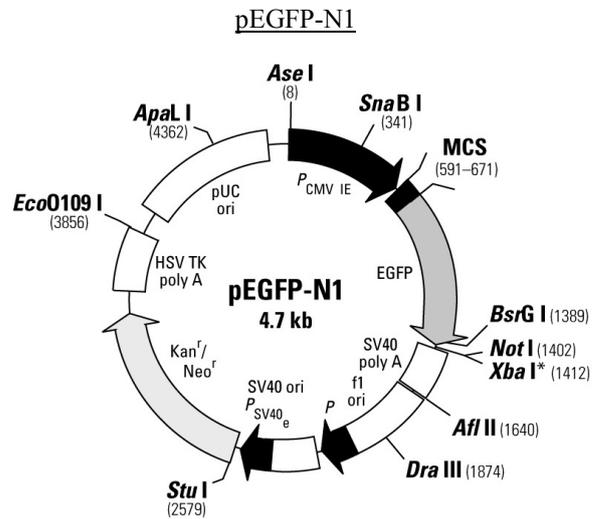
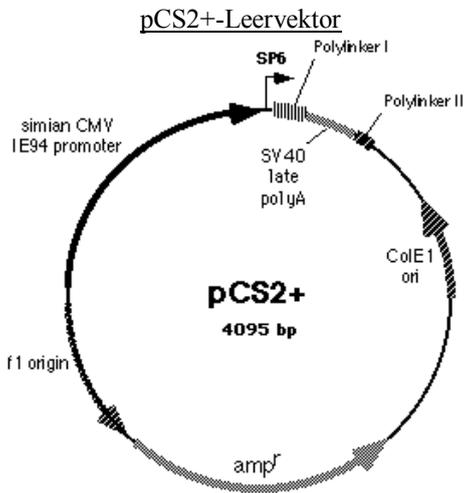
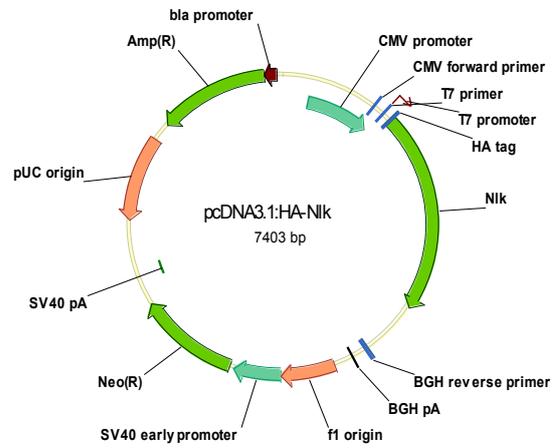
pcDNA3.1:Flag-Ctnnb1-dN, kodiert murines nicht-degradierbares  $\beta$ -Catenin mit Flag-Tag



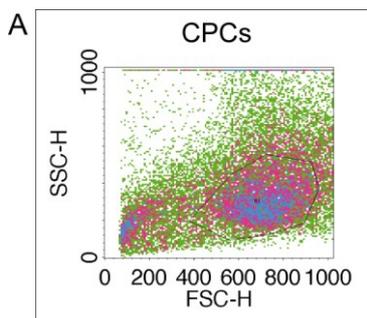
pcDNA3.1:Flag-KLF15, kodiert humanes KLF15 mit Flag-Tag. Die verkürzte N-terminalen  $\Delta$ N45-,  $\Delta$ N152- und  $\Delta$ N260, sowie eine  $\Delta$ C-Mutante wurden auf dieselbe Art generiert.



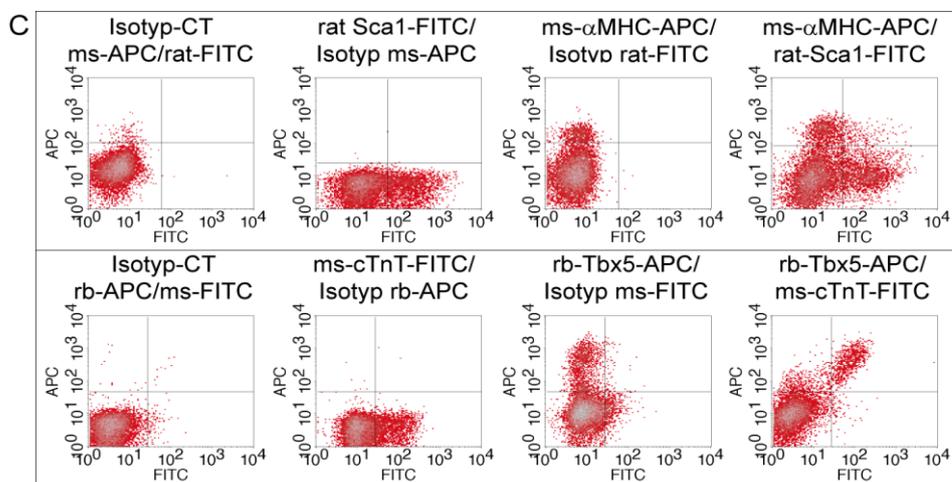
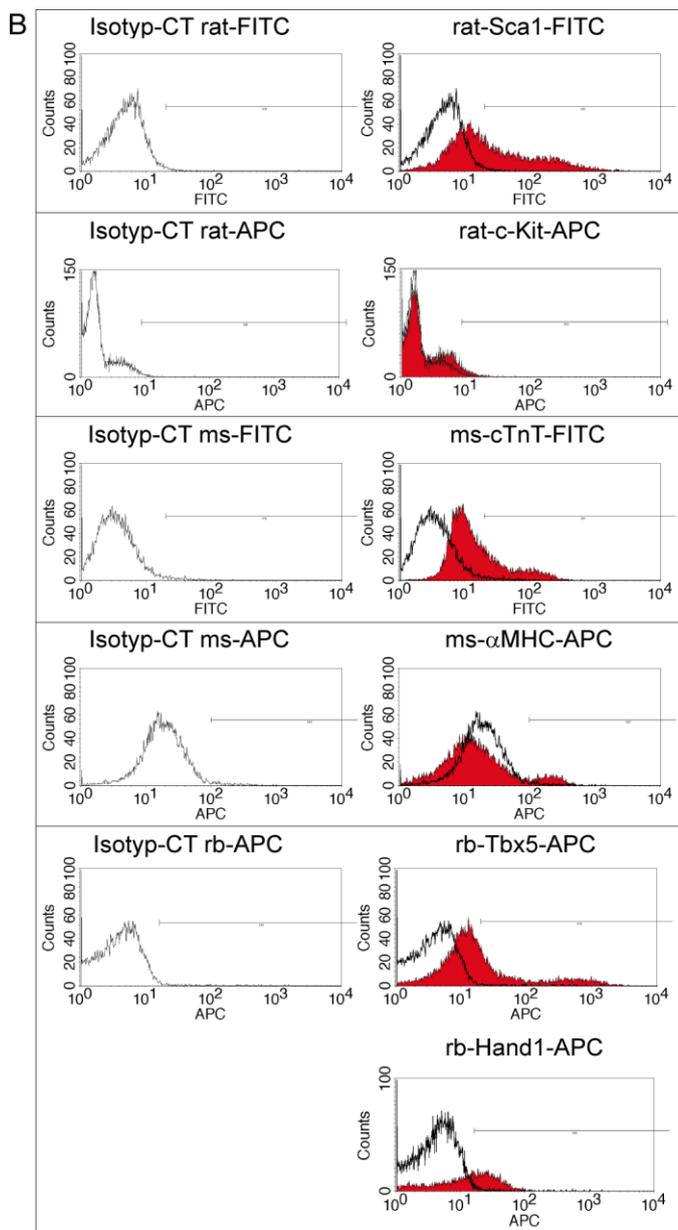
pcDNA3.1:HA-NLK, kodiert murines NLK mit HA-Tag

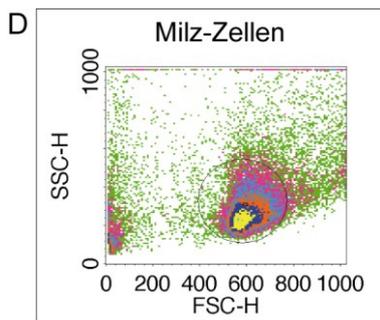


## II Durchflusszytometrische Kontrollen

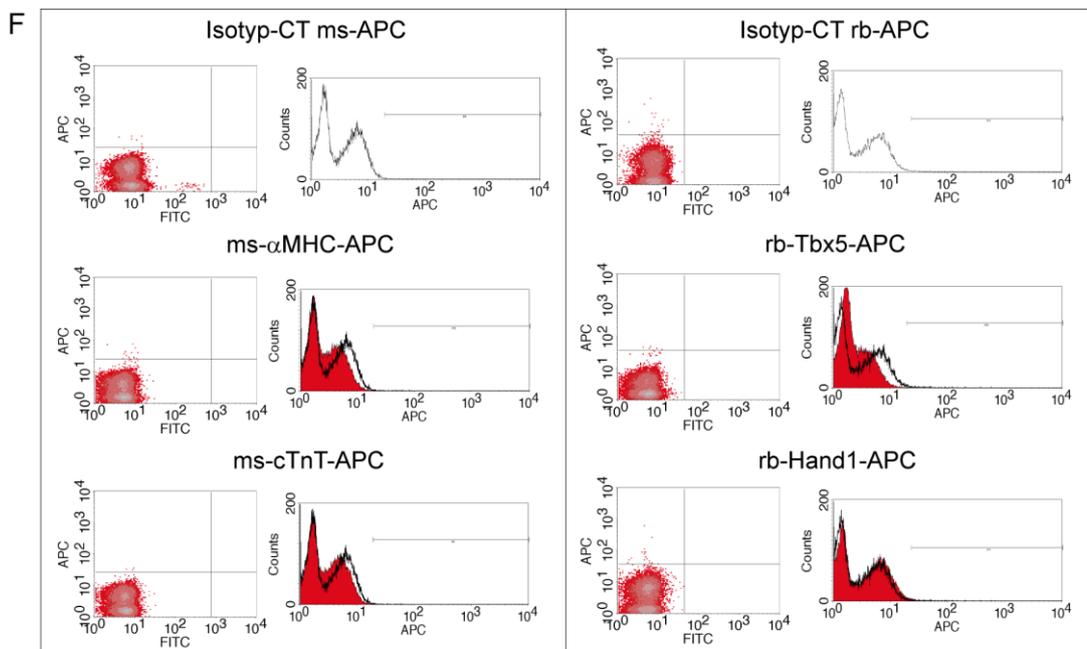
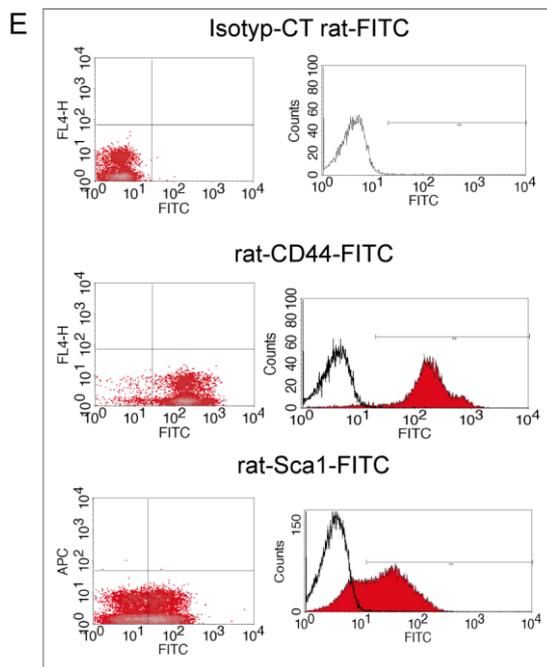


Isolierte CPCs aus adulten Mausherzen wurden in der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrisch untersucht. **(A)** zeigt die analysierte CPC-Population im SSC- und FCS-Scatterplot. **(B)** Dargestellt sind Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen von CPCs mittels der Stammzell-Marker Sca1 und c-Kit, sowie der kardialen Marker cTnT,  $\alpha$ MHC, Tbx5 und Hand1 (rot) mit den entsprechenden Isotyp-Kontrollen (CT, weiß). **(C)** demonstriert eine Analyse der Doppelfärbungen der angegebenen Marker.





Zur Kontrolle wurden Milzzellen auf dieselbe Art isoliert und analysiert. **(D)** zeigt diese Milzzell-Population im SSC- und FCS-Scatterplot. **(E)** Als Positivkontrolle für die Methode wurden die Milzzellen mit Sc1 und dem typischen Marker CD44 detektiert. **(F)** Diese Populationen wurden mit den oben genannten kardialen Markern gefärbt. Es wurde keine positive Population erhalten, so dass demonstriert werden konnte, dass die Marker spezifisch funktionieren.



### III Echokardiographische Messwerte

**Tab. A1 Echokardiographische Analyse der *Klf15*-KO- und WT-Mäuse.**

n.v.=nicht verfügbar, n=10/Gruppe; (\*) p<0.05 Student's *t*-Test, verglichen mit der WT-Gruppe desselben Alters

Alter (Wochen)	<i>Klf15</i> Genotyp	IVSd (mm)	LVPWd (mm)	LVIDd (mm)	FS (%)	EF (%)	HW/BW (mg/g)	HW/TL (mg/mm)
8	WT	0.60 ± 0.02	0.60 ± 0.02	4.07 ± 0.09	28.1 ± 2.19	51.2 ± 3.13	n.v.	n.v.
	KO	0.58 ± 0.02	0.60 ± 0.03	3.88 ± 0.11	24.6 ± 1.88	45.8 ± 2.14	n.v.	n.v.
12	WT	0.75 ± 0.04	0.70 ± 0.03	4.21 ± 0.09	29.8 ± 1.61	54.8 ± 2.84	4.54 ± 0.16	7.71 ± 0.34
	KO	0.73 ± 0.03	0.76 ± 0.03	4.14 ± 0.14	22.2 ± 2.66	42.8 ± 4.24	5.01 ± 0.18	7.03 ± 0.94
16	WT	0.72 ± 0.02	0.72 ± 0.03	4.27 ± 0.19	30.2 ± 3.18	57.3 ± 4.64	5.11 ± 0.12	7.94 ± 0.35
	KO	0.76 ± 0.02	0.77 ± 0.03	4.52 ± 0.12	23.3 ± 3.76 *	46.0 ± 6.50 *	5.44 ± 0.18	8.60 ± 0.38

**Tab. A2 Echokardiographische Analyse der  $\beta$ Cat<sup>Δex3</sup>-TG- und CT-Mäuse 16 Wochen nach Induktion.**

n.v.=nicht verfügbar, n=7/Gruppe; (\*) p<0.05 Student's *t*-Test, verglichen mit der CT-Gruppe desselben Induktionszeitpunkts

Cre Induktion	Genotyp	IVSd (mm)	LVPWd (mm)	LVIDd (mm)	FS (%)	EF (%)	HW/BW (mg/g)	HW/TL (mg/mm)
vor	CT	0.72 ± 0.02	0.69 ± 0.03	4.06 ± 0.08	33.61 ± 1.82	62.63 ± 2.50	n.v.	n.v.
	TG	0.76 ± 0.01	0.75 ± 0.02	4.25 ± 0.04	30.63 ± 1.79	58.27 ± 2.66	n.v.	n.v.
16 Wochen danach	CT	0.68 ± 0.04	0.68 ± 0.04	4.25 ± 0.13	32.76 ± 2.23	61.31 ± 3.28	4.19 ± 0.12	7.01 ± 0.14
	TG	0.77 ± 0.03	0.71 ± 0.00	4.61 ± 0.29	22.41 ± 2.37 *	45.15 ± 4.21 *	4.74 ± 0.18 *	7.46 ± 0.13

**Tab. A3 Echokardiographische Analyse der *Klf15*-KO- und WT-Mäuse nach 2-wöchiger AngII-Infusion.**

ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test, \* p&lt;0.05 and \*\*\* p&lt;0.001 verglichen mit WT-NaCl; †† p&lt;0.01 verglichen mit KO-NaCl

<i>Klf15</i> Genotyp	Infusion	n	IVSd (mm)	LVPWd (mm)	LVIDd (mm)	FS (%)	EF (%)	HW/BW (mg/g)
WT	NaCl	15	0.69 ± 0.02	0.67 ± 0.02	4.54 ± 0.05	25.4 ± 1.51	49.5 ± 2.40	4.17 ± 0.16
WT	AngII	13	0.83 ± 0.03 ***	0.83 ± 0.03 ***	4.37 ± 0.09	22.5 ± 1.17	45.3 ± 2.03	4.94 ± 0.16 *
KO	NaCl	10	0.87 ± 0.05	0.84 ± 0.04	4.02 ± 0.13	28.0 ± 1.43	54.0 ± 4.78	4.85 ± 0.33
KO	AngII	9	0.87 ± 0.03	0.85 ± 0.02	4.48 ± 0.14 ††	23.6 ± 2.89	46.4 ± 5.00	5.37 ± 0.38

**Tab. A4 Echokardiographische Analyse der *Klf15*-KO- und WT-Mäuse 2 Wochen nach TAC.**

ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test, \* p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01, and \*\*\* p&lt;0.001 verglichen mit entsprechender Sham-Gruppe; †† p&lt;0.01 und ††† p&lt;0.001 KO-TAC vs. WT-TAC

<i>Klf15</i> Genotyp & OP	n	desc. Gradient (mm/Hg)	IVSd (mm)	LVPWd (mm)	LVIDd (mm)	FS (%)	EF (%)	HW/BW (mg/g)	HW/TL (mg/mm)
WT-Sham	8	4.25 ± 0.43	0.74 ± 0.02	0.75 ± 0.03	4.27 ± 0.12	30.8 ± 1.80	58.2 ± 2.66	4.25 ± 0.18	6.22 ± 0.26
WT-TAC	12	42.4 ± 5.89 ***	0.93 ± 0.02 ***	0.93 ± 0.02 ***	4.79 ± 0.10 *	17.3 ± 2.04 ***	36.2 ± 3.82 ***	6.63 ± 0.27 ***	10.2 ± 0.43 ***
KO-Sham	8	2.63 ± 0.41	0.76 ± 0.03	0.73 ± 0.03	4.11 ± 0.10	24.5 ± 1.22	48.8 ± 1.76	5.06 ± 0.24	6.03 ± 0.35
KO-TAC	10	35.7 ± 3.62 ***	0.92 ± 0.04 **	0.90 ± 0.04 **	5.34 ± 0.17 ***/††	8.45 ± 1.33 ***/††	18.0 ± 2.92 ***/†††	9.39 ± 0.19 ***/†††	11.8 ± 0.23 ***/††