

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

I. Medizinische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

Die Rolle von Isl1 und Nkx2.5 im transkriptionellen Netzwerk der kardialen Progenitorzelle

Alexander Rudolf Peter Goedel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

2. apl. Prof. Dr. G. Schmidt

3. Univ.-Prof. Dr. M. Halle

Die Dissertation wurde am 11.08.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.04.2012 angenommen.

Für Laurens

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. Herzentwicklung im Embryo bei Säugetieren	9
1.2. Vorläuferpopulationen	12
1.3. Entwicklungspotential multipotenter Isl1 ⁺ kardialer Vorläuferzellen	17
1.4. Transkriptionsfaktoren in der Embryonalentwicklung	20
2. Fragestellung und Zielsetzung	26
3. Material	30
3.1. Chemikalien und Reagenzien	30
3.2. Medium und Zusätze für Bakterien- und Zellkultur	32
3.3. Puffer und Lösungen	33
3.4. Enzyme	36
3.5. Bakterienstämme	36
3.6. Zelllinien	37
3.7. Antikörper	37
3.8. Molekularbiologische Kitsysteme	37
3.9. Molekulargewichtsmarker	38
3.10. Primer	38
3.11. Vektoren	39
3.12. Geräte	40
3.13. Software	41
3.14. Verbrauchsmaterialien	42
4. Methoden	43
4.1. Molekularbiologische Methoden	43
4.1.1. Restriktionsverdau	43
4.1.2. Dephosphorylierung	43
4.1.3. Überhängende DNA-Fragmente entfernen	43
4.1.4. Ligationen	43
4.1.5. DNA-Elektrophorese	44

4.1.6.	Aufreinigung und Konzentration von DNA	44
4.1.7.	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	44
4.1.8.	DNA-Sequenzierung	45
4.1.9.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
4.1.10.	Herstellung von doppelsträngigen Oligonukleotiden	45
4.1.11.	Quantitative Real-Time PCR	46
4.1.12.	Isolierung von RNA aus Zellen	46
4.1.13.	Reverse Transkription von RNA zu cDNA	47
4.1.14.	Herstellung von nukleären Extrakten.....	47
4.1.15.	Luciferase-Assay.....	47
4.1.16.	β -Galaktosidase-Assay	48
4.1.17.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	48
4.1.18.	Bindungs-Assay	49
4.1.19.	Immunpräzipitation.....	49
4.1.20.	SDS-Elektrophorese	50
4.1.21.	Electromobility-Shift-Assay (EMSA)	50
4.1.22.	Western Blot	51
4.2.	Klonierung der Vektoren.....	52
4.2.1.	Klonierung des Vektors pGEX-Nkx2.5.....	52
4.2.2.	Klonierung des Vektors pET101-Is1	52
4.2.3.	Klonierung des Vektors pSin Nkx-HA IRES GFP.....	53
4.2.4.	Klonierung der pGL4.24 Luciferase Vektoren.....	53
4.3.	Bakterienkultur	54
4.3.1.	Transformation kompetenter Bakterien	54
4.3.2.	Vermehrung von Plasmiden	54
4.3.3.	Expression von GST-tag-Nkx2.5 in Escherichia Coli	54
4.3.4.	Aufreinigung von GST-tag Proteinen.....	54
4.3.5.	Expression von His-tag-Is1 in Escherichia Coli.....	55
4.3.6.	Aufreinigung von His-tag Proteinen.....	55

4.4.	Eukaryote Zellkultur.....	56
4.4.1.	Kulturbedingungen	56
4.4.2.	Passagieren der Zellen	56
4.4.3.	Einfrieren der Zellen.....	56
4.4.4.	Auftauen der Zellen.....	57
4.4.5.	Präparation der Feederzellen.....	57
4.4.6.	Transfektion von Zellen	57
4.4.7.	Herstellung von Poly-HEMA beschichteten Platten	58
4.4.8.	Differenzierung von ES-Zellen im embryoid body (EB) System	58
4.4.9.	Herstellung von Lentiviren.....	58
4.4.10.	Infektion von embryonalen Stammzellen mit Lentiviren	59
4.4.11.	Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung (FACS).....	59
4.4.12.	Immunfluoreszenz.....	60
5.	Ergebnisse	61
5.1.	Interaktion von Nkx2.5 und Isl1	61
5.1.1.	Co-Immunpräzipitation im heterologen System	61
5.1.2.	<i>In vitro</i> Expression, Aufreinigung und Interaktion.....	62
5.1.3.	Domain-Mapping mit trunkierten Nkx2.5 Mutanten.....	63
5.1.4.	Herstellung einer Nkx2.5-HA überexprimierenden ES-Zelllinie.....	64
5.1.5.	Co-Immunpräzipitation in ES-Zellen der Maus	67
5.2.	Gemeinsame Regulation von Genen der kardialen Entwicklung	68
5.3.	Direktes Abschalten der Isl1-Expression durch Nkx2.5	70
6.	Diskussion	75
6.1.	Interaktion von Nkx2.5 mit Isl1	75
6.2.	Gemeinsame Regulation von Genen der kardialen Entwicklung	76
6.3.	Direktes Abschalten der Isl1-Expression durch Nkx2.5	78
6.4.	Ausblick.....	80
7.	Literaturverzeichnis.....	81
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	87

9. Zusammenfassung	89
10. Summary	90
Im Rahmen der Dissertation entstandene Publikationen	91
Lebenslauf	92
Danksagung.....	93

1. Einleitung

1.1. Herzentwicklung im Embryo bei Säugetieren

Die Entstehung des Herzens und der damit verbundene Aufbau einer eigenen Zirkulation erfolgt im komplexen Zusammenspiel verschiedener Gewebe aus unterschiedlichen Teilen des Embryos. Zu Beginn werden die Zellen des Embryos über Diffusion ernährt. Bei zunehmender Größe und dementsprechender Zunahme der Diffusionsstrecken wird der Transport von Nährstoffen und Sauerstoff notwendig: Der Beginn der Entwicklung des kardiovaskulären Systems ist eingeleitet. Diese verläuft bei Säugetieren insbesondere in der frühen Phase relativ ähnlich, so dass im Folgenden für diese Zeit die Embryonalentwicklung in der Maus als Modell für die Entstehung des kardiovaskulären Systems bei Säugetieren beschrieben wird. Die ersten Vorläuferzellen entstehen im seitlichen viszeralem Mesoderm, breiten sich nach kranial aus und bilden eine hufeisenförmige Struktur, die auch kardiogene Zone genannt wird (siehe Abbildung 1). Diese Zone liegt am Boden der Zölonhöhle, welche an dieser Stelle später das Perikardium bildet, sowie zentral vor der Prächordalplatte und der Neuralplatte (Sadler 1998). Die kraniale und seitliche Ausdehnung der kardiogenen Zone reicht fast bis zur Grenze zwischen embryonalem und extraembryonalem Gewebe (Harvey 2002).

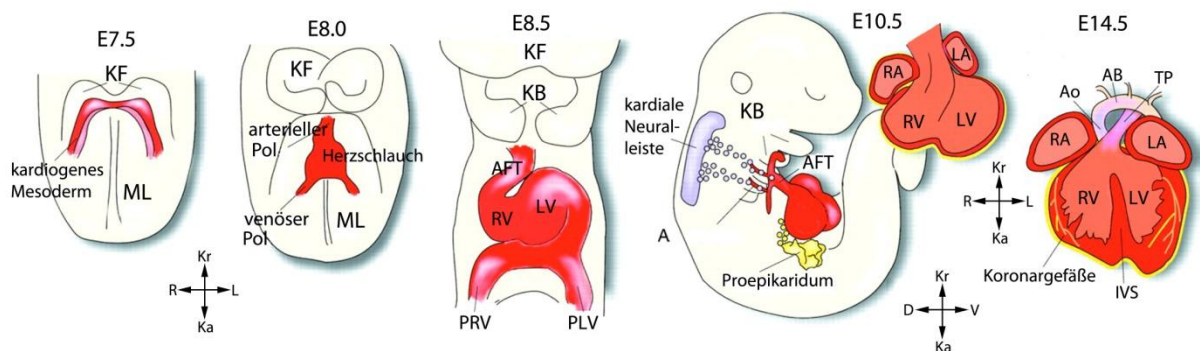


Abbildung 1 Schematische Darstellung der embryonalen Herzentwicklung

Die Abbildung zeigt schematisch den Beitrag der drei kardialen Vorläuferpopulationen, des kardiogenen Mesoderms (rot), der kardialen Neuralleiste (lila) und des proepikardialen Organs (gelb). Die angegebenen Tage der Embryonalentwicklung beziehen sich auf Mäuseembryonen. Kopffalten (KF), Mittellinie (ML), Kiemenbögen (KB), Ausflusstrakt (AFT), rechter Ventrikel (RV), linker Ventrikel (LV), primitiver rechter Vorhof (PRV), primitiver linker Vorhof (PLV), Arterien des Aortenbogens (AB Arterien), rechter Vorhof (RA), linker Vorhof (LA), Aorta (Ao), Truncus pulmonalis (TP), interventrikuläres Septum (IVS) (nach Laugwitz et al. 2008).

Dadurch, dass die Zellen der kardiogenen Zone ventralwärts wandern und an der Mittellinie miteinander verschmelzen, bildet sich der Herzschlauch (siehe Abb. 1). Dieser nimmt an seinem kaudalen Ende venöses Blut auf und pumpt dieses nach kranial. Durch die Vorwölbung des Herzschlauches in die Zölonhöhle entsteht eine Umschlagfalte, die dem dorsalen Mesokard entspricht. Im weiteren Verlauf bildet sich diese zurück, so dass das Herz

in der entstehenden Perikardhöhle nur noch im Aus- und Einflussbereich fixiert ist (Sadler 1998).

Bei der Bildung der Herzscheife krümmt sich der obere Teil des Herzschlauch nach ventral, kaudal und rechts und verdrängt den unteren Teil nach dorsal, kranial und links (siehe Abb. 1). Gleichzeitig beginnt sich der Herzschlauch selbst zu verändern. Der kaudale Abschnitt, der außerhalb des Perikards liegt und noch aus zwei paarigen Anlagen besteht, verschmilzt und wird in die Perikardhöhle verlagert. Er bildet den einheitlichen Vorhof. Aus einer Verdickung des Herzschlauches, dem Bulbus cordis, entsteht der trabekuläre Teil des rechten Ventrikels, die Ausflussbahn und der Truncus arteriosus. Auch im Bereich des späteren linken Ventrikels bilden sich Trabekel aus. Durch diese trabekuläre Struktur sind bereits in diesem Entwicklungsstadium rechter und linker Ventrikel gekennzeichnet. Die beiden Ventrikel bleiben zunächst über das Foramen interventriculare miteinander verbunden (Sadler 1998). Im Bereich des atrioventrikulären Übergangs bilden sich Endokardkissen aus, aus welchen sich später die Mitral- und die Trikuspidalklappe entwickeln. Solche Endokardkissen findet man auch im Bereich des Ausflusstraktes. Dort entsteht aus ihnen die Aorten- und Pulmonalklappe sowie das Septum aortopulmonale, welches später den Ausflusstrakt in Aorta und Arteria pulmonalis teilt (Harvey 2002).

Zu diesem Zeitpunkt wandern Zellen aus dem dorsalen Neuralrohr in das sich entwickelnde Herz ein (siehe Abb. 1). Sie umhüllen die Aorta und bilden einen Teil der glatten Muskulatur des Ausflusstraktes. Gleichzeitig beginnen Zellen des proepikardialen Organs den epikardialen Mantel zu bilden und tragen später zur Entwicklung der Koronargefäße bei (Laugwitz et al. 2008). Der Vorhof enthält seinen Zufluss in dieser Zeit über eine breite Verbindung aus dem Sinus coronarius. Dieser besteht aus zwei Hörnern, die jeweils drei große venöse Zuflüsse besitzen, die Dottervene, die Nabelvene und den Stamm der Kardinalvenen. Im Verlauf verkleinert sich diese Verbindung und verlagert sich nach rechts. Die linken Anteile bilden sich zurück und es bleiben nur die Vena obliqua des linken Vorhofs und der Sinus coronarius übrig. Die rechten Anteile vergrößern sich, verschmelzen teilweise mit der Vorhofwand und bilden später die untere und die obere Hohlvene mit den zugehörigen Klappenstrukturen (Sadler 1998).

Mit der Septierung der Vorhöfe beginnt sich der Entwicklungsprozess in höher entwickelten Säugetieren wie dem Menschen und in der Maus zunehmend voneinander zu unterscheiden, so dass im Folgenden die Entwicklung des menschlichen Embryos beschrieben wird (Dalglish 1976). Die Septierung der Vorhöfe beginnt beim Menschen etwa am 27. Entwicklungstag mit dem Septum primum, welches vom Vorhofdach in Richtung Atrioventrikularkanal wächst. Kurz bevor das Septum mit den sich im AV-Kanal befindenden

Endokardkissen verschmilzt und zu einer vollständigen Teilung des Vorhofs führt, entsteht im oberen Teil des Septums ein physiologischer Defekt, der als Ostium secundum bekannt ist. Durch diesen Defekt kann das Blut weiterhin vom rechten Vorhof direkt in die linke Strombahn gelangen. Durch Wachstum des rechten Vorhofs bildet sich im weiteren Verlauf am Vorhofdach erneut ein Septum, das Septum secundum, welches sich über den Defekt schiebt. Die schlitzförmige Öffnung, die zwischen den beiden Septen bestehen bleibt, wird Foramen ovale genannt und verschließt sich auf Grund der postpartalen Druckumkehr nach der Lungenentfaltung funktionell. Im Neugeborenenalter verwachsen die beiden Septen in etwa 80% der Fälle miteinander und trennen die Vorhöfe endgültig. Bei den verbleibenden 20% bleibt der Verschluss lebenslang rein funktionell (Sadler 1998).

Bevor die Unterteilung des Atrioventrikularkanals am Ende der vierten Entwicklungswoche beginnt, öffnet sich dieser ausschließlich in den primitiven linken Ventrikel. Erst durch eine teilweise Rückbildung der Bulboventrikularfalte erhält der primitive rechte Ventrikel Anschluss an die Vorhöfe. Die Unterteilung des Atrioventrikularkanals erfolgt durch vier Endothelkissen. Ein oberes, ein unteres und zwei laterale Endothelkissen wachsen aufeinander zu und verschmelzen anschließend. Dadurch werden gegen Ende der 5. Entwicklungswoche zwei voneinander getrennte Kanäle gebildet. Das Gewebe um die beiden neu entstandenen Kanäle beginnt sich anschließend in einem komplexen Prozess aus Proliferation und Apoptose derart umzugestalten, dass sich Mesenchymolster bilden, die nur durch feine Muskelstränge an der Ventrikelwand befestigt sind. Aus diesen Strukturen entwickeln sich im weiteren Verlauf die Atrioventrikularklappen. Im rechten Kanal finden sich drei solcher Mesenchymolster, welche später die Trikuspidalklappe bilden, und im linken Kanal zwei solcher Polster, welche später die Mitralklappe bilden (Sadler 1998).

Ebenfalls im Verlauf der 5. Entwicklungswoche werden die Aorta und die Arteria pulmonalis von einem spiralförmigen Septum voneinander getrennt. Dieses entwickelt sich im gemeinsamen Ausflusstrakt aus zwei Wandvorwölbungen. Die rechte obere Truncuswulst und die linke untere Truncuswulst wachsen aufeinander zu, verdrehen sich untereinander und verschmelzen anschließend. Kurz bevor das Septum seine endgültige Form erreicht, werden auf diesem kleine paarige Endothelkissen sichtbar. Zwei davon befinden sich im Bereich der Aorta, zwei weitere im Bereich der Arteria pulmonalis. Im jeweils gegenüberliegenden Wandabschnitt zeichnet sich ein weiteres Endothelkissen ab. Aus diesen entwickeln sich die drei Taschen der Aorten- bzw. Pulmonalklappe. Weiter kaudal, im Bereich des Conus cordis, finden sich Gewebivorwölbungen, die aber langsamer an Größe zunehmen als ihre Gegenstücke im Truncusbereich. Erst nachdem sich das spiralförmige Septum dort gebildet hat, verschmelzen die Conuswülste mit dessen kaudalen Abschnitt und

teilen dadurch die Ausflussbahn in einen anterolateralen, rechten und einen posteromedialen, linken Abschnitt (Sadler 1998).

Bereits während der Septierung der Vorhöfe und der Ausflussbahn nehmen die Ventrikel stark an Größe zu. Dadurch kommt es zu einer zunehmenden Überlagerung von Wandabschnitten zwischen linkem und rechtem Ventrikel. Im Verlauf der 7. Entwicklungswoche verschmelzen die Wände in diesem Bereich miteinander und bilden den muskulären Anteil des Ventrikelseptums. Der membranöse Anteil des Ventrikelseptums, dessen Bildung am Ende der 7. Entwicklungswoche abgeschlossen ist, wird teilweise von kaudalen Abschnitten des Conusseptums gebildet und teilweise von Gewebe, welches aus dem muskulären Anteil des Septums hervor wächst.

Im Herzschauch übernehmen Zellen im linken, kaudalen Abschnitt des Herzschauches die Schrittmacherfunktion. Das eigentliche Reizleitungssystem entwickelt sich größtenteils aus Zellen im Bereich des Sinus venosus. Nach dessen Integration in den rechten Vorhof kommen die Zellen des Sinusknoten in ihre endgültige Position im Einmündungsbereich der Vena cava superior. Auch His-Bündel und Atrioventrikularknoten werden von diesen Zellen gebildet (Sadler 1998).

1.2. Vorläuferpopulationen

Die kardialen Vorläuferzellen, die bei der Herzentwicklung der Säugetiere den größten Anteil stellen, kommen aus drei unterschiedlichen Regionen im Embryo. Der Hauptteil stammt aus dem kardiogenen Mesoderm, welches die kardiogene Zone bildet (siehe Abb. 1). Darüber hinaus tragen Zellen aus der Neuralleiste und aus dem proepikardialen Organ entscheidend zur Herzentwicklung bei. Wie bereits weiter oben angedeutet, leisten die unterschiedlichen Populationen zu verschiedenen Zeitpunkten ihren Beitrag und bilden jeweils klar unterscheidbare Teile des späteren Herzens (Laugwitz et al. 2008).

Die ersten Herzvorläuferzellen bilden sich im Bereich des kardialen Mesoderms. Dieser Vorgang ist größtenteils von Signalmolekülen aus dem umgebenden Gewebe abhängig. Ein deutlicher Hinweis darauf ist die Tatsache, dass Zellen, die aus anderen Bereichen des Embryos in diese Region eingebracht werden, zu Herzzellen differenzieren. Umgekehrt entwickeln sich Zellen, die bereits in die kardiale Entwicklung eingetreten sind, zu anderen Geweben, wenn man Sie aus Ihrer Position entfernt (Harvey & Rosenthal 1999).

Zu den wichtigsten Signalwegen bei der Entwicklung des Kopfes und des in der direkten Umgebung der Kopffalte liegendem, kardiogenen Mesoderms gehören bone morphogenetic proteins (BMPs), Wnt- und Nodal-Signalwege. Die bone morphogenetic proteins (BMPs) wurden, wie der Name nahe legt, bei der Entwicklung von Knochen und anderer knöcherner

Strukturen erstmals beschrieben. Neuere Forschung hat jedoch gezeigt, dass die Aufgaben dieser Signalmoleküle vielfältiger sind und sie auch in der Herzentwicklung eine entscheidende Rolle spielen (D. Chen et al. 2004). Die Proteine der Nodal-Familie sind, unter Anderem, für die Achsenbestimmung und die links-rechts Asymmetrie verantwortlich und damit in die Entstehung fast aller Organsysteme involviert (Schier 2003). Der Wnt-Signalweg ist eine der zentralen Figuren in der Zell-Zell Kommunikation und für Proliferation von Vorläuferzellen, so auch von kardialen Progenitorzellen, von essentieller Bedeutung (Logan & Nusse 2004). Zur Entwicklung des Kopfes müssen bone morphogenetic proteins (BMPs), Wnt- und Nodal-Signalwege blockiert werden, was durch Sekretion bestimmter Liganden aus dem umgebenden Gewebe erreicht wird (Harvey 2002). Im Bereich des kardiogenen Mesoderms, welches in direkter Umgebung der Kopffalten liegt, ist durch diese Liganden der Wnt-Signalweg blockiert, während BMPs weiterhin aktiv sind (siehe Abbildung 4). Diese Konstellation aus aktiver BMP Signaltransduktion bei blockiertem Wnt-Signalweg initiiert die kardiale Spezifizierung der Vorläuferzellen (Marvin et al. 2001; V. A. Schneider & Mercola 2001). Zusätzlich scheint die Konzentration dieser Liganden eine entscheidende Rolle bei der räumlichen Gestaltung der kardiogenen Zone zu spielen. Die kardiale Vorläuferpopulation entwickelt sich nur in einem Gebiet mit der richtigen Mischung aus den oben genannten Faktoren (siehe Abb. 4). Die Integration dieser unterschiedlichen Stimuli erfolgt über mehrere Wege. Den Transkriptionsfaktoren der smad-Familie, smad-interacting protein, activating transcription factor 2 (Atf2) und mitogen-activated protein kinase kinase Tak1 scheint hierbei eine wichtige Rolle zuzukommen (Harvey 2002). Im benachbarten Endoderm wird unter dem Einfluss von BMPs fibroblast growth factor 8 (Fgf8) gebildet und sezerniert. Ohne diesen Faktor kann die kardiale Spezifizierung nicht initiiert werden (Alsan & Schultheiss 2002).

Das kardiogene Mesoderm ist jedoch kein einheitlicher Zellhaufen, sondern besteht aus zwei unterschiedlichen Vorläuferpopulationen (siehe Abbildung 2). Die ersten Hinweise darauf fanden sich bei Experimenten am Hühnerembryo 1977, bei denen sich zeigte, dass der Ausflusstrakt von Zellen gebildet wird, die sich anterior des eigentlichen Herzschlauches befinden (de la Cruz et al. 1977). Die weitere Forschung auf diesem Gebiet führte zur Identifikation einer Region, die als anteriores oder sekundäres Herzfeld bezeichnet wurde (Mjaatvedt et al. 2001; Waldo et al. 2001; Kelly et al. 2001). Der Ausflusstrakt wird fast ausschließlich aus Vorläuferzellen dieser Population gebildet, während der linke Ventrikel fast ausschließlich aus Zellen des primären Herzfeldes hervorgeht. Die weiteren Strukturen des Herzens, die Vorhöfe und der rechte Ventrikel, entwickeln sich anteilig aus beiden Herzfeldern (siehe Abb. 2). Experimente mit Mäuseembryonen und Hühnerembryonen kamen hierbei zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während bei Hühnerembryos die

Beteiligung des sekundären Herzfeldes zu den oben genannten, gemeinsam gebildeten Strukturen fast vernachlässigbar scheint, spielen diese Zellen bei Mäuseembryonen eine deutlich größere Rolle und stellen den Hauptteil der Zellmasse. Ob diese Differenzen auf unterschiedliche experimentelle Ansätze oder tatsächliche Unterschiede in der Herzentwicklung dieser Arten zurückzuführen sind, ist bisher nicht eindeutig geklärt (Buckingham et al. 2005).

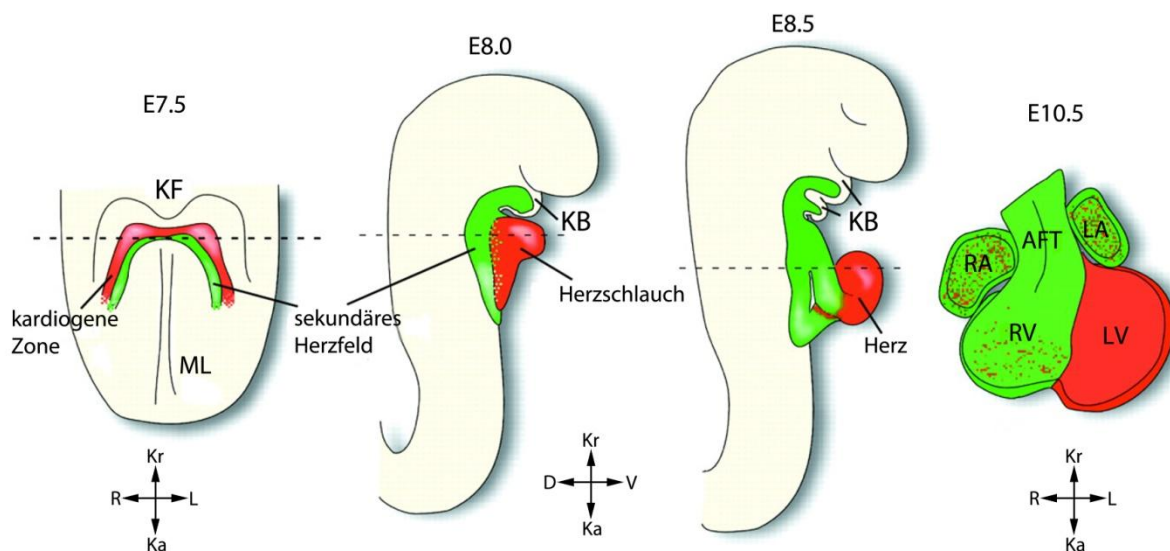


Abbildung 2 Das primäre und das sekundäre Herzfeld und deren Beteiligung am embryonalen Herzen

Die Abbildung zeigt die relative Lage, Ausdehnung und die Bewegung der Vorläuferzellen des primären Herzfeldes (rot) und des sekundären Herzfeldes (grün) im Embryo. Die angegebenen Tage der Embryonalentwicklung beziehen sich auf Mäuseembryonen. Kopffalten (KF), Mittellinie (ML), Kiemenbögen (KB), rechter Vorhof (RA), linker Vorhof (LA), Ausflusstrakt (AFT), rechter Ventrikel (RV), linker Ventrikel (LV) (nach Laugwitz et al. 2008).

Die beiden Herzfelder lassen sich jedoch nicht nur anhand von morphologischen Aspekten unterscheiden. Während einige Gruppen von Genen, wenn auch teilweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten, in beiden Vorläuferpopulationen aktiviert werden, sind andere für das jeweilige Feld spezifisch. Unter dem Einfluss der oben genannten Signale beginnen zunächst Zellen beider Linien, Regulatoren des kardialen Programms anzuschalten. Zu den frühesten dieser Marker zählen mesoderm posterior 1 (MESP1) und mesoderm posterior 2 (MESP2), die für die Migration der Zellen zum anterioren Abschnitt des Embryos nötig sind (Buckingham et al. 2005). Darüber hinaus werden Transkriptionsfaktoren aus der GATA Familie, die Gata binding proteins 4, 5 und 6 (Gata4, Gata5 und Gata6) sowie NK2 transcription factor related, locus 5 (Nkx2.5) aktiviert (Laugwitz et al. 2008).

knock-out Experimente haben gezeigt, dass keiner der Faktoren, die bei der Herzentwicklung eine Rolle spielen, für die Entstehung von Kardiomyozyten essentiell ist. Das liegt möglicherweise zum Einen daran, dass, wie es beispielsweise bei myocyte enhancer factor 2c (Mef2c) der Fall ist, andere Mitglieder der gleichen Familie die Funktion

übernehmen. Zum Anderen scheint es so zu sein, dass es alternative genetische Programme gibt, die die Entstehung von Kardiomyozyten auch nach dem Ausschalten wichtiger Regulatoren möglich machen. Viele dieser Defekte zeigen eine charakteristische Morphologie, die sich relativ klar einem der beiden Herzfelder zuordnen lässt (siehe Tabelle 1). *Nkx2.5*, *Hand1* und *Tbx5* sind Faktoren, die, obwohl sie teilweise auch im sekundären Herzfeld exprimiert werden, vor allem im primären Herzfeld eine wichtige Rolle spielen. *Fgf8*, *Fgf10*, *Tbx1*, *Tbx20*, *Foxh1* und *Mef2c* zeigen in den entsprechenden *knock-out* Mutanten einen Defekt, der sich auf eine Fehlfunktion im sekundären Herzfeld zurückführen lässt (Buckingham et al. 2005).

Tabelle 1 Zuordnung der Transkriptionsfaktoren zu den unterschiedlichen Vorläuferpopulationen

Die Tabelle zeigt die Zuordnung der unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren, die an der Herzentwicklung im Embryo beteiligt sind, zu den entsprechenden Vorläuferpopulationen (nach Buckingham et al. 2005)

Mesoderm des Primitivstreifens	Frühes kardiogenes Mesoderm	
	Kardiogene Zone	Sekundäres Herzfeld
BryT	<i>Nkx2.5</i>	<i>Nkx2.5</i>
<i>Mesp1/2</i>	<i>Hand1</i>	<i>Isl1</i>
<i>Fgf8</i>	<i>Tbx5</i>	<i>Fgf10</i>
<i>Isl1</i> (?)	<i>Tbx20</i>	<i>Foxh1</i>
	<i>Mef2c</i> (?)	<i>Tbx20</i>
		<i>Mef2c</i>

Obwohl sich diese Faktoren den beiden Herzfeldern zuordnen lassen, sind sie nicht geeignet, um klar zwischen den beiden Populationen zu unterscheiden (siehe Tab. 1). 2003 wurde *Islet1* (*Isl1*) als der Marker für Progenitorzellen des sekundären bzw. anterioren Herzfeldes identifiziert. *Isl1 knock-out* Experimente zeigen einen kardialen Defekt mit einem gemeinsamen Vorhof und einer gemeinsamen Kammer, die eine linksventrikuläre Identität aufweist. Rechte Kammer und der gesamte Ausflusstrakt, also Strukturen, die sich aus dem sekundären Herzfeld entwickeln, fehlen (Cai et al. 2003). Es lassen sich dadurch eine *Isl1* unabhängige, dem primären Herzfeld entstammende und eine *Isl1* abhängige, dem sekundären Herzfeld entstammende Progenitorpopulation unterscheiden. Es gibt jedoch einige Hinweise darauf, dass *Isl1* zumindest vorübergehend auch im primären Herzfeld exprimiert wird (siehe Tab. 1). Neuere Experimente haben gezeigt, dass Zellen, die für eine kurze Zeitspanne *Isl1* exprimieren, große Teile des linken Ventrikels, eigentlich eine Domäne des primären Herzfeldes, bilden (Prall et al. 2007). Darüber hinaus zeigen Experimente im *Xenopus*, dass in einem bestimmten Entwicklungsstadium *Isl1* in Bereichen zu finden ist, die Strukturen des primären Herzfeldes entsprechen (Brade et al. 2007). *Isl1* kann also auch als pankardialer Marker betrachtet werden, wenngleich *Isl1 knock-out* Experimente nahelegen,

dass Isl1 im primären Herzfeld lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Laugwitz et al. 2008). Diese Isl1 positiven Progenitorzellen sind jedoch nicht nur während der Embryonalentwicklung zu finden, sondern liegen auch in neonatalen Herzen von Mäusen, Ratten und Menschen vor. Es ist möglich diese Zellen zu identifizieren und aufzureinigen. Sie verfügen über die für Progenitorzellen typischen Eigenschaften der Selbsterneuerung und Differenzierung und sind wahrscheinlich Reste der embryonalen Progenitorpopulation. Ihre genaue Funktion und das von ihnen ausgehende Erneuerungspotential im adulten Herzen sind noch nicht genau geklärt (Laugwitz et al. 2005).

Die Zellen der Neuralleiste wandern in die hinteren Kiemenbögen ein und bilden dort Teile der glatten Gefäßmuskulatur der Arterien. Darüber hinaus stammen die endokardialen Kissen im Ausflusstrakt von ihnen ab. Ohne den Beitrag der Neuralleiste zeigen sich Defekte bei der Septierung und Ausbildung des Myokards im Bereich des Ausflusstraktes (Waldo et al. 2005). Außerdem beeinflusst die Interaktion zwischen Zellen der Neuralleiste und Zellen des sekundären Herzfeldes entscheidend die Funktion derselben (Vincent & Buckingham 2010).

Die Rolle des proepikardialen Organs (PEO) und seine Beziehung zum sekundären Herzfeld sind nicht eindeutig geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass das PEO und Teile des sekundären Herzfeldes einer gemeinsamen Vorläuferpopulation entstammen, die sich relativ früh in der Entwicklung aufteilt (van Wijk et al. 2009). Zellen des PEO exprimieren eine gewisse Zeit Isl1 und Nkx2.5, zwei Transkriptionsfaktoren, die bei der Entwicklung im sekundären Herzfeld ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Im Gegensatz zu Nkx2.5 scheint Isl1 jedoch dort, ähnlich wie im primären Herzfeld, nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da *knock-out* Experimente keinen Defekt in der Entwicklung zeigen (Vincent & Buckingham 2010). Aus dieser Vorläuferpopulation entwickeln sich das Epikard des Herzens und die glatte Muskulatur der Koronargefäße. Der weitere Beitrag zur Herzentwicklung ist nicht abschließend geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass sich auch Teile des Myokards daraus entwickeln (Cai et al. 2008; Zhou et al. 2008). Bisher ging man davon aus, dass auch das Endothel der Koronargefäße dieser Progenitorpopulation entstammt. Neueste Forschungsergebnisse haben jedoch gezeigt, dass es sich aus einer anderen Zellgruppe entwickelt (Red-Horse et al. 2010).

1.3. Entwicklungspotential multipotenter $Isl1^+$ kardialer Vorläuferzellen

Die entscheidenden Bausteine der Säugetierherzen sind das Arbeitsmyokard, die glatten Muskelzellen und Endothelzellen der Koronargefäße sowie die Zellen des Erregungsleitungssystems. Wie weiter oben beschrieben, tragen die verschiedenen Vorläuferpopulationen ihren Teil zur Herzentwicklung bei und bilden für sie jeweils spezifisches Gewebe. Verschiedene Experimente, die die Entwicklung einzelner Zellen im Embryo beobachteten, haben gezeigt, dass gewisse Zellpopulationen nicht nur einen Gewebetyp bilden können. *Mef2c*, *Nkx2.5* und *Mesp1* markieren beispielsweise Zellen, die nicht nur Herzmuskelgewebe sondern auch Teile des Endokardiums bilden (Laugwitz et al. 2008). Darüber hinaus konnte eine VEGF-Rezeptor 2 (*flk1*) positive, mesodermale Vorläuferpopulation identifiziert werden, die neben Kardiomyozyten auch glatte Muskelzellen bildet (Motoike et al. 2003).

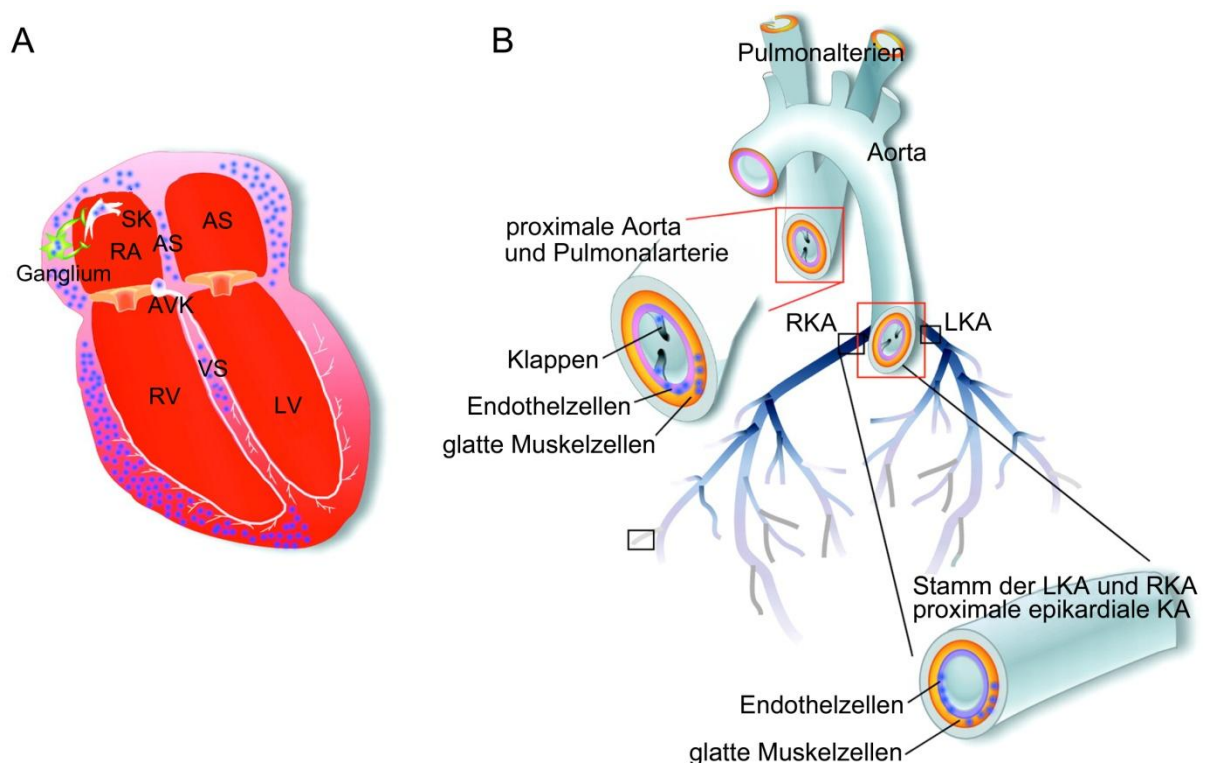


Abbildung 3 Beteiligung von Zellen der $Isl1^+$ -Vorläuferpopulation an Herzen adulter Mäuse

Die Abbildung zeigt blau gefärbte Zellen, die von $Isl1^+$ -Vorläuferzellen abstammen. In (A) ist deren Beitrag zum adulten Herzen in der Übersicht dargestellt. (B) zeigt das Gefäßsystem mit den großen Arterien und den Koronargefäßen und die Lokalisation dieser Zellen. Sinusknoten (SK), rechter Vorhof (RA), linker Vorhof (LA), Vorhofseptum (AS), Atrioventrikularknoten (AVK), rechter Ventrikel (RV), linker Ventrikel (LV), Ventrikelseptum (VS), rechte Koronarterie (RKA), linke Koronarterie (LKA), Koronarterien (KA) (nach Laugwitz et al. 2008)

Experimente, bei denen in Isl1 positiven Zellen dauerhaft ein Enzym des Zuckerstoffwechsels (lacZ) exprimiert und dieses später durch Verstoffwechslung eines Farbstoffs sichtbar gemacht wurde, zeigten, dass diese Zellen zu allen, oben genannten, wichtigen Bausteinen der Säugetierherzen einen Beitrag leisten (siehe Abbildung 3).

Diese Zellen bilden große Teile der Herzmuskelmasse des rechten Ventrikels und der beiden Vorhöfe (siehe Abb. 3). Außerdem konnten Zellen des Erregungsleitungssystems, vor allem die des Sinusknoten, der die Schrittmacherfunktion im Herzen erfüllt, auf diese Progenitorpopulation zurückgeführt werden. Darüber hinaus tragen sie Endothel- und glatte Muskelzellen zur Bildung der Aortenwurzel, des Pulmonalarterienstamms und des proximalen Anteils der rechten und linken Koronararterie bei (Laugwitz et al. 2005).

Neben der Lokalisation der Zellen in den jeweiligen Strukturen haben diese dort auch funktionelle Bedeutung. Zellen im rechtsventrikulären Myokard und in den beiden Vorhöfen zeigen eine Expression von myocytic protein sacromeric α -actinin, einem Marker für Kardiomyozyten (Laugwitz et al. 2005). Die von der Isl1⁺ Vorläuferpopulation abstammenden Zellen des Sinusknoten exprimieren Acetylcholinesterase, was die Zuordnung zum Erregungsbildungs- und Leitungssystem des Herzen ermöglicht. Im Bereich der Koronararterien zeigt die Expression von für glatte Muskulatur und Endothel spezifischen Markern wie CD31 (Pecam 1), VE-cadherin (cadherin 5) und smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) die funktionelle Bedeutung (Moretti et al. 2006; Sun et al. 2007).

Wie unter 1.2 bereits erwähnt ist die Expression von Isl1 jedoch nicht auf Zellen des sekundären Herzfeldes beschränkt (siehe Tab. 1). Der Beitrag Isl1⁺ Zellen zur Entwicklung der Koronargefäße ließe sich beispielsweise auch auf das proepikardiale Organ und nicht auf eine Progenitorpopulation des sekundären Herzfeldes zurückführen. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass nicht alle Zellen des sekundären Herzfeldes Isl1 exprimieren und sich dort verschiedene Subpopulationen befinden (Vincent & Buckingham 2010). Der größte Teil der Zellen des sekundären Herzfeldes exprimiert jedoch Isl1 und selbst in neonatalen Herzen von Mäusen, Ratten und Menschen sind noch Isl1⁺ Zellen zu finden. Diese haben nach der Isolation und Aufreinigung *in vitro* das Potential, sich selbst zu erneuern und Kardiomyozyten zu bilden (Laugwitz et al. 2005). Darüber hinaus besitzen diese Zellen die Fähigkeit, zu glatten Muskelzellen zu differenzieren. Im embryonalen Stammzellsystem konnte eine Isl1⁺, Nkx2.5⁺ und Flk1⁺ Progenitorpopulation identifiziert werden, die in Herzmuskelgewebe, glatte Muskulatur und Endothel differenzieren kann (siehe Abbildung 4). In Experimenten im Mausmodell konnten Zellen dieser Population ebenfalls gefunden und *in vitro* in die oben genannten Zelllinien differenziert werden. Im Laufe des Differenzierungsprozesses verlieren diese Zellen ihre Isl1-Expression und beginnen, je nach

Gewebetyp, andere Marker anzuschalten (siehe Abb. 4). Bleibt Nkx2.5 detektierbar hat die Zelle eher einen „muskulären Weg“ eingeschlagen. Das bedeutet, dass sie sich entweder zu einer Herzmuskelzelle oder zu einer glatten Muskelzelle entwickelt. Bleibt die Zelle Fik1 positiv hat sie einen „vaskulären Weg“ eingeschlagen und wird entweder zu Endothel oder glatter Muskulatur. Dies legt nahe, dass innerhalb der kardialen Vorläuferzellen ein System der klonalen Expansion und Differenzierung existiert, welches dem im hämatopoetischen System ähnelt (Kiel et al. 2005).

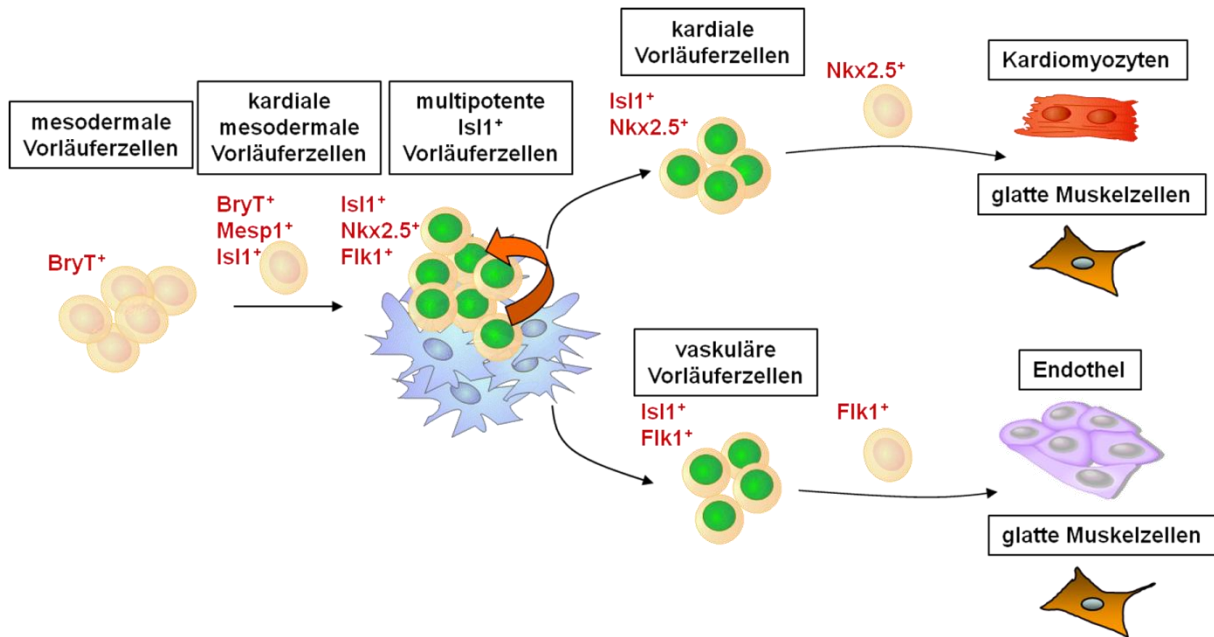


Abbildung 4 Hierarchisches Modell des Differenzierungsprozesses kardiovaskulärer Progenitorzellen

Die Abbildung zeigt schematisch die verschiedenen Stufen der Entwicklung aus einer mesodermalen Vorläuferpopulation, die an der Bildung des Herzens beteiligt ist. Dargestellt ist die Population Isl1⁺ Progenitorzellen, die über den „vaskulären“ Weg oder den „kardialen“ Weg, welche sich durch ihr Transkriptionsprofil unterscheiden, zu Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen und Endothel differenzieren (nach Moretti et al. 2006).

Isl1⁺ Progenitorzellen liefern einen entscheidenden Beitrag zur Herzentwicklung und stellen große Teile der Zellen des adulten Herzens, sind aber nicht der einzige Weg, auf dem Kardiomyozyten entstehen können. Mäuse in *Isl1* knock-out Experimenten bilden zwar keine lebensfähigen Nachkommen, in der Herzregion sind jedoch Kardiomyozyten zu finden (Cai et al. 2003). Das bedeutet, dass ein Isl1 unabhängiger Differenzierungsprozess existiert, der ebenfalls zu Herzmuskelgewebe führt. Trotzdem ist das Entwicklungspotential der Isl1⁺ Progenitorzellen, dadurch, dass aus ihnen alle wichtige Strukturen des Herzens gebildet werden können, sehr bedeutend und das Verständnis dieses Prozesses für die Kardiogenese essentiell.

1.4. Transkriptionsfaktoren in der Embryonalentwicklung

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die direkt oder indirekt an der Transkription von Genen beteiligt sind. Die meisten besitzen DNA-Sequenzen erkennende und bindende Domänen und können häufig zusätzlich mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren. Grundsätzlich werden allgemeine und spezifische Transkriptionsfaktoren unterschieden.

Allgemeine Transkriptionsfaktoren sind in eukaryoten Zellen für die Initiierung der Transkription nötig und bilden zusammen mit der entsprechenden RNA-Polymerase den Initiationskomplex. Eukaryote Zellen besitzen drei verschiedene RNA-Polymerasen. RNA-Polymerase I ist für die Transkription der meisten ribosomalen RNA Gene verantwortlich. RNA-Polymerase II transkribiert alle Gene, die Proteine kodieren, und den größten Teil der inhibierenden RNA-Sequenzen wie miRNA und snRNA. RNA-Polymerase III ist hauptsächlich für die Synthese der tRNAs zuständig. Die Nomenklatur der allgemeinen Transkriptionsfaktoren folgt der RNA-Polymerase, für deren Bindung an den Promoter der jeweiligen Gene sie zuständig sind. Die weitere Unterteilung erfolgt mit Hilfe von Buchstaben in alphabetischer Reihenfolge. Sie werden allgemeine Transkriptionsfaktoren genannt, da sie für fast alle Transkriptionsprozesse in eukaryoten Zellen essentiell sind (Löffler & Petrides 1998).

Spezifische Transkriptionsfaktoren sind ebenfalls an der Transkription fast aller eukaryoten Gene beteiligt und modulieren dort die Aktivität der RNA-Polymerase. Man unterscheidet zwischen Aktivatoren, die, wenn sie an die entsprechenden Sequenzen gebunden sind, die Transkriptionsrate des Gens steigern und Repressoren, die bei Bindung das Gegenteil, bis zum völligen Transkriptionsstopp, bewirken können. Ob ein Transkriptionsfaktor als Aktivator oder Repressor wirkt, hängt von dem jeweiligen Gen ab. Faktoren, die an einem Gen die Transkriptionsrate steigern, also als Aktivatoren wirken, können am nächsten Gen die Transkription blockieren und damit die Funktion eines Repressors ausüben. Darüber hinaus kann die Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren die Rolle derselben beeinflussen. Die Bindungsstellen dieser spezifischen Transkriptionsfaktoren liegen oft hunderte von Basenpaaren von dem Gen, dessen Transkription sie regulieren, entfernt. Sie können sowohl oberhalb am 5'-Ende als auch unterhalb am 3'-Ende liegen (siehe Abbildung 5). In einigen Fällen sind regulatorische Sequenzen auch innerhalb des Gens zu finden, meist in Intron-Regionen. Durch Schleifenbildung innerhalb des DNA-Stranges gelangen alle Faktoren, die an regulatorische Sequenzen eines Gens gebunden haben, in die Nähe des Promotors und interagieren dort mit dem Komplex aus RNA-Polymerase und den bereits erwähnten allgemeinen Transkriptionsfaktoren, um die Geschwindigkeit und Intensität der Transkription zu regulieren (siehe Abb. 5).

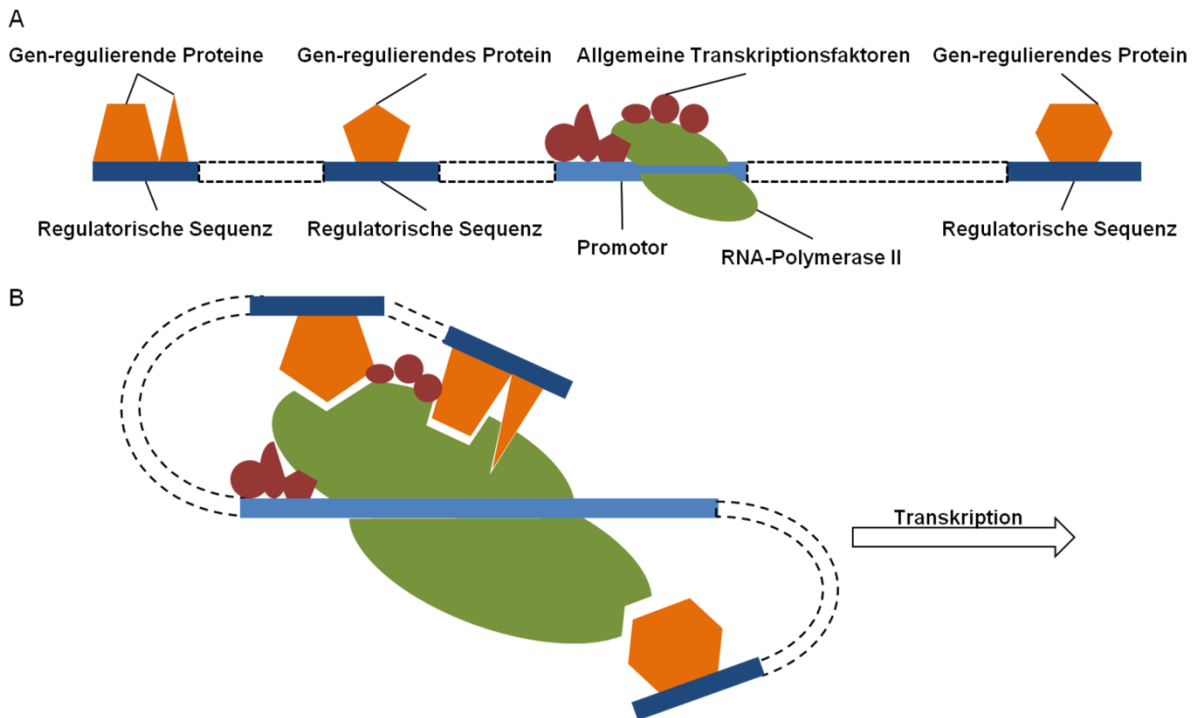


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Transkriptionskomplexes eines eukaryoten Gens

Die Abbildung zeigt schematisch in (A) die DNA-Region um ein eukaryotes Gen und die sich 5' und 3' davon befindenden regulatorischen Sequenzen. In (B) kommt der Transkriptionskomplex, der durch Faltung der DNA entsteht und die Interaktion der verschiedenen Aktivatoren und Repressoren mit der RNA-Polymerase ermöglicht, zur Darstellung (nach Alberts et al. 2008).

Die Existenz dieser genregulierenden Proteine wurde erstmals in den 50er Jahren in prokaryoten Zellen entdeckt. Der *Lambda-Repressor*, der Teil einer Bakteriophagen-DNA ist, bewirkt nach Integration der Phagen-DNA in das bakterielle Chromosom, dass die Transkription phagenspezifischer Gene unterdrückt wird und sich die Phagen-DNA dadurch zusammen mit dem Bakterium unentdeckt vermehren kann (Alberts et al. 2008).

Fast alle Transkriptionsfaktoren verfügen über Domänen, die DNA-Sequenzen spezifisch erkennen und binden können. Die DNA liegt als Doppelhelix vor, die auf Grund Ihrer Struktur an der Außenseite zwei unterschiedliche große Einkerbungen zeigt, die kleine Furche und die große Furche. Die Sequenzerkennung durch die unterschiedlichen Bindungsmotive der Transkriptionsfaktoren erfolgt durch die Eigenschaften der Basenpaare, die an der Bildung der jeweiligen Furche beteiligt sind. Durch die Präsentation entsprechender hydrophiler oder hydrophober Molekülanteile in der großen Furche können die Faktoren sequenzspezifisch binden, ohne die Doppelhelix an dieser Stelle zu öffnen und die Bindung der Einzelstränge zu stören. In mehr als 80 Prozent der Fälle bestehen diese DNA-bindenden Strukturen aus einer der vier folgenden Domänen: *helix-turn-helix (HTH)*, *zinc finger*, *leucine zipper* oder *helix-loop-helix (HLH)*. Innerhalb der DNA-bindenden Domänen findet sich am häufigsten das HTH-Motiv, das auch Teil der sogenannten *homeobox* (oder *Homeodomäne*) ist, einer Struktur, die in vielen Transkriptionsfaktoren zu finden ist. (Papavassiliou 1995).

Transkriptionsfaktoren sind an fast allen biologischen Prozessen im Organismus beteiligt. Entsprechend vielfältig sind die Auswirkungen bei Defekten derselben. Beim Menschen sind eine Vielzahl von Erkrankungen bekannt, die auf die Fehlfunktion von genregulierenden Proteinen zurückzuführen sind. Darüber hinaus können sie den Verlauf von anderen Erkrankungen beeinflussen. Die größte medizinische Bedeutung haben sie bei Hormonstoffwechselstörungen, der Krebsentstehung und bei angeborenen Fehlbildungen. Viele Hormonrezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, die nach Bindung der Liganden die Transkription bestimmter Gene bewirken. Der Glukokortikoid-Rezeptor befindet sich im Zytosol der Zellen und wird nach Bindung des Liganden in den Zellkern transloziert, wo er an bestimmte regulatorische Sequenzen bindet und dadurch eine Änderung der Genexpression bewirkt. Mutationen in diesem Rezeptor behindern dessen normale Funktion und können dadurch Krankheiten verursachen. Auch der Schilddrüsenhormonrezeptor und der Androgenrezeptor sind Transkriptionsfaktoren und können bei Mutationen zu schweren Erkrankungen führen. Die geregelte Genexpression ist für alle Zellen des menschlichen Organismus essentiell. Vor allem Gene, die das Wachstum der Zellen und den Zelltod regulieren, unterliegen einer strengen Kontrolle. Viele der Proteine, die an diesen Funktionen beteiligt sind, gehören zur Familie der Transkriptionsfaktoren. Störungen in diesem Bereich führen zur Entstehung von malignen Zellen, die, wenn Sie der Kontrolle des Immunsystems entgehen, zum Ausgangspunkt von Tumoren werden können. Umgekehrt findet man in fast allen malignen Zellpopulationen Mutationen in diesen Genen. Transkriptionsfaktoren, die an der Entstehung von Krebs beteiligt sind, unter anderem, *myelocytomatosis viral oncogen homolog (c-MYC)*, *Y box binding protein 1 (YBX1)* und *tumor protein p53 (TP53)*. Darüber hinaus spielen in der Embryonalentwicklung ebenso wie beim Wachstum von Neugeborenen und Kindern Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle. Dadurch lassen sich viele angeborene Fehlbildungen auf Mutationen in den zuständigen Genen zurückführen. Patienten mit Mutationen im Gen *pituitary-specific positive transcription factor 1 (PIT1)*, welches für die Synthese von Hormonen in der Hypophyse essentiell ist, leiden beispielsweise unter Kleinwuchs und mentaler Retardierung. Defekte in den Transkriptionsfaktoren aus der PAX-Familie führen zu Erkrankungen wie dem Waardenburg-Syndrom, bei dem Schwerhörigkeit, Heterochromatie der Iris und bestimmte Deformitäten im Gesichtsbereich zu finden sind (Latchman 1996).

Angeborene Herzfehlbildungen finden sich bei etwa einem von hundert Neugeborenen und gehören damit zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen überhaupt (Hoffman & Kaplan 2002). Ein großer Teil dieser Defekte lassen sich auf eine durch Mutationen in Transkriptionsfaktoren bedingte fehlerhafte Embryonalentwicklung zurückführen (siehe Tabelle 2). Die Tatsache, dass ein Transkriptionsfaktor eine ganze Kaskade von Genen

aktiviert und teilweise komplette genetische Programme koordiniert, erklärt die Komplexität und Variabilität der beobachteten Phänotypen (Clark et al. 2006). Einige der bisher am besten untersuchten Fehlbildungen und ihre häufigsten klinischen Manifestationen sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 2 Mutationen in kardialen Transkriptionsfaktoren und deren klinische Manifestationen

Die Tabelle zeigt den betroffenen Transkriptionsfaktor, die zugehörige klinische Manifestation und die Referenzen. Die Bedeutungen der genutzten Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

Transkriptionsfaktor	Klinische Manifestationen	Referenzen
NKX2.5	ASD; VSD; TOF; AV-Block; DORV; SAS	(Schott et al. 1998) (Benson et al. 1999) (Goldmuntz et al. 2001) (Gutierrez-Roelens et al. 2002) (Y. Ikeda et al. 2002) (Kasahara et al. 2000) (McElhinney et al. 2003) (Watanabe et al. 2002) (Kasahara & Benson 2004)
TBX5	Holt-Oram-Syndrom (HOS)	(Basson et al. 1994) (Basson et al. 1997) (Gruenauer-Kloevekorn & Froster 2003) (Li et al. 1997)
GATA4	ASD; VSD	(Garg et al. 2003) (Hirayama-Yamada et al. 2005)
TBX1	Di-George-Syndrom	(Jerome & Papaioannou 2001) (Lindsay et al. 1999) (Lindsay et al. 2001) (Merscher et al. 2001)
TFAP2B	Char-Syndrom	(Satoda et al. 1999) (Satoda et al. 2000) (F. Zhao et al. 2001)

Die Vielfalt der Manifestationsformen bei Mutationen im Gen für NKX2.5 lässt sich aus der bereits beschriebenen zentralen Rolle dieses Transkriptionsfaktors bei der embryonalen Herzentwicklung erklären. Es sind zahlreiche Mutationen innerhalb dieses Gens beschrieben, wobei die meisten innerhalb der für die DNA-Bindung zuständigen Homeodomäne zu finden sind. Insgesamt sind etwa 4% der angeborenen Herzfehlbildungen auf Mutationen in diesem Gen zurückzuführen (Clark et al. 2006). Ein weiterer zentraler Transkriptionsfaktor in der Herzentwicklung, der bisher nur bedingt mit kardialen Malformationen in Zusammenhang gebracht werden konnte, ist ISL1. Es mehren sich jedoch Hinweise darauf, dass auch Mutationen in diesem Gen zu komplexen kardialen Fehlbildungen führen können. Bestimmte Polymorphismen innerhalb der für ISL1

kodierenden Sequenz konnten in einer großen Studie mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer komplexen Herzfehlbildung korreliert werden (Stevens et al. 2010). Betrachtet man das Ausmaß der Defekte in *knock-out* Experimenten im Tiermodell und die Bedeutung dieses Faktors bei der Differenzierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) in der Zellkultur, erscheinen diese Zusammenhänge wenig überraschend.

Nk2 transcription factor related locus 5 (NKX2.5/CSX) gehört zur Familie der NK-homeobox-Gene und kodiert für einen DNA-bindenden Transkriptionsfaktor. Diese Genfamilie unterteilt sich in zwei Subgruppen, die NK-1-Klasse und die NK-2-Klasse, der auch *NKX2.5* angehört. Es ist ein Säugetierhomolog zu *Tinman*, einem Transkriptionsfaktor, der in der Fruchtfliege *Drosophila* eine wichtige Rolle spielt. Das Gen ist beim Menschen im Locus 5q34 zu finden. Bei der Maus befindet es sich auf Chromosom 17. Im menschlichen Organismus existieren drei Splicevarianten, die sich vor allem am 3'-Ende der kodierenden Sequenz und im untranslatierten Bereich unterscheiden. Das zugehörige vollständige Protein hat eine Länge von 318 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ungefähr 35 kDa. Es enthält drei Domänen (siehe Abbildung 6). Die nahe am N-Terminus lokalisierte TN-Domäne, die relativ mittig liegende Homeodomäne und die C-terminal davon liegende NK2-Domäne. Die genaue Funktion der TN-Domäne ist unklar. Die Homeodomäne ist für DNA-Bindung, Dimerisierung und Protein-Protein Interaktion (mit TBX5, GATA4, SRF und CAL) zuständig. Die NK2-Domäne scheint als transkriptioneller Repressor zu fungieren und könnte auf Grund der zahlreichen Prolin-Aminosäuren auch für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich sein. Als für die Bindung spezifische DNA-Sequenzen ist neben dem für Homeobox-Proteinen beschriebene 5'-TAAT-3' Motiv auch das einmalige Bindungsmotiv 5'-T(C/T)AAGTG-3' bekannt.

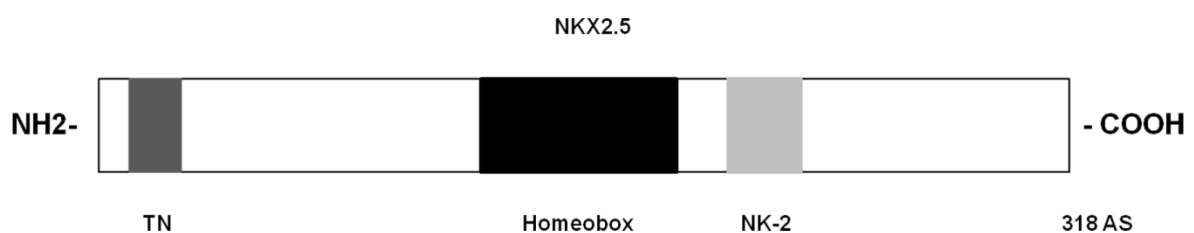


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Domänen von NKX2.5

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des Proteins NKX2.5 mit der Verteilung der unterschiedlichen Domänen (nach Akazawa & Komuro 2005).

LIM homeobox 1 (ISL1) gehört zur Familie der LIM-homeodomain Transkriptionsfaktoren und ist ebenfalls ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor. Das Gen befindet sich beim Menschen im Locus 5q11.1 und bei der Maus auf dem Chromosom 13. Ursprünglich wurde ISL1 in seiner Funktion als Transkriptionsregulator des Insulins identifiziert, wo es an eine

Enhancer-Region bindet und entsprechend in adulten Insel-Zellen exprimiert wird. Auch bei der Entwicklung des endokrinen Pankreas und der Differenzierung von Insel-Vorläuferzellen spielt er eine entscheidende Rolle (Karlsson et al. 1990). Außerdem kontrolliert ISL1 im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren der LIM-Familie verschiedene Aspekte der Identität von embryonalen Motoneuronen (Laugwitz et al. 2008). Mutationen im Bereich von *ISL1* sind mit der Erkrankung MODY (maturity onset diabetes of the young) assoziiert. 2003 wurde die Bedeutung von ISL1 für die embryonale Herzentwicklung entdeckt und ist als ein früher Marker der Zellen des sekundären Herzfeldes etabliert (Cai et al. 2003; Vincent & Buckingham 2010). Das zugehörige Protein hat eine Länge von 349 Aminosäuren und ein Gewicht von ungefähr 39 kDa. Wie alle Mitglieder der LIM-homeodomain Transkriptionsfaktoren enthält ISL1 drei Domänen (siehe Abbildung 7). Die N-terminal lokalisierte LIM1-Domäne gefolgt von einer LIM2-Domäne. Etwa mittig lokalisiert findet sich eine Homeodomäne. Diese ist für die DNA-Bindung zuständig. Interessanterweise zeigen *in vitro*-Experimente, dass die LIM-Domänen die DNA-Bindung der Homeodomäne stören. Erst nach Entfernung derselben erkennen Mitglieder dieser Proteingruppe das für die Homeobox spezifische Erkennungsmotiv 5'-TAAT-3'. Es gibt Hinweise darauf, dass die LIM-Domänen für Protein-Protein Interaktionen zuständig sind und diese Interaktionen über sterische Änderungen eventuell erst die DNA-Bindung ermöglichen. Für ISL1 sind mehrere solcher Interaktionen beschrieben, unter anderem mit neurogenic differentiation factor 1 (NEUROD1/BETA2), estrogen receptor 1 (ESR1) und LIM-homeobox protein 3 (LHX3) (Karlsson et al. 1990; Curtiss & Heilig 1998).

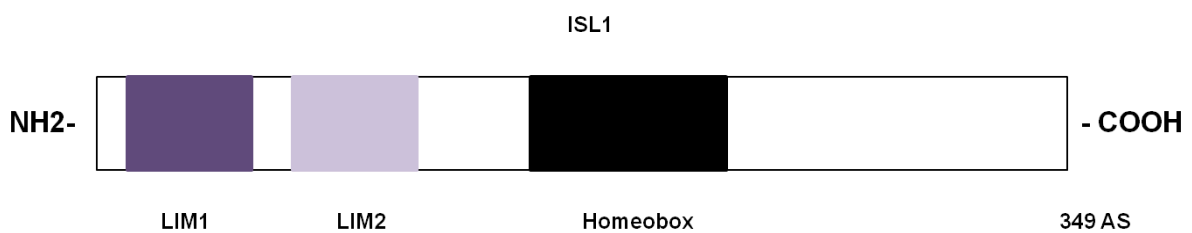


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Domänen von ISL1

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des Proteins ISL1 mit der Verteilung der unterschiedlichen Domänen (nach Curtiss & Heilig 1998).

2. Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, die molekularbiologischen Mechanismen, die zur Spezifizierung und Differenzierung $Isl1^+$ kardialer Progenitorzellen im sekundären Herzfeld führen, zu untersuchen und dadurch zum besseren Verständnis der embryonalen Kardiogenese beizutragen. Das regulatorische Netzwerk, das die Herzentwicklung im Embryo steuert, ist sehr komplex. Allein im sekundären Herzfeld sind mehr als zwanzig unterschiedliche Transkriptionsfaktoren bekannt, die an diesem Prozess beteiligt sind (siehe Abbildung 8). Dazu kommen noch Einflüsse aus dem umliegenden Gewebe, die über verschiedene Signalwege in die Entwicklung des Herzens eingreifen (Vincent & Buckingham 2010).

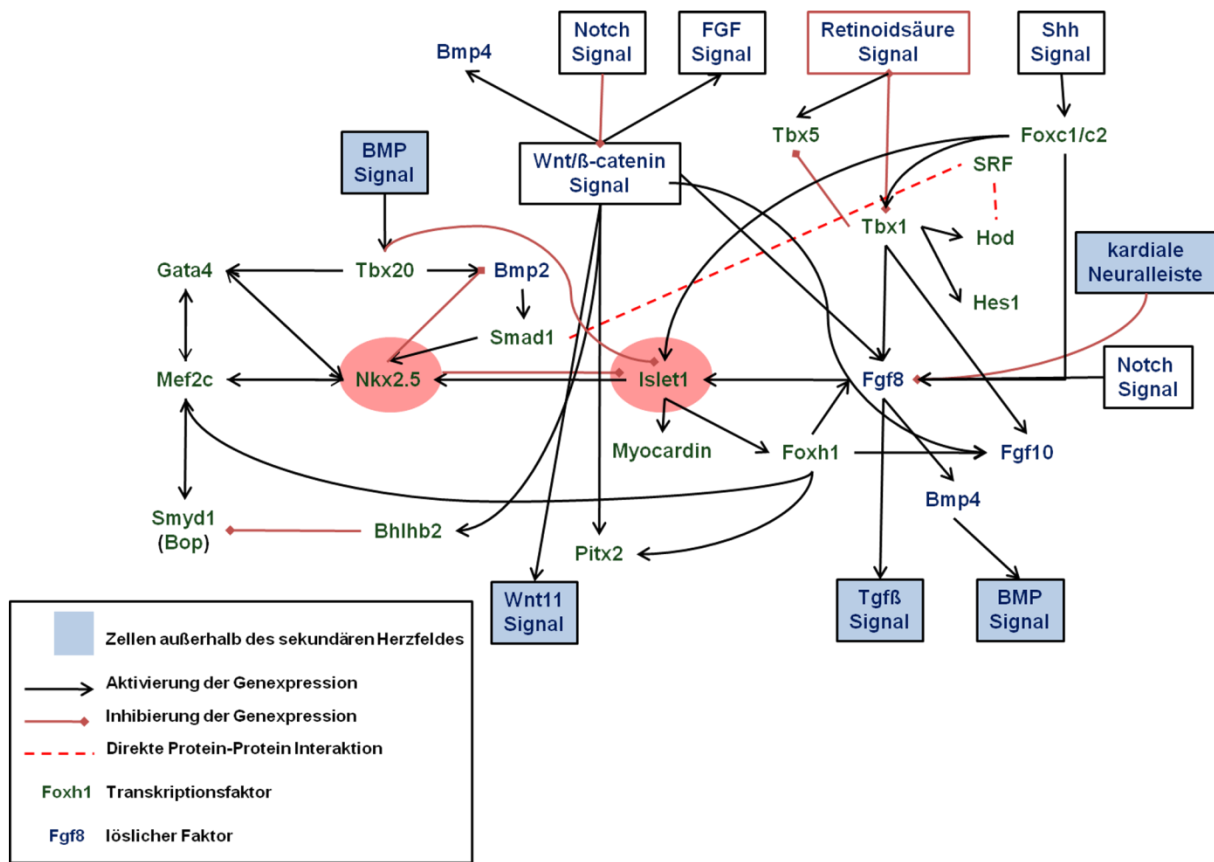


Abbildung 8 Regulatorische Netzwerke im sekundären Herzfeld von Maus und Mensch

Die Abbildung zeigt das regulatorische Netzwerk kardialer Progenitorzellen im sekundären Herzfeld. Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Proteine Nkx2.5 und Isl1 sind farblich unterlegt (nach Vincent & Buckingham 2010).

Wie aus der Abbildung 8 ersichtlich, sind zwei der zentralen Proteine in diesem Netzwerk die Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und Isl1. Diese beiden Faktoren markieren zusammen mit Flk1 eine Population, die große Teile des Herzens bildet. Trotz des wissenschaftlichen Fortschritts auf diesem Gebiet sind die genauen Mechanismen, die der Entstehung und Differenzierung dieser Zellen zu Grunde liegen, weitgehend unbekannt. Insbesondere ist die Rolle des bisher vor allem als Marker des sekundären Herzfeldes beschriebenen Transkriptionsfaktors Isl1 unklar (Cai et al. 2003). Die deutlichen kardialen Phänotypen in

knock-out Mausmodellen und andere Experimente haben jedoch gezeigt, dass die Funktion von *Isl1* bei der Entstehung von Herzmuskelgewebe weit über die eines reinen Markers einer Vorläuferpopulation hinausgeht (Laugwitz et al. 2008). Darüber hinaus ist auch über das Zusammenspiel von *Isl1* mit anderen Transkriptionsfaktoren der kardialen Entwicklung und deren molekularbiologischen Mechanismen nur wenig bekannt (Vincent & Buckingham 2010). Um der Komplexität dieser Fragestellung gerecht zu werden, sollen in dieser Arbeit verschiedene Teilaspekte der Entwicklung *Isl1*⁺ Progenitorzellen untersucht werden.

Bei der Entstehung von Kardiomyozyten aus undifferenzierten mesodermalen Vorläuferzellen beginnen diese zunächst *Isl1* zu exprimieren. Kurz darauf bilden dieselben Zellen dann auch den Transkriptionsfaktor *Nkx2.5*. Mit zunehmender Differenzierung wird *Isl1* im Verlauf abgeschaltet, bis es schließlich in ausdifferenzierten Kardiomyozyten nicht mehr nachweisbar ist (siehe Abbildung 9). Als Arbeitshypothese kann angenommen werden, dass *Isl1* für die Spezifizierung der kardialen Vorläuferpopulation verantwortlich ist. In diesem Zeitraum proliferieren die Zellen und bilden den notwendigen Zellpool. Mit zunehmendem Differenzierungsgrad beginnen die Zellen dann *Nkx2.5* zu exprimieren und stellen nach einer gewissen Zeit ihre *Isl1*-Expression ein.

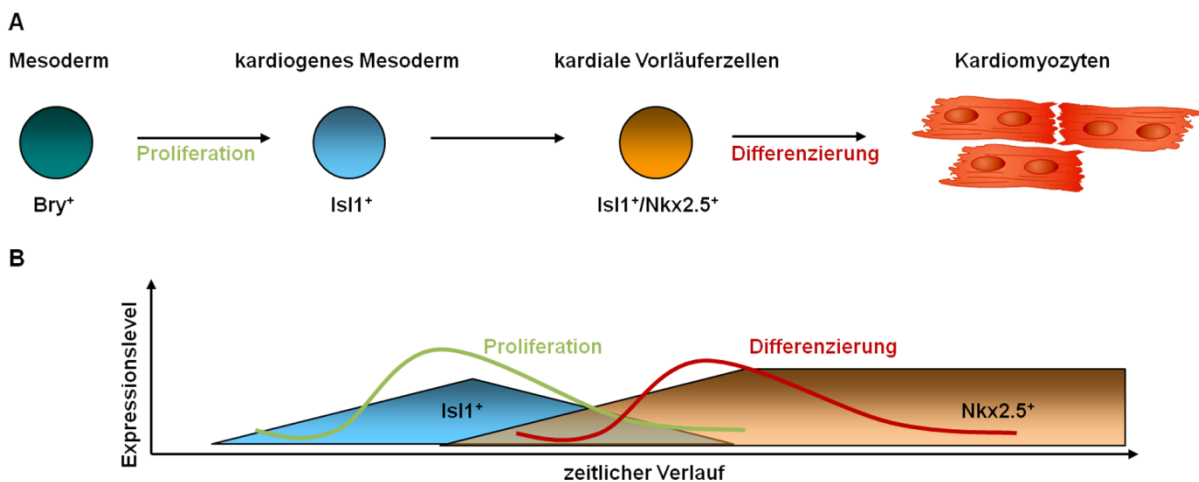


Abbildung 9 Entwicklung kardialer Progenitorzellen

In (A) werden die einzelnen Stufen der Entstehung von Kardiomyozyten über *Isl1*⁺/*Nkx2.5*⁺ Progenitorzellen dargestellt. (B) gibt den Verlauf der Expressionslevel der beiden Faktoren schematisch wieder.

Wie die Abbildung 9 zeigt, sind Proliferation und Differenzierung der kardialen Progenitorzellen keine strikt voneinander getrennten Prozesse, sondern bilden ein Kontinuum in der Zellentwicklung. Somit existiert ein zeitlich nicht genau eingegrenzter Bereich, in dem sowohl *Isl1* als auch *Nkx2.5* gemeinsam exprimiert werden (siehe Abbildung 10). Außerdem ist *Isl1*, genauso wie *Nkx2.5*, ein primär im Zellkern lokalisierter Transkriptionsfaktor (siehe Abb. 10). Darüber hinaus sind für beide Proteine zahlreiche Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren bereits beschrieben (siehe Abb. 8).

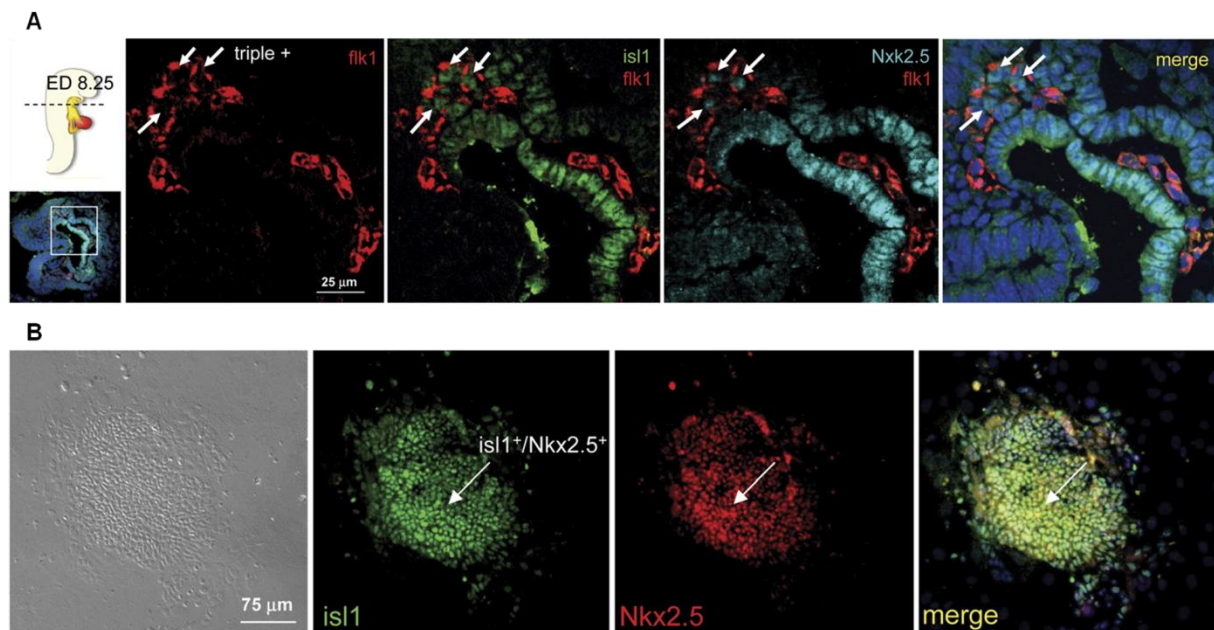


Abbildung 10 Co-Expression der Transkriptionsfaktoren Isl1 und Nkx2.5 in kardialen Progenitorzellen

Die Abbildung zeigt exemplarisch die Co-Expression der Transkriptionsfaktoren Isl1 und Nkx2.5 in kardialen Vorläuferzellen von Mäuseembryonen (A) und in differenzierenden ES-Zellen der Maus (B). In (A) sind mittels Immunfluoreszenz angefärbte Schnitte aus der Herzregion eines 8.25 Tage alten Mäuseembryos dargestellt (Isl1-Expression grün; Nkx2.5-Expression hellblau; Flk1-Expression rot). (B) zeigt die mittels Immunfluoreszenz dargestellte Co-Expression der Transkriptionsfaktoren in einem differenzierenden Klon von ES-Zellen der Maus am Tag 6 der Differenzierung (Isl1-Expression grün; Nkx2.5-Expression rot). Mit freundlicher Genehmigung des Autors aus Moretti et al. 2006.

Daraus ergibt sich die wissenschaftliche Fragestellung: Arbeiten Nkx2.5 und Isl1 in einem transkriptionellen Komplex zusammen, und ist diese Interaktion direkt oder indirekt über weitere Faktoren vermittelt?

Neben dem biochemischen Nachweis der Interaktion stellt sich die Frage nach deren funktioneller Bedeutung. Isl1⁺/Nkx2.5⁺-Zellen sind *in vitro* dazu fähig, alle Zelltypen des Herzens zu bilden (Moretti et al. 2006). Das bedeutet, dass in dieser Zeitspanne der gemeinsamen Expression beide Faktoren wichtige Entscheidungen bezüglich des Zelltyps fallen, in den diese Progenitorzellen im weiteren Verlauf differenzieren. Es liegt also nahe, dass gewisse Gene, die im Differenzierungsprozess von kardialen Progenitorzellen eine Rolle spielen, durch den transkriptionellen Komplex, in dem Isl1 und Nkx2.5 beteiligt sind, reguliert werden.

Die sich daraus ergebenden Fragen lauten: Auf welche Gene nimmt eine solche gemeinsame Regulation Einfluss und führt diese zu einer Aktivierung oder einer Inhibition der Expression des Gens?

Aus der molekularen Biologie sind zahlreiche Beispiele bekannt, in der solche zentralen Transkriptionsfaktoren der Entwicklung nicht nur zusammen verschiedene Prozesse steuern

sondern auch in sogenannten Feedback-Loops die eigene Aktivität oder die Aktivität von Faktoren, mit denen sie zusammen in Komplexen arbeiten, regulieren. Im Bereich der *Isl1*⁺ kardialen Progenitorzellen gibt es mehrere Hinweise darauf, dass *Isl1* durch *Nkx2.5* reguliert wird. In *Nkx2.5-knock-out*-Mäusen bleibt *Isl1* aktiv und ist in Bereichen im Embryo nachweisbar, wo es in Wildtyp-Mäusen nicht detektierbar ist (Prall et al. 2007). Darüber hinaus zeigen sich in *Nkx2.5* überexprimierenden ES-Zellen weniger *Isl1* exprimierende Zellen (unveröffentlichte Daten aus unserem Labor). Die Tatsache, dass *Nkx2.5* im regulatorischen Netzwerk der kardialen Progenitorzellen die Aktivität von *Isl1* inhibiert, ist weitgehend akzeptiert.

Offen ist jedoch die Frage: Bindet *Nkx2.5* in der Nähe des chromosomalen Lokus von *Isl1* an die DNA und reguliert es dort direkt die Aktivität des Promotors oder handelt es sich um einen indirekten Prozess, bei dem noch weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt sind?

Zusammenfassend beschäftigt sich diese Arbeit mit den folgenden drei Fragen:

- 1) Arbeiten *Nkx2.5* und *Isl1* in einem transkriptionellen Komplex zusammen, und ist diese Interaktion direkt oder indirekt über weitere Faktoren vermittelt?
- 2) Welche Gene sind potentielle Kandidaten für eine gemeinsame Regulation durch den transkriptionellen Komplex aus *Isl1* und *Nkx2.5* und welchen Einfluss hat diese Regulation auf das Expressionsverhalten der Gene?
- 3) Bindet *Nkx2.5* in der Nähe des chromosomalen Lokus von *Isl1* an die DNA und reguliert es dort direkt die Aktivität des Promotors oder handelt es sich dabei um einen indirekten Prozess, bei dem noch weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt sind?

Durch Beantwortung dieser Fragen sollen weitere Teile des transkriptionellen Netzwerks, welches die *Isl1*⁺ Progenitorzellen reguliert, aufgedeckt werden. Darüber hinaus soll gezeigt werden, dass *Isl1* bei der Entstehung von Herzmuskelzellen einen funktionellen Beitrag leistet und nicht nur als Marker einer Vorläuferpopulation dient. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse könnten dazu beitragen, das Verständnis der embryonalen Herzentwicklung zu vertiefen und den bei der Entstehung zahlreicher Gewebe ablaufenden Prozess von Spezifizierung einer Vorläuferpopulation, Expansion dieser Population und anschließender Differenzierung in das funktionelle Zielgewebe besser zu verstehen.

3. Material

3.1. Chemikalien und Reagenzien

30% Acrylamid/Bis Lösung, 29:1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Agarose SERVA premium	Serva
Amersham™ ECL plus western blotting detection reagents	GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland
Ammonium Persulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BIO-RAD™ protein assay dye reagent concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Blotting grade blocker non-fat dry milk	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Borsäure, SigmaUltra	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bromphenol Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Complete®, Mini, EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
CPRG (chlorophenolred-β-D-galaktopyranosid)	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Dako™ Fluorescent Mounting Medium	Dako Inc., Carpinteria, USA
Dimethyl Sulphoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
dNTP Mix (10mM)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidium Bromid (1%ige wässrige Lösung) für Elektrophorese	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenediamin Tetra Acetat Säure Dinatrium Salz Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Formaldehyd Lösung mind. 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
gereinigtes BSA (100x) (10mg/ml)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Glyzerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glyzin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Hepes (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Hoechst Dye 33258 (10mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hydrochlorsäure rauchend 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Luciferase Assay Reagenz	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

Material

Magnesium Chlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Magnesium Sulfat Heptahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Mytomycin C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natrium Phosphat dibasisches Heptahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natrium Phosphat monobasisches Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumhydroxid Lösung (1N)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfon Säure (BES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol 25:24:1 (gesättigt mit 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Reporter Lysis 5x Buffer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
RNaseOUT™	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol (50mM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sulfosalazylsäure	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100 (t-Octylphenoxypoly-ethoxyethanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Xylen Zyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ziegenserum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.2. Medium und Zusätze für Bakterien- und Zellkultur

Ampicillin Natrium Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bacto™ agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ tryptone	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ yeast extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's MEM (1x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dulbecco's MEM (1x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ELECTROPORATION Hypoosmolar Puffer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FBS (fetal bovine serum)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FuGENE® 6 transfection reagent	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
FuGENE® HD transfection reagent	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Gelatine (2% solution type B: aus Rinderhaut)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kanamycin Sulfat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin (200mM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MEM Natrium Pyruvat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MEM Non Essential Aminoacids	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
OPTI-MEM® I (1x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Dulbecco (1x) mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS-Dulbecco (1x) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS-Dulbecco (1x) mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Dulbecco (1x) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS (1x) mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS (1x) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS (10x) mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS (10x) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Pen/Strep (1000Units/ml Penicillin, 1000µg/ml Streptomycin)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Polybrene	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
S.O.C. Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SuperFect® transfection reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

3.3. Puffer und Lösungen

Falls nicht anders bezeichnet, wurden alle Puffer und Lösungen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Protein-Gele und Western Blots:

10x SDS Laufpuffer	10 g SDS 30.3 g Tris 144.1 g Glyzin <i>auflösen in 800 ml destilliertem H₂O à 1000 ml mit destilliertem H₂O</i>
2x SDS Probepuffer	10 ml 1.5 M Tris (pH 6.8) 6 ml 20% SDS 30 ml Glyzerol 15 ml β -mercaptoethanol 1.8 mg Bromphenol Blau <i>à 100 ml mit destilliertem H₂O Aufbewahrung bei -20°C; kurzzeitig auch bei 4°C</i>
10 ml 12% resolving SDS-gel	3.3 ml destilliertes H ₂ O 4.0 ml 30% Acryl-Bisacrylamide Mix 2.5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8) 100 μ l 10% SDS 100 μ l 10% Ammonium Persulfat 10 μ l TEMED
5 ml 5% stacking SDS-gel	3.4 ml destilliertes H ₂ O 830 μ l 30% Acryl-Bisacrylamide Mix 630 μ l 1.5 M Tris (pH 6.8) 50 μ l 10% SDS 50 μ l 10% Ammonium Persulfat 10 μ l TEMED
Coomassie Blue Färbelösung	2.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 450 ml Methanol 100 ml Essigsäure <i>à 1000 ml mit destilliertem H₂O</i>
Coomassie Blue Entfärbelösung	450 ml Methanol 100 ml Essigsäure <i>à 1000 ml mit destilliertem H₂O</i>
PBST	1x PBS 0.1% Tween [®] 20
Transfer Puffer	90 ml Methanol 90 ml 10x SDS Laufpuffer <i>à 900 ml mit destilliertem H₂O</i>

Material

DNA-Gele:

10x TBE (tris-borat-EDTA)

108 g Tris
55 g Borsäure
aflösen in 900 ml destilliertem H₂O
füge 40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) dazu
à 1000 ml mit destilliertem H₂O

10x DNA Ladepuffer

250 mg Bromphenol Blau
250 mg Xylene Zyanol
löse in 33 ml 150 mM Tris (pH 7.6) auf
füge 60 ml glycerol dazu
à 100 ml mit destilliertem H₂O

Immunpräzipitation

Co-Immunpräzipitationspuffer

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
15 mM EGTA
100 mM NaCl
0,1 % (w/v) Triton X-100
Aufbewahrung bei 4°C

β-Galaktosidase-Assay

Puffer Z

16,1 g Natriumphosphat dibasisch Heptahydrat
5,5 g Natriumphosphat monobasisch Monohydrat
0,75 g Kaliumchlorid
0,246 g Magnesiumsulfat Heptahydrat
à 1000 ml mit destilliertem H₂O
pH auf 7,0 einstellen

Bakterienkultur:

Ampicillin Vorratslösung (1000x)

100 mg/ml in destilliertem H₂O

Kanamycin Vorratslösung (1000x)

50 mg/ml in destilliertem H₂O

Luria Bertani (LB) Medium (flüssig)

5 g/l Hefe Extrakt
10 g/l Tryptone
5 g/l Natrium Chlorid
à 1000 ml mit destilliertem H₂O
füge 1 ml 1 M NaOH hinzu
vor Verwendung Autoklavieren

Luria Bertani (LB) agar (solid)

LB Medium (flüssig) mit 15 g/l Agarose
vor Verwendung Autoklavieren

Aufreinigung von GST-tag Proteinen:

Puffer L:

300 mM Natriumchlorid
20 mM Hepes pH 7.6
10% Glycerol
0.1% NP40
füge frisch hinzu: Protease Inhibitor und 2 mM

Material

	<i>DTT (finale Konzentration)</i>
Puffer W:	100 mM Natriumchlorid 20 mM Hepes pH 7.6 2 mM Magnesiumchlorid 0.5 mM EGTA 10% Glycerol 0.1% NP40
GST Elutionspuffer:	50 mM Tris (pH 8.0) 10 mM reduziertes Glutathion <i>à pH 8.0</i>
Aufreinigung von His-tag Proteinen:	
Resuspensionspuffer	50 mM Tris HCL pH8,0 150 mM Natriumchlorid 25% Glycerol 1 mM Magnesiumchlorid 5 mM β -Mercaptoethanol 20 μ M Zinkchlorid <i>füge frisch hinzu: Protease Inhibitor</i>
Waschpuffer	Resuspensionspuffer + 25 mM Imidazol + 350 mM Natriumchlorid (500 mM finale Konz.) + 0,1% Triton X-100
Elutionspuffer	Resuspensionspuffer + 300 mM Imidazol
Zellkultur:	
2x Einfriermedium	Kulturmedium <i>füge 20% FBS hinzu</i> <i>füge 20% DMSO hinzu</i>
MEF medium	500 ml DMEM high Glucose (-L-Glutamine) 5 ml L-Glutamine 200 mM 5 ml MEM non essential Aminoacids (100x) 5ml MEM Na ⁺ Pyruvate (100x) 5 ml Pen/Strep (100x) 5 μ l β -Mercaptoethanol 50 ml FBS
ES-Zell medium	500 ml DMEM high Glucose (-L-Glutamine) 5 ml L-Glutamine 200 mM 5 ml MEM non essential Aminoacids (100x) 5 ml MEM Na ⁺ Pyruvate (100x) 5 ml Pen/Strep (100x) 5 μ l β -Mercaptoethanol 90 ml FBS
HEK 293T medium	500 ml DMEM high Glucose (-L-Glutamine) 5 ml L-Glutamine 200 mM

	5 ml Pen/Strep (200x) 50 ml FBS
FACS-Puffer	2% FBS in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺
Nukleäre Extraktion:	
Puffer A	10 mM Hepes pH 7.9 1.5 mM Magnesium Chloride 10 mM Kalium Chloride <i>füge frisch hinzu: Protease Inhibitor</i> <i>Aufbewahrung bei -20°C</i>
Herstellung von doppelsträngigen Oligonukleotiden:	
10x DNA Annealing Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 1 M NaCl

3.4. Enzyme

Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern aufbewahrt und verwendet.

Restriktionsenzyme:

alle verwendeten Restriktionsenzyme New England Biolabs, Ipswich, USA

Polymerasen:

Platinum [®] Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Herculase [®] II Fusion Enzym mit dNTPs Combo	Stratagene, La Jolla, USA
FIREPol [®] DNA polymerase	Solis BioDyne, Tartu, Estonia

Andere:

0.05% Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
0.25% Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4 DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Quick T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA

3.5. Bakterienstämme

One shot [®] BL21 Star [™] (DE3) <i>F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm me131 (DE3)</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
One shot [®] Top10 competent cells <i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

rpsL (StrR) endA1 nupG

JM 109 competent cells

Stratagene, La Jolla, USA

*e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17
(rK- mK+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36
proAB lacIqZΔM15]*

3.6. Zelllinien

HEK (human embryonic kidney) 293T

HEK (human embryonic kidney) 293

T10 ½

Isl1-NlacZ knock-in embryonale Stammzellen der Maus (Sun et al. 2007)

3.7. Antikörper

primäre Antikörper

anti-Nkx2.5, H-114, Hase, polyklonal, IgG

Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA

anti-Nkx2.5, N-19, Ziege, polyklonal, IgG

Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA

anti-Isl (39.4D5), Maus, monoklonal, IgG

Developmental Studies Hybridoma Bank

anti-HA (ab9110), Hase, polyklonal, IgG

Abcam PLC, Cambridge, England

anti-HA Y11 (sc805), Hase, polyklonal, IgG

Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA

sekundäre Antikörper

anti-Ziege IgG (#705-035-147), Peroxidase
konjugiert, Affe, IgG

Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.,
Newmarket, England

anti-Hase IgG (#111-035-144), Peroxidase
konjugiert, Ziege, IgG

Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.,
Newmarket, England

anti-Maus IgG (#715-035-151), Peroxidase
konjugiert, Affe, IgG

Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.,
Newmarket, England

anti-Hase IgG, Alexa Fluor® 594 konjugiert,
Ziege, IgG

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.8. Molekularbiologische Kitsysteme

Absolutely RNA® Miniprep Kit

Stratagene, La Jolla, USA

Biotin 3' End DNA Labeling Kit

Thermo Scientific, Rockford, USA

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Applied Biosystems, Foster City, USA

LightShift Chemiluminescent EMSA Kit

Thermo Scientific, Rockford, USA

LightShift EMSA Optimization and Control Kit

Thermo Scientific, Rockford, USA

NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit

Thermo Scientific, Rockford, USA

QUIAGEN® Large-Construct Kit

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

QIAprep® Spin Maxiprep Kit

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

QIAprep® Spin Miniprep Kit

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

QIAquick® Gel Extraction Kit

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

QIAquick® PCR Purification Kit

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.9. Molekulargewichtsmarker

Protein:

precision plus protein[™] dual color standard

Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

DNA:

1 kb DNA Leiter (0.5-10 kb)

New England Biolabs, Ipswich, USA

2-log DNA Leiter (0.1-10 kb)

New England Biolabs, Ipswich, USA

3.10. Primer

Alle Primer wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) in lyophilisierter Form bestellt und, wenn nicht anders bezeichnet, mit destilliertem Wasser rekonstituiert und auf eine Konzentration von 100µM verdünnt.

Primer zur Klonierung:

HA-tag	Vorwärts	5'-TAT ACC CAT ACG ATG TTC CAG ATT ACG CTT AA-3'
HA-tag	Rückwärts	5'-GGC CTT AAG CGT AAT CTG GAA CAT CGT ATG GGT ATA-3'
Igfbp5	Vorwärts	5'-TCT CAG TGC TTT GTC AAG ATA AAG G-3'
Igfbp5	Rückwärts	5'-TAT CTT GAC CCC CGC CAT TTC T-3'
NkxBamH1	Vorwärts	5'-GCG GAT CCA TGT TCC CCA GCC CTG CGC TCA-3'
NkxBamH1	Rückwärts	5'-GCG GAT CCC TAC CAG GCT CGG ATG CCG T-3'
NkxHA	Vorwärts	5'-AAG CTT GCA CCA TGT TCC CCA GCC CTG CGC TC-3'
NkxHA	Rückwärts	5'-GAA TTC CCA GGC TCG GAT GCC GTG CAG CGT-3'
pET101Isl1	Vorwärts	5'-CAC CAT GGG AGA CAT GGG CGA TCC A-3'
pET101Isl1	Rückwärts	5'-TGC CTC AAT AGG ACT GGC TAC CA-3'
Tbx20	Vorwärts	5'-TTC TCT GTA TGT CTG GGC ATT TTC AG-3'
Tbx20	Rückwärts	5'-TGT ATG ATA CAG ACC ATG GAA AAC AGC-3'
TripleNKE-Site	Vorwärts	5'-GAG TTC AGG TGG TTG TTT CTG TC-3'
TripleNKE-Site	Rückwärts	5'-AGT AAT AAG CCC CTT GAC CAG AC-3'

Primer zur Sequenzierung:

T3	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
SP6	5'-CAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3'

Oligos für EMSA:

NKE-Site 1	Vorwärts	5'-GAG GGG AAA AAA AAA TCA AGT GCT CCT TC-3'
NKE-Site 1	Rückwärts	5'-GAA GGA GCA CTT GAT TTT TTT TTC CCC TC-3'
NKE-Site 1 m	Vorwärts	5'-GAG GGG AAA AAA AAA TCG CTT GCT CCT TC-3'

NKE-Site 1 m	Rückwärts	5'-GAA GGA GCA AGC GAT TTT TTT TTC CCC TC-3'
NKE-Site 2	Vorwärts	5'-GCA GCA TTT CCT TTA AGT GTA ATT ATG-3'
NKE-Site 2	Rückwärts	5'-CAT AAT TAC ACT TAA AGG AAA TGC TGC-3'
NKE-Site 2 m	Vorwärts	5'-GCA GCA TTT CCT TTC GAT GTA ATT ATG-3'
NKE-Site 2 m	Rückwärts	5'-CAT AAT TAC ATC GAA AGG AAA TGC TGC-3'
NKE-Site 3	Vorwärts	5'-GAG GAG CTG GGT CAA GTG AGG ACA GAG-3'
NKE-Site 3	Rückwärts	5'-CTC TGT CCT CAC TTG ACC CAG CTC CTC-3'
NKE-Site 3 m	Vorwärts	5'-GAG GAG CTG GGT CTA CAG AGG ACA GAG-3'
NKE-Site 3 m	Rückwärts	5'-CTC TGT CCT CTG TAG ACC CAG CTC CTC-3'
ISL1-Site	Vorwärts	5'-GTA ATT ATA TGC TAA TGA TAG TGC-3'
ISL1-Site	Rückwärts	5'-GCA CTA TCA TTA GCA TAT AAT TAC-5'
ISL1-Site m	Vorwärts	5'-GTA ATT ATA TGC TAG GTA TAG TGC-5'
ISL1-Site m	Rückwärts	5'-GCA CTA TAC CTA GCA TAT AAT TAC-5'

3.11. Vektoren

Name	Eigenschaften	Resistenz	Hersteller
pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	in linearisierter Form vorliegend kovalent an Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I gebunden um das klonieren von <i>blunt-end</i> Polymerase Ketten Reaktionen (PCR) Produkten zu ermöglichen	Kanamycin	Invitrogen
pGL4.24 [luc2P/minP]	exprimiert Luciferase (<i>Photinus pyralis</i>) unter der Kontrolle eines minimalen Promotors enthält ein Rapid Response [™] Reporter Gen für den schnelleren Abbau der Luciferase ermöglicht das klonieren von 5' und 3' Enhancer-Elementen	Ampicillin	Promega
pfos-Luc	Backbone ist der pGL3-Basic Vektor von Promega, der die Luciferase- Sequenz (<i>Photinus pyralis</i>) ohne Promotor beinhaltet enthält einen c-fos minimal promotor der zwischen die Restriktionsstellen BglII und XhoI kloniert wurde	Ampicillin	freundlicherweise von Dr. Dobrev zur Verfügung gestellt
pfos-Luc-Tbx20	Enthält zusätzlich oberhalb des c-fos Promotors ein 1.5kb großes Enhancer-Element des Tbx20 Gens	Ampicillin	freundlicherweise von Dr. Dobrev zur Verfügung gestellt
pGEX-4T1	exprimiert ein N-terminales GST- Fusionsprotein unter der Kontrolle eines Promotors für prokaryotische Expression	Ampicillin	GE Healthcare
pET101/D-TOPO [®]	liegt in linearisierter Form vor	Ampicillin	Invitrogen

	<p>kovalent an Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I gebunden enthält ein definierten Basenüberhang um die orientierte Klonierung von PCR-Fragmenten nach Verdau zu ermöglichen exprimiert ein Protein mit c- terminalem V5-Epitop und Polyhistidin(6x)-tag unter der Kontrolle eines Promotors für prokaryotische Expression</p>		
pRSV-βGal	<p>exprimiert β-Galctosidase (<i>Escherichia Coli</i>) unter der Kontrolle des RSV Promotors</p>	Ampicillin	<p>freundlicherweise von Dr. Dobрева zur Verfügung gestellt</p>
pcDNA-Nkx2.5-myc	<p>exprimiert Nkx2.5 mit einem C- terminalen myc-tag unter dem CMV Promotor</p>	Ampicillin	<p>Freundlicherweise von Dr. Lam zur Verfügung gestellt</p>
pcDNA-flag-Isl1	<p>exprimiert Isl1 mit einem N-terminalen flag-tag unter dem CMV Promotor</p>	Ampicillin	<p>Freundlicherweise von Dr. Lam zur Verfügung gestellt</p>
pRRL.sin-18.PGK-IRES-GFP	<p>exprimiert ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) unter der Kontrolle der pGK Promotors enthält eine <i>internal ribosome entry side (IRES)</i> für die Expression eines weiteren Gens neben GFP unter Kontrolle des pGK Promotors</p>	Ampicillin	<p>freundlicherweise von Dr. Dobрева zur Verfügung gestellt</p>
CMVΔR8.74 Packaging Plasmid	<p>kodiert für Proteine die für die Produktion von Lentiviren in eukaryoten Zellen nötig sind</p>	Ampicillin	<p>freundlicherweise von Dr. Dobрева zur Verfügung gestellt</p>
VSV.G Envelope Plasmid	<p>kodiert für Proteine die für die Produktion von Lentiviren in eukaryoten Zellen nötig sind</p>	Ampicillin	<p>freundlicherweise von Dr. Dobрева zur Verfügung gestellt</p>

3.12. Geräte

Zentrifugen:

Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
ROTANTA 64R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
ROTANTA/TRC	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Universal 30RF	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland

Fluoreszenzbildgebung:

Material

Leica Application Suite	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica DFC350 FX	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica DMI 6000B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland

Luminometer:

Lumat LB 9507	Berthold Technologies, Bad Herrenalb, Deutschland
---------------	---

PCR-Maschinen:

7300 Real Time PCR System, 7300 System Sequence Detection Software Version 1.4 Core Application	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
DNA Engine [®] Peltier Thermal Cyclers	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

pH-Meter:

SevenEasy	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
-----------	---

Bakterienkultur:

innova [®] 43 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, USA
---	---

Ultraschallsonde:

Sonopuls Homogenisator	Bandelin electronic GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland
------------------------	---

Photometer:

DU-640 Spectrophotometer	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

3.13. Software

Microsoft Office Professional Plus 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism Version 3.02	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
pDraw32 Version 1.1.08	Accaclone Software
NCBI Blast Version 2.2.24	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
GIMP 2.6.11	GIMP Open Source Developer Team
ECR Browser	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA

3.14. Verbrauchsmaterialien

9.2 cm Zellkulturschale (150350)	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
14 ml Polypropylene Round-Bottom Tube	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
14.5 cm Zellkulturschale	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-well optical reaction plate mit Barcode	Applied Biosystems, Foster City, USA
Amersham™ Hybond ECL Nitrocellulose Membrane	GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland
Biodyne® B Precut Nylon Membrane 77016	Thermo Scientific, Rockford, USA
Deckglass (24x60 mm, 22x22 mm)	MENZEL-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einmalcuvetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Lab-Tek® Chamber Slide™ Multiwell lumi vials 5ml	Berthold Technologies, Bad Herrenalb, Deutschland
Objektträger (76x26 mm)	MENZEL-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Multidishes für Zellkultur	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
Multi® reaction tubes (1.7 ml)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, Deutschland
Permanox® Objektträger	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
polysine™ Objektträger (25x75x1.00 mm)	MENZEL-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Rotilabo®-PCR-Reaktionsstreifen	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, Deutschland

4. Methoden

4.1. Molekularbiologische Methoden

4.1.1. Restriktionsverdau

Alle Restriktionsenzyme wurden bei New England Biolabs erworben. Der Restriktionsverdau wurde mit der laut NEBuffer activity chart (New England Biolabs 2008) geeigneten Pufferlösung durchgeführt und die Enzymmenge an die DNA-Menge angepasst. Die DNA wurde auf eine maximale Konzentration von 100 ng/μl verdünnt, und die Reaktion anschließend je nach erwarteter Enzymaktivität für 30 min bis zu 2 h bei 37°C inkubiert.

4.1.2. Dephosphorylierung

Dephosphorylierungen des 5'-Endes von linearisierten Vektoren, welche mit Restriktionsenzymen behandelt wurden, die kompatibel Enden hinterlassen, wurde durchgeführt, um eine Religierung des Vektors zu verhindern und somit die Effizienz des Klonierens zu erhöhen. Dazu wurde die Vektor-DNA mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von maximal 100 ng/μl verdünnt und je nach DNA-Menge 1 μl bis 2 μl *calI intestinal alkaline phosphatase* mit der entsprechenden Pufferlösung hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C.

4.1.3. Überhängende DNA-Fragmente entfernen

Zum Ligieren von nicht kompatiblen DNA-Enden nach Restriktionsverdau mussten die entsprechenden Überhänge entfernt beziehungsweise aufgefüllt werden, um eine blunt-end Ligation zu ermöglichen. Die DNA wurde mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von maximal 100 ng/μl verdünnt. Anschließend wurden 1 μl bis 2 μl T4 DNA Polymerase, 2 μl 10 mM dNTP Mix und der zugehörige Reaktionspuffer hinzugefügt und bei 37°C für 30 min inkubiert.

4.1.4. Ligationen

Für Ligationen wurde entweder die Quick T4 DNA Ligase (New England Biolabs) oder die T4 DNA Ligase (New England Biolabs) verwendet. Bei der schnellen Ligation wurden 1 μl des Vektors und 3 μl des Inserts unabhängig von der jeweiligen DNA-Konzentration und dem Verhältnis der Molekulargewichte mit 1 μl Quick T4 DNA Ligase und 5 μl 2x Reaktionspuffer vermischt. Die Reaktion wurde anschließend bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Ligationen unter Verwendung der T4 DNA Ligase wurden in einem Gesamtvolumen von 10 μl bis 20 μl durchgeführt. Es wurden 50 ng Vektor-DNA eingesetzt und die benötigte Menge Insert-DNA so kalkuliert, dass ein molekulares Mischungsverhältnis von 1:3 bis 1:10 von Vektor:Insert entstand. Dem Gemisch wurden 1 μl T4 DNA Ligase und die entsprechende Menge Reaktionspuffer hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte entweder für 2 h

bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C. Negative Kontrollen ohne Insert-DNA wurden regelmäßig eingesetzt.

4.1.5. DNA-Elektrophorese

DNA-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe von Agarose-Gelen. Je nach erwarteter Länge der DNA-Fragmente wurden für große DNA-Fragmente (>2 kb) Gele mit 0.8% (w/v) Agarose und für kleinere Fragmente Gele mit 2% (w/v) Agarose verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1xTBE-Puffer gegeben und erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlung auf unter 50°C wurden 5 µl 1%iger EthBr-Lösung hinzugefügt und die Gelkammern ausgegossen. Bei Erreichen der Raumtemperatur konnten die Gele verwendet werden. Vor dem Laden der DNA-Proben in die Probekammern wurden diese mit 10xDNA Ladepuffer vermischt. Zum Auftrennen der Fragmente wurden an die Gele in einem Bad mit 1xTBE Puffer für 40 min eine Spannung von 100 V angelegt. Zur weiteren Verwendung der aufgetrennten DNA-Stücke wurden diese unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits aufgereinigt.

4.1.6. Aufreinigung und Konzentration von DNA

Für die Aufreinigung oder Konzentration von DNA wurde entweder das QIAquick® PCR Purification Kit benutzt oder eine Chloroform-Phenol Extraktion durchgeführt. Bei letzterer wurde die DNA-enhaltende Lösung mit der gleichen Menge Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol 25:24:1 (gesättigt mit 10 mM Tris pH 8.0; 1 mM EDTA) gemischt und anschließend für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert. Der DNA-enhaltende Überstand wurde abpipettiert, mit der gleichen Menge Isopropanol vermischt und danach für mindestens 2 h bei -20°C gelagert. Im Anschluss wurde die Lösung bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 75% Ethanol gewaschen und erneut bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C für 10 min zentrifugiert. Danach wurde das DNA-Pellet in einem geeigneten Volumen destillierten Wassers resuspendiert.

4.1.7. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch entweder mit Hilfe eines Beckmann Photometers oder des Nanodrops. Für das Beckmann Photometer wurden 3 µl der zu bestimmenden DNA enthaltenden Lösung im Verhältnis 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Für das NanoDrop wurde 1 µl unverdünnter DNA-Lösung verwendet. Die Extinktionen bei 280 nm und bei 260 nm wurden gemessen und als optische Dichte (OD) ausgegeben. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine OD_{280} von 1 einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl. Bei einzelsträngiger DNA oder RNA entspricht eine OD_{280} von 1

einer DNA-Konzentration von 33 ng/μl. Das Verhältnis von OD₂₈₀/OD₂₆₀ spiegelt die Kontamination der Lösung mit Proteinen und anderen Stoffen wieder und wurde zur Qualitätskontrolle der DNA-Präparation mitbestimmt.

4.1.8. DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA-Proben wurden diese an Eurofins Medigenomix GmbH in Martinsried, Deutschland, geschickt. Die Proben wurden nach Vorgabe des Unternehmens mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 200 ng/μl verdünnt und die entsprechenden Sequenzierungsprimer hinzugefügt, um eine Konzentration von 5 pmol/μl zu erreichen. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 10 μl.

4.1.9. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Polymerasekettenreaktionen wurden in einem Gesamtreaktionsvolumen von 50 μl durchgeführt. Die Zusammensetzung der Reaktionsgemische richtete sich nach der verwendeten Polymerase.

Platinum Pfx:

10x Pfx Reaktionspuffer	5 μl
DNA Probe	5 μl
10 mM dNTPs	2 μl
50 mM MgSO ₄	1 μl
Platinum Pfx Polymerase	1 μl
Destilliertes Wasser	36 μl

Falls nicht Anders beschrieben, wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet.

Schritt	Zyklen	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1	1	2:00	94
2	29	00:30	95
		00:30	56
		01:00	68
3	1	05:00	68
4	1	hold	16

4.1.10. Herstellung von doppelsträngigen Oligonukleotiden

Die zur Herstellung von doppelsträngiger DNA vorgesehenen Oligonukleotide wurden nach Lieferung durch Eurofins MWG Operon in lyophilisierter Form mit DNase freiem Wasser auf eine Stammkonzentration von 200 μM anstelle der sonst üblichen 100 μM aufgelöst. Jeweils 2 μl der Stammlösung komplementärer Stränge wurden mit 8 μl DNase-freiem Wasser und 2 μl 10x DNA Annealing Puffer vermischt, um eine finale Konzentration der doppelsträngigen

DNA von 50 µM zu erreichen. Das Gemisch wurde für 4 min auf 95°C erhitzt und dann im Thermoblock langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

4.1.11. Quantitative Real-Time PCR

Bei der quantitativen Real-Time PCR wurde entweder der TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Roche) oder der SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) verwendet. Die cDNA Proben aus der reversen Transkription wurden mit destilliertem Wasser 1:3 verdünnt. Entsprechend den Herstellerangaben setzten sich die Reaktionsgemische wie folgt zusammen.

TaqMan™ Q-PCR:

2x TaqMan™ Universal PCR Master Mix	10 µl
TaqMan™ Probe	1 µl
cDNA Probe	1 µl
destilliertes Wasser	8 µl

SYBR®-Green Q-PCR:

2x SYBR®-Green PCR Master Mix	10 µl
Vorwärtsprimer 10 µM	1 µl
Rückwärtsprimer 10 µM	1 µl
cDNA Probe	1 µl

Für die quantitative Real-Time PCR wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet.

Schritt	Zyklen	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1	1	2:00	50
2	1	10:00	95
3	40	00:15	95
		01:00	60
4	1	01:00	95
		00:15	60
		00:15	95
		00:15	60

Schritt 4 (Dissoziationsschritt) wurde nur bei Verwendung der SYBR®-Green Methode durchgeführt und diente der Qualitätskontrolle der Reaktion.

4.1.12. Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des Absolutely RNA® Miniprep Kits von Stratagene.

4.1.13. Reverse Transkription von RNA zu cDNA

Die Reverse Transkription wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystem durchgeführt. Um den Abbau von RNA zu verhindern, wurde der Reaktion der RNase Inhibitor RNaseOUT™ von Invitrogen hinzugefügt.

4.1.14. Herstellung von nukleären Extrakten

Zur Herstellung von nukleären Extrakten wurden entweder das NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet oder wie folgt vorgegangen: Die Zellen einer 10 cm Petrischale wurden zunächst trypsinisiert und neutralisiert (siehe 4.4.2). Anschließend wurden sie zweimal mit 10 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen, in 800 μl kaltem Puffer A resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 50 μl 10%igem NP-40 und vortexen. Danach wurden die Zellen bei 12.000 U/min und 4°C für 30 sec zentrifugiert. Der Überstand, welcher der zytoplasmatischen Fraktion entspricht, wurde bei -80°C eingefroren und aufbewahrt. Das nukleäre Pellet wurde in 600 μl Co-Immünpräzipitationspuffer mit Protease Inhibitoren resuspendiert und mit Hilfe der Ultraschallsonde bei 92% Leistung für 10 sec homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 12.000 U/min und 4°C für 30 sec wurde der die nukleären Proteine enthaltende Überstand entweder direkt für weitere Experimente verwendet oder bei -80°C zur Lagerung eingefroren.

4.1.15. Luciferase-Assay

Für die Durchführung von Luciferase-Assays wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion passagiert und auf eine 24-*well* Platte verteilt, so dass am Tag der Transfektion der Konfluenzgrad in den einzelnen *wells* ungefähr 60%-80% betrug. Die Zellen wurden entsprechend der jeweiligen Planung des Experiments mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. Alle Transfektionen wurden mindestens als Duplikate durchgeführt. Um die Luciferaseaktivität anhand der Transfektionsrate normalisieren zu können, wurde, unabhängig von denen für die Experimentplanung nötigen Konstrukten, in jedem *well* 50-100 ng pRSV- β Gal-Vektor transfiziert. Die Kultivierung der Zellen nach der Transfektion folgte dem verwendeten Transfektionsprotokoll. 48 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium entfernt und 100 μl 1x Reporter Lysis Puffer in jedes *well* gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die 24-*well* Platte für mindestens 30 min bei -80°C eingefroren. Nach erneutem Auftauen der Zellen wurden diese bei Raumtemperatur für weitere 30 min inkubiert. Das Zelllysat wurde in PCR-Reaktionsstreifen übertragen und für 2 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um Zellreste zu pelletieren. Jeweils 10 μl des Überstandes wurden in ein Lumi-Vial gegeben und die Messungen unter Verwendung eines Luminometers mit Autoinjektion von 50 μl Luciferase Substrat, 2 sekundiger Verzögerung, gefolgt von einer 10 sec dauernde Messung der Lumineszenz

durchgeführt. Zur Normalisierung der Luciferaseaktivität anhand der Transfektionseffizienz wurden die erhaltenen Werte durch die gemessene β -Galaktosidase-Aktivität des jeweiligen *wells* geteilt (siehe 4.1.16). Anschließend wurden die Mittelwerte aus den Duplikaten gebildet und die x-fache Änderung der Aktivität gegenüber der Kontrolle berechnet. Diese Werte wurden danach anhand der Aktivitätsänderung eines Standardvektors ohne Enhancer-Elemente normalisiert, um unspezifische Effekte am Vektor zu eliminieren. Die Standardabweichung und Standardfehler wurden aus unabhängigen Experimenten berechnet. Zur Prüfung der Ergebnisse auf statistische Signifikanz wurde nach bestandener Normalitätsprüfung ein One-Sample-T-Test verwendet.

4.1.16. β -Galaktosidase-Assay

Der β -Galaktosidase-Assay wurde durchgeführt, um die im Luciferase-Assay gemessene Lumineszenz anhand der Transfektionsrate zu normalisieren. Daher entspricht die Vorgehensweise hierbei bis zum Erhalt des Zellysats dem Protokoll zur Durchführung des Luciferase-Assays (siehe 4.1.15). 10 μ l des Lysats wurden in eine 96-*well* Platte mit flachem Boden gegeben und dort mit 190 μ l der Reaktionslösung, bestehend aus Puffer Z, 1:100 CPRG (50 mM) und 1:1000 β -Mercaptoethanol, vermischt. Die Reaktion wurde für 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch Lagerung auf Eis gestoppt. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte photometrisch unter Verwendung eines ELISA Plate Reader bei 595 nm. Als Leerkontrolle wurde ein Well mit nur 1x Reporter Lysis Puffer und Reaktionslösung verwendet.

4.1.17. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Proben erfolgte mit Hilfe des Bradford-Assay. Dieser wurde in einer 96-*well* Platte mit flachem Boden durchgeführt. In jedes Experiment wurde eine Standardkurve, bestehend aus einer BSA Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 0 ng/ μ l, 50 ng/ μ l, 100 ng/ μ l, 200 ng/ μ l, 400 ng/ μ l und 600 ng/ μ l, inkludiert. Das Bio-Rad™ Protein Assay Dye Reagent Concentrate wurde 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Proben wurden je nach erwarteter Proteinkonzentration 1:5 oder 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Jeweils 10 μ l der Proben und der Standards wurden in Wells der gleichen Platte gegeben. Die Wells wurden anschließend mit 190 μ l des verdünnten Reagens aufgefüllt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde unter Verwendung eines ELISA Plate Reader photometrisch bei 595 nm bestimmt und die Standardkurve berechnet. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand dieser Standardkurve ermittelt.

4.1.18. Bindungs-Assay

Zur Durchführung des *in vitro* Bindungs-Assay wurden zunächst die Konzentrationen der aufgereinigten Proteinlösungen bestimmt. Da Nkx2.5 beziehungsweise dessen trunkierte Mutanten bei diesem Assay nicht von den Glutathion-Sepharose-Kügelchen eluiert wurden, konnte kein Bradford-Assay durchgeführt werden. Stattdessen wurde ein Teil des aufgereinigten Proteins in einer SDS-Elektrophorese mit anschließender Coomassie Färbung eingesetzt, um die Konzentration abzuschätzen (siehe 4.1.20). Gleichzeitig konnte so die Qualität des aufgereinigten Proteins beurteilt werden. Die Konzentration für Isl1 wurde auf demselben Weg abgeschätzt. Für die Bindungsreaktion wurden 5 µg Nkx2.5 beziehungsweise dessen trunkierte Mutanten und 1 µg Isl1 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden 5 µg aufgereinigtes GST mit 1 µg Isl1 verwendet. Die entsprechende Menge von an Glutathion-Sepharose-Kügelchen gebundenes Nkx2.5 beziehungsweise dessen trunkierte Mutanten wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Um die Vergleichbarkeit zu optimieren, wurde durch Zugabe von Glutathion-Sepharose-Kügelchen in Co-Immunpräzitationspuffer sichergestellt, dass die gleiche Menge an Kügelchen in jeder Reaktion vorlag. Anschließend wurde die entsprechende Menge eluiertes Isl1 hinzugegeben und die Reaktion mit Co-Immunpräzitationspuffer auf ein Gesamtvolumen von 500 µl gebracht. Die Inkubation erfolgte für eine 1 h bei 4°C. Danach wurde jeder Ansatz 10x mit 1 ml Co-Immunpräzitationspuffer gewaschen, wobei jeder Waschschrift bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde eine ausreichende Menge Co-Immunpräzitationspuffer im Reaktionsansatz belassen, so dass eine 50%ige Mischung aus Kügelchen und Puffer vorlag. Zur Detektion der gebundenen Proteine wurden 10 µl dieser Mischung in einer SDS-Elektrophorese mit anschließendem Western Blot eingesetzt (siehe 4.1.20 und 4.1.22).

4.1.19. Immunpräzitation

Immunpräzitationen (IP) wurden mit anti-Isl1 oder anti-Nkx2.5 Antikörpern durchgeführt. Nach Extraktion der nukleären Fraktion (siehe 4.1.14) wurde die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 4.1.17). Für IP mit dem anti-Isl1 Antikörper wurden 500 µg Protein mit Co-Immunpräzitationspuffer inklusive Protease Inhibitor auf 500 µl Gesamtvolumen verdünnt. Anschließend wurden 2 µg anti-Isl1 Antikörper hinzugefügt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Für IP mit dem anti-Nkx2.5 Antikörper (H-114) wurden 200 µl Protein mit Co-Immunpräzitationspuffer inklusive Protease Inhibitor auf 250 µl Gesamtvolumen verdünnt. Im Anschluss wurden 6 µg anti-Nkx2.5 (H-114) Antikörper hinzugefügt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Protein G (für anti-Isl1) oder Protein A (für anti-Nkx2.5) Sepharose Kügelchen mit Co-Immunpräzitationspuffer gewaschen und eine 50%ige Lösung aus Kügelchen und Co-Immunpräzitationspuffer hergestellt. 50 µl davon

wurden zu der jeweiligen IP-Reaktion hinzugefügt und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen bei 15.000 U/min und 4°C für 30 sec abzentrifugiert und drei Mal mit 1 ml Co-Immunpräzipitationspuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden 20 µl 2x SDS Probepuffer auf die Kügelchen gegeben und diese entweder direkt für SDS-Elektrophorese verwendet oder bei -80°C zur Lagerung eingefroren.

4.1.20. SDS-Elektrophorese

Für die SDS-Elektrophorese wurde das Mini-PROTEAN™ Electrophoresis System (Bio-Rad) eingesetzt. Die verwendeten SDS-PAGE Gele bestehen aus zwei unterschiedlichen Polyacrylamid-Gelen und stammen aus der eigenen Herstellung. Im oberen Teil findet sich ein 5%iges Stacking-Gel, welches auch die Probenaschen enthält. Im unteren Teil befindet sich ein 12% Resolving-Gel, welches für die Auftrennung der denaturierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht zuständig ist. Die Proben wurden vor dem Laden der Gele mit der entsprechenden Menge 2x SDS Probenpuffer vermischt und für 10 min bei 95°C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der Proteine sicherzustellen. Anschließend wurden die Proben sowie ein Protein Molekulargewichtsmarker in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese wurde für 45 min bei 200 V durchgeführt. Die Proteinbanden wurden entweder mit Hilfe einer Coomassie-Färbung direkt sichtbar gemacht oder für eine Antikörperdetektion auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (4.1.22). Bei der Coomassie-Färbung wurde das Gel für 0,5-1 h bei Raumtemperatur mit Coomassie Blue Färbelösung inkubiert. Im Anschluss wurde es unter mehrmaligem Wechsel der Lösung für mindestens 3 h mit Coomassie Blue Entfärbelösung behandelt.

4.1.21. Electromobility-Shift-Assay (EMSA)

Für den EMSA wurden Oligonukleotide bei Eurofins MWG Operon bestellt und mit Hilfe des Biotin 3' End DNA Labeling Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben mit Biotin markiert und anschließend zu Doppelsträngen zusammengefügt. Die Transkriptionsfaktoren für den Bindungsnachweis stammten aus nukleären Extrakten, die mit Hilfe des NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent Kit (Thermo Scientific) aus HEK 293 Zellen gewonnen wurden, die 48h zuvor zur Überexpression der Faktoren mit pcDNA-Nkx2.5 beziehungsweise pcDNA-Isl1 transfiziert worden waren. Für den Electromobility-Shift-Assay wurde das LightShift Chemiluminescent EMSA Kit nach Herstellerangaben verwendet. Das eingesetzte Protokoll wurde zuvor durch das LightShift EMSA Optimization and Control Kit (Thermo Scientific) optimiert. Als Blottingmembran wurde die Biodyne® B Precut Nylon Membrane (Thermo Scientific) verwendet.

4.1.22. Western Blot

Western Blots wurden unter Verwendung des Tank Blotter Mini Trans-Blot™ Cell Systems (Bio-Rad) und der Amersham™ Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (Amersham Bioscience) durchgeführt. Aus der Membran wurde ein der Größe des SDS-PAGE Gels entsprechendes Stück ausgeschnitten und, wie im Folgenden dargestellt, mit dem Gel zusammen in einer Halterung zusammengepresst.

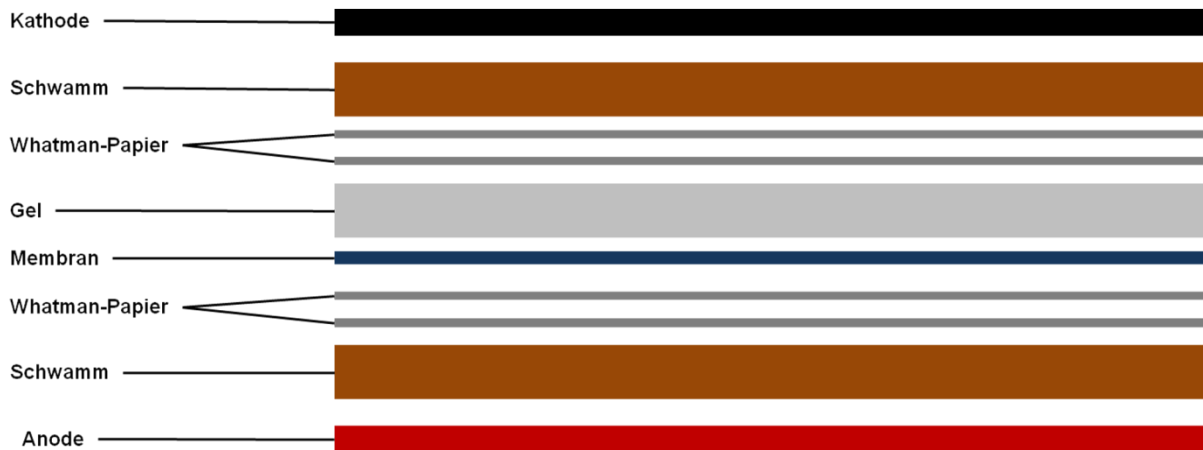


Abbildung 11 Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus des Proteintransfers

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei 90 V für 1,5 h in Transfer Puffer. Die restlichen Proteinbindungsstellen der Membran wurden im Anschluss mit 5% blotting grade non-fat dry milk (Bio-Rad) in PBST für 1 h bei Raumtemperatur gesättigt. Die Antikörperdetektion der Proteinbanden erfolgte in einem zweistufigen System mit primärem und sekundärem Antikörper. Der primäre Antikörper ist gegen das gesuchte Protein gerichtet und bindet es. Je nach Spezies, aus welcher der primäre Antikörper stammt, muss ein anderer sekundärer Antikörper verwendet werden. Der sekundäre Antikörper erkennt den F_c -Teil des primären Antikörpers und ist kovalent mit einem Enzym verbunden, welches bei Zugabe des entsprechenden Substrats zur Chemielumineszenz führt und somit die Detektion von Proteinbanden ermöglicht. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit der geeigneten Menge primären Antikörpers in PBST mit 5% blotting grade non-fat dry milk inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 10 min mit PBST gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in der Verdünnung 1:10000 in PBST mit 5% blotting grade non-fat dry milk für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran erneut drei Mal für 10 min mit PBST gewaschen. Um Reste des Detergens zu entfernen, wurde nach dem letzten Waschschrift die Membran ein Mal für 2 min mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 5 min mit Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection

Reagent inkubiert. Die Detektion fand in der Dunkelkammer mit Hilfe der Belichtung von Chemilumineszenz detektierenden Filmen statt. Für die Entwicklung der Filme wurde eine Entwicklermaschine verwendet.

4.2. Klonierung der Vektoren

4.2.1. Klonierung des Vektors pGEX-Nkx2.5

Die Nkx2.5 cDNA wurde mit Hilfe eines pcDNA-Vektors, welcher die cDNA von Maus Nkx2.5 enthielt, amplifiziert. Für die Polymerasekettenreaktion wurden die Primer NkxBamH1Fwd und NkxBamH1Rev (siehe 3.10) verwendet. Die Primer wurden so designt, dass das PCR-Produkt zwei BamH1 Schnittstellen an beiden Enden der cDNA aufwies. Um die Nkx2.5 cDNA an den Reading Frame des GST-tags des Vektors anzupassen, wurden am 5' hinter der BamH1 Schnittstelle zwei zusätzliche Basenpaar inkludiert. Das PCR-Produkt und der pGEX-4T1 Vektor wurden mit BamH1 verdaut und letzterer anschließend dephosphoryliert, mit Hilfe eines 1% Agarose Gels aufgetrennt und aufgereinigt (siehe 4.1.1; 4.1.2; 4.1.4; 4.1.5 und 4.1.6). Das PCR-Produkt wurde ebenfalls aufgereinigt (siehe 4.1.6). Nach Ligation wurde das neue Konstrukt in TOP10 Zellen transformiert, der Plasmid unter Verwendung einer Minipräparation aufgereinigt und dieser mit Hilfe eines EcoR1 Verdau mit anschließender DNA-Elektrophorese nach der gewünschten Orientierung der Nkx2.5 cDNA im Vektor überprüft (siehe 4.1.1, 4.1.5 und 4.3.2). Das in den späteren Experimenten verwendete Konstrukt wurde sequenziert, um die Integrität der DNA-Sequenz sicherzustellen (siehe 4.1.8).

4.2.2. Klonierung des Vektors pET101-IsI1

Die IsI1 cDNA wurde mit Hilfe eines pcDNA-Vektors, welcher die cDNA von Maus IsI1 enthielt, amplifiziert. Für die Polymerasekettenreaktion wurden die Primer pET101IsI1Fwd und pET101IsI1Rev (siehe 3.10) verwendet. Die Primer wurden nach Herstellerangaben des pET101/D-TOPO®-Vektors designt, so dass das PCR-Produkt nach Aufreinigung direkt in der ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführten TOPO-Ligationsreaktion verwendet werden konnte (siehe 4.1.6). Nach Ligation wurde das neue Konstrukt in TOP10 Zellen transformiert, der Plasmid unter Verwendung einer Minipräparation aufgereinigt und dieser mit Hilfe eines EcoR1 Verdau mit anschließender DNA-Elektrophorese nach der gewünschten Orientierung der Nkx2.5 cDNA im Vektor überprüft (siehe 4.1.1, 4.1.5 und 4.3.2). Das in den späteren Experimenten verwendete Konstrukt wurde sequenziert, um die Integrität der DNA-Sequenz sicherzustellen (siehe 4.1.8).

4.2.3. Klonierung des Vektors pSin Nkx-HA IRES GFP

Bei dem HA-tag handelt es sich um ein Epitop des Oberflächenmarkers Hämagglutinin des Influenza-Virus, das auf Grund seiner kleinen Größe (9 AS; YPYDVPDYA) nur wenig mit der Struktur des getaggen Proteins interferiert und eine gute Erkennung und Präzipitation mit Antikörpern erlaubt. Um ein C-terminales Nkx2.5-HA tag Fusionsprotein zu erzeugen, wurde die cDNA von Nkx2.5 mit dem Primerpaar NkxHA (siehe 3.10) und dem pcDNA-Nkx2.5 Vektor als Vorlage amplifiziert. Die Primer wurden so designt, dass das Produkt eine Mutation im Stopcodon von Nkx2.5 aufwies und darüber hinaus bei der späteren Klonierung *in frame* mit dem HA-tag war. Das PCR-Produkt wurde zunächst in einen pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] Vektor kloniert. Dieser wurde anschließend mit XhoI auf korrekte Orientierung des PCR-Produkts gescreent und mit NotI und EcoRV verdaut (siehe 4.1.1). Dies öffnete den Vektor so, dass das doppelsträngige DNA Stück, welches aus dem komplementären Primerpaar HA-tag (siehe 3.10) hergestellt wurde (siehe 0) und die Sequenz für das HA-tag enthielt, dort hinein ligiert werden konnte (siehe 4.1.4). Das Konstrukt wurde komplett sequenziert, um die Integrität der Nkx2.5 cDNA sicherzustellen und die korrekte Fusion mit dem HA-tag zu überprüfen. Um das Konstrukt in den Zielvektor pRRL.sin-18.pGK-IRES-GFP zu transferieren, wurde dieser mit BamH1 verdaut, anschließend unter Verwendung der T4 DNA Polymerase die überhängenden DNA-Enden entfernt (siehe 4.1.3) und dephosphoryliert (siehe 4.1.2). Der das sequenzierte Konstrukt enthaltende pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] Vektor wurde mit XbaI und SpeI verdaut, durch DNA-Elektrophorese aufgetrennt, das Insert aufgereinigt (siehe 4.1.5) und die überhängenden DNA-Enden ebenfalls entfernt. Anschließend wurde das Insert und der pRRL.sin-18.pGK-IRES-GFP Vektor ligiert und das Produkt mit EcoR1 auf korrekte Orientierung gescreent.

4.2.4. Klonierung der pGL4.24 Luciferase Vektoren

Zur Klonierung der verschiedenen Enhancer-Elemente in pGL4.24 Luciferase Vektoren wurden mit Hilfe von Primerpaaren die entsprechenden DNA-Regionen durch Polymerase-Ketten-Reaktion mit DNA von der Maus als Vorlage amplifiziert (siehe 3.10 und 4.1.9). Die PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung in pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] Vektoren kloniert (siehe 4.1.4 und 4.1.6). Bei Klonierung des Tbx20-Enhancers und des Isl1-Enhancers wurden diese im Anschluss mit KpnI und XhoI verdaut. Bei Klonierung des Igfbp5-Enhancers wurde SacI und XhoI verwendet (siehe 4.1.1). Der pGL4.24 Vektor wurde im Anschluss mit den gleichen Kombinationen von Restriktionsenzymen verdaut. Die unterschiedlichen Inserts und die unterschiedlich geöffneten Zielvektoren wurden durch DNA-Elektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt (siehe 4.1.5). In der Ligation wurde das entsprechende Insert in den jeweiligen Vektor kloniert und die Integrität der DNA-Sequenz, insbesondere der bekannten Bindungsmotive, durch Sequenzierung sichergestellt.

4.3. Bakterienkultur

4.3.1. Transformation kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien wurden nach Herstellerangaben transformiert. Die Inkubationszeit auf Eis vor dem Hitzeschock betrug bei der Transformation von Plasmiden 10 min, bei Ligationen zur Erhöhung der Effizienz 20 min.

4.3.2. Vermehrung von Plasmiden

Entsprechend des im Plasmid enthaltenden Resistenzgens wurden die Bakterien auf LB-Agar mit Kanamycin in einer Konzentration von 50 µg/ml oder Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Bakterienkolonien ausgewählt und für Minipräparationen in 2 ml, für Maxipräparationen in 200 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum inokuliert und für mindestens 8 h (Minipräparationen) beziehungsweise 12 h (Maxipräparationen) inkubiert. Die Mini- oder Maxipräparationen wurden mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits oder der QIAprep® Spin Maxiprep Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.3.3. Expression von GST-tag-Nkx2.5 in Escherichia Coli

Für die Expression von GST-tag-Nkx2.5 wurden BL21 E. Coli Bakterien mit dem Vektor pGEX-Nkx2.5 nach Herstellerangaben transformiert. Die Zellen wurden über Nacht auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Bakterienkolonie ausgewählt und in 2 ml LB-medium mit 100 µg/ml Ampicillin inokuliert und für 8 h bei 37°C inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde anschließend in 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin inokuliert und für ungefähr 4 h bei 37°C inkubiert. Um das Bakterienwachstum zu überwachen wurde in regelmäßigen Abständen die optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen. Wenn die OD₆₀₀ 0,4 bis 0,5 erreicht hatte, wurde die Kultur in ein Eisbad gesetzt und durch die Zugabe von IPTG in einer finalen Konzentration von 0,5 mM induziert. Anschließend wurde die Kultur für weitere 4 h bei 18°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4500 U/min und 4°C für 30 min gesammelt. Das Pellet wurde zwei Mal mit 10 ml PBS gewaschen und danach bei -80°C eingefroren.

4.3.4. Aufreinigung von GST-tag Proteinen

Zunächst wurden Glutathion-Sepharose Kügelchen mit Puffer L gewaschen und eine 50%ige Lösung aus Kügelchen und Puffer L hergestellt (3.3). Das Pellet aus der *in vitro* Expression (siehe 4.3.3) wurde aufgetaut und in 5 ml Puffer L mit Protease Inhibitoren resuspendiert. Die Zellsuspension wurde drei Mal für 30 sec mit Hilfe der Ultraschallsonde bei 92% Leistung homogenisiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 15.000 U/min und 4°C wurde der Überstand mit 500 µl der 50%igen Kügelchen-Puffer L Lösung vermischt und für eine Stunde

bei 4°C auf einer Rüttelplatte inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen bei 15.000 U/min für 30 sec abzentrifugiert und zwei Mal mit Puffer L und zwei Mal mit Puffer W gewaschen. Das an die Kügelchen gebundene GST-tag Protein wurde bei 4°C in Puffer W für maximal zwei Tage aufbewahrt.

4.3.5. Expression von His-tag-Isl1 in Escherichia Coli

Für die Expression von His-tag-Isl1 wurden BL21 E. Coli Bakterien mit dem Vektor pET101-Isl1 nach Herstellerangaben transformiert. Die Zellen wurden über Nacht auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Bakterienkolonie ausgewählt und in 2 ml LB-medium mit 100 µg/ml Ampicillin inokuliert und für 8 h bei 37°C inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde anschließend in 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin inokuliert und für ungefähr 4 h bei 37°C inkubiert. Um das Bakterienwachstum zu überwachen, wurde in regelmäßigen Abständen die optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen. Wenn die OD₆₀₀ 0,4 bis 0,5 erreicht hatte, wurde die Kultur in ein Eisbad gesetzt und durch die Zugabe von IPTG in einer finalen Konzentration von 0,25 mM induziert. Anschließend wurde die Kultur für eine weitere Stunde bei 23°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4500 U/min und 4°C für 30 min gesammelt. Das Pellet wurde zwei Mal mit 10 ml PBS gewaschen und danach bei -80°C eingefroren.

4.3.6. Aufreinigung von His-tag Proteinen

Zunächst wurden Ni-NTA-Agarose-Kügelchen mit Resuspensionspuffer gewaschen und eine 50%ige Lösung aus Kügelchen und Resuspensionspuffer hergestellt (siehe 3.3). Das Pellet aus der *in vitro* Expression (siehe 4.3.5) wurde aufgetaut und in 5ml Resuspensionspuffer mit Protease Inhibitoren resuspendiert. Falls die Lösung sehr trüb war, wurden weitere 5 ml Resuspensionspuffer hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde vier Mal für 30 sec mit Hilfe der Ultraschallsonde bei 92% Leistung homogenisiert und danach für 20 min bei 15.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Dem Überstand wurde Natriumchlorid (finale Konzentration 500 mM), Imidazol (finale Konzentration 25 mM) und Triton X-100 (finale Konzentration 0,1%) hinzugefügt. Anschließend wurden 500 µl der 50%igen Kügelchen Resuspensionspuffer Lösung hinzugegeben und für 30 min bei 4°C auf einer Rüttelplatte inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen bei 15.000 U/min für 30 sec abzentrifugiert und vier Mal mit Waschpuffer gewaschen (siehe 3.3). Nach dem letzten Waschschrift wurde zur Elution des His-tag Protein von den Ni-NTA-Kügelchen 500 µl Elutionspuffer auf die Kügelchen gegeben, 30 sec bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zentrifugation der Überstand abgenommen (siehe 3.3). Dieser Vorgang wurde fünf Mal wiederholt und die Fraktionen getrennt voneinander für maximal zwei Tage bei 4°C aufbewahrt.

4.4. Eukaryote Zellkultur

4.4.1. Kulturbedingungen

HEK293-Zellen wurden in HEK293-Medium kultiviert und je nach Konfluenzgrad alle zwei bis drei Tage passagiert. MEFs (Maus embryonale Fibroblasten) wurden in MEF-Medium kultiviert und nach dem Protokoll für die Herstellung von Feeder-Zellen für die embryonale Stammzellkultur behandelt (siehe 4.4.5). Maus ES-Zellen wurden in ES-Zell-Medium mit 1 µl/ml LIF (Leukozyten inhibierender Faktor) zur Erhaltung des undifferenzierten Stadiums auf Feeder-Zellen kultiviert und entsprechend der Morphologie der Kolonien und des Konfluenzgrades passagiert. Die Differenzierung der Zellen erfolgte nach einem festgelegten Protokoll (siehe 4.4.8). Alle Zelllinien wurden in einem Zellkulturinkubator bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte in einer sterilen Umgebung.

4.4.2. Passagieren der Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurden diese nach Entfernen des Kulturmediums zweimal mit warmen PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das PBS vollständig entfernt und eine der Größe der Petrischale entsprechende Menge 0,05%igen Trypsins auf die Zellen gegeben und für 4-8 min bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde mit mindestens der doppelten Menge warmen Kulturmediums neutralisiert, die Zellen gesammelt und bei 12.000 U/min für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in warmen Kulturmedium resuspendiert und die Zellen mit einer verbesserten Neubauer Zählkammer gezählt. Eine adäquate Menge an Zellen wurde in das entsprechende Volumen Kulturmedium gegeben und auf einer neuen Petrischale verteilt. Bei der ES-Zell-Kultur wurden auf dieser Petrischale bereits am Tag zuvor Feederzellen ausplattiert, so dass eine konfluente Schicht dieser Zellen den Boden der Schale bedeckte.

4.4.3. Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zunächst genauso behandelt wie beim Passagieren (siehe 4.4.2). Nach dem Zählen der Zellen wurde die geeignete Menge Kulturmedium so berechnet, dass diese in der Hälfte des gewünschten Einfriervolumens vorlagen. Anschließend wurde das gleiche Volumen 2x Einfriermedium hinzugefügt und die Zellen gleichmäßig auf die geeignete Menge 1,5 ml Cryo-Vials verteilt. Danach wurden diese in eine Einfrierbox, welche mit Isopropanol gefüllt war, gegeben und bei -80°C gelagert um während des Einfriervorgangs einen kontrollierten Abfall der Temperatur um 1°C pro Minute zu gewährleisten. Frühestens 2 h später wurden die Cryo-Vials aus der Einfrierbox entnommen und für die Langzeitlagerung in flüssige Stickstofftanks verstaut.

4.4.4. Auftauen der Zellen

Die zum Auftauen ausgewählten Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstofftank entnommen und in einem 37°C warmen Wasserbad zügig aufgetaut. Nach Verflüssigung des Mediums wurde zu diesem langsam 10 ml warmes Kulturmedium hinzugegeben, um das enthaltene DMSO zu verdünnen. Anschließend wurden die Zellen bei 12.000 U/min für 5 min zentrifugiert, das Pellet in dem geeigneten Volumen Kulturmedium resuspendiert und in einer Petrischale ausplattiert.

4.4.5. Präparation der Feederzellen

Feederzellen für die ES-Zell-Kultur wurden hergestellt, indem zunächst embryonale Mausfibroblasten (MEF) der Passage zwei aufgetaut wurden. Diese wurden zuvor aus Mäuseföten isoliert, für zwei Passagen in MEF-Medium kultiviert und anschließend eingefroren. Die Zellen wurden nach dem Auftauen weiter passagiert und amplifiziert, bis sie bei Passage fünf annähernd 100%ige Konfluenz erreichten. Danach wurde zu dem Kulturmedium Mytomycin in einer finalen Konzentration von 10 µg/ml hinzugefügt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen, gezählt und eingefroren. Ein 1,5 ml Cryo-Vial wurde so befüllt, dass nach dem Auftauen zwei 10 cm Petrischalen mit Feederzellen bedeckt werden konnten.

4.4.6. Transfektion von Zellen

Zur Transfektion von Zellen wurde entweder die Calciumchlorid-BES-Methode oder das SuperFect® Transfection Reagent (Quiagen) verwendet. Bei letzterem fand die Transfektion der Zellen nach Herstellerangaben statt. Zur Transfektion mit Hilfe der Calciumchlorid-BES-Methode wurden die Zellen am Tag zuvor passagiert, so dass zur Transfektion am nächsten Tag ein Konfluenzgrad von etwa 40% erreicht war. Am Tag der Transfektion wurde das Medium gewechselt und mit 9/10 des normalen Kulturvolumens wieder aufgefüllt. Die Menge an Transfektionslösung entsprach dem verbliebenen 1/10 des Kulturvolumens. Die verwendete DNA-Menge war 1 µg DNA pro 100 µl Transfektionslösung. Die DNA wurde in destilliertem Wasser mit Calciumchlorid in einer finalen Konzentration von 250 mM so verdünnt, dass das Volumen der Hälfte der Transfektionslösung entsprach. Diese Lösung wurde langsam mit dem gleichen Volumen 2xBES (pH 6,95-7,05) vermischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dieses Gemisch der Kulturlösung hinzugefügt und die Zellen unter normalen Bedingungen kultiviert. Nach 12 h wurde das Medium gewechselt, ohne die Zellen mit PBS zu waschen. Die maximale Expression des transfizierten Konstrukts war nach 48 h zu erwarten.

4.4.7. Herstellung von Poly-HEMA beschichteten Platten

Um ES-Zellen im EB-System zu differenzieren, war die Verwendung Poly-HEMA beschichteter Platten nötig (siehe 4.4.8). Diese wurden aus Standard 10 cm Petrischalen in eigener Herstellung gefertigt. Dazu wurde die entsprechende Menge Poly-HEMA in 95%igem Ethanol gelöst, um eine 5%ige Poly-HEMA Lösung herzustellen. Zum Auflösen des Pulvers musste die Lösung auf einer Magnetrührplatte erhitzt werden. Anschließend erfolgte aus Sterilitätsgründen eine Filtrierung mit einem 0.25 µm Filter. 1 ml dieser Lösung wurde in eine 10 cm Petrischale gegeben, wobei darauf zu achten war, dass der Boden der Platte vollständig bedeckt war. Danach wurde die Platte über Nacht unter sterilen Bedingungen getrocknet und mit UV-Licht erneut sterilisiert, um verbliebene Keime abzutöten.

4.4.8. Differenzierung von ES-Zellen im embryoid body (EB) System

Für die *in vitro* Differenzierung ES-Zellen wurde das EB-System mit Aggregaten verwendet. Dazu wurden ES-Zellen der Maus zunächst nach den Standard Kulturbedingungen im undifferenzierten Zustand kultiviert (siehe 4.4.1). Nachdem eine ausreichende Menge an Zellen vorhanden war, wurden diese wie beim Passagieren (siehe 4.4.2) behandelt, jedoch in ES-Zell Medium ohne LIF resuspendiert. Um die ES-Zellen von den MEF-Zellen zu trennen, wurde die Zellsuspension auf eine unbehandelte Petrischale gegeben, für 45 min bei 37°C inkubiert und der Überstand anschließend abgenommen. Die MEF-Zellen adhäreren schneller auf der Platte als die ES-Zellen, so dass dieser fast ausschließlich ES-Zellen enthielt. Der Überstand wurde anschließend mit ES-Zell Medium ohne LIF auf eine Zellkonzentration von 33.000 Zellen/ml verdünnt. Anschließend wurden je 10 ml dieser Zellsuspension in eine mit Poly-HEMA beschichtete 10 cm Petrischale gegeben und für die entsprechende Anzahl Tage nach gewünschter Differenzierungsdauer unter normalen Bedingungen kultiviert. Während dieser Zeit wurde das Medium nach Bedarf teilweise gewechselt.

4.4.9. Herstellung von Lentiviren

Um eine embryonale Stammzelllinie mit einem Konstrukt stabil zu transfizieren, wurde ein lentivirales System unter Verwendung des pRRL.sin-18 Vektors mit entsprechenden packaging Plasmiden eingesetzt. Zur Herstellung der Lentiviren wurde der lentivirale Vektor zusammen mit dem CMVΔR8.74 packaging plasmid und dem VGV.G envelop plasmid mit Hilfe des SuperFect® Transfection Reagent (Quiagen) in HEK293T-Zellen transfiziert. Für eine 10 cm Petrischale mit HEK293T-Zellen wurden 7,5 µg pRRL.sin-18 Vektor, 4,875 µg CMVΔR8.74 packaging Plasmid und 2,625 µg VGV.G envelope Plasmid eingesetzt. Nach Transfektion wurden die Zellen für 48 h kultiviert und anschließend der fertigen Virus enthaltende Überstand abgenommen, bei 3.000 U/min und 4°C für 15 min zentrifugiert und

bei 4°C aufbewahrt. Um weitere Viren zu produzieren, wurde 8 ml Kulturmedium auf die Zellen gegeben und diese für weitere 24 h kultiviert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, bei 3.000 U/min und 4°C für 15 min zentrifugiert und bei 4°C aufbewahrt. Für längere Aufbewahrung wurde der Überstand aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Viren enthaltenden Überstände wurden getrennt aufbewahrt und genutzt.

4.4.10. Infektion von embryonalen Stammzellen mit Lentiviren

Die Infektion von ES-Zellen mit Lentiviren fand in einer Suspensionskultur statt. Dazu wurden die ES-Zellen wie beim Passagieren behandelt (siehe 4.4.2). Um die MEF-Zellen zu eliminieren, wurden die Zellen nach Resuspension in einem geeigneten Volumen ES-Zell Medium auf eine unbehandelte Petrischale gegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Der die ES-Zellen enthaltende Überstand wurde abgenommen, erneut zentrifugiert, resuspendiert und gezählt. Die Infektion fand in einer auf Grund der verringerten Adhäsion besser geeigneten, bakteriologischen 24-well Platte statt. In jedes Well wurden 20.000 ES-Zellen in 1 ml ES-Zell Medium gegeben und mit 1ml des Virus enthaltenden Überstandes (siehe 4.4.9) vermischt. Im Anschluss wurde der Zellsuspension in jedem well LIF in einer finalen Konzentration von 1 µg/ml und Polybrene in einer finalen Konzentration von 8 ng/ml hinzugefügt und diese für 12 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension aus jedem well in eine 6 cm Petrischale, in der am Tag zuvor MEF-Zellen ausplattiert worden waren, gegeben, für weitere 12 h bei 37°C inkubiert und anschließend das Medium gewechselt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgt nach den Standardbedingungen für ES-Zell Kultur (siehe 4.4.1). Da das verwendete lentivirale Konstrukt neben dem Protein von Interesse auch GFP unter dem PGK Promotor exprimiert, konnte nach zwei Tagen mit Hilfe von Fluoreszenzbildgebung der Erfolg der Infektion überprüft werden. Konnten GFP positive Zellen eindeutig identifiziert werden, wurde die Infektion als erfolgreich angesehen.

4.4.11. Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung (FACS)

Um die ES-Zellen nach lentiviraler Infektion zu sortieren und dadurch eine stabil infizierte Zelllinie zu kreieren, wurde ein Fluoreszenz-aktiviertes-Sortierungsverfahren (FACS) verwendet, welches nach GFP-Expression, also erfolgreicher Infektion, sortierte. Zunächst wurden die ES-Zellen wie beim Passagieren behandelt (siehe 4.4.2). Nach Resuspension in ES-Zell Medium wurden diese bei 1.200 U/min für 5 min zentrifugiert, gezählt und anschließend in FACS-Puffer resuspendiert, so dass eine Zellkonzentration von 50×10^6 Zellen/ml in einem Volumen zwischen 200-800 µl erreicht wurde. Der Transport der Zellen fand auf Eis statt. Die FAC-Sortierung wurde von Katleen Gotsch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dirk Busch (Technische Universität München, Deutschland) durchgeführt. Es wurden etwa 200.000 GFP positive Zellen sortiert, diese anschließend in 6 ml ES-Zell Medium mit LIF resuspendiert, auf eine 6 cm Petrischale, auf der am Tag zuvor

MEF-Zellen ausplattiert worden waren, gegeben und unter normalen Bedingungen kultiviert. Zur Kontrolle wurde bei der Sortierung eine nicht infizierte ES-Zelllinie mit dem gleichen genetischen Hintergrund verwendet.

4.4.12. Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden zur Immunfluoreszenz auf Objektträgern mit zwei Kammern unter normalen Bedingungen bis zu einem Konfluenzgrad von etwa 70% kultiviert. Danach wurden die Zellen drei Mal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und zur Fixierung für 15 min bei Raumtemperatur mit 3,7% Formaldehyd in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} inkubiert. Anschließend wurde erneut drei Mal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen und Blockierung von unspezifischen Bindungen wurden die Zellen für mindestens 1 h bei 37° mit 0,1% Triton X-100 und 10% Ziegen Serum in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} inkubiert. Im Anschluss wurde der primärer Antikörper in vom Hersteller empfohlener Konzentration, 0,1% Triton X-100 und 1% Ziegen Serum in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} verdünnt, auf die Zellen gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde fünf Mal mit 0,1% Triton X-100 in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und die Zellen für 1 h bei 37°C mit dem sekundären Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung, Hoechst-Dye 33528 in der Verdünnung 1:1000, 0,1% Triton X-100 und 1% Ziegen Serum in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} inkubiert. Anschließend wurde erneut fünf Mal mit 0,1% Triton X-100 in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und die Objektträger mit Hilfe von Dako™ Fluorescent Mounting Medium zugedeckelt. Bei jedem Experiment wurde eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper durchgeführt.

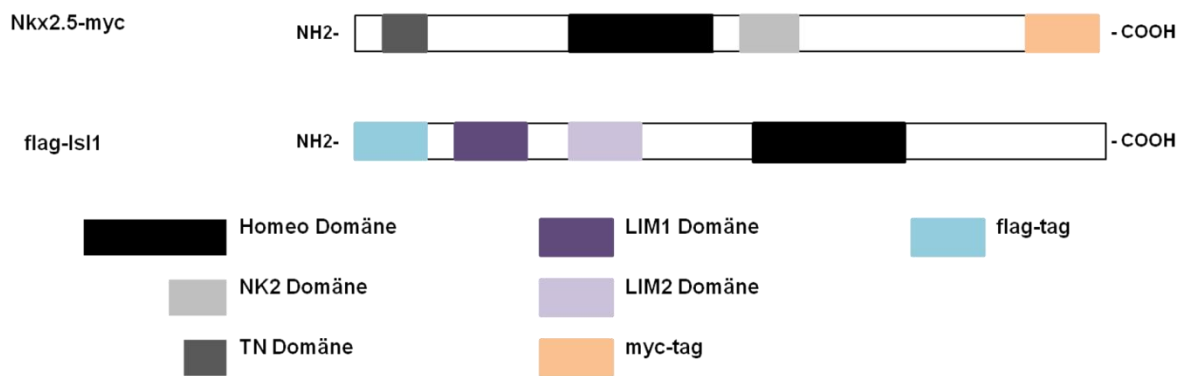
5. Ergebnisse

5.1. Interaktion von Nkx2.5 und Isl1

5.1.1. Co-Immunpräzipitation im heterologen System

Um die Frage zu beantworten, ob eine Interaktion zwischen Nkx2.5 und Isl1 prinzipiell möglich ist, wurden die Transkriptionsfaktoren zunächst gemeinsam in einem heterologen System überexprimiert. In HEK293T Zellen zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Überexpression nach Immunpräzipitation von Isl1 eine Präzipitation von Nkx2.5 stattfand. Als Kontrolle wurde eine Immunpräzipitation von Isl1 ohne Überexpression von Isl1 durchgeführt. Dieser experimentelle Ansatz zeigte keine Präzipitation von Nkx2.5. Somit konnte eine unspezifische Bindung von Nkx2.5 an den zur Immunpräzipitation verwendeten anti-Isl1 Antikörper oder die Präzipitationsbeads ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 12 (B)).

A



B

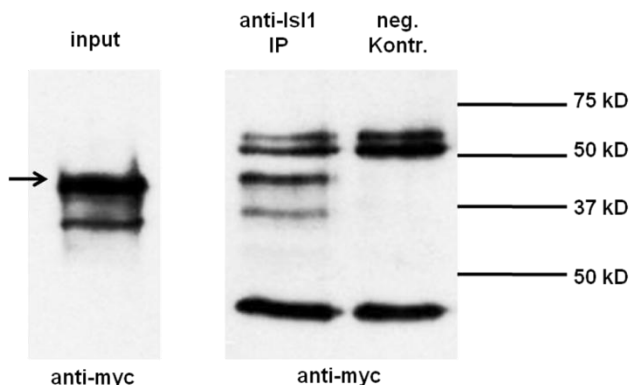


Abbildung 12 Co-Immunpräzipitation in HEK293T Zellen

In (A) kommt der schematische Aufbau der, im Immunpräzipitationsexperiment verwendeten Proteine zur Darstellung. Die Verteilung der unterschiedlichen Domänen und die verwendeten „tags“ zur Erleichterung der Identifizierung sind farblich gekennzeichnet. (B) zeigt einen Western Blot, bei dem durch Immunpräzipitation von Isl1 Nkx2.5 angereichert werden konnte. Die schwarzen Pfeile markieren die Proteinbanden. Unter den Blots ist der jeweilige zur Färbung markierte Antikörper vermerkt. Immunpräzipitation (IP), Antikörper (AK)

HEK293T Zellen exprimieren, wie alle Zelllinien, endogen zahlreiche andere Transkriptionsfaktoren, so dass durch dieses Experiment nicht unterschieden werden konnte, ob die gezeigte Interaktion direkt zwischen den beiden Faktoren stattfindet oder ob diese lediglich in einem Komplex mit anderen Faktoren gemeinsam vorliegen.

5.1.2. *In vitro* Expression, Aufreinigung und Interaktion

Zur Beantwortung der Frage, ob die im vorherigen Experiment gezeigte Komplexbildung aus Nkx2.5 und Isl1 über weitere Faktoren vermittelt wird oder ob sie direkt miteinander interagieren, wurden die beiden Faktoren Nkx2.5 und Isl1 in einem *in vitro* System exprimiert und aufgereinigt. Zum Nachweis der Aufreinigung und zur Beurteilung der Qualität wurden Coomassie-Färbungen und Western Blots durchgeführt.

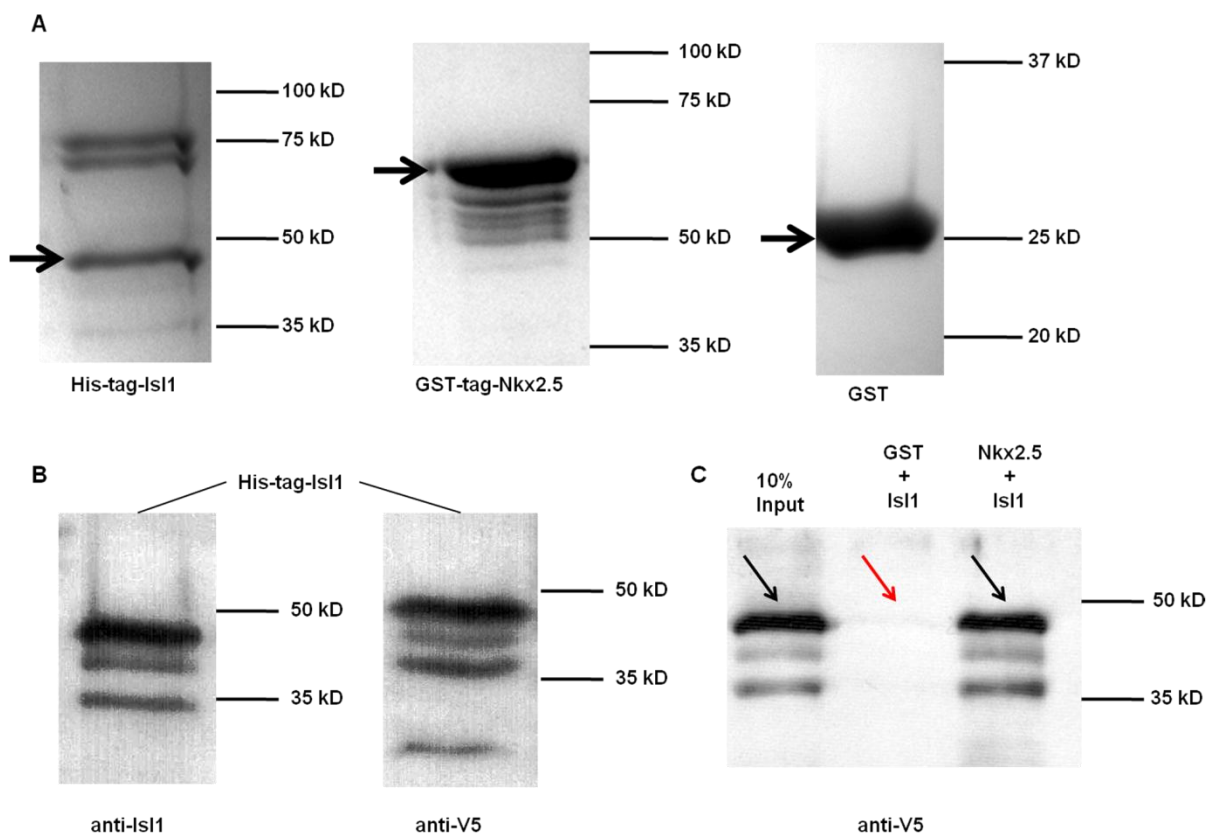


Abbildung 13 Nkx2.5 und Isl1 aus der *in vitro* Expression

In (A) sind Coomassie-Blue Färbungen der Proteine nach SDS-Elektrophorese dargestellt. Die Molekulargewichte der Banden entsprechen den jeweiligen Proteinen mit zugehörigen „tags“. (B) zeigt Western Blots des His-tag-Isl1 mit Antikörpern gegen Isl1 und Antikörpern gegen das C-terminale V5 Epitop. In (C) wird die direkte Interaktion der beiden Proteine dargestellt. Die mit Hilfe des anti-V5 Antikörpers markierte Isl1-Bande findet sich nur im Input und in der GST-tag-Nkx2.5 Fraktion. In der Kontrolle (GST) fehlt diese. Die schwarzen Pfeile markieren die Proteinbanden. Unter den Blots ist der jeweilige zur Färbung markierte Antikörper vermerkt.

His-tag-Isl1, GST-tag-Nkx2.5 und das zur Kontrolle verwendete GST wurden in ausreichender Menge und Qualität produziert (siehe Abbildung 13 (A)). Im Western Blot zeigte sich, dass das *in vitro* exprimierte His-tag-Isl1 sowohl durch den anti-Isl1 Antikörper als auch durch den Antikörper gegen das C-terminal liegende V5 Epitop identifiziert werden

konnte (siehe Abb. 13 (B)). Durch die *in vitro* Expression und Aufreinigung der Proteine wurde sichergestellt, dass bei dem anschließend durchgeführten *in vitro* Bindungs-Assay nur die beiden Proteine vorlagen und keine weiteren Faktoren an der Interaktion beteiligt sein konnten. Bei Kombination von Isl1 mit dem GST-tag-Nkx2.5 zeigt sich deutlich, dass eine Interaktion der beiden Faktoren nachweisbar war (siehe Abb. 13 (C)). Das Fehlen der Isl1-Bande bei Kombination mit dem Kontrollprotein GST demonstriert, dass die Bindung spezifisch über Nkx2.5 vermittelt wurde und keine unspezifische Bindung an den GST-tag oder die verwendeten Präzipitationsbeads stattfand.

5.1.3. Domain-Mapping mit trunkierten Nkx2.5 Mutanten

Um zu ermitteln, welche Domäne von Nkx2.5 für die eben gezeigte Interaktion mit Isl1 verantwortlich ist, wurden mehrere trunkierte Mutanten des Nkx2.5 Proteins generiert, in einem *in vitro* System exprimiert und anschließend aufgereinigt. Diese Mutanten wurden dann in einem *in vitro* Bindungs-Assay zusammen mit Isl1 verwendet. Mutante A bestand allein aus der Homeodomäne. Mutante B enthielt nur den C-Terminus des Proteins und Mutante C den N-Terminus und die Homeodomäne zusammen (siehe Abbildung 14 (A)).

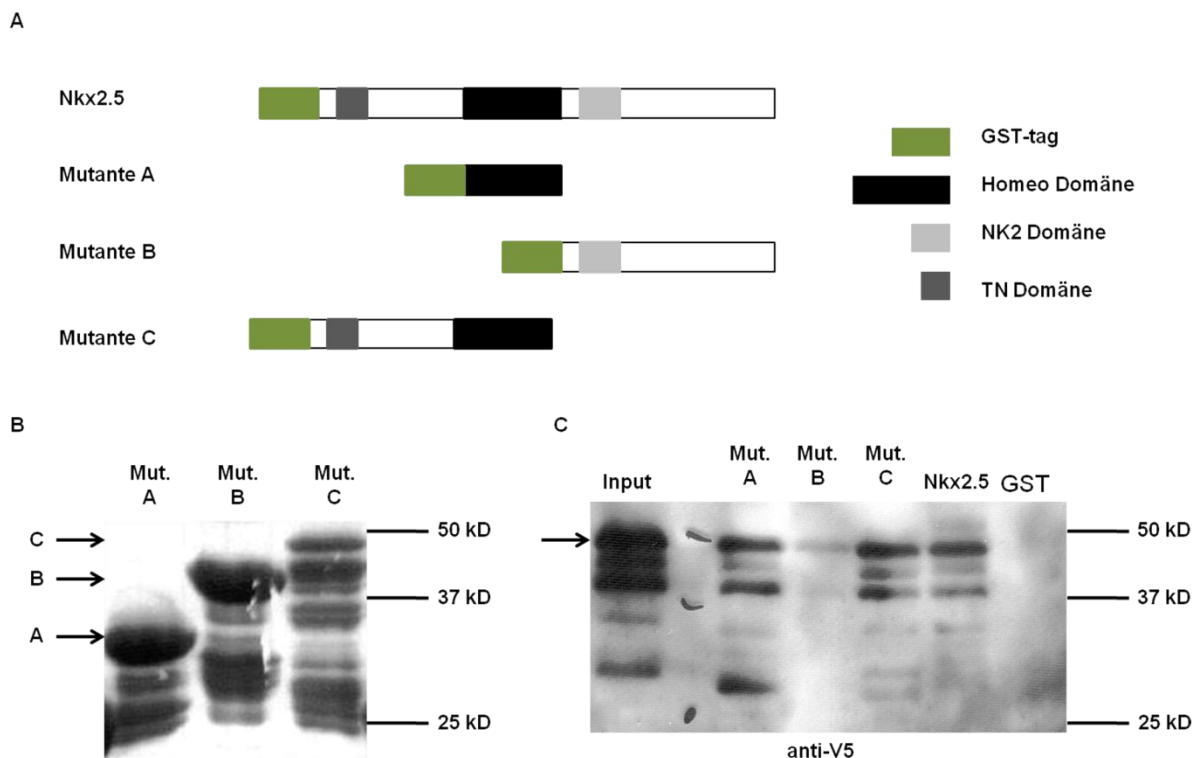


Abbildung 14 Trunkierte Mutanten von Nkx2.5 aus der *in vitro* Expression

(A) ist eine schematische Darstellung der drei verwendeten trunkierten Mutanten von Nkx2.5 und die zugehörige Verteilung der bekannten funktionellen Domänen. In (B) zeigt eine Coomassie-Färbung nach *in vitro* Expression, dass die Proteinbanden ungefähr den erwarteten Molekulargewichten der trunkierten Mutanten inklusive GST-tag entsprechen. (C) ist ein Western Blot mit anti-V5 Antikörper nach *in vitro* Bindungs-Assay mit *in vitro* hergestelltem His-tag Isl1 und zeigt die erhaltene Interaktionsfähigkeit der Mutanten A und C und deren Verlust bei Mutante B. Die fehlende Bande bei GST zeigt die Spezifität der Bindung. Die schwarzen Pfeile markieren die Proteinbanden. Unter den Blots ist der jeweilige zur Färbung markierte Antikörper vermerkt.

Die trunkierten Mutanten wurden in ausreichender Menge produziert (siehe Abbildung 14 (B)). Die Mutanten A und C, sowie Nkx2.5 in voller Länge konnten Isl1 binden. Bei Mutante B und dem Kontrollprotein GST wurde keine Interaktion nachgewiesen (siehe Abb. 14 (C)). Dies lässt den Schluss zu, dass die Interaktion von Isl1 und Nkx2.5 über die Homeodomäne von Nkx2.5 vermittelt wird. Da Mutante A, die lediglich aus der Homeodomäne besteht, ebenfalls eine Interaktion mit Isl1 zeigte, ist davon auszugehen, dass die Homeodomäne für diese Interaktion nicht nur notwendig sondern auch allein hinreichend ist, die Bindung zu vermitteln.

5.1.4. Herstellung einer Nkx2.5-HA überexprimierenden ES-Zelllinie

Bisher konnte also gezeigt werden, dass die beiden Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und Isl1 in einem heterologen Zellsystem und in einem Bindungs-Assay mit *in vitro* aufgereinigtem Protein direkt miteinander interagieren können. Diesen Nachweis auch in der Population der Isl1⁺/Nkx2.5⁺ kardialen Progenitorzellen während der embryonalen Entwicklung zu führen, ist auf Grund der geringen Zellzahl und der niedrigen Expressionslevel der Proteine schwierig. Darüber hinaus ist die Effizienz der Immunpräzipitation in ES-Zellen der Maus niedriger als im heterologen System.

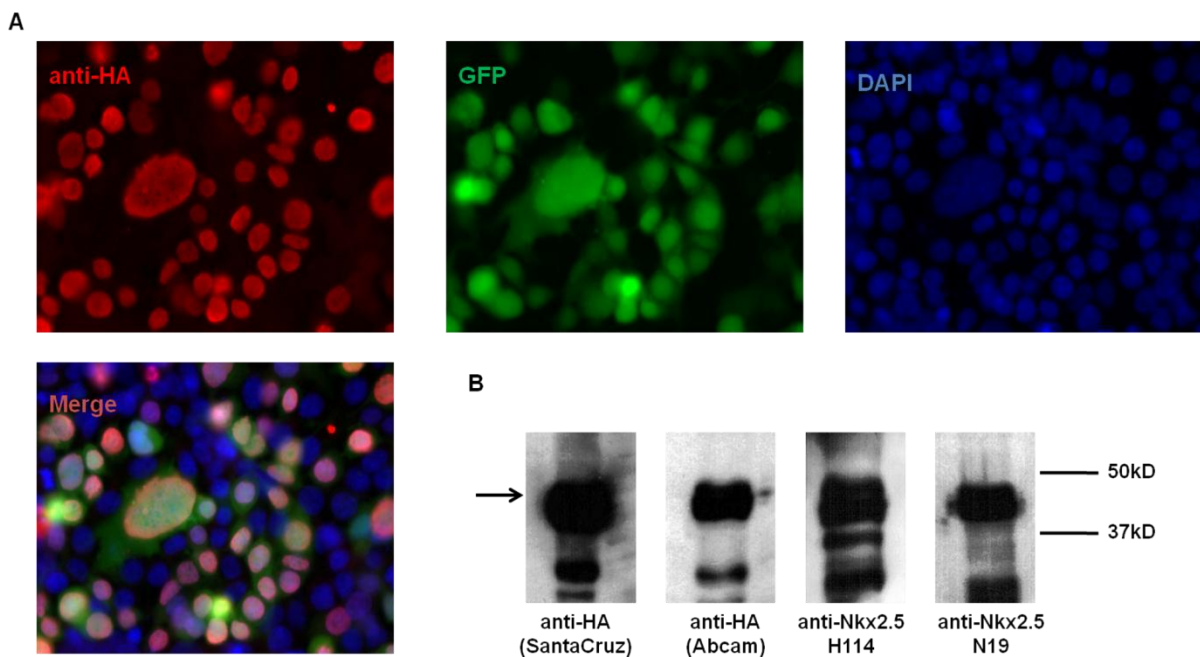


Abbildung 15 Expression von HA-tag-Nkx2.5 in HEK293T Zellen

Die Abbildung zeigt in (A) Immunfluoreszenzbilder von HEK293T Zellen, die mit pRRL.sin-18.pGK-Nkx2.5-HA IRES GFP transfiziert wurden. In Rot ist die Verteilung des HA-tags dargestellt. Grün entspricht der GFP Expression und in Blau färben sich die Kerne der Zellen. Im vierten Bild kommen die nukleäre Lokalisation und die Überlappung der Expression von HA-tag mit GFP-Expression zur Darstellung. (B) zeigt vier Western Blots mit zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen das HA-tag und zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen Nkx2.5. Das Molekulargewicht des Proteins entspricht dem von Nkx2.5. Der schwarze Pfeil markiert die Proteinbanden. Unter den Blots ist der jeweilige zur Färbung markierte Antikörper vermerkt. Grün Fluoreszierendes Protein (GFP)

Um dieser Problematik zu begegnen, wurde ein lentivirales Konstrukt zur stabilen Infektion von ES-Zellen entwickelt, welches Nkx2.5 mit einem C-terminalen Hämagglutinin-tag zur Verbesserung der Immunpräzipitationseffizienz exprimiert. Zur Infektionskontrolle und um die Zellen später mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten-Zellsortierung (FACS) einfacher aufzureinigen zu können, exprimiert das Konstrukt hinter einer internen ribosomalen Eintrittsstelle unter dem gleichen Promotor GFP. Bevor ES-Zellen mit dem Konstrukt infiziert wurden, wurde es zunächst in HEK293T Zellen auf Funktionalität überprüft. Das Konstrukt wurde in HEK293T Zellen nach Transfektion exprimiert und das produzierte Protein zeigte eine nukleäre Lokalisation (siehe Abbildung 15 (A)). Der verwendete HA-tag interferierte dementsprechend nicht mit der nukleären Lokalisationssequenz von Nkx2.5. Darüber hinaus zeigte die Überlappung des im roten Kanal markierten HA-tags mit dem GFP Signal, dass der Antikörper spezifisch Protein in den Zellen bindet, die auch GFP exprimieren (siehe Abb. 15 (A)). Das exprimierte Protein wurde durch zwei unterschiedliche anti-HA Antikörper und durch zwei unterschiedliche anti-Nkx2.5 Antikörpern spezifisch gebunden (siehe 15 (B)). Die Proteingröße des HA-tag Nkx2.5 lässt sich von endogenem Nkx2.5 auf Grund der kleinen Größe des HA-tags von lediglich neun Aminosäuren nicht unterscheiden. Da die Antikörper H114 und N19 an unterschiedlichen Epitopen des Nkx2.5 Proteins binden und der HA-tag C-terminal lokalisiert ist, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein in voller Länge exprimiert wurde.

Nachdem das lentivirale Konstrukt pRRL.sin-18.pGK-Nkx2.5-HA-IRES-GFP in HEK293T Zellen erfolgreich getestet wurde, erfolgte die Herstellung von Lentiviren. Zur Infektion wurde eine in der Arbeitsgruppe etablierte ES-Zelllinie mit einem *Isl1-NlacZ knock in* verwendet. In dieser Linie ist in einem *Isl1* Allel ein *nuclear-localizing-beta-galactosidase* Gen eingesetzt. *Isl1* exprimierende Zellen exprimieren somit auch *NlacZ* und können mit Hilfe von FDG-loading in der Fluoreszenz-aktivierten-Zellsortierung erkannt und aufgereinigt werden. Darüber hinaus können *Isl1* positive Zellen nach Fixierung angefärbt werden. Diese Zelllinie wurde mit den Lentiviren infiziert, kultiviert und mit Hilfe der FACS nach GFP Positivität sortiert. Nach der Sortierung wurden zwei Zelllinien Nkx2.5-HA J und Nkx2.5-HA A ausgewählt. Zur Charakterisierung der neu geschaffenen Zelllinien wurde das Transkriptionsprofil von vier Faktoren, die in der kardialen Entwicklung eine wichtige Rolle spielen, im Verlauf der Differenzierung der Zellen analysiert. *Nkx2.5* mRNA wurde von Tag 0 an stark überexprimiert. Die bei der Akquirierung der Daten verwendete Taqman® Probe unterschied dabei nicht zwischen endogen produzierter *Nkx2.5* mRNA und *Nkx2.5* mRNA, die von der Überexpression des lentiviralen Konstrukts stammte (siehe Abbildung 16). Des Weiteren war ein Effekt auf andere Gene, die bei der kardialen Entwicklung eine Rolle spielen, nachweisbar.

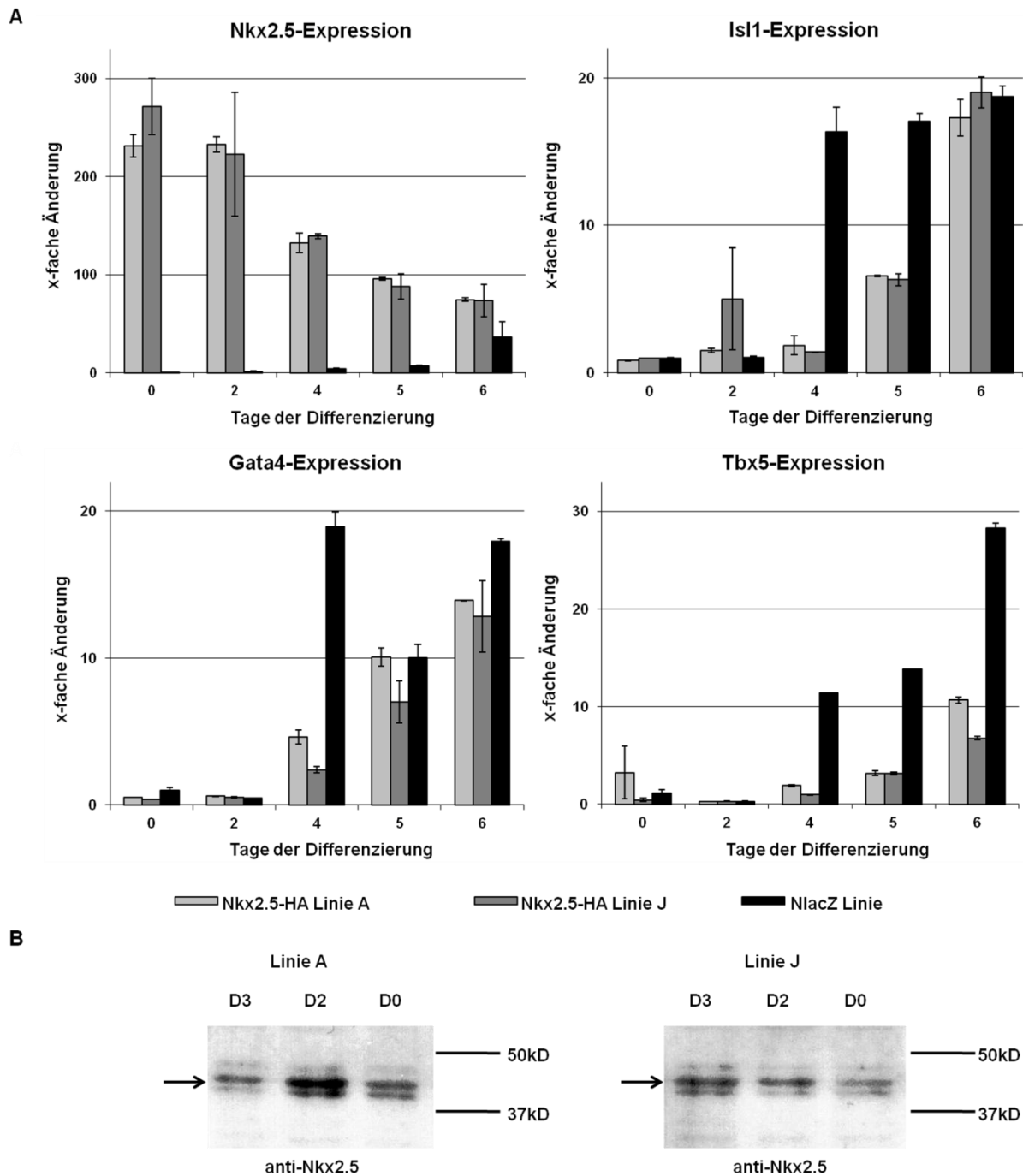


Abbildung 16 Charakterisierung der Nkx2.5-HA überexprimierenden embryonalen Stammzelllinie

(A) zeigt durch RT-PCR gewonnene Daten zum Expressionslevel von vier verschiedenen Genen im Verlauf der Differenzierung im EB-System. In (B) kommen Western Blots von nukleären Extrakten, welche zu verschiedenen Zeitpunkten der EB-Differenzierung gewonnen wurden, zur Darstellung. Die schwarzen Pfeile markieren die Proteinbanden. Unter den Blots ist der jeweilige zur Färbung markierte Antikörper vermerkt.

Die Expression von Isl1, die in den Kontrollzellen ungefähr um Tag 4 der EB-Differenzierung beginnt, wurde supprimiert. Erst nach 6 Tagen EB-Differenzierung erreichte die Isl1-Expression etwa normale Werte. Ähnliches war bei der Gata4- und Tbx5-Expression zu beobachten, wobei jedoch die Tbx5-Expression an Tag 6 der EB-Differenzierung immer noch deutlich unter den normalen Werten lag und bei der Gata4-Expression bereits an Tag 4 der

EB-Differenzierung kein Unterschied mehr zur Kontrollzelllinie auszumachen war (siehe Abb. 16).

Zum Proteinnachweis des überexprimierten Konstrukts wurden nukleäre Extrakte an unterschiedlichen Zeitpunkten der EB-Differenzierung untersucht. Trotz der auf mRNA-Level deutlichen Überexpression des lentiviralen Konstrukts (siehe Abb. 16 (A)) konnte im Western Blot mit Antikörpern, die gegen das HA-tag gerichtet sind, kein Protein nachgewiesen werden. Unter Verwendung eines anti-Nkx2.5 Antikörpers konnten geringe Mengen des überexprimierten Proteins nachgewiesen werden (siehe Abb. 16 (B)). Da eine Erkennung des Proteins mit gegen das HA-tag gerichteten Antikörpern bereits im Western Blot nicht möglich war, wurden keine Immunpräzipitationsexperimente mit dieser Zelllinie durchgeführt werden.

5.1.5. Co-Immunpräzipitation in ES-Zellen der Maus

Die im vorherigen Abschnitt beschriebene ES-Zelllinie konnte aus den genannten Gründen nicht für Immunpräzipitationsexperimente verwendet werden. Statt dessen wurden die Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) unter Inkaufnahme einer niedrigeren Immunpräzipitationseffizienz in einer bereits in der Arbeitsgruppe etablierten ES-Zelllinie durchgeführt, die mit Hilfe von zwei lentiviralen Konstrukten Nkx2.5 und Isl1 unter dem pGK Promotor exprimiert.

In dieser Zelllinie konnte durch Immunpräzipitation von Isl1 kein Nkx2.5 präzipitiert werden (siehe Abbildung 17 (A)). Zur Durchführung des umgekehrten Experiments, also der Immunpräzipitation von Nkx2.5 mit anschließendem Nachweis von Isl1, wurden zunächst die optimalen Immunpräzipitationsbedingungen bei Verwendung der verschiedenen anti-Nkx2.5 Antikörper durch eine Testreihe mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen identifiziert. Es zeigte sich, dass 6µg des Antikörper H114 die besten Resultate ergab (siehe Abb. 17 (B)). Bei der unter diesen Bedingungen durchgeführten Immunpräzipitation von Nkx2.5 konnte keine Co-Präzipitation von Isl1 nachgewiesen werden (siehe Abb. 17 (C)). Diese Experimente legen nahe, dass die Interaktion von Nkx2.5 und Isl1 zumindest in der ES-Zelllinie, die beide Faktoren überexprimiert, nicht stattfindet. Um der Problematik zu begegnen, dass diese Interaktion nicht nachweisbar war, da es sich um undifferenzierte Zellen handelte, wurde die Immunpräzipitation von Nkx2.5 in ES-Zellen durchgeführt, die sich an Tag 3 der EB-Differenzierung befanden. In diesem Experiment wurde durch Immunpräzipitation von Nkx2.5 ebenfalls kein Isl1 präzipitiert, so dass auch in differenzierenden ES-Zellen die Interaktion nicht nachgewiesen werden konnte.

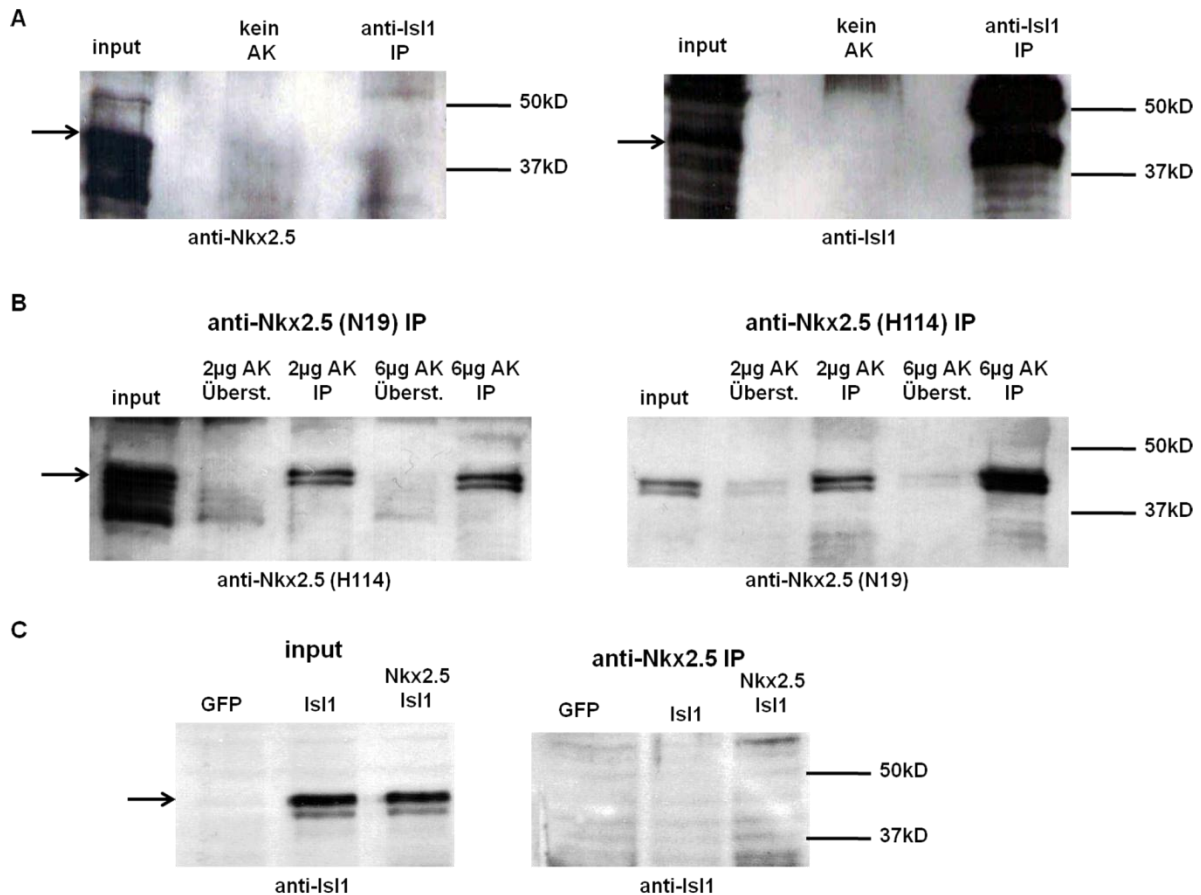


Abbildung 17 Immunpräzipitationen in ES-Zellen der Maus

(A) zeigt Western Blots nach Immunpräzipitation mit anti-Isl1 Antikörper. Die Blots zeigen trotz erfolgreicher Immunpräzipitation von Isl1 keine Co-Immunpräzipitation von Nkx2.5. Die Western Blots in (B) stellen die unterschiedliche IP-Effizienz von Nkx2.5 je nach verwendetem anti-Nkx2.5 Antikörper und Konzentration dar. (C) zeigt Western Blots einer Immunpräzipitation mit anti-Nkx2.5 Antikörper, bei der keine Co-Immunpräzipitation von Isl1 nachgewiesen werden konnte. In (A) und (B) wurden Extrakte aus Tag 0 ES-Zellen verwendet. Bei (C) wurden Extrakte aus ES-Zellen an Tag 3 der EB-Differenzierung eingesetzt. Die schwarzen Pfeile markieren die Proteinbanden. Unter den Blots ist der jeweilige zur Färbung markierte Antikörper vermerkt. Antikörper (AK), Immunpräzipitation (IP), Überstand (Überst.)

5.2. Gemeinsame Regulation von Genen der kardialen Entwicklung

Wie im ersten Ergebnisteil gezeigt, können Nkx2.5 und Isl1 im heterologen System direkt miteinander interagieren und auf diese Weise in einem transkriptionellen Komplex zusammenarbeiten. Um die mögliche Funktion dieser Interaktion bei der Spezifizierung und Differenzierung kardialer Progenitorzellen zu untersuchen, wurden Gene ausgewählt, die potentielle Kandidaten für eine gemeinsame Regulation durch diese beiden Transkriptionsfaktoren sind, und mit Hilfe eines Luciferase-Assay die Funktionalität des Enhancer-Elements überprüft. Durch eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) in Isl1 überexprimierenden ES-Zellen wurden potentielle Zielgene von Isl1 identifiziert. Die ChIP ist ein Verfahren, bei dem Zellen zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt fixiert werden und die nukleäre Fraktion aufgereinigt wird. Anschließend wird mit Hilfe von Ultraschall die

genomische DNA in kleine Fragmente zerteilt und eine Immunpräzipitation mit einem gegen den Transkriptionsfaktor gerichteten Antikörper durchgeführt. Auf diese Weise werden DNA-Fragmente, die zum Zeitpunkt der Fixierung an den Transkriptionsfaktor gebunden waren, aufgereinigt und können durch Sequenzierung als potentielle regulatorische Elemente von in der Nähe befindlichen Gene identifiziert werden. Das Transkriptionsprofil dieser Gene in kardialen Progenitorzellen wurde im Anschluss mit Hilfe eines RT-PCR-Arrays in *Isl1*, *Nkx2.5* und *Nkx2.5/Isl1* überexprimierenden Zelllinien untersucht. Diese Daten wurden gewonnen, indem *Isl1*, *Nkx2.5* und *Nkx2.5/Isl1* überexprimierende ES-Zelllinien im EB-System differenziert und *Isl1* positive kardiale Progenitorzellen mit Hilfe von FACS aufgereinigt wurden (unveröffentlichte Daten aus unserem Labor). Gene, die in *Isl1*, *Nkx2.5* und in doppelt-überexprimierenden Zellen unterschiedliche Expressionsmuster zeigten, wurden als potentielle Kandidaten der gemeinsamen Regulation durch die beiden Transkriptionsfaktoren eingestuft. Exemplarisch wurde so ein Enhancer-Element im Bereich des *insulin-like growth factor binding protein 5 (Igfbp5)*, welches im ersten Intron des Gens liegt, ausgewählt und im Folgenden näher untersucht.

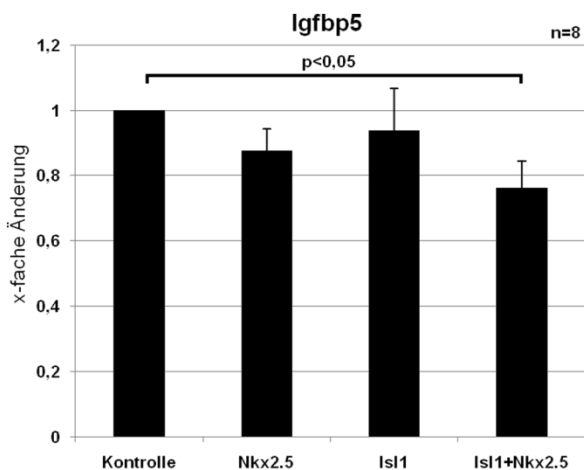


Abbildung 18 Luciferase-Assays potentieller Zielgene gemeinsamer Regulation durch *Nkx2.5* und *Isl1*

In der Abbildung kommt die relative Luciferaseaktivität eines pGL4.24 Vektors mit dem *Igfbp5* Enhancer-Element zur Darstellung. Die Überexpression von *Nkx2.5* gemeinsam mit *Isl1* führt zu einer signifikanten Abnahme der Luciferase Aktivität. *n* gibt die Anzahl der unabhängigen Experimente an. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler der jeweiligen Gruppe. Die Kontrolle wurde auf 1 normiert. Der *p*-Wert wurde mittels One-Sample-T-Test ermittelt.

Wie der Assay zeigte, führte die gleichzeitige Überexpression beider Faktoren zu einer signifikanten Reduktion der Luciferase Aktivität (siehe Abbildung 18). Die Überexpression der einzelnen Faktoren zeigte keine signifikante Änderung, was für einen synergistischen Effekt der beiden Transkriptionsfaktoren an diesem Enhancer-Element spricht. Ob *Nkx2.5* und *Isl1* an diesem Enhancer-Element als transkriptioneller Komplex agieren oder ob die beiden Faktoren getrennt voneinander an das Enhancer-Element binden, lässt sich durch dieses Experiment nicht beurteilen.

5.3. Direktes Abschalten der *Isl1*-Expression durch *Nkx2.5*

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die gemeinsame Funktion der beiden Transkriptionsfaktoren in kardialen Progenitorzellen des sekundären Herzfeldes untersucht. Diese Phase der gleichzeitigen Expression beider Faktoren scheint für die Initiierung des kardialen Programms in diesen Zellen essentiell zu sein. Bei der anschließenden Entwicklung zu adulten Kardiomyozyten wird die *Isl1*-Expression eingestellt, während *Nkx2.5* weiter aktiv bleibt. Im Folgenden wurde ein Mechanismus aufgedeckt, der dieser Abnahme der *Isl1*-Expression im Verlauf der Differenzierung zu Grunde liegen könnte. Dazu wurde zunächst ein DNA-Abschnitt 50 kb oberhalb bis 50 kb unterhalb des *Isl1* Gens auf das Vorkommen von NKE-Sites (5'-AAGTG-3'), einem konservierten Bindungsmotiv für *Nkx2.5*, hin untersucht (C. Y. Chen & Schwartz 1995; Molkentin et al. 2000). 4 kb oberhalb des *Isl1*-Gens wurde ein knapp 4 kb langer DNA-Abschnitt ausgemacht, der drei solcher möglicher Bindungsstellen enthält (siehe Abbildung 19). Darüber hinaus findet sich innerhalb dieses Abschnitts in unmittelbarer Nachbarschaft zu den NKE-Sites auch ein *Isl1*-Bindungsmotiv (5'-CAATG-3') (Karlsson et al. 1990). Die Nomenklatur erfolgte der Reihe nach, mit der am weitesten am 5'-Ende liegenden Site als Nummer 1.

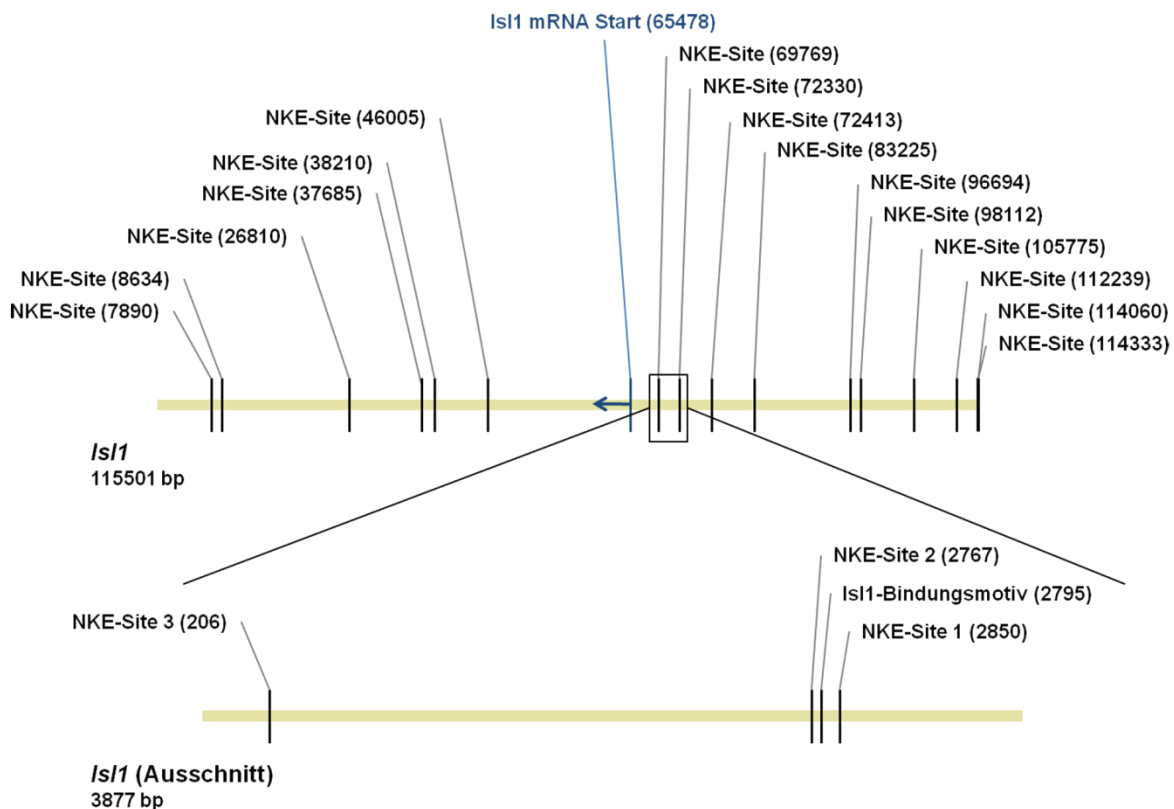


Abbildung 19 *Nkx2.5* und *Isl1* Bindungsstellen im Bereich des *Isl1* Lokus

Die Abbildung zeigt die NKE-Sites und *Isl1*-Bindungsmotive in einer Region 50 kb downstream bis 50 kb upstream des *Isl1*-Gens. Ein Abschnitt etwa 4 kb upstream des Promotors des *Isl1*-Gens mit einer Häufung solcher Bindungsmotive, der für die weiteren Experimente ausgewählt wurde, ist heraus vergrößert dargestellt.

Der ausgewählte DNA-Abschnitt wurde hinsichtlich der evolutionären Konservierung der DNA-Sequenz untersucht. Dazu wurde der ECR-Browser verwendet (Ovcharenko et al. 2004). Die Bindungsstellen enthaltenden Abschnitte lagen in Regionen, die zu etwa 65% in verschiedenen Spezies konserviert waren (siehe Abbildung 20 (A)). Beim Vergleich mit humaner Sequenz zeigte sich, dass das Isl1-Bindungsmotiv zu 100% konserviert war. Bei den drei NKE-Sites waren im Vergleich jeweils zwei Basenpaare im Bindungsmotiv verändert (siehe Abb. 20 (B)).

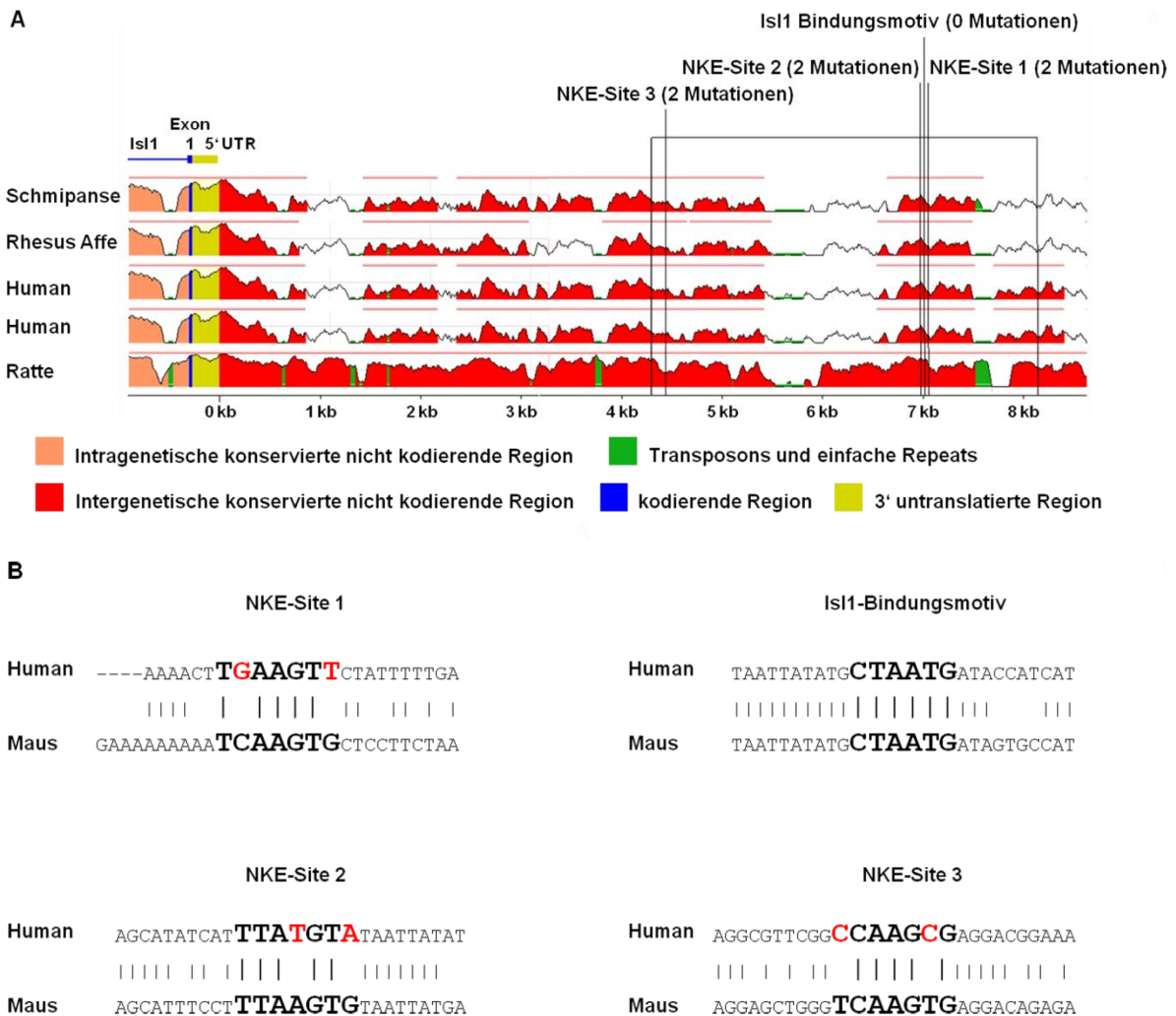
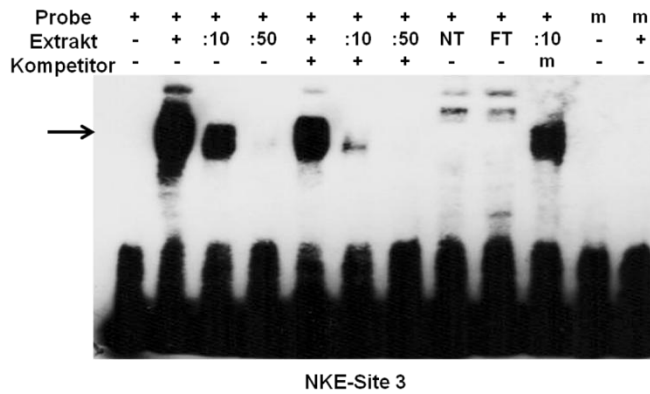
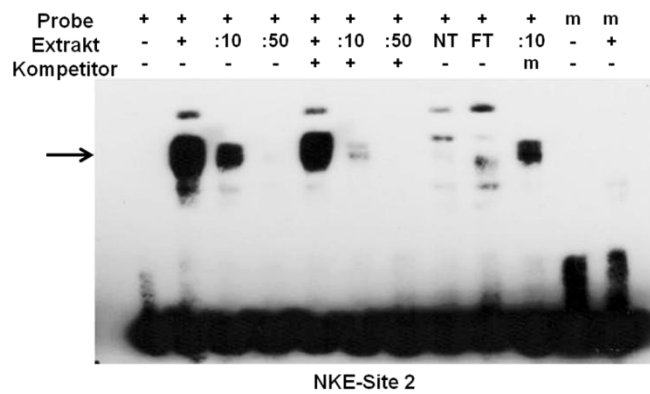
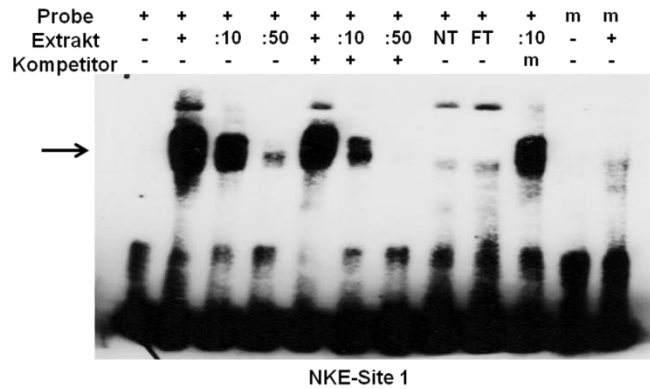


Abbildung 20 Konservierte Abschnitte oberhalb des *Isl1*-Promotors

Die Abbildung zeigt in (A) konservierte DNA-Elemente oberhalb des *Isl1*-Promotors. Die Farbkodierung ist der Legende zu entnehmen. Darüber hinaus ist die Position des Enhancer-Elements und der verschiedenen untersuchten Bindungsstellen wiedergegeben. In (B) werden die Sequenzen der Bindungsmotive im Genom der Maus mit den entsprechenden Sequenzen im menschlichen Genom verglichen (nach Ovcharenko et al. 2004).

Um zu zeigen, dass diese möglichen Bindungsstellen, Nkx2.5 beziehungsweise Isl1 binden, wurden Electromobility-Shift-Assays durchgeführt. Die dazu verwendeten Oligonukleotide hatten eine Länge von etwa 25 bp und umfassten die jeweiligen NKE-Sites beziehungsweise das Isl1-Bindungsmotiv.

A



B

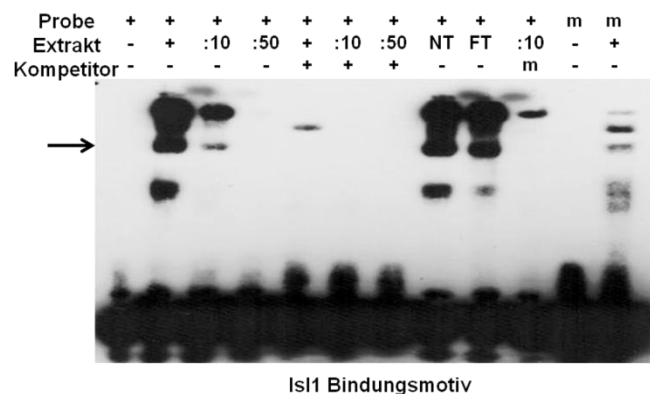


Abbildung 21 Electromobility-Shift-Assays (EMSA) der möglichen Bindungsstellen im *Is1* Lokus

(A) zeigt Electromobility-Shift-Assays (EMSA) mit Oligonukleotiden, die die NKE-Sites aus dem in Abb. 20 beschriebenen Enhancer-Element etwa 4 kb upstream des Promotors des *Is1*-Gens liegen. In (B) kommt ein Electromobility-Shift-Assay (EMSA) mit Oligonukleotiden, die das IsI1 Bindungsmotiv, welches in demselben Enhancer-Element liegt, enthalten, zur Darstellung. Extrakt von nicht transfizierten Zellen (NT); Extrakt von Zellen, die den „falschen“ Transkriptionsfaktor überexprimiert haben (FT).

Bei den drei ausgewählten NKE-Sites zeigte sich nach Zugabe von Extrakt aus Nkx2.5 überexprimierenden Zellen ein deutlicher DNA-Shift. Dies entspricht der Bindung des Transkriptionsfaktors an die verwendeten Oligonukleotide. Diese Bindung konnte durch Zugabe von unmarkierten Oligonukleotiden antagonisiert werden und fand nach Mutation der NKE-Site nicht mehr statt. Dies lässt auf eine spezifische Bindung des Transkriptionsfaktors schließen (siehe Abbildung 21 (A)). Das Isl1-Bindungsmotiv zeigte nach Zugabe von Extrakt aus Isl1 überexprimierenden Zellen ebenfalls einen DNA-Shift, der wiederum einer Bindung des Faktors an die Oligonukleotide entsprach. Auch hier konnte die Bindung durch Zugabe von unmarkierten Oligonukleotiden antagonisiert werden und fand nach Mutation des Bindungsmotivs nicht mehr statt (siehe Abb. 21 (B)). Ein DNA-Shift war jedoch auch nach Zugabe von Extrakt aus Zellen, die nicht Isl1 exprimierten, zu sehen. Dies lässt sich am ehesten aus der Tatsache erklären, dass HEK293T Zellen in geringem Maße eine endogene Isl1-Expression aufweisen. Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl Nkx2.5 als auch Isl1 an die Enhancer-Region 4 kb oberhalb des *Isl1*-Lokus binden kann.

Um nun die Funktionalität des ausgewählten Enhancer-Elements zu untersuchen, wurde der in Abbildung 19 dargestellte, etwa 4 kb große DNA-Abschnitt in einem Luciferase-Assay untersucht.

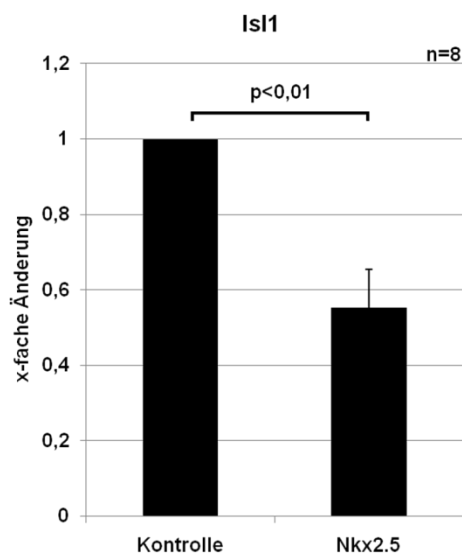


Abbildung 22 Luciferase-Assay eines Enhancer-Elements in der Nähe des *Isl1*-Lokus

In der Abbildung kommt die relative Luciferase Aktivität eines pGL4.24 Vektors mit einem Enhancer-Element des *Isl1*-Gens bei Überexpression von Nkx2.5 zur Darstellung. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der Aktivität. *n* gibt die Anzahl der unabhängigen Experimente an. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler der jeweiligen Gruppe. Die Kontrolle wurde auf 1 normiert. Der p-Wert wurde mittels One-Sample-T-Test ermittelt.

In diesem Assay führte die Anwesenheit von Nkx2.5 an einem Luciferase-Vektor, der das entsprechende Enhancer-Element enthielt, zu einer signifikante Reduktion der Luciferase-Aktivität (siehe Abbildung 22). Übertragen auf die Isl1⁺ Progenitorzelle bedeutet dies, dass

eine erhöhte Expression von Nkx2.5 zu einer Reduktion der Isl1-Expression führt. Wie die Daten zeigen, liegt diesem Abschalten der Isl1-Expression ein direkter Mechanismus zu Grunde: Nkx2.5 bindet an DNA-Elemente in einer Region etwa 4 kb oberhalb des genomischen Lokus von *Isl1* und übt dort einen direkten, transkriptionseinhibierenden Effekt aus, der zur Abschaltung der Isl1-Expression führt. Da die verantwortliche Enhancer-Region auch potentiell funktionelle Isl1-Bindungsmotive enthält, könnte daran auch Isl1 selber im Sinne einer Auto-Regulation beteiligt sein.

6. Diskussion

Die Proliferation und Differenzierung $Isl1^+$ kardialer Progenitorzellen im sekundären Herzfeld ist einer der entscheidenden Schritte zur Entstehung eines gesunden Herzens. Herzfehlbildungen, die vor allem den rechten Ventrikel und den Ausflusstrakt betreffen, wie beispielsweise die Tetralogie von Fallot (TOF), der *double outlet right ventricle* (DORV) oder die Transposition der großen Arterien (TGA) haben ihren Ursprung in Defekten der Entwicklung der sich dort befindenden Vorläuferpopulationen (Nakajima 2010). Darüber hinaus sind diese Zellen nicht nur im Laufe der embryonalen Entwicklung sondern auch noch im neonatalen Herzen nachweisbar (Laugwitz et al. 2005). Ihre genaue Rolle bezüglich der Regenerationsfähigkeit des Herzens *in vivo* ist zwar nicht geklärt, es konnte in Experimenten jedoch gezeigt werden, dass diese Zellen in alle Gewebe des Herzens differenzieren können. Damit stellen sie multipotente kardiale Vorläuferzellen dar, die als eine potentielle Quelle für eine regenerative Zelltherapie gelten (Moretti et al. 2006). Um zum Einen in Zukunft diese Zellen gefahrlos in der Therapie von Menschen mit Herzerkrankungen einsetzen zu können und zum Anderen die Ursachen der beschriebenen Fehlbildungen aufzuklären, ist es essentiell, die Mechanismen, die die Entstehung und Differenzierung dieser Zellen lenken, genau zu kennen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, die Rolle, die der Transkriptionsfaktor $Isl1$ bei diesen Prozessen spielt, besser zu verstehen und seine Aufgabe im regulatorischen Netzwerk der kardialen Progenitorzelle klarer zu definieren.

6.1. Interaktion von $Nkx2.5$ mit $Isl1$

$Nkx2.5$ ist einer der zentralen Faktoren bei der Entstehung von Kardiomyozyten aus undifferenzierten Vorläuferzellen. Um diese Funktion zu erfüllen, interagiert $Nkx2.5$ unter anderem mit zahlreichen anderen Proteinen, die bei der Herzentwicklung von Bedeutung sind wie beispielsweise $Gata4$, serum response factor (Srf), $Tbx-5$, $Tbx-2$, $dHand/Hand2$, $Foxh1$ und dem LIM-Domäne-Protein Cl (Akazawa & Komuro 2005). Basierend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit reiht sich nun auch der Transkriptionsfaktor $Isl1$ in diese Liste ein. Darüber hinaus wird gezeigt, dass diese Interaktion zwischen $Isl1$ und $Nkx2.5$ direkt stattfindet und ohne Beteiligung durch weitere Proteine auskommt.

Für die meisten der beschriebenen Interaktionen von $Nkx2.5$ mit anderen Faktoren der kardialen Entwicklung wie $Gata4$, $Tbx-5$ und dem LIM-Domäne-Protein Cl konnte die Homeodomäne von $Nkx2.5$ als die zur Bindung essentielle Struktur des Proteins identifiziert werden (Akazawa & Komuro 2005). $Isl1$ bindet ebenfalls über diese Domäne an $Nkx2.5$ und kann dadurch die DNA-Bindung von $Nkx2.5$ oder die dabei stattfindende Dimerisierung des Proteins beeinflussen. Auf diese Weise wird die Aktivität von $Nkx2.5$ an den verschiedenen

regulatorischen Elementen positiv oder negativ beeinflusst. Es ist jedoch kritisch anzumerken, dass der Interaktionsnachweis in ES-Zellen der Maus in unseren Experimenten nicht gelang. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass aus technischen Gründen nicht die eigentliche Zielzelle, also die *Isl1*⁺ Progenitorzelle, kurz vor Beginn der Differenzierung untersucht wurde, sondern eine *Nkx2.5* und *Isl1* überexprimierende Linie gewählt wurde. Obwohl die *in vitro* Bindungs-Assays zeigen, dass die beiden Transkriptionsfaktoren direkt miteinander interagieren, schließt das nicht aus, dass in ES-Zellen andere Faktoren für die Interaktion nötig sind und diese Faktoren in dieser Zelllinie zu den gewählten Zeitpunkten nicht in ausreichender Menge vorlagen. Darüber hinaus ist die geeignete Differenzierungsdauer, um dem physiologischen Zeitpunkt des Auftretens *Isl1*⁺ Progenitorzellen nahe zu kommen, schwierig zu wählen, da diese Zellen ein anderes Differenzierungsverhalten zeigen als Stammzellen, die keinen dieser Faktoren überexprimieren. Des Weiteren legen die Experimente mit dem HA-tag *Nkx2.5* nahe, dass sich die posttranskriptionellen oder posttranslationalen Modifikationen an überexprimiertem *Nkx2.5* in ES-Zellen von denen in anderen Zellsystemen unterscheiden. In ES-Zellen konnte das in HEK293T Zellen noch vorhandene HA-tag bei Überexpression nicht detektiert werden. Das bedeutet, dass das HA-tag entweder auf mRNA- beziehungsweise Protein-Ebene abgebaut wurde oder die dreidimensionale Struktur des exprimierten Proteins den Zugang des Antikörpers zum HA-tag unmöglich macht. Eine solche Faltung oder Modifikation könnte dazu führen, dass die Interaktion der Proteine gestört wird. Ob dies jedoch durch die Überexpression des Proteins bedingt ist oder ein physiologischer Mechanismus zu Grunde liegt, kann mit den vorliegenden Daten nicht beurteilt werden. Der fehlende Interaktionsnachweis in ES-Zellen schließt also eine Interaktion der beiden Faktoren *in vivo* nicht aus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Isl1* direkt mit *Nkx2.5* interagieren kann und diese Interaktion durch die Homeodomäne von *Nkx2.5* vermittelt wird.

6.2. Gemeinsame Regulation von Genen der kardialen Entwicklung

An der Kontrolle der Differenzierung von *Isl1*⁺ Progenitorzellen sind eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren beteiligt, von denen einige aus anderen Bereichen der embryonalen Entwicklung bekannt sind. Das in dieser Arbeit exemplarisch untersuchte Gen *insulin like growth factor binding protein 5 (Igfbp5)* wurde erst kürzlich mit der Kardiogenese in Verbindung gebracht. Durch den Vergleich der mRNA Profile von undifferenzierten ES-Zellen mit *Nkx2.5*⁺ kardialen Vorläuferzellen konnte eine Änderung des Expressionsverhaltens dieses Gens im Lauf der Herzentwicklung aufgezeigt werden. *In situ* Hybridisierungen konnten darüber hinaus darstellen, dass die Expression von *Igfbp5*

zunächst in der kardiogenen Zone und später in der Entwicklung von Strukturen lokalisiert ist, die dem sekundären Herzfeld zuzuordnen sind (Miller et al. 2008).

Über die genaue Rolle dieses Proteins bei der Entwicklung des Herzens und der Entstehung von Kardiomyozyten ist nur wenig bekannt. Auch die Regulation dieses Proteins durch andere Faktoren ist kaum erforscht. In *Nkx2.5 knock-out* Experimenten konnte ein Fehlen des Abschaltens von *Igfbp5* in kardialen Progenitorzellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde es in kardialen Strukturen exprimiert, in denen es normalerweise nicht vorhanden ist (Prall et al. 2007). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von *Igfbp5* der Kontrolle von *Nkx2.5* unterliegt. Bei dem in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten *Isl1* ChIP Experiment wurde außerdem ein Enhancer-Element im ersten Intron des *Igfbp5* Gens entdeckt. Dies bedeutet, dass das *Igfbp5* Gen nicht nur durch *Nkx2.5* reguliert wird sondern auch *Isl1* an der Regulation beteiligt ist.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, üben beide Faktoren alleine keinen klaren Effekt an dem untersuchten Enhancer-Element aus. Als Trend zeigt sich eine leichte Abnahme der Expression bei der Überexpression von *Nkx2.5*. Durch die gleichzeitige Expression beider Faktoren wird dieser Effekt allerdings deutlich verstärkt und erreicht statistische Signifikanz. Daraus ergibt sich, dass *Nkx2.5* und *Isl1* durch gemeinsame Wirkung an dem untersuchten Enhancer-Element die Aktivität von *Igfbp5* regulieren und der Effekt von *Nkx2.5* durch die Anwesenheit von *Isl1* verstärkt wird. Diese Daten decken sich mit den bereits erwähnten Änderungen des Expressionsmusters in *Nkx2.5 knock-out* Embryonen (Prall et al. 2007). Darüber hinaus zeigen in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte qRT-PCR Arrays ebenso eine Abnahme der Expression von *Igfbp5* bei Überexpression von *Nkx2.5*, die sich bei gleichzeitiger Überexpression von *Nkx2.5* und *Isl1* noch weiter verstärkt (unveröffentlichte Daten).

Interessanterweise ist *Igfbp5* in Zellen, die physiologische Level von *Nkx2.5* exprimieren wie die Zellen der kardiogenen Zonen und des Ausflustrakts, nachweisbar. Daraus lässt sich schließen, dass *Nkx2.5 in vivo* alleine nicht in der Lage ist, die Aktivität von *Igfbp5* zu supprimieren. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass erst die gemeinsame Regulation durch Anwesenheit von *Isl1* und *Nkx2.5* in den kardialen Progenitorzellen eine effektive Suppression von *Igfbp5* ermöglicht. Die biologische Funktion dieser Regulation und die Rolle von *Igfbp5* in der Herzentwicklung bleiben vorerst unklar. In anderen Geweben, wie beispielsweise Knochen und Drüsengewebe der Brust, wird *Igfbp5* häufig mit Proliferation, Migration und Apoptose in Verbindung gebracht (M. R. Schneider et al. 2002). Dies sind Prozesse, die vor allem in der frühen Entwicklungsphase des Herzens, zu der auch die Expansion und Migration der *Isl1*⁺ Progenitorzellen gehört, entscheidend

sind. Es ist also möglich, dass durch das gemeinsame Abschalten von *Igfbp5* durch *Nkx2.5* und *Isl1* in den kardialen Progenitorzellen die Proliferation und Migration dieser Zellen beeinflusst wird.

Darüber hinaus spielt *Igfbp5* eine etablierte Rolle bei der Entwicklung der kraniofazialen Muskulatur. Neueste Erkenntnisse auf diesem Gebiet haben gezeigt, dass die Entwicklung der kraniofazialen Muskulatur und die Entwicklung des Herzens keine streng voneinander getrennten Prozesse sind, sondern aus gemeinsamen Vorläuferpopulationen entstehen, die in Lokalisation und Expressionsverhalten sehr ähnlich sind. Auch *Isl1* ist bei beiden Entwicklungsprozessen beteiligt (Kelly 2010). Dies bestärkt die Annahme, dass *Igfbp5* auch bei der Spezifizierung und Differenzierung des sekundären Herzfeldes beteiligt ist und eröffnet umgekehrt die Möglichkeit, dass der oben beschriebene Mechanismus nicht nur bei der Herzentwicklung zum Tragen kommt sondern auch bei der Entstehung von Skelettmuskulatur im kraniofazialen Bereich von Bedeutung ist.

6.3. Direktes Abschalten der *Isl1*-Expression durch *Nkx2.5*

Das Abschalten von *Isl1* in kardialen Progenitorzellen des sekundären Herzfeldes bei der Differenzierung zu Kardiomyozyten ist ein Prozess, der in der Literatur bereits häufig beschrieben wurde. Während die Vorläuferzellen, die sich noch posterior des Herzens befinden, *Isl1* exprimieren, verlieren diese Zellen, sobald sie die spätere Ventrikelregion erreichen, dieses Signal. Auch *in vitro* ist dieses Phänomen nachvollziehbar. Bei der Differenzierung von Herzmuskelzellen aus multipotenten kardialen Vorläuferzellen exprimieren diese zunächst die Faktoren *Nkx2.5*, *Flk1* und *Isl1*. Im Laufe der weiteren Entwicklung dieser Zellen wird *Isl1* abgeschaltet und ist in adulten Kardiomyozyten im Gegensatz zu *Nkx2.5* nicht mehr nachweisbar (Moretti et al. 2006). Bei der *in vitro* Differenzierung von *Isl1*⁺ positiven Zellen aus dem fetalen Herzen des Menschen und der Maus ist der gleiche Prozess zu beobachten (Laugwitz et al. 2005). Die molekularen Mechanismen, die hinter diesem Vorgang stehen, sind weitgehend unerforscht. Außer den erst kürzlich identifizierten Forkehead-Transkriptionsfaktoren und den beiden möglichen Kandidaten *Gata4* und *Foxo1* ist wenig über die direkte Regulation von *Isl1* in kardialen Vorläuferzellen bekannt (Kappen & Salbaum 2009; Kang et al. 2009).

Es wurde jedoch gezeigt, dass in *Nkx2.5 knock-out* Experimenten die *Isl1*-Expression in den differenzierenden Zellen aktiv bleibt. Darüber hinaus kann *Isl1* in Abwesenheit von *Nkx2.5* in Regionen der Umgebung der Herzen der Embryonen nachgewiesen werden, in denen es normalerweise nicht aktiv ist (Prall et al. 2007). Dies legt bereits nahe, dass *Nkx2.5* an der Regulation der *Isl1*-Expression beteiligt ist. In Konkordanz dazu haben in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Versuche zum Expressionsverhalten von *Isl1* in *Nkx2.5*

überexprimierenden Zelllinien gezeigt, dass die Überexpression von Nkx2.5 Isl1 supprimiert. Darüber hinaus finden sich bei der *in vitro* Differenzierung dieser Zelllinie weniger Isl1 positive Progenitorzellen als in vergleichbaren Kontrollen.

Zusammen mit denen im letzten Teil dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass Isl1 einer direkten, negativen Regulation durch Nkx2.5 unterliegt. Umgekehrt wurde bereits gezeigt, dass Isl1 zusammen mit Tbx20 direkt stimulierend auf die Nkx2.5-Expression in Zellen des sekundären Herzfeldes wirkt (Takeuchi et al. 2005). Es ist somit anzunehmen, dass Isl1, Tbx20 und Nkx2.5 gemeinsam eine negative Feedback-Schleife bilden, die einer der zentralen Elemente im regulatorischen Netzwerk des sekundären Herzfeldes darstellen könnte und somit den Übergang von der Proliferation zur Differenzierung dieser Zellen steuert (siehe Abbildung 23).

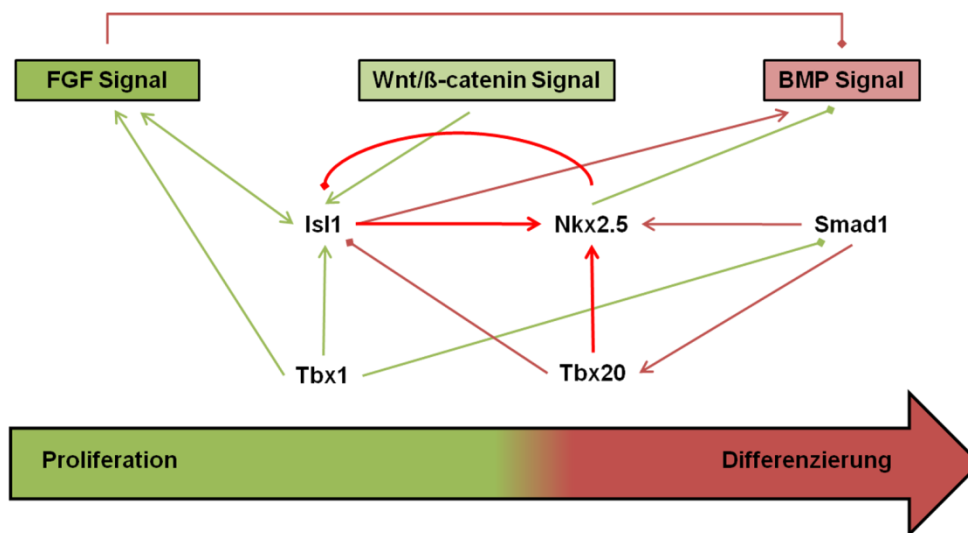


Abbildung 23 Netzwerk zur Regulation von Proliferation und Differenzierung kardialer Vorläuferzellen im sekundären Herzfeld

Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung des regulatorischen Netzwerkes, das in kardialen Vorläuferzellen des sekundären Herzfeldes Proliferation und Differenzierung steuert. In Grün und Rot sind die für Proliferation beziehungsweise Differenzierung wichtigen Signalwege dargestellt. Die hellroten Linien markieren eine neue Isl1/Tbx20/Nkx2.5 negative Feedback Schleife, die eine der zentralen Elemente dieses Netzwerkes sein könnte (nach Evans et al. 2010).

Anhand dieser Feedback-Schleife lässt sich erklären, warum in Nkx2.5 *knock-out* Experimenten die Isl1-Expression nicht abgeschaltet wird und diese außerdem in Geweben nachweisbar ist, die normalerweise keine Isl1-Expression zeigen (Prall et al. 2007). Dabei regulieren die kardialen Vorläuferzellen nicht sofort nach Beginn der Nkx2.5-Expression Isl1 herunter, sondern exprimieren eine gewisse Zeit lang beide Faktoren (Moretti et al. 2006). Das könnte bedeuten, dass das Abschalten von Isl1 durch Nkx2.5 dosisabhängig ist und erst dann zu Tage tritt, wenn die Zellen eine gewisse Menge an Nkx2.5 exprimieren. Alternativ könnten weitere Faktoren beteiligt sein, die die inhibierende Wirkung von Nkx2.5 modulieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind nicht ausreichend, um die vollständige biologische

Funktion dieser Regulation zu verstehen, liefern aber ein robustes Modell zur Erklärung einiger Phänomene bei der Differenzierung kardialer Progenitorzellen im sekundären Herzfeld.

6.4. Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse tragen vor allem zum Verständnis der molekularen Mechanismen bei der Proliferation und Differenzierung $Isl1^+$ kardialer Progenitorzellen im sekundären Herzfeld bei. Dieser komplexe Prozess führt die Zelle von einem undifferenzierten Stadium zum reifen Kardiomyozyten. Gegenstand zukünftiger Forschung wird es sein, die biologische Relevanz der einzelnen Mechanismen weiter zu erforschen: zum Einen um ein noch genaueres Bild dieser Vorgänge zu erhalten und zum Anderen um mögliche Ansatzpunkte für die Manipulation des Differenzierungsprozesses zu finden und diesen dadurch in eine gewünschte Richtung zu lenken.

Durch Experimente mit Mutanten von $Nkx2.5$ und $Isl1$, die trotz voller Funktionalität keine Bindung zum Interaktionspartner aufweisen, könnten die Auswirkungen der hier gezeigten Interaktion auf die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen erforscht werden. Darüber hinaus wäre es zur Aufklärung der biologischen Relevanz dieses transkriptionellen Netzwerks interessant, die Entwicklung kardialer Vorläuferzellen zu beobachten, die $Isl1$ durch Manipulation der $Isl1/Tbx20/Nkx2.5$ Feedback-Schleife während der Differenzierung nicht abschalten können.

Das Verständnis der kardialen Entwicklung und deren molekularer Mechanismen könnten in Zukunft dazu beitragen, die Entstehung von kardialen Fehlbildungen besser zu verstehen und embryonale Stammzellen oder induzierte pluripotente Stammzellen als Therapieoption und Krankheitsmodell zu nutzen. Insbesondere für das sich neu entwickelnde Feld der direkten Transdifferenzierung von einem Gewebe in ein anderes ist eine genaue Kenntnis der Schlüsselproteine, die bei der Differenzierung dieser Zellen beteiligt sind, essentiell.

7. Literaturverzeichnis

- Akazawa, H. & Komuro, I., 2005. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 107(2), pp.252-268.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P., 2008. *Molecular biology of the cell* 5th ed., New York: Garland Science.
- Alsan, B.H. & Schultheiss, T.M., 2002. Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. *Development (Cambridge, England)*, 129(8), pp.1935-1943.
- Basson, C.T., Bachinsky, D.R., Lin, R.C., Levi, T., Elkins, J.A., Soultz, J., Grayzel, D., Kroumpouzou, E., Traill, T.A., Leblanc-Straceski, J., Renault, B., Kucherlapati, R., Seidman, J.G. & Seidman, C.E., 1997. Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nature Genetics*, 15(1), pp.30-35.
- Basson, C.T., Cowley, G.S., Solomon, S.D., Weissman, B., Poznanski, A.K., Traill, T.A., Seidman, J.G. & Seidman, C.E., 1994. The clinical and genetic spectrum of the Holt-Oram syndrome (heart-hand syndrome). *The New England Journal of Medicine*, 330(13), pp.885-891.
- Benson, D.W., Silberbach, G.M., Kavanaugh-McHugh, A., Cottrill, C., Zhang, Y., Riggs, S., Smalls, O., Johnson, M.C., Watson, M.S., Seidman, J.G., Seidman, C.E., Plowden, J. & Kugler, J.D., 1999. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(11), pp.1567-1573.
- Brade, T., Gessert, S., Kühl, M. & Pandur, P., 2007. The amphibian second heart field: *Xenopus* islet-1 is required for cardiovascular development. *Developmental Biology*, 311(2), pp.297-310.
- Buckingham, M., Meilhac, S. & Zaffran, S., 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews. Genetics*, 6(11), pp.826-835.
- Cai, C.L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P.H., Pfaff, S.L., Chen, J. & Evans, S., 2003. *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental Cell*, 5(6), pp.877-889.
- Cai, C.L., Martin, J.C., Sun, Y., Cui, L., Wang, L., Ouyang, K., Yang, L., Bu, L., Liang, X., Zhang, X., Stallcup, W.B., Denton, C.P., McCulloch, A., Chen, J. & Evans, S., 2008. A myocardial lineage derives from *Tbx18* epicardial cells. *Nature*, 454(7200), pp.104-108.
- Chen, C.Y. & Schwartz, R.J., 1995. Identification of Novel DNA Binding Targets and Regulatory Domains of a Murine Tinman Homeodomain Factor, *nkx-2.5*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(26), pp.15628 -15633.
- Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G. R., 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 22(4), pp.233-241.
- Clark, K.L., Yutzey, K.E. & Benson, D.W., 2006. Transcription factors and congenital heart defects. *Annual Review of Physiology*, 68(1), pp.97-121.
- de la Cruz, M.V., Sánchez Gómez, C., Arteaga, M. & Argüello, C., 1977. Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *Journal of Anatomy*, 123(Pt 3), pp.661-686.

- Curtiss, J. & Heilig, J.S., 1998. DeLIMiting development. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 20(1), pp.58-69.
- Dagleish, A.E., 1976. The development of the septum primum relative to atrial septation in the mouse heart. *Journal of Morphology*, 149(3), pp.369-382.
- Evans, S., Moretti, A. & Laugwitz, K.L., 2010. MicroRNAs in a Cardiac Loop: Progenitor or Myocyte? *Developmental Cell*, 19(6), pp.787-788.
- Garg, V., Kathiriya, I.S., Barnes, R., Schluterman, M.K., King, I.N., Butler, C.A., Rothrock, C.R., Eapen, R.S., Hirayama-Yamada, K., Joo, K., Matsuoka, R., Cohen, J.C. & Srivastava, D., 2003. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature*, 424(6947), pp.443-447.
- Goldmuntz, E., Geiger, E. & Benson, D.W., 2001. NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot. *Circulation*, 104(21), pp.2565-2568.
- Gruenauer-Kloevekorn, C. & Froster, U.G., 2003. Holt-Oram syndrome: a new mutation in the TBX5 gene in two unrelated families. *Annales De Génétique*, 46(1), pp.19-23.
- Gutierrez-Roelens, I., Sluysmans, T., Gewillig, M., Devriendt, K. & Vikkula, M., 2002. Progressive AV-block and anomalous venous return among cardiac anomalies associated with two novel missense mutations in the CSX/NKX2-5 gene. *Human Mutation*, 20(1), pp.75-76.
- Harvey, R.P., 2002. Patterning the vertebrate heart. *Nature Reviews. Genetics*, 3(7), pp.544-556.
- Harvey, R.P. & Rosenthal, N., 1999. *Heart development*, Gulf Professional Publishing, pp.19-154.
- Hirayama-Yamada, K., Kamisago, M., Akimoto, K., Aotsuka, H., Nakamura, Y., Tomita, H., Furutani, M., Imamura, S., Takao, A., Nakazawa, M. & Matsuoka, R., 2005. Phenotypes with GATA4 or NKX2.5 mutations in familial atrial septal defect. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 135(1), pp.47-52.
- Hoffman, J.I. & Kaplan, S., 2002. The incidence of congenital heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(12), pp.1890-1900.
- Ikeda, Y., Hiroi, Y., Hosoda, T., Utsunomiya, T., Matsuo, S., Ito, T., Inoue, J., Sumiyoshi, T., Takano, H., Nagai, R. & Komuro, I., 2002. Novel point mutation in the cardiac transcription factor CSX/NKX2.5 associated with congenital heart disease. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 66(6), pp.561-563.
- Jerome, L.A. & Papaioannou, V.E., 2001. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nature Genetics*, 27(3), pp.286-291.
- Kang, J., Nathan, E., Xu, S.M., Tzahor, E. & Black, B.L., 2009. Isl1 is a direct transcriptional target of Forkhead transcription factors in second-heart-field-derived mesoderm. *Developmental Biology*, 334(2), pp.513-522.
- Kappen, C. & Salbaum, J.M., 2009. Identification of regulatory elements in the Isl1 gene locus. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(7), pp.935-946.

- Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H. & Edlund, T., 1990. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature*, 344(6269), pp.879-882.
- Kasahara, H. & Benson, D.W., 2004. Biochemical analyses of eight NKX2.5 homeodomain missense mutations causing atrioventricular block and cardiac anomalies. *Cardiovascular Research*, 64(1), pp.40-51.
- Kasahara, H., Lee, B., Schott, J.J., Benson, D.W., Seidman, J.G., Seidman, C.E. & Izumo, S., 2000. Loss of function and inhibitory effects of human CSX/NKX2.5 homeoprotein mutations associated with congenital heart disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(2), pp.299-308.
- Kelly, R.G., 2010. Core issues in craniofacial myogenesis. *Experimental Cell Research*, 316(18), pp.3034-3041.
- Kelly, R.G., Brown, N.A. & Buckingham, M., 2001. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Developmental Cell*, 1(3), pp.435-440.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C. & Morrison, S.J., 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121(7), pp.1109-1121.
- Latchman, D.S., 1996. Transcription-factor mutations and disease. *The New England Journal of Medicine*, 334(1), pp.28-33.
- Laugwitz, K.L., Moretti, A., Caron, L., Nakano, A. & Chien, K.R., 2008. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development (Cambridge, England)*, 135(2), pp.193-205.
- Laugwitz, K.L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L.Z., Cai, C.L., Lu, M.M., Reth, M., Platoshyn, O., Yuan, J.X., Evans, S. & Chien, K.R., 2005. Postnatal Isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 433(7026), pp.647-653.
- Li, Q.Y., Newbury-Ecob, R.A., Terrett, J.A., Wilson, D.I., Curtis, A.R., Yi, C.H., Gebuhr, T., Bullen, P.J., Robson, S.C., Strachan, T., Bonnet, D., Lyonnet, S., Young, I.D., Raeburn, J.A., Buckler, A.J., Law, D.J. & Brook, J.D., 1997. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nature Genetics*, 15(1), pp.21-29.
- Lindsay, E.A., Botta, A., Jurecic, V., Carattini-Rivera, S., Cheah, Y.C., Rosenblatt, H.M., Bradley, A. & Baldini, A., 1999. Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature*, 401(6751), pp.379-383.
- Lindsay, E.A., Vitelli, F., Su, H., Morishima, M., Huynh, T., Pramparo, T., Jurecic, V., Ogunrinu, G., Sutherland, H.F., Scambler, P.J., Bradley, A. & Baldini, A., 2001. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature*, 410(6824), pp.97-101.
- Löffler, G. & Petrides, P.E., 1998. *Biochemie und Pathobiochemie* 6th ed., Berlin [u.a.], Springer, pp. 240-261.
- Logan, C.Y. & Nusse, R., 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, pp.781-810.

- Marvin, M.J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S.M. & Lassar, A.B., 2001. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes & Development*, 15(3), pp.316-327.
- McElhinney, D.B., Geiger, E., Blinder, J., Benson, D.W. & Goldmuntz, E., 2003. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(9), pp.1650-1655.
- Merscher, S., Funke, B., Epstein, J.A., Heyer, J., Puech, A., Lu, M.M., Xavier, R.J., Demay, M.B., Russell, R.G., Factor, S., Tokooya, K., Jore, B.S., Lopez, M., Pandita, R.K., Lia, M., Carrion, D., Xu, H., Schorle, H., Kobler, J.B., Scambler, P., Wynshaw-Boris, A., Skoultschi, A.I., Morrow, B.E. & Kucherlapati, R., 2001. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell*, 104(4), pp.619-629.
- Miller, R.A., Christoforou, N., Pevsner, J., McCallion, A.S. & Gearhart, J.D., 2008. Efficient Array-Based Identification of Novel Cardiac Genes through Differentiation of Mouse ESCs. *PLoS ONE*, 3(5), p.e2176.
- Mjaatvedt, C.H., Nakaoka, T., Moreno-Rodriguez, R., Norris, R.A., Kern, M.J., Eisenberg, C.A., Turner, D. & Markwald, R.R., 2001. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Developmental Biology*, 238(1), pp.97-109.
- Molkentin, J.D., Antos, C., Mercer, B., Taigen, T., Miano, J.M. & Olson, E.N., 2000. Direct Activation of a GATA6 Cardiac Enhancer by Nkx2.5: Evidence for a Reinforcing Regulatory Network of Nkx2.5 and GATA Transcription Factors in the Developing Heart. *Developmental Biology*, 217(2), pp.301-309.
- Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J.T., Bernshausen, A., Chen, Y., Qyang, Y., Bu, L., Sasaki, M., Martin-Puig, S., Sun, Y., Evans, S., Laugwitz, K.L. & Chien, K.R., 2006. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*, 127(6), pp.1151-1165.
- Motoike, T., Markham, D.W., Rossant, J. & Sato, T.N., 2003. Evidence for novel fate of Flk1+ progenitor: contribution to muscle lineage. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 35(3), pp.153-159.
- Nakajima, Y., 2010. Second lineage of heart forming region provides new understanding of conotruncal heart defects. *Congenital Anomalies*, 50(1), pp.8-14.
- Ovcharenko, I., Nobrega, M.A., Loots, G.G. & Stubbs, L., 2004. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server issue), pp.W280-286.
- Papavassiliou, A.G., 1995. Molecular medicine. Transcription factors. *The New England Journal of Medicine*, 332(1), pp.45-47.
- Prall, O.W., Menon, M.K., Solloway, M.J., Watanabe, Y., Zaffran, S., Bajolle, F., Biben, C., McBride, J.J., Robertson, B.R., Chaulet, H., Stennard, F.A., Wise, N., Schaft, D., Wolstein, O., Furtado, M.B., Shiratori, H., Chien, K.R., Hamada, H., Black, B.L., Saga, Y., Robertson, E.J., Buckingham, M. & Harvey, R.P., 2007. An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell*, 128(5), pp.947-959.
- Red-Horse, K., Ueno, H., Weissman, I.L. & Krasnow, M.A., 2010. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature*, 464(7288), pp.549-553.

- Sadler, T., 1998. *Medizinische Embryologie : die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen* 9th ed., Stuttgart ;;New York: Thieme.
- Satoda, M., Pierpont, M.E., Diaz, G.A., Bornemeier, R.A. & Gelb, B.D., 1999. Char syndrome, an inherited disorder with patent ductus arteriosus, maps to chromosome 6p12-p21. *Circulation*, 99(23), pp.3036-3042.
- Satoda, M., Zhao, F., Diaz, G.A., Burn, J., Goodship, J., Davidson, H.R., Pierpont, M.E. & Gelb, B.D., 2000. Mutations in TFAP2B cause Char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus. *Nature Genetics*, 25(1), pp.42-46.
- Schier, A.F., 2003. Nodal signaling in vertebrate development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, pp.589-621.
- Schneider, M.R., Wolf, E., Hoeflich, A. & Lahm, H., 2002. IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *The Journal of Endocrinology*, 172(3), pp.423-440.
- Schneider, V.A. & Mercola, M., 2001. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes & Development*, 15(3), pp.304-315.
- Schott, J.J., Benson, D.W., Basson, C.T., Pease, W., Silberbach, G.M., Moak, J.P., Maron, B.J., Seidman, C.E. & Seidman, J.G., 1998. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science (New York, N. Y.)*, 281(5373), pp.108-111.
- Stevens, K.N., Hakonarson, H., Kim, C.E., Doevendans, P.A., Koeleman, B.P., Mital, S., Raue, J., Glessner, J.T., Coles, J.G., Moreno, V., Granger, A., Gruber, S.B. & Gruber, P.J., 2010. Common Variation in ISL1 Confers Genetic Susceptibility for Human Congenital Heart Disease. *PLoS ONE*, 5(5), p.e10855.
- Sun, Y., Liang, X., Najafi, N., Cass, M., Lin, L., Cai, C.L., Chen, J. & Evans, S., 2007. Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Developmental Biology*, 304(1), pp.286-296.
- Takeuchi, J.K., Mileikowskaia, M., Koshiba-Takeuchi, K., Heidt, A.B., Mori, A.D., Arruda, E.P., Gertsenstein, M., Georges, R., Davidson, L., Mo, R., Hui, C.C., Henkelman, R.M., Nemer, M., Black, B.L., Nagy, A. & Bruneau, B.G., 2005. Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development. *Development (Cambridge, England)*, 132(10), pp.2463-2474.
- Vincent, S.D. & Buckingham, M., 2010. How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Current Topics in Developmental Biology*, 90, pp.1-41.
- Waldo, K.L., Hutson, M.R., Stadt, H.A., Zdanowicz, M., Zdanowicz, J. & Kirby, M.L., 2005. Cardiac neural crest is necessary for normal addition of the myocardium to the arterial pole from the secondary heart field. *Developmental Biology*, 281(1), pp.66-77.
- Waldo, K.L., Kumiski, D.H., Wallis, K.T., Stadt, H.A., Hutson, M.R., Platt, D.H. & Kirby, M.L., 2001. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development (Cambridge, England)*, 128(16), pp.3179-3188.
- Watanabe, Y., Benson, D.W., Yano, S., Akagi, T., Yoshino, M. & Murray, J.C., 2002. Two novel frameshift mutations in NKX2.5 result in novel features including visceral inversus and sinus venosus type ASD. *Journal of Medical Genetics*, 39(11), pp.807-811.

van Wijk, B., van den Berg, G., Abu-Issa, R., Barnett, P., van der Velden, S., Schmidt, M., Ruijter, J.M., Kirby, M.L., Moorman, A.F. & van den Hoff, M.J., 2009. Epicardium and myocardium separate from a common precursor pool by crosstalk between bone morphogenetic protein- and fibroblast growth factor-signaling pathways. *Circulation Research*, 105(5), pp.431-441.

Zhao, F., Weismann, C.G., Satoda, M., Pierpont, M.E., Sweeney, E., Thompson, E.M. & Gelb, B.D., 2001. Novel TFAP2B mutations that cause Char syndrome provide a genotype-phenotype correlation. *American Journal of Human Genetics*, 69(4), pp.695-703.

Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S.M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K.R. & Pu, W.T., 2008. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*, 454(7200), pp.109-113.

8. Abkürzungsverzeichnis

AV-Block	Atrioventrikuläre Blockade der Erregungsleitung
AVD	Vorhofseptumdefekt
bp / kbp	Basenpaare / 1000 Basenpaare
Ca	Calcium
cDNA	Komplementäre DNA
Cl	Chlor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleotidsäure
DORV	<i>double outlet right ventricle</i> angeborene Fehlbildung bei der die Aorta und die Arteria Pulmonalis aus dem rechten Ventrikel entspringen
EDTA	Ethylen Diamin Tetraessigsäure
EGTA	Ethylen Glykol Tetraessigsäure
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACS	Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung
FBS	Fetales Bovines Serum
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HEK Zellen	Humane embryonale Karzinomzellen
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOS	Holt-Oram-Syndrom
Ig	Immunglobulin
IPS Zellen	Induzierte pluripotente Stammzellen
K	Kalium
LB Medium	Luria Bertoni Medium
Mg	Magnesium
Na	Natrium
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
qRT-PCR	Quantitative-PCR
RT-PCR	Reverse-Transkription-PCR
SAS	<i>subaortic stenosis</i>
SDS	Sodium dodecyl Sulfat

SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gel Elektrophorese
TBE	Tris-Borat-EDTA
TOF	Tetralogy of Fallot
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen/Minute
VSD	Ventrikelseptumdefekt

9. Zusammenfassung

Nkx2.5 spielt bei der Entstehung und Differenzierung von Herzvorläuferzellen sowie bei der Entwicklung reifer Kardiomyozyten eine zentrale Rolle. Isl1 hat sich in den letzten Jahren zum wichtigsten Marker des sekundären Herzfeldes, aus dem große Teile des adulten Herzens entstehen, herauskristallisiert. Die gemeinsame Expression dieser beiden Faktoren markiert eine Population multipotenter kardialer Vorläuferzellen, die *in vivo* und *in vitro* alle Gewebe des Herzens bilden können. Die molekularbiologischen Mechanismen, die zur Spezifizierung und Differenzierung dieser Vorläuferzellen führen, sind indes weitgehend unbekannt. Diese Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, die gemeinsame Funktion von Isl1 und Nkx2.5 sowie deren Zusammenspiel zu charakterisieren.

Dazu wurde zunächst die Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren *in vitro* mittels bakteriell synthetisierten Proteinen sowie *in vivo* in einem heterologen Zellsystem und in embryonalen Stammzellen der Maus untersucht. Weiterhin wurde ihr Einfluss im heterologen Zellsystem auf das Expressionsverhalten verschiedener *downstream* gelegener Gene der kardialen Entwicklung analysiert. Zuletzt wurde die gegenseitige Regulation der beiden Transkriptionsfaktoren und der damit verbundene Übergang von der Spezifizierung zur Differenzierung kardialer Progenitorzellen überprüft.

Diese Studie zeigt, dass Nkx2.5 und Isl1 sowohl *in vitro* als auch im heterologen Zellsystem direkt miteinander interagieren und einen Komplex bilden können. Dabei scheint die Homeodomäne von Nkx2.5 die entscheidende Struktur für die Interaktion der beiden Faktoren zu sein. Des Weiteren wurde dargestellt, dass diese gemeinsam an einem Enhancer-Element des *insulin-like growth factor binding protein 5 (Igfbp5)* einen synergistischen, transkriptionshemmenden Effekt ausüben. Außerdem wurde gezeigt, dass Nkx2.5 an mehrere Enhancer-Elemente, die sich oberhalb des *Isl1*-Lokus befinden, binden kann und dort zu einer verminderten Transkription führt.

In dieser Arbeit ergeben sich erstmals Hinweise darauf, dass die beiden zentralen Transkriptionsfaktoren der kardialen Entwicklung, Nkx2.5 und Isl1, in einem transkriptionellen Komplex zusammenarbeiten und so die Aktivität anderer Gene regulieren können. Darüber hinaus legen die Ergebnisse nahe, dass dem Abschalten der Isl1-Expression durch Nkx2.5 ein direkter Mechanismus im Sinne einer negativen Feedback-Schleife zu Grunde liegt, der möglicherweise einer der entscheidenden Schritte beim Übergang von der Spezifizierung zur Differenzierung kardialer Vorläuferzellen im sekundären Herzfeld darstellt.

10. Summary

Nkx2.5 is one of the key players in the formation and differentiation of progenitor cells and in the development of mature cardiomyocytes. Over the last years, Isl1 has become one of the most important markers of the second heart field precursor cells which form large parts of the adult heart. The simultaneous expression of both factors marks a population of multipotent cardiac progenitors which can differentiate *in vitro* and *in vivo* into all different cardiac lineages. However, the molecular mechanism governing the specification and differentiation of these progenitors is widely unknown. This work aims at characterizing the function of Nkx2.5 and Isl1 as well as examining possible interactions between them.

At first, the interaction between those two transcription factors was studied *in vitro* using bacterially synthesized protein and *in vivo* in a heterologous cell system as well as in mouse embryonic stem cells. Moreover, the joint influence of Isl1 and Nkx2.5 on the expression of possible downstream target genes was analyzed in a heterologous cell system. Furthermore, the mutual regulation of these two proteins potentially connected to the switch from specification to differentiation in cardiac progenitor cells was examined.

This work demonstrates the physical interaction of Nkx2.5 and Isl1 *in vitro* as well as in a heterologous cell system. Moreover, the data suggest the homeodomain of Nkx2.5 as the essential structure for the interaction between those two factors. Furthermore, they exert a synergistic, inhibiting effect on one enhancer element of the *insulin like growth factor binding protein 5 (Igfbp5)*. At last, Nkx2.5 was proven to bind to several enhancer elements upstream of the genomic *Isl1* locus and to silence the transcription of this gene.

The results suggest that the two key transcription factors in cardiac development, Nkx2.5 and Isl1, can join in a transcriptional complex and thus potentially regulate the activity of downstream target genes. In addition, there is evidence for the downregulation of Isl1 expression by Nkx2.5 to be the result of a negative feedback loop in which Nkx2.5 exhibits a direct, silencing effect on the *Isl1* gene. This could potentially be one of the crucial steps in the development of cardiac progenitors in the second heart field.

Im Rahmen der Dissertation entstandene Publikationen

Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flügel L, Dorn T, Goedel A, Höhnke C, Hofmann F, Seyfarth M, Sinnecker D, Schömig A, Laugwitz KL, 2010. **Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome.** *New England Journal of Medicine*, 363(15), pp. 1397-409.

Jung CB, Moretti A, Mederos y Schnitzler M, Iop L, Storch U, Pfeiffer S, Bellin M, Dorn T, Goedel A, Dirschinger R, Seyfarth M, Lam JT, Sinnecker D, Gudermann T, Lipp P, Laugwitz KL, 2011. **Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.** *EMBO Molecular Medicine*, 4(3), pp. 180-91.

Lebenslauf

Alexander Rudolf Peter Goedel

Geboren am 21.04.1984 in München

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung:

- | | |
|-------------------|---|
| 05/2010 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 10/2005 – 04/2010 | Fortführung des Medizinstudiums an der Technischen Universität München |
| 09/2005 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 10/2003 – 09/2005 | Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München / Technische Universität München |
| 09/2003 | Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes |
| 07/2003 | Aufnahme in die Bayerische Begabtenförderung |
| 06/2003 | Allgemeine Hochschulreife (Abitur) |
| 1994 – 2003 | Besuch des Luitpold-Gymnasiums in München |
| 1990 – 1994 | Besuch der Grundschule St. Anna in München |

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Mentor Herrn Prof. Dr. Karl-Ludwig Laugwitz für die faszinierende Themenstellung und die Möglichkeit, in seiner herausragenden Forschergruppe mitarbeiten zu dürfen. Herrn Prof. Dr. Albert Schömig danke ich für die Gelegenheit zur Promotion in seiner Klinik.

Frau Dr. Gergana Dobрева und Herrn Dr. Jason T. Lam danke ich herzlich für die exzellente Betreuung und die ständige Hilfestellung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente. Außerdem bedanke ich mich für die Weitergabe ihres Wissens und die große Geduld beim Lehren der technischen Fertigkeiten.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. Alessandra Moretti für ihr stets offenes Ohr in allen Belangen und die zahlreichen fruchtbaren Gespräche. Ferner danke ich Frau Dr. Tatjana Dorn und Herrn Christian Jung für ihre Hilfestellung bei der Zellkultur und in allen praktischen Fragen des Laboralltags. Herrn Prof. Dr. Steffen Maßberg, Herrn Prof. Dr. Melchior Seyfahrt und Herrn Dr. Daniel Sinnecker möchte ich für die anregenden Diskussionen während der Entstehung dieser Arbeit danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Diana Grewe und Frau Christina Scherb für die ausgezeichnete Infrastruktur und die Hilfe bei der Durchführung vieler Experimente. Herrn Michael Breckwoldt und Herrn Sebastian Schmidt danke ich für die zahlreichen kritischen Anmerkungen und die Hilfe bei der Formatierung.

Zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie für die stetige Unterstützung, ihre Zeit und Geduld während der Entstehung dieser Dissertation bedanken.