



**TECHNISCHE UNIVERSITÄT
CAROLO-WILHELMINA
ZU BRAUNSCHWEIG**

**Institut für Biochemie und Biotechnologie
Abteilung Zell- und Molekularbiologie**

Studienarbeit

**Differenzierung von *popdc2*-defizienten embryonalen
Stammzellen zu Kardiomyozyten und mesothelialen Zellen**

vorgelegt von:	Katrin Peter
geb. am:	09.05.1982
Studiengang:	Biotechnologie
Matrikel-Nr.:	2655727

verantwortlicher Hochschullehrer: Prof. Dr. T. Brand

Braunschweig, den 10.08.2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
2. Grundlagen.....	5
2.1 Embryogenese der Vertebraten.....	5
2.1.1 Blastogenese.....	5
2.1.2 Gastrulation.....	6
2.1.3 Differenzierungen am Mesoderm: Entstehung des Mesothels.....	7
2.2 Herzentwicklung bei den Vertebraten.....	8
2.3 Die Popeye-Genfamilie.....	10
2.3.1 Das popdc2-Gen.....	11
3. Material und Methoden.....	13
3.1 Material.....	13
3.1.1 murine Zelllinien.....	13
3.1.2 Geräte.....	13
3.1.3 Verbrauchsmaterial.....	14
3.1.4 Chemikalien.....	14
3.1.5 Antikörper.....	16
3.1.6 Enzyme.....	16
3.1.7 Primer.....	17
3.1.8 Gebrauchslösungen.....	17
3.2 Methoden.....	18
3.2.1 Kultivierung von embryonalen Stammzellen.....	18
3.2.2 Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten.....	19
3.2.3 LacZ-Färbung.....	21
3.2.4 Immunhistochemische Färbung.....	21
3.2.5 Kryoschnitte.....	22
3.2.6 Eindeckeln der gefärbten Gewebe und Kryoschnitte.....	23
3.2.7 RNA-Isolierung.....	23
3.2.8 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung isolierter RNA.....	25
3.2.9 RT-PCR.....	25

3.2.10 Bestimmung der Annealing-Temperatur TA der Primer.....	27
3.2.11 Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel.....	27
4. Ergebnisse.....	28
4.1 LacZ-Expression in popdc2-defizienten embryoid bodies.....	28
4.2 Anfärbung mesothelialer Zellen.....	30
4.3 Vergleichende Expression der Popeye-Gene bei popdc2-defizienten Zellen.....	32
5. Diskussion.....	35
5.1 Entwicklung der Kardiomyozyten aus popdc2-defizienten embryonalen Stammzellen....	36
5.2 Popdc2 und Mesothelin werden koreguliert.....	37
5.3 Popdc2 ist ein sehr früher kardiogener Marker, während popdc1 schon in embryonalen Stammzellen exprimiert wird.....	38
6. Literaturverzeichnis.....	43

1. Einleitung

Die molekularen Wege, die zur Differenzierung und Spezifizierung von Kardiomyozyten im embryonalen Mesoderm führen, sind noch immer kaum verstanden. Viele der bisherigen Erkenntnisse wurden aus Primärkulturen von Kardiomyozyten gewonnen. Diese haben jedoch den Nachteil, dass die Zellen im Laufe der Kultivierung oftmals ihre Eigenschaften und Fähigkeiten zur normalen Kardiogenese verlieren. So hören zum Beispiel von Herzen entstammende Zellen aus 3 Tage alten Hühnerembryonen auf, sich in Bezug auf ihre morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften weiter zu entwickeln [1].

Permanente Zelllinien hingegen, die zumindest einige herzspezifische Eigenschaften zeigen, gibt es bis heute nur sehr wenige (z. B. H9c2 aus dem embryonalen Herz einer Ratte).

Eine alternative Möglichkeit zur Untersuchung der Entwicklung kardialer Zellen bieten Kardiomyozyten, die *in vitro* aus pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus differenziert werden. Die embryonalen Stammzellen werden dafür der inneren Zellmasse von Blastozysten entnommen und als permanente Zelllinien kultiviert. Würden die kultivierten embryonalen Stammzellen in eine Wirtsblastozyste reimplantiert werden, verhielten sie sich wie normale embryonale Zellen und könnten sich *in vivo* zu jeder beliebigen Gewebezelle der Chimäre entwickeln [2]. Auch als Zelllinie verlieren sie bei Anwesenheit von LIF (*leukemia inhibitory factor*) nicht ihre Pluripotenz.

Die am häufigsten genutzte Methode zur *in vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen ist die Kultur in komplexen Zellaggregaten, den *embryoid bodies*. In ihrer Dreidimensionalität machen sie einen Entwicklungsprozess durch, der in vielen Aspekten der frühen Embryogenese eines Säugetiers entspricht. Die *in vitro* zu Kardiomyozyten differenzierten Zellen exprimieren dabei viele jener herzspezifischen Proteine, die auch bei der *in vivo* Entwicklung auftreten. Unter anderem kann hier die Expression der *Popeye*-Proteine, einer Gruppe von Molekülen, die zu den frühesten Markern der embryonalen Herzentwicklung zählen [3], im Differenzierungsprozess beobachtet werden.

1. Einleitung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, aus *popdc2*-defizienten embryonalen Stammzellen, in die stattdessen ein LacZ-Gen eingefügt wurde, Kardiomyozyten zu generieren und dabei das Verhalten während der Differenzierung zu studieren.

Wie LacZ-Färbungen in *popdc2*-defizienten Mausembryonen des Stadiums E7.5 zeigten, wird *popdc2* stark in den Herzfeldern und schwächer im umgebenden Mesoderm exprimiert [unveröffentlichte Beobachtung]. Ein ähnliches Expressionsmuster konnte in vorangegangenen Experimenten an *popdc2*-defizienten *embryoid bodies* beobachtet werden. Nach einer Anheftung der *embryoid bodies* am Boden von Zellkulturschalen wandern Zellen aus dem Gewebeverband aus. Unter diesen Zellen befinden sich neben zusammenhängenden stark LacZ-gefärbten Bereichen auch weniger stark gefärbte einzelne Zellen. Es gilt zu überprüfen, ob es sich bei den Zellen, in denen *popdc2* schwächer exprimiert wird, um mesotheliale Zellen handelt.

Bei Mausembryonen mit einer *popdc1/ bves*- oder *popdc2*-Nullmutation fehlt – trotz einer wahrscheinlich wichtigen Funktion der *Popeye*-Proteine während der embryonalen Entwicklung – ein lethaler Phänotyp [3][unveröffentlicht]. Es soll nun *in vitro* untersucht werden, ob durch eine homozygote Defizienz des *popdc2*-Gens die Expression der anderen *Popeye*-Genfamilienmitglieder aufgrund einer möglichen funktionellen Redundanz hochreguliert wird.

2. Grundlagen

2.1 Embryogenese der Vertebraten

Schon in der frühen Embryonalentwicklung werden die Grundsteine für die Anlage der Organe gelegt: Die Hauptachsen des Embryos werden angeordnet und die zunächst noch undifferenzierten Zellen erhalten ihr späteres Schicksal.

2.1.1 Blastogenese

Nach der Befruchtung einer Eizelle beginnt die Entwicklung zu einem vielzelligen Organismus mit der Furchung. Hierbei erfolgen in schneller Abfolge MPF (*mitosis-promoting factor*) gesteuerte mitotische Teilungen [4].

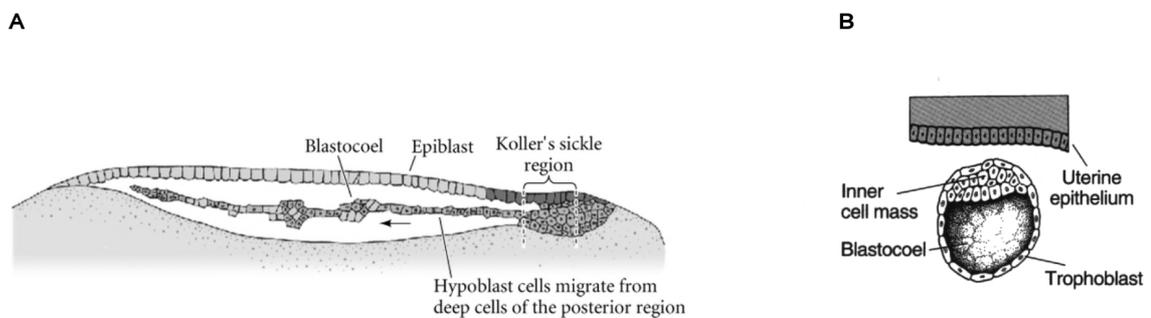


Abb. 1: (A) Blastula des Huhns [4]. (B) Blastozyste des Säugetiers [5].

Das Produkt der Furchung ist die Blastula bzw. die Blastozyste bei den Säugetieren. Sie hat je nach Organismus aufgrund verschiedener Furchungstypen ein unterschiedliches Aussehen. Dieses wird hauptsächlich durch die Menge und Verteilung von Dotterprotein im Zytoplasma sowie Faktoren, die den Winkel und Formierungszeitpunkt der mitotischen Spindel be-

einflussen, bestimmt. Obwohl die Zellen der Blastula morphologisch noch undifferenziert sind, liegen bereits Bezirke für die Anlage von Organen und Steuerung der späteren Entwicklung fest. Sie ist im Allgemeinen durch einen Hohlraum, dem Blastozöl, zwischen den äußeren Blastomeren (Epiblast) und den inneren Blastomeren (Hypoblast) gekennzeichnet.

Die Blastula der Säugetiere wird aufgrund morphologischer Besonderheiten als Blastozyste bezeichnet. Hier befindet sich das Blastozöl zwischen dem äußeren Trophoblast und dem inneren Embryoblast (innere Zellmasse) [5].

2.1.2 Gastrulation

Die Gastrulation ist ein Prozess hochkoordinierter, FGF gesteuerter Zellbewegungen [4], bei dem die nach der Furchung entstandenen Zellen flächenhaft angeordnet werden und die drei Keimblätter Ektoderm, Endoderm und Mesoderm entstehen. Dabei werden die Anlagen der endo- und mesodermalen Organe ins Innere des Embryos und die ektodermalen Zellen, die die Haut und das Nervensystem bilden, nach außen über die Oberfläche des Embryos verlegt.

Bei den Säugetieren beginnt die Gastrulation mit der Formierung der inneren Zellmasse. Aus dem Embryoblast entwickelt sich ein Embryonalschild, bei dem die untere Zellschicht, der Hypoblast, die restliche innere Zellmasse, die sich zum Epiblast formiert, vom Blastozöl abgrenzt. Ab diesem Zeitpunkt erfolgt die weitere Keimblattentwicklung bei den Reptilien, Vögeln und Säugetieren ähnlich.

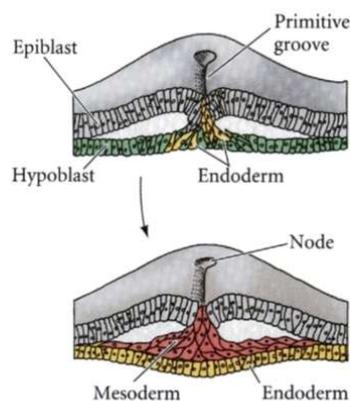


Abb. 2: Entstehung der Keimblätter aus Epiblast und Hypoblast [4].

Das gemeinsame strukturelle Merkmal bei der Gastrulation dieser Tiere ist der Primitivstreifen. Er entsteht in der Mitte des Keims zunächst durch Verdickung und anschließend durch Invagination des Epiblasten. Vom Primitivstreifen aus migrieren Zellen aus dem Epiblast in den Hypoblast und bilden das Endoderm. Außerdem treten Zellen in den Raum zwischen Epiblast (Ektoderm) und Endoderm ein. Sie bilden das flächenhafte, sich ständig vergrößernde Mesoderm, an dem sofort Differenzierungen einsetzen. Die Gastrulation erfolgt in einem zeitlichen Gefälle von anterior nach posterior.

2.1.3 Differenzierungen am Mesoderm: Entstehung des Mesothels

Während aus dem Ektoderm die Neuralrinne (später das Neuralrohr) und aus dem Endoderm die Darmwand geformt wird, kommt es beim Mesoderm zu einer Unterteilung in ein axiales, paraxiales, laterales und intermediäres Mesoderm. Das axiale Mesoderm bildet die Chorda dorsalis, während am paraxialen Mesoderm die Bildung der Urwirbel (Somiten) durch Segmentierung erfolgt. Das intermediäre Mesoderm bildet die Urogenitalplatte und verbindet das paraxiale mit dem lateralen Mesoderm. Das laterale Mesoderm wiederum spaltet sich flächenparallel in die Somatopleura, bestehend aus Mesoderm und Ektoderm, und die Splanchnopleura, zusammengesetzt aus Mesoderm und Endoderm (Abb. 3; Abb. 4: A). Der entstehende Hohlraum zwischen beiden Blättern wird Zöлом genannt. Das Zöлом wird durch eine Schicht abgeflachter Zellen, welche sowohl aus der Somatopleura als auch aus der Splanchnopleura hervorgeht, als Raum abgegrenzt. Diese Schicht wird zum Mesothel und kleidet die Leibeshöhle aus [6].

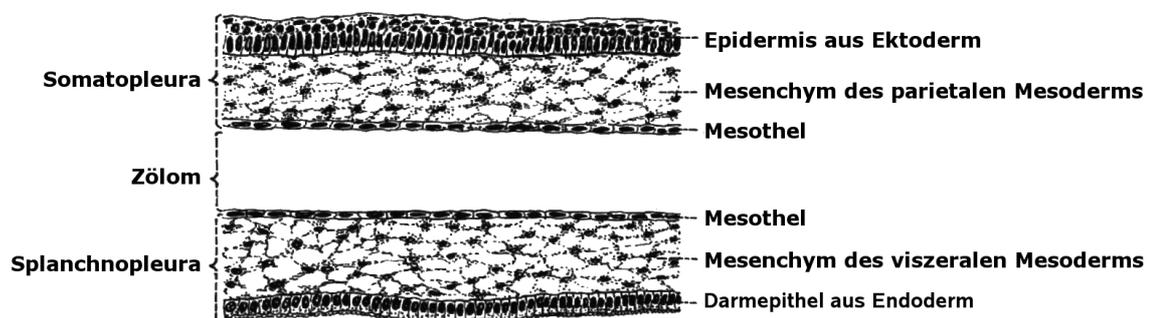


Abb. 3: Differenzierung am lateralen Mesoderm [6].

Im reifen Organismus liegt ein seröser Flüssigkeitsfilm über dem Mesothel, der von den Mesothelzellen gebildet wird. Durch Poren zwischen den Mesothelzellen kann die seröse Flüssigkeit in die Leibeshöhle ein- und austreten. Das Mesothel reguliert damit den Transport von Molekülen und Zellen und ist somit sowohl resorptiv als auch sekretorisch aktiv [7].

Ein weiterer Teil der Zellen des Mesoderms differenziert zu einer homogenen Interzellularsubstanz, die dem embryonalen Bindegewebe (Mesenchym) entspricht.

2.2 Herzentwicklung bei den Vertebraten

Im sich entwickelnden Vertebratenembryo ist das Kreislaufsystem, zusammengesetzt aus Herz, Blutzellen, Arterien und Venen, die erste funktionierende Einheit und sorgt damit für eine ausreichende Nährstoffverteilung während der Embryogenese. Die treibende Kraft dieses Kreislaufsystems bildet das Herz. Es ist das erste Organ, welches im Embryo seine Funktion aufnimmt.

Der Beginn der Herzentwicklung findet beim Huhn im HH-Stadium 4, bei der Maus im Stadium E7.25 und beim Menschen am Ende der 3. Woche statt. Eine wichtige Rolle spielt dabei das laterale Plattenmesoderm. Hier bilden sich zunächst aus Herzvorläuferzellen in Höhe des späteren Vorderdarms zwei bilateral zur Mittellinie des Embryos liegende Herzfelder: Das kardiogene Mesoderm. Aus den Zellen des kardiogenen Mesoderms gehen im Laufe der Organogenese die myokardiale Muskulatur und später auch das Reizleitungssystem mit Purkinje-Fasern, Sinus- und Atrioventrikularknoten, sowie die endokardialen Polsterzellen der Herzklappen und Endothelzellen des Endokards hervor. Die Spezifizierung der Herzvorläuferzellen wird durch ein Wechselspiel von BMP-, FGF- und Wnt-Signalmolekülen, die ihrerseits die Expression verschiedener Proteine und Transkriptionsfaktoren induzieren oder inhibieren (z. B. Nkx2.5, SRF, GATAs), gesteuert [4] [8].

Mit der Bildung des Darmrohrs wandern die beiden Herzfelder aufeinander zu (Abb. 4: A). Dabei migrieren Zellen aus dem kardialen Mesoderm zum Endoderm nach der Mitte des Embryos. Erreichen sie die endodermale Wand des Vorderdarms, stoppt die Migration und die Zellen bilden das tubuläre Herz (Abb. 4: B) [4][8]. Während der Schließung des Vorderdarms fusionieren die beiden endokardialen Schläuche an der Mittellinie des Embryos und bilden das Endokard. Nach kurzer Zeit löst sich die Zellschicht in der Fusionszone auf, so dass ein unpaarer

2. Grundlagen

Herzschlauch entsteht (Abb. 4: C-D). Das verdickte kardiogene Mesoderm legt sich im gleichen Prozess um das Endokard und bildet das Myokard. Das Myokard wiederum wird nach außen vom perikardialen Zölom durch eine mesothelartige Zellschicht, dem Epikard, abgegrenzt. Das Epikard selbst wird durch zytisch vermittelte Migration epikardialer Vorläuferzellen von außerhalb des Herzens zum Myokard gebildet [9].

Bereits zum Zeitpunkt der Fusion der Herzschläuche nimmt das frühe Herz seine Funktion auf. Es beginnt zu schlagen und Nährstoffe vom Dottersack aus dem posterioren venösen Teil in den arteriellen anterioren Teil zu transportieren. Beim Huhn geschieht dies im HH-Stadium 10, bei der Maus im Stadium E8 und beim Menschen in der 4. Schwangerschaftswoche. Die Stärke der Herzschläge nimmt dabei mit Abschluss der Fusion des Endokards stetig zu.

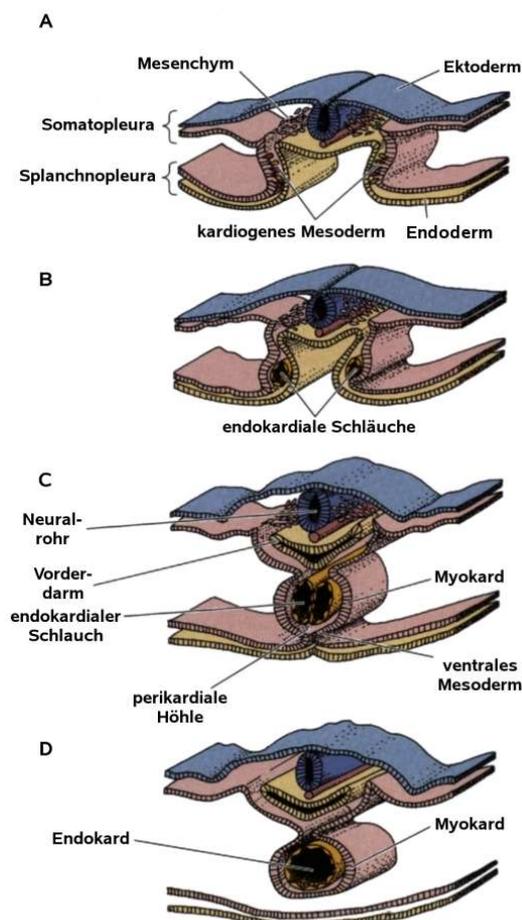


Abb. 4: Entstehung des tubulären Herzens beim Huhn [4]

Der entstandene tubuläre Herzschlauch wächst rasch in die Länge und beginnt sich zu krümmen. Bei der Krümmung des Herzens (*looping*) verändert sich die räumliche Lage der Atrien- und Ventrikelanlagen. Dabei werden die Anlagen der Atrien durch die Expression spezifischer morphogenetischer Regulatoren (z.B. Pitx2, HAND1, HAND2, N-Cadherin) zu einer links-rechts-Asymmetrie gezwungen, während die zunächst anterior-posterior orientierten Anlagen der Ventrikel durch das *looping* nebeneinander zu liegen kommen [8].

Während der Krümmung und Drehung des Herzens entstehen Ausbuchtungen am Schlauch (*ballooning*), welche die späteren Ventrikel und Atrien formen. Das Herz hat das *looping* beim Huhn im HH-Stadium 16, bei der Maus im Stadium E9 und beim Menschen Ende der 4. Woche vollständig abgeschlossen. Im weiteren Entwicklungsprozess erfolgt ein Dickenwachstum der Muskelschicht und die Septierung der Herzkammern. Das Herz hat seine endgültige Form nun nahezu erreicht, unterhält einen umfangreichen Dotter- und Körperkreislauf und hat ein Volumen von ungefähr 25 % des gesamten Keimvolumens.

2.3 Die Popeye-Genfamilie

Bei den Vertretern der *Popeye domain-containing* Genfamilie (auch *Popdc*-Gene genannt) handelt es sich um Gene, welche vor allem in der Skelett-, Glatt- und Herzmuskulatur vorkommen. Besonders stark sind sie in embryonalen Muskelgeweben exprimiert, weshalb sie wahrscheinlich eine wichtige Rolle während embryonaler und fötaler Entwicklung spielen. In geringerer Stärke treten sie jedoch auch in den neuronalen Zellen des Gehirns, des Rückenmarks und der Ganglien sowie in verschiedenen Epithelzellen auf.

Die *Popeye*-Familie umfasst drei Mitglieder, deren Expressionsmuster im Laufe der Evolution konserviert blieb: Bisher sind in den Vertebraten die Gene *popdc1/bves*, *popdc2* und *popdc3* in Mensch, Maus, Huhn und Zebrafisch identifiziert sowie *Popdc*-homologe Gene in Ratte, *Xenopus* und *Branchiostoma* und *Ciona intestinalis* gefunden worden. Auch bei dem Invertebrat *Drosophila melanogaster* wurde ein *Popdc*-entsprechendes Gen entdeckt.

Die *Popdc*-Proteine zeigen in ihrer Sequenz gemeinsam eine hoch konservierte 70 Aminosäuren lange Region, die – wie Computeranalysen der Sekundärstruktur ergaben – für drei Transmembranodomänen kodiert. Der C-Terminus der *Popdc*-Proteine befindet sich auf intrazellulärer Seite der Plasmamembran und trägt ebenfalls eine, für jedes *Popdc*-Gen spezifische,

hoch konservierte Domäne: die *Popeye*-Domäne. Sie ist an Homodimerisation beteiligt, wird dabei durch Disulfidbrücken stabilisiert und interagiert möglicherweise mit anderen Proteinen. Das N-terminale Ende dagegen liegt extrazellulär und besitzt zwei Glykosylierungsstellen, welche an Zelladhäsionen beteiligt zu sein scheinen [3][10].

Die genannten Merkmale machen die *Popeye*-Proteine zu einer einzigartigen Klasse von Molekülen, die keine Homologien zu anderen Proteinfamilien aufweist.

2.3.1 Das *popdc2*-Gen

Während *popdc1/ bves* und *popdc3* tandemartig auf dem gleichen Chromosom lokalisiert sind – so auf Chromosom 3 des Huhns, Chromosom 10 der Maus und der chromosomalen Region 6q21 des Menschen – befindet sich das *popdc2*-Gen isoliert von den anderen beiden Genen auf Chromosom 1 des Huhns, Chromosom 16 der Maus und Chromosom 3 des Menschen [10]. *popdc2* wird außerdem hauptsächlich im Herzmuskel und kaum in den Skelettmuskeln exprimiert. Es unterscheidet sich damit deutlich von den anderen *Popdc*-Genen, welche gleichermaßen in beiden Muskeltypen auftreten. *Popdc2* ist deshalb für die Erforschung der embryonalen Herzentwicklung besonders interessant.

In situ Hybridisierungen von embryonalen Herzen der Maus und des Huhns zeigten, dass *popdc2*, ebenso wie *popdc1/ bves* und *popdc3*, nur in der myokardialen Schicht, nicht aber im Epikard oder Endokard exprimiert wird [3][11]. Schon während der Entstehung des kardiogenen Mesoderms wird es im Bereich der sich entwickelnden Herzfelder exprimiert. In Abb. 5 sind diese Bereiche bei einem Mäuseembryo durch Expression von LacZ, welches das *popdc2*-Gen ersetzt, deutlich zu erkennen. Im Stadium E7.5 liegt hier eine starke LacZ-Expression im Bereich der Herzfelder vor, während sich eine schwächere LacZ-Färbung über das umgebende, möglicherweise mesotheliale Gewebe ausbreitet.



Abb. 5: LacZ-Expression in *popdc2*-heterogen defizienten Mäuseembryonen. In den Embryonen der Stadien E7.5 und E8.5 können zwei unterschiedlich intensiv gefärbte Zellpopulationen beobachtet werden. Am Embryonaltag E7.5 handelt es sich bei der schwach gefärbten Zellpopulation vermutlich um mesotheliale Zellen, während die wesentlich intensiver gefärbten Zellen differenzierte Myozyten sind. Im Stadium E8.5 ist eine starke Färbung des sich bildenden tubulären Herzens zu erkennen, wohingegen die Zellen des Perikards, das aus dem Mesothel gebildet wird, schwächer gefärbt sind. Färbungen und Fotos: Alexander Fröse [unveröffentlicht].

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 murine Zelllinien

Fibroblastenzellen:	<i>popdc2</i> -defizient, Mitomycin C inaktiviert
embryonalen Stammzellen:	Wildtyp-Zellen
	<i>popdc2</i> -defizient heterozygot aus Klon 14
	<i>popdc2</i> -defizient homozygot aus Klon 23

3.1.2 Geräte

Binokular	MZFL III, Leica
Elektrophoresekammern	BIO RAD
Eppendorfgefäßschüttler	Thermomixer 5436, Eppendorf
Fettstift (PapPen)	Sigma
Digitalkameras	PDMC-3, Polaroid
	ProgRes C12, Jenoptik
Heizblock	Techne DRIDB-Block 24
Kryotom	Jung Frigocut 2800 E, Leica
Magnetrührer	IKAMAG RCT
Mikroskope	DM RBE, Leica
	Telaval 31, Zeiss
PCR-Maschine	T3 Thermocycler, Biometra
	T-Gradient, Biometra
Photometer	Ultraspec 2100 pro, Amersham

Pipetten	Gilsen
	Eppendorf
Zentrifugen	Centrifuge 5414, Eppendorf
	Centrifuge 5804R, Eppendorf
Vortexer	Certomat MW
Wärmewasserbad	GFL
Zellinkubatoren	Heraeus

3.1.3 Verbrauchsmaterial

Bakterienkulturschalen	Nunc
Einbettformen	Agar Scientific
Deckgläschen	Assistent
Bakterienkulturschalen	Nunc
Objektträger	Menzel-Gläser
PP-Röhrchen 15ml, 50ml	Greiner
Vakuum Sterilfiltergerät	Vacuflo PV 050/3 0,2 µm, Schleicher&Schuell
Zellkulturschalen 6 cm, 9 cm	Nunc

3.1.4 Chemikalien

Agar-Agar	Roth
Agarose NEE0 Ultra Qualität	Roth
Aminosäuren, nicht essentiell	Gibco BRL
5x AMV-Reverse Transkriptase-Puffer	Promega
Aqua-Phenol	Roth
Chloroform	J. T. Baker
DAB (Diaminobenzidin)	Sigma
DMEM low Glucose	Gibco BRL
DMEM 25 mM Hepes	Gibco BRL
DNA Leiter, 100 Bp	Roth
DTT (Dithiothreitol) (100 mM)	Promega
EGTA	Sigma

3. Material und Methoden

EDTA	Roth
Ethanol	Fluka
Ethidiumbromid	Sigma
FCS (fötales Kälberserum)	PAA
Formaldehyd 37 %	Sigma
Gelatine	Sigma
Geneticin G418 Sulfat	Gibco BRL
L-Glutamin	PAA
Glutaraldehyd 25%	Sigma
Glykogen	USB
Guanidinium Isothiocyanat	Fluka
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Roth
$K_3Fe(CN)_6$	Sigma
$K_4Fe(CN)_6$	Sigma
LIF	ESGRO, Chemikon International
Magnesiumchlorid	Merck
β -Mercaptoethanol	Fluka
Mowiol	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdesoxycholat	Sigma
NaN_3 (Natriumazid)	Sigma
NP40 (IGEPAL)	Sigma
dNTPs (10 mM)	Promega
Oligo-(dT)-Primer (0,1 mM)	Promega
PBS-Tablette (für Zellkultur)	Gibco
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA
Phenol/ Chloroform	Roth
Pferdeserum	Dianova
Polyfreeze Einfriermedium	Polysciences

Saccharose	Roth
Sarcosyl	Sigma
5x Transkriptionspuffer für DNase	New England Biolabs
10x Transkriptionspuffer für PCR	Promega
Tris	Biosolve LTD
Tween 20	Merck
Wasserstoffperoxid	Merck
X-Gal	Sigma

3.1.5 Antikörper

Maus K1 anti-Mesothelin	Zymed Laboratories
HRP-konjugiertes Pferd anti-Maus IgG	Vector Laboratories

3.1.6 Enzyme

AMV-Reverse Transkriptase	Promega
RNasin (40 U/μl)	Promega
RQ1-DNase	Promega
Taq-Polymerase	Takara
Trypsin-EDTA (10x)	PAA

3.1.7 Primer

Bezeichnung	Richtung		Sequenz	
GAPDH	fw	5' >	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG	< 3'
	rv	5' >	ATC GAA GGT GGA AGA GTG GG	< 3'
popdc2	fw	5' >	CTA CGC TGT GGA GGG GGA GAC	< 3'
	rv	5' >	CTG AGA AGA GGC GGG AGA TGT AT	< 3'
lacZ	fw	5' >	CCG TTG ATG TTG AAG TGG CG	< 3'
	rv	5' >	AGC GGT GAA GTG CCT CTG GA	< 3'
popdc1	fw	5' >	GGA CGG CCT GCA CCA CTT TCT	< 3'
	rv	5' >	TGG CCC TCC CTC ACT TCC CTT CT	< 3'
popdc3	fw	5' >	AGA CCC ACA GAG GAA GGC ATT TT	< 3'
	rv	5' >	CTG TCG TTC AAG GCA TAG AGT TT	< 3'

3.1.8 Gebrauchslösungen

10x PBS

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O2 g KH₂PO₄auf 1 L mit bidest. H₂O auffüllen

10x TBE pH 8

108 g Tris

55 g Borsäure

7,4 g EDTAauf 1 L mit bidest. H₂O auffüllen

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von embryonalen Stammzellen

Damit embryonale Stammzellen (ES) ihren totipotenten Charakter aufrecht erhalten können, müssen sie auf einer Schicht aus Helferzellen, so genannten *feeder*-Zellen, kultiviert werden. Bei den *feeder*-Zellen handelt es sich um embryonale Fibroblasten, die verschiedene Wachstumsstoffe absondern, welche die embryonalen Stammzellen im undifferenzierten Zustand halten. Vor ihrem Einsatz als *feeder*-Zellen sind die Fibroblasten mit Mitomycin C behandelt worden, um ihre Zellteilung zu verhindern. Aus *popdc2*-defizienten Mausembryonen präparierte und mit Mitomycin C behandelte Fibroblasten wurden freundlicherweise von Stephanie Breher zur Verfügung gestellt.

Zunächst werden die *feeder*-Zellen auf eine mit 0,2 % Gelatine beschichtete 9 cm Zellkulturschale, befüllt mit 7 ml *feeder*-Zell-Medium, ausgesät. Das *feeder*-Zell-Medium enthält DMEM (mit wenig Glukose) mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin und 50 µg/ml Penicillin/ Streptomycin. Bereits nach wenigen Stunden Inkubation bei 37 °C und 10 % CO₂ können die embryonalen Stammzellen auf die *feeder*-Zellen ausgesät werden. Hierfür wird das *feeder*-Zell-Medium abgenommen und durch 7 ml ES-Medium, welches aus DMEM (mit 25 mM HEPES) mit 15 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Penicillin/ Streptomycin, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren, 0,05 mM β-Mercaptoethanol, 400 µg/ml G418 und 10³ units/ml LIF besteht, ersetzt. LIF (*leukemia inhibitory factor*) gehört zur Interleukin-6 Familie der Cytokine und verhindert die spontane Differenzierung der embryonalen Stammzellen.

Es erfolgt jeden Tag ein Mediumwechsel. Je nach Größe und Anzahl der Kolonien werden die embryonalen Stammzellen einer Kulturschale etwa jeden zweiten Tag auf mehrere neue Kulturschalen verteilt. Dies geschieht, indem das Medium abgenommen wird und die Zellen einmal vorsichtig mit 1x PBS gewaschen werden. Anschließend gibt man 3,5 ml 1x Trypsin auf die Zellen und inkubiert sie für 2 min bei 37 °C. Es ist darauf zu achten, dass die empfindlichen Zellen nicht zu lang trypsinisiert werden, da sie sonst absterben. Der Verdau wird durch Zugabe von mindestens 1 Volumen ES-Medium abgestoppt. Die Zellen werden nun für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in ES-Medium resuspendiert und entsprechend der

Menge der embryonalen Stammzellen auf zwei bis drei mit *feeder*-Zellen bewachsene Zellkulturschalen verteilt.

Die Inkubation der embryonalen Stammzellen und später der *embryoid bodies* erfolgt bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 6 %.

3.2.2 Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten

Die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten erfolgt über die Herstellung von *embryoid bodies* nach Maltsev et al. (1993) [12]. Hierfür werden konfluente Kulturen der embryonalen Stammzellen benötigt, die keine Merkmale einer beginnenden Differenzierung aufweisen sollten. Diese Stammzellen werden zunächst von den *feeder*-Zellen getrennt. Hierfür werden die Zellen trypsiniert (siehe 3.2.1 „Kultivierung von embryonalen Stammzellen“, Seite 18) und anschließend 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wird das Pellet in 7 ml ES-Medium aufgenommen und auf gelatinebeschichtete 9 cm Zellkulturschalen gegeben.

Die *Feeder*-Zellen heften sich, im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen, relativ schnell am Boden der Schalen an, so dass nach 20 min der Überstand abgenommen und auf eine neue gelatinierte Schale gegeben werden kann. Dieser Vorgang wird 2x wiederholt bis sich keine *feeder*-Zellen mehr unter den embryonalen Stammzellen befinden. Anschließend werden die Stammzellen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Zur Entfernung von LIF- und G418-Rückständen wird das Pellet in 5 ml 1x PBS aufgenommen und erneut 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Wiederaufnahme des Zellpellets erfolgt in 4 ml Differenzierungsmedium, welches einem ES-Medium mit 20 % FCS entspricht, jedoch kein LIF und G418 enthält.

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wird unter dem Mikroskop die Zellzahl ermittelt und anschließend die Zellsuspension mit Differenzierungsmedium auf 50.000 Zellen/ml verdünnt. Mit einer Mehrkanal-Pipette werden nun Tropfen zu je 20 µl (entspricht einer Zellzahl von 1000 Zellen/Tropfen) in den Deckel einer Zellkulturschale pipettiert. Der Deckel wird vorsichtig umgedreht und auf den mit 10 ml 1x PBS befüllten Boden der Schale aufgesetzt. Die so entstandenen „hängenden Tropfen“ werden für 2 Tage im Brutschrank inkubiert, wobei das PBS ein Austrocknen der Tropfen verhindert.

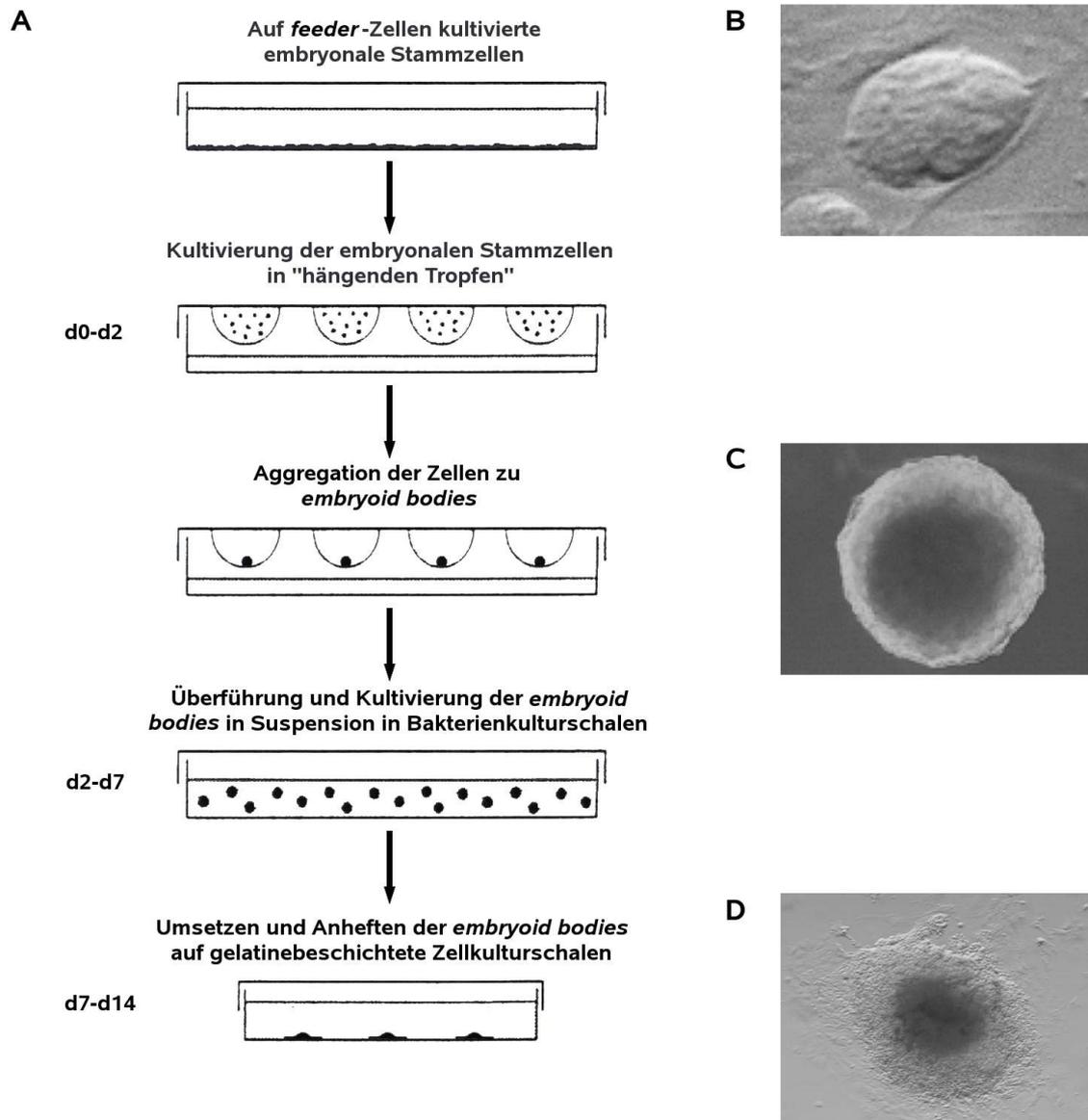


Abb. 6: (A) Arbeitsschema zur Herstellung von *embryoid bodies* nach Matlsev et al. (1993) [12]. (B) Kolonie muriner embryonaler Stammzellen auf *feeder*-Zellen. (C) 5 Tage alter *embryoid body*. (D) Angehefteter *embryoid body*, Tag 9.

Während der Inkubation aggregieren die embryonalen Stammzellen unter Schwerkraft zu *embryoid bodies*. Diese werden an Tag 2 in eine 9 cm Bakterienkulturschale überführt, indem

auf die obersten Tropfen des schräg gehaltenen Zellkulturschalendeckels 3 ml Differenzierungsmedium geträufelt werden. Die Tropfen fließen dann ineinander über, reißen sich mit und werden in der Bakterienkulturschale aufgefangen. Zur sicheren Überführung aller *embryoid bodies* wird die Innenseite des Zellkulturschalendeckels mit 3 ml Differenzierungsmedium nachgespült. Die sich in Suspension befindenden *embryoid bodies* werden nun für weitere 5 Tage im Brutschrank inkubiert.

An Tag 7 werden je 15 *embryoid bodies* mit einer Pipette auf gelatinebeschichtete 4 cm Zellkulturschalen umgesetzt, in die 3 ml Differenzierungsmedium vorgelegt wurde. Sie können sich nun am Schalenboden anheften und werden bis zu weitere 6 Tage inkubiert, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel mit frischem Differenzierungsmedium erfolgt.

3.2.3 LacZ-Färbung

Die freien *embryoid bodies* aus der Suspensionskultur und die angehefteten *embryoid bodies* werden zunächst zweifach mit 1x PBS gewaschen, um Rückstände der Kulturlösung zu entfernen. Anschließend werden die Zellen mit einer Fixierlösung, bestehend aus 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0,2 % Glutaraldehyd und 4 % Formaldehyd (alles gelöst in 1x PBS), bei RT für 3 min fixiert. Mit einer speziellen Waschlösung aus 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0,02 % NP40 und 0,01 % Natriumdesoxycholat, ebenfalls alles mit 1x PBS angefertigt, werden die fixierten Zellen 3 x 5 min bei RT gewaschen. Nach dem Entfernen der Waschlösung wird die Färbelösung auf die Zellen gegeben. Diese enthält 1 mg/ml X-Gal, 5 mM K₃Fe(CN)₆ und 5 mM K₄Fe(CN)₆, gelöst in Waschlösung. Die *embryoid bodies* werden in dieser Färbelösung für 2-4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Färbelösung zur Wiederverwendung abgenommen und die Zellen mit Waschlösung überschichtet. Die gefärbten *embryoid bodies* können nun bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.2.4 Immunhistochemische Färbung

Für die Färbung mesothelialer Zellen wird eine HRP-Färbung der LacZ-gefärbten freien *embryoid bodies* aus der Suspensionskultur und der angehefteten *embryoid bodies* durchgeführt. Dabei wird anti-Mesothelin aus der Maus als erster Antikörper eingesetzt. Der zweite Antikörper wurde aus dem Pferd gewonnen, ist gegen den ersten Antikörper gerichtet und an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt.

3. Material und Methoden

Zunächst werden die Zellen zur Verhinderung der Aktivität endogener Peroxidasen für 30 min in einer Lösung aus 3 % H₂O₂ und 1 % NaN₃ in 1x PBS bei RT inkubiert und anschließend 5 x 5 min gründlich in 1x PBS gewaschen. Um später den Antikörperverbrauch zu reduzieren, werden die freien *embryoid bodies* in ein Eppendorf-Gefäß überführt, während die angehefteten *embryoid bodies* mit einem Fettstift umrandet werden. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen der Antikörper erfolgt nun eine Inkubation der Zellen für 1 h bei RT mit Normalse- rum der Spezies, aus welcher der zweite Antikörper gewonnen wurde. In diesem Fall wird Pferdeserum, 1:20 in 1x PBS mit 0,05 % Tween 20 verdünnt, als Blockierungslösung eingesetzt. Tween 20 ist ein nichtionisches oberflächenaktives Detergenz, das es den Antikörpern möglich macht, in das Zytosol der Zellen einzudringen.

Nach dem Blockieren wird der erste Antikörper (1:75 in Blockierungslösung verdünnt) auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die *embryoid bodies* 3 x 5 min in 1x PBS gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper (1:200 in Blockierungslösung verdünnt) für 1 h bei RT inkubiert. Das Waschen der Zellen nach der In- kubation für 3 x 5 min mit 1x PBS entfernt den Überschuss an zweitem Antikörper. Ein an- schließendes zweimaliges Spülen für je 5 min mit 0,05 M Tris pH 7,6 bereitet auf die Färbere- aktion vor: 1 mg/ml 3,3-Diaminobenzidin und 0,03 % H₂O₂, gelöst in 0,05 M Tris pH 7,6, wird auf die Zellen gegeben und die Farbentwicklung unter dem Mikroskop beobachtet. Je nach ge- wünschter Farbintensität wird die Reaktion nach etwa 5-7 min durch Zugabe von 1x PBS gestoppt. Die *embryoid bodies* können anschließend bei 4 °C in 1x PBS gelagert werden.

Während des gesamten Arbeitsablaufs ist darauf zu achten, dass die Zellen stets mit einem Feuchtigkeitsfilm bedeckt sind und nicht austrocknen. Sämtliche Inkubationsschritte bei den angehefteten *embryoid bodies* erfolgen deshalb in einer mit angefeuchtetem Filterpapier ausge- legten Kammer.

3.2.5 Gefrierschnitte

Nach der LacZ- und immunhistochemischen Färbung werden die *embryoid bodies* in 1x PBS gewaschen und nochmals für 10 min in 0,2 % Glutaraldehyd, verdünnt in 1x PBS, fixiert. Um ein Platzen der Zellen beim Einfriervorgang zu verhindern, werden die *embryoid bodies* nach dreifachem gründlichen Waschen in 1x PBS für 12 h bei 4 °C in 30 %ige Saccharoselösung, welche ebenfalls mit 1x PBS angesetzt wurde, eingelegt. Anschließend werden die präparierten

embryoid bodies mittels einer 1000 ml Pipette mit abgeschnittener Spitze in mit Polyfreeze befüllte Einbettformen überführt. Dabei ist darauf zu achten, dass so wenig wie möglich Saccharoselösung in das Polyfreeze gelangt. Mit einer Nadel werden die *embryoid bodies* ausgerichtet und eventuell vorhandene Schlieren von Saccharose im Polyfreeze beseitigt. Die Einbettformen werden nun auf Trockeneis gelegt, so dass das Polyfreeze gefriert. In Folie verpackt können die eingebetteten *embryoid bodies* bei -80 °C gelagert werden. Mit dem Kryostat werden 12 µm dicke Schnitte auf unbeschichtete Objektträger angefertigt.

3.2.6 Eindeckeln der gefärbten Gewebe und Gefrierschnitte

Die angefertigten Gefrierschnitte der *embryoid bodies* werden vorsichtig 3 x 5 min mit 1x PBS zur Entfernung des Polyfreeze gewaschen. Zum Eindeckeln der gespülten Gefrierschnitte und der LacZ- und antikörpergefärbten angehefteten *embryoid bodies* wird Mowiol verwendet. Dieses wird vor seiner Verwendung 30 min bei RT zentrifugiert, um Blasenentwicklung nach dem Aufbringen der Deckgläschen zu vermeiden.

3.2.7 RNA-Isolierung

Von den embryonalen Stammzellen und von den 2 bis 10 Tage alten *embryoid bodies* wird die totale RNA isoliert. Die hierfür verwendeten embryonalen Stammzellen werden nach der Abtrennung von den *feeder*-Zellen (siehe „Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten“) aus 1,5 ml Überstandslösung durch Zentrifugation in einem Eppendorf-Gefäß gewonnen. Je 15 *embryoid bodies* jeden Alters werden ebenfalls separat in Eppendorf-Gefäße überführt. Bereits angeheftete *embryoid bodies* werden mit einer Pipette vorsichtig vom Boden der Kulturschale abgenommen. Bis zur Durchführung der RNA-Isolierung können die Proben mit möglichst wenig Kulturlösung bei -80 °C gelagert werden.

Die Isolierung der totalen RNA erfolgt nach dem Protokoll von Chomzynski & Sacchi (1987), verändert für kleine Gewebemengen nach Schultheiss et al. und Münsterberg et al. (1995). Während des gesamten Arbeitsvorgangs ist darauf zu achten, dass die Proben zwischen den einzelnen Schritten stets auf Eis gelagert werden, um ständig gut gekühlt zu sein und damit die RNasen zu inhibieren.

Zunächst werden die embryonalen Stammzellen und *embryoid bodies* durch Zugabe von 200 µl einer Lösung, welche 4 M Guanidiniumisothiocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH 7,2 und

3. Material und Methoden

0,5 % Sarcosyl enthält, unter Zusatz von 2 μl β -Mercaptoethanol vollständig solubilisiert. Durch Zugabe von 20 μl 2 M Natriumacetat pH 4,0 werden für die spätere Nucleinsäurefällung durch Ethanol monovalente Kationen bereit gestellt. Nach 10 s Vortexen erfolgt eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Entfernung der Proteine und Abtrennung der DNA. Hierbei wird 200 μl Roti-Aqua-Phenol zugegeben, 10 s gevortext, 40 μl Chloroform/ Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1 zugesetzt und wiederum 10 s lang gevortext. Phenol und Chloroform denaturieren die Proteine, wobei sich in dem Aqua-Phenol zusätzlich DNA löst und Chloroform die Löslichkeit der RNA-haltigen wässrigen Phase in der organischen phenolischen Phase reduziert. Der Zusatz des Isoamylalkohols verhindert ein Schäumen während des Mischvorgangs.

Zur Beschleunigung der Phasentrennung werden die Proben nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis 10 min lang bei 4 °C und 14.000 upm zentrifugiert. Hiernach haben sich die Proteine hauptsächlich in der Interphase angesammelt. Die obere RNA-haltige wässrige Phase wird deshalb vorsichtig in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 μl Rnase freiem Glykogen mit einer Konzentration von 35 mg/ ml versetzt. Nach Zugabe von 500 μl 96 %igen Ethanol werden die Nucleinsäuren mindestens 1 h bei -80 °C gefällt. Hierbei bildet die RNA zusammen mit den Kationen des Natriumacetats einen unlöslichen Niederschlag. Das Glykogen dient bei eventuell geringer RNA-Konzentration (< 10 $\mu\text{g/ml}$) als Carrier der Nucleinsäuren. Es wird ebenfalls durch Ethanol präzipitiert und fällt so die kleinen RNA-Mengen mit aus.

Nach der Fällreaktion werden die Proben für 20 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets werden zweimal mit 80 %igem Ethanol zur Entfernung der Salze gewaschen, kurz luftgetrocknet und in 40 μl Wasser resuspendiert. Anschließend wird die restliche DNA durch Zugabe von 2 μl DNase, 10 μl entsprechenden 5x Transkriptionspuffers und 1 μl RNasin (zur Inhibierung der RNasen) und Inkubation für 1 h bei 37 °C entfernt. Durch eine erneute Extraktion mit 53 μl Phenol/ Chloroform wird die RNA gereinigt und aus dem wässrigen Überstand nach Zusatz von 10 μl 2 M Natriumacetats pH 4,5 und 150 μl 96 %igen Ethanols für mindestens 1 h bei -80 °C präzipitiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 upm werden die Pellets einmal mit 80 %igem Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und in 10 μl Wasser aufgenommen. Die isolierte RNA kann bei -80 °C gelagert werden.

3.2.8 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung isolierter RNA

Die Konzentration der RNA wird über die Optische Dichte (OD) photometrisch bei 260 nm ermittelt, wobei vorausgesetzt wird, dass eine $OD_{260} = 1$ einer Menge von 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA entspricht. Die Verunreinigung der RNA mit Proteinen wird über den Quotient OD_{260}/OD_{280} abgeschätzt. Eine reine RNA-Lösung hat dabei einen Wert von $OD_{260}/OD_{280} = 2,0$. Kontamination durch Proteine verschieben den Wert des Quotienten nach unten.

Um den Degradationsgrad der RNA durch RNasen beurteilen zu können, wird je 1 μl der isolierten RNA-Proben in einem 1 %igem Agarosegel bei 110 V aufgetrennt. Da die totale RNA zu etwa 95 % aus ribosomaler RNA besteht, sollten nach etwa 10 min Laufzeit bei einer guten Präparation die 28S- und die 18S-RNAs als zwei scharfe Banden zu sehen sein.

Zur Überprüfung der Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA wird ohne vorherige Reverse Transkription mit 50 ng jeder RNA-Probe eine PCR mit GAPDH-Primern durchgeführt.

3.2.9 RT-PCR

Da die Taq-Polymerase für eine Amplifikation nicht direkt die RNA als Matrize verwenden kann, wird diese vorher durch eine Reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben.

Zunächst erfolgt das spezifische Anlagern von Oligo-(dT)-Primern an den poly(A)-Schwanz der mRNAs. Es werden eingesetzt:

x μl	RNA (1,3 μg)
1 μl	Oligo-(dT)-Primer (0,1 mM)
x μl	H ₂ O
<hr/>	
13 μl	gesamt

Zur Auflösung der Sekundärstrukturen der RNA wird der Ansatz für 3 min bei 65 °C erhitzt und danach direkt auf Eis gekühlt.

3. Material und Methoden

Für die Synthesereaktion wird folgender Mastermix zum Ansatz hinzugefügt:

2,5 µl DTT (100 mM)
0,7 µl RNasin (40 U/µl)
2,5 µl dNTPs (10 mM)
0,7 µl AMV-Reverse Transkriptase
5 µl 5x AMV-Reverse Transkriptase Puffer
0,7 µl H₂O
12,1 µl gesamt

Der Reaktionsansatz von insgesamt 25,1 µl wird nun bei 42 °C, dem Temperaturoptimum der AMV-Reversen Transkriptase (isoliert aus dem Avian-Myoblastosis-Virus von Vögeln), für 1 h inkubiert. Zur Stabilisierung der Reaktion wird DTT (Dithiothreitol) zur Reduktion der Disulfidbrücken und RNasin zum Schutz der RNA vor RNasen eingesetzt.

Das Beenden der Synthesereaktion geschieht durch Aufkochen des Ansatzes für 2 min bei 100 °C. Die cDNA kann anschließend bei -20 °C aufbewahrt werden.

Die Amplifizierung der cDNA erfolgt mit einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Folgender Reaktionsansatz wird verwendet:

1 µl cDNA (50 ng)
1,6 µl dNTPs (10 mM)
0,5 µl Primer fw (0,1 mM/µl)
0,5 µl Primer rv (0,1 mM/µl)
0,3 µl rTaq-Polymerase
2 µl 10x Puffer
14,1 µl H₂O
20 µl gesamt

In die PCR-Maschine wird ein Programm mit sechs Stufen eingegeben:

Stufe	Temperatur	Dauer	
1	94 °C	5 min	
2	94 °C	1 min	←
3	T_A	1 min	↑
4	72 °C	1 min	→ zurück zu Stufe 2; 35 Zyklen →
5	72 °C	10 min	
6	4 °C	Pause	

T_A entspricht hierbei der jeweiligen Annealing-Temperatur der Primer.

3.2.10 Bestimmung der Annealing-Temperatur T_A der Primer

Um die optimale Annealing-Temperatur T_A der verwendeten Primer zu bestimmen, wird vor der eigentlichen PCR eine Temperaturgradienten-PCR gefahren. Hierbei können während eines PCR-Durchlaufs verschiedene Annealing-Temperaturen bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen getestet werden. Sinnvollerweise liegen die zu testenden Temperaturen im Bereich der theoretisch Annealing-Temperaturen, die folgendermaßen aus der Primersequenz ermittelt werden: Die Summe der Guanine und Cytosine wird mit dem Faktor 4, die Summe der Adenine und Thyrosine mit Faktor 2 multipliziert. Die theoretische Annealing-Temperatur in °C erhält man durch den Abzug von 4 nach der Addition der G/ C- bzw. A/ T-Produkte.

3.2.11 Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel

Jedem PCR-Produkt (20 µl) wird zur Beschwerung der DNA 4 µl 6x Ladepuffer zugesetzt und vermischt. Pro 50 ml 1 %igen flüssigen Agarosegels, angesetzt in 1x TBE, wird 4,5 µl Ethidiumbromid zugegeben, vermischt und in die mit einem Kamm ausgestattete Gelkammer gegossen. Nach dem Verfestigen des Agarosegels wird die Gelkammer samt Gel in die mit 1x TBE als Laufpuffer befüllte Laufkammer eingesetzt und der Kamm entfernt. Die vorbereiteten PCR-Produkte werden in die Taschen des Agarosegels pipettiert und die Elektroden der Laufkammer an die Stromversorgung angeschlossen. Nach einer Einstellung von 110 V werden nun die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Marker wird stets eine 100 bp Leiter eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 LacZ-Expression in *popdc2*-defizienten *embryoid bodies*

Zur Untersuchung der *popdc2*-Expression in aus embryonalen Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten wurden murine embryonale Stammzellen eingesetzt, denen über das LoxP-Cre-Rekombinasesystem das 1. Exon des *popdc2*-Gens durch ein LacZ-Gen mit NLS-Sequenz ersetzt wurde. Die Möglichkeit einer Selektion wurde dabei durch das gleichzeitige Einfügen eines Neomycin-Gens geschaffen. Sowohl bei den *popdc2* heterozygoten als auch bei den homozygoten Zellen wurde das LacZ-Gen nur auf je einem Allel eingefügt.

Die *popdc2*-defizienten embryonalen Stammzellen wurden freundlicherweise von Alexander Fröse bereitgestellt.

Die Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten erfolgte über die Methode der *embryoid bodies*. Hierbei aggregierten die embryonalen Stammzellen zu dreidimensionalen Gewebekugeln, die nach einigen Tagen Differenzierung in Suspensionskultur sich am Boden der Kulturschale anheften gelassen wurden.

Zur Kontrolle über die *popdc2*-Expression wurden nun *embryoid bodies* verschiedener Entwicklungsstufen der Kultur entnommen und eine LacZ-Färbung durchgeführt (Abb. 7).

Dabei fiel grundsätzlich auf, dass sich die *popdc2*-homozygoten Zellen zeitlich etwa einen halben bis einen Tag verzögert und generell weniger stark differenzierten als die heterozygoten Zellen. Bei einer Auszählung von je 15 *embryoid bodies* pro Genotyp und Tag kam es in den heterozygoten Zellen bei etwa 80 % der *embryoid bodies* zu einer starken Differenzierung zu Kardiomyozyten. Bei den homozygoten Zellen hingegen gab es in nur circa 35 % der *embryoid bodies* größere, zu Kardiomyozyten differenzierte Bereiche. Exemplarisch ist dies in der Aufnahme mehrerer *embryoid bodies* im Alter von 6 Tagen zu sehen (Abb. 7A).

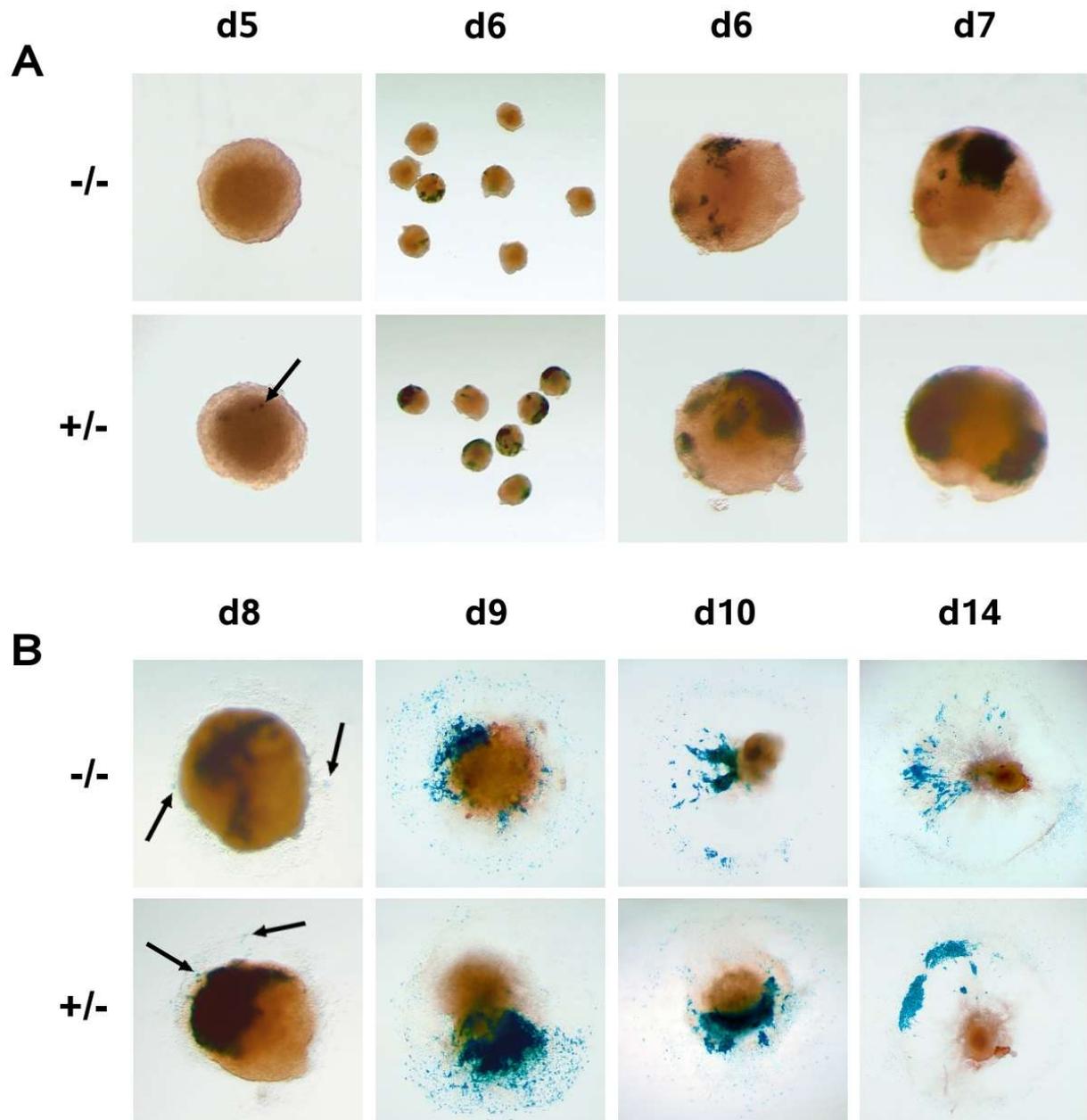


Abb. 7: LacZ-Färbung homo- und heterozygoter *popdc2*-defizienter Kardiomyozyten. (A) *embryoid bodies* aus Suspensionskultur. (B) *embryoid bodies* nach Anheftung.

Die allgemeine Entwicklung der Zellen zu Kardiomyozyten konnte über die LacZ-Färbung frühestens ab den 5. Tag der Kultivierung festgestellt werden. Bei den heterozygoten Zellen zeigten sich hier innerhalb der *embryoid bodies* stellenweise erste kleine Gruppierungen blau ge-

färbter Zellen (Abb. 7A: d5, Pfeil). Auf den 6. Tag erfolgt ein Entwicklungssprung, so dass bereits ganze Bereiche der *embryoid bodies* gefärbt sind, die mit Tag 7 noch größer werden. Die LacZ-Färbung der Kardiomyozyten ist dabei sehr intensiv. Mit dem Anheften der *embryoid bodies* an den Boden der Zellkulturschale ab Tag 7 erfolgt an der Stelle des Aufsetzens eine Auswanderung der Zellen vom Gewebeverband des *embryoid bodies* weg. Unter diesen Zellen befinden sich vereinzelt blau gefärbte Zellen (Abb. 7B: d8, Pfeile), deren LacZ-Färbung jedoch wesentlich schwächer als jene im Inneren der *embryoid bodies* ist.

Mit dem 2. Tag nach der Anheftung beginnen auch die großen Bereiche der Kardiomyozyten aus dem Inneren der *embryoid bodies* nach außen zu wandern, während gleichzeitig die Körper der *embryoid bodies* abflachen (Abb. 7B: d9, d10, d14).

Bei den stark LacZ-gefärbten Bereichen der *embryoid bodies* von Tag 8 bis 14 handelt es sich um kontrahierende Einheiten von Kardiomyozyten. Obwohl schon in den *embryoid bodies* im Alter von 6 und 7 Tagen große, blau gefärbte Bereiche vorhanden waren, konnten erst nach der Anheftung ab Tag 8 Kontraktionen der Kardiomyozyten beobachtet werden. Auch während des Auswanderns der Zellen behielten diese Kardiomyozyten ihre kontraktile Aktivität, während die einzelnen schwach LacZ-gefärbten Zellen nie Kontraktionen zeigten.

4.2 Anfärbung mesothelialer Zellen

Nach der LacZ-Färbung der *embryoid bodies* wurde überprüft, ob es sich bei den Zellen, in denen *popdc2* nur schwach exprimiert wird, um Mesothelzellen handelt. Hierfür wurden die *embryoid bodies* zusätzlich immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Mesothelin, einem Differenzierungsantigen mesothelialer Zellen, behandelt (Abb. 8).

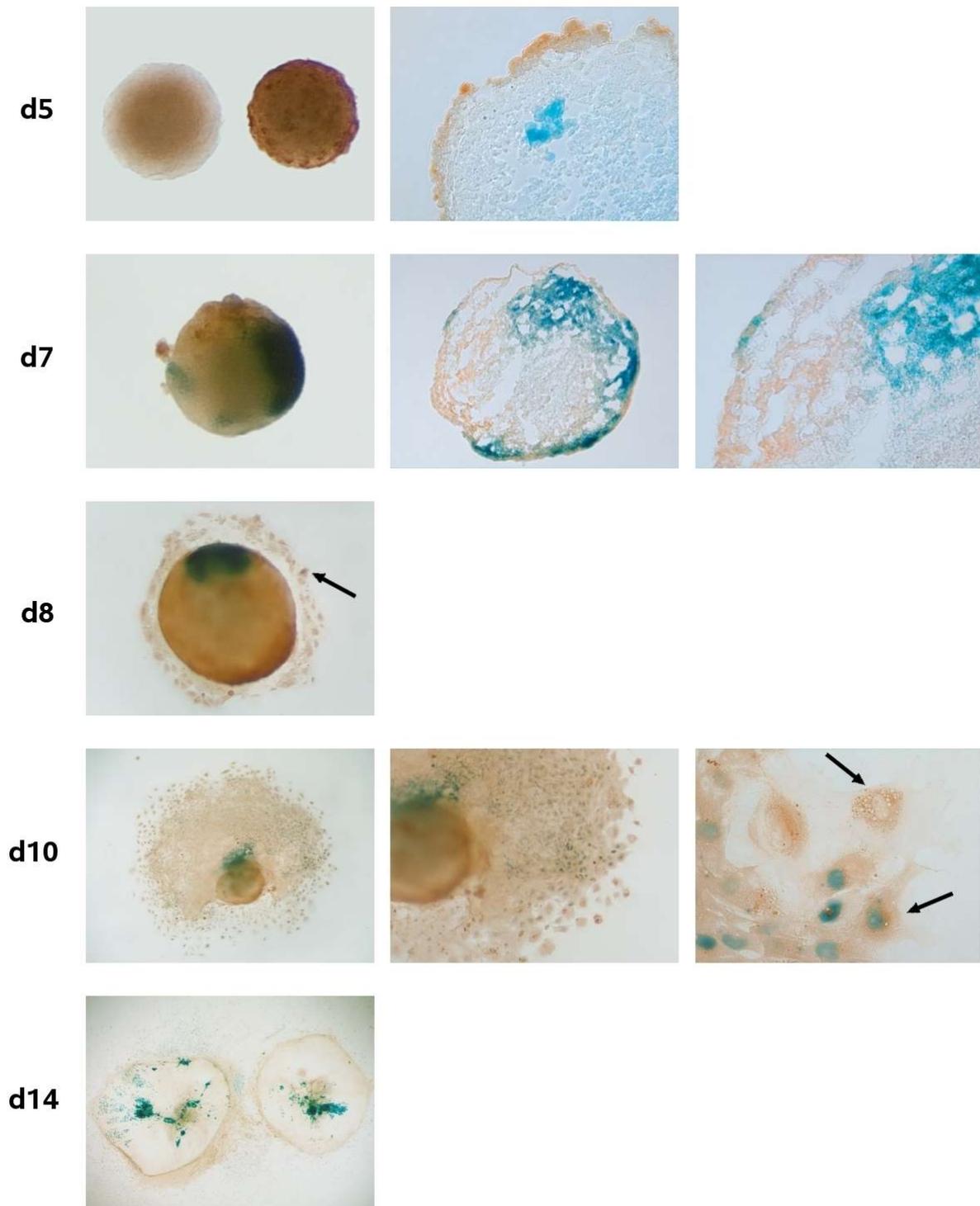


Abb. 8: LacZ-Färbung *popdc2*-defizienter Kardiomyozyten und immunhistochemische Detektion von Mesothelin

Bei den 5 Tage alten *embryoid bodies* treten nur Färbungen des Mesothelins in der äußeren Zellschicht auf. Deutlich von diesen bräunlich gefärbten Zellen abgegrenzt, sind beim Dünnschnitt LacZ-gefärbte blaue Zellen im Inneren eines *embryoid bodies* sichtbar. Bei den 7 Tage alten *embryoid bodies* ist zu sehen, dass es sich bei der Färbung der äußeren Zellschicht nicht um ein Artefakt aufgrund eines Geweberandes handelt. Hier geht die Färbung des Mesothelins stellenweise bis tief in das Innere des Gewebes. Zusätzlich kann die Färbung des Mesothelins örtlich zusammen mit der LacZ-Färbung, die nun auch am Geweberand zu sehen ist, auftreten.

Kurz nach der Anheftung der *embryoid bodies* wandern Zellen aus dem Gewebeverband aus (Vgl. 4.1 „LacZ-Expression in *popdc2*-defizienten *embryoid bodies*“, Seite 28). In allen diesen Zellen ist das Mesothelin angefärbt worden. Unter den Zellen gibt es vereinzelt auch jene Zellen, deren Kern LacZ-gefärbt ist (siehe Abb. 8: d8, Pfeil). Bei allen nachfolgend auswandernden Zellen ist das Mesothelin ebenfalls in jeder Zelle reichlich vorhanden. Seine Färbung tritt dabei nur an der Zellmembran und am Golgi-Apparat, nicht aber im Zytoplasma oder im Zellkern auf. Parallel zur Braunfärbung des Mesothelins ist in vielen Zellen der Kern blau gefärbt. Dagegen gibt es jedoch keine Zellen, in denen zwar *popdc2*, nicht jedoch Mesothelin exprimiert wird (Abb. 8: d10, Pfeile).

Bei weiterer Inkubation wird um das Zentrum des angehefteten *embryoid bodies* eine Art Kranz aus Mesothelin-gefärbten Zellen deutlich (Abb. 8: d14), der in seiner Form bei nicht immunhistochemisch gefärbten *embryoid bodies* nur erahnbar war (Vergleich Abb. 7B: d14). Nur innerhalb dieses Ringes befinden sich die kontrahierenden Bereiche stark LacZ-gefärbter Kardiomyozyten, während die schwächer LacZ-gefärbten Zellen außerhalb liegen.

4.3 Vergleichende Expression der *Popeye*-Gene bei *popdc2*-defizienten Zellen

GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) oxidiert in der Glykolyse zusammen mit NAD^+ das Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat und wird in jeder Zelle gleich stark exprimiert. Es wurde daher als interner Mengenstandard für die RT-PCR eingesetzt.

Zur Überprüfung einer Kontamination der isolierten RNA mit genomischer DNA wurde eine PCR mit GAPDH-Primern ohne vorherige Reverse Transkription durchgeführt (Abb. 9A).

Leider sind vor allem bei der RNA der Wildtyp-Präparate Rückstände genomischer DNA zu finden.

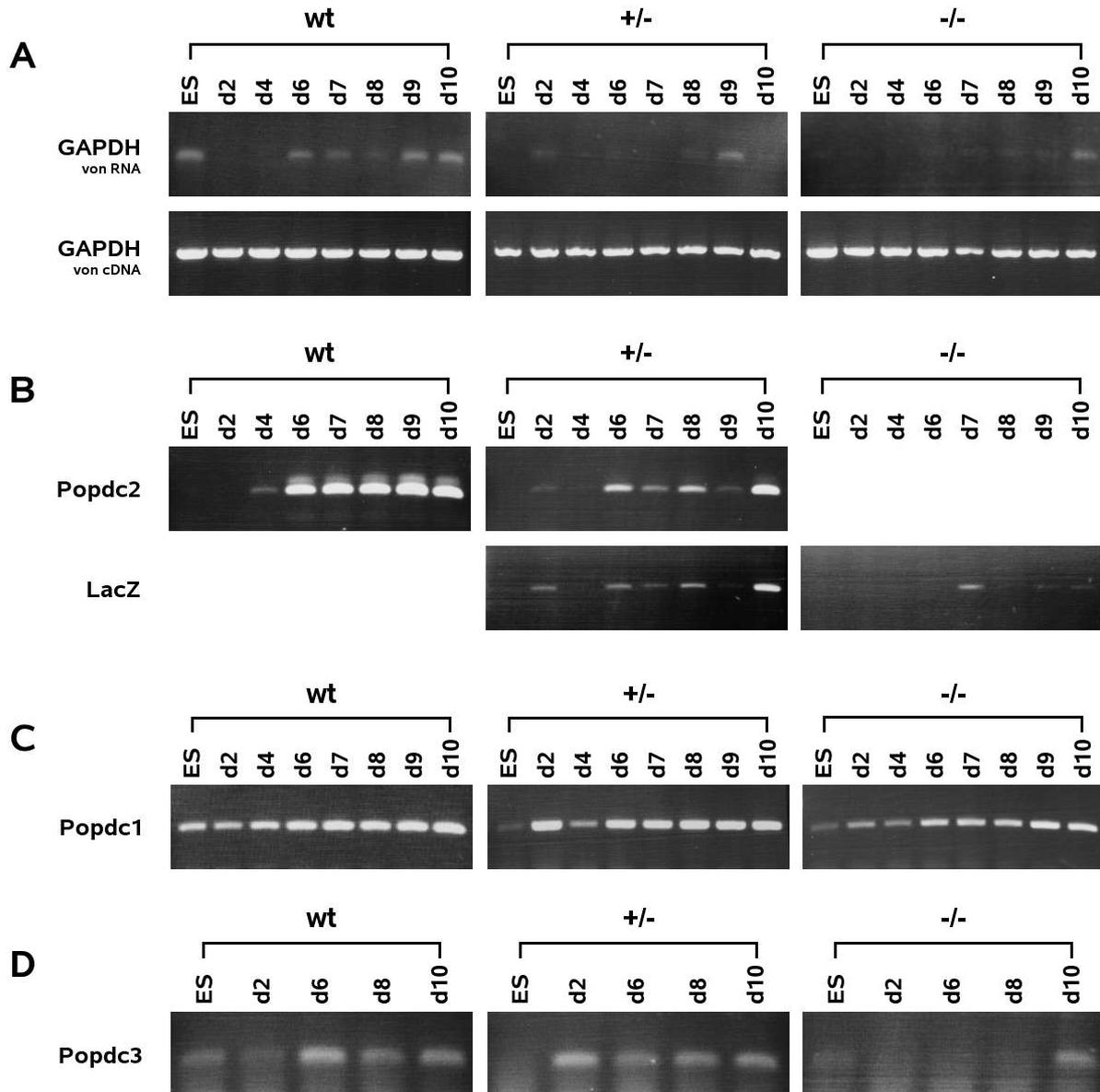


Abb. 9: Expression der *Popeye*-Gene in embryonalen Stammzellen (ES) und *embryoid bodies* verschiedenen Alters aus Wildtyp-, *popdc2*-homo- und heterozygoten Zellen. Kontroll-PCRs mit GAPDH (A) sowie RT-PCRs von *popdc2* und *LacZ* (B), *popdc1* (C) und *popdc3* (D).

Eine stetige Expression des *popdc2*-Gens mit Zunahme kardialer Differenzierung ist nur bei den Wildtyp-Geweben zu sehen (Abb. 9B). Erste *popdc2*-Transkripte sind hier in 4 Tage alten *embryoid bodies* erkennbar. Wie schon bei der LacZ-Färbung der Zellen beobachtet (siehe Abb. 7), erfolgt mit dem 6. Tag ein sprunghafter Anstieg der *popdc2*-Expression, deren Stärke mit zunehmendem Alter der *embryoid bodies* konstant bleibt. Dieser Sprung ist auch bei den *popdc2*-heterozygoten *embryoid bodies* zu erkennen, bei denen ansonsten die *popdc2*-Amplifikate der verschiedenen Altersstufen in ihrer Menge recht unterschiedlich sind. Die geringe Expression an Tag 2 ist vermutlich auf die in der RNA vorhandene Kontamination mit genomischer DNA zurückzuführen (Vgl. Abb. 9A).

Eine Kontrolle über eine zweite PCR, in der die unter dem *popdc2*-Promotor stehenden LacZ-Transkripte amplifiziert wurden, stimmt mit der *popdc2*-Expression überein. Bei den *popdc2*-homozygoten *embryoid bodies* wurde ebenfalls eine PCR mit LacZ-Primern durchgeführt, jedoch sind hier, außer an Tag 7, kaum Amplifikate vorhanden (Abb. 9B).

Ein anderes Expressionsmuster ist bei der Amplifikation der *popdc1*-Transkripte festzustellen (Abb. 9C). In allen Genotypen wird *popdc1*, im Gegensatz zu *popdc2*, schon in den embryonalen Stammzellen synthetisiert. Seine Expression wird mit zunehmender kardialer Differenzierung hochreguliert. Dabei zeigen die *popdc2*-heterozygoten Zellen eine ähnlich starke Expression wie die Wildtyp-Zellen, die *popdc2*-homozygoten Zellen eine etwas schwächere.

Bei der *popdc3*-Expression wiederum lässt sich bei allen Genotypen kaum ein einheitliches Expressionsmuster erkennen (Abb. 9D). Nur unter Berücksichtigung der genomischen DNA in der RNA von den embryonalen Stammzellen und *embryoid bodies* von Tag 6 der Wildtypen sowie der *embryoid bodies* von Tag 2 bei den Heterozygoten könnte man einen ähnlichen Expressionsverlauf von *popdc3* wie bei *popdc1* vermuten.

5. Diskussion

Nach der Aggregation von embryonalen Stammzellen zu *embryoid bodies* entwickeln sich zunächst die äußeren Zellen zu primitivem Endoderm (Hypoblast). Sie umhüllen die inneren Zellen, die sich zu einer weiteren pluripotenten Zellpopulation, dem primitivem Ektoderm (Epiblast), formieren. Nach 3-5 Tagen Inkubation beginnen die inneren Zellen ihre Pluripotenz zu verlieren und differenzieren zu den drei Keimblättern Ektoderm, Mesoderm und Endoderm [13][14]. Nachfolgende Differenzierungen führen zur Entwicklung vieler embryonaler und adulter Zelltypen.

Die Entstehung der Kardiomyozyten erfolgt aus den im Inneren der *embryoid bodies* gelegenen mesenchymalen Zellen des Mesoderms [15] (siehe Abb. 8: Dünnschnitt eines *embryoid bodies* d5). Dabei durchlaufen sie drei verschiedene Differenzierungsstufen: eine frühe, eine intermediäre und eine späte Stufe. In der frühen Phase sind die Kardiomyozyten meist klein und rund, wobei die Struktur ihrer Myofibrillen oftmals noch unorganisiert ist. Mit der Anheftung der *embryoid bodies* und der Reifung der Zellen gelangen die Kardiomyozyten in die intermediäre Phase. Sie haben nun gut entwickelte Myofibrillen und Sarkomere und fangen an, zu kontrahieren. Außerdem wurden an ihnen Zell-Zell-Kontakte beobachtet, welche mit denen der sich *in vivo* entwickelnden Kardiomyozyten übereinstimmen [16]. Im späten Stadium, ab etwa einem Alter von 25 Tagen, haben sich aus den Kardiomyozyten Atrium-, Ventrikel-, Sinusknoten- und Purkinje-ähnliche Zellen gebildet [15].

Die Methode der *embryoid bodies* hat den Vorteil, dass sich die Zellen im dreidimensionalen Verband befinden, was ihrer natürlichen Umgebung entspricht. Es sind daher jene Signale vorhanden, die *in vivo* die Aufrechterhaltung der Pluripotenz der Zellen bzw. deren Differenzierung kontrollieren.

Der Hauptunterschied zwischen der *in vivo* und der *in vitro* Entwicklung der embryonalen Stammzellen ist die fehlende Anlage der Körperachsen in den *embryoid bodies*. Die daraus resultierende Disorganisation der Zellen führt häufig zur unsachgemäßen Ausschüttung von in-

duktiven und milieubedingten Signalen und damit zu zeitlichen und räumlichen Fehlern bei der Anordnung von Geweben [17]. Entsprechend heterogen sind die Populationen innerhalb eines *embryoid bodies*, was dazu führt, dass die Entwicklung zu bestimmten Zelltypen zwar allgemein abschätzbar, im Detail jedoch nicht genau kontrollierbar ist.

5.1 Entwicklung der Kardiomyozyten aus *popdc2*-defizienten embryonalen Stammzellen

Das in das Genom der Stammzellen eingefügte LacZ-Gen liegt unter der Kontrolle des *popdc2*-Promotors. Eine Blaufärbung tritt daher nur in jenen Zellen auf, in denen zum gleichen Zeitpunkt auch das *popdc2*-Gen exprimiert würde. Die Färbung ist dabei aufgrund der in das LacZ-Gen eingefügten NLS-Sequenz im Zellkern lokalisiert (siehe Abb. 8: Vergrößerung des angehefteten *embryoid bodies* d10).

Jeder *embryoid body* hat ein individuelles Muster an LacZ-gefärbten Zellen, welches aus der spontanen Differenzierung der Stammzellen zu Kardiomyozyten entsteht. Das sich ergebende Bild bei der Auswanderung der Kardiomyozyten nach dem Anheften der *embryoid bodies* ist ebenfalls stark vom Zufall beeinflusst. Hier ist die Zahl der Kardiomyozyten sowie Zeitpunkt und Richtung ihrer Auswanderung stark von der Lage des *embryoid bodies* während der Anheftung abhängig. Heftet sich ein *embryoid body* mit einer Seite an, an der bereits große Bereiche zu Kardiomyozyten differenziert sind, so erfolgt die Auswanderung der Kardiomyozyten schnell und verstärkt. In jenen Anheftungsbereichen hingegen, in denen Kardiomyozyten weniger vertreten sind, ist die Auswanderung der Zellen etwas langsamer und schwächer.

Im Allgemeinen scheinen die *popdc2*-homozygoten Zellen verzögert und schlechter zu Kardiomyozyten zu differenzieren, als die heterozygoten Zellen. Die generelle Differenzierung zu Kardiomyozyten ist jedoch stark von der anfänglichen Zellzahl für die Aggregation zu *embryoid bodies*, von Medium, Wachstumsfaktoren und Zusatzstoffen, von dem Zeitpunkt des Anheftens der *embryoid bodies* und von den eingesetzten Zelllinien abhängig [18]. Schon geringere Abweichungen von der Zellzahl können zu einer Verschiebung im Entwicklungsprozess führen und dadurch einen Vergleich der Differenzierung zu Kardiomyozyten von unterschiedlichen Zelllinien erschweren.

Es ist daher möglich, dass die beobachtete schlechtere Differenzierung der *popdc2*-homozygoten Zellen nur ein Artefakt ist, und nicht zwangsläufig auf ein schlechteres Differenzierungspotential aufgrund des fehlenden *popdc2*-Gens schließen lässt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die verwendete homozygote Zelllinie nicht optimal differenziert. Für ein aussagekräftigeres Ergebnis müsste der Versuch daher mit einer *popdc2*-homozygoten Zelllinie eines anderen Klons durchgeführt werden.

5.2 *Popdc2* und Mesothelin werden koreguliert

Mesothelin ist ein in seiner biologischen Funktion noch weitgehend unbekanntes, Glycosylphosphatidylinositol-verknüpftes Glycoprotein, welches in mesothelialen Zellen, Mesotheliomen, im Epithel des Eierstockkrebses und in einigen Spinaliomen (verhornender Plattenepithelkrebs) exprimiert wird [19]. Es wird zunächst als ein Vorläufermolekül mit einer Masse von 69 kDa synthetisiert, wird dann jedoch proteolytisch in ein N-terminales 31 kDa großes MPF (*megakaryocyte-potentiating factor*)-Fragment und ein 40 kDa großes membrangebundenes Fragment gespalten [20].

Für die immunhistochemische Färbung der mesothelialen Zellen wurde ein K1 anti-Mesothelin Antikörper verwendet, der mit dem 40 kDa Fragment des Mesothelins reagiert [19]. Da dieses Fragment über das Phosphatidylinositol an Zellmembranen gebunden ist, entsprechen die Ergebnisse der Färbungen an der Zelloberfläche und am Golgi-Apparat (Abb. 8: d10, Vergrößerung) den Erwartungen.

Das Mesothelin wird zuerst in der epithelartigen äußeren Zellschicht der *embryoid bodies*, das heißt im primitiven Endoderm, exprimiert. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da mesotheliale Zellen ursprünglich aus dem mesodermalen Keimblatt, welches sich im Inneren der *embryoid bodies* entwickelt, hervorgehen.

Deutlich von der Mesothelin-exprimierenden äußeren Zellschicht entfernt entstehen im Inneren der *embryoid bodies* die ersten frühen Kardiomyozyten, die durch LacZ-Expression gekennzeichnet sind.

Im weiteren Entwicklungsverlauf wird das Mesothelin auch im mesenchymalen inneren Gewebe der *embryoid bodies*, in dem sich nun wahrscheinlich auch mesotheliale Zellen differenziert haben, exprimiert. Gleichzeitig treten stellenweise die LacZ- und Mesothelin-Färbung

gemeinsam in den Zellen auf, wobei diese auch in der äußeren Zellschicht der *embryoid bodies* lokalisiert sein können. Das bedeutet, dass ab diesem Zeitpunkt die *popdc2*- und Mesothelin-Expression koreguliert wird.

Nach der Anheftung der *embryoid bodies* wandern zuerst die Zellen des primitiven Endoderms der Außenschicht [13] und nachfolgend die Gewebezellen der Keimblätter aus, bis schließlich ein Kranz aus Zellen um das Zentrum der *embryoid bodies* entsteht. Innerhalb dieses Kranzes befinden sich die stark LacZ-gefärbten und außerhalb des Kranzes die schwächer LacZ-gefärbten Zellen. Mit der Auswanderung der Zellen bleibt die Koregulation von *popdc2* und Mesothelin bestehen, wobei in ausnahmslos jeder Zelle, in der LacZ synthetisiert wird, auch Mesothelin exprimiert wird.

Da jedoch alle auswandernden Zellen Mesothelin-gefärbt sind, ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei allen diesen Zellen um vom Mesoderm abstammende mesotheliale Zellen handelt. Vielmehr scheint es sich bei Mesothelin um ein Differenzierungsantigen zu handeln, welches nicht nur vom Mesothel abstammende Zellen charakterisiert, sondern auch in vielen der aus allen drei Keimblättern hervorgehenden (Vorläufer-)Zellen, sowie im primitiven Endoderm der *embryoid bodies* exprimiert wird.

Nichtsdestotrotz ist es wahrscheinlich, dass auch *in vivo* Mesothelin und *popdc2* zwar gleichzeitig aber unabhängig voneinander synthetisiert werden. Einen weiteren Hinweis hierfür liefert eine beobachtete Expression des Genfamilienmitglieds *popdc1/ bves* in einer epikardial-mesothelialen Zelllinie (EMC) [21].

Die Frage jedoch, ob es sich in einem Mäuseembryo im Stadium E7,5 bei den LacZ-gefärbten Zellen im Mesoderm abseits der Herzfelder um mesotheliale Zellen handelt, konnte mit der immunhistochemischen Färbung des Mesothelins in *embryoid bodies* nicht mit Sicherheit geklärt werden. Eine zusätzliche Untersuchungsmöglichkeit dieser Zellen würde sich durch eine Kontrolle über Kardiomyozyten-spezifische Marker ergeben.

5.3 *Popdc2* ist ein sehr früher kardiogener Marker, während *popdc1* schon in embryonalen Stammzellen exprimiert wird

Ein *in vitro* Vergleich der Expression der *Popdc*-Gene von Wildtyp und *popdc2*-Mutanten untereinander wird durch das heterogene Verhalten des *popdc2* im Expressionsmuster und die

geringe kardiale Differenzierung der *popdc2*-homozygoten *embryoid bodies* erschwert. Die Diversität im Expressionsverhalten ist wahrscheinlich auf die für die RT-PCR verwendete begrenzte Anzahl an *embryoid bodies* pro Entwicklungstag zurückzuführen. Bei den zufällig ausgewählten 15 *embryoid bodies* pro RNA-Isolierung gab es vermutlich größere Schwankungen im Entwicklungszustand. Auch wenn bei der LacZ-Färbung eine statistische Prozentzahl des Differenzierungsgrades von 80 % der Heterozygoten bzw. 35 % der Homozygoten ermittelt werden konnte, so gibt sie doch nur einen Überblick über den gesamten Entwicklungszeitraum. Schwankungen im Entwicklungszustand der wenigen für die RT-PCR ausgewählten *embryoid bodies* wirken sich daher stark auf das Expressionsbild aus.

Eine stetige Expression von *popdc2* während kardialer Differenzierung war über die RT-PCR nur bei den aus Wildtyp-Zellen generierten *embryoid bodies* zu sehen (Abb. 9B). Erste Transkripte des *popdc2*-Gens konnten hier bei 4 Tage alten *embryoid bodies* festgestellt werden. Der Zeitpunkt der frühesten Expression liegt damit einen Tag eher, als durch eine LacZ-Färbung *popdc2*-defizienter Zellen ermittelt werden konnte (Abb. 7A). Am 6. Tag – zwei Tage bevor die ersten Kontraktionen beobachtet wurden – wird die Expression stark hochreguliert und bleibt während der weiteren Differenzierung der Kardiomyozyten konstant.

Vergleicht man das Expressionsmuster von *popdc2* bei den Wildtyp-Zellen mit demjenigen anderer herzspezifischer Gene, so stellt man fest, dass *popdc2* zu den frühesten Markern kardialer Differenzierung zählt.

α - und β -cardiac myosin heavy chain (α -MHC, β -MHC) sowie myosin light chain isoform 2v (MLC2v) gehören zu den Hauptbestandteilen des kontraktiven Systems in Kardiomyozyten und werden als solche erst mit der Anheftung der *embryoid bodies* am Tag 7, das heißt mit Beginn der ersten Kontraktionen, stark exprimiert [22][15] (Abb. 10B/C). Das atrial natriuretic factor (ANF)-Protein, welches *in vivo* im rechten Atrium produziert wird, zeigt *in vitro* mit seinem ersten Auftreten an Tag 9 entsprechend eine zeitlich noch spätere Expression [15] (Abb. 10C).

Mehr Ähnlichkeiten zu *popdc2* hat dagegen das Expressionsmuster der herzspezifischen α_1 -Einheit des L-Typ-Kalziumkanals (α_1 CaCh) [15] (Abb. 10C). Hier wurden die ersten Transkripte an Tag 5 detektiert. Mit Beginn der Kontraktionen stellt sich auch hier eine höhere Expressionsstärke ein.

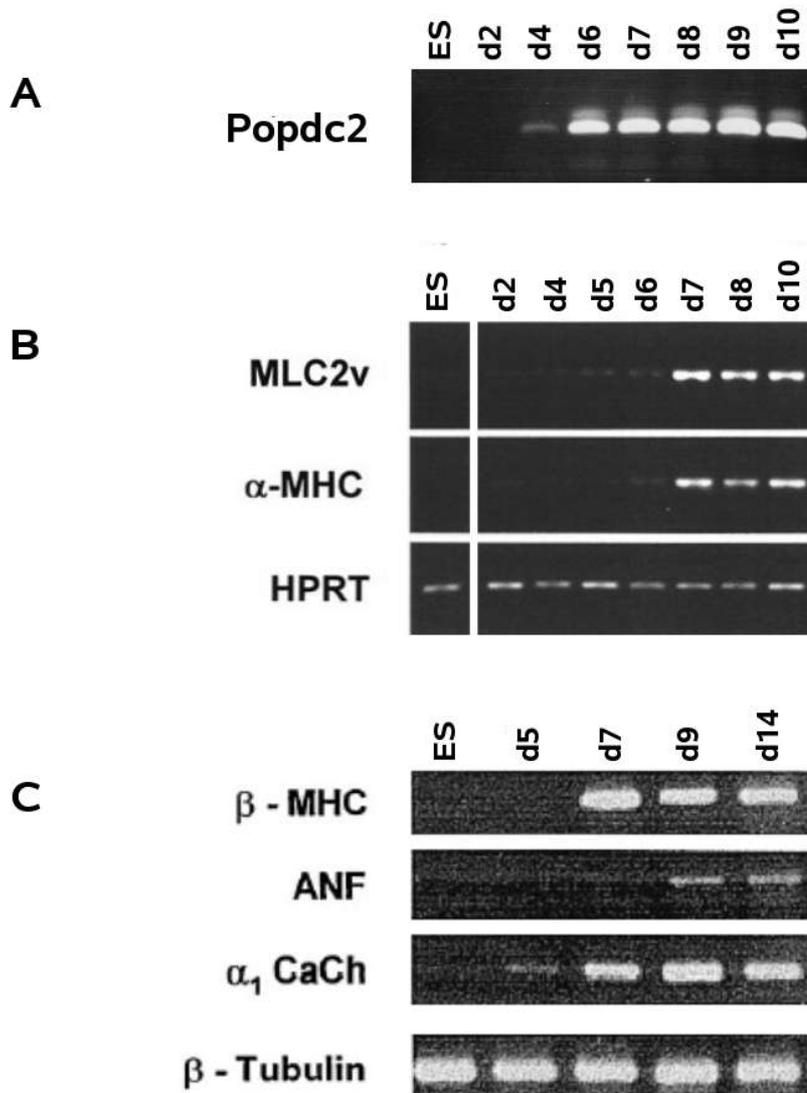


Abb. 10: Vergleich der Expression verschiedener herzspezifischer Gene bei der *in vitro* Differenzierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen des Wildtyps. (A) *popdc2*-Expression. (B) Expression der herzspezifischen Proteine MLC2v und α -MHC. HPRT diente als interner Standard. Parisi et al. (2003) [22]. (C) Expression von β -MHC, ANF und α_1 CaCh. Hier diente β -Tubulin als interner Standard. Hescheler et al. (1997) [15].

Die α_1 -Einheit setzt mit vier weiteren Einheiten den Ca^{2+} -Kanal vom L-Typ zusammen, der bei einer Änderung der Spannung des Aktionspotentials Kalziumionen in die Zelle hinein lässt. Dabei wird er über eine Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A reguliert

[23]. Die α_1 -Einheit selbst ist ein hydrophobes Polypeptid mit 4 Untereinheiten, von denen jede 6 Transmembrandomänen besitzt, an denen vermutlich aufgrund eine Kette positiv geladener Arginine und Lysine die Spannungssensoren des Kalziumkanals liegen [24][25]. Außer vorhandener Transmembrandomänen besitzen *popdc2* und α_1 CaCh keine weiteren strukturellen Gemeinsamkeiten, die auf eine Funktion von *popdc2* hindeuten könnten.

Popdc1 wird bereits in den embryonalen Stammzellen exprimiert (Abb. 9C). Bisher wurde die früheste Expression *in vivo* im HH-Stadium 4 des Hühnerembryos beobachtet. Mit einem polyklonalen Antikörper (B846) konnte eine Expression von *popdc1/bves* im Epiblast des posterioren Abschnitts des Embryos, an dem die Gastrulation noch nicht eingetreten ist, detektiert werden [21][26].

Die stetige Expression von *popdc1* mit der kardialen Entwicklung verläuft bei den *popdc2*-heterozygot defizienten *embryoid bodies* und den Wildtyp-*embryoid bodies* gleich. Bei der *popdc2*-homozygoten Zellen wurde *popdc1* zwar schwächer, aber ebenfalls stetig exprimiert. Dies ist insofern interessant, da sich die homozygoten *embryoid bodies* hier recht schlecht zu Myozyten differenziert haben und sich ihre LacZ-Expression über die RT-PCR, wie auch diejenige der Heterozygoten, zwischen den einzelnen Altersstufen als sehr unterschiedlich erwies. Trotzdem gibt es kaum Schwankungen in der Expression des *popdc1*.

Auch Transkripte von *popdc3* sind teilweise schon bei den embryonalen Stammzellen zu sehen (Abb. 9D). Wird die in der RNA vorhandene genomischen DNA berücksichtigt, könnte man einen ähnlichen Expressionsverlauf von *popdc3* wie bei *popdc1* vermuten. Es sollte hier jedoch der Versuch mit eventuell optimierteren Primern wiederholt werden.

Im Allgemeinen aber unterstützen die Beobachtungen im Verhalten der Expression die These, dass es sich bei *popdc1/bves* und möglicherweise auch bei *popdc3* um ein Zelladhäsionsprotein handelt, welches schon sehr früh, aber auf noch unbekannt Weise, am frühen embryonalen Entwicklungsprozess beteiligt ist [8][21].

Die geringe kardiale Differenzierung der *popdc2*-homozygoten *embryoid bodies* (wahrscheinlich aufgrund geringer Schwankungen der die Kultivierung beeinflussenden Faktoren) ist für die allgemein schwächere Expression von *popdc1/bves* und *popdc3* verantwortlich. Um herauszufinden, ob eine Nullmutation von *popdc2* eine Hochregulation von *popdc1* und/ oder

popdc3 zur Folge hat, müssten die *popdc2*-homozygoten *embryoid bodies* einen ähnlichen Differenzierungsgrad erreichen wie die Wildtyp-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die schlechte kardiale Differenzierung der *popdc2*-homozygot defizienten Zellen einen guten Vergleich bei der Expression der *Popeye*-Gene zwischen Wildtyp, Heterozygoten und Homozygoten verhinderte. Der Grund für den geringen Grad an Differenzierungen liegt wahrscheinlich nicht an einem verminderten Differenzierungspotential aufgrund der Nullmutation, sondern an geringen Schwankungen von die Kultivierung beeinflussenden Faktoren zusammen mit der gegebenen Spontanität des Entwicklungsprozesses. Eine Wiederholung des Experiments, eventuell mit einer *popdc2*-homozygoten Zelllinie eines anderen Klons, würde hier zu konkreteren Erkenntnissen führen.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *popdc2* zu den frühesten Markern der Herzentwicklung zählt und noch vor dem Auftreten anderer herzspezifischer Proteine wie α - und β -MHC, MLC2v und ANF exprimiert wird. *Popdc1* dagegen wird schon in den embryonalen Stammzellen synthetisiert.

Weiterhin konnte über eine immunhistochemische Färbung eine Koregulation von *popdc2* mit dem endogenen Mesothelin beobachtet werden. Es ließ sich hierbei jedoch nicht feststellen, ob es sich bei den angefärbten Zellen um mesotheliale Zellen handelt, da Mesothelin auch in nicht mesothelialen Zellen auftrat.

Obwohl es die *in vitro* Differenzierung also ermöglicht, einzelne Entwicklungsschritte der *in vivo* Kardiogenese zu beobachten, ist es aufgrund der auftretenden Individualität und Heterogenität in den Zellpopulationen innerhalb der *embryoid bodies* schwierig, konkrete zelluläre und molekulare Vorgänge zu verstehen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Sperelakis, N.: Cultured heart cell reaggregate model for studying cardiac toxicology. *Env. Health Persp.* 26, 243-267, 1978
- [2] Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., Robertson, E.: Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309 (5965), 255-256, 1984
- [3] Andrée, B., Hillemann, T., Kessler-Icekson, G., Schmitt-John, T., Jockusch, H., Arnold, H.-H., Brand, T.: Isolation and characterization of the novel Popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart. *Dev. Biol.* 223, 371-382, 2000
- [4] Gilbert, S. F.: *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, 2003
- [5] Müller, W. A.: *Developmental Biology*. Springer-Verlag, New York, 1997
- [6] Michel, G.: *Vergleichende Embryologie der Haustiere*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1995
- [7] Fredorko, M. E., Hirsch, J. G., Fried, B.: Studies on the transport of macromolecules and small particles across mesothelial cells of the mouse omentum. II. Kinetic features and metabolic requirements. *Exp. Cell Res.* 69, 313-323, 1971
- [8] Brand, T.: Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev. Biol.* 258, 1-19, 2003
- [9] Viragh, S., Challice, C. E.: The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat. Rec.* 201, 157-168, 1981
- [10] Brand, T.: The Popeye domain-containing gene family. *Cell Bioch. and Bioph.* 43, 1-9, 2005
- [11] Breher, S., Mavridou, E., Brenneis, C., Fröse, A., Arnold, H.-H., Brand, T.: Popeye domain containing gene 2 (Popdc2) is a myocyte-specific differentiation marker during chick heart development. *Dev. Dynamics* 229, 695-702, 2004
- [12] Maltsev V.A., Rohwedel J., Hescheler J., Wobus A.M.: Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech. Dev.* 44 (1), 41-50, 1993
- [13] Martin, G. R., Evans, M. J.: Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72 (4), 1441-1445, 1975

- [14] Doetschmann, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R.: The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morph.* 87, 27-45, 1985
- [15] Hescheler, J., Fleischmann, B. K., Lentini, S., Maltsev, V. A., Rohwedel, J., Wobus, A. M., Addicks, K.: Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc. Res.* 36, 149-162, 1997
- [16] Westfall, M. V., Pasyk, K. A., Yule, D. I., Samuelson, L. C., Metzger, J. M.: Ultrastructure and cell-cell coupling of cardiac myocytes differentiating in embryonic stem cell cultures. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 36, 43-54, 1997
- [17] Rathjen, R., Rathjen, P. D.: Lineage specific differentiation of mouse ES cells: formation and differentiation of early primitive ectoderm-like (EPL) cells. *Methods in Enzymology* 365, 3-25, 2003
- [18] Wobus, A. M., Guan, K., Yang H.-T., Boheler, K. R.: Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol. Biol.* 185, 127-156, 2002
- [19] Chang, K., Pastan, I.: Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 136-140, 1996
- [20] Bera, T. K., Pastan, I.: Mesothelin is not required for normal mouse development or reproduction. *Mol. Cell. Biol.* 20 (8), 2902-2906, 2000
- [21] Osler, E., Bader, D. M.: Bves expression during avian embryogenesis. *Dev. Dynamics* 229, 658-667,
- [22] Parisi, S., D'Andrea, D., Lago, C. T., Adamsom, E. D., Persico, M. G., Minchiotti, G.: Nodal-dependent Cripto signaling promotes cardiomyogenesis and redirects the neural fate of embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 163 (2), 303-314, 2003
- [23] Trautwein, W., Hescheler, J.: Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 257-274, 1990
- [24] Sandmann, S., Unger, T.: L- and T-type calcium channel blockade - the efficacy of the calcium channel antagonist mibefradil. *J. Clin. Basic Cardiol.* 2 (2), 187-201, 1999
- [25] Vaghy P. L., Striessnig J., Miwa K., Knaus H. G., Itagaki K., McKenna E., Glossmann H., Schwartz A.: Identification of a novel 1,4-dihydropyridine- and phenylalkylamine-binding polypeptide in calcium channel preparations. *J. Biol. Chem.* 262, 14337-42, 1987

6. Literaturverzeichnis

[26] Torlopp, A., Breher, S. S., Schlüter, J., Brand, T.: Comparative analysis of mRNA and protein expression of Popdc1 (Bves) during early development in the chick embryo. Eingereicht bei: *Dev. Dyn.*, 2005