

Stammzell-Labor
Abteilung Kardiologie und Pneumologie
Prof. Dr. med. G. Hasenfuß
Arbeitsgruppe PD Dr. K. Guan-Schmidt

Labor „Molecular Imaging of the Heart“
Abteilung Kardiologie und Pneumologie
Prof. Dr. med. G. Hasenfuß
Arbeitsgruppe PD Dr. V. Nikolaev

Masterarbeit

Pharmaceutical Biotechnology

Visualisierung von cAMP während der kardialen Differenzierung embryonaler und induzierter pluripotenter Stammzellen

Julia Pflaumenbaum

Matrikelnr.: 1945522

19. April 2013

1. Gutachter PD Dr. Viacheslav Nikolaev
(Universitätsmedizin Göttingen)
2. Gutachter Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker
(HAW Hamburg)

„Nicht, was er mit seiner Arbeit verdient, ist der eigentliche Lohn des Menschen, sondern was er durch sie wird.“

John Ruskin (1819-1900)

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Masterarbeit mit dem Titel

„Visualisierung von cAMP während der kardialen Differenzierung embryonaler und induzierter pluripotenter Stammzellen“

selbständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 19. April 2013

Julia Pflaumenbaum

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	3
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1 Einleitung und Zielsetzung	10
1.1 Definition und Eigenschaften von Stammzellen	11
1.2 Embryonale Stammzellen.....	12
1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen	13
1.4 Entwicklung von Kardiomyozyten aus pluripotenten Stammzellen	15
1.5 Rolle von cAMP bei Differenzierung von Stammzellen.....	17
1.6 Funktionsprinzip des cAMP-Sensors.....	19
1.7 Visualisierung von cAMP-Synthese und -Abbau	21
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2 Materialien und Methoden.....	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Zelllinien.....	23
2.1.2 Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer für die Zellkultur	23
2.1.3 Bakterienstamm	25
2.1.4 Lösungen und Medien für mikrobiologische Arbeiten	25
2.1.5 Enzyme, Lösungen und Substanzen für molekularbiologische Methoden ...	26
2.1.6 Puffer und Lösungen für die FRET-Messungen.....	27
2.1.7 Oligonukleotide	27
2.2 Plasmide.....	29

2.2.1	mCherry Template-Plasmid	29
2.2.2	Bry-eGFP Plasmid	30
2.2.3	Mesp1-Venus Plasmid	31
2.3	Nkx2.5-mCherry Plasmid.....	31
3	Methoden	33
3.1	Molekularbiologische Methoden	33
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	33
3.1.2	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktions (RT-PCR)-Analyse.....	34
3.1.3	Agarosegelelektrophorese	36
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels NanoDrop	37
3.2	Klonierung der DNA-Konstrukte	37
3.2.1	Restriktionsverdau	38
3.2.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	38
3.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	39
3.2.4	Transformation und Selektion von Bakterienzellen	39
3.2.5	Vervielfältigung von transformierten Klonen	40
3.2.6	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Aufreinigung.....	40
3.3	Zellkultur.....	41
3.3.1	Kultivierung von mausembryonalen Fibroblasten	41
3.3.2	Kultivierung von ESCs- und iPSCs	42
3.3.3	Einfrieren und Auftauen von ESCs- und iPSCs	42
3.4	Transfektion von ESCs und iPSCs.....	42

3.5	Selektion von transfizierten Zellen.....	43
3.6	Alkalische Phosphatase Färbung von undifferenzierter ESCs und iPSCs...	44
3.7	Differenzierung von ESCs und iPSCs in kardiovaskuläre Vorläuferzellen...	44
3.7.1	<i>In vitro</i> Differenzierung von ESC- und iPSC- Bry und Mesp-Klone als Monolayer.....	45
3.7.2	<i>In vitro</i> Differenzierung von ESCs und iPSCs mittels <i>hanging drop</i>	45
3.7.3	<i>In vitro</i> Differenzierung von ESC und iPSC mittels <i>mass culture</i>	46
3.8	FRET-Messungen	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Herstellung des Bry-mCherry Konstrukts	48
4.2	Herstellung des Mesp1-mCherry Konstrukts	50
4.3	Linearisierung des pBSK-Nkx2.5-mCherry Konstrukts	53
4.4	Transfektion der Hergestellten Konstrukte in die ESCs und iPSCs.....	54
4.5	Charakterisierung der ES und iPS-Zellklone-mittels PCR	56
4.6	Charakterisierung der ESC- und iPSC-Klone mittels Alkalische Phosphatase Färbung	57
4.7	Differenzierung	59
4.7.1	Präkardiales Mesoderm	59
4.7.2	Frühes kardiales Mesoderm	62
4.7.3	Schlagende Kardiomyozyten	65
4.8	FRET Messungen.....	67
4.8.1	Präkardiales Mesoderm	68

4.8.2	Frühes Kardiales Mesoderm	69
4.8.3	Schlagende Kardiomyozyten	70
5	Diskussion.....	72
6	Ausblick.....	76
7	Zusammenfassung.....	78
8	Anhang.....	80
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	80
9	Tabellenverzeichnis	82
10	Literaturverzeichnis	83

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AMP	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
b.p.	Basenpaare
Bry	Brachyury
CAG	<i>Chicken β-Aktin CMV-Enhancer</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CREB	<i>Cre-element-binding</i> Protein
cTnT	<i>cardiac troponin T</i>
D	<i>day</i> (Tag)
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Deoxynucleotidtriphosphate
DPBS	Dulbeccos Phosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EBS	<i>embryoid bodies</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESCs	<i>embryonic stem cells</i>
For	forward
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierenden Proteins
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
iPSCs	<i>induced pluripotent stem cell</i>

Kana	Kanamycin
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
MEFs	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
mES	<i>murine embryonic stem cells</i>
Mesp1	<i>mesoderm posterior 1</i>
MMC	Mitomycin C
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
mRNA	messenger RNA
MTG	Monothioglycerol
N	Negativkontrolle
Neo	Neomycin
Oct4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
P	Produktgrößen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase
Rev	reverse
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Reverse Transkriptase
Sox2	<i>sex determining region Y (SRY)-box 2</i>
Tm	Annealingtemperature
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
α-SM-actin	<i>smooth muscle actin</i>
β-ME	β-Mercaptoethanol

1 Einleitung und Zielsetzung

Die häufigste Todesursache weltweit sind die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems. Durch Myokardinfarkt, seine späteren Folgen (chronische Herzinsuffizienz) oder andere Herz-Kreislauf-Erkrankungen sterben alleine in Deutschland rund 41% der Betroffenen (statistisches Bundesamt, aufgerufen am 27.01.13). Ein Herzinfarkt verursacht irreversiblen Schaden am Herzen durch den Verlust von Herzmuskelzellen Kardiomyozyten.

Neben einer medikamentösen Therapie wird zurzeit an neuen Heilverfahren zum Ersatz vom fehlenden Herzmuskelgewebe geforscht. Zu den vielversprechenden Methoden gehört die Herstellung von Kardiomyozyten aus pluripotenten Stammzellen durch deren Differenzierung in Kultur. Allerdings haben die verfügbaren Differenzierungsmethoden eine zu geringe Ausbeute, um eine ausreichende Menge von reifen funktionsfähigen Kardiomyozyten für die Zelltherapie zu erhalten. Daher müssen genaue Regulationsmechanismen der Differenzierung weitgehend untersucht werden.

Einer der solchen Mechanismen ist die Genregulation durch das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP). In diesem Zusammenhang wird in dieser Arbeit die intrazelluläre Dynamik von cAMP mittels eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-basierten cAMP-Biosensors während der Differenzierung von embryonalen (ESCs) und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) zu Kardiomyozyten untersucht.

Diese Masterarbeit wurde durch ein gemeinsames Kooperationsprojekt zwischen dem Stammzellenlabor von PD Dr. Kaomei Guan-Schmidt und dem Labor „Molecular Imaging of the Heart“ von PD Dr. Viacheslav Nikolaev in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen ermöglicht.

1.1 Definition und Eigenschaften von Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die die Fähigkeit besitzen sich in mindestens einen spezialisierten Zelltypen zu differenzieren und sich selbst erneuern zu können.

Die Stammzellen lassen sich durch ihr ontogenetisches Alter in embryonale, fetale und adulte Stammzellen sowie durch ihr Differenzierungspotenzial in totipotente, pluripotente, multipotente und unipotente Stammzellen einteilen.

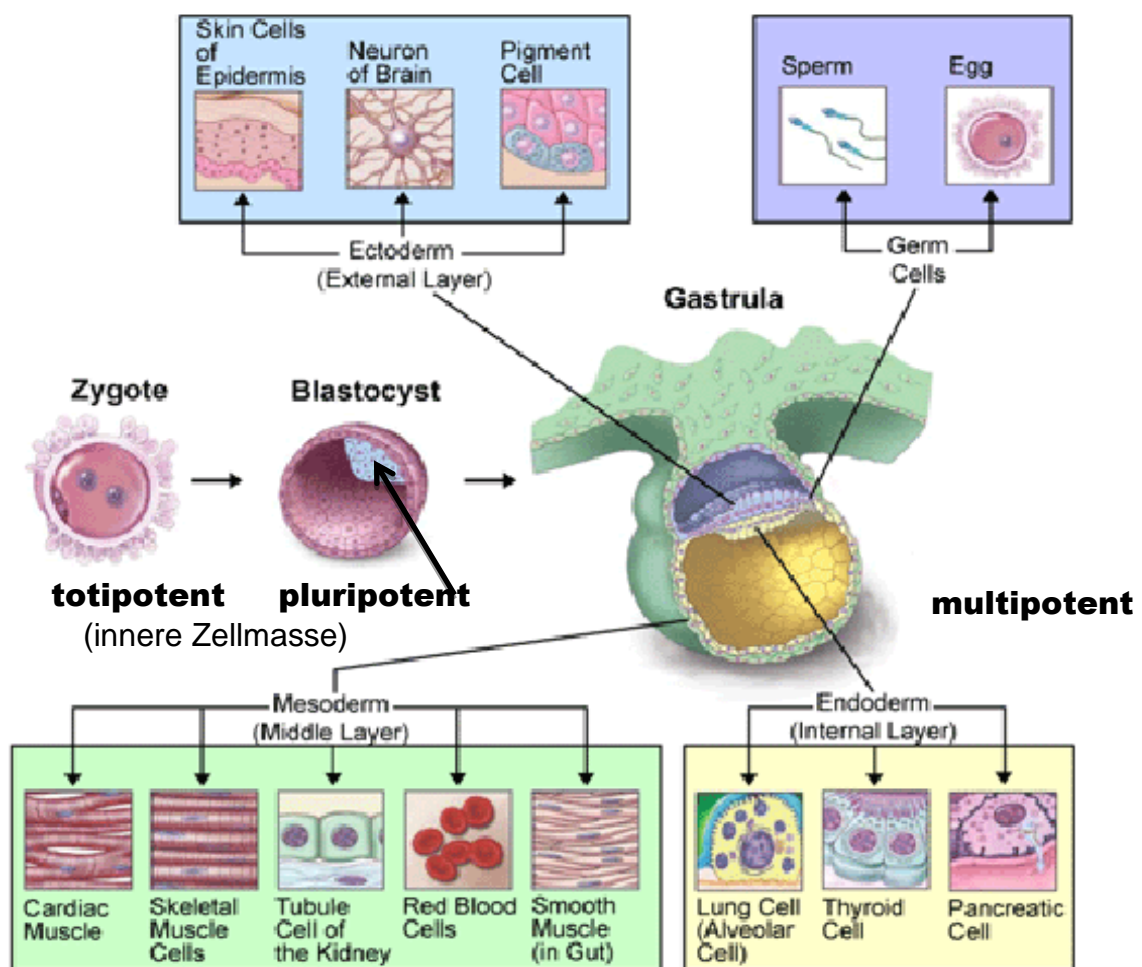


Abb. 1. Schematische Darstellung der Differenzierung von Stammzellen in verschiedene Zelltypen während der Embryonalentwicklung. Die drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm bilden sich während der Entwicklung im Gastrula-Stadium. Die Schichten werden durch ihre physikalische Position in der Gastrula bestimmt. Diese Etappe folgt der Zygote- und der Blastozysten-Stadium (mod. nach <http://www.allthingsstemcell.com/glossary/>).

Zu den totipotenten Stammzellen zählen die Zygote und ihre ersten Teilungsstadien. Aus ihr entwickeln sich der Fetus und die Plazenta. Die Blastozyste, die sich aus der Zygote entwickelt, enthält in der inneren Zellmasse pluripotente embryonale Stammzellen, die sich in Keimbahnzellen und in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und dem Mesoderm) ausdifferenzieren lassen (Abb. 1). Murine embryonale Stammzellen (mESCs) sind ein Beispiel für pluripotente Zellen, die sich selbst erneuern können und alle Zelltypen des Körpers *in vivo* und *in vitro* erzeugen können. Allerdings können sie im Gegensatz zur Zygote kein Organismus generieren (Rossant J, 2008).

Multipotente Stammzellen, zu denen beispielsweise hämatopoetischen Stammzellen gehören, können sich zu allen Zelltypen innerhalb einer bestimmten Abstammungslinie entwickeln (Orkin et al., 2008).

Spermatogoniale Stammzellen sind ein Beispiel für unipotente Stammzellen. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit Zellen nur einer spezifischen Zelllinie zu bilden. In diesem Beispiel also nur Spermien (Cinalli et al., 2008).

1.2 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESCs) wurden erstmals 1981 aus der inneren Zellmasse von Mausblastozysten isoliert (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Nach der Verschmelzung von Ei- und Samenzellen und der Vereinigung der Vorkerne durchläuft die Zygote eine Reihe von Zellteilungen: Über das Zwei-, Vier und Acht-Zellstadium wird bei Maus am Tag 2,5 der Entwicklung das Morula-Stadium (16-Zellstadium) und schließlich nach etwa 3,5 Tagen das Blastozysten-Stadium, das ca. 150 Zellen umfasst, erreicht. Die Blastozyste enthält in der inneren Zellmasse pluripotente embryonale Stammzellen. Nach dem Herausspülen der Blastozysten aus dem Uterus der Maus werden anschließend die mESCs isoliert. Die Kultivierung der Zellen erfolgt im geeigneten Kulturmedium auf mitotisch inaktivierten embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) mit Zusatz von Leukämie inhibierendem Faktor (LIF) für den Erhalt des undifferenzierten und pluripotenten Zustands der Zellen.

Die Pluripotenz wird durch ein Netzwerk von mehreren Transkriptionsfaktoren reguliert (Boyer et al., 1990; Hanna et al., 2010). Die wichtigsten Faktoren sind Oct4 (Octamer binding transcription factor 4), Sox2 (sex determining region Y (SRY)-box 2), und Nanog (Homöoboxprotein). Durch ihr einzigartiges Expressionsmuster und ihre essenziellen Rolle während der frühen Entwicklung spezifizieren sie die ESCs-Identität (Avilion et al., 2003; Chambers et al., 2003; Hart et al., 2004; Schöler et al., 1990).

Oct4 wird in frühen Entwicklungsstadien der Maus in totipotenten und pluripotenten Zellen exprimiert (Rosner et al., 1990; Schöler et al., 1990). Oct4 interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren und aktiviert oder deaktiviert somit die Genexpression in mESCs (Pesce und Schöler, 2001). Sox2 ist für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von undifferenzierten Stammzellen verantwortlich. Nanog ist in embryonalen Stammzellen aktiv und ist ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor für die Aufrechterhaltung von Pluripotenz (Zhang, et al., 2006).

1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen

Ein weiterer Typ von Stammzellen sind induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs). Im Jahr 2006 ist es der Arbeitsgruppe von Shinya Yamanaka gelungen aus murinen Fibroblasten iPSCs zu gewinnen (Takahashi und Yamanaka, 2006). Diese Zellen wurden mittels retroviraler Transduktion von Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc reprogrammiert. In ihren Eigenschaften, der Expression von Pluripotenzmarkern und ihrem Differenzierungspotentials gleichen die iPSCs stark den ESCs, obwohl einige geringe Unterschiede in Gentranskription und DNA-Methylierung festgestellt werden konnten (Okita et al., 2007; Kim et al., 2010).

iPSCs stellen ethisch weitgehend unbedenkliche Alternative zu den embryonalen Stammzellen dar. Der größte Nachteil von iPSCs liegt jedoch in der Bildung von Tumoren nach der Injektion von iPSCs in immunsuppressive Mäuse (Okita et al., 2007) und in der viralen Integration in das Zellgenom. Das letztere kann jedoch mit Hilfe neuartiger Methoden wie durch das Einschleusen der Plasmide (Okita et al., 2008) oder Proteine (Zhou et al., 2009) in die Empfängerzellen vermieden werden.

Der Einsatz von iPSCs in der regenerativen Therapie könnte zukünftig neue Möglichkeiten in der Medizin eröffnen (Abb. 2). Es ist bereits mehreren Arbeitsgruppen gelungen patienteneigene iPSCs zu generieren und in die erkrankten Zelltypen zu differenzieren. Beispielsweise konnte Moretti et al., 2011 patientenspezifische Zellen mit einer Genmutation in kardialen Ionenkanälen zu isolieren und daraus Kardiomyozyten mit patiententypischen Krankheitsbild einer Herzrhythmusstörung herzustellen. Solche Krankheitsmodelle ermöglichen den Wissenschaftlern eine genaue Erforschung der Krankheitsverläufe auf der zellulären Ebene und Screening neuer patientenspezifischer Medikamente (Vitale et al., 2011, Lam et al., 2009). Zelltherapeutische Anwendungen, die eine Selektion und Anreicherung des gewünschten Zelltyps sowie möglicherweise auch eine genetische Veränderung in den Zellen erfordern, sind als längerfristiges Ziel anzusehen (Löser et al., 2011).

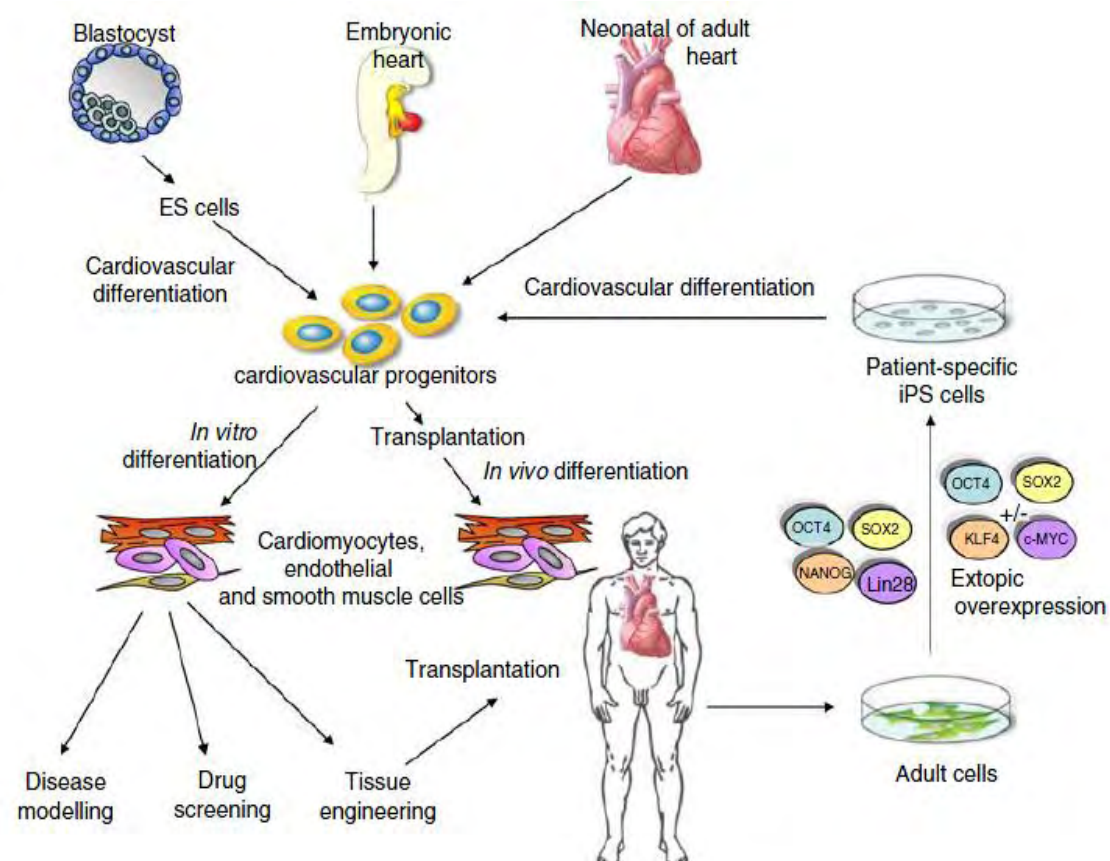


Abb. 2. Quellen und Anwendungsmöglichkeiten von kardiovaskulären Vorläuferzellen. Kardiovaskuläre Vorläuferzellen wurden aus ESCs, embryonalen und adulten Herzen isoliert. Reprogrammierungstechniken erlauben Generierung patienteneigener iPSCs. Diese können beispielsweise zur Entwicklung neuer Wirkstoffe, in der pharmakologisch-toxikologischen

Untersuchungen, zur Etablierung von patientenspezifischer Krankheitsmodellen oder zu zelltherapeutischen Zwecken dienen (Lam et al., 2009).

Seit der Entdeckung von ESCs und iPSCs werden viele Hoffnungen in die zukünftige Therapiemöglichkeiten mit Hilfe dieser Zellen gesetzt. Durch ihr unerschöpfliches Erneuerungs- sowie Differenzierungspotential in unterschiedliche Zelltypen hoffen Wissenschaftler und Mediziner Krankheiten zu heilen wie Herzinfarkt, Diabetes oder Morbus Parkinson. Allerdings ist ihr Einsatz bei Menschen durch das Potential Tumore zu bilden sehr stark risikobehaftet. Deshalb müssen dafür die Differenzierungsvorgänge intensiver untersucht werden um potentielle Gefahren für Patienten ausschließen zu können.

1.4 Entwicklung von Kardiomyozyten aus pluripotenten Stammzellen

Während der Gastrulation in der embryonalen Entwicklung entstehen Zellen aller drei Keimblätter-Ektoderm, Endoderm und Mesoderm (Abb. 1). Die frühen mesodermalen Zellen entwickeln sich zum präkardialen Mesoderm, welches den wichtigen T-Box-Transkriptionsfaktor Brachyury (Bry) exprimiert (Gilbert, 2010). Danach migrieren einige Bry⁺ Zellen zu den oberen seitlichen Teilen des Embryos (lateral-cranial) und bilden dort die sog. kardiogenen Regionen. Dabei wird Bry, der früheste mesodermale Marker herunterreguliert und das mesoderm posterior 1 (Mesp1) Gen aktiviert (Solloway et al., 2003). Aus den Mesp1⁺ Zellen entwickeln sich alle Herzmuskelzellen sowie einige Skelettmuskelzellen des Kopfes (Saga et al., 1999). Im Laufe der weiteren Entwicklung bilden sich kardiovaskuläre Vorläuferzellen, die zwei Homeodomänenproteine Nkx2.5 und Isl1 und einen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Flk1 exprimieren (Laugwitz et al. 2009). Aus diesen Vorläuferzellen bilden sich sowohl Muskel- als auch vaskuläre Vorläuferzellen. In der weiteren Differenzierung entstehen aus Muskel-Vorläuferzellen Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen. Aus den vaskulären Vorläuferzellen entwickeln sich sowohl Endothelzellen als auch glatte Muskelzellen (Lam et al, 2009) (Abb. 3).

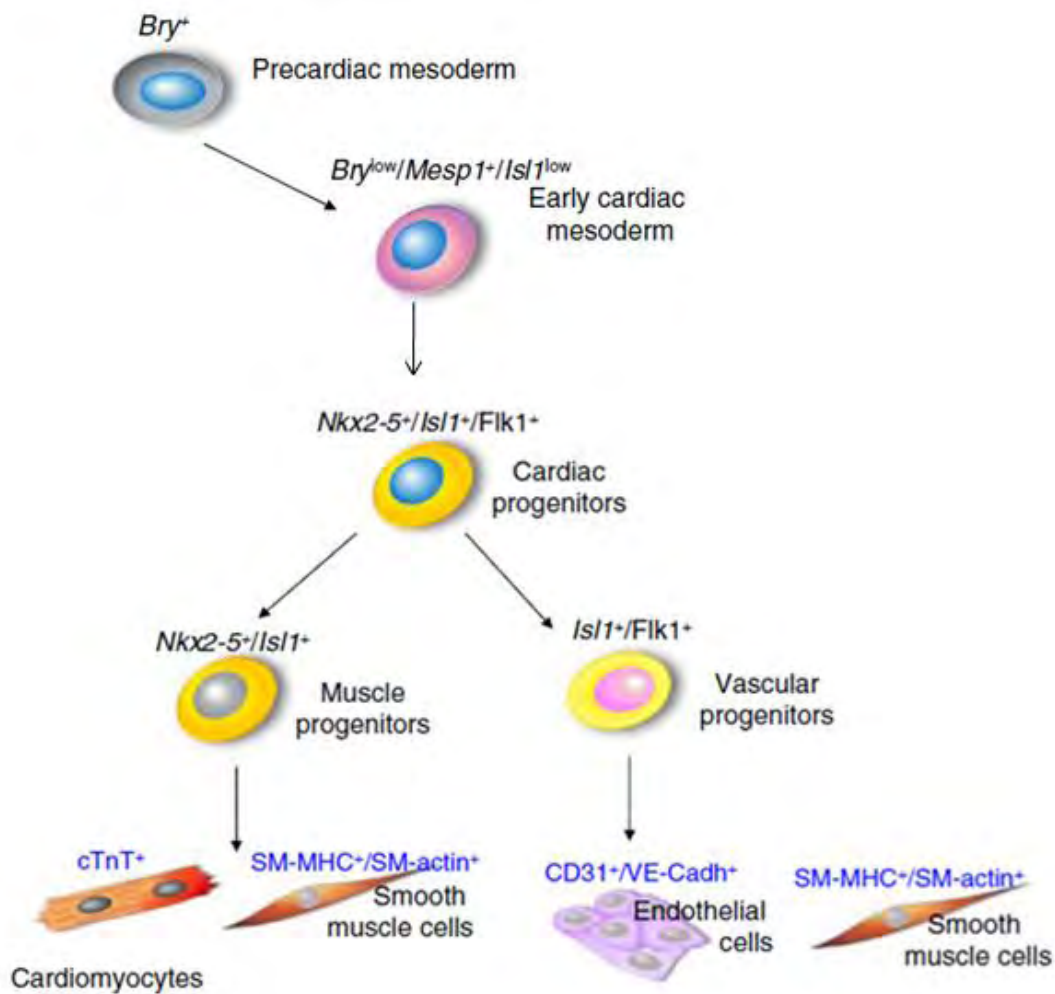


Abb. 3. Hierarchiemodell der kardialen Vorläuferzellen und ihrer Abkömmlinge (modifiziert nach Lam et al, 2009). Die Differenzierung zum Kardiomyozyten beginnt mit der Expression des Markers Brachyury (Bry) in den präkardialen mesodermalen Zellen (precardiac mesoderm). Das frühe kardiale Mesoderm (early cardiac mesoderm) wird durch mesoderm posterior 1 ($Mesp1$), Bry und $Isl1$ markiert, wobei Bry und $Isl1$ in geringeren Konzentrationen exprimiert werden. Im weiteren Verlauf der Differenzierung entwickeln sich aus kardialen Vorläuferzellen (cardiac progenitors), die $Nkx2.5/Isl1/Flk$ positiv sind, Muskel- (markiert durch $Nkx2.5/Isl1$) und vaskuläre Vorläuferzellen (markiert durch Isl/Flk) (muscle progenitors and vascular progenitors). Aus Muskel-Vorläuferzellen entstehen *cardiac troponin T* ($cTnT$) positive Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen, welche durch α -smooth muscle actin (α -SM-actin) und smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) Expression identifiziert werden können. Aus den vaskulären Vorläuferzellen entwickeln sich Endothelzellen (markiert durch $CD31/VE$ -Cadherin) und glatte Muskelzellen.

Bei *in vitro* Kultur von mESCs und iPSCs werden die embryonalen Entwicklungsstadien in den sog. Embryoid Körpern (*embryoid bodies* (EBs)) oder auch zum Teil in *mass culture*- und in der Monolayerkultur nachgeahmt. Dabei entstehen die gemischten Populationen der meso-, ekto- und endodermalen Zellen (Prelle et al., 2002). Einige mesodermale Zellen entwickeln sich zu Kardiomyozyten und durchlaufen die gleichen Entwicklungsstadien, die durch Expression von *Bry*, *Mesp1* und *Nkx2.5* charakterisiert sind und im Einzelnen identifiziert werden können.

1.5 Rolle von cAMP bei Differenzierung von Stammzellen

Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein universeller zweiter Botenstoff (*second messenger*) zur Regulation von Genaktivitäten und Enzymsystemen. Es wird bei der zellulären Signaltransduktion eingesetzt und führt zur Aktivierung der Proteinkinasen (Beavo and Brunton, 2002). cAMP wird in vielen Zellen des menschlichen Organismus nach der Bindung eines extrazellulären Liganden (Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren) an spezifische G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR), die sich in der Plasmamembran befinden, gebildet. Die Bindung eines Liganden führt zu einer Konformationsänderung eines GPCRs und zur Bindung des G-Proteins an den Rezeptor unter Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat (GDP/GTP)-Austausch. Die α -Untereinheit des G-Proteins spaltet sich vom Protein ab und aktiviert die Adenylatzyklase, die wiederum den *second messenger* cAMP aus Adenosintriphosphat (ATP) generiert. cAMP selbst ist danach in der Lage verschiedene Zellproteine (siehe Abb. 4), besonders cAMP-abhängige Proteinkinasen (PKAs) zu aktivieren (Daniel et al., 1998). Im Anschluss phosphoryliert PKA unter anderem einige Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel CREB (*Cre element-binding*) Protein und aktiviert diesen somit (Bloch et al., 1999; Krumenacker und Murad, 2006; Mayr und Montminy, 2001; Pilz und Casteel, 2003). Dies führt zu seiner Translokation in den Zellkern, wo die Transkription einer großen Anzahl an cAMP-induzierten Genen von CREB gesteuert wird (Mayr and Montminy, 2001). Viele dieser Gene sind für die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren und für die Differenzierung der Zellen zuständig (Impey et al, 2004).

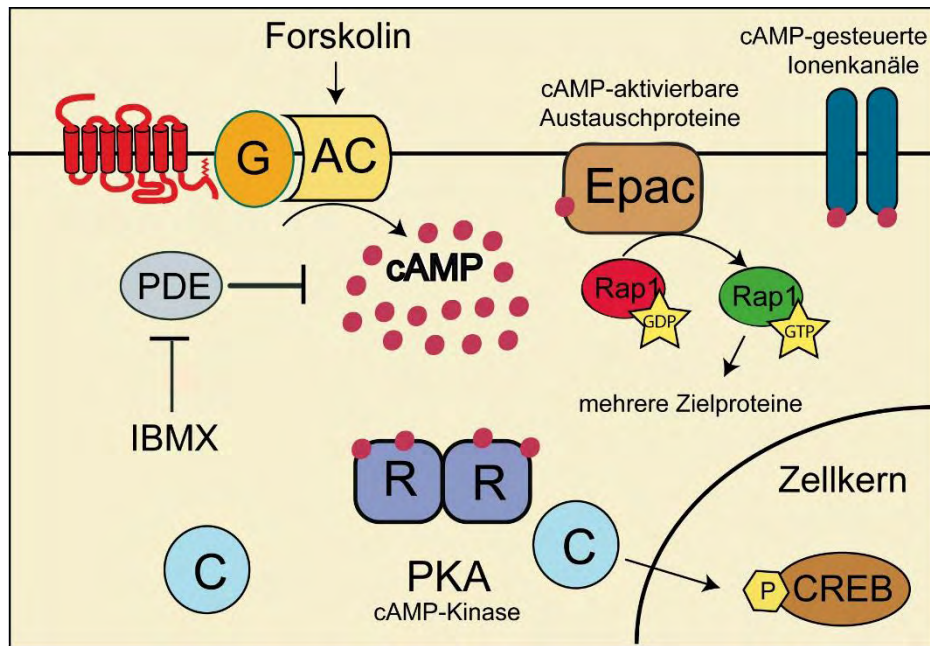


Abb. 4. cAMP Signalweg und seine Rolle in der Regulation zellulärer Proteine. cAMP wird durch Adenylylzyklen (AC) aus ATP gebildet. AC-Aktivität kann über die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder in Experimenten dieser Masterarbeit direkt durch Forskolin stimuliert werden. cAMP aktiviert in Zellen die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), den Austauschfaktor Epac und die cAMP-gesteuerten Kationenkanäle. Die PKA dissoziiert nach cAMP-Bindung an regulatorischen (R) Untereinheiten und setzt die aktiven katalytischen Untereinheiten (C) frei. Diese phosphorylieren wiederum eine Reihe von Substratproteinen, darunter das *Cre-element binding* (CREB) Protein, welches die Transkription mehrerer in die Differenzierung involvierter Gene reguliert. cAMP wird in Zellen durch die Phosphodiesterase (PDE) zu AMP abgebaut. Durch den Inhibitor (3-Isobutyl-1-methylxanthin) IBMX kann im Experiment PDE-Aktivität blockiert werden.

Inhibierung und Abschaltung der cAMP-Kaskade erfolgen durch Aktivierung von inhibitorischen G-Proteinen (durch andere GPCRs), Inhibierung der Adenylylzyklen (über Kalzium oder Phosphorylierung) und durch Aktivierung des cAMP-Abbaus über Phosphodiesterasen (PDE) (Cooper, 2003, Soderling and J.A. Beavo, 2000).

Die in die Differenzierung und Reprogrammierung involvierten Transkriptionsfaktoren und genetischen Mechanismen sind relativ gut untersucht. Allerdings ist nur wenig über die intrazellulären Signalprozesse bekannt, die solche Entwicklungsvorgänge steuern.

Während der Differenzierung von Monozyten in verschiedene Typen von Makrophagen wurden dynamische Veränderungen in der Expression der PDEs gezeigt, die

zeitabhängig cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP)- und cAMP-Konzentrationen regulierten. Ihre exogene Modulation erlaubte, die Richtung und die Effizienz der Differenzierung zu beeinflussen (Bender and Beavo, 2006). Alleine die Aktivierung von cAMP Synthese in neuronalen Stammzellen stimuliert die Differenzierung dieser Zellen in Richtung β -Endorphin-produzierender Neurone (Sarkar et al., 2008). Außerdem die Stimulation vom cAMP/PKA Signalweg in mesenchymalen Stammzellen förderte die Synthese von osteoinstruktiven Zytokinen und die Differenzierung von Osteoblasten und damit die bessere Knochenbildung *in vivo* (Siddappa et al., 2008).

Allerdings wurde die Rolle von cAMP bei der Differenzierung pluripotenter Zellen und bei der Reprogrammierung noch nicht untersucht. Für die zur Reprogrammierung notwendigen Faktoren Klf4 (Evans et al., 2007) und Oct4 (Burnside and Collas, 2002) wurde gezeigt, dass sie durch cAMP/CREB reguliert und induziert werden können. Histondeacetylaseinhibitoren, welche die Reprogrammierungseffizienz erhöhen, aktivieren unter anderem die cAMP/CREB abhängige Gentranskription (Huangfu et al., 2008, Vecsey et al., 2007). Zwar werden nach empirischen Beobachtungen cAMP-Analoga verwendet, um die Effizienz der ESCs-Differenzierung z. B. in Endothelzellen (Narazaki et al., 2008) und Kardiomyozyten (Chen et al., 2006) zu erhöhen, jedoch sind keine Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen und die zeitliche Regulation dieser Effekte vorhanden.

Klassische biochemische Verfahren zur Untersuchung der Signaltransduktion sind aufwendig, haben geringe zeitliche und keine räumliche Auflösung. Sie ermöglichen es nicht Signalprozesse und die Genexpression auf Einzelzellebene gleichzeitig zu visualisieren. Mit Hilfe eines in das Zellgenom transgeneingebauten Sensors sind solche Untersuchungen jedoch möglich.

1.6 Funktionsprinzip des cAMP-Sensors

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden optische Methoden entwickelt, die es ermöglichen, biochemische Prozesse in Echtzeit in lebenden Zellen zu verfolgen. Diese Methoden beruhen auf der Nutzung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und seiner Mutanten, welche zur Herstellung von speziellen Biosensoren verwendet werden konnten (Zhang et al., 2002). Das Messprinzip dieser Sensoren beruht auf

dem quantenmechanischen Phänomen, dass ein angeregter Fluoreszenzfarbstoff seine Energie an benachbarte Fluoreszenzfarbstoffe mit geeigneten spektralen Eigenschaften überträgt und diese dadurch zur Fluoreszenz anregt. Dieses Phänomen wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) bezeichnet. Die Effizienz des FRETs ist im Wesentlichen davon abhängig, welche Entfernung die beiden Farbstoffe voneinander haben. Bei den cyan- und gelb- (yellow) fluoreszierenden Proteinen (CFP und YFP) ist die FRET-Effizienz besonders sensitiv auf Änderungen von Distanzen im Bereich von 1-10 Nanometern. Dadurch kann FRET besonders gut verwendet werden, um die Protein-Protein Interaktionen oder Konformationsänderung eines Proteins sichtbar zu machen (Förster, 1946, Lohse, 2007).

Der in diese Arbeit verwendeter FRET-basierter cAMP-Sensor Epac1-camps beruht auf einer einzelnen cAMP-Bindedomäne aus dem Epac1-Protein, deren Sequenz mit CFP und YFP fluoreszierenden Proteinen fusioniert ist (Nikolaev et al., 2004, 2006).

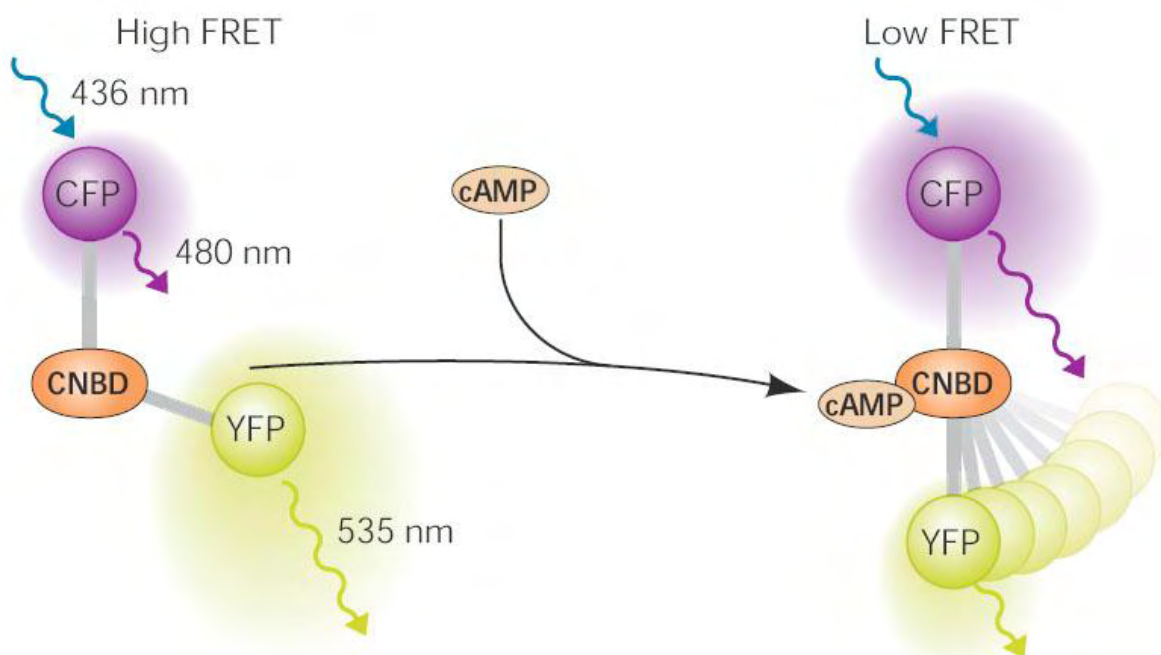


Abb. 5. Funktionsprinzip des cAMP-Sensors. Im linken Bild ist die Bindungsstelle für cAMP frei. Die Energieübertragung von CFP auf YFP ist groß. Die Bindung von cAMP im rechten Bild führt zu einer Konformationsänderung im Sensormolekül, die durch Abnahme im FRET visualisiert wird.

Wenn in cAMP-freiem Zustand das CFP durch 436 nm Licht angeregt wird, überträgt es einen großen Teil seiner Energie auf das benachbarte YFP, wobei dieses zur Fluoreszenz angeregt wird und ein charakteristisches Licht einer Wellenlänge von 535 nm emittiert (Abb. 5). Das FRET-Signal zwischen der gelb- und cyanfarbenen Fluoreszenz ist groß.

Bindet nun cAMP an die Bindungsstelle kommt es zu einer Konformationsänderung im Sensormolekül, dadurch vergrößert sich der Abstand zwischen CFP und YFP und die Energieübertragung von CFP auf YFP nimmt ab. Damit nimmt auch das Verhältnis der Fluoreszenz von YFP und CFP ab.

1.7 Visualisierung von cAMP-Synthese und -Abbau

Epac1-camp ist in der Lage dynamische Änderungen in den freien intrazellulären cAMP-Konzentrationen zum Beispiel nach der direkten Aktivierung von Adenylatzyklen durch Forskolin oder bei Hemmung von cAMP-abbauenden Phosphodiesterasen durch 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) in einzelnen lebenden Zellen zu visualisieren.

Um direkte Messungen in isolierten Zellen oder lebenden Geweben von Mäusen zu ermöglichen, wurde eine transgene Maus generiert, welche den Sensor ubiquitär, d.h. in allen Zelltypen exprimiert (Calebiro et al. 2009). Diese Expression wird durch den CAG (*Chicken β -Aktin CMV-Enhancer*) Promoter angetrieben, welcher im transgenen Konstrukt enthalten ist.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war cAMP-Konzentrationen sowohl in embryonalen als auch in induzierten pluripotenten Stammzellen mittels des transgen eingebauten Epac-Sensors in verschiedenen Differenzierungsstadien zu messen und zu vergleichen. Im ersten Schritt wurden drei verschiedene Plasmide konstruiert, welche die Sequenz für den Bry-, Mesp1-, und Nkx2.5-Promoter enthielten. Weiterhin wurde hinter den Promoter die Sequenz für den rot fluoreszierenden Farbstoff (mCherry) eingebaut. mCherry ermöglicht die Identifizierung der Zellen während der Differenzierung bzw. des Differenzierungsstadiums unter dem Mikroskop. Die fertigen Konstrukte wurden

in embryonale Stammzellen und in die aus den Mausfibroblasten gewonnenen iPSCs mittels Elektroporation transfiziert. Für den stabilen Einbau des linearisierten Konstrukts wurden die Zellen durch Zugabe von Neomycin-Antibiotikum zum Kultivierungsmedium selektioniert. Die selektionierten Klone konnten nun unter geeigneten Differenzierungsbedingungen kultiviert werden. Während der Differenzierung der Zellen zu Kardiomyozyten wurden die entsprechenden Zellen mit Hilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Ttransfer vermessen. Diese Zellen konnten zuvor anhand der rot fluoreszierenden Farbe im Mikroskop identifiziert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

CAG-Epac Isolierte ES-Zellen aus den E3.5-Blastozysten (Dr. Alexander Becker, Stammzellenlabor, Abteilung Kardiologie und Pneumologie, UMG, Göttingen) einer transgenen Maus. Diese exprimiert Epac1-camps unter der Kontrolle von CAG-Promoter (Calebiro et al. 2009)

CAG-Epac-KGA iPS-Zellen, gewonnen durch Reprogrammierung mittels lentiviralen Gentransfers von Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc aus embryonalen Mausfibroblasten der Epac1-camps exprimierenden Maus (Dr. Katrin Streckfuß-Bömeke, Abteilung Kardiologie und Pneumologie, UMG, Göttingen)

MEF Emryonale Mausfibroblasten aus NMRI-Mäusen der Zentralen Tiereinrichtung der Universitätsmedizin

2.1.2 Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer für die Zellkultur

DMEM Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium mit 4,5 g/L Glucose (Life technologies, 11960)

DPBS Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung 1x (DPBS; Life technologies, 14190)

50x EDTA-Lösung	1 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; Sigma-Aldrich®, E6758) in 100 ml DPBS gelöst, pH = 7, steril-filtriert, Lagerung bei 4 °C
MMC-Lösung (200 µgml ⁻¹)	2 mg Mitomycin C (MMC; Serva, 29805.02) in 10 ml DPBS gelöst, aliquotiert, Lagerung bei -20°C
G418 Sulfat	G418 Sulfat (Sigma-Aldrich®, 631308), 100 mgml ⁻¹ Stocklösung angesetzt in PBS oder <i>Aqua dest.</i>
Penicillin/Streptomycin-Lösung	100x Penicillin/Streptomycin, (Sigma-Aldrich®, P4333), Gebrauchskonzentration im gewünschten Medium 1x - 2x
0,1% Gelatinelösung	1% Gelatine (Fluka Biochemica, 48720) in <i>Aqua dest.</i> , autoklaviert und 1:10 mit <i>Aqua dest.</i> verdünnt
0,2% Trypsin-Lösung	2 g Trypsin (Life technologies, 27250-018) in 1000 ml DPBS gelöst, sterilfiltriert
0,1%Trypsin/0,01% EDTA-Lösung	für 100 ml: 50 ml 0,2%-iger Trypsin-Lösung, 49 ml DPBS, 1 ml 50x EDTA-Lösung
100x β-ME-Stammlösung	7 µl β-Mercaptoethanol (β-ME; Promega, Z523C) in 10 ml 1x DPBS, sterilfiltriert
100x NEAA	100x nicht essentielle Aminosäuren (NEAA); Life technologies, 11140
100x L-Glutamin	100x L-Glutamin (Life technologies, 25030)
MEF-Medium	84% DMEM mit 15% fetalem Kälberserum (FKS; Lonza, F-6SB0011, durch Hitze für 30 min bei 56°C inaktiviert), 1x L-Glutamin

mES-Medium	82% DMEM mit 15% FKS, 1x Glutamin, 1x nicht essentielle Aminosäuren (NEAA; Life technologies, 11140-035), 1x β -ME, 103 U/ml Leukemia Inhibitory Factor (LIF; Chemicon, 1107)
MTG-Stammlösung	1ml Iscove-Medium mit 13 μ l Monothioglycerol (MTG Sigma, M-6145), sterilfiltriert
Iscove-Medium	Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium (IMDM) + 1x GlutaMAX™ mit 20% FKS, 1x NEAA. Zu 1ml Iscove-Medium wurden 3 μ l von der MTG-Stammlösung gegeben
Einfriermedium	72% DMEM, 20% FKS, 8% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich®, D2650)

2.1.3 Bakterienstamm

XL1-Blue - E.coli Stratagene

2.1.4 Lösungen und Medien für mikrobiologische Arbeiten

LB-Medium	LB-Medium-Pulver nach Miller (AppliChem, A0954) 25 $g l^{-1}$, autoklaviert
LB-Agarplatten	LB-Agar-Pulver nach Miller (AppliChem, A0927) 40 $g l^{-1}$, autoklaviert
Ampicillin	Ampicillin (Sigma-Aldrich®, A9518) 100 $mg ml^{-1}$ Stocklösung, angesetzt in <i>Aqua dest.</i> , aliquotiert, Lagerung bei $-20^{\circ}C$
Kanamycin	Kanamycinsulfat (Sigma-Aldrich®, K1377) 50 $mg ml^{-1}$ Stocklösung, angesetzt in <i>Aqua dest.</i> , aliquotiert, Lagerung bei $-20^{\circ}C$

5x KCM-Puffer 100 mM KCl (Sigma-Aldrich®, P9541), 30 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich®, 449709), 50 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich®, M8266, angesetzt in *Aqua dest.*

2.1.5 Enzyme, Lösungen und Substanzen für molekularbiologische Methoden

50x TAE-Puffer AppliChem (A 1691,0500), 1 x anwenden

5x TB - Puffer für 1000 ml: 54 g Tris (Roth, 5429.3), 27,5 g Borsäure (Sigma-Aldrich®, 15663) in *Aqua dest.*, 1x anwenden

Universal Agarose Peqlab (H45120006)

RNA-Lysis-Puffer für 10 ml, 9,8 ml RNA Lysis Puffer (Promega, Z305E) mit 200 µl 48,7%-iges β - ME (Promega, Z523C)

5x GreenGoTaq®
Reaction Buffer Promega (M791B)

GoTaq® DNA-
Polymerase Promega (M830C)

10 mM dNTP Mix Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs), (Promega, U1515)

100 mM MgCl₂ Promega (A351B)

T4-DNA-Ligase NEW ENGLAND BioLabs® (M0202S)

10x T4-DNA-Ligase-
Puffer NEW ENGLAND BioLabs® (B0202S)

Pfu-Polymerase Promega (M774A)

10x Pfu-Puffer Promega (M776A)

Restriktionsenzyme HF	NEW ENGLAND BioLabs®
Restriktionsenzym-Puffer	NEW ENGLAND BioLabs®
DNA Ladder	Quick-Load 1 kb DNA Ladder, (NEW ENGLAND BioLabs®, N0468S)
Midori Green Advanced DNA Stain	Nippon Genetics Europe GmbH (MG02)

2.1.6 Puffer und Lösungen für die FRET-Messungen

FRET-Puffer	144 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 2mM CaCl ₂ , 10 mM HEPES, pH 7,4
Forskolin	10 mM Stammlösung in DMSO, (Sigma-Aldrich® F6886), für den Gebrauch: 1:1000 mit FRET-Puffer verdünnen
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin, (Sigma-Aldrich® J5879), 100 mM Stammlösung in DMSO, für den Gebrauch: 1:1000 mit FRET-Puffer verdünnen

2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden durch die Firma MWG Eurofins Operon synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden in *Aqua dest.* gelöst und bei -20°C gelagert. Die Vorwärts- und Rückwärtssequenzen (forward = for, reverse = rev), Annealing-Temperatur (T_m) und Produktgrößen (P) sind in Tab. 1 aufgeführt, wobei die Schnittstellen für Restriktionsenzyme in grün markiert sind.

Tab. 1. Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der Reporterkonstrukte

Bezeichnung Nr.()	Primersequenz	T _m [°C]	P [bp]
Cherry-Agel-for (C1)	5`-AAA ACC GGT CGC CACCA-3`	55 °C	721
Cherry-Sall-rev (C2)	5`-AAA GTC GAC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CATG-3`		
Cherry-XhoI-for (C3)	5`-AAA CTG GAG ACC ATG GTG AGC AAGGG-3`	55 °C	721
Cherry-Agel/Sall-rev (C4)	5`-AAA ACC GGT AAA GTC GAC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CATG-3`		
Poly-A-Sall-for (P1)	5`-AAA GTC GAC GAT CTG GAC TCT AGA GGATC-3`	55 °C	1030
Poly-A-Agel-rev (P2)	5`-AAG GGG CCA CCA AAGAA-3`		

Tab. 2. Oligonukleotide zur PCR-Detektion von transfizierten Konstrukten in der genomischen DNA

Bezeichnung Nr.()	Primersequenz	T _m [°C]	P [bp]	n
Bry (B1/B2)	for: 5`- CGA TCT CGG TGC TCC TTT-3` rev: 5`- CCACCCTTGGTCACCTT-3`	55 °C	342	35
Mesp1 (M1/M2)	for: 5`- CCTGCTATGGTTCAAAGGGT -3` rev: 5`- CCACCCTTGGTCACCTT -3	55 °C	342	35
Nkx2.5 (N1/N2)	for: 5`- GTG CTC AGC GCT ACCT-3` rev: 5`- CCACCCTTGGTCACCTT -3`	55 °C	502	35
GAPDH (G1/G2)	for: 5`-GCA GTG GCA AAG TGG AGA TT 3` rev: 5`-TCT CCA TGG TGG TGA AGA CA 3`	56 °C	250	31

Tab. 3. Oligonukleotide zur Detektion von RT-PCR-Produkten

Bezeichnung Nr.()	Primersequenz	T _m [°C]	P [bp]	n
Bry (B3/B4)	for: 5`-GCT GTG ACT GCC TAC CAG AATG-3` rev: 5`-GAG AGA GAG CGA GCC TCC AAAC-3`	52 °C	231	33
Mesp1 (M3/M4)	for: 5`-CCT GAC CAA GAT CGA GAC G-3` rev: 5`-ACG ACA CCC CGC TGC AGA-3	55 °C	202	35
Nkx2.5 (N3/N4)	for: 5`-CGA CGG AAG CCA CGC GTC CT-3` rev: 5`-CCG CTG TCG CTT GCA CTT G-3`	62 °C	180	35

2.2 Plasmide

2.2.1 mCherry Template-Plasmid

Das 12 kbp große MHC-Cherry2AHygroNeo Plasmid enthält die mCherry-Sequenz (Shaner et al., 2004), die als Template zur Herstellung der Bry- und Mesp1-mCherry Plasmide genutzt wurde. Diese Sequenz wurde hinter den Promotoren der beiden Plasmide eingebaut. Die Expression von mCherry, eines rot fluoreszierenden Proteins ermöglicht die Identifizierung von differenzierenden ESCs und iPSCs in verschiedenen Stadien unter dem Fluoreszenzmikroskop.

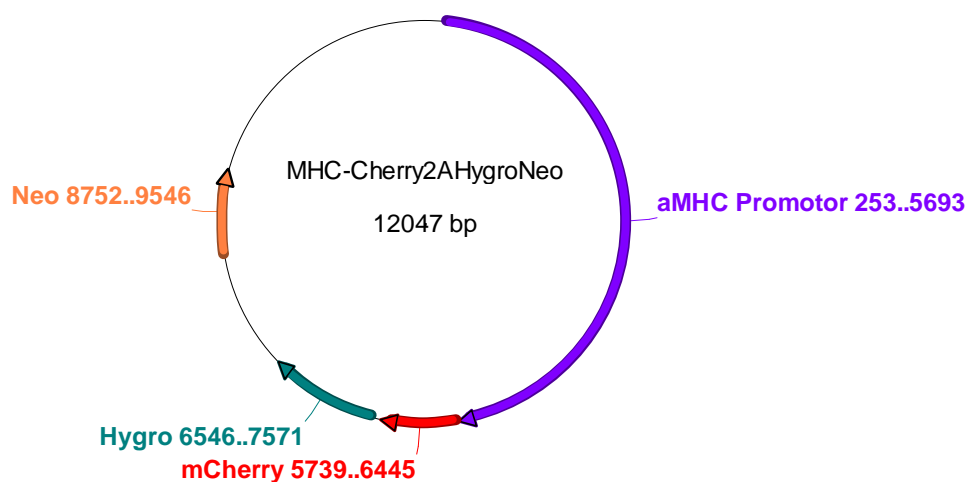


Abb. 6. MHC-Cherry2AHygroNeo Plasmid. Das Plasmid enthält als Insert die mCherry-Sequenz, die für weitere Klonierungen als Template benutzt wurde.

2.2.2 Bry-eGFP Plasmid

Zur Herstellung des Bry-mCherry Plasmids wurde der in der Abb.7 gezeigte Expressionsvektor Brachyury-eGFP Rex Neo verwendet (Kita-Matsuo et al., 2009). Der Vektor besteht aus einem 643 bp großen Bry-Promoter, der die Expression vom *enhanced green fluorescent* Protein (eGFP) im frühen kardialen Mesoderm steuert, einem Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion transformierter *E. coli* sowie Neomycin-Resistenz für die Selektion transfizierter ESCs und iPSCs. Weiterhin sind Schnittstellen der in dieser Arbeit verwendeter Restriktionsendonucleasen (Sall und Agel) eingezeichnet.

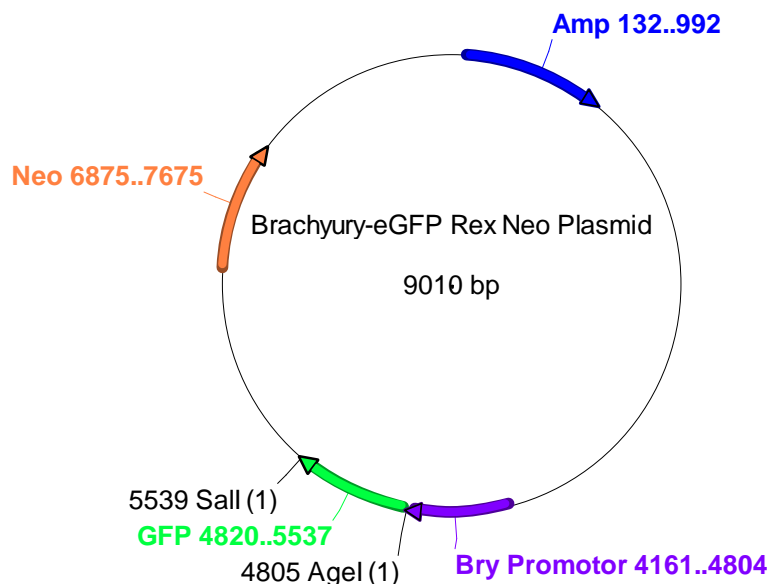


Abb. 7. Brachyury-eGFP Rex Neo Plasmid. Der Vektor enthält unter anderem Antibiotika-Resistenzgene Neomycin (Neo) und Ampicilin (Amp) und für die Klonierung wichtige Restriktionsenzymchnittstellen für Sall und Agel.

2.2.3 Mesp1-Venus Plasmid

Die Herstellung des Mesp1-mCherry Plasmids erfolgte mit Hilfe der in Abb.8 gezeigten Expressionsvektors pMesp1-Venus-PL451Neo (Bondue et al., 2011)

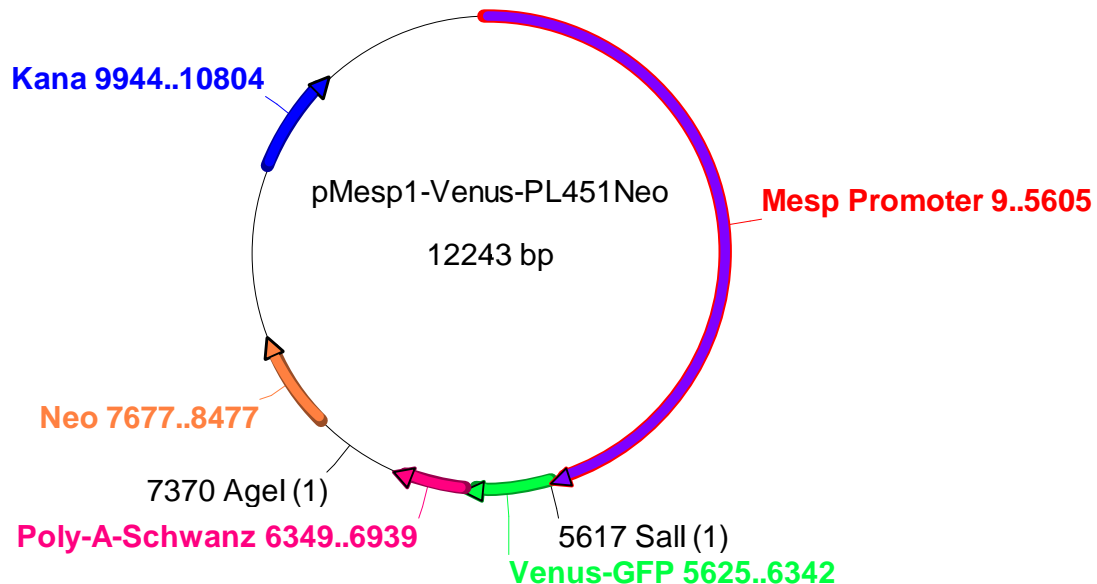


Abb. 8. pMesp1-Venus-PL451Neo. Das Plasmid enthält Antibiotika-Resistenzgene Neomycin (Neo) und Kanamycin (Kana) und für die Klonierung wichtige Restriktionsenzymstellen für Sall und Agel.

Das Plasmid besteht aus einem 5,6 kb großen Mesp1-Promoter, der die Expression von Venus-GFP im frühen kardiogenen Mesoderm ermöglicht. Weiterhin enthält das Plasmid einen Kanamycin- und einen Neomycin-Resistenzgen für die Selektion positiver transformierter und transfizierter Zellen. Bei der Klonierung verwendete Agel- und Sall- Schnittstellen sind im Vektor ebenfalls eingezeichnet.

2.3 Nkx2.5-mCherry Plasmid

Der pBSK-Nkx2.5-mCherry Vektor wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Stefan Döker (Abteilung Pharmakologie, Universitätsmedizin Göttingen) zur Verfügung gestellt. Der Vektor enthält einen 12,5 kb großen Nkx2.5-Promoter, der die Expression eines rot fluoreszierenden Proteins mCherry in kardialen Vorläuferzellen ermöglicht. Ampicillin- und Neomycin-Resistenz-Kassetten, die sich ebenfalls auf dem Plasmid befinden, dienen zur Selektion positiver transformierter und

transfizierter Zellen. Pmel-Schnittstelle wurde zur Linearisierung des Plasmids genutzt. Kontrollverdau erfolgte mittels Restriktionsenzym HindIII.

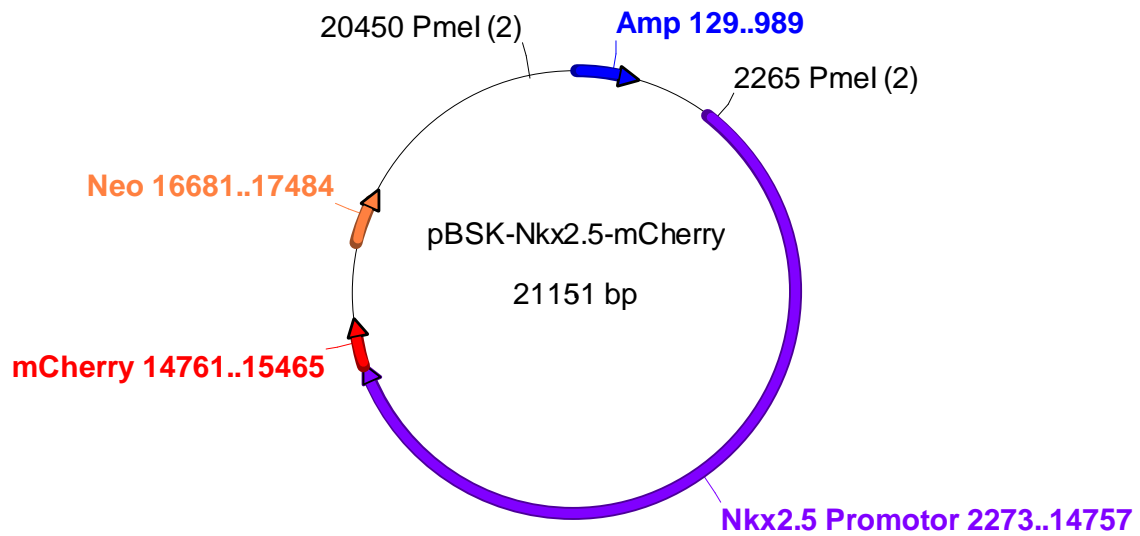


Abb. 9. pBSK-Nkx2.5-mCherry Vektor. Das Plasmid enthält Antibiotika-Resistenzgene Neomycin (Neo) und Ampicillin (Amp) und zur Linearisierung des Plasmids eine wichtige Schnittstelle für das Restriktionsenzym Pmel.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion kurz PCR (*polymerase chain reaction*) genannt, ist eine Methode zur Vervielfältigung eines kurzen, genau definierten DNA-Abschnittes (Template). Die PCR wurde in dem SensoQuest Thermocycler durchgeführt. Die Reaktion verläuft typischerweise in drei aufeinanderfolgenden Schritten:

- Denaturierung: Spaltung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge (üblicherweise bei 94 °C)
- Annealing: Anlagerung von Primern an die Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Die optimale Annealing-Temperatur (T_m) der Primer wird für jedes Paar individuell ermittelt
- Elongation: Ausgehend von den Primern wird der Einzelstrang mit Hilfe von der eingesetzten Polymerase und den einzelnen Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) zu einem Doppelstrang verlängert. Die Temperatur beträgt dabei 72 °C.

Mit jedem Zyklus wird die DNA zwischen den beiden Primern verdoppelt. Dies führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA. Diese Abfolge wird in 30-40 Zyklen wiederholt.

Der Reaktionsansatz zur Herstellung des gewünschten DNA-Abschnittes und die dafür entsprechenden Einstellungen des Thermocyclers sind im Folgenden zusammengestellt:

Reaktionsansatz für Klonierung, 100 µl		Einstellungen des Termocyclers		
Template-DNA	0,5 µl (ca. 0,3 µg)	Temperatur	Zeit	Zyklen
10x Pfu Puffer	10 µl	95 °C	5 min	
10 mM dNTPs	2 µl	95 °C	30 sec	35
forward - Primer	2,5 µl (25 pMol)	Primer- abhängig	30 sec	35
reverse - Primer	2,5 µl (25 pMol)	72 °C	t _i ~ 2 min	35
Pfu Polymerase	1 µl		pro k.b.	
Nuklease freies Wasser	ad 100 µl	72 °C	7 min	

Reaktionsansatz, genomische Integration		Einstellungen des Termocyclers		
Genomische-DNA	50 ng	Temperatur	Zeit	Zyklen
5x Go Taq Puffer	5 µl	94 °C	3 min	
10 mM dNTPs	1 µl	94 °C	30 sec	35
forward - Primer	1 µl	55 °C	30 sec	35
reverse - Primer	1 µl	72 °C	30 sec	35
GoTaq Polymerase	0,1 µl	72 °C	7 min	
Nuklease freies Wasser	ad 25 µl			

3.1.2 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktions (RT-PCR)-Analyse

Die RT-PCR dient zum semiquantitativen Nachweis der mRNA-Expression. Im ersten Schritt wird von der Probe die gesamte RNA isoliert. Im zweiten Schritt erfolgt mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) die Umschreibung von RNA in die komplementäre DNA (cDNA). Anschließend wird die gewünschte DNA mittels PCR amplifiziert.

3.1.2.1 RNA-Isolation

Die zu untersuchenden Zellen werden zuerst mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert, zwei Mal mit PBS gewaschen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20 °C gelagert.

Sobald die Proben untersucht werden sollen, werden diese aufgetaut und in 400 µl RNA-Lysispuffer resuspendiert. Die RNA-Isolierung erfolgt mittels Promega SV Total RNA Isolation System. Zu den Proben wird nun 400 µl 95%-iges Ethanol hinzugefügt. Anschließend wird die Mischung auf die Filtersäulen (*spin basket assembly tubes*) aufgetragen und bei 12000g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415D). Das Eluat wird verworfen. Nun werden 600 µl RNA Wash Solution zugegeben und erneut bei 12000g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Eluat wird erneut verworfen. Von dem DNA-Inkubations Mix (pro Probe: 40 µl Yellow Core Puffer, 5 µl 0,09 M MnCl₂, 5 µl DNaseI von Promega) werden je 50 µl direkt auf den Filter der Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im weiteren Schritt wird 200 µl DNase Stop Solution hinzugegeben und bei 12000g für 1 min zentrifugiert. Auf die Säule wird erneut 600 µl RNA Wash Solution hinzupipettiert und erneut bei 12000g für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen. Der letzte Waschschritt erfolgt unter Zugabe von 250 µl RNA Wash Solution und anschließender Zentrifugation für 2 min bei 12000g. Die RNA kann nun durch nucleasefreies Wasser (100 µl) und einminütige Zentrifugation von der Säule in ein neues Eppendorfgefäß eluiert werden. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt mit Hilfe des NanoDrop 2000 Spektrophotometers von Thermo Scientific. Der Nullabgleich erfolgt mit nucleasefreiem Wasser.

3.1.2.2 RT-PCR

Im nachfolgenden ist der Reaktionsansatz für RT mit den benötigten Substanzen sowie die Einstellungen des Thermocyclers zur Durchführung der PCR aufgeführt. Die verschiedenen Substanzen für (außer dNTPs) wurden von der Firma Applied Biosystems hergestellt. Die dNTPs wurden von der Firma Promega verwendet.

Reaktionsansatz für RT, 20 µl		Einstellungen des Thermocyclers	
200 ng RNA in DEPC-H ₂ O	10,2 µl	Temperatur	Zeit
10x PCR Puffer	2 µl	22 °C	10 min
25 mM MgCl ₂	4 µl	42 °C	50 min
100 mM dNTP-Mix	0,8 µl	95 °C	10 min
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl	4 °C	∞
Oligo (dT) 16 Primer (50 µM)	1 µl		
MuLV Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1 µl		

Reaktionsansatz für PCR

DNA/RT-Produkt	1 µl
5x PCR GreenGoTaq Puffer	5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
forward - Primer	1 µl
reverse - Primer	1 µl
GoTaq DNA Polymerase	0,1 µl
nukleasefreies Wasser	ad 25 µl

3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Auftrennung von Nukleinsäure-Strängen nach ihrer Größe. Lange Fäden aus Agarosepolymeren werden zu einem Gel vernetzt. Das Gel hat die Funktion eines Siebes. Mit dem Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch das Gel. Dabei bewegen sich die kleineren Moleküle schneller durch die engen Maschen des Gels als die größeren. Es kommt zur Auftrennung der Nukleinsäure-Stränge nach ihrer Größe. Zusätzlich zu den Proben wird ein Marker auf das Gel aufgetragen, der

Stränge bekannter Größen enthält. Durch den Vergleich mit dem Marker kann die Größe des unbekanntes Stranges ermittelt werden.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels NanoDrop

Der NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) wird zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen durch Messung der optischen Dichte verwendet. Dabei wird die Absorption der Lösung bei verschiedenen Wellenlängen gemessen.

Die Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die aromatischen Ringe der Basen sind hierbei für die Absorption verantwortlich. Liegt eine doppelsträngige DNA vor, so entspricht eine OD_{260} von 1,0 einer Konzentration von $50 \mu\text{gml}^{-1}$, bei RNA dagegen $40 \mu\text{gml}^{-1}$.

Anhand des Verhältnisses der $OD_{260\text{nm}}$ und der $OD_{280\text{nm}}$ kann die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden. Ein Verhältnis von $>1,8$ spricht für eine reine DNA-Probe, ein Verhältnis von $>2,0$ für eine reine RNA-Probe (NanoDrop 2000/2000c Spektralphotometer User's Manual).

Beim NanoDrop Spektrophotometer können Konzentrationen von $2-3000 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$ in einem Probenvolumen von nur $1 \mu\text{l}$ gemessen werden. Dazu werden $1-2 \mu\text{l}$ Nukleinsäurelösungen direkt auf die Messoberfläche pipettiert. Daraufhin wird der Probearm des Gerätes heruntergelassen und die Probe vermessen. Durch die Oberflächenspannung der Probe wird eine Flüssigkeitssäule zwischen den Enden der optischen Fasern der Messoberfläche und des Probearms aufgebaut, die den Messpfad etabliert. Die gemessenen Spektren, Absorptionswerte und Konzentrationen erscheinen anschließend auf einem Computerbildschirm.

3.2 Klonierung der DNA-Konstrukte

Bei der Klonierung wird ein spezifisches DNA-Fragment in einen Vektor integriert. Das gewünschte DNA-Fragment wird mittels PCR amplifiziert. Dabei dienen die jeweils eingesetzten Oligonukleotide unter anderem auch zum Anfügen der spezifischen DNA-Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen. Zur Insertion der Ziel-DNA in das gewünschte Plasmid erfolgt ein Restriktionsverdau

sowohl von dem Vektor im dem sich die Ziel-DNA befindet als auch von dem Plasmid. Die komplementären Enden werden anschließend durch eine Ligase miteinander verbunden. Zur Vervielfältigung der klonierten Plasmide werden diese durch eine chemische Transformation in die Bakterien eingefügt.

3.2.1 Restriktionsverdau

Die durch PCR hergestellten doppelsträngigen DNA-Fragmente besitzen an Ihren 5`- und 3`-Enden die spezifischen Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen, die meistens aus einer palindromischen Sequenz von vier bis acht Basenpaaren bestehen. Nach dem Restriktionsverdau entstehen am 5`- und 3`-Ende die sog. *sticky ends* (überhängende Enden). Der Restriktionsansatz sowohl für das PCR-Fragment als auch für den Zielvektor ist im Folgenden aufgeführt:

PCR Produkt	40 µl
/Zielvektor	6 µg
10x Restriktionsenzym puffer	5 µl
ggf. 100x BSA Stammlösung	0,5 µl
Restriktionsenzym 1	2,5 µl
Restriktionsenzym 2	2,5 µl
Wasser	ad 50 µl

Der Ansatz wird zusammen gemischt und bei 37°C im Thermomixer mind. 2 Std. inkubiert. Danach erfolgt die Auftrennung der Ansätze über das Agarosegel und anschließend die Gelextraktion über das Gelextraktions-Kit.

3.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechenden Banden werden unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA aus dem Gelstückchen mit dem QIAquick Gel Extractions-Kit der Fa. Qiagen nach Hersteller-Protokoll isoliert und aufgereinigt. Die

Eluierung des Inserts und der Plasmid-DNA von der Säule des Kits erfolgt mit *Aqua dest.* für den Restriktionsansatz (Vektor - 40 µl, Insert oder geschnittenes PCR-Produkt - 40 µl) oder mit EB-Puffer für den Ligationsansatz (Vektor - 50 µl, Insert oder geschnittenes PCR-Produkt - 25 µl).

3.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation wird das Insert mit dem linearisierten Ziel-Vektor nach einer Ligationsreaktion durch das Enzym T4-DNA-Ligase zu einem intakten, zirkulären Plasmid verknüpft. Der Ligationsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

Insert	11,5 µl (ca. 300 ng)
Zielvektor	1 µl (ca. 150 ng)
10x Ligase-Puffer	1,5 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl

Der Ansatz wird zusammen pipettiert und mind. 2 Std. im Thermomixer bei 14°C inkubiert. Danach erfolgt die Auftrennung der Ansätze über das Agarosegel. Über das Gelextraktions-Kit werden die ausgeschnittenen Gelstücke aufgereinigt.

3.2.4 Transformation und Selektion von Bakterienzellen

Zur Transformation klonierter Plasmide werden kompetente XL1-Blue *E. Coli* Zellen benutzt. Dazu werden 65 µl Wasser und 20 µl vom 5x KCM Puffer zum Ligationsansatz pipettiert und 5 Minuten auf Eis gehalten. Zum Ansatz werden nun 100 µl aufgetaute kompetente Zellen dazugeben und weitere 20 Minuten auf Eis und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt die Zugabe von 1 ml LB-Medium. Der Reaktionsmix wird im Anschluss 50 Minuten bei 37°C im Thermomixer (Eppendorf) bei 700 rpm geschüttelt. Für die Selektion transformierter *E. coli* Zellen werden dem LB-Agar bei der Herstellung von LB-Platten, je nachdem ob die transformierten Zellen Ampicillin- oder Kanamycin-Resistenzgen besitzen, Ampicillin oder Kanamycin dazugegeben. Die nicht-transformierten Zellen können somit auf solchen Platten nicht wachsen. Der Ansatz wird nach der Inkubation 3 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Ein Teil des

Überstandes wird verworfen und das Pellet im restlichen Medium (ca. 100 µl) resuspendiert. Die Zellen werden auf LB-Platten ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C für mind. 12 Stunden inkubiert.

3.2.5 Vervielfältigung von transformierten Klonen

Zur Vervielfältigung von transformierten Klonen in kleinen Mengen („Minis“) werden 15 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt) vorbereitet in denen je 3 ml LB-Medium mit dem Plasmid-spezifischen Antibiotikum vorgelegt wird. Einzelne Kolonien werden mit autoklavierten Pipettenspitzen gepickt, in Falcon-Röhrchen gegeben und im Schüttler über Nacht bei 37°C, 200 rpm geschüttelt. Im Anschluss erfolgt eine Aufreinigung der Plasmide mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit nach Herstelleranleitung.

Zur Herstellung größerer Plasmidmengen („Midis“) wird im Erlenmeyerkolben 30 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium vorgelegt. Die weiteren Schritte werden, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgt mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit nach Herstelleranleitung.

3.2.6 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Aufreinigung

Die Aufreinigung des pBSK-Nkx2.5-Vektors für die Transfektion in die ESCs und iPSCs aufgrund seiner Größe von 18185 bp erfolgt über Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Aufreinigung. Dazu wird der 300 µl Verdaumix auf 500 µl mit TE-Puffer (10 mM Tris mit HCL auf den pH 8.0 einstellen) aufgefüllt. Hinzu wird 500 µl des Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch unter dem Abzug dazupipettiert und geschüttelt bis eine milchig trübe Emulsion entsteht. Es erfolgt im nächsten Schritt eine Phasentrennung des Gemischs durch 3 minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 16000g. Die wässrige Phase wird in ein neues Gefäß überführt und mit gleichem Volumenanteil Chloroform gewaschen. Es erfolgte erneute Phasentrennung durch Zentrifugation (3 Minuten, Raumtemperatur und 16000g). Die wässrige Phase wird in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 3 M Natriumazetat-Lösung wird eine NaOAc-Konzentration von 0,3 M eingestellt und durch Zugabe von 0,75 Volumenanteilen an Isopropanol die DNA extrahiert. Nun wird die DNA durch das Zentrifugieren für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 16000g pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 70%-igem

Ethanol gewaschen. Es erfolgt erneutes Pelletieren der DNA durch Zentrifugation (16000g, Raumtemperatur, 5 Minuten). Der Überstand wird verworfen und das Pellet trocken gelassen. Die DNA wird zum Schluss in 50 µl 10 mM Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 8.5 resuspendiert.

3.3 Zellkultur

Alle Arbeiten erfolgten unter der Sterilwerkbank der Fa. Heraeus Instruments und unter Einsatz von sterilen Materialien und Lösungen. Die Zellen wurden in einem Inkubator der Fa. Heraeus Instruments bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid und 95 % Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Eine mikroskopische Beurteilung der Zellen in Bezug auf Morphologie, Dichte und Differenzierungsgrad erfolgte täglich. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop Zeiss Axiovert 200 mittels des digitalen Bildverarbeitungsprogramms Axio Vision 3 erstellt.

3.3.1 Kultivierung von mausembryonalen Fibroblasten

Embryonale Mausfibroblasten (MEFs) werden zur Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen (mESCs) sowie induzierter pluripotenter Stammzellen (iPSCs) benötigt. Diese werden als Versorgungsschicht auf die Zellkulturschalen der Fa. Nunc aufgetragen.

Die MEFs werden im Entwicklungsstadium E 14,5 bis E 15,5 aus Embryonen von NMRI-Mäusen isoliert und in MEF-Medium auf Zellkulturschalen bis zu maximal vier Passagen kultiviert. Bevor die MEFs als Versorgungsschicht eingesetzt werden können, muss deren Proliferationsfähigkeit mit dem Zellspindelgift Mitomycin C ($10 \mu\text{gml}^{-1}$) für 3 h bei 37°C inhibiert werden. Danach werden die Fibroblasten drei Mal mit DPBS gewaschen und anschließend mit 0,2%-igem Trypsin abgelöst und auf 60 x 15 mm mit Gelatine (0,1%) beschichtete Zellkulturschalen (pro cm^2 Wachstumsfläche 0,1 ml Gelatinelösung bei 4°C über Nacht) umgesetzt. Die inaktivierten MEFs werden maximal zwei Tage verwendet.

3.3.2 Kultivierung von ESCs- und iPSCs

Die undifferenzierten ESCs und iPSCs werden auf inaktivierten MEFs und in mES-Medium kultiviert. Um den undifferenzierten Zustand der ESCs- und iPSCs zu erhalten, erfolgt alle 24-48 h eine Passagierung der Zellen auf frische MEFs. Dazu wird das mES-Medium abgesaugt. Danach werden die Zellen zwei Mal mit 0,1%-iger Trypsin/ 0,01%-iger EDTA-Lösung für 1 Minute behandelt. Durch Zugabe von FCS, das im frischen Medium enthalten ist, wird die Trypsinaktivität gestoppt. Die Zellen können nun durch auf- und abpipettieren in Einzelsuspension gebracht und je nach Verwendung entweder in gewünschter Zellzahl auf Zellkulturschalen ausplattiert, eingefroren oder zum Ansetzen für Versuche verwendet werden.

3.3.3 Einfrieren und Auftauen von ESCs- und iPSCs

Zur langfristigen Lagerung von Zellen und Aufrechterhaltung der Zelllinien werden diese in Einfrierröhrchen konserviert. Dazu werden die Zellen mit Trypsin behandelt, in MEFs-Medium aufgenommen und zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wird in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen (Starlab) überführt. Die Einfrierröhrchen werden in einer Einfrierbox (Nalgene®), die zum Teil mit Isopropanol gefüllt ist, langsam (1 °C pro Minute) bei -80 °C herunter gekühlt. Anschließend werden die Einfrierröhrchen im flüssigen Stickstoff gelagert.

Für das Auftauen der Zellen werden die Einfrierröhrchen kurz in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen, in dem bereits die zehnfache Menge an MEFs-Medium vorgelegt ist, langsam hinzugegeben und 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet im mES-Medium resuspendiert und ausplattiert.

3.4 Transfektion von ESCs und iPSCs

Nach der Generierung der Bry-, Mesp1- und Nkx2.5-mCherry Klone werden diese via Elektroporation mit Hilfe des Amaxa™ Mouse ES Cell Nucleofector™ Kits der Fa. Lonza in die ESCs mit dem Namen der Zelllinie CAG-EPAC und iPSCs (CAG-EPAC-KGA) transfiziert.

Als Vorbereitung für die Transfektion werden die ESCs und iPSCs von den Mausfibroblasten durch das Preplating getrennt. Für eine Transfektion wird eine Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen benötigt. Die gewünschte Menge der Zellsuspension wird in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen übertragen und zentrifugieren. Das Zellpellet (1×10^6) wird in 90 μ l mES-Nucleofaktor-Puffer resuspendiert. In ein 1,5 ml großes Eppendorfgefäß werden 10 μ l Supplement, 4-6 μ g DNA und 90 μ l resuspendierter Zellen zusammen gemischt. Das Gemisch wird in die Amaxa®-Nucleofectorl-Küvetten übertragen, in das Gerät Amaxa-Nucleofector®II Device reingestellt und das entsprechende Zelltyp-Programm gewählt, in dieser Arbeit A-030 und zwei Mal „Start“-Knopf betätigt. In die Amaxa® Pipette wird 500 μ l vorgewärmtes ES-Medium aufgenommen und etwas in die Küvette vorsichtig dazupipettiert. Anschließend werden alle Zellen mit dem Medium in die Amaxa® Pipette aufgenommen und auf die 60 x 15 mm Zellkulturschale mit MEFs- Versorgungsschicht tröpfchenweise ausplattiert.

3.5 Selektion von transfizierten Zellen

Die Selektion der Zellen zur Generierung stabiler transfizierter Klone erfolgt mit dem Antibiotikum Geneticin (G-418). G418 wird mit einer Konzentration zwischen 250 und 300 μ gml⁻¹ zum mES-Medium dazugegeben. Die Selektion beginnt 24 h nach der Transfektion und dauert ca. 2 Wochen. In dieser Zeit werden die Morphologie und der allgemeine Zustand der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet. Weiterhin wird Mediumwechsel durchgeführt und ggf. die Zellen umgesetzt, wobei beim ersten Umsetzen erst nach 24 h Selektionsmedium dazugegeben werden kann.

Da die Zellen längere Zeit in der Zellkulturschale verbleiben und durch das Selektionsmedium die Fibroblasten-Versorgungsschicht abgetötet wird, müssen die Zellen über das Conditioning-Medium versorgt werden. Das Medium wird hergestellt, in dem das mES-Medium auf frische Fibroblasten gegeben und zwei Tage bei 37 °C inkubiert wird. Danach wird das Medium abgenommen, das Antibiotikum dazugegeben und für die Selektion verwendet.

3.6 Alkalische Phosphatase Färbung von undifferenzierter ESCs und iPSCs

Undifferenzierte Stammzellen zeigen eine hohe Expression des Enzyms Alkalische Phosphatase (Wobus et al., 1984, Pease et al., 1990). Das Enzym kann somit als ein Marker zum Nachweis des Differenzierungszustandes von Stammzellen (ESCs und iPSCs) verwendet werden.

Die Alkalische Phosphatase Färbung erfolgt mit dem Alkalische Phosphatase Kit der Fa. Sigma-Aldrich®. Hierfür wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und für 30 Sekunden mit Fixierungslösung (5 ml Citrate Solution, 13 ml Aceton, 1,6 ml Formaldehyd 37%) behandelt und anschließend für eine Minute mit *Aqua dest.* gewaschen. Im nächsten Schritt wird die Färbelösung (0,3 ml Natrium Nitrat zusammen mit 0,3 ml FBB-Alkaline Solution mischen und 2 Minuten stehen lassen, 13,5 ml H₂O dazupipettieren, kurz vor Beginn 0,3 ml Naphthol AS-BI Alkaline Solution dazu pipettieren) für 15 min aufgetragen und bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden erneut für 2 Minuten mit *Aqua dest.* gewaschen und anschließend für 10 Sekunden mit Neutral Red als Gegenfärbung gefärbt. Die Färbung wird durch Leitungswasser abgestoppt und die Schalen zum Trocknen gelassen. Am nächsten Tag kann die Färbung der Zellen unter dem Mikroskop ausgewertet werden. Die blaue Färbung der Zellen entspricht dem undifferenzierten Zustand der Zellen, die rote Färbung dagegen dem differenzierten Zustand.

3.7 Differenzierung von ESCs und iPSCs in kardiovaskuläre Vorläuferzellen

Die *in vitro*-Differenzierung von ESCs und iPSCs erfolgt durch den Entzug von LIF und MEFs. Hierzu erfolgt die Differenzierung von Zellen im Differenzierungsmedium ohne Zusatz von LIF mit dem zuvor angewendeten Verfahren zur Trennung von ESCs und iPSCs von den Fibroblasten, das als Preplating bezeichnet wird. Im Weiteren wird auf das genaue Vorgehen eingegangen.

Für alle die in dieser Arbeit durchgeführten Differenzierungen transfizierter ESCs und iPSCs werden die Zellen durch das Preplating von MEFs getrennt. Dazu werden die Zellen nach der Trypsinbehandlung in mEF-Medium aufgenommen und auf Kulturplatten mit Gelatinebeschichtung ausplattiert. Die ESCs und iPSCs weisen eine niedrigere Adhärenz gegenüber von Fibroblasten auf und können bereits nach einer

Stunde Inkubationszeit bei 37 °C leicht von der Gelatineplatte mit einer Glaspipette abgespült werden. Der so entstandene Überstand wird 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und in Differenzierungsmedium Iscove mit Zusatz von MTG (Iscove+MTG) resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt im nächsten Schritt mittels der Thoma Zählkammer.

3.7.1 *In vitro* Differenzierung von ESC- und iPSC- Bry und Mesp-Klone als Monolayer

Für die spontane Differenzierung der Bry- und Mesp- mCherry Klone als Monolayer werden die Zellen zuerst durch das Preplating von der Versorgungsschicht getrennt und mit einer Zellzahl von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen auf 60 x 15 mm gelatinebeschichtete Zellkulturschalen und auf 6-Well-Platten mit Deckgläschen ausplattiert. Die Zellen werden so über mehrere Tage im Iscove+MTG Medium kultiviert, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel stattfindet. Zusätzlich werden innerhalb von den ersten 7 Tagen Proben von Bry-mCherry Klonen für die RT-PCR weggefroren. Dazu werden die Zellen von den Kulturschale mittels Trypsin/EDTA-Lösung gelöst, in 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert und anschließend mit DPBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in Stickstoffeis kurz eingetaucht und anschließend bei -80 °C gelagert.

Die Proben für die RT-PCR der Mesp1-mCherry Klone werden an den Tagen d0, d4, d5, d7, d10, d12 und d16 weggefroren.

Weiterhin werden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Sobald die rot fluoreszierenden Zellen zu sehen sind, werden mit diesen Zellen FRET-Messungen durchgeführt.

3.7.2 *In vitro* Differenzierung von ESCs und iPSCs mittels *hanging drop*

Ein weiteres Verfahren zur spontanen Differenzierung von ES und iPSC-Zellen ist die *in vitro* Methode mittels *hanging drop* (hängende Tropfen). Dazu werden die Zellen von Mausfibroblasten getrennt, im Differenzierungsmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Im nächsten Schritt werden je 300 Zellen pro 20 µl Tropfen mit einer Multikanalpipette auf den Deckel einer unbeschichteten 85,48 x 127,76 mm

Platte (CELLSTAR®OneWell Plate™, greiner bio-one) aufgetragen. Der Deckel mit den Tropfen wird vorsichtig umgedreht und auf die zuvor mit DPBS befeuchtete Platte aufgesetzt. Nun erfolgt eine zweitägige Inkubation der Zellen bei 37 °C. Während dieser Phase kommt es zur Bildung der Embryoid Körper (*embryoid bodies* (EBs)). Am zweiten Tag (d2) werden die *bodies* mit Iscove+MTG-Medium von dem Deckel abgespült und in 60 x 15 mm unbeschichtete Bakterienkulturschalen (Sarstedt) überführt. Das Medium wird auf 5 ml aufgefüllt und die Zellen erneut bei 37°C inkubiert. Am fünften Tag (d5) werden die EBs auf gelatinebeschichtete Schalen 60 x 15 mm je 30 EBs und 6-Well-Platten mit Deckgläschen je 4 EBs ausplattiert. Alle 48 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel.

Die *hanging drop*-Differenzierungsmethode wird bei Mesp1- und Nkx2.5-mCherry Klonen angewendet. Die Proben für die RT-PCR werden bei Mesp1-Klonen an den Tagen d0, d5+2, d5+5, d5+7, d5+11 und bei Nkx2.5-Klonen an den Tagen d0, d5, d5+3, d5+8, d5+11, d5+16 und d5+21 weggefroren. Auch hier erfolgen FRET-Messungen in rot fluoreszierenden und schlagenden Zellen.

3.7.3 *In vitro* Differenzierung von ESC und iPSC mittels *mass culture*

Zusätzlich zu der *hanging drop*-Methode erfolgt die Differenzierung der Nkx2.5-Klone mit dem *mass culture*-Verfahren. Nach dem Preplating und der Zellzahlbestimmung erfolgt das Resuspendieren der Zellen im Iscove+MTG Medium. Die Zellen werden im Anschluss mit einer Zellzahl von $2,5 \cdot 10^5$ auf 60 x 15 mm unbeschichtete Bakterienkulturschalen gegeben. Das Medium wird auf 5 ml aufgefüllt und die Zellen bei 37°C inkubiert. Während der nächsten 5 Tage kommt es zur Bildung Embryonaler Körper. Ein Mediumwechsel erfolgt nach drei Tagen. Dafür werden die EBs vorsichtig mit einer Eppendorfpipette (100-1000 µl) eingesammelt und auf neue 60 x 15 mm unbeschichtete Bakterienkulturschalen ins frische Iscove+MTG Medium überführt. Nach weiteren zwei Tagen (d5) werden die EBs auf gelatinebeschichtete 60 x 15 mm Zellkulturschalen und 6-Well-Platten mit Deckgläschen ausplattiert. Alle 48 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel. Schlagende Kardiomyozyten werden mit FRET vermessen.

3.8 FRET-Messungen

Die FRET-Messungen werden mit dem Zeiss AxioObserver A1 Mikroskop durchgeführt, ausgestattet mit einem Plan Neofluar 63x Ölimmersionsobjektiv und einem 4-Kanal-Emissionssystem (QuadView, Photometrics). Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen werden in der Attofluor-Halterung (Invitrogen) eingespannt. Für jedes Experiment werden manuell Einzelzellen oder Zellgruppen mit roter Fluoreszenz bzw. bei den undifferenzierten Zellen mit cyan-gelber Fluoreszenz ausgesucht.

Die Anregung erfolgt durch den Polychrom V Monochromator-basierte Lichtquelle (Till Photonics) und die Bilder werden mit CoolSNAP HQ CCD Camera (Photometrics) aufgenommen. Die Aufnahmen werden mit VisiView Software (Visitron Systems) gesteuert. Dabei wird eine Belichtungszeit von 30-50 millisekunden mit Bildaufnahmen in 5 Sekundenabständen verwendet.

Bei allen FRET-Experimenten wird das CFP als Donor mit einer Wellenlänge von 436 nm angeregt. Als Akzeptorfluorophor wird YFP verwendet. Zur Auswertung wird die Akzeptoremission um das Durchbluten vom Donor- in den Akzeptorkanal korrigiert. Die Berechnungen erfolgt mit der Origin 6.1 Software. Die Messdaten sind als Quotienten aus korrigierter Akzeptor- und Donorfluoreszenz (YFP/CFP Ratio) dargestellt, welche bei der Erstellung der Balkendiagramme auf maximale FRET-Änderungen durch Forskolin plus IBMX bezogen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung des Bry-mCherry Konstrukts

Zur Herstellung des Brachyury-mCherry (Bry-mCherry) Konstrukts wurde der Brachyury-eGFP RexNeo Vektor verwendet. Der MHC-Cherry2AHygroNeo Vektor mit der sich darauf befindenden mCherry Sequenz wurde als Template für die Amplifizierung des Inserts mittels PCR verwendet. Die in der PCR eingesetzten Primer waren Cherry-Agel-forward- und Cherry-Sall-reverse-Primer. Durch die Auftragung der PCR-Probe auf das Agarosegel und die anschließende Elektrophorese kann das Insert auf die Richtigkeit seiner Größe überprüft und von den nicht mehr benötigten Template Vektor getrennt werden. Die Größe sollte dabei 724 bp betragen. Das Insert wurde im Anschluss aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels QIAQuick Gel Extraction Kit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Zur Insertion der Ziel-DNA in das gewünschte Plasmid erfolgte ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen Sall und Agel sowohl von der Ziel-DNA als auch von dem Brachyury-eGFP RexNeo Vektor, wobei GFP-Sequenz dadurch herausgeschnitten wurde. Die beiden Verdauungsansätze wurden erneut auf das Gel zum Ausschneiden der gewünschten DNA-Fragmente aufgetragen. Die Abb. 10 zeigt den Restriktionsverdau vom Zielevektor und mCherry PCR-Produkt.

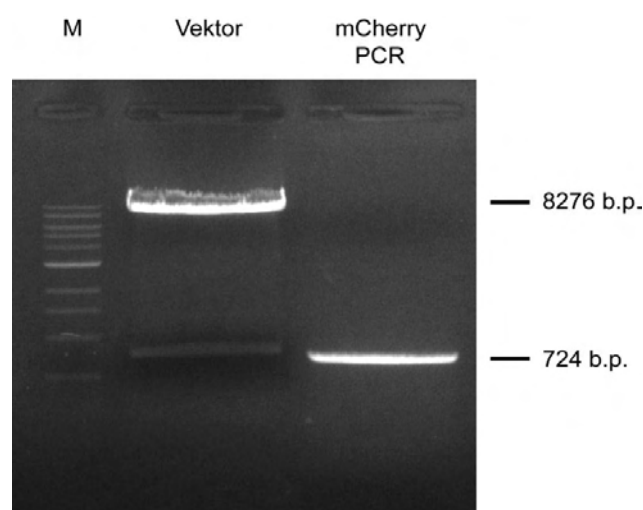


Abb. 10. Restriktionsverdau vom Brachyury-eGFP Ausgangsvektor und mCherry PCR Produkt mit Agel und Sall.

Nach der Aufreinigung erfolgte die Ligation des Inserts mCherry mit der Zielvektor-DNA zu einem intakten, zirkulären, 9 kbp großen Plasmid, wobei mCherry-Sequenz direkt hinter dem Bry Promoter einkloniert wurde. Diese ermöglicht die Identifizierung der Expression des präkardialen mesodermalen Markers Bry in Bry-mCherry transfizierten Zellen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Transformation von Bry-mCherry Plasmiden in kompetente XL1-Blue *E. Coli*. Die Zellen wurden nach der Transformation auf ampicillinhaltigen LB-Agar Bakterienkulturen ausplattiert und über Nacht wachsen gelassen. Positiv transformierte Klone konnten anschließend für die Herstellung von Minis gepickt werden. Nach der Isolation der Plasmide der Mini-Übernachtskultur mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit nach Herstelleranleitung wurden diese für den diagnostischen Restriktionsverdau mit den Enzymen XcmI und XhoI verwendet. Der diagnostische Verdau dient zur Überprüfung der eingesetzten DNA. In der Abb. 11 ist das Resultat des Bry-mCherry Plasmid Verdau zu sehen.

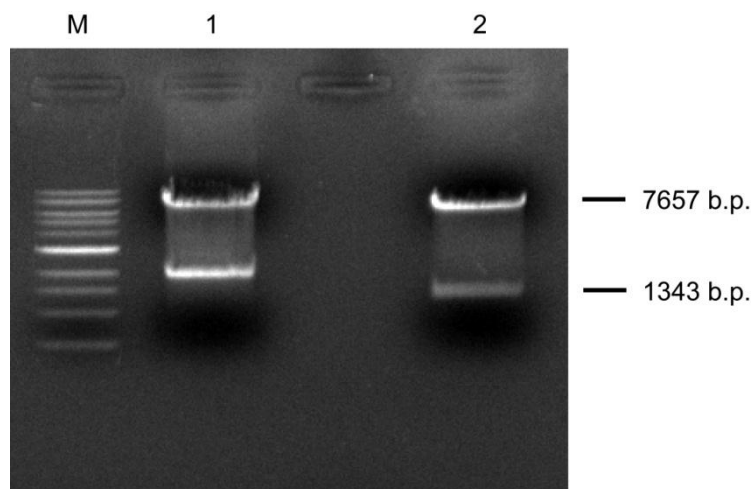


Abb. 11. Diagnostischer Restriktionsverdau von 2 gepickten Klonen mit XcmI und XhoI, bei dem der Klon 2 anhand der richtigen Fragmentgrößen als positiv identifiziert wurde.

Der als positiv identifizierter Klon wurde weiterhin an die Fa. MWG Eurofins zur Sequenzierung geschickt. Nach der erfolgreichen Sequenzierung konnte nun von dem Plasmid eine Midi-Übernachtskultur angesetzt und anschließend über das QIAfilter Plasmid Midi Kit isoliert werden. Die Abb. 12 zeigt eine Plasmidkarte des fertigen Reporterkonstrukts. Zur Transfektion des Plasmids in die ESCs und iPSCs musste zuerst das Plasmid linearisiert werden. Dies erfolgte mit dem Restriktions-

enzym NotI (50 µg Plasmid-DNA, 10 µl NotI, 20 µl 10x Puffer Nr.4, mindestens 2 Stunden Verdau des 200 µl Ansatzes).

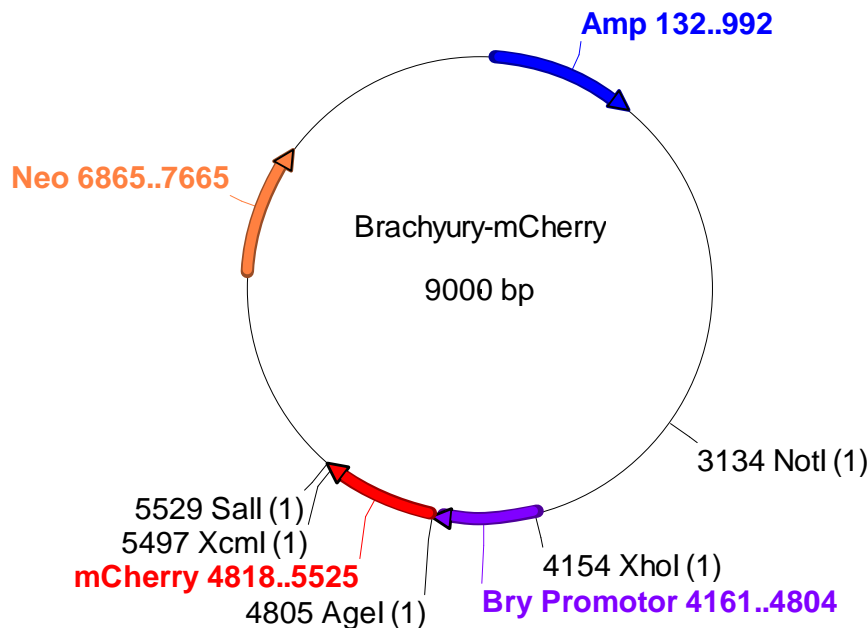


Abb. 12. Brachyury-mCherry (Bry-mCherry) Vektor. Dieses Plasmid enthält den Bry Promoter, die eingebaute mCherry- Sequenz und die für verschiedene Schritte zum Bau und zur Linearisierung des Konstrukts verwendeten Restriktionsenzymststellen.

4.2 Herstellung des Mesp1-mCherry Konstrukts

Für die Herstellung des Mesp1-mCherry Konstrukts wurde der Vektor MHC-Cherry2AHygroNeo als Template für die Amplifizierung des Inserts mCherry mittels PCR benutzt. In den pMesp1-Venus-PL451Neo Vektor wurde schließlich mCherry Sequenz inkloniert.

Hierzu erfolgte die Amplifizierung des Inserts mit den Cherry-XhoI-forward und Cherry-AgeI/Sall-reverse-Primern. Dabei wurde an die mCherry Sequenz XhoI-, Sall- und AgeI-Restriktionsenzymststelle für den Restriktionsverdau im nächsten Schritt hinzugefügt. Der PCR Ansatz wurde zur Überprüfung auf die richtige Größe auf das Agarosegel aufgetragen und anschließend nach dem es aus dem Gel ausgeschnitten wurde, aufgereinigt. Der Vektor pMesp1-Venus-PL451Neo dagegen wurde mit den Restriktionsenzymen Sall und AgeI verdaut, was zum Herausschneiden von GFP und PolyA-Schwanz führte (Abb. 13).

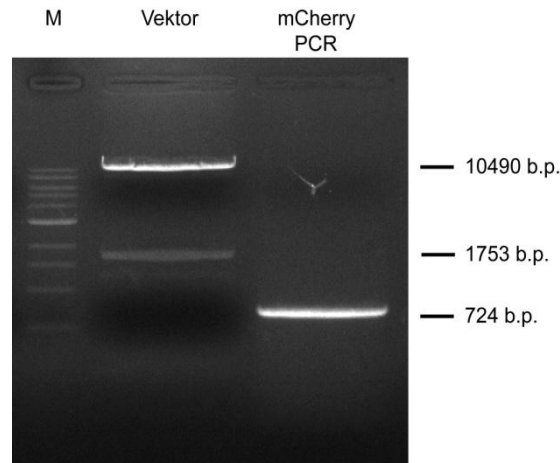


Abb. 13. Restriktionsverdau vom pMesp1-Venus-PL451Neo Ausgangsvektor und mCherry PCR Produkt mit Agel und Sall. 10490 bp großes Fragmentstück des Zielvektors wurde im Anschluss mit dem 724 b.p. großen mCherry PCR-Fragment ligiert.

Bei der anschließenden Ligation vom PCR-Produkt in den Vektor wurde die XhoI Schnittstelle auf Sall Schnittstelle komplementär ligiert, sodass diese Schnittstellen im resultierenden Vektor nicht mehr für weitere Klonierungen oder Restriktionsverdau zur Verfügung standen. Stattdessen erfolgte die Generierung einer neuen Sall Schnittstelle am Ende der mCherry-Sequenz (die Sequenz befand sich auf dem Cherry-Agel/Sall-reverse-Primer), damit im 2. Klonierungsschritt die Poly-A-Sequenz über Sall und Agel eingefügt werden konnte. Es entstand nun das Mesp1-mCherry Konstrukt ohne Poly-A-Schwanz (Abb. 14 zeigt den Kontrollverdau). Dieses Plasmid wurde sequenziert, mittels Midi-Übernachtskultur vervielfältigt und anschließend über das QIAfilter Plasmid Midi Kit isoliert.

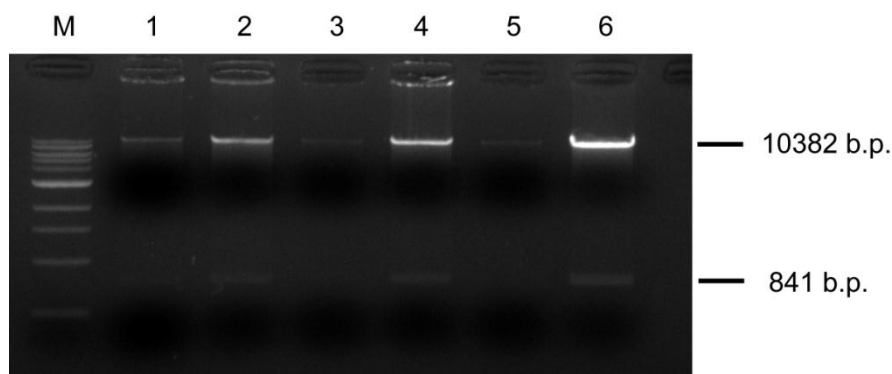


Abb. 14. Diagnostischer Restriktionsverdau von Mesp1-mCherry (ohne Poly-A) Klonen mit Agel und XhoI. Die Klone 1, 2, 4 und 6 wurden anhand der richtigen Fragmentgrößen als positiv identifiziert. Der Klon 6 wurde im nächsten Klonierungsschritt weiter benutzt.

Im zweiten Klonierungsschritt wurde der pMesp1-Venus-PL451Neo Vektor als Template für die Herstellung des Poly-A-Schwanzes mittels PCR benutzt. Dazu wurden Poly-A-Sall-forward und Poly-A-Agel-reverse-Primer verwendet. Nach der Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte ein Verdau des Poly-A-Schwanzes und des Mesp1-mCherry Konstrukts ohne Poly-A-Schwanz mit den Restriktionsenzymen Agel und Sall. Beide Restriktionsansätze wurden anschließend aufgereinigt und mit einander zu einem intakten Plasmid Mesp1-mCherry ligiert (Abb.15). Die mCherry Sequenz befindet sich wie auch beim Bry-mCherry Konstrukt hinter dem Mesp1 Promotor. Dies ermöglicht eine Identifizierung der Mesp1-mCherry positiven Zellen im frühen kardialen Mesodermstadium.

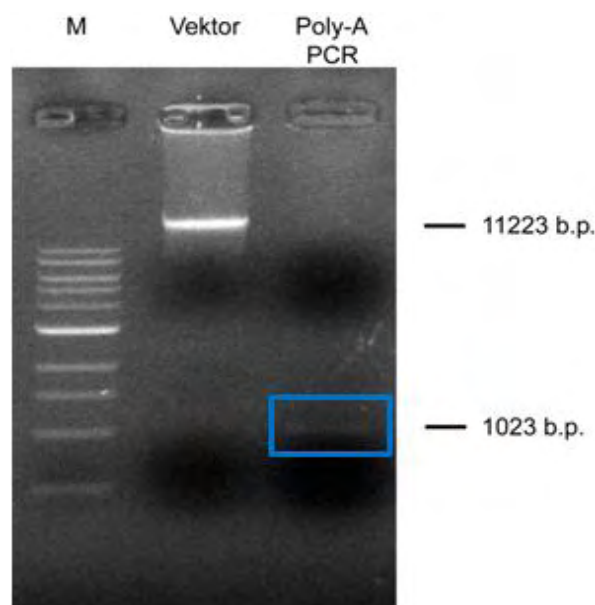


Abb. 15. Restiktionsverdau vom Mesp1-mCherry (ohne Poly-A) Zwischenvektor und Poly-A-Schwanz PCR Produkt mit Agel und Sall (schlecht in der Abbildung erkennbar, blau umrandet).

Die nächsten Schritte wurden bereits bei der Herstellung des Bry-mCherry Klonen beschrieben. Der diagnostische Verdau erfolgte mit den Sall und Agel Restriktionsenzymen. Die Ergebnisse sind in der Abb. 16 zu sehen. Die Linearisierung des fertigen Plasmids (Abb. 17) für die Transfektion wurde mit dem Enzym BamHI durchgeführt (50 µg Plasmid-DNA, 10 µl BamHI, 20 µl 10x Puffer Nr.4, mindestens 2 Stunden Verdau des 200 µl Ansatzes).

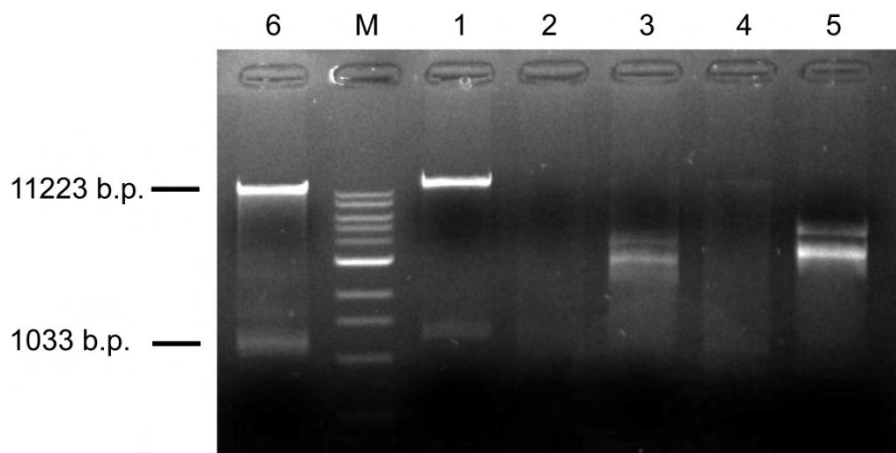


Abb. 16. Diagnostischer Restriktionsverdau vom Mesp1-mCherry Vektor mit Agel und Sall. Der Klon 6 wurde anhand der richtigen Fragmentgröße als positiv identifiziert. Er wurde sequenziert und für die Transfektion der ESCs und iPSCs benutzt.

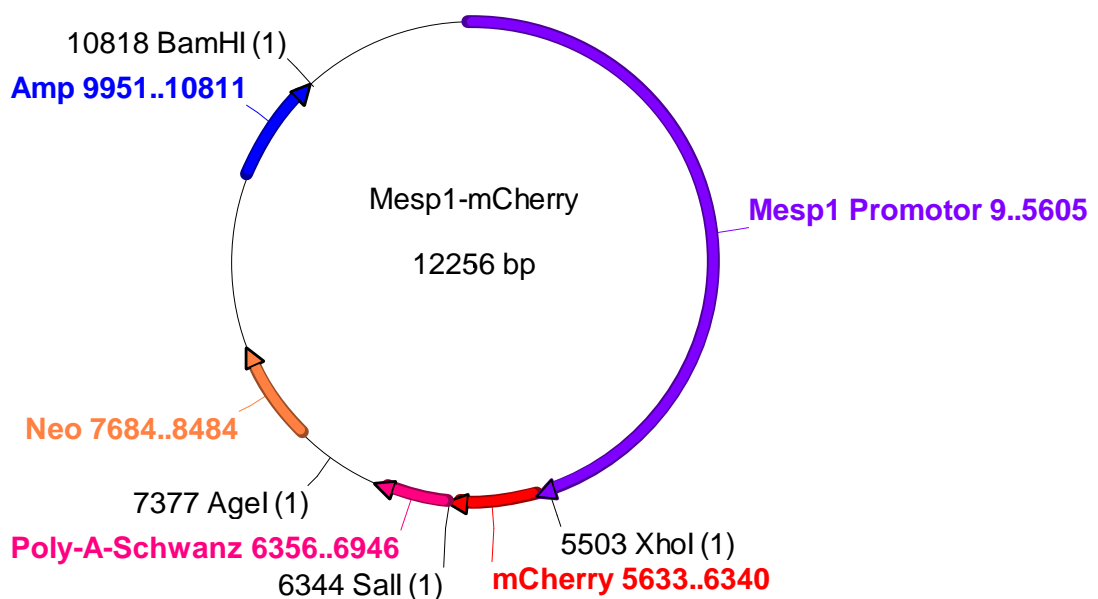


Abb. 17. Mesp1-mCherry Vektor. Das Plasmid besteht aus dem Mesp1 Promoter, mCherry-Sequenz und für verschiedene Schritte zum Bau und zur Linearisierung des Konstrukts verwendete Restriktionsenzymchnittstellen.

4.3 Linearisierung des pBSK-Nkx2.5-mCherry Konstrukts

Die Linearisierung des pBSK-Nkx2.5-mCherry Konstrukts erfolgte mit dem PmeI-Restriktionsenzym. Dazu wurde ein Linearisierungsmix von 50 µg DNA, 15 µl PmeI, 30 µl Puffer Nr.4, 30 µl BSA und 216 µl H₂O über Nacht angesetzt. Zur Überprüfung, ob das Konstrukt an der richtigen Position geschnitten wurde, wurde ein geringer

Anteil des Restriktionsansatzes (1 μ l, 3 μ l, 5 μ l mit einer 1:10 Verdünnung) nach der 3.2.6 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Aufreinigung auf das Agarosegel aufgetragen und nach Größe aufgetrennt (Abb.18). Der Rest wurde für die Transfektion verwendet. Das pBSK-Nkx2.5-mCherry Konstrukt ermöglicht die Identifizierung positiv transfizierter Zellen im kardialen Vorläuferzellenstadium.

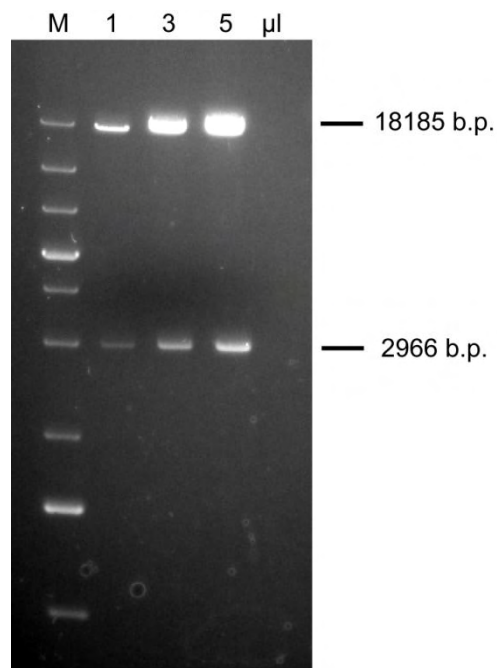


Abb. 18. Ergebnis der Linearisierung vom pBSK-Nkx2.5-mCherry Vektor (18185) mit PmeI. 2966 bp großes Vektorabschnitt befand sich zwischen den beiden PmeI-Schnittstellen und wurde bei dem Verdau ausgeschnitten.

4.4 Transfektion der Hergestellten Konstrukte in die ESCs und iPSCs

Die Transfektion der Bry-, Mesp1- und pBSK-Nkx2.5-mCherry Konstrukte wurde wie im Abschnitt 3.6 beschrieben, durchgeführt. So entstanden ESCs-Zelllinien mit den Namen CAG-EPAC-Bry-Not1/Mesp1/Nkx2.5 und iPSCs-Zelllinien mit den Namen CAG-EPAC-KGA-Bry-Not1/Mesp1/Nkx2.5. Als Negativkontrolle wurde ein Transfektionsmix ohne DNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von 250 μ gml⁻¹ G418 selektiert. In den nächsten zwei Wochen wurde die Konzentration auf 300 μ gml⁻¹ erhöht.

Der Verlauf der Selektion wurde unter dem Mikroskop beobachtet. In den Abb. 19 ist der Unterschied in der Überlebensrate und der Morphologie zwischen den positiv transfizierten Zellen und der Negativkontrolle deutlich zu sehen.

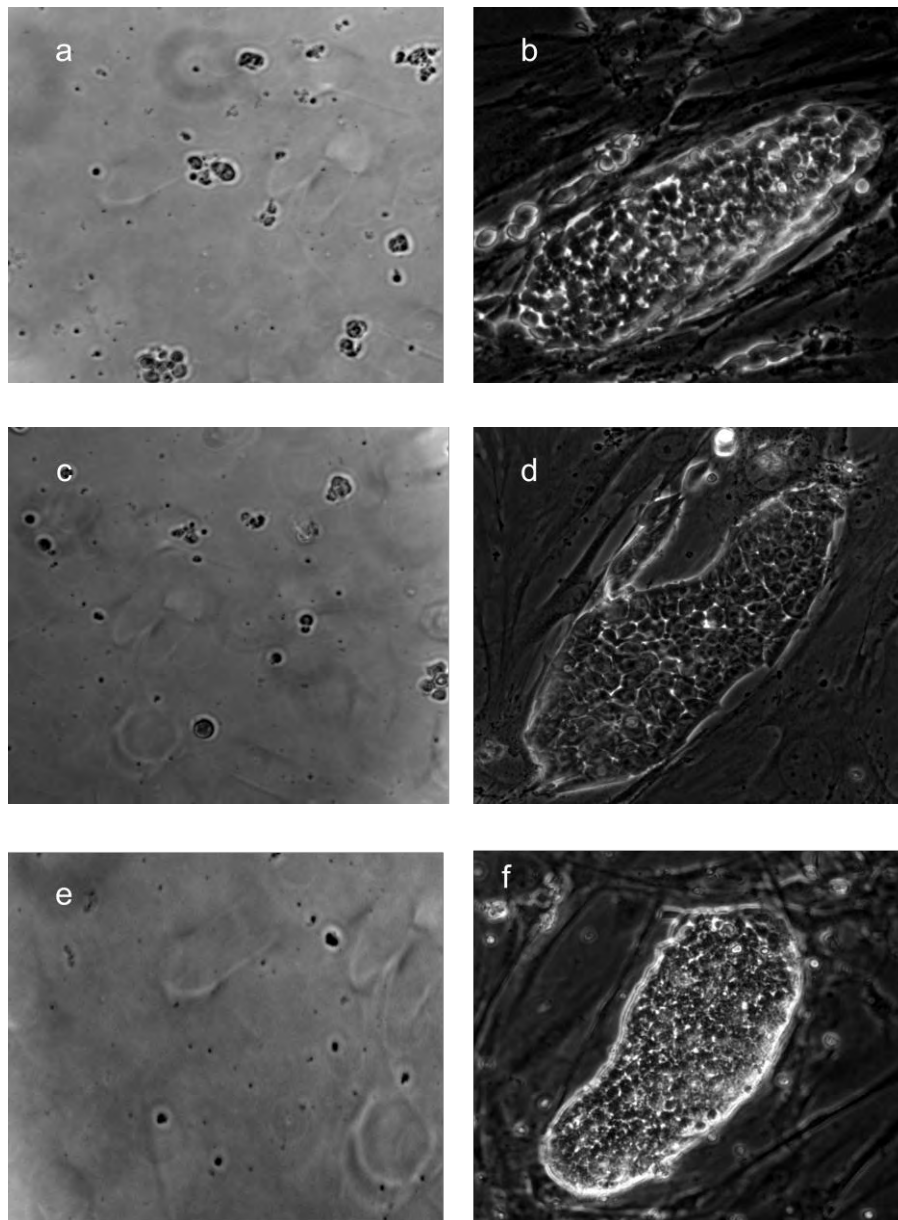


Abb. 19. Vergleich zwischen transfizierten und nichttransfizierten Zellen während der Selektion. Die transfizierten Zellen haben eine Resistenz gegenüber vom Antibiotikum G418 aufgrund des Reportergens entwickelt und weisen somit eine typische Morphologie der ESCs und iPSCs auf (hier nur iPSCs Klone gezeigt). Dagegen waren bei der Negativkontrolle nur tote Zellen wegen des fehlenden Konstrukts und somit des fehlenden Resistenzgens unter dem Mikroskop festzustellen. a), c), e) Tote Zellen der Negativkontrolle von a) Bry-, c) Mesp1- und e) pBSK-Nkx2.5-Vektortransfektion. b), d) f) Positiv transfizierte Klone von b) Bry-, d) Mesp1-, f) pBSK-Nkx2.5-Vektortransfektion.

4.5 Charakterisierung der ES und iPSC-Zellklone mittels PCR

Nach zweiwöchentlicher Selektion wurden die morphologisch schönsten Klone (zwischen 8 und 10 Klonen) von der Platte gepickt und auf eine MEFs-beschichtete 24-Well Platte in mES-Medium mit $300 \mu\text{ml}^{-1}$ G418 übertragen. Nach zweimaligem Umsetzen der Klone wurden diese schließlich bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren, wobei von jedem Klon eine Zellpelletprobe genommen wurde zur Identifizierung der eingebauten Konstrukte in die genomische DNA mittels PCR-Amplifizierung. Die verwendeten PCR Primerpaare waren Bry mit den Nummern B1/B2, Mesp1 (M1/M2) und N1/N2 (Nkx2.5).

Es konnten somit einige Klone identifiziert werden, die das transfizierte Konstrukt in ihrem Genom enthielten. Mit solchen Klonen konnten anschließend Differenzierungsversuche angesetzt werden.

In den nachfolgenden Abbildungen 20, 21 und 22 sind die Ergebnisse der PCR mit der genomischen DNA der Bry-, Mesp1-, und pBSK-Nkx2.5-mCherry Konstrukte der iPSCs und ESCs mit den zu den jeweiligen Proben gehörigen GAPDH-PCR Banden zu sehen. Die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist ein Haushaltsgen, das zur Qualitätskontrolle der DNA-Proben oder als interner Standard eingesetzt wird.

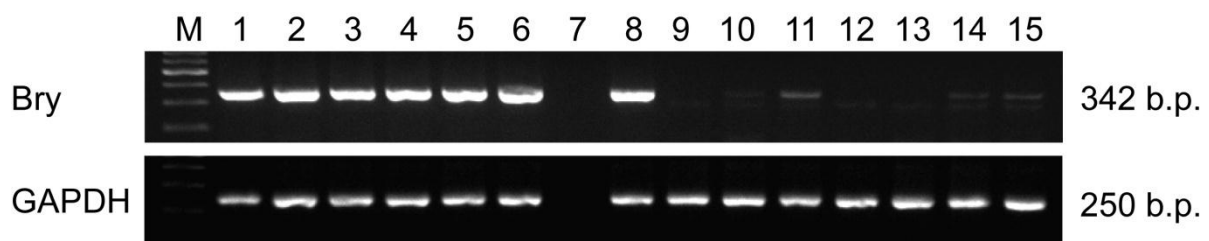


Abb. 20. Überprüfung der gepickten Zellklone auf eine genomische Integration des Bry-mCherry Konstrukts. Von 1 bis 6 und 8 wurden Proben der iPSCs aufgetragen. Die Nr. 7 entspricht der Negativkontrolle (PCR-Mix ohne DNA). Die Nummern 9 bis 15 entsprechen den aufgetragenen ES-Zellproben. Die Transfektion und die Selektion der Bry-mCherry Klone (CAG-EPAC-KGA-Bry-NotI-Klone) waren sehr erfolgreich, sodass die Klone mit der Nr.1 und Nr.2 für die Differenzierungsversuche ausgewählt wurden. Dagegen wurden die CAG-EPAC-Bry-NotI-Klone der ESCs schlecht selektioniert, da die Intensität der Bry Banden im Vergleich zu GAPDH nicht stark genug war. Somit muss weiterhin selektioniert werden.

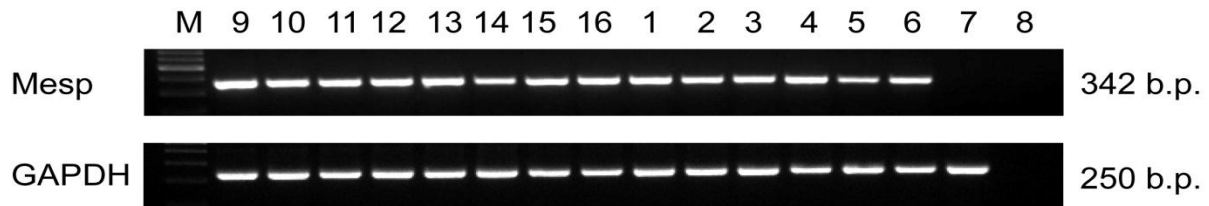


Abb. 21. Überprüfung der gepickten Zellklone auf eine genomische Integration des Mesp1-mCherry Konstrukts. Von 1 bis 7 wurden Proben der iPS-Zellen aufgetragen. Die Nr. 8 entspricht der Negativkontrolle. Die Nummern 9 bis 16 entsprechen den aufgetragenen ES-Zellproben. Die Transfektion und die Selektion der Mesp1-mCherry Klone sowohl von CAG-EPAC-KGA-Mesp1-Klonen (iPSCs-Klone) als auch von CAG-EPAC-Mesp1-Klonen (ESCs-Klone) war erfolgreich, außer beim Klon mit der Nr. 7. Die Banden der Mesp1-mCherry- und der GAPDH-DNA sind sehr gut zu erkennen. Die stabil transfizierten Klone mit den Nummern 3, 4, 9 und 10 wurden für die Differenzierungsversuche ausgewählt.

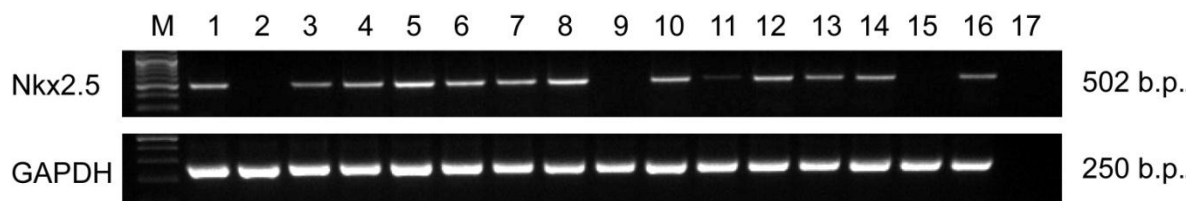


Abb. 22. Überprüfung der gepickten Zellklone auf eine genomische Integration des pBSK-Nkx2.5-mCherry Konstrukts. Von 1 bis 8 wurden Proben der iPS-Zellen aufgetragen. Die Nummern 9 bis 16 entsprechen den aufgetragenen ES-Zellproben. Die Nr. 17 entspricht der Negativkontrolle. Auch bei dieser Abbildung waren die Transfektion und Selektion einiger iPSCs- und ESCs-Klone sehr erfolgreich. Die stabil transfizierten Klone mit den Nummern 5, 7, 10 und 12 wurden für Differenzierungsversuche ausgewählt.

4.6 Charakterisierung der ESC- und iPSC-Klone mittels Alkalische Phosphatase Färbung

Zur Überprüfung des pluripotenten Zustandes der Zellen vor der Differenzierung wurden die Zellen auf ihre Alkalische Phosphatase Aktivität untersucht. Hierzu wurden die Zellen wie im Abschnitt 3.7 beschrieben, gefärbt. Die Blaufärbung der Zellen entsprach dem undifferenzierten Zustand der Zellen, die Rotfärbung dagegen dem differenzierten Zustand.

Die Alkalische Phosphatase Färbung wurde bei allen ausgewählten Klonen der iPS-Zellen durchgeführt (Abb. 23). Alle Klone wiesen eine Blaufärbung auf, das einem

undifferenzierten Zustand der Zelle entspricht. Somit konnten alle getesteten Klone für Differenzierungsversuchen verwendet werden.

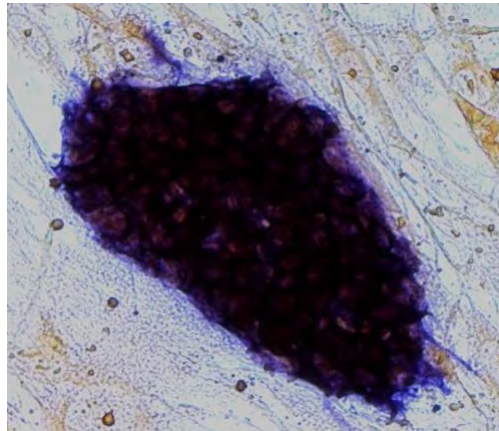


Abb. 23. Alkalische Phosphatase Färbung von Bry-mCherry iPSCs. Anhand der Blaufärbung der Zelle konnte der undifferenzierte Zustand der Zelle nachgewiesen werden. Die Mesp1- und pBSK-Nkx2.5-Klone wurden auch der Färbung unterzogen, zeigten dieselben Ergebnisse wie Bry-mCherry Klone, wurden jedoch in dieser Arbeit nicht zusätzlich gezeigt.

4.7 Differenzierung

Aus zeitlichen Gründen wurden nur stabil transfizierte Klone der iPSCs differenziert. Für die Differenzierung von ESC-Klonen müssten zuerst CAG-EPAC-Bry-NotI-Klone weiter selektiert werden.

Die Differenzierung von iPSCs wurde zunächst über Monolayer-Differenzierung mit Bry-mCherry-Klonen (Nr.1 und Nr.2) durchgeführt. Die Mesp1-mCherry-Klone (Nr.3 und Nr.4) wurden über Monolayer- und über *hangig drop*-Methode differenziert. Die Differenzierung von pBSK-Nkx2.5-Klonen (Nr.5 und Nr.7) erfolgte über *hanging drop*- und *mass culture*-Methode.

Die Monolayer-Differenzierung wurde für die Bry-mCherry Klone gewählt, da diese Methode sich am besten für die FRET-Messungen eignet. Das Bry-Gen wird bereits in der frühen Phase der Differenzierung (Tag 2-4) hochreguliert. Mit der *hangig drop*-Methode wäre die Vermessung somit nicht möglich, da die Bodies erst ab dem 5. Tag ausplattiert werden. Zu diesem Zeitpunkt würde die Expression des Bry-Gens bereits abnehmen. Die Mesp1-mCherry-Klone wurden über Monolayer- und über *hangig drop*-Methode differenziert, um verschiedene Differenzierungsprotokolle zu vergleichen. Weiterhin können Rückschlüsse gewonnen werden, ob verschiedene Methoden einen Einfluss auf die Differenzierung und somit auf die cAMP-Konzentration haben. Die pBSK-Nkx2.5-Klone können dagegen nicht mit Monolayer-Methode differenziert werden, da mit dieser Methode die Zellen bis zu Kardiomyozyten-Stadium nicht ausdifferenzieren. Zusätzlich zu der *hangig drop*-Methode wurden die pBSK-Nkx2.5-Klonen über *mass culture* differenziert, da durch die erste Methode keine schlagenden Kardiomyozyten erzeugt werden konnten.

4.7.1 Präkardiales Mesoderm

Die Monolayer-Differenzierung der Bry-mCherry iPSC-Klone wurde wie im Abschnitt 3.7 beschrieben, durchgeführt. $1,5 \cdot 10^5$ Zellen wurden auf 60 x 15 mm gelatinebeschichtete Zellkulturschalen und auf 6-Well-Platten mit Deckgläschen ausplattiert und im Iscove+MTG Medium differenziert.

Die differenzierten Zellen auf Deckgläschen wurden für die FRET-Messung sowie mikroskopische Untersuchungen verwendet. Die Zellen auf Zellkulturschalen dienten zur Probenahme für die RT-PCR. Die Proben wurden während der ersten 7 Tage der Differenzierung genommen. Außerdem wurden die undifferenzierten Bry-mCherry iPSCs des gleichen Klons mit FRET vermessen (Abschnitt 4.8). Diese wurden jedoch vorher auf Fibroblasten-beschichteten Deckgläschen in mES-Medium kultiviert.

Die spontane Differenzierung über Monolayer führt zur Ausbildung unterschiedlicher Zellarten aller drei Keimblätter darunter auch früher mesodermaler Zellen, die sich zum präkardialen Mesoderm entwickeln. Ab diesem Zeitpunkt kommt es zur Expression des Transkriptionsfaktors Bry. Der genaue Zeitpunkt ab dem die Bry-mRNA-Expression hochreguliert wird, konnte mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR (Abb.24) und mikroskopischer Untersuchungen (Abb.25) festgestellt werden.

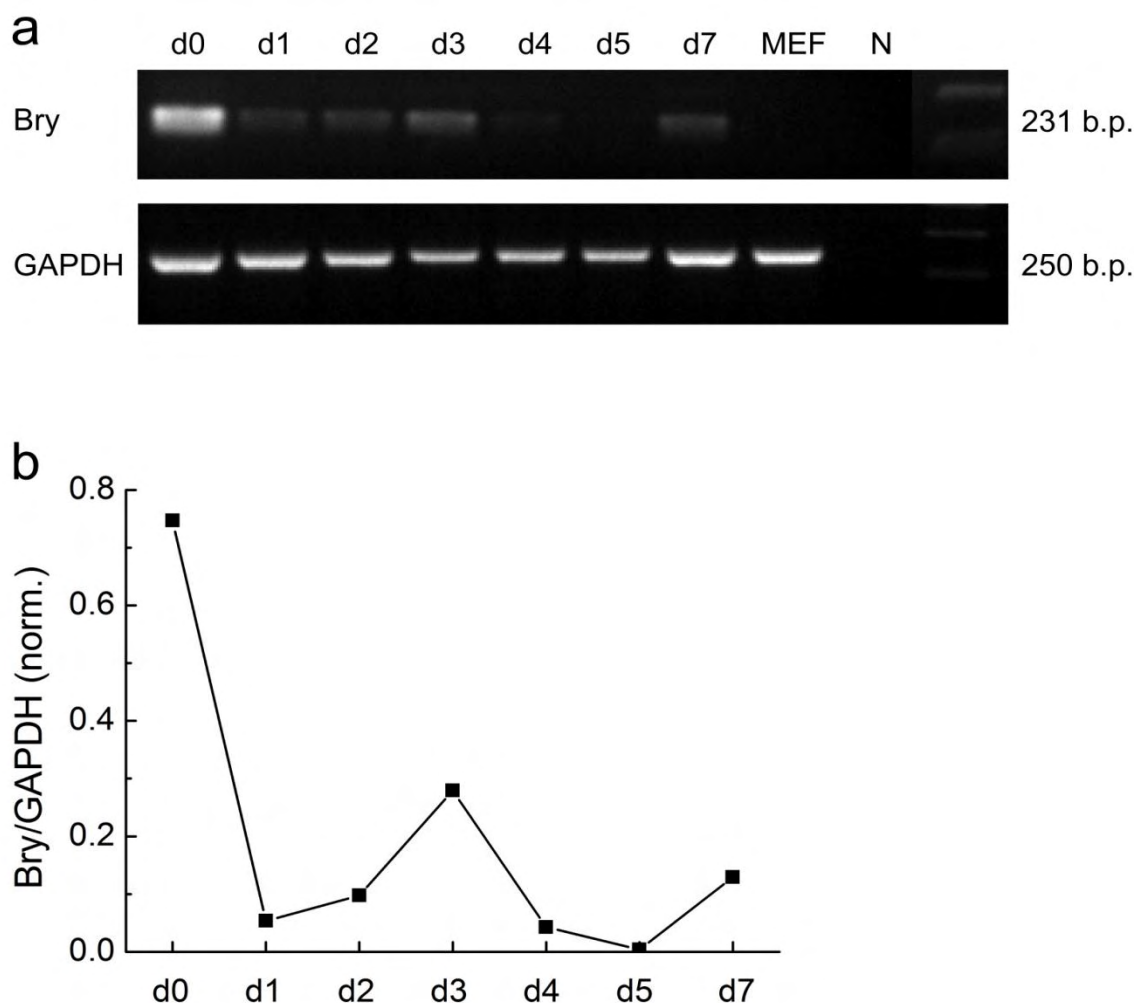


Abb. 24. Semiquantitative RT-PCR des Klons Bry-mCherry. a) Die Expression der Bry-mRNA war am 3. Tag (d3) der Differenzierung am stärksten, nahm stetig ab, bis sie wieder am 7. Tag leicht

anstieg. Am Tag der Ausplattierung (d0) ist auch eine starke Bande zu sehen, diese könnte jedoch auf ein Artefakt zurück zu führen sein, da in pluripotenten Zellen das Bry-Gen nicht aktiv ist und diese Zellen auch keine rote Fluoreszenz aufweisen (siehe Abb. 25c). b) Graphische Auswertung der Bry-Genexpression. GAPDH wurde als Interner Standard benutzt. Die Intensität der Bry-Banden wurde durch die Intensität der entsprechenden GAPDH-Banden geteilt (normiert). MEF-RNA (MEF) wurde als Positivkontrolle und Wasser wurde statt RNA bei der Negativkontrolle (N) eingesetzt.

Sobald das Bry-Gen exprimiert, kommt es auch zur Aktivierung der in die genomische DNA eingebauten Bry-Promoters. Die dahinter klonierte mCherry-Sequenz wird abgelesen. Es kommt zu einer roten Fluoreszenz in Bry-exprimierenden präkardialen mesodermalen Zellen.

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die rote Fluoreszenz ab Tag 4 ständig zunahm bis schließlich die Zellen am 6. Tag die stärkste rote Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 25d-f). Somit weicht die mikroskopische Analyse von der graphischen Auswertung der RT-PCR etwas ab. In der graphischen ist die stärkste Expression bereits am Tag 3, in der mikroskopischen Auswertung dagegen konnte die rote Fluoreszenz erst am 4. Tag detektiert werden, wobei diese dann bis zum 7. Tag in der Intensität anstieg. Die möglichen Gründe für solche Ergebnisse werden im Abschnitt 5 diskutiert.

Am Tag 6 wurden die Zellen mit Hilfe des FRET-Mikroskops vermessen (Abschnitt 4.8). Nach dem 7. Tag nahm die Fluoreszenz wieder ab. Die Differenzierung wurde schließlich nach Tag 8 abgebrochen, da das Bry-Gen herunterreguliert war und diese Zellen somit für die Messungen nicht mehr benutzt werden konnten.

Während der Differenzierung verändert sich ständig die Morphologie der Zellen. Die undifferenzierten Zellen weisen einzelne kompakte Kolonien auf. Die differenzierten Zellen dagegen bilden ein Zellgeflecht mit runder Morphologie, die eindeutig den rot fluoreszierenden präkardialen mesodermalen Zellen zugewiesen werden kann (Abb. 25).

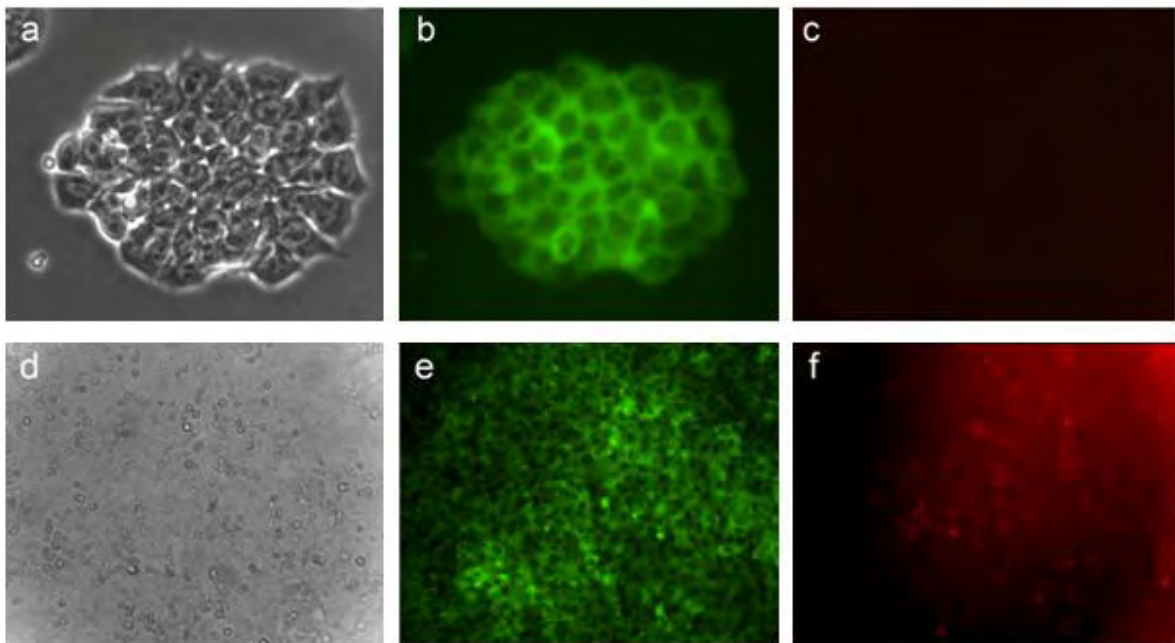


Abb. 25. Undifferenzierte und differenzierte Bry-mCherry iPSCs im Vergleich. a,b,c) undifferenzierte Bry-mCherry iPSCs am Tag 1 im a) Phasenkontrast, b) GFP-Kanal, c) mCherry-Kanal. d,e,f) Bry-mCherry iPSCs am 6. Tag der Differenzierung im d) Phasenkontrast, e) GFP-Kanal, f) mCherry-Kanal. Im undifferenzierten Zustand ist eindeutig keine rote Fluoreszenz im Bild 26 c) zu sehen, dagegen weisen viele der differenzierten Zellen im Bild f) die rote mCherry-Färbung. Weiterhin sind die un- und differenzierten Zellen durch unterschiedliche Morphologie geprägt. Die undifferenzierten Zellen weisen einzelne kompakte Kolonien auf, dagegen sind differenzierte Zellen des präkardialen Mesoderms rund und bilden ein Zellgeflecht. Die grüne Fluoreszenz im GFP-Kanal kommt vom in allen Zellen transgen exprimierten FRET Sensor.

4.7.2 Frühes kardiales Mesoderm

Durch die spontane Differenzierung der Mesp1-mCherry-Klone über Monolayer und *hangig drop* kommt es auch hier zur Ausbildung unterschiedlicher Zellarten aller drei Keimblätter. Die frühen mesodermalen Zellen entwickeln sich zum präkardialen Mesoderm, welches sich wiederum zum frühen kardialen Mesoderm entwickelt und durch Mesp1, Bry und Isl1 markiert wird, wobei Bry und Isl1 in geringeren Konzentrationen exprimiert werden.

Die Proben für die semiquantitative RT-PCR der Mesp1-mCherry Klone wurden an den Tagen d0, d4, d5, d7, d10, d12 und d16 genommen. Mit Hilfe der RT-PCR und der graphischen Auswertung konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der Monolayer-

als auch bei der *hanging drop*-Differenzierungsmethode Mesp1-Genexpression am 5. Tag am stärksten war (Abb. 26).

Für die Amplifizierung der Mesp1-cDNA wurden die in der Publikation Mauritz et al, 2008 beschriebenen Mesp1-Primer (M3/M4) verwendet. Auf den Gelaufnahmen der Abb. 26 (a und c) sind leider zwei Banden je Probe zu sehen. Die obere Bande ist wahrscheinlich auf die unspezifische Bindung des Primers zurückzuführen, da sogar eine eindeutige Bande bei der Positivkontrolle (MEF-cDNA) zu sehen ist. Somit wurde nur die untere Bande zur graphischen Auswertung benutzt. Diese entspricht auch der Fragmentstücklänge der Mesp1-cDNA von 202 bp am ehesten.

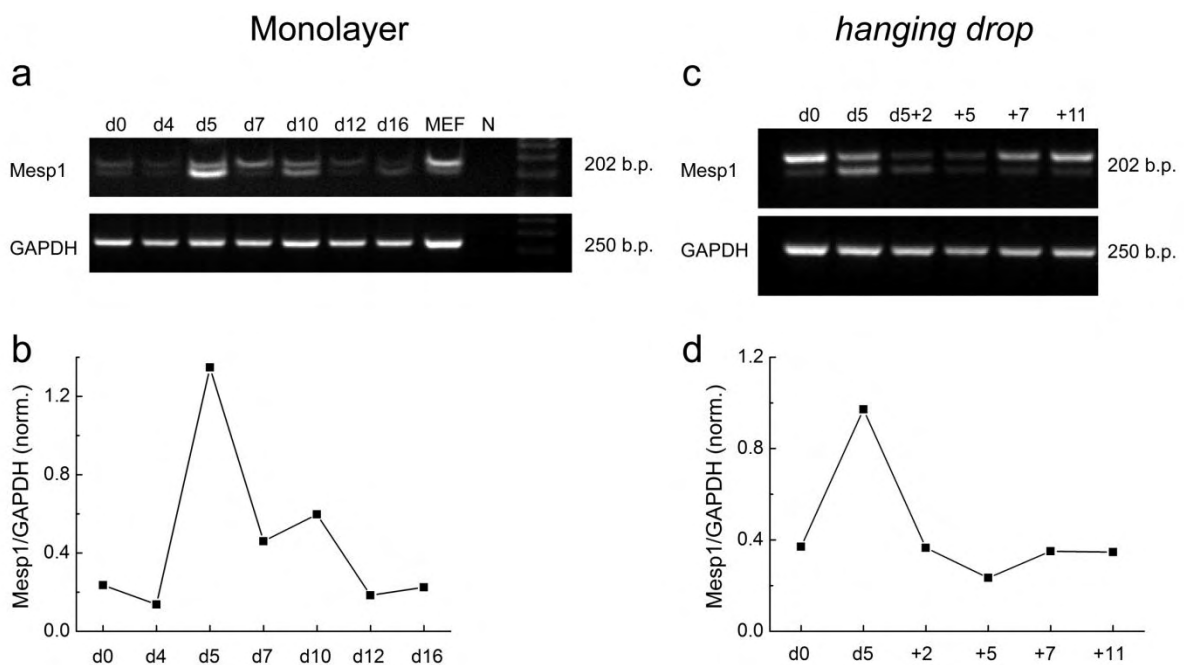


Abb. 26. Vergleich zwischen den Semiquantitativen RT-PCRs des Klons Mesp1-mCherry differenziert über Monolayer- und *hanging drop*-Methode. a) Mesp1-Differenzierungsergebnisse der RT-PCR über Monolayer mit der jeweils dazu gehörigen GAPDH Bande als Interner Standard. b) Graphische Auswertung der Monolayer-Differenzierung der Mesp1- und GAPDH-Banden vom Bild a). c, d) RT-PCR Ergebnisse der *hanging drop*-Differenzierungsmethode mit der dazu gehörigen graphischen Auswertung. Sowohl bei der Monolayer- als auch bei der *hanging drop*-Differenzierungsmethode ist die Expression der Mesp1-mRNA am 5. Tag (d5) der Differenzierung am stärksten, danach sinkt die Intensität bis zum 16. (d5+11) Tag. Somit lässt sich aussagen, dass der allgemeine Verlauf der Differenzierung bei beiden Methoden ähnlich ist.

Die Abb. 27 zeigt Fluoreszenzbilder zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung von einem Mesp1-mCherry-Klon, wobei wiederum die Monolayer-Differenzierungsmethode (g-i) mit der *hanging drop*-Methode (a-f) verglichen wird.

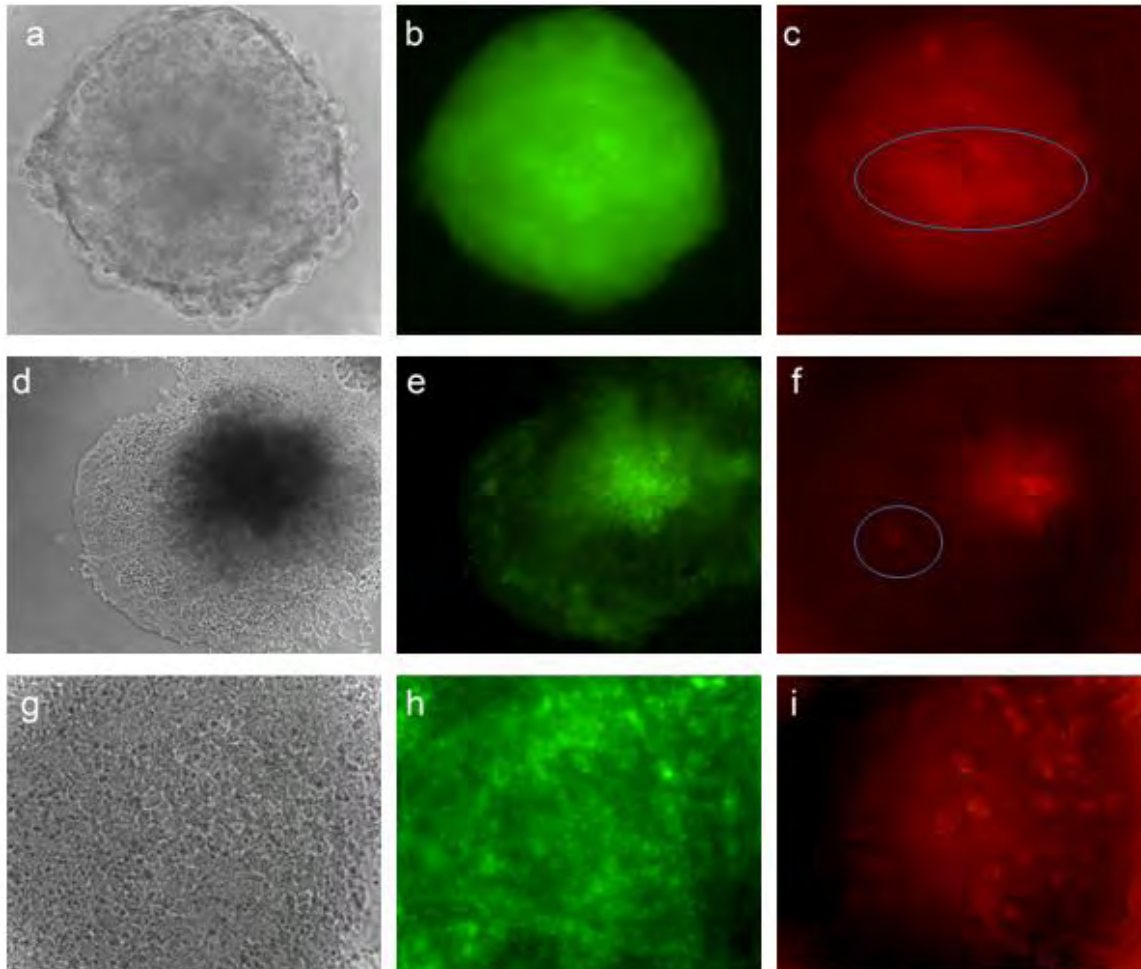


Abb. 27. Mikroskopische Aufnahmen des Mesp1-mCherry Klonen zu unterschiedlichen Differenzierungsstadien mit der *hanging-drop*- (a-f) und der Monolayer- (g-i) Differenzierungsmethode. a-c) zeigen einen frisch ausplattierten Embryoidkörper am Tag 5 (d5), d-f) am Tag 10. (d5+5) und g-i) den Monolayer am Tag 10. der Differenzierung. a,d,g) Phasenkontrast, b,e,h) GFP-Kanal, c,f,i) mCherry-Kanal.

Die Abbildungen 27a-c zeigt einen *embryoid body* gleich nach der Ausplattierung auf Gelatine am Tag 5 der Differenzierung unter a) Phasenkontrast, b) GFP-Kanal, c) mCherry-Kanal. Es ist bereits eindeutig die rote Fluoreszenz (blau umrandet) im *body* zu erkennen. Somit stimmen die RT-PCR-Ergebnisse mit den mikroskopischen Ergebnissen überein. Leider konnten jedoch die *bodies* in so einem Zustand wegen ihrer hohen Dicke nicht unter FRET-Mikroskop vermessen werden. Es musste darauf

gewartet werden bis die zu vermessenden Zellen aus den *bodies* herausgewachsen sind (Abb. 27d-f). Erst am 10. Tag konnten die herausgewachsenen Zellen (28 f, blau umrandet) vermessen werden. Dagegen konnten die Zellen, sobald diese eine rote Fluoreszenz aufwiesen, jederzeit im Monolayer vermessen werden (Abb. g-i). Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass die Monolayer-Differenzierungsmethode eine geeignetere Methode zur Vermessung der Zellen im frühen kardialen Mesoderm ist als die *hanging drop*-Methode.

4.7.3 Schlagende Kardiomyozyten

Die spontane Differenzierung der Nkx2.5 Zellen erfolgte über *hanging drop* und der *mass culture*- Methode. Auch hier bildeten sich unterschiedliche Zellarten aller drei Keimblätter, die sich über präkardiales und frühes kardiales Mesoderm zu schlagenden Kardiomyozyten ausbildeten.

Solche *in vitro* differenzierten Kardiomyozyten ähneln in ihrer Morphologie und Entwicklungsgrad den frühen embryonalen Kardiomyozyten (Abb. 28) und sind somit weit von den voll entwickelten adulten Herzmuskelzellen entfernt. Mit Hilfe der neuen Erkenntnisse aus dieser Arbeit könnte dieses Problem durch verbesserte Differenzierungsprotokolle evtl. in der Zukunft umgangen werden (Abschnitt 6).

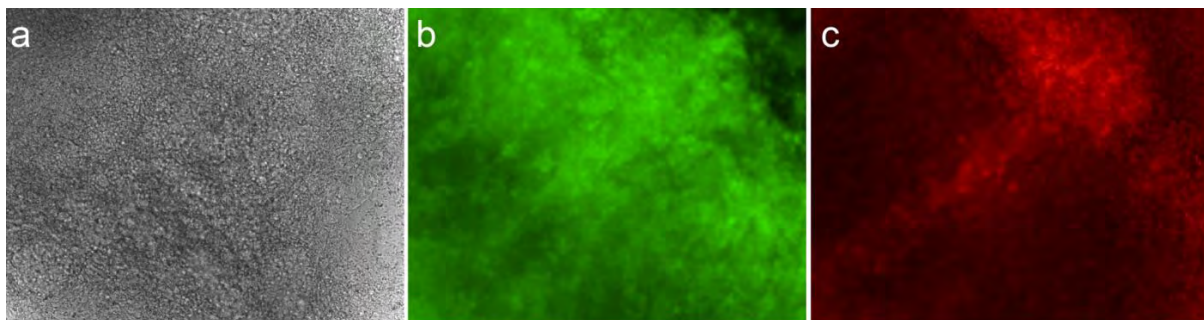


Abb. 28. Ein Cluster aus schlagenden Kardiomyozyten im a) Phasenkontrast, b) GFP-Kanal und c) mCherry-Kanal differenziert nach der *mass culture*-Methode. Die schlagenden Kardiomyozyten wurden am 17 Tag (d5+12) der Differenzierung mikroskopisch charakterisiert und mit FRET vermessen.

In der Abbildung 29 sind Ergebnisse der RT-PCR von dem Nkx2.5-mCherry-Klon zu sehen. Die Proben wurden während der *hanging drop*-Differenzierung an den Tagen d0, d5, d5+3, d5+8, d5+8, d5+11, d5+16 und d5+21 genommen. Am Tag d5+16 ist die stärkste Expression der Nkx2.5-mRNA zu vermerken.

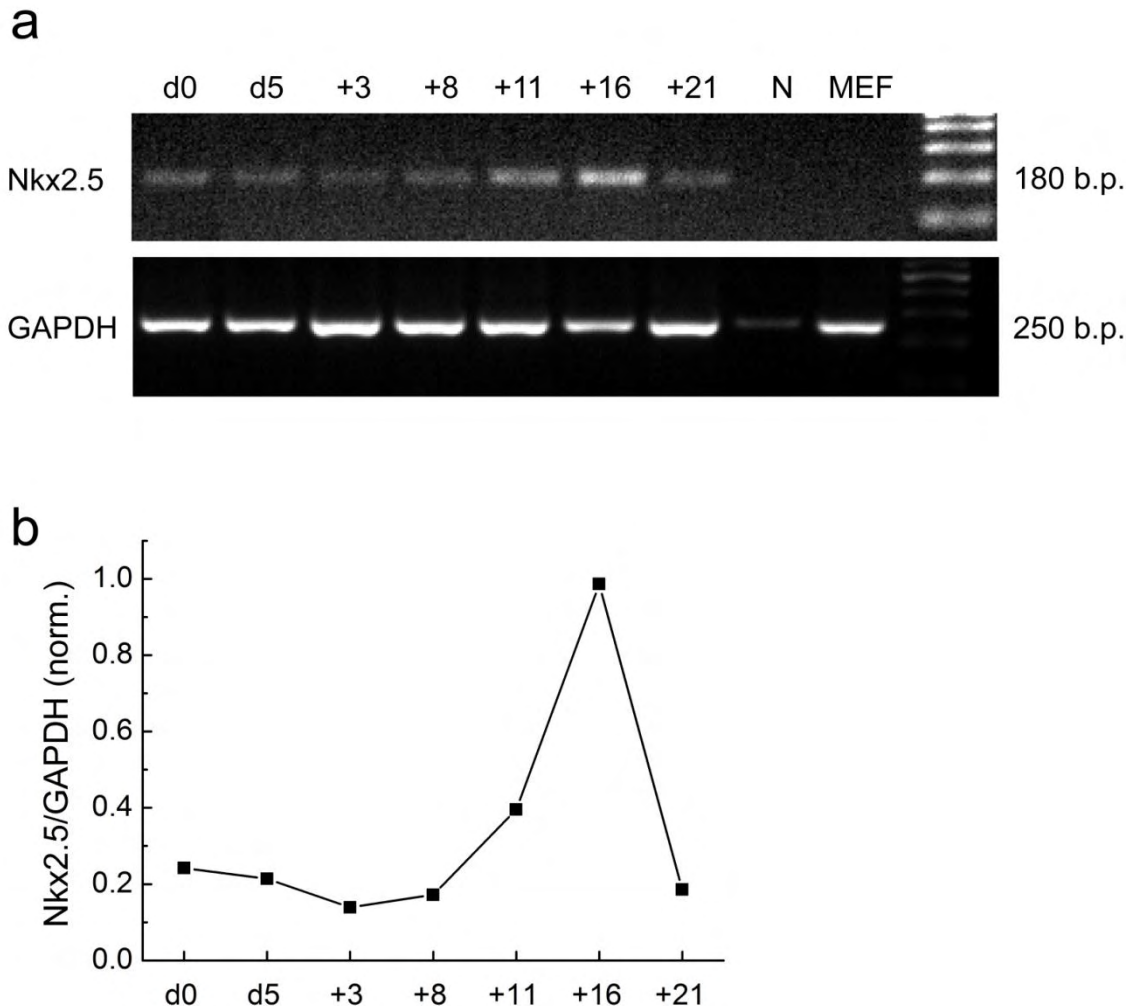


Abb. 29. Semiquantitative RT-PCR des Klons Nkx2.5-mCherry. Die Expression der Nkx2.5-mRNA war in den ersten 13. Tagen mit leichten Schwankungen konstant niedrig. Danach stieg die Expression an, bis sie am Tag d5+16 am stärksten war. Ab diesem Zeitpunkt sank die Intensität der Banden, was sich wiederum in der graphischen Auswertung widerspiegelte.

Mittels der *hanging drop*-Differenzierungsmethode war es nicht möglich schlagende Kardiomyozyten zu generieren. Das könnte daran liegen, dass die Morphologie der Zellen, welche für die Differenzierung eingesetzt wurden, schlecht war. Bei der *hanging drop*-Differenzierungsmethode werden alle Zellen mit guter oder schlechter Morphologie in denselben Tropfen verpackt. Daraus bilden sich letztendlich die

bodies. Die schlechten Zellen können jedoch nicht lange in solch einem *body* verbleiben. Sie sterben ab oder verteilen sich in der Schale als Zellklumpen.

Zur Verbesserung der Morphologie wurden die Zellen über mehrere Wochen gepickt. Anschließend wurde entschieden mit der *mass culture*-Differenzierungsmethode weiter zu verfahren, da bei dieser Methode sich die Zellen mit der guten Morphologie eher mit den Zellen ähnlicher Morphologie zusammen finden. Somit besteht bei dieser Methode eher die Wahrscheinlichkeit schlagende Kardiomyozyten, zwar mit weniger Ausbeute als bei der *hanging drop*-Methode, zu bekommen. Bereits nach 9 Tagen der Differenzierung mit dieser Methode konnten in manchen Schalen schlagende Kardiomyozyten beobachtet werden.

Der späte Zeitpunkt der Nkx2.5-mRNA Expression in den Klonen, die über *hanging drop* differenziert wurden und die Abwesenheit schlagender Kardiomyozyten bei dieser Methode könnte unter anderem auf die schlechte Morphologie der Zellen zurückzuführen sein.

4.8 FRET Messungen

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der cAMP-FRET Messungen dargestellt. Für einige im Abschnitt 4.4 generierte und charakterisierte Zellklone (i.d.R. 2 Klone pro Konstrukt) wurden die Messungen zunächst im pluripotenten Zustand (undifferenzierte iPSCs) und zu verschiedenen Zeitpunkten der kardialen Differenzierung durchgeführt.

Zwei experimentelle Protokolle wurden gewählt um cAMP Konzentrationen bei voller Stimulation der Adenylatzyklasen durch Forskolin und die PDE-Aktivität unter Inhibierung mit IBMX zu messen. Anschließende Gabe von Forskolin in Kombination mit IBMX führte zur maximalen cAMP Erhöhung, auf welchen die FRET-Veränderung bei alleiniger Gabe von Forskolin oder IBMX bezogen werden konnten.

4.8.1 Präkardiales Mesoderm

Die FRET Messungen mit Bry-mCherry Reporterzellklonen wurden zunächst im undifferenzierten Zustand durchgeführt. In diesem Fall zeigte die Forskolin Stimulation nur eine sehr leichte Abnahme im FRET-Signal, was auf eine sehr geringe Zunahme von intrazellulärem cAMP unter voller Adenylatzyklase-Aktivierung hindeutet (Abb. 30a). Die Stimulation von pluripotenten Zellen mit IBMX alleine zeigte jedoch einen starken Abfall im FRET, welcher auf die hohe basale Aktivität der PDE-Enzyme hindeutet (Abb.31b).

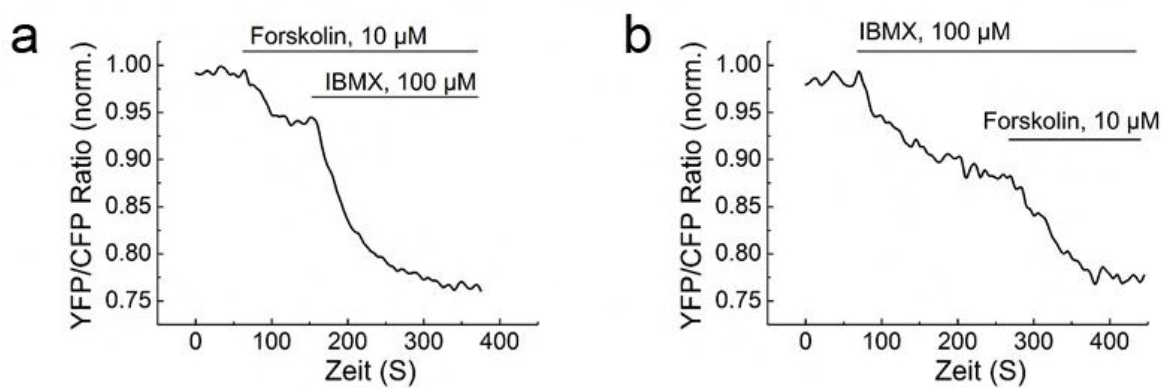


Abb. 27. cAMP Messungen in pluripotenten Zellen. Exemplarische FRET-Spuren für undifferenzierte Bry-mCherry Zellklone sind gezeigt. a) Forskolin Stimulation führt nur zu einer geringen Abnahme in FRET (hier als auf den Ausgangswert normalisiertes Ratio von YFP zur CFP Fluoreszenz dargestellt), welche einen geringen cAMP-Anstieg bedeutet. Zusätzliche Gabe von IBMX führt zu einem starken cAMP-Signal. b) Stimulation der Zellen mit IBMX alleine führt zu einer starken Erhöhung von cAMP, welche auf eine hohe basale PDE Aktivität hindeutet. Repräsentative FRET-Spuren aus jeweils 10 (a) und 7 (b) Zellen. Die Auswertungen sind in der Abb. 31 c und d dargestellt.

Im nächsten Schritt wurden die durch rote Fluoreszenz identifizierten Bry-exprimierenden Zellen am Tag 5 oder 6 der Monolayer-Differenzierung mit FRET vermessen. Hier zeigte die Forskolin-Stimulation eine deutlich stärkere cAMP-Antwort als im pluripotenten Zustand, während die IBMX-Signale signifikant kleiner waren (Abb. 31 a und b).

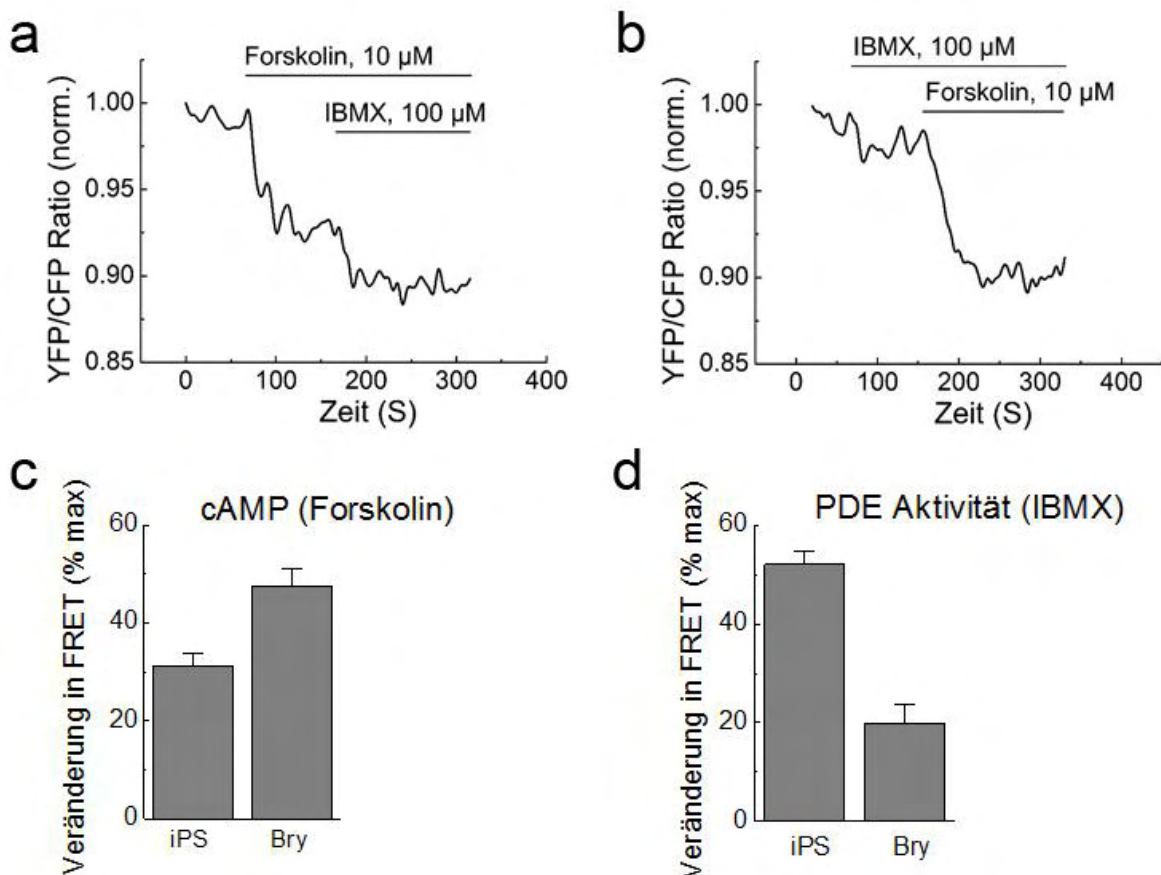


Abb. 28. cAMP Messungen in den roten Bry-mCherry exprimierenden Zellen unter Stimulation mit a) Forskolin und b) IBMX. Repräsentative FRET-Spuren aus jeweils 10 (a) und 7 (b) Zellen. c) und d) zeigen die Auswertungen der FRET Signalen in pluripotenten (siehe Abb. 30) und differenzierten Bry-mCherry Zellen, Mittelwerte \pm Standardfehler.

Der Vergleich der FRET Daten zwischen pluripotenten und Bry exprimierenden Zellen zeigt, dass der Anfang der Differenzierung durch eine Erhöhung der Forskolin-stimulierten cAMP Konzentrationen und Senkung der basalen PDE-Aktivität gekennzeichnet ist.

4.8.2 Frühes Kardiales Mesoderm

Im weiteren Verlauf der Differenzierung wurden die roten Mesp1-mCherry Zellen im Vergleich zu den Ausgangs-iPSCs untersucht. Sowohl bei der Monolayer-Differenzierung als auch bei der Differenzierung über EBs ist ein deutlicher Abfall in der Forskolin-Stimulierbarkeit dieser Zellen im Vergleich zu Bry-Zellen zu sehen. Die

PDE-Aktivität dagegen stieg etwas an, da die Antworten auf IBMX bei diesen Zellen wieder etwas größer waren (Abb. 32).

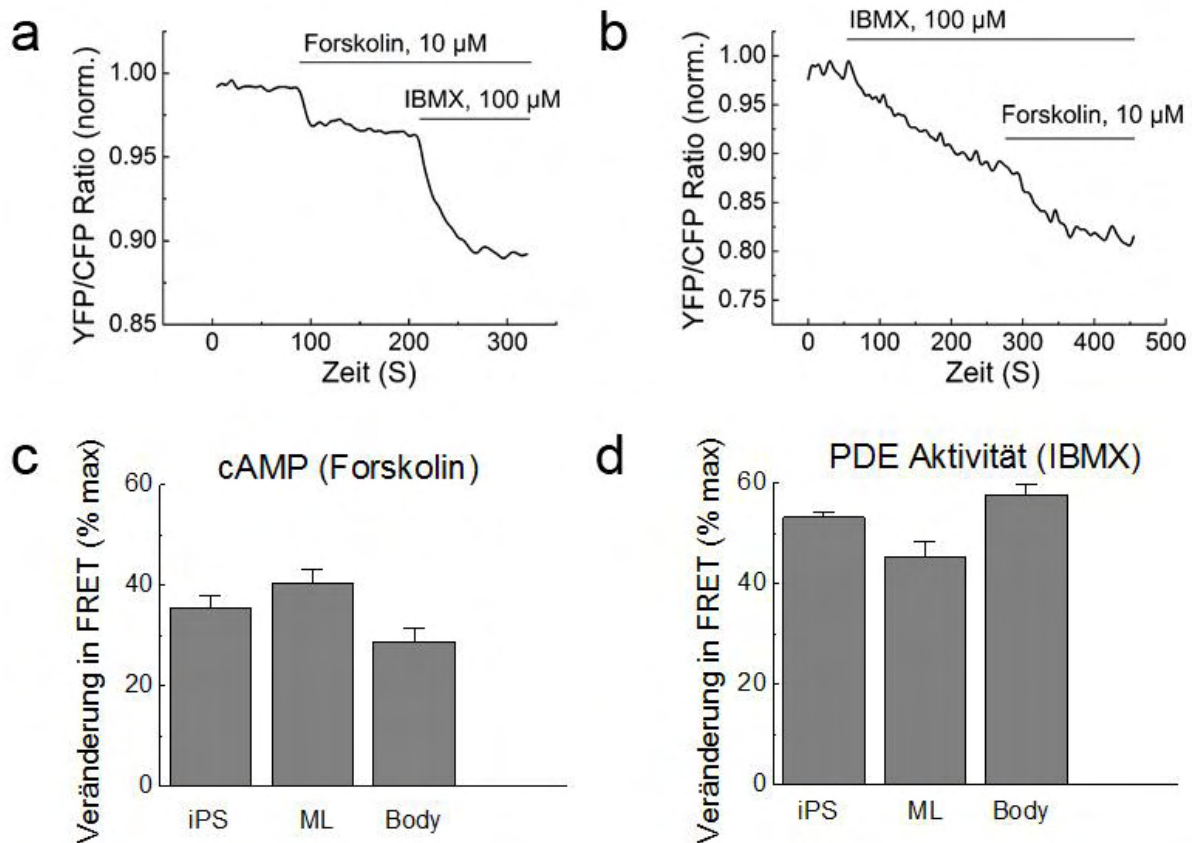


Abb. 29. cAMP Messungen in den roten Mesp1-mCherry exprimierenden Zellen unter Stimulation mit a) Forskolin und b) IBMX. Hier sind die repräsentativen FRET-Spuren für die im Monolayer differenzierten Zellen gezeigt. c) und d) zeigen die Auswertungen der FRET Signalen in pluripotenten Klonen und in durch EBs oder Monolayer (ML) differenzierten Mesp-mCherry Zellen, Mittelwerte \pm Standardfehler. Die Zellzahlen waren zwischen 8 und 11 Zellen pro Bedingung.

4.8.3 Schlagende Kardiomyozyten

Um die cAMP-Konzentrationen und die PDE Aktivität in frühen Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden die Nkx2.5-mCherry Zellen zunächst im pluripotenten Zustand vermessen und dann weiter zu schlagenden Kardiomyozyten ausdifferenziert. Hier zeigte die Forskolin-Stimulation wieder größere cAMP Signale, während die basale mit IBMX inhibierbare PDE-Aktivität in Vergleich zu Mesp1-positiven Zellen niedriger wurde (Abb. 33).

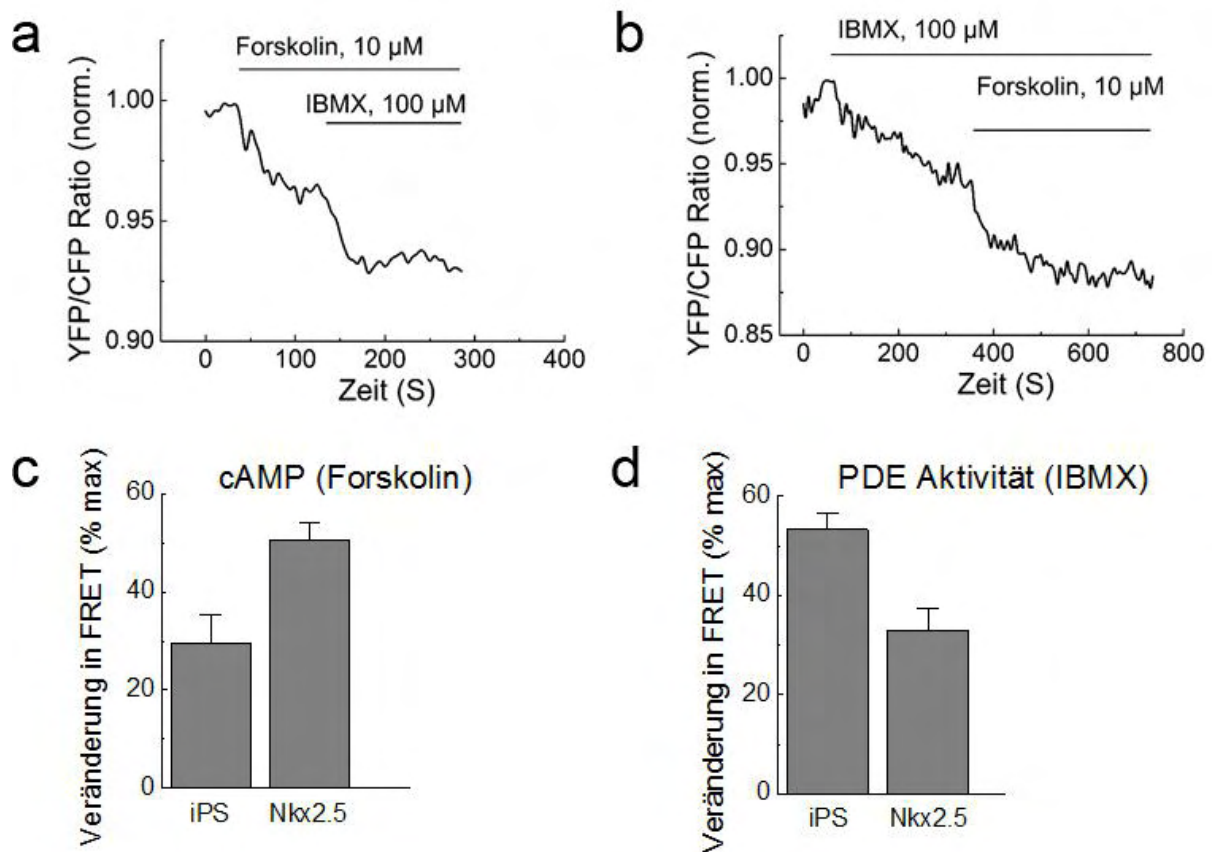


Abb. 33. cAMP Messungen in den roten Nkx2.5-mCherry exprimierenden Zellen unter Stimulation mit a) Forskolin und b) IBMX. Repräsentative FRET-Spuren aus jeweils 8 (a) und 12 (b) Zellen. c) und d) zeigen die Auswertungen der FRET Signalen in pluripotenten und differenzierten Nkx2.5-mCherry Klonen, Mittelwerte \pm Standardfehler. Zellzahlen waren zwischen 8 und 10 pro Bedingung.

Diese Daten zeigen, dass der Übergang von den Mesp1-exprimierenden Zellen zu den Nkx2.5-positiven schlagenden Kardiomyozyten durch eine Erhöhung der cAMP-Spiegeln und Senkung der basalen PDE-Aktivität charakterisiert ist.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die cAMP Konzentrationen während der Differenzierung von iPSCs zu Kardiomyozyten über mehrere Stadien dynamisch verändern. cAMP gilt als allgegenwärtiger zweiter Botenstoff und Transkriptionsregulator mit einer wichtigen Rolle bei der Differenzierung. So wurde es in mehreren anderen Zellsystemen gezeigt (siehe Abschnitt 1.5), dass über cAMP die Entwicklung von Zellen reguliert und pharmakologisch beeinflusst werden kann. Allerdings wurden bislang keine Untersuchungen zu cAMP in Stammzellen durchgeführt, obwohl die Differenzierung dieser Zellen, insbesondere im Lichte der neu entwickelten iPSC-Technologie eine herausragende Bedeutung für die moderne Biomedizin hat.

Die Verbesserung der vorhandenen Differenzierungsmethoden könnte durch chemische Verbindungen oder Wachstumsfaktoren einen entscheidenden Fortschritt für die regenerative Medizin bedeuten. Da cAMP sich relativ leicht pharmakologisch modulieren lässt, könnte cAMP dafür ein guter Kandidat sein. Somit war es in dieser Arbeit wichtig zu verstehen, inwieweit cAMP in die Differenzierung von Stammzellen involviert ist. Allerdings war es extrem schwierig diese Frage mit klassischen biochemischen Methoden zu beantworten, da die Differenzierung von pluripotenten Zellen über Mischkulturen erfolgt und die Markierung bzw. Isolierung der gewünschten Zellpopulationen kompliziert ist. Das könnte der Grund dafür sein, warum so gut wie keine Daten zu cAMP und Stammzellen in der gegenwärtigen Literatur zu finden sind.

Durch die Entwicklung neuer Fluoreszenz-basierter Techniken wurde es möglich diese Schwierigkeiten zu umgehen und in dieser Arbeit den dynamischen Verlauf von cAMP in den spezifischen Entwicklungsstadien und Zelltypen auf dem Weg von einer pluripotenten Stammzelle zu einem schlagenden Kardiomyozyten zu untersuchen. Tatsächlich konnten dabei Unterschiede und dynamische Veränderungen in den cAMP-Spiegeln festgestellt werden, welche für die Differenzierung wichtig sind und in der Zukunft ggf. für die pharmakologische Modulation dieser Prozesse zwecks Verbesserung der Differenzierungseffizienz und Generierung höherer Zahlen der gewünschten Zelltypen benutzt werden könnten.

Zwei neue Techniken wurden in dieser Arbeit verwendet, um gewünschte Zellpopulationen zu markieren und die cAMP Messungen durchzuführen. Als erstes wurde die Reportergentechnologie für die Zwecke des Projektes etabliert. Dazu wurden verschiedene Entwicklungsstadien mittels eines rot fluoreszierenden Proteins mCherry markiert. Dies erfolgte über einen transgenen Ansatz unter Verwendung von zelltypspezifischen Promotoren. Drei Stadien wurden ausgewählt, die durch die Expression von drei charakteristischen Genen gekennzeichnet sind. Brachyury (Bry) wurde als Marker vom präkardialen Mesoderm, Mesp1 für frühes kardiales Mesoderm und Nkx2.5 zur Markierung von schlagenden Kardiomyozyten verwendet. Die Promotoren dieser 3 Gene dienten der Expression von mCherry in jeweils einem genetischen Reporterkonstrukt, die stabil in ESCs und iPSCs transfiziert wurden. Während der kardialen Differenzierung dieser Zellklone zeigten die entsprechenden Zellen die rote Fluoreszenz und konnten mikroskopisch identifiziert und für cAMP-Messungen ausgewählt werden.

Der Vergleich zwischen der mRNA Expression dieser Gene und den Zeitpunkten der Fluoreszenzmarkierung hat ergeben, dass in einigen Fällen, besonders bei Bry die Fluoreszenz erst mit einer kleinen Verzögerung von 1-2 Tagen aufgetreten ist, während bei anderen beiden Konstrukten die beiden Parameter zeitgleich waren. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Expression und die Reifung des mCherry Proteins ab dem Zeitpunkt der mRNA-Transkription etwa 8-12 Stunden dauert. Außerdem kamen die Proben für RT-PCR und Mikroskopie aus unterschiedlichen Zellkulturschalen, wobei jede Schale sich individuell mit geringen zeitlichen Unterschieden entwickelt. Weiterhin spielen solche Faktoren, wie die Morphologie der Zellen und die Zellzahl eine wichtige Rolle für die Kinetik der Differenzierung. Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass die Reporterkonstrukte die Entwicklungsstadien mit Fluoreszenz zuverlässig markieren können.

Die zweite neue Technik ist die FRET-Mikroskopie, welche die cAMP Messungen ermöglicht. Im Vergleich zu den klassischen biochemischen Methoden konnten diese an einzelnen Zellen statt an Lysaten aus mehreren Zellen durchgeführt werden. Mittels eines transgen exprimierten FRET-Sensors für cAMP war es möglich in rot markierten Zellen bei verschiedenen Stadien der Differenzierung die cAMP Konzentrationen und die Aktivität der cAMP-abbauenden Enzyme der Phosphodiesterasen zu messen. Die Kombination von Reporterkonstrukten mit der

FRET-Technik ermöglichte es die in dieser Arbeit gestellte Frage zur Rolle von cAMP bei der Differenzierung erstmalig zu beantworten.

Während der kardialen Differenzierung von iPSCs haben sich die cAMP Spiegel dynamisch verändert. Im pluripotenten Zustand reagierten die Zellen wenig auf Forskolin-Stimulation, was durch die hohe PDE Aktivität erklärt werden konnte. Beim Übergang von iPSCs zum präkardialen Mesoderm sank die PDE Aktivität stark ab, während die aktivierten cAMP Konzentrationen anstiegen. Im weiteren Verlauf der Differenzierung sank cAMP im frühen kardialen Mesoderm wieder ab, bevor es in den schlagenden Kardiomyozyten wieder besser stimulierbar war. Die Abbildung 34 zeigt den dynamischen Verlauf der Forskolin-aktivierten cAMP Spiegel und der durch IBMX ermittelten PDE-Aktivität.

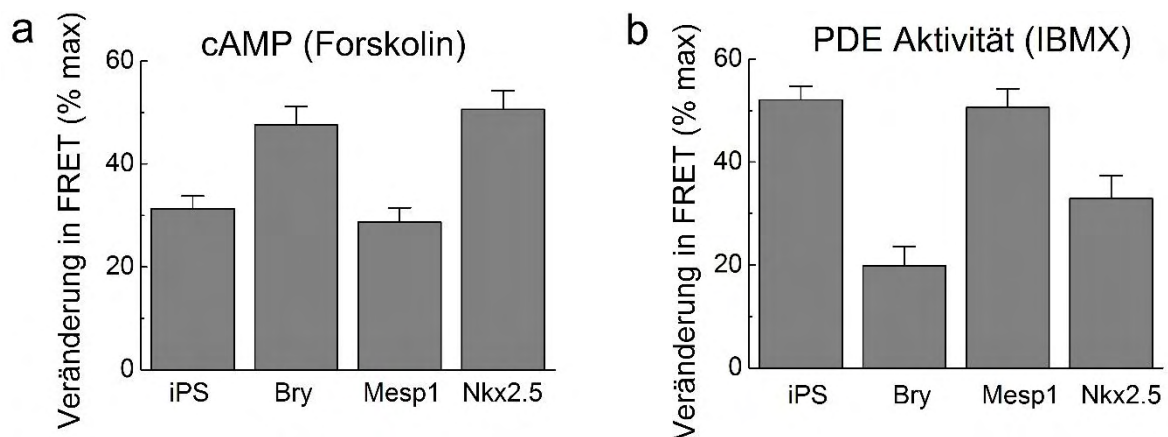


Abb. 30. Verlauf der cAMP Konzentrationen (a) und PDE-Aktivität (b) während der Differenzierung von iPSCs zu schlagenden Kardiomyozyten. Die Daten sind zusammenfassend präsentiert und stammen aus den Abb. 30-33

Damit ergibt sich eine dynamische und biphasische Veränderung von cAMP während der Zellentwicklung. Bei einigen Entwicklungsstadien, wie in den Bry und Nkx2.5-positiven Zellen ist ein hoher cAMP Spiegel zu vermerken, während im pluripotenten Zustand und in den Mesp1-positiven Zellen cAMP sehr niedrig ist. Dieser Verlauf ist vermutlich für die dynamische Veränderung in der Genexpression CREB-abhängiger Gene während der Differenzierung notwendig. Die noch nicht publizierten Daten aus der Arbeitsgruppe um Heiner Westphal (NIH, Bethesda) zeigen, dass während der ersten 3 Tage der Differenzierung von murinen ESCs *über embryoid bodies* es zu einem starken Anstieg in der Expression sämtlicher CREB-abhängiger Gene kommt. Es wäre somit sinnvoll die Genexpression im weiteren Verlauf der Differenzierung zu

untersuchen. Damit kann eine funktionelle Verbindung zwischen cAMP und Genexpression bei mehreren Differenzierungsstadien dokumentiert werden. Im nächsten Kapitel werden die Möglichkeiten diskutiert, wie die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in der Stammzellenforschung und evtl. in der regenerativen Medizin verwendet werden können.

6 Ausblick

Welche Bedeutung hat diese Arbeit für die Stammzellforschung und regenerative Medizin? Um den langjährigen Traum der Zell- und Gewebeersatz in den pathologischen Situationen, wie z.B. nach einem Herzinfarkt zu ermöglichen, ist es wichtig, eine große Menge von den gewünschten Zellen generieren zu können. Dafür sind Differenzierungsprotokolle mit hoher Effizienz notwendig. Durch unterschiedliche Zelltypen, die während der Differenzierung gleichzeitig entstehen, können in der Regel nicht mehr als 30% an Kardiomyozyten gewonnen werden (Laflamme et al., 2007).

Zurzeit laufen einige Untersuchungen zur Anwendung chemischer Verbindungen oder Wachstumsfaktoren unter definierten Bedingungen zur Erhöhung der Differenzierungseffizienz. Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten, bietet sich die pharmakologische Modulation der cAMP-Signalkaskade als ein interessanter neuer Ansatzpunkt an.

Pharmakologisch sinnvoll wäre es z.B. die cAMP Synthese ganz am Anfang der Differenzierung von iPSCs zu Bry-positiven Zellen zu stimulieren. Das könnte durch Inhibierung der PDE-Aktivität oder durch Stimulation mit z.B. Forskolin oder Agonisten von cAMP-aktivierenden Rezeptoren erfolgen und zur Erhöhung der Anzahl Bry-positiver Zellen und/oder zur Beschleunigung der Differenzierung führen. Im späteren Verlauf wäre es nützlich cAMP Konzentrationen zu erniedrigen, um mehr Mesp1-positive Zellen zu bekommen. Dafür könnten z.B. PDE-Aktivatoren (Tradtrantip et al., 2009) oder Agonisten der cAMP-hemmenden Rezeptoren eingesetzt werden. Beim nachfolgenden Übergang zu den Nkx2.5-exprimierenden Zellen müsste die cAMP Produktion wieder stimuliert bzw. der cAMP-Abbau gehemmt werden. Insgesamt ergibt sich eine präzise zeitlich-definierte Modulation von cAMP, die anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse entwickelt werden kann. Solche Experimente sollten in der Zukunft durchgeführt werden, um den Einfluss einer pharmakologischen Modulation auf die Differenzierungseffizienz analysieren zu können.

Eine andere große Herausforderung ist die Generierung reifer Kardiomyozyten. Bis heute ist es nicht möglich mittels verfügbarer Differenzierungsprotokolle reife und

funktionell gut entwickelte Kardiomyozyten aus ECSs und/oder iPSCs zu generieren. Die damit entstehenden Zellen ähneln in ihrer Morphologie und Entwicklungsgrad den frühen embryonalen Kardiomyozyten und sind somit noch sehr weit von den voll entwickelten adulten Herzmuskelzellen entfernt. Es wäre interessant und wichtig zu untersuchen, ob durch die Modulation der cAMP-Signalkaskade nicht nur die Differenzierungseffizienz, sondern auch Reifegrad der Zellen verbessert werden kann.

Für die mögliche therapeutische Anwendung in der regenerativen Medizin ist es wichtig die Rolle von cAMP bei der Differenzierung humaner iPSCs zu untersuchen. Diese unterscheiden sich in einigen Aspekten von den Mauszellen. Allerdings wäre es zu erwarten, dass die grundlegenden Signalmechanismen und ihr Einfluss auf die Regulation der Genexpression ähnlich sind.

7 Zusammenfassung

Herzinfarkt ist eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland und weltweit. Es entsteht ein irreversibler Schaden des Herzmuskelgewebes durch den Verlust von Kardiomyozyten. Zu einer der vielversprechenden Heilungsmethoden gehört der Einsatz von einem aus Stammzellen künstlich generierten Herzgewebe. Beispielsweise könnte durch Reprogrammierungstechniken patienteneigene Herzmuskelzellen erzeugt und anschließend dem betroffenen Patienten transplantiert werden. Solche Zellen könnten zu einer schnellen Genesung des Patienten führen und nicht vom Körper des Patienten abgestoßen werden. Die Schwierigkeit dieses Verfahrens besteht jedoch unter anderem darin, eine ausreichende Menge an Kardiomyozyten zu einem bestimmten Zeitpunkt für die Behandlung eines Patienten zur Verfügung zu stellen. Daher ist es wichtig die an der kardialen Differenzierung von Stammzellen beteiligten Signalmechanismen zu untersuchen, um durch ihre Modulation die Effizienz und die Schnelligkeit der Differenzierung zu erhöhen. In dieser Arbeit wurde cAMP Signalkaskade als ein möglicher Kandidat für die Verbesserung der kardialen Differenzierung untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Reporterkonstrukte hergestellt, die die Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien mittels eines rot fluoreszierenden Proteins mCherry markieren. Dies erfolgte über einen transgenen Ansatz unter Verwendung von zelltypspezifischen Promotoren. Drei Stadien wurden ausgewählt, die durch die Expression von drei charakteristischen Genen gekennzeichnet sind. Brachyury (Bry) wurde als Marker vom präkardialen Mesoderm, Mesp1 für frühes kardiales Mesoderm und Nkx2.5 zur Markierung von schlagenden Kardiomyozyten verwendet. Die Promotoren dieser 3 Gene dienten der Expression von mCherry in jeweils einem genetischen Reporterkonstrukt, die stabil in ESCs und iPSCs transfiziert wurden, um Reporterzellklone herzustellen. Der erfolgreiche Einbau des Konstrukts in die genomische DNA wurde mittels PCR bestätigt.

Aus zeitlichen Gründen wurden im zweiten Teil der Arbeit nur iPSC-Klone differenziert (zwei Klone je Konstrukt). Vor der Differenzierung erfolgte eine Überprüfung des pluripotenten Zustandes der Zellen auf ihre Alkalische Phosphatase Aktivität. Anschließend wurden die Bry-Klone über Monolayer-, die Mesp1-Klone

über Monolayer- und *hanging drop*- und Nkx2.5-Klone über *hanging drop*- und *mass culture*-Methoden differenziert. Zur Feststellung des Tages an dem die Expression der Bry/Mesp1/Nkx2.5-mRNA am stärksten war, wurde eine semiquantitative Reverse Transkriptase (RT)-PCR durchgeführt und graphisch ausgewertet. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass die Expression der Bry-mRNA am Tag 3, der Mesp1-mRNA am Tag 5 und der Nkx2.5-mRNA am Tag 21 am stärksten war. Die *hanging drop*-Differenzierungsmethode führte bei Nkx2.5 Klonen nicht zur Ausbildung schlagender Kardiomyozyten. Erst die *mass culture*-Differenzierungsmethode verhalf zu schlagenden Herzmuskelzellen. Bereits am Tag 9 der Differenzierung wurden bei dieser Methode schlagende Zellen beobachtet.

Im dritten Teil der Arbeit konnte mittels Mikroskopie die Zellmorphologie, der Differenzierungsgrad und die Intensität der roten Fluoreszenz untersucht werden. Sobald die rote Fluoreszenz intensiv genug war, konnten in diesen Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Mikroskops die Konzentrationen vom cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) vermessen werden. Diese Messungen zeigten eine dynamische und biphasische Veränderung von cAMP während der Differenzierung von iPSCs zu schlagenden Kardiomyozyten. Bei Bry- und Nkx2.5-positiven Zellen konnte relativ hohe cAMP Konzentrationen gemessen werden, während im pluripotenten Zustand und in den Mesp1-positiven Zellen cAMP sehr niedrig war.

Diese Erkenntnisse könnten in der Zukunft unter anderem für die pharmakologische Modulation der Differenzierung zwecks Verbesserung ihrer Effizienz und Generierung höherer Zahlen des gewünschten Zelltyps im kürzeren Zeitrahmen verwendet werden.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Schematische Darstellung der Differenzierung von Stammzellen in verschiedene Zelltypen während der Embryonalentwicklung.	11
Abb. 2. Quellen und Anwendungsmöglichkeiten von kardiovaskulären Vorläuferzellen.....	14
Abb. 3. Hierarchiemodell der kardialen Vorläuferzellen und ihrer Abkömmlinge.....	16
Abb. 4. cAMP Signalweg und seine Rolle in der Regulation zellulärer Proteine.....	18
Abb. 5. Funktionsprinzip des cAMP-Sensos.....	20
Abb. 6. MHC-Cherry2AHygroNeo Plasmid.....	29
Abb. 7. Brauchyury-eGFP Rex Neo Plasmid.....	30
Abb. 8. pMesp1-Venus-PL451Neo.....	31
Abb. 9. pBSK-Nkx2.5-mCherry Vektor.....	32
Abb. 10. Restiktionsverdau vom Brachyury-eGFP Ausgangsvektor und mCherry PCR Produkt mit Agel und Sall.....	48
Abb. 11. Diagnostischer Restiktionsverdau von 2 gepickten Klonen mit Xcml und Xhol.....	49
Abb. 12. Brauchyury-mCherry (Bry-mCherry) Vektor.....	50
Abb. 13. Restiktionsverdau vom pMesp1-Venus-PL451Neo Ausgangsvektor und mCherry PCR Produkt mit Agel und Sall.....	51
Abb. 14. Diagnostischer Restiktionsverdau von Mesp1-mCherry (ohne Poly-A) Klonen mit Agel und Xhol.....	51
Abb. 15. Restiktionsverdau vom Mesp1-mCherry (ohne Poly-A) Zwischenvektor und Poly-A-Schwanz PCR Produkt mit Agel und Sall.....	52

Abb. 16 Diagnostischer Restriktionsverdau vom Mesp1-mCherry Vektor mit AgeI und Sall	53
Abb. 17. Mesp1-mCherry Vektor	53
Abb. 18. Ergebnis der Linearisierung vom pBSK-Nkx2.5-mCherry Vektor (18185) mit PmeI	54
Abb. 19. Vergleich zwischen transfizierten und nichttransfizierten Zellen während der Selektion.....	55
Abb. 20. Überprüfung der gepickten Zellklone auf eine genomische Integration des Bry-mCherry Konstrukts.....	56
Abb. 21. Überprüfung der gepickten Zellklone auf eine genomische Integration des Mesp1-mCherry Konstrukts	57
Abb. 22. Überprüfung der gepickten Zellklone auf eine genomische Integration des pBSK-Nkx2.5-mCherry Konstrukts	57
Abb. 23. Alkalische Phosphatase Färbung von Bry-mCherry iPSCs	58
Abb. 24. Semiquantitative RT-PCR des Klons Bry-mCherry	60
Abb. 25. Undifferenzierte und differenzierte Bry-mCherry iPSCs im Vergleich.....	62
Abb. 26. Vergleich zwischen den Semiquantitativen RT-PCRs des Klons Mesp1-mCherry differenziert über Monolayer- und <i>hanging drop</i> -Methode	63
Abb. 27. cAMP Messungen in pluripotenten Zellen. Exemplarische FRET-Spuren für undifferenzierte Bry-mCherry Zellklone sind gezeigt	68
Abb. 28. cAMP Messungen in den roten Bry-mCherry exprimierenden Zellen unter Stimulation mit a) Forskolin und b) IBMX.....	69
Abb. 29. cAMP Messungen in den roten Mesp1-mCherry exprimierenden Zellen unter Stimulation mit a) Forskolin und b) IBMX	70
Abb. 30. Verlauf der cAMP Konzentrationen (a) und PDE-Aktivität (b) während der Differenzierung von iPSCs zu schlagenden Kardiomyozyten	74

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der Reporterkonstrukte	28
Tab. 2. Oligonukleotide zur PCR-Detektion von transfizierten Konstrukten in der genomischen DNA.....	28
Tab. 3. Oligonukleotide zur Detektion von RT-PCR-Produkten.....	29

10 Literaturverzeichnis

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17, 126-140.

Beavo, J.A., and Brunton, L.L. (2002). Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 710-718.

Bender, A.T., and Beavo, J.A. (2006). PDE1B2 regulates cGMP and a subset of the phenotypic characteristics acquired upon macrophage differentiation from a monocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 460-465.

Bloch, W., Fleischmann, B.K., Lorke, D.E., Andressen, C., Hops, B., Hescheler, J., and Addicks, K. (1999). Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 43, 675-684.

Bondue, A., Tannler, S., Chiapparo, G., Chabab, S., Ramialison, M., Paulissen, C., Beck, B., Harvey, R., and Blanpain, C. (2011). Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol* 192, 751-765.

Börner, S., Schwede, F., Schlipp, A., Berisha, F., Calebiro, D., Lohse, M.J., and Nikolaev, V.O. (2011). FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells. *Nat Protoc* 6, 427-438.

Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.

Brinkhuis, H., Schouten, S., Collinson, M.E., Sluijs, A., Sinninghe Damste, J.S., Dickens, G.R., Huber, M., Cronin, T.M., Onodera, J., Takahashi, K., et al. (2006). Episodic fresh surface waters in the Eocene Arctic Ocean. *Nature* 441, 606-609.

Burnside, A.S., and Collas, P. (2002). Induction of Oct-3/4 expression in somatic cells by gap junction-mediated cAMP signaling from blastomeres. *Eur J Cell Biol* 81, 585-591.

- Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Gagliani, M.C., de Filippis, T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani, L., and Lohse, M.J. (2009). Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* 7, e1000172.
- Chambers, I. (2004). The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 6, 386-391.
- Chen, Y., Shao, J.Z., Xiang, L.X., Guo, J., Zhou, Q.J., Yao, X., Dai, L.C., and Lu, Y.L. (2006). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Cell Biol Int* 30, 301-307.
- Cinalli, R.M., Rangan, P., and Lehmann, R. (2008). Germ cells are forever. *Cell* 132, 559-562.
- Cooper, D.M. (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J* 375, 517-529.
- Daniel, P.B., Walker, W.H., and Habener, J.F. (1998). Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu Rev Nutr* 18, 353-383.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Evans, P.M., Zhang, W., Chen, X., Yang, J., Bhakat, K.K., and Liu, C. (2007). Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation. *J Biol Chem* 282, 33994-34002.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Physik* 437, 55-75.
- Gilbert, S.F. (2010). *Developmental biology*, 9th edn (Sunderland, Mass.: Sinauer Associates).
- Hanna, J.H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143, 508-525.
- Hart, A.H., Hartley, L., Ibrahim, M., and Robb, L. (2004). Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn* 230, 187-198.

Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26, 1269-1275.

Impey, S., McCorkle, S.R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J.M., Yochum, G.S., Boss, J.M., McWeeney, S., Dunn, J.J., Mandel, G., and Goodman, R.H. (2004). Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* 119, 1041-1054.

Kim, E.Y., Jeon, K., Park, H.Y., Han, Y.J., Yang, B.C., Park, S.B., Chung, H.M., and Park, S.P. (2010). Differences between cellular and molecular profiles of induced pluripotent stem cells generated from mouse embryonic fibroblasts. *Cell Reprogram* 12, 627-639.

Kita-Matsuo, H., Barcova, M., Prigozhina, N., Salomonis, N., Wei, K., Jacot, J.G., Nelson, B., Spiering, S., Haverslag, R., Kim, C., et al. (2009). Lentiviral vectors and protocols for creation of stable hESC lines for fluorescent tracking and drug resistance selection of cardiomyocytes. *PLoS One* 4, e5046.

Krumenacker, J.S., and Murad, F. (2006). NO-cGMP signaling in development and stem cells. *Mol Genet Metab* 87, 311-314.

Laflamme, M.A., Chen, K.Y., Naumova, A.V., Muskheli, V., Fugate, J.A., Dupras, S.K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., et al. (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 25, 1015-1024.

Lam, J.T., Moretti, A., and Laugwitz, K.L. (2009). Multipotent progenitor cells in regenerative cardiovascular medicine. *Pediatr Cardiol* 30, 690-698.

Laugwitz, K.L., Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., and Chien, K.R. (2008). Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development* 135, 193-205.

Lohse, M.J., Bunemann, M., Hoffmann, C., Vilardaga, J.P., and Nikolaev, V.O. (2007). Monitoring receptor signaling by intramolecular FRET. *Curr Opin Pharmacol* 7, 547-553.

Löser, P., Hanke, B., and Wobus, A.M. (2011). Humane pluripotente Stammzellen – Perspektiven ihrer Nutzung und die Forschungssituation in Deutschland. *Naturwissenschaftliche Rundschau* 9.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.

Mauritz, C., Schwanke, K., Reppel, M., Neef, S., Katsirntaki, K., Maier, L.S., Nguemo, F., Menke, S., Haustein, M., Hescheler, J (2008). Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118, 507-517.

Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599-609.

Moran, K., Backman, J., Brinkhuis, H., Clemens, S.C., Cronin, T., Dickens, G.R., Eynaud, F., Gattacceca, J., Jakobsson, M., Jordan, R.W., et al. (2006). The Cenozoic palaeoenvironment of the Arctic Ocean. *Nature* 441, 601-605.

Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C.B., Lam, J.T., Bott-Flugel, L., Dorn, T., Goedel, A., Hohnke, C., Hofmann, F., et al. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 363, 1397-1409.

Narazaki, G., Uosaki, H., Teranishi, M., Okita, K., Kim, B., Matsuoka, S., Yamanaka, S., and Yamashita, J.K. (2008). Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118, 498-506.

Nikolaev, V.O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., and Lohse, M.J. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* 279, 37215-37218.

Nikolaev, V.O., Gambaryan, S., and Lohse, M.J. (2006). Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nat Methods* 3, 23-25.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949-953.

Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.

Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D., and Williams, R.L. (1990). Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* 141, 344-352.

Pesce, M., and Scholer, H.R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19, 271-278.

Pilz, R.B., and Casteel, D.E. (2003). Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 93, 1034-1046.

Prelle, K., Zink, N., and Wolf, E. (2002). Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anat Histol Embryol* 31, 169-186.

Rossant, J. (2008). Stem cells and early lineage development. *Cell* 132, 527-531.

Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J., and Inoue, T. (1999). MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126, 3437-3447.

Sarkar, D.K., Boyadjieva, N.I., Chen, C.P., Ortiguera, M., Reuhl, K., Clement, E.M., Kuhn, P., and Marano, J. (2008). Cyclic adenosine monophosphate differentiated beta-endorphin neurons promote immune function and prevent prostate cancer growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9105-9110.

Scholer, H.R., Dressler, G.R., Balling, R., Rohdewohld, H., and Gruss, P. (1990). Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 9, 2185-2195.

Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22, 1567-1572.

Siddappa, R., Martens, A., Doorn, J., Leusink, A., Olivo, C., Licht, R., van Rijn, L., Gaspar, C., Fodde, R., Janssen, F., et al. (2008). cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells in vitro results in robust bone formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7281-7286.

Soderling, S.H., and Beavo, J.A. (2000). Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 12, 174-179.

Soeung, S.C., Grundy, J., Maynard, J., Brooks, A., Boreland, M., Sarak, D., Jenkinson, K., and Biggs, B.A. (2006). Financial sustainability planning for immunization services in Cambodia. *Health Policy Plan* 21, 302-309.

Solloway, M.J., and Harvey, R.P. (2003). Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovasc Res* 58, 264-277.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Takahashi, K.S., Gabay, M., Jaccard, D., Shibuya, K., Ohnishi, T., Lippmaa, M., and Triscone, J.M. (2006). Local switching of two-dimensional superconductivity using the ferroelectric field effect. *Nature* 441, 195-198.

Tradtrantip, L., Yangthara, B., Padmawar, P., Morrison, C., and Verkman, A.S. (2009). Thiophenecarboxylate suppressor of cyclic nucleotides discovered in a small-molecule screen blocks toxin-induced intestinal fluid secretion. *Mol Pharmacol* 75, 134-142.

Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., et al. (2007). Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci* 27, 6128-6140.

Vitale, A.M., Wolvetang, E., and Mackay-Sim, A. (2011). Induced pluripotent stem cells: a new technology to study human diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 843-846.

Willoughby, D., and Cooper, D.M. (2008). Live-cell imaging of cAMP dynamics. *Nat Methods* 5, 29-36.

Wobus, A.M., Holzhausen, H., Jakel, P., and Schoneich, J. (1984). Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152, 212-219.

Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y., and Tsien, R.Y. (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 906-918.

Zhang, X., Stojkovic, P., Przyborski, S., Cooke, M., Armstrong, L., Lako, M., and Stojkovic, M. (2006). Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells* 24, 2669-2676.

Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381-384.

https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2011/09/PD11_354_232.html aufgerufen am 27.01.2013