

**Identifizierung neuer Zielgene
der Hey bHLH Transkriptionsfaktoren**

Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Julia Heisig
aus Rothenburg o.T.

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter :

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
2. Summary	6
3. Einleitung.....	8
3.1. Der Notch Signalweg	8
3.2. Die Hey bHLH Transkriptionsfaktoren	10
3.2.1. Proteinstruktur von bHLH Proteinen	10
3.2.2. Expressionsmuster der Hey Gene	10
3.2.3. Phänotyp der Hey Knockout-Mäuse	11
3.3. Interaktionen des Notch-Signalweges mit anderen Signalwegen.....	12
3.4. Regulationsmechanismen der bHLH Transkriptionsfaktoren	13
3.4.1. Einfluss von Protein-Interaktionen auf die Genregulation der Hey Proteine.....	13
3.4.2. Indirekte Regulation der Genexpression	14
3.4.3. Direkte Zielgene der Hey Proteine.....	14
4. Ziel der Arbeit	16
5. Material	17
5.1. Geräte	17
5.2. Chemikalien	17
5.3. Plasmide.....	17
5.4. Primer	18
5.5. Puffer	20
5.6. Antikörper.....	21
6. Methoden	22
6.1. RNA-Extraktion.....	22
6.2. Microarray	22
6.3. Reverse Transkription	22
6.4. Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	22
6.5. DNA-Gelelektrophorese.....	23
6.6. Zellkultur.....	23
6.7. Generierung stabiler Zelllinien	24
6.7.1. Transfektion	24

6.7.2.	Transduktion.....	25
6.7.3.	Selektion.....	25
6.8.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	25
6.9.	Koimmunpräzipitation.....	27
6.10.	Immunfluoreszenz.....	27
6.11.	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	28
6.12.	Chromatin-Immunpräzipitation für ChIP-PET Sequenzierung.....	30
6.13.	DNA Quantifizierung mit PicoGreen®	32
7.	Ergebnisse	33
7.1.	Identifizierung neuer Hey Zielgene in HEK293 Zellen.....	33
7.1.1.	Etablierung von Doxyzyklin-induzierbaren Zelllinien	33
7.1.2.	Expressionsanalyse nach Hey-Überexpression mittels Microarray-Analysen... 34	34
7.1.3.	Untersuchung der direkten Bindung von Hey Proteinen an DNA (ChIP)	36
7.2.	Analyse von Hey1 Mutanten.....	38
7.2.1.	Etablierung und Charakterisierung der Hey1 Mutanten	38
7.2.2.	Zielgene von Hey1-Δbasic und Hey1-RK ₃	40
7.3.	ChIP-PET Sequenzierung.....	41
7.3.1.	Validierung der PET-Cluster.....	43
7.3.2.	Position der PET-Cluster im Genom.....	44
7.3.3.	Bestimmung eines Hey1-Bindemotivs.....	45
7.3.4.	Vergleich der ChIP-PET Sequenzierung mit den Microarray Daten	46
7.4.	Embryonale Stammzellen und Kardiomyozyten.....	48
7.4.1.	Etablierung und Charakterisierung der Zelllinien	48
7.4.2.	Expressionsanalyse in ES-Zellen und Kardiomyozyten	51
7.4.3.	ChIP in ES-Zellen und Kardiomyozyten	53
7.5.	Genontologie-Analyse aller Zielgene	56
7.5.1.	GO-Analyse der HEK293-Zielgene	56
7.5.2.	GO-Analyse der Zielgene von ES-Zellen und Kardiomyozyten	57
8.	Diskussion	59
8.1.	Hey Zielgene in HEK293 Zellen	59
8.1.1.	Doxyzyklin-induzierbare Zelllinien	59
8.1.2.	Genregulation nach Hey Überexpression.....	59

8.1.3.	Direkte Bindung von Hey an die Promotoren der Zielgene.....	61
8.1.4.	Genomweite Analyse der Hey Bindestellen mittels CHIP-PET	63
8.2.	Hey Zielgene in anderen Zelltypen	65
8.2.1.	Zielgene in ES-Zellen.....	65
8.2.2.	Kardiomyozyten als Zellkulturmodell für Genregulation	67
9.	Literaturverzeichnis	69
10.	Anhang.....	76
10.1.	Abkürzungen	76
10.2.	Genlisten der GO-Analysen	77
10.2.1.	GO-Analyse der regulierten Gene des Microarrays von HEK293 Zellen.....	77
10.2.2.	GO-Analyse der CHIP-PET aus HEK293-Zellen	78
10.2.3.	GO-Analyse der Microarrays in ES-Zellen und Kardiomyozyten	78
10.3.	Lebenslauf.....	80
	Danksagung.....	82
	Erklärung.....	84

1. Zusammenfassung

Der Notch Signalweg spielt während der Embryonalentwicklung eine zentrale Rolle in der Spezifizierung des Zellschicksales, der Proliferation und der Kommunikation benachbarter Zellen. Die Hey bHLH Transkriptionsfaktoren sind Zielgene des Notch-Signalweges und besitzen wichtige Funktionen in der kardiovaskulären Entwicklung. Hey2 Knockout (KO) Mäuse und Hey1/HeyL Doppelknockout-Mäuse (DKO) sind gekennzeichnet durch eine fehlerhafte Ausbildung der Herzscheidewand und der Herzklappen und durch eine unzureichende Differenzierung während der Blutgefäßentwicklung.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Zielgene der Hey Proteine zu finden, um ihre Funktion in der Organentwicklung und die Ausprägung der Hey KO Maus-Phänotypen besser verstehen zu können. Dazu wurde als Methode eine Kombination aus Microarray-Analyse und Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) gewählt, um gleichzeitig einen Überblick über die regulierten Zielgene und der direkt gebundenen Promotoren zu gewinnen. Als Zellkulturmodell wurden HEK293-Zellen genutzt, die doxyzyklin-induzierbar Flag-markiertes Hey1, bzw. Hey2 Protein überexprimieren. Eine Microarray-Analyse nach Überexpression von Hey1, bzw. Hey2 ergab insgesamt ca. 100 bis zu 5-fach herunterregulierte Zielgene und nur für Hey2 15 Gene, die stärker als 2-fach hochreguliert waren. Eine ChIP mit α Flag-Antikörper zeigte eine direkte DNA-Bindung von Hey1, bzw. Hey2, im proximalen Promotorbereich von 4 herunterregulierten Zielgenen (HEY1, BMP2, KLF10 und FOXC1). Ist jedoch die DNA-bindende basische Domäne des Hey1-Proteins deletiert, bzw. durch Aminosäureaustausche (3 Arginine zu 3 Lysine) vermutlich nicht mehr DNA-bindend, kann eine Herunterregulation der Zielgene nach Überexpression der Hey1-Mutanten nicht mehr festgestellt werden. Ebenso kann eine Bindung der Hey1-Mutanten an die ausgewählten Promotoren von HEY1, BMP2, KLF10 oder FOXC1 mit ChIP nicht mehr nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die basische Domäne essentiell für die DNA-Bindung und für die Funktion der Hey Proteine ist.

Mit ChIP-PET und anschließender Hochdurchsatz-Sequenzierung wurde ein genomweiter Screen der Hey1- und der Hey2-Bindungsstellen in HEK293-Zellen durchgeführt. Für Hey1 wurden 1453 Zielgene, für Hey2 4288 Zielgene bestimmt, wobei 1147 Gene gemeinsame Zielgene von Hey1 und Hey2 waren. Obwohl die Bindungsstellen in 5'- und 3'-Richtung von kodierenden Sequenzen und auch in Exons und Introns lokalisiert waren, waren 55 %, bzw. 49 % aller Bindungsstellen für Hey1, bzw. Hey2 im proximalen Promotorbereich von -0,5 kb und im ersten Exon lokalisiert. Eine *in silico* Analyse des Bindemotivs deutete auf eine

repetitive GC-haltige Sequenz hin, die vermutlich in CpG Inseln lokalisiert ist. Diese Ergebnisse weisen auf eine direkte Regulation der Transkriptionsmaschinerie durch die Hey Proteine hin.

Ein Vergleich der Zielgene aus den Microarray-Analysen mit den CHIP-PET Daten zeigte einen hohen Anteil an herunterregulierten Genen mit Bindestellen, die direkt von Hey gebunden waren. Während 60 % der herunterregulierten Hey2 Zielgene in der CHIP-PET Analyse eine direkte DNA-Bindung zeigen, weisen nur 20 % der hochregulierten Gene Bindestellen für Hey2 auf. Dies spricht für eine überwiegende Repressorfunktion der Hey Proteine.

Um zu überprüfen, inwieweit die Hey Proteine zelltypspezifisch verschiedene Zielgene regulieren, wurden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) generiert, die ebenfalls doxyzyklin-induzierbar Hey1, bzw. Hey2 überexprimieren. Diese ES-Zellen konnten effektiv zu Kardiomyozyten differenziert werden, so dass auch in diesen Zellen eine Hey Überexpression induziert und somit eine Genexpressionsanalyse durchgeführt werden konnte. Microarray Analysen der ES-Zellen und Kardiomyozyten ergaben mehr hoch- als herunterregulierte Gene im Vergleich zu HEK293-Zellen. Die Überlappung an gemeinsam regulierten Zielgenen in HEK293, ES-Zellen und Kardiomyozyten war sehr gering. Nur zwei Hey2-Zielgene wurden gleichzeitig in HEK293 und ES-Zellen stärker als 2-fach reguliert (Hes1, Zic2). Diese geringe Überlappung deutet auf ein enges zelltypspezifische Regulationspotential hin.

Eine Genontologie-Analyse aller Zielgene zeigte Interaktionen der Hey Proteine mit verschiedenen Signalwegen (z.B. TGF β -, Id- oder Wnt-Signalweg), die alle unersetzlich in frühen Entwicklungsprozessen sind.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Hey Proteine zelltypspezifisch die Expression von Genen aus verschiedenen Signalwegen beeinflussen und modulieren können. Weiterhin eröffnen diese Daten neue Möglichkeiten für zukünftige Forschung, um die Rolle der Hey Proteine in der frühen Organentwicklung genauer ergründen.

2. Summary

During embryonic development, the Notch signaling pathway plays a central role in cell fate specification, proliferation and communication between neighboring cells. Hey basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors are targets of the Notch signaling pathway and show crucial functions in cardiovascular development. Hey2 knock out (KO) mice and Hey1/HeyL double knock out mice (DKO) exhibit incomplete formation of the septum and valves in heart development and defects in the differentiation of blood vessels.

The aim of this study was to find new target genes of the Hey proteins to further clarify their function during organ development and to get more insight into the phenotypes of the Hey KO mice. Towards this goal, a combination of microarray analysis and chromatin immunoprecipitation (ChIP) was chosen to get an overview of genes directly regulated by Hey proteins in a cell culture model of HEK293 cells overexpressing doxycycline-inducible Flag-tagged Hey1 or Hey2. Microarray analysis revealed approximately 100 target genes that were downregulated up to 5-fold by both Hey1 and Hey2. Interestingly, 15 genes were upregulated more than 2-fold by Hey2. ChIP with α Flag antibody confirmed direct interaction of Hey1 and Hey2 with the proximal promoter regions of 4 downregulated target genes (HEY1, BMP2, KLF10 und FOXC1). Overexpression of mutant Hey1 proteins with deletion of the DNA-binding basic domain or single amino acid exchanges in the basic domain (3 arginine to lysine), failed to downregulate Hey1 target genes. Additionally, ChIP assay demonstrated that the binding of the Hey mutants to the promoter regions of HEY1, BMP2, KLF10 or FOXC1 is abolished, suggesting an essential role for the basic domain in DNA binding and function of the Hey proteins.

We then utilized ChIP-PET in conjunction with highthroughput sequencing to perform a genome-wide screen for Hey1 and Hey2 binding sites in HEK293 cells. 1453 and 4288 target genes were identified for Hey1 and Hey2, respectively, of which 1147 genes were targets of both Hey1 and Hey2. Although the binding sites were located upstream and downstream of coding sequences, or even in exons and introns, 55 % and 49 % of all binding sites for Hey1 and Hey2, respectively, were located in proximal promoter regions between -0.5 kb and the first exon. An *in silico* binding motif analysis suggests a repetitive GC-rich sequence for Hey binding which is probably located in CpG islands, indicating a direct regulation of the transcriptional machinery by the Hey proteins.

A comparison of the target genes from microarray analysis and ChIP-PET sequencing data demonstrates a large number of downregulated genes with binding sites that are directly

bound by the Hey proteins. While 60 % of Hey2 downregulated genes contain binding sites, only 20 % of upregulated genes have binding sites for Hey2, invoking a repressor function for Hey proteins.

To investigate, whether the Hey proteins regulate different target genes in a cell type specific manner, embryonic stem cells (ES cells) were generated which also overexpress doxycycline-inducible Hey1 or Hey2. These ES cells could be differentiated efficiently into cardiomyocytes and thus could also be used for gene expression analysis after induction of Hey overexpression. Microarray analysis of ES cells and cardiomyocytes resulted in more up- than downregulated genes in comparison to HEK293 cells. The overlap of common regulated genes in HEK293, ES cells and cardiomyocytes was very low. Only two Hey2 target genes were regulated more than 2-fold in both HEK293 and ES cells (Hes1, Zic2). This disparity indicates a narrow cell-type specific gene regulation by Hey proteins.

Gene ontology analysis of all target genes demonstrated interactions of Hey proteins with different signaling pathways (e.g. TGF β , Id or Wnt signaling), which are all indispensable for early developmental processes.

These results show that Hey proteins influence and modulate gene expression levels in different signaling pathways in a cell-type specific manner. These data provide new possibilities for future research efforts to elucidate the role of Hey proteins in early organ development.

3. Einleitung

3.1. Der Notch Signalweg

Der Notch Signalweg ist während der Entwicklung in vielen Organen einer der wichtigsten Signalwege. Er ist ein evolutionär konservierter und interzellulärer Signalweg, der sowohl in der frühen embryonalen Entwicklung, als auch in der Organogenese binäre Zellschicksale und Differenzierung bestimmt. Er legt durch asymmetrische Zellschicksalsbestimmung Grenzen fest und erhält die Balance zwischen Zellproliferation und Differenzierung (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Niessen et al., 2007; High et al., 2008).

Notch ist wichtig für die Ausbildung der lateralen Inhibition, um z.B. die Musterbildung von neuralen Gewebe zu etablieren. Der aktive Notch-Signalweg ist in undifferenzierten neuralen Vorläuferzellen nötig, um sie im undifferenzierten Stadium zu halten und so den Pool an Vorläuferzellen aufrechtzuerhalten oder durch Proliferation zu vergrößern. Ein Fehlen der Notch-Aktivität führt so zu vorzeitigen Differenzierung und zu kleineren und unvollständigen Organen (Apelqvist et al., 1999; Hald et al., 2003; Yoon et al., 2005; Jadhav et al., 2006). Im Gegensatz zu neuralen Zellen ist Notch in Gliazellen wichtig um die Differenzierung voranzutreiben (Hatakeyama et al., 2004).

Während der Organogenese ist der Notch-Signalweg wichtig für die induktive Zellschicksalsbestimmung. Beispielsweise ist bei der Angiogenese die Expression eines Notch-Liganden in der sprossenden Tipzelle eines neuen Gefäßes nötig, um die nachfolgenden signalempfangenden Stammzellen zur Proliferation anzuregen und den Tipzell-Status zu unterdrücken (le Noble et al., 2008).

Genmutation im Notch-Signalweg führen beim Menschen zu diversen Krankheiten, wie z.B. CADASIL, Alagille-Syndrom oder T-ALL (Ellisen et al., 1991; Joutel et al., 1996; Li et al., 1997; Oda et al., 1997). Bei all diesen Krankheiten kommt es zu einer fehlerhaften Differenzierung von Zellen oder Geweben.

Beim kanonischen Notch-Signalweg (Abb. 1) bindet ein DSL-Ligand (Delta/Delta-like, Serrate/Jag in *Drosophila*/Säugetern und LAG-2 in *C. elegans*) an einen Notch-Rezeptor einer benachbarten Zelle. DSL-Liganden und Notch-Rezeptoren sind Typ-I-Membranproteine mit einer einzelnen Transmembrandomäne und zahlreichen extrazellulären tandemartig angeordneten EGF-ähnlichen Wiederholungen. In Säugetern sind 5 DSL-Liganden beschrieben (Dll-1, -3, -4, Jagged-1 und -2) und 4 Notchrezeptoren (Notch-1, -2, -3, -4). Sie vermitteln

interzelluläre Interaktionen über kurze Distanz. Nach der Bindung wird durch einen zweistufigen proteolytischen Prozess die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) abgespalten und über seine Kernlokalisationssequenz in den Nukleus transportiert. Dort bindet NICD über das sequenzspezifische Protein RBPJ κ /CBF1 an einen DNA-gebundenen Repressorkomplex. Durch diese Bindung wird der Komplex durch Rekrutierung von Koaktivatoren (Mastermind/MAML und p300/CBP in *Drosophila*/Säugetern) in einen aktivierenden Komplex umgewandelt, der die Transkription von spezifischen Zielgenen ermöglicht (Fischer et al., 2003; Niessen et al., 2007).

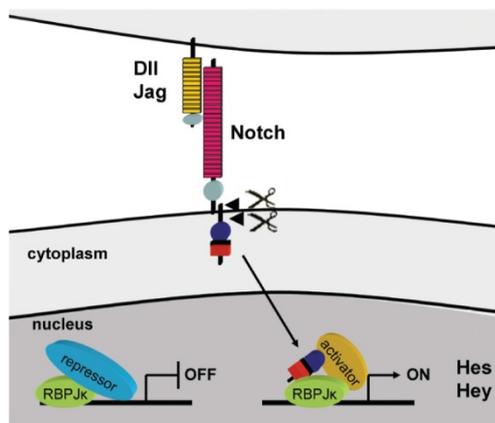


Abb. 1. Kanonischer Notch Signalweg (Fischer et al., 2007a).

Neben diesem klassischen Notch-Signalweg wurden auch nicht-kanonische Signalwege beschrieben. Beispielsweise besitzt der Notch-Ligand Wry (Weary) in *Drosophila* EGF-ähnliche Wiederholungen und eine Transmembrandomäne, aber keine DSL-Domäne und verursacht in Embryonen, denen Wry fehlt, dilatative Kardiomyopathie (Kim et al., 2010).

Zielgene des Notch-Signalweges sind Hairy und die Enhancer-of-Split (E(spl)) Gene in *Drosophila* und die nahe verwandten Hes- und Hey-Gene in Säugetern. Diese Gene kodieren für basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine. Direkte Zielgene von Notch in Säugetern sind aus der Hes-Familie Hes1, 5, 7 und die gesamte Hey Genfamilie, bestehend aus Hey1, Hey2 und HeyL (Kokubo et al., 1999; Leimeister et al., 1999; Nakagawa et al., 1999; Chin et al., 2000; Iso et al., 2001a). Weitere Notch-Zielgene sind z.B. NRARP (Lamar et al., 2001), CyclinD1 (Ronchini et al., 2001) und die HoxA Gengruppierung (Weerkamp et al., 2006).

3.2. Die Hey bHLH Transkriptionsfaktoren

3.2.1. Proteinstruktur von bHLH Proteinen

bHLH Proteine zeichnen sich durch eine konservierte Domänenstruktur aus (Abb. 2). Die N-terminal gelegene basische Domäne hat einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren und kann sequenzspezifisch mit DNA interagieren. Die direkt benachbarte Helix-Loop-Helix (HLH) Domäne wird durch zwei amphipatische α -Helices gebildet, die durch einen kurzen Linker miteinander verbunden sind. Über diese Domäne können bHLH Proteine Homo- oder Heterodimere bilden. Diese Dimere bilden eine scherenförmige Struktur, die über die basische Domäne an die DNA bindet (Murre et al., 1989; Shimizu et al., 1997). C-terminal der bHLH-Domäne liegt bei Hey- und Hes-Proteinen die Orange-Domäne aus zwei α -Helices, die als zusätzliche protein-interagierende Domäne fungiert. Charakteristisch für die Hairy- und E(spl)-Proteine ist ein konserviertes Prolin in der basischen Domäne und ein C-terminales WRPW-Motiv, das den Korepressor Groucho bindet. Hes Proteine sind in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich zu Hairy und E(spl). Hey-Proteine hingegen besitzen an Stelle des konservierten Prolins ein Glycin und C-terminal das YXXW-Motiv (YRPW für hHey1 und hHey2, YHSW für hHeyL). Im Gegensatz zum WRPW-Motiv der Hes-Proteine, bindet das YXXW-Motiv nicht an den Korepressor Groucho/TLE1-4 (Iso et al., 2001b; Fischer et al., 2002; Pichon et al., 2004). Nur in den Hey-Proteinen folgen diesem Motiv die Aminosäuren TE(I/V)GAF mit ebenfalls unbekannter Funktion (Steidl et al., 2000).



Abb. 2. Domänenstruktur der Hey Proteinfamilie (Fischer et al., 2002).

3.2.2. Expressionsmuster der Hey Gene

Die Hey-Genfamilie besteht bei Säugern aus den drei Mitgliedern Hey1, Hey2 und HeyL. Sie sind während der embryonalen Entwicklung in einigen Geweben in nicht-überlappenden Bereichen exprimiert. Hey1- und Hey2-mRNA sind in den myokardialen Zellen des Herzens exprimiert, wobei Hey1 nur im Ein- und Ausflusstrakt und im Atrium zu finden ist und Hey2 nur im Ventrikel. Dieses komplementäre Expressionsmuster liegt z.B. auch in den Schnurrhaar-Follikeln (Hey1), bzw. des umliegenden Gewebes (Hey2) vor (Leimeister et al., 1999).

In anderen Geweben werden die Hey Gene gemeinsam in abgegrenzten Bereichen exprimiert. So sind alle Hey Gene in den Endothelzellen der Arterien und Hey2 und HeyL zusätzlich in

der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert, wohingegen eine Expression in den Venen fehlt. Im Herzen liegt die einzige gemeinsame Expression aller Hey Gene in den endokardialen Zellen des atrioventrikulären (AV) Kissens vor, die Expression in den mesenchymalen Zellen des AV-Kissens ist schwächer oder fehlt ganz (Fischer, 2007). Hey2 und HeyL sind zudem gemeinsam im trigeminalen Ganglion und in den spinalen Nerven exprimiert (Leimeister et al., 1999; Fischer et al., 2007b).

Die Expressionen der Hey mRNAs ist während der embryonalen Entwicklung sehr spezifisch, was darauf hindeutet, dass ihre Funktion während der Neurogenese, Somitogenese und Organogenese wichtig ist.

3.2.3. Phänotyp der Hey Knockout-Mäuse

Die Relevanz der Hey Proteine für die Embryonalentwicklung ist gut an Knockout-Mäusen erkennbar. Sind ein oder mehrere Gene der Hey Familie homozygot deletiert, sind die Mäuse oft durch einen krankhaften Herz- und Blutgefäßphänotyp gekennzeichnet. Hey2 Knockout (KO) Mäuse weisen wenige Tage nach der Geburt eine Hypertrophie beider Ventrikel auf, die Herzmuskelwände sind verdickt und die vergrößerten Kardiomyozyten zeigen eine weniger geordnete Myofibrillenstruktur (Donovan et al., 2002; Gessler et al., 2002; Sakata et al., 2002). Weiterhin haben die KO-Mausembryonen ab E13.5 (Tag 13,5 der embryonalen Entwicklung) einen ventrikulären Septumdefekt (VSD), bei dem der muskuläre Teil des Septums auswächst, aber der membranöse Teil zurückgebildet ist und sich das Septum nicht schließt. Weiterhin zeigen sie verdickte Trikuspidalklappensegel, die zu Insuffizienz neigen oder es liegt ein vollständiger Verschluss der Klappensegel vor. Bei diesen Hey2 KO-Mäusen ist während der Entwicklung der Vorgang der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) gestört, der eine Voraussetzung für die vollständige Ausbildung des Septums und der Klappen ist (Fischer et al., 2007b). Je nach Mausstamm sterben die KO-Mäuse innerhalb weniger Tage oder Wochen nach der Geburt (Donovan et al., 2002; Gessler et al., 2002; Sakata et al., 2002; Fischer et al., 2004; Sakata et al., 2006).

Im Gegensatz dazu sind Hey1 KO-Mäuse lebensfähig und haben während der Embryonalentwicklung keine Defekte. Hey1/Hey2 Doppelknockout-Mäuse (DKO) zeigen schon ab E9.5 massive Hämorrhagie in Rumpf, Kopf und Herzbeutel und sterben ab (Fischer et al., 2004). Vergleicht man den Dottersack von Hey1/Hey2-DKO-Embryonen an Tag E10.5 mit Wildtyp-Embryonen, bei denen ein fein verzweigtes Netzwerk von Blutgefäßen erkennbar ist, wird ein großer Unterschied deutlich. In den DKO-Embryonen werden

Blutgefäße durch Vaskulogenese zwar anfänglich ausgebildet, es findet aber kein angiogenetischer Umbau statt und die Gefäße degenerieren oder fehlen völlig. Ab E11.5 sind keine Blutgefäße mehr erkennbar. Zudem fehlt die Expression von arteriellen Markern, so dass eine arterielle Differenzierung ausbleibt (Fischer et al., 2004; Kokubo et al., 2005).

Ebenso wie Hey1 KO-Mäuse zeigen auch HeyL KO-Mäuse keinen veränderten Phänotyp. Jedoch wird bei Hey1/HeyL DKO-Mäusen ein sehr ähnlicher Herzphänotyp wie bei Hey2 KO-Mäusen gefunden. Auch sie zeigen VSD, verdickte Klappensegel und somit auch Defekte während der EMT (Fischer et al., 2007b). Der fehlende veränderte Phänotyp der Hey1 und HeyL KO-Mäuse gegenüber Wildtyp-Mäusen ist mit der Redundanz der Hey Familienmitglieder zu erklären. So kann z.B. das Fehlen von Hey1 in Blutgefäßen durch Hey2 kompensiert werden (Fischer et al., 2004).

Die kardiovaskulären Phänotypen von Hey KO-Mäusen sind auch bei KO-Mäusen zu sehen, bei denen andere Gene des Notch-Signalweges deletiert oder mutiert sind (z.B. Notch1, Notch4, Jag1, Dll4, RBPJ κ). Der Notch- und RBPJ κ KO zeigen ebenfalls Defekte während der EMT im AV-Kissen, wobei diese Phänotypen stärker ausgeprägt sind, als z.B. im Hey1/HeyL DKO Phänotyp (Timmerman et al., 2004; Fischer et al., 2007b).

3.3. Interaktionen des Notch-Signalweges mit anderen Signalwegen

Es wurden Verbindungen zwischen dem Notch-Signalweg mit weiteren Signalwegen beschrieben, wobei teilweise zu klären ist, inwieweit die Hey Proteine in diesen Signalweg-Interaktionen involviert sind und welche direkten Zielgene sie in diesen Signalwegen regulieren. Während der Herzentwicklung spielt z.B. der Wnt/ β -Catenin Signalweg eine wichtige Rolle. Im präkardialen Mesoderm induziert Wnt Proliferation, kardiale Genexpression und Kontraktion, während später in der Entwicklung die Differenzierung zu Herzzellen durch Wnt inhibiert wird (Naito et al., 2006). Notch1 beeinflusst die Wnt-Aktivierung negativ und moduliert die Wnt-abhängige Genexpression von Islet-1, Myocardin und Smyd1, um den Zeitpunkt und die Menge des Wnt-Signales für die frühe Herzentwicklung festzulegen (Klaus et al., 2007; Kwon et al., 2009).

Auch mit dem TGF β -Signalweg sind Interaktionen beschrieben. Notch induziert synergistisch zusammen mit TGF β das Gen Snail, das zusammen mit dem TGF β -Zielgen Slug in Endothelzellen die EMT des endokardialen Kissens vorantreibt und damit die Ausbildung des Septums und der Klappen (Niessen et al., 2008). Auch in der Differenzierung der glatten Gefäßmuskulatur wirken Notch und TGF β synergistisch auf die Erhöhung der Genexpression

von SM-Aktin, Calponin1 und SM22a (Tang et al., 2010). Notch kann zudem die Genregulation und Protein-Halbwertszeiten einiger R-Smad-Proteine unterschiedlich beeinflussen und moduliert so die von TGF β induzierte Genexpression (Fu et al., 2009).

Der BMP-Signalweg ist in vielen verschiedenen Geweben während der Entwicklung ebenfalls nötig, um Zellschicksale zu determinieren. Bmp2 verstärkt das Notch Signal, was zu einer erhöhten Expression von Hes1 und Hey1 in neuroepithelialen Vorläuferzellen führt und die Differenzierung in Neuronen verhindert (Takizawa et al., 2003). Auch im Herzen spielen Hey1 und Hey2 zusammen mit Bmp2 eine wichtige Rolle in der Spezifizierung von Zellschicksalen. Hey1 und Hey2 verhindern im Myokard die Expression von AV-Kanal-spezifischen Genen, wie Bmp2 und Tbx2, und etablieren Atrium und Ventrikel (Rutenberg et al., 2006; Kokubo et al., 2007).

3.4. Regulationsmechanismen der bHLH Transkriptionsfaktoren

Um die Phänotypen der Hey KO-Mäuse und die Interaktion mit verschiedenen Signalwegen besser verstehen zu können, sind biochemische Analysen notwendig, die die Rolle der Hey Proteine als Protein-Interaktionspartner und Transkriptionsfaktoren genauer untersuchen.

Durch die Fähigkeit der bHLH Proteine Homo- und Heterodimere zu bilden und über ihre zusätzlichen Domänen weitere Proteine zu binden, üben sie verschiedene Genregulationsmechanismen aus. Je nach Bindungspartner können sie die Genaktivität durch DNA-unabhängige Protein-Protein-Interaktionen, aber auch durch direkte DNA-Interaktionen spezifisch regulieren. Es wurde gezeigt, dass sie bis auf sehr wenige Ausnahmen aus der Hes-Familie Repressoren sind (Fischer et al., 2007a).

3.4.1. Einfluss von Protein-Interaktionen auf die Genregulation der Hey Proteine

Die Homo- oder Heterodimerisierung von Hey bHLH Transkriptionsfaktoren beeinflusst die DNA-Bindungsstärke. So zeigen Heterodimere aus Hes1 und Hey1 (oder Hey2) eine höhere DNA-Bindungsaffinität als ihre jeweiligen Homodimere (Iso et al., 2001b). Ebenso beeinflusst die Dimerisierung die Bindungsaffinität zwischen den Dimerpartnern. Heterodimere zeigen eine stärkere Protein-Protein-Bindung, als die jeweiligen Homodimere (Van Wayenbergh et al., 2003; Ross et al., 2006). Über ihre Orange Domäne können Hey-Homo- und Heterodimere weitere Proteine binden. In einem Heterodimer aus Hey2 und dem bHLH-Protein Helt, kann Hey2 über die Orange Domäne Hes5 binden und reprimiert so neuronale Differenzierung in Vorläuferzellen (Nakatani et al., 2004).

Hey2 rekrutiert über die HLH-Domäne den mSin3-Repressorkomplex, der den Korepressor N-CoR und die Histondeacetylase HDAC-1 beinhaltet (Iso et al., 2001b). Hey2 interagiert auch mit der Histondeacetylase SIRT1 (Takata et al., 2003). Durch diese Rekrutierungen wird durch Histon-Modifikationen die Genaktivität reprimiert. Da Hey und Hes sich in der Rekrutierung von Korepressoren stark unterscheiden, führt ihre Heterodimerisierung zu einem breiteren Repertoire an Repressionsmöglichkeiten, als durch Homodimerisierung.

3.4.2. Indirekte Regulation der Genexpression

Hey Proteine können ohne direkte DNA-Bindung über Protein-Protein-Interaktionen die Genregulation beeinflussen. Hey1 und Hey2 binden an die DNA-gebundenen Aktivatoren GATA4 und GATA6 und inhibieren so die Expression von ANF und weiteren GATA-vermittelten kardialen Genen (Kathiriya et al., 2004; Fischer et al., 2005).

Weiterhin wurde beschrieben, dass Hey1 direkt den Initiationskomplexes der Transkription inhibieren kann (Henderson et al., 2001; Taylor et al., 2002). Die Repression des VEGFR2-Promotors durch Hey1 wird entweder über GC-bindende Sp1-Proteine vermittelt oder über eine Interaktion mit dem Initiationskomplexes (Holderfield et al., 2006).

Hey Proteine können auch an Genaktivatoren binden, ihre DNA-Bindung verhindern und somit reprimierend auf die Expression von Zielgenen wirken. Hey2 bindet zytosolisch an den aktivierenden Ptf1-p48-Komplex, der während der Pankreas-Entwicklung die Differenzierung zu pankreatischen Zellen und den Austritt aus dem Zellzyklus vorantreibt. Durch diese Bindung wird der Differenzierungsbeginn verzögert, um Proliferation von Vorläuferzellen zu ermöglichen (Ghosh et al., 2006).

3.4.3. Direkte Zielgene der Hey Proteine

Durch ihre DNA-bindende Fähigkeit können Hey Proteine direkt auf die Genregulation einwirken. Hey Proteine binden als Dimere über ihre basischen Domänen direkt an DNA. Es wurde gezeigt, dass Hey1 und Hey2 ebenso wie E(spl) Proteine *in vitro* an Klasse B E-Box Sequenzen (CACGTG) binden (Jennings et al., 1999; Nakagawa et al., 2000; Iso et al., 2001b; Pichon et al., 2004). Die Bindung von Hey2 an Klasse C E-Box Sequenzen ist schwach, wird aber durch die Bildung von Hey2/Hes1-Heterodimere verstärkt (Iso et al., 2001b). Da diese DNA-Bindungsversuche *in vitro* durchgeführt wurden, bleibt zu klären ob E-Boxen auch eine physiologische Bedeutung haben und ob weitere Bindungsstellen in Betracht gezogen werden müssen.

Die Suche nach Zielgenen, die direkt durch Hey Proteine reguliert werden, wurde mit verschiedenen Ansätzen und Methoden versucht. Mit Microarray Analysen konnten in Endothelzellen mit überexprimiertem Hey2 mehrere regulierte Gene aufgedeckt werden, die auf eine Rolle in der vaskulären Differenzierung hindeuten (Chi et al., 2003). Mit Hilfe von genetisch veränderten Mäusen konnten durch in-situ Hybridisierungen ebenfalls Zielgene der Hey Proteine überprüft werden. In Hey2 KO-Mäusen sind atriale Gene, wie ANF, Cx40, Tbx5, Mlc1a, Mlc2a und Sln im Myokard der Ventrikel ektoptisch exprimiert (Fischer et al., 2005; Koibuchi et al., 2007; Xin et al., 2007). Dies deutet auf eine aktive Repression atrialer Gene durch Hey2 hin. Eine direkte DNA-Bindung durch die Hey Proteine wurde allerdings nicht untersucht. Bei der Verwendung dieser beiden Methoden (Microarray und Genexpression in KO-Mäusen) bleibt zu klären, ob diese Gene direkte Zielgene sind oder indirekt reguliert werden.

Mit Luziferase Reporterversuchen konnten ebenso regulierte Zielgene untersucht werden. In hypoxischen endothelialen Vorläuferzellen regulieren Hey1 und Hey2 den Venen-Marker COUP-TFII herunter und induzieren arterielles Zellschicksal (Diez et al., 2007). Einzelne direkt regulierte Zielgene konnten mit Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) nachgewiesen werden. Zwischen Hey1 und dem p57^{KIP2}-Promotor konnte eine direkte Interaktion in Hefezellen und Fibroblasten mittels ChIP nachgewiesen werden (Jia et al., 2007). Hey1 kontrolliert die Größe der optischen Linse, indem Hey1 die Proliferation in den Linsen-Vorläuferzellen durch Herunterregulation des Zellzyklus-Inhibitors p57^{KIP2} aufrecht erhält. Bei vielen Methoden kann eine direkte Regulation durch die Hey Proteine überprüft werden, wenn es im Vorfeld schon Hinweise auf eine Regulation gab. In dieser Arbeit sollte ein neues Screening-Verfahren angewandt werden, das neue und direkt regulierte Zielgene eines Transkriptionsfaktors aufdecken soll.

4. Ziel der Arbeit

Einige Hey Zielgene und auch Interaktionen mit verschiedenen Signalwegen sind bekannt und deuten auf eine wichtige Rolle während der Organogenese hin. Ein genauer Überblick über die Zielgene der Hey Proteine oder deren Regulationsmechanismen ist unbekannt. Mit Hilfe von Microarray-Analysen und Chromatin-Immunpräzipitationen sollten in dieser Arbeit neue Zielgene der Hey Proteine in Zellkultur aufgedeckt werden. Mit doxyzyklin-induzierbaren Vektorsystemen sollten HEK293-Zellen Flag-markiertes Hey1, bzw. Hey2 überexprimieren. Microarray-Analysen dieser Zellen sollte Aufschluss darüber geben, welche Gene durch Hey reguliert werden. Diese Zielgene sollten zuerst mit ChIP auf eine direkte Regulation hin untersucht werden. Ein neues Screening-Verfahren, bei der die ChIP-Eluat sequenziert werden, sollte genutzt werden, um neue direkt gebundene Zielgene von Hey1 und Hey2 zu finden. Darüberhinaus sollte eine Hey1-Mutante, die in ihrer DNA-bindenden basischen Domäne mutiert ist, auf Regulationspotential und direkte DNA-Bindung hin untersucht werden.

Um die Ergebnisse aus HEK293-Zellen mit einem anderen Zellkultursystem zu vergleichen, wurden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) ebenfalls mit doxyzyklin-induzierbaren Vektoren transduziert. Die aus den ES-Zellen differenzierten Kardiomyozyten sollten ebenfalls in diesen Vergleich einbezogen werden. Microarray-Analysen und ChIP-Experimente ausgesuchter Zielgene in diesen beiden Zelllinien sollten Aufschluss über die Zelltypspezifität der Hey Proteine geben.

5. Material

5.1. Geräte

Digital Sonifier [®] W-250 D	Branson Ultrasonics
iCycler iQ [™] Real-Time PCR Detection System	BioRad
NanoDrop ND 1000 Spektrophotometer	Peqlab
Leica Fluoreszenz Mikroskop DMI 6000B	Leica

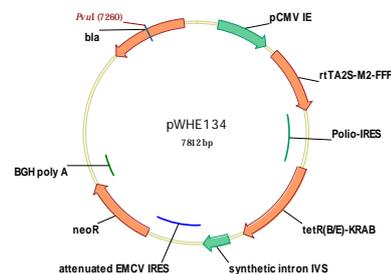
5.2. Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in p.a. Qualität bei Roth, Sigma-Aldrich oder AppliChem bezogen.

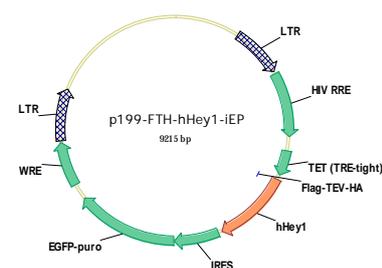
5.3. Plasmide

pCS2p: Expressionsvektor mit CMV-Promotor (Rupp et al., 1994)

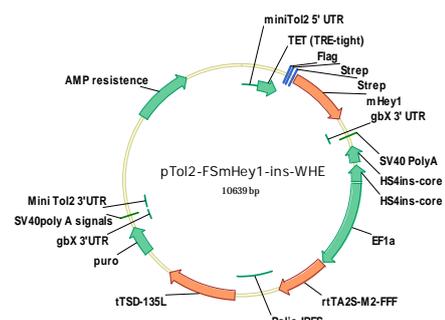
pWHE134: tricistronische Regulationskassette unter CMV-Promotor mit Tetrazyklin-abhängigen Aktivator rtTA2^S-M2, Repressor TetR-KRAB und Neomycin-Resistenz, getrennt durch zwei IRES-Elemente (Wong et al., 2005)



p199-iEP: lentivirale Expressionskonstrukte, bicistronisch mit IRES-Element und Fusionsprotein aus EGFP und Puromycin-Resistenz, unter der Kontrolle des Tetrazyklin-regulierbaren Promotors TRE (Stegmeier et al., 2005)



pTol2-ins-WHE: Expressionskonstrukte, flankiert von miniTol2-Sequenzen und Insulatorsequenzen HS4, WHE-Element aus pWHE459; mit Puromycin-Resistenz (von pTol2), (Balciunas et al., 2006)



pKate-N/Tol2: Expressionskonstrukt für Tol2-Transposase (Balciunas et al., 2006)

pBS-KS: pBluescript II KS (+) (Stratagene)

psPAX2, pCMV-VSVg: Plasmide für Virusproduktion (Patrick Salmon)

5.4. Primer

Primersequenzen wurden mit Hilfe des Primer3-Programmes (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) erstellt und bei MWG oder Sigma-Aldrich synthetisiert. Das Lyophilisat wurde in H₂O gelöst, auf eine Konzentration von 100 mM eingestellt und bei -20°C aufbewahrt.

Name	5' → 3' Sequenz	Name	5' → 3' Sequenz
ChIP (human):			
hHey1-p1-for	CGTGAGCGGGATCAGTGT	hJAG2-p-for	GGGCCTCGTCGTCATCC
hHey1-p1-rev	TTCTCCACCTCGATGGTCTC	hJAG2-p-rev	ATGGAGCGCACGTACCG
hHey1-int4,5-for	GGAACCTAACGGGAGACCA	hSMAD7-p-for	GCGCACCGCTGCCTCTCTGCT
hHey1-int4,5-rev	GGCAGAGAAACCACAGAGCA	hSMAD7-p-rev	CCGGGCCAGCCTGCAGTCCA
hBMP2-p1-for	CGCTAGTCGCTCCGCTTC	hBMPR1A-p-for	CTGTGGGGCTGGCTTGT
hBMP2-p1-rev	GTCCCCGGTGATCCACTC	hBMPR1A-p-rev	AGTCGGGGCTGCTCCTC
hBMP2-p2-for	TCCTTCTGCCTGTGATCTGG	hCOUPTF2-p-for	CAGTCCGGCCAATGACG
hBMP2-p2-rev	GGGCAAAGGAATTTGGACTT	hCOUPTF2-p-rev	TTTGACACGACTGCTGCAACT
hKLF10-int1,2-for	AAGCTCAGGAAGTAGGGGAAAG	hRUNX2-p-for	GAGGGCGAGAAGAAAAGAAGG
hKLF10-int1,2-rev	GCGAGGCATGTGAACAAAG	hRUNX2-p-rev	GGGCTGCACGCTCAGAT
hKLF10-p2-for	TCAGGTGGCCTCTGGAGTT	hRUNX1-p-for	CGGGCCAATTCAGGAG
hKLF10-p2-rev	AATCAACGGCAAAGGTGTGT	hRUNX1-p-rev	ACAGGCCTTTCCGGTATCA
hFOXC1-p1-for	TCATTCGGAGGCGGTTCT	hFOXO3A-p-for	CAGCGCCACATTCCATT
hFOXC1-p1-rev	ACCCAGGCGAGGACTTTTT	hFOXO3A-p-rev	AGCGCACGTGGGTGTTATT
hFOXC1-p2-for	CGAAACCGGTTCTTTGGAG	hSKIL-p-for	GAGGGGCAGCCCAGGAGGGAGGT
hFOXC1-p2-rev	GCCAGGTTTGCCATAAAAAGT	hSKIL-p-rev	AGAGTGCCGCCCGCCGAGGTCAG
hCOUP-TF2-p1-for	ACACCCTGGAATTCAAAGACAC	hEYA4-p-for	CTCACGAGCCCGCAGTAG
hCOUP-TF2-p1-rev	AACCAAACCCAAGCCATATTC	hEYA4-p-rev	CTTCACGTGGACAGGATGG
hCOUP-TF2-p2-for	GAGATCCGAGTACGGTCCAA	hMYB-p-for	TCCCTGGCCCCGGGCTCCCT
hCOUP-TF2-p2-rev	ACGTAGGCATAGGAGAACGAAA	hMYB-p-rev	GGCCGGGTCGCCGCTCCCATTC
hKLF10-p1-for	GCTGGGTCAACAGGATGG	h-miR9-2-p-for	AATCAGACGCCGCTTTTC
hKLF10-p1-rev	TCCTGAGTCTGCTGGAGAGG	h-miR9-2-p-rev	ATGCGGTTAGGCTAGGCAGT
hDLL4-p-for	CAGCCGTAGTCACCTGGATT	hID2-p-for	TCGCAGGCATTGATCAGC
hDLL4-p-rev	GCTCCCCTTTGGCCTTC	hID2-p-rev	CCCTGCAGCCTTGTCCTC
hDLL1-p-for	TCCTGCGCGTGTGACTG	hSEMA3C-p-for	GCTCCCTGCCAGGCTCTC
hDLL1-p-rev	ACTCCGGGCTCCGATCT	hSEMA3C-p-rev	CGAGCGCTCTTGGTGTCC
hGATA4-p-for	GACCCCGAGCGCCCGGAGTTTG	hUNC5B-p-for	CGGTTGGCGAACTCACTC
hGATA4-p-rev	GCAGCCCGGGTGATGGATGGCCG	hUNC5B-p-rev	GCTGTGCCTCCGAAGTTG
hTGFB2-p-for	GCAGCTCCCAGAGCAGGA	hNKIRAS1-int1-for	GCTCCCTGACCCACATTCC
hTGFB2-p-rev	GGAGGAGGGTGCCTTC	hNKIRAS1-int1-rev	CTCCTCCGAGTGTGCAA
hSMAD6-p-for	CGGGACGCCAGCGACCCCT	hHOXA5-p-for	AATTTTGCCATAATGGGCTGT
hSMAD6-p-rev	TGAGCCGCTTACAGCGAGTACGTGA	hHOXA5-p-rev	AATAGGGGAGTTGGTGGAG
hHEY2-p-for	GTGAGGTGGCCCCACCGCTCG	hHNRPU-int1-for	TGCAGCTGCCGCTGTAGGGGAGGA
hHEY2-p-rev	TAGCGGCTCTTTCCACGCCGCAACT	hHNRPU-int1-rev	CCCCGAGACATGTGCCCGCACCG

ChIP (murin):

mLefty1-p1-for	CAGGACTCAGGGGCTTGTT	mHey1-prom1-for	CCAACCTCTCCGCCTTCC
mLefty1-p1-rev	CTTGAGTCTGCGGAGGAATG	mHey1-prom1-rev	CGTGCACACTGATCCCACTC
mLefty1-p2-for	GGAAACTGGAATCGCCTTG	mHey1-prom2-for	GCCCCGACTCCGATTACA
mLefty1-p2-rev	AGAGCGTGTAGGCTGTTGG	mHey1-prom2-rev	CGGCTGCATGAATGGAGAAGAA
mLefty2-p1-for	GCTTGTCTCATGCTGAGTTCC	mHey2-prom1-for	GGTAGAAACTCGGCGGGAGA
mLefty2-p1-rev	TGGCACTGGCCTTCTTTATAGTT	mHey2-prom1-rev	AGTGGAGCGCTGGGGTTG
mLefty2-p2-for	GATGCACTTGCAGCTAAAACCT	mHey2-prom2-for	CGGCAGAGCCTGCTAAAAA
mLefty2-p2-rev	CATCCTCAGCAGACATCCATC	mHey2-prom2-rev	TGCACGTACAGCATGGATTG
mLefty2-p3-for	AAGGACCTCACGTTCTGGTG	mBMP2-p1-for	TGCGCCTCCGAGGGGGAGGTGTT
mLefty2-p3-rev	CCACTCTGTATCCGGCTTTCT	mBMP2-p1-rev	GGGCGGGCTGTGGGAAGCGCAG
mLefty2-p4-for	CGTCCCACTCAGATCCACA	mBMP2-p2-for	TCCTCTCCATTTCCTTCCAC
mLefty2-p4-rev	GCCCAAAGAAGGAAGCAGA	mBMP2-p2-rev	CGATGCACAAGACAGTTCCA
mLefty2-p5-for	TGAGCTGGGCTGTGGAGTAG	mTBX2-p2-for	CAGAACTGCCTGGGAGAGG
mLefty2-p5-rev	TTTCCCCATCACCTATGGAA	mTBX2-p2-rev	CCGAGGCTCCACAACAAA
mId2-p1-for	GGGAGAATTCGCCTGGTATG	mTBX2-p3-for	GCACCCACCCTTCTGCTAC
mId2-p1-rev	CCAGGCTCGGTTTCAGAATG	mTBX2-p3-rev	CACCCTTCCCCATTTACTT
mId2-p2-for	CCCCAAATCACTCGAAAC		
mId2-p2-rev	AGCTGATCAATGCCTGCAA		

qRT-PCR (human):

hHey1-real5-ex1	CCAGCATGAAGCGAGCTCAC	hBMP2-real5'	CAGACCACCGTTGGAGA
hHey1-real3-ex2	GGGGACATGGAACCTAGAGC	hBMP2-real3'	CTCCTCCGTGGGGATAGAAC
huclik3 (hHey1)	TGAGCTGAGAAGGCTGGTAC	hFOXC1-altreal5'	TCTCCCTCTCTTGCTTCT
clikseq5 (hHey1)	ACCCCAAACCTCCGATAGTCC	hFOXC1-altreal3'	CGTCAGGTTTTGGGAACACT
hHes1-real5'	GAGAAGGCGGACATTCTGG	hBHLHB5-real5'	CCCAGTTCCTTCTGTGGTGA
hHes1-real3'	GAAGCCGGCTCGGTACTT	hBHLHB5-real3'	TGGATGTGCAGGTGTGAGAA
hSKIL-real5'	AAGAGGCTGAATATGCAGGACA	hZIC2-real5'	AGCCCTCAAGGCCAAATAC
hSKIL-real3'	CTTCCCGTTCCTGTCTGAGTT	hZIC2-real3'	GCAGCCCTCAAACCTCACACT
hNF1B-real5'	CCGACTACTATGAAGAAGCCTGAA	hGAS1-real5'	CTGTGGCTTGGGACAGATAGA
hNF1B-real3'	GGTGGAGTTCGAGTTGAGATGAC	hGAS1-real3'	GAGGAGCTTCAGGGGAAGTG
hDLX2-real5'	GGCGTTTCCAAAAGACTCAA	hCCDC85B-real5'	ACCTCTGCTGCTTCTGGACT
hDLX2-real3'	AGGGGATCTCACCCTTTTCC	hCCDC85B-real3'	CTCCTTAAGCGCTAGGTTCTCC
hKLF10-real5'	ACATCTGTAGCCACCCAGGA	hZNF652-real5'	CAGTGGTGTGGCAAGGATTT
hKLF10-real3'	GTTTCATCAGAACGGGCAAAC	hZNF652-real3'	TCTCGCTGTGTGAGTTCTG
hPMAIP1-realex2-5'	CTCTTTCCTCCTCGCCACTT	hBMP6-real5'	CCCTTCATGGTGGCTTCTT
hPMAIP1-real3'	CGGAAGTTCAGTTTGTCTCCA	hBMP6-real3'	AGGCTGTTTTCAATTCCTGCT
hCDKN1B-real5'	CTCAGAAGACGTCAAACGTAAACA	hMARK3-real5'	CAGTGTGTTGGAGGAAAGG
hCDKN1B-real3'	CAGGATGTCCATTCCATGAAG	hMARK3-real3'	TGCAAACATAAGTATTTCTGCTG
hSMAD9-real5'	CGTGTATGAACTGACCAAGATGTG		
hSMAD9-real3'	CAGTGGCCCATGAAGATGAA		

qRT-PCR (murin):

mOct4-real5'	CCGTGAAGTTGGAGAAGGTG	mMash2-real5'	ATCCCACCCCCTAAGCTG
mOct4-real3'	GAAGCGACAGATGGTGGTCT	mMash2-real3'	GGTCCGGAAGATGGAAGATG
mNanog-real5'	TTGCCTAGTTCTGAGGAAGCA	mSema4a-real5'	ATGGATGAGCAGTGGTAGG
mNanog-real3'	GAGGAAGGGCGAGGAGAG	mSema4a-real3'	TCCAGATGCCTCCAGAGAAG
mBrachyuryT-real5'	CAGCCACCTACTGGCTCT	mMeis2-real5'	CTCACACCCCGTACCCTTC
mBrachyuryT-real3'	GCGTCAGTGGTGTGTAATGTG	mMeis2-real3'	GTTGCTGACCATCCAACACA
mANF-real5'	GGGTAGGATTGACAGGATTGG	mNox4-real2-5'	CGATTCCGGGATTTGCTAC
mANF-real3'	CACACCACAAGGGCTTAGGA	mNox4-real2-3'	GACTCCTCAAATGGGCTTCC

mNkx2.5-real5'	CAAGTGCTCTCCTGCTTTCC	mPrrx1-real5'	CATCGTACCTCGTCTCTGCTC
mNkx2.5-real3'	GTCCAGCTCCACTGCCTTC	mPrrx1-real2-3'	CAATGCTGTTGGCCATGTT
mNotch1-real3'	GATCAGTGGAGTTGTGCCATC	mRgs4-real2-3'	TTCAGCCCATTTCTTGACTTCT
mNotch1-real5'	CCGTTACATGCAGCAGTTTCT	mPrrx1-real2-5'	AACCCATCGTACCTCGTCTCT
huclik3 (hHey1)	TGAGCTGAGAAGGCTGGTAC	mGbx2-real5'	AGACGGCAAAGCCTTCTTG
clikseq5 (hHey1)	ACCCCAAACCTCCGATAGTCC	mGbx2-real3'	GCCTTGACACGTTTCCACTT
mHey2-real-e3for	TGAGAAGACTAGTGCCAACAGC	mCoup-TF2-real5'	AGTACTGCCGCCTCAAAAAG
mHey2-real-e5rev	TGGGCATCAAAGTAGCCTTTA	mCoup-TF2-real3'	CAGGTACGAGTGGCAGTTGA
mZic2-real5'	GCACGTGCGGCGGCCGGAACA	mFzd5-real5'	GAAGGAAGAGAAGGCGAGTGA
mZic2-real3'	GCGCCGGTCACAGCCCTCGAACTCA	mFzd5-real3'	AGCACTCAGTTCCACACCAGA
mLefty2-real5'	ACGCCGGACGGCAAGGGGCAG	mGfra2-real5'	TGTGAACATGTCTCCCAAAGG
mLefty2-real3'	CGAGGCCCCAGAAATGGCCACCCGA	mGfra2-real3'	TGGGCTGATATTTGTCGTGAG
mJag1-real2-5'	CTCGTTAGTAAACGGGATGGAA	mCpeb1-real5'	AGTCACCGCTGCTTTTGTG
mJag1-real2-3'	CTCAGCAGAGGAACCAGGAA	mCpeb1-real3'	GTAGGCCTTCCATGCTGTGT
mDtna-real5'	CAGCCTGAAAAGCCACTCAA	mDub1-real5'	CTCTTCCTTCCCAGAAGCAG
mDtna-real3'	GGACTTCCTGAGGAGGGAAC	mDub1-real3'	CAGCTAGAGGTGGTGTGTGTGT
mId2-real5'	GGACATCAGCATCCTGTCTCT	mEif1a-real5'	ACACCTTCCGGAGAACCAG
mId2-real3'	CTCCTGGTGAATGGCTGAT	mEif1a-real3'	CTCTTAGGATGGGTGGCAGA
mHes1-real2-5'	GCGGAAGGGCAAGAATAAA	mPmaip1-real5'	GTGCACCGGACATAAAGTGTG
mHes1-real2-3'	CGCGGTATTTCCCCAACAA	mPmaip1-real3'	TCCTGGGAGGTCCCTTCTT
mSema3e-real5'	CGTTGGACAGGACTGAAGAGA	mPlcb4-real5'	GAAAATAGCAAGGCCATCAGTC
mSema3e-real3'	GAGGAAGAGCAAGCCCAAG	mPlcb4-real3'	CATCGCCAGTCTCTTTCTTTCT
mKrt7-real5'	ATCGCAGAGGCTGAGGAAC	mFgf1-real5'	CTACCACCGCTGCTTGCT
mKrt7-real3'	CCATTCCGTCTCCAGACAAC	mFgf1-real3'	CCGGTCTCCGTACCCTTTAT
mLefty1-real5'	GGCTCTGCTGGGCACTCTGGGCACT		
mLefty1-real3'	GACACCAGGAACCTGCCTGCCACCTCTC		
MHC-alpha-3'	CGCGAATTTCGACAGATCGAACGTTTATGTTT		
MHC-alpha-5'	CGCGGATCCACGACGAGGAATAACC		

5.5. Puffer

PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄
TE	10 mM Tris-Cl pH 8,0, 1 mM EDTA
10x PCR-Puffer	100 mM Tris-Cl pH 8,85, 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 1 % TritonX-100, 0,3 mg/ml acetyliertes BSA
20x SB-Puffer	200 mM Natriumhydroxid, mit Borsäure auf pH 8 einstellen
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Ac pH 7,5 - 8, 50 mM EDTA
DNA-Ladepuffer	50 % Glycerin, 15 % Ficoll, 10 mM EDTA pH 8, 0,25 % Bromphenolblau
2x Protein-Ladepuffer	0,1 M Tris-Cl pH 6,8, 4 % SDS, 0,25 % Bromphenolblau, 25 % Glycerin, 200 mM DTT
RIPA-Puffer	50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0,5 % Deoxycholat, 0,1 % SDS
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1 % SDS
Western-Blot-Puffer	25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % Methanol

Chemilumineszenz-Lösung (ECL): 100 mM, Tris-Cl pH 8,0, 250 mM Luminol,
90 mM Cumarinsäure, 0,03 % H₂O₂ (35 %)

Puffer für Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP):

Lysepuffer	5 mM PIPES pH 8,0, 85 mM KCl, 0,5 % NP-40
Nuklei-Lysepuffer	50 mM Tris pH 8,1, 10 mM EDTA, 1 % SDS
ChIP-Verdünnungspuffer	16,7 mM Tris-Cl pH 8,2, 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA, 1,1 % TritonX-100, 0,01 % SDS
Blockpuffer	ChIP-Verdünnungspuffer mit 1 mg/ml BSA, 0,1 mg/ml ssDNA
Niedrigsalzpuffer	10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % TritonX-100, 0,1 % SDS
Hochsalzpuffer	10 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % TritonX-100, 0,1 % SDS
LiCl-Puffer	10 mM Tris pH 8,0, 0,25 M LiCl, 1 mM EDTA, 0,5 % Nonidet P-40, 0,5 % Deoxycholat
Elutionspuffer	50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, 1 % SDS

zusätzliche Puffer für CHIP-PET:

FA Zellysepuffer	50 mM HEPES-KOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % TritonX-100, 0,1 % Deoxycholat, 0,1 % SDS <i>oder</i> 1 % SDS
Waschpuffer 2	50 mM HEPES-KOH pH 7,5, 350 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % TritonX-100, 0,1 % Deoxycholat, 0,1 % SDS
LiCl-Waschpuffer	10 mM Tris-Cl pH 8,0, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0,5 % Nonidet P-40, 0,5 % SDS

5.6. Antikörper

αFlag-M2	aus Maus	Sigma-Aldrich, #F3165
αFlag	aus Kaninchen	Cell Signalling, #2368
αHA (F-7)	aus Maus	Santa Cruz, #sc-7392
IgG	aus Kaninchen	Sigma-Aldrich, #I5006
αMaus-POD	aus Ziege	Chemicon, #AP124P
αKaninchen-POD	aus Ziege	BioRad, #172-1019

6. Methoden

6.1. RNA-Extraktion

Für eine RNA-Extraktion wurden Zellen auf einer 6 well-Platte ausgesät. Am Tag der Ernte wurde das Zellkulturmedium entfernt und sofort 1 ml Trifast (peqGOLD TriFast; Peqlab) zu den Zellen gegeben. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur wurden die lysierten Zellen resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert oder sofort für eine RNA-Extraktion weiterverarbeitet. Die Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop photometrisch bestimmt.

6.2. Microarray

Microarray Hybridisierungen und Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Susanne Kneitz, IZKF Labor für Microarray Anwendungen, Institut für Virologie in Würzburg durchgeführt. Für humane Proben wurde der Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) verwendet und für murine Proben der Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix).

6.3. Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA wurden 2 µg Gesamt-RNA mit dem Revert Aid First-Strand cDNA synthesis Kit (MBI Fermentas) und Oligo(dT)-Primer gemäß den Angaben des Herstellers revers transkribiert und anschließend mit H₂O 1:10 verdünnt. Die cDNAs wurden bei -20°C aufbewahrt.

6.4. Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Relative Expressionslevel verschiedener Gene wurden mit qRT-PCR bestimmt. Die Messung beruht auf der Zunahme der Fluoreszenz von SybrGreen, einem Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und dabei seine Fluoreszenz stark erhöht.

qRT-PCR Ansatz (25 µl)	17,55 µl	H ₂ O
	2,5 µl	10x PCR-Puffer
	0,25 µl	dNTPs [100 mM]
	0,25 µl	FITC (Biorad) [1:2.000 in H ₂ O/0,45 % DMSO]
	0,75 µl	Sybr Green (Cambrex) [1:2.000 in H ₂ O/0,45 % DMSO]
	0,2 µl	His-Taq [15 U/µl]

0,75 µl	5'-Primer [10 pmol]
0,75 µl	3'-Primer [10 pmol]
2 µl	cDNA

Für die Amplifikation GC-reicher Sequenzen wurde dem PCR-Ansatz 8,3 µl 3 M Betain-Monohydrat oder 1,5 µl Ethlenglycol zugegeben.

qRT-PCR-Programm	1. 95°C	3 Minuten
	2. 95°C	15 Sekunden
	3. 60°C	20 Sekunden
		40 Wiederholungen der Schritte 2. bis 3.
	4. 55-95°C	Schmelzkurve (alle 10 Sekunden +1°C)
5. 16°C	Programmende	

Zusätzlich zur Schmelzkurve, die während Schritt 4 erstellt wurde, wurden alle PCR-Produkte im Agarosegel analysiert. Eventuell gebildete Primere-Dimere wurden so festgestellt und von der Auswertung ausgeschlossen, da die Fluoreszenz der Primer-Dimere die gemessenen Expressionslevel der untersuchten Gene verfälscht. Um die Expression eines Gens in verschiedenen Ansätzen eines Experiments zu ermitteln, wurden Konzentrationsunterschiede in der eingesetzten cDNA durch Normierung auf ein Haushaltsgen wie beispielsweise HPRT ausgeglichen. Nach Möglichkeit wurden die Primer über Exon-Intron-Grenzen gelegt, um eine falsche Bestimmung des Expressionslevels durch Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen.

6.5. DNA-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von kurzen DNA-Fragmenten von bis zu 600 bp wurden 1 % Agarose-Gele mit SB-Puffer und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt. Die Elektrophorese erfolgte bei 300 V für 15 Minuten in SB-Puffer. Größere Fragmente bis 20 kb wurden mit 1 % Agarose-Gelen in TAE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Hier erfolgte die Auftrennung bei 100 V für 30 - 60 Minuten in TAE-Puffer. Die Gele wurden unter UV-Licht fotografiert.

6.6. Zellkultur

HEK293 Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert, embryonale Stammzellen (ES-Zellen) in

DMEM mit 10 % FCS, 1 % MEM-NEAA, 0,1 mM β -Mercaptoethanol, 1 % Penicillin/Streptomycin (PAN, Biotech) und 1.000 U/ml LIF. Zellkulturschalen für ES-Zellen wurden vor der Aussaat für mindestens 2 Stunden oder über Nacht mit 0,2 %iger Gelatine im Brutschrank beschichtet. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 0,25 %iger Trypsinlösung 1 - 3 Minuten inkubiert, mit FCS-haltigem Medium resuspendiert, bei 1.000 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert und auf frische Zellkulturschalen verteilt.

Für die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten wurde ES-Medium ohne LIF verwendet. An Tag 0 wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen auf eine unbeschichtete 10 cm-Petrischale ausgesät und für die folgenden 15 Tage auf einem rotierenden Schüttler bei 40-50 rpm im Brutschrank inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage, indem die sich bildenden Embryoid Bodies (EBs) in ein 15 ml-Röhrchen überführt wurden. Nach dem Absetzen wurden die EBs in frischem Medium resuspendiert und wieder auf eine Petrischale überführt. Ab dem 9. Tag der Differenzierung wurde dem Medium 0,4 mg/ml G418 zugesetzt, um auf α -MHC exprimierende Zellen zu selektionieren. Zwischen dem 9. und 11. Tag fingen die EBs an zu kontrahieren. Am 15. Tag wurden die EBs zweimal mit PBS gewaschen und mit 5 ml 0,25 %iger Trypsin-Lösung auf dem rotierenden Schüttler vereinzelt. Nach dem Abstoppen des Trypsin-Verdaus nach 10 Minuten mit FCS-haltigem Medium wurden $0,25 \cdot 10^6$ Zellen pro cm^2 Fläche auf Gelatine-beschichtete Zellkulturschalen in G418-haltigem Medium ausplattiert. Die Kardiomyozyten proliferieren noch ca. eine Woche und fangen nach zwei Wochen an abzusterben.

6.7. Generierung stabiler Zelllinien

6.7.1. Transfektion

Die Transfektion zur Generierung stabiler HEK293-Linien wurde mit Polyethylenimin (PEI) durchgeführt. Dazu wurde am Vortag der Transfektion eine 6-well-Platte mit 80-90 % konfluenten Zellen vorbereitet. Für den Transfektionsansatz A wurden 3 μg linearisiertes Plasmid in 100 μl DMEM verdünnt, für den Ansatz B wurden 6 μl PEI in 100 μl DMEM verdünnt (pro μg DNA 2 μl PEI). Nach Mischen beider Ansätze und 20minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz direkt auf die Zellen getropft. Nach 8 h erfolgte ein Mediumwechsel.

Embryonale Stammzellen wurden mit Metafecten Pro (Biontex) nach Herstellerangaben mit 0,8 μg pTol2-Plasmiden und 0,4 μg pKate-N/Tol2 in einer 12-well-Platte transfiziert.

6.7.2. Transduktion

Für eine Transduktion wurden zuerst lentivirale Viruspartikel in HEK293T-Zellen hergestellt. Dazu wurde eine Transfektion mit 3 µg CMV-VSVg, 4,5 µg psPax2 und 6 µg p199-iEP-Plasmid in einer 10 cm Schale wie oben beschrieben durchgeführt. Am folgenden Tag wurde dem Zellkulturmedium 10 mM Natriumbutyrat für 8 h zugegeben, um die Virusproduktion zu steigern. 48 h später wurde der Zellkulturüberstand mit den enthaltenen Viren abgenommen, sterilfiltriert und in 1-ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt oder direkt für eine Transduktion eingesetzt. Die Transduktion wurde in einer 12-well-Platte mit 80-90 % konfluenten Zellen und 1 ml Virus-Zellkulturüberstand mit 8 µg/ml Polybren durchgeführt. Nach 8 h erfolgte ein Mediumwechsel.

6.7.3. Selektion

Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion, bzw. Transduktion je nach Resistenzgen des Konstrukts mit 1 µg/ml Puromycin, 0,5 mg/ml G418 oder 0,2 mg/ml Zeocin für 1-3 Wochen selektioniert, bis eine nicht-transfizierte, bzw. nicht-transduzierte Kontrolle komplett abgestorben war. Wurden Zellen mit p199-iEP Viren transduziert, erfolgte die Selektion zusätzlich mit 1 µg/ml Doxyzyklin, da bei diesem Konstrukt das Resistenzgen unter der Kontrolle des Doxyzyklin-induzierbaren Promotor TRE steht. Nach erfolgreicher Selektion wurden kleine Zellkolonien gepickt und getrennt kultiviert, um monoklonale Linie zu erhalten.

6.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Zellen einer 6 well- oder 12 well-Platte wurden mit PBS gewaschen, abgekratzt und bei 3.000 rpm für 1 Minute bei 4°C pelletiert. Die Zellpellets wurden im doppelten Pelletvolumen mit 2x Protein-Ladepuffer aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden die Lysate für 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert.

Um die Proteinkonzentrationen bestimmen zu können, wurden die Zellen einer 6 well-Platte in 50 µl RIPA-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugieren bei maximaler Drehzahl in einer Mikrozentrifuge für 10 Minuten bei 4°C wurde vom Überstand 1 µl für eine Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen. Die Messung wurde mit Bradford-Reagenz (BioRad) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden anschließend mit 4x Protein-Ladepuffer versetzt und wie oben beschrieben denaturiert.

10-20 μl der Proteinlysate, bzw. 50-75 μg Proteinmenge wurden in die Taschen eines SDS-Polyacrylamidgels geladen. In eine freie Tasche wurden 5 μl Proteinmarker (PageRulerTM Prestained Protein Ladder, Fermentas) geladen. In der folgenden Tabelle ist die genaue Zusammensetzung eines 12 %igen SDS-Polyacrylamidgels aufgeführt (Tab. 1). Die Gele (ca. 50 cm^2) wurden bei 120 V und 50 mA für 1 - 2 h in SDS-Laufpuffer aufgetrennt.

Tab. 1. Zusammensetzung eines 12 % SDS-Polyacrylamidgels (Trenngel) und eines Sammelgels.

	Trenngel	Sammelgel
Rotiphorese 30	6 ml	1 ml
H ₂ O	3 ml	4 ml
1 M Tris, pH 8,8	5,6 ml	-
1 M Tris, pH 6,8	-	750 μl
20 % SDS	75 μl	30 μl
10 % APS	150 μl	75 μl
TEMED	6 μl	3 μl

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe einer semi-dry Elektroblokkammer (Biometra) in Western-Blot-Puffer auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der Transfer für 2 Proteingele mit einer Gesamtfläche von 100 cm^2 erfolgte bei 15 V und 400 mA für 40 Minuten bei 4°C.

Anschließend wurde die Membran kurz in PBS geschwenkt und mit 5 % Milchpulver/PBS für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt. Die Antikörper-Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 0,5 % Milchpulver/PBS. Die Antikörperverdünnungen sind in Tab. 2 zusammengefasst. Danach wurde der Blot 5 mal mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper α -Maus-POD oder α -Kaninchen-POD inkubiert. Nach erneutem 5 maligen Waschen wurde die Membran mit Chemilumineszenz-Lösung (ECL) entwickelt.

Tab. 2. Antikörper-Verdünnungen für Western Blot

α Flag-M2 (aus Maus)	1:5.000	1 h bei Raumtemperatur
α Flag (aus Kaninchen)	1:1.000	über Nacht bei 4°C
α Maus-POD	1:5.000	1 h bei Raumtemperatur
α Kaninchen-POD	1:5.000	1 h bei Raumtemperatur

6.9. Koimmunpräzipitation

Für eine Koimmunpräzipitation wurden HEK293T Zellen in einer 10 cm-Zellkulturschale transient mit pCS2p-Konstrukten transfiziert. Dafür wurde ein Transfektionsansatz mit 8 µg Plasmid-DNA und 16 µl PEI in jeweils 250 µl DMEM verdünnt und wie unter 6.7.1 beschrieben für eine Transfektion eingesetzt. Nach 48 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, von den Schalen geschabt und bei 3.000 rpm für 1 Minute bei 4°C pelletiert. Die Zellpellets wurden in 1 ml RIPA-Puffer wie in 6.8 beschrieben lysiert und abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 20 µl als Input-Proben entnommen und mit 6,7 µl 4x Proteinladepuffer versetzt, denaturiert und bei -20°C aufgehoben. Das restliche Lysat wurde auf zwei 1,5 ml Gefäße aufgeteilt und mit 1 µg Antikörper (α Flag-M2 oder α HA) versetzt. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Am folgenden Tag wurden 50 µl Protein-G Agarose Beads zugegeben. Die Lysate wurden nochmals für 1 h rotierend bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Agarose Beads bei 5.000 rpm für 1 Minute bei 4°C abzentrifugiert und in 1 ml kaltem RIPA-Puffer aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal wiederholt. Nach dem Abnehmen des Puffers nach dem letzten Waschschrift wurden 40 µl 2x Proteinladepuffer ohne DTT zu den Agarose Beads gegeben. Nach kurzem vortexen wurde das Gemisch für 5 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Beads für 1 Minute bei maximaler Drehzahl abzentrifugiert, der Überstand entnommen und mit DTT versetzt. Diese Eluate wurden zusammen mit den Input-Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

6.10. Immunfluoreszenz

Am Tag vor der Transfektion mit PEI wurde eine 24 well-Platte mit 10 mm Deckgläschen und 0,5 ml 0,2 % Gelatine für 2 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Gelatinelösung abgenommen und HEK293 Zellen ausgesät. Die Transfektion erfolgte am nächsten Tag, wie unter 6.7.1 beschrieben, mit 600 ng DNA pro well mit einem Expressionsplasmid (pCS2p basierend) und pBS-KS im Verhältnis 1:5.

24 h nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium entfernt. Alle folgenden Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden direkt im well in 4 % PFA/PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde 3-mal mit PBS gewaschen. Es folgte die Permeabilisierung mit 0,1 % TritonX-100/PBS für 5 Minuten. Die Zellen wurden mit 10 % BSA/PBS für 30 Minuten geblockt. Der Primärantikörper α Flag-M2 wurde 1:800 in PBS verdünnt und für eine Stunde auf den Zellen

inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS. Der Cy3-gekoppelte α -Maus Antikörper wurde 1:5.000 in PBS verdünnt und ebenfalls eine Stunde inkubiert. Nach drei Waschschrten mit PBS erfolgte eine 1minütige Inkubation in 0,1 % Hoechst/PBS. Nach erneutem 3-maligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit Mowiol eingebettet und über Nacht bei 4°C getrocknet.

Für eine Färbung mit dem α Flag Antikörper aus Kaninchen wurden die Zellen wie beschrieben fixiert. Permeabilisierung und Blocken erfolgte in einem Schritt mit 5 % Ziegenserum, 0,3 % TritonX-100/PBS für 1 h. Der Primärantikörper wurde 1:800 in 1 % BSA, 0,3 % TritonX-100/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Alexa488-gekoppelte α -Kaninchen Antikörper wurde 1:2.000 in 1 % BSA, 0,3 % TritonX-100/PBS verdünnt und für eine Stunde inkubiert. Alle Waschschrte und die Hoechst-Färbung wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Aufnahmen der Fluoreszenzfärbungen wurden mit einem Leica-Mikroskop erstellt.

6.11. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Für eine ChIP wurden HEK293- bzw. ES-Zellen auf 10 cm Schalen ohne, bzw. mit 50 ng/ml Doxzyklin in 10 ml Medium für 48 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde eine Schale ausgesät, um die Zellzahl am Tag der Ernte zu bestimmen. Man erhält typischerweise eine Zellzahl von $2 \cdot 10^7$ Zellen pro 10 cm Schale bei ca. 80 % Konfluenz.

Alle verwendeten Lysepuffer und Waschpuffer wurden kurz vor Verwendung mit 50 μ g/ml PMSF und mit 1x Complete Protease-Inhibitor (Roche) versetzt.

Die für eine Immunpräzipitation verwendeten Protein G Agarose Beads (60 μ l pro Ansatz; Thermo Fischer) wurden zur Vorbereitung zuerst mit ChIP-Verdünnungspuffer gewaschen und anschließend mit Blockpuffer für 4 Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Nach Abzentrifugieren bei 1.000 rpm bei 4°C für 2 Minuten wurde eine 1:1 Mischung (Beads:Puffer) mit Blockpuffer hergestellt.

Die Fixierung der Protein-DNA- und Protein-Protein-Interaktionen wurde mit frisch angesetztm PFA durchgeführt. In 4,8 ml Wasser mit 35 μ l 1 M NaOH wurden 0,925 g Paraformaldehyd eingewogen und bei 70°C inkubiert und gevortext, bis das PFA vollständig gelöst war. Von dieser 18,5 %igen PFA-Lösung wurden 540 μ l direkt in das Zellkulturmedium einer 10 cm-Schale pipettiert. Die Zellkulturschalen wurden für 10 Minuten langsam schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Fixierung abzustoppen

wurden 0,5 ml 2,5 M Glycin zugegeben und für 5 Minuten langsam schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellschalen auf Eis gehalten und 3-mal mit 5 ml kaltem PBS/PMSF gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml PBS/PMSF abgeschabt und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die Zellschalen wurden 2-mal mit 5 ml PBS/PMSF gewaschen. Die gesammelten Zellen wurden bei 1.200 rpm für 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert.

Die Zellpellets wurden in PBS/PMSF resuspendiert und in je $5 \cdot 10^6$ Zellen aliquotiert und erneut abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 10-fachem Pellet-Volumen Lysepuffer aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 2.800 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Nukleipellet wurde in 400 µl Nuklei-Lysepuffer resuspendiert und zum Sonifizieren in 15 ml-Röhrchen überführt. Während des Sonifizierens wurden die Röhrchen in einem Eis/Wassergemisch gekühlt. Die lysierten Nuklei wurden mit 4x 10-Sekunden-Pulsen bei 10 % Amplitude und 30 Sekunden langen Pausen zwischen den Pulsen sonifiziert. Nach dem Sonifizieren wurden die Lysate bei 13.500 rpm für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert.

Von dem Überstand wurden 20 µl zur Überprüfung der Chromatin-Fragmentgröße für ein TAE-Agarosegel entnommen. Die restlichen 380 µl wurden 1:10 mit ChIP-Verdünnungspuffer verdünnt. Um unspezifische Bindungen des Chromatins an die Beads während der Immunpräzipitation zu verhindern, wurde das verdünnte Chromatin mit 20 µl geblockter Protein G Agarose für 45 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert und anschließend bei 3.000 rpm für 2 Minuten bei 4°C abzentrifugiert („preclear“). Von jeder Probe wurden 20 µl entnommen und als „Input“ bei 4°C aufbewahrt. Der Überstand wurde auf zwei 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit Antikörper versetzt. Pro 2 ml Chromatin wurden 4 µg αFlag- und IgG-Antikörper eingesetzt. Die Lysate wurden mit dem Antikörper über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 40 µl geblockte Protein G Agarose-Beads in jedes 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und für eine Stunde bei 4°C rotierend inkubiert. Die Beads-Antikörper-Chromatin Komplexe wurden bei 3.000 rpm abzentrifugiert, in 1 ml Niedrigsalzpuffer resuspendiert und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde die Agarose zweimal in Niedrigsalzpuffer, einmal in Hochsalzpuffer und 4-mal mit LiCl-Waschpuffer gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurde die Agarose für 5 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert und bei 3.000 rpm abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Agarose mit 120 µl Elutionspuffer versetzt und im Thermoschüttler für 15 Minuten

bei 1.000 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 13.500 rpm wurden 100 µl Elution in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Elution wurde mit 150 µl Elutionspuffer wiederholt. Das Eluat wurde mit 10 µl 5 M NaCl versetzt und mit Mineralöl überschichtet. Um die PFA-Fixierung aufzuheben wurden die Eluate im Thermoschüttler über Nacht bei 65°C bei 500 rpm inkubiert. Die Input-Proben wurden mit Elutionspuffer auf 250 µl aufgefüllt und wie die Eluate behandelt. Die Chromatin-Proben für ein DNA-Gel wurden mit 2 µl 5 M NaCl und 1 µl RNase [50 mg/ml] versetzt und ebenso wie die Eluate behandelt.

Am folgenden Tag wurden zu jeder Probe 2 µl Proteinase K [10 mg/ml] gegeben und erneut im Thermoschüttler für drei Stunden bei 55°C und 500 rpm inkubiert. Für die Aufreinigung des Chromatins wurden 240 µl der Probe unter dem Mineralöl entnommen und mit 120 µl Phenol (TE-gesättigt, pH 7,5 - 8,0) und 120 µl Chloroform versetzt. Die Ansätze wurden für 15 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei 13.500 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit dem PCR-Aufreinigungs-kit ExtractII von Macherey & Nagel aufgereinigt. Die DNA-Fragmente wurden von der Säule mit 50 µl Elutionspuffer des Kits eluiert. Für die anschließende qRT-PCR wurde 1 µl als Template pro Ansatz verwendet. Die Primer sind unter 5.4. zusammengefasst.

6.12. Chromatin-Immunpräzipitation für ChIP-PET Sequenzierung

Für die ChIP-PET wurden pro Ansatz $5 \cdot 10^8$ Zellen eingesetzt, das entspricht insgesamt zehn 15 cm-Schalen für HEK293 Zellen. Für die Induktion mit 50 ng/ml Doxyzyklin in 20 ml Medium wurden 5 Schalen für 48 Stunden inkubiert, die restlichen 5 Schalen wurden nicht induziert.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben fixiert und abgeschabt. Die verwendeten Volumina wurden auf die größeren Zellschalen angepasst. Die Zellpellets wurden nach der Zentrifugation in 12 ml FA Zellysepuffer (0,1 % SDS) resuspendiert und für 15 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 2.000 rpm für 10 Minuten bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut in 12 ml FA Zellysepuffer (0,1 % SDS) aufgenommen. Die Inkubation und die Zentrifugation wurden wiederholt. Das dabei entstandene Nuklei-Pellet wurde in 12 ml FA-Zellysepuffer (1 % SDS) aufgenommen und für 15 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert. Das Lysat wurde in einer Sorvall Bodenzentrifuge bei 20.000 rpm für 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit einer

Plastikimpföse in 3-5 Stücke gebrochen und mit 12 ml FA Zellysepuffer (0,1 % SDS) für 15 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert. Das Lysat wurde erneut bei 20.000 rpm für 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Der Waschschrift mit 12 ml FA Zellysepuffer (0,1% SDS) wurde wiederholt.

Das Pellet wurde für die Sonifizierung in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und pro 100 µl Nuklei-Pellet Volumen mit 1 ml FA Zellysepuffer (0,1 % SDS) versetzt. Es wurde bei 30 % Amplitude mit 12 10-Sekunden Pulsen und 1-minütigen Pausen auf einem Eis/Wasser-Gemisch sonifiziert. Anschließend wurde das sonifizierte Chromatin in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und in einer Mikrozentrifuge bei 14.000 rpm für 1 h bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in 550 µl aliquotiert. 100 µl des Chromatins wurden für die Überprüfung der Fragmentgröße mit einer DNA-Gelelektrophorese analysiert. 50 µl Chromatin wurden als Input-Proben bei 4°C aufbewahrt.

Die Protein G Agarose wurde vor der Immunpräzipitation mit dem Antikörper vorinkubiert. Zuerst wurde die Agarose dreimal mit 1 ml PBS/0,1 % TritonX-100 und Zentrifugationen bei 5.000 rpm für 1 Minute gewaschen. Das Chromatin wurde mit 45 µl gewaschenen Protein G Agarose Beads 2 h bei 4°C rotierend inkubiert, um unspezifisch bindendes Chromatin zu entfernen. Während dieser Inkubation wurden 400 µl PBS/0,1 % TritonX-100 mit 10 µg Antikörper zu je 45 µl Protein G Agarose gegeben. Die Agarose wurde mit dem Antikörper ebenfalls für 2 Stunden rotierend bei 4°C inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper wurde anschließend in 3 Waschschriften mit je 1 ml PBS/0,1 % TritonX-100 entfernt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit 550 µl Chromatin und 45 µl antikörperbeladenen Agarose Beads rotierend über Nacht bei 4°C.

Die Agarose Beads wurden am folgenden Tag 3 mal mit je 1 ml FA-Zellysepuffer (0,1% SDS) gewaschen, 1 mal mit 1 ml Waschpuffer 2, 1 mal mit 1 ml LiCl-Waschpuffer und 1 mal mit TE. Anschließend wurden die Chromatin-Antikörper-Komplexe mit 270 µl Elutionspuffer für 30 Minuten bei 68°C und 1.000 rpm im Thermomixer von den Beads eluiert. Nach einer Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute wurde der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt, mit 230 µl TE verdünnt und mit 40 µl Proteinase K [10 mg/ml] versetzt. Die Eluate wurden bei 42°C für 2 h bei 400 rpm verdaut und anschließend bei 68°C über Nacht im Thermomixer inkubiert. Mit den Input-Proben und den Proben für die DNA-Gelelektrophorese wurde ebenso verfahren. Am folgenden Tag erfolgte eine Extraktion mit Phenol (TE-gesättigt, pH 7,5 - 8,0) und Chloroform mit anschließender EtOH-Fällung. Die DNA Pellets wurden in 100 µl dH₂O resuspendiert. Die DNA wurde anschließend mit 1 µl

pro Ansatz durch qRT-PCR analysiert. Die DNA-Konzentrationen in den ChIP-Eluaten wurde mit Hilfe des PicoGreen Kits (Invitrogen) bestimmt.

6.13. DNA Quantifizierung mit PicoGreen[®]

Das Kit Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Reagent (Invitrogen) enthält den ultrasensitiven Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen[®], der spezifisch dsDNA unabhängig von geringen Verunreinigungen, wie z.B. ssDNA, RNA, Salzen, Proteinen oder Chloroform, anfärbt. Mit einem Fluoreszenz-Mikroplattenmessgerät lassen sich damit geringe dsDNA-Konzentrationen bis zu 250 pg/ml messen.

Zuerst wurde der PicoGreen[®] Farbstoff im Dunkeln bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend 1:200 in TE verdünnt (pro Probe wurden 50 µl TE-Verdünnung benötigt). Für eine Standard-Verdünnungsreihe wurde λ-DNA in 50 µl Aliquots verdünnt. Hier wurde eine Startkonzentration von 0,1 ng/µl gewählt, die für die Verdünnungsreihe jeweils 1:1 mit TE verdünnt wurde. Die zu messende DNA-Probe wurde 1:10 - 1:50 ebenfalls in 50 µl TE verdünnt. Anschließend wurden die DNA-Proben mit den Farbstoffverdünnungen 1:1 gemischt und in einer schwarzen 96-well Platte in einem Tecan Fluorescence Plate Reader (Lehrstuhl für Mikrobiologie) in 10-facher Wiederholung für je eine Zeitdauer von 40 µs gemessen (Anregung 485 nm, Emission 525 nm).

7. Ergebnisse

7.1. Identifizierung neuer Hey Zielgene in HEK293 Zellen

Um neue Zielgene der Hey Proteine zu finden, wurden als Zellkultursystem stabile HEK293 Zellen generiert, die Doxyzyklin-induzierbar Hey1, bzw. Hey2 überexprimieren. Nach Überexpression sollte eine Genexpressionsanalyse mit Hilfe von Micorarrays durchgeführt werden. Anschließend sollten diese Zelllinien genutzt werden, um direkte DNA-Bindungsstellen der Hey Proteine mit Hilfe von ChIP-Experimenten zu überprüfen.

7.1.1. Etablierung von Doxyzyklin-induzierbaren Zelllinien

HEK293-Zellen wurden zuerst mit dem Plasmid pWHE134 transfiziert, das mit PvuII linearisiert wurde. Nach Selektion mit G418 wurde diese Mischkultur mit lentiviralen p199-iEP Konstrukten transduziert, die die Flag-markierten Sequenzen von hHEY1, bzw. mHEY2 unter der Kontrolle des Tetrazyklin abhängigen Promotor TRE enthalten. Nach anschließender Selektion mit Puromycin wurden je einzelne Zellklone gepickt und getrennt weitergezogen. Diese stabilen monoklonalen Zelllinien werden im Folgenden mit 293-Hey1, bzw. 293-Hey2 bezeichnet. Nach Zugabe von Doxyzyklin, einem Tetrazyklin-Analogen, exprimieren diese Zelllinien Flag-markiertes Hey1, bzw. Hey2 Protein.

Die Stärke der Hey Expression ist abhängig von der Menge des zugegebenen Doxyzyklins. Auf RNA-Ebene ist ein deutlicher Anstieg von HEY1-Transkript mit zunehmender Doxyzyklin-Konzentration im Zellkulturmedium zu sehen (Abb. 3, A). Eine starke Überexpression ist mit 2 µg/ml erreicht. Gleichzeitig ist mit zunehmender HEY1-mRNA eine Herunterregulation des endogenen HEY1 zu erkennen.

Wird dem Zellkulturmedium kein Doxyzyklin zugegeben, ist kein Protein mit Western Blot Analyse detektierbar (Abb. 3, B). Bei einer Induktion mit 50 ng/ml für 72 h ist Hey1 Protein als schwache Proteinbande zu sehen, im Gegensatz zu einer Induktion mit 2 µg/ml Doxyzyklin für 72 h, bei der eine starke Überexpression erzielt wurde. Die induzierbare Überexpression von Hey2 verhält sich ähnlich.

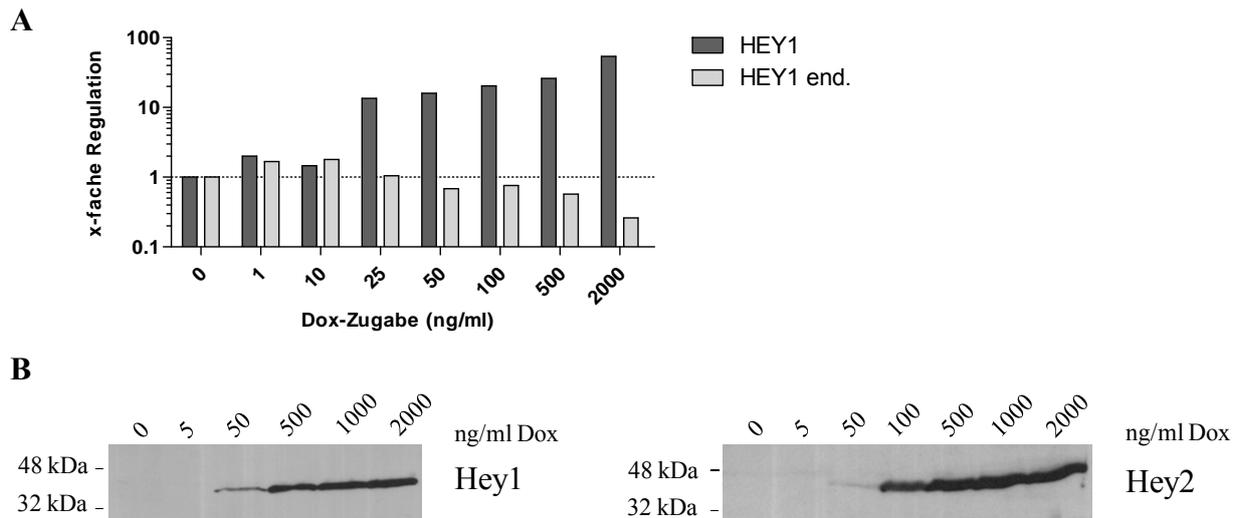


Abb. 3. Induktion der Zelllinien 293-Hey1 und 293-Hey2 mit Doxyzyklin. A: qRT-PCR der HEY1 mRNA in 293-Hey1 Zellen nach einer Inkubation von 72h mit verschiedenen Doxyzyklin-Konzentrationen. HEY1: Amplifikation der gesamten HEY1 mRNA, HEY1 end.: nur Amplifikation des endogenen HEY1. **B:** Western Blot-Analyse mit α Flag-Antikörper von 293-Hey1 und -Hey2 Zellen mit verschiedenen Doxyzyklin-Konzentrationen induziert nach 72 h.

In nachfolgenden Versuchen wurde die Hey Expression für eine schwache Überexpression mit 50 ng/ml Doxyzyklin induziert (entspricht einer ca. 10-fachen Induktion im Vergleich zu endogenen Hey1), für eine starke Überexpression mit 1 - 2 μ g/ml (ca. 50 - 100-fache Induktion).

7.1.2. Expressionsanalyse nach Hey-Überexpression mittels Microarray-Analysen

Die RNA aus induzierten und nicht-induzierten stabilen 293-Hey1 und -Hey2 Zellen wurde extrahiert und mit Hilfe einer Microarray-Analyse auf Expressionsunterschiede untersucht.

293-Hey1 Zellen wurden mit 1 μ g/ml Doxyzyklin für 48 h induziert. Die Anzahl der Transkripte, die stärker als 2-fach reguliert sind, ist sehr gering (Tab. 3). Nur die endogene HEY1 mRNA ist stärker als 2-fach herunterreguliert und kein Transkript war stärker als 2-fach hochreguliert. Unter den 21 Genen, die zwischen 2-fach und 1,5-fach herunterreguliert waren, fanden sich z.B. KLF10, BMP2 und FOXC1, die in Entwicklungsprozessen entscheidende Rollen spielen.

293-Hey2 Zellen wurden ebenfalls mit 1 μ g/ml Doxyzyklin über einen längeren Zeitraum (72 h) induziert, da bei den Hey1-Zellen festgestellt wurde, dass nach 72 h die Zielgene stärker herunterreguliert waren. Hier waren 95 Gene stärker als 2-fach herunterreguliert, und auch 15 Gene hochreguliert (Tab. 3). Auch bei den 293-Hey2 Zellen befanden sich unter den herunterregulierten Genen KLF10, BMP2 und FOXC1.

Tab. 3. Anzahl der im Microarray regulierten Gene nach Überexpression von Hey1, bzw. Hey2

	293-Hey1	293-Hey2
< -2	1	95
< -1,5	21	549
> 1,5	7	136
> 2	0	15

Es wurden insgesamt 18 Gene für eine Validierung mit qRT-PCR ausgewählt, die entweder in beiden oder nur in einer Zelllinie reguliert waren (Tab. 4). Die RNA aus 293-Hey1 und 293-Hey2 Zellen, die für 72 h mit 1 µg/ml Doxyzyklin induziert wurden, wurde extrahiert und in cDNA umgeschrieben, um sie anschließend mit qRT-PCR auf Expressionslevel zu analysieren. 11 Gene, die nach Hey1- und nach Hey2-Überexpression im Microarray herunterreguliert waren, konnten validiert werden (HEY1, HES1, SKIL, NFIB, DLX2, KLF10, PMAIP1, CDKN1B, SMAD9, BMP2, FOXC1) (Tab. 4). Dabei fiel auf, dass die Stärke der Herunterregulation für jedes Gen in beiden Zelllinien sehr ähnlich ist. 5 Gene waren nur nach Hey2-Überexpression im Microarray herunterreguliert. Mit qRT-PCR konnten aber bHLHB5, ZIC2, GAS1 und ZNF652 als Zielgene von beiden Hey Proteinen validiert werden. CCDC85B war nur in 293-Hey2 Zellen herunterreguliert.

Die beiden im Hey2-Microarray hochregulierten Gene BMP6 und MARK3 konnten weder in 293-Hey1, noch in 293-Hey2 Zellen mit qRT-PCR validiert werden. Vermutlich handelt es sich hier um falsch-positive Signale auf dem Microarray-Chip.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass eine Überexpression von Hey1 und Hey2 zu einer Herunterregulation ihrer Zielgene führt.

Tab. 4. Auswahl an regulierten Genen nach Hey1- bzw. Hey2 Überexpression und Validierung mit qRT-PCR

	Microarray		qRT-PCR	
	Hey1	Hey2	Hey1	Hey2
HEY1	-2,1	-5,6	-4,5	-4,8
HES1	-1,5	-3,8	-2,3	-2,2
SKIL	-1,8	- *	-2,3	-1,7
NFIB	-1,6	-2,2	-2,1	-1,8
DLX2	-1,6	-3,0	-2,7	-3,1
KLF10	-1,7	-2,9	-4,0	-3,4
PMAIP1	-1,6	-2,2	-2,6	-2,0
CDKN1B	-1,9	-1,6	-1,3	-2,4
SMAD9	-1,6	-2,6	-2,5	-2,3

BMP2	-1,5	-3,1	-2,9	-3,0
FOXC1	-1,7	-2,3	-2,1	-2,3
bHLHB5	-1,2	-3,4	-2,7	-4,4
ZIC2	-1,2	-3,2	-4,8	-7,4
GAS1	-1,4	-4,5	-3,8	-5,8
CCDC85B	1,1	-3,0	1,4	-3,3
ZNF652	1,6	-2,1	-2,1	-5,5
BMP6	1,3	2,3	-1,8	1,4
MARK3	1,0	11,8	-2,6	-1,6

* nicht im Microarray dabei

7.1.3. Untersuchung der direkten Bindung von Hey Proteinen an DNA (ChIP)

Da in den Microarray-Analysen (7.1.2) gezeigt wurde, dass Hey Proteine Repressoren sind und somit Einfluß auf die Transkription ausüben, wurde nun mit Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) untersucht, ob Hey Proteine direkt an Promotorbereiche ihrer Zielgene binden. Bei einer ChIP werden die Zellen mit PFA fixiert, so dass mögliche Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und DNA und auch Bindungen zwischen Proteinen über eine kurze Distanz von 2 Å fixiert werden (Orlando et al., 1997; Zeng et al., 2006). Durch Sonifizierung wird das fixierte Chromatin in Bruchstücke von ca. 500 bp fragmentiert. Nun können mit einem spezifischen Antikörper gegen einen Transkriptionsfaktor die fixierten Protein-DNA-Komplexe in einer Immunpräzipitation angereichert werden. Nach anschließender Elution und Aufreinigung der DNA kann diese als Template in einer qRT-PCR eingesetzt werden, um die Anreicherung quantitativ zu bestimmen.

Für eine ChIP mit Flag-markierten Hey Proteinen wurden die Promotoren von BMP2, FOXC1, KLF10 und HEY1 ausgewählt, da diese Gene mindestens eine 2-fache Repression nach Überexpression von Hey1, bzw. Hey2 gezeigt haben (Tab. 4). Um putative Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle (TFBS) im Promotor einzugrenzen, wurden zuerst Vergleiche zwischen murinen und humanen Sequenzen mit Hilfe des Vista-Programmes (Frazer et al., 2004) erstellt, um konservierte Bereiche zu finden (Abb. 4). Es wurde angenommen, dass eine TFBS am ehesten in konservierten Promotorbereichen liegt.

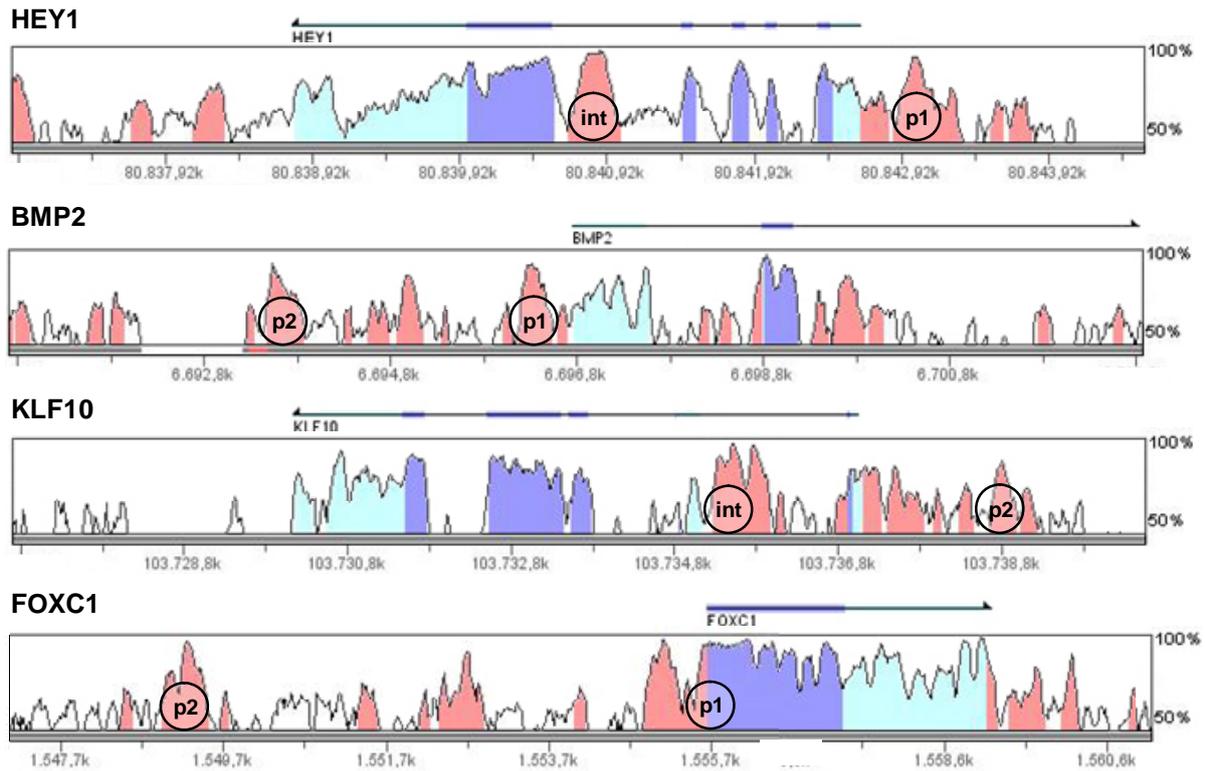


Abb. 4. Konservierte Bereiche zwischen murinen und humanen genomischen Sequenzen. Gene sind als Pfeil über dem Alignment angegeben, über 75 % konservierte Bereiche sind farbig: Exons dunkelblau, UTRs hellblau, nicht-kodierende Bereiche rot. Die Bezeichnungen p1, p2 und int beziehen sich auf für die PCR ausgewählten Bereiche (p: Promotor; int: Intron). Das Alignment wurde mit Vista erstellt (<http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2>).

Für jedes Zielgen wurden zwei genomische Bereiche in konservierten Regionen ausgewählt. Ein Bereich liegt direkt im proximalen Promotorbereich vor dem Transkriptionsstart (TSS) (-500 bis +50 bp), ein anderer Bereich liegt in 5'-Richtung (-6,5 bis -1,4 kb) oder im Intron (Abb. 4).

293-Hey1 Zellen wurden für eine ChIP mit 50 ng/ml Doxyzyklin induziert, um mögliche unspezifische und unphysiologische Nebeneffekte einer starken Überexpression zu verhindern. Durch Sonifizierung des PFA-fixierten Chromatins wurden Chromatin-Fragmente von ca. 250-800 bp gebildet (Abb. 5, A). Mit α Flag-Antikörper gegen das Flag-Epitop konnten in einer ChIP aus induzierten Zellen starke Anreicherungen für Promotorregionen von HEY1, BMP2, FOXC1 und KLF10 erzielt werden (Abb. 5, B). Für Kontrollregionen weiter weg vom Transkriptionsstart (BMP2, FOXC1, KLF10) oder intronische Regionen (HEY1) konnte mit qRT-PCR keine Anreicherung festgestellt werden. Darüberhinaus wurden in einer ChIP mit unspezifischem IgG-Antikörper ebenfalls keine Anreicherung für alle getesteten Regionen detektiert.

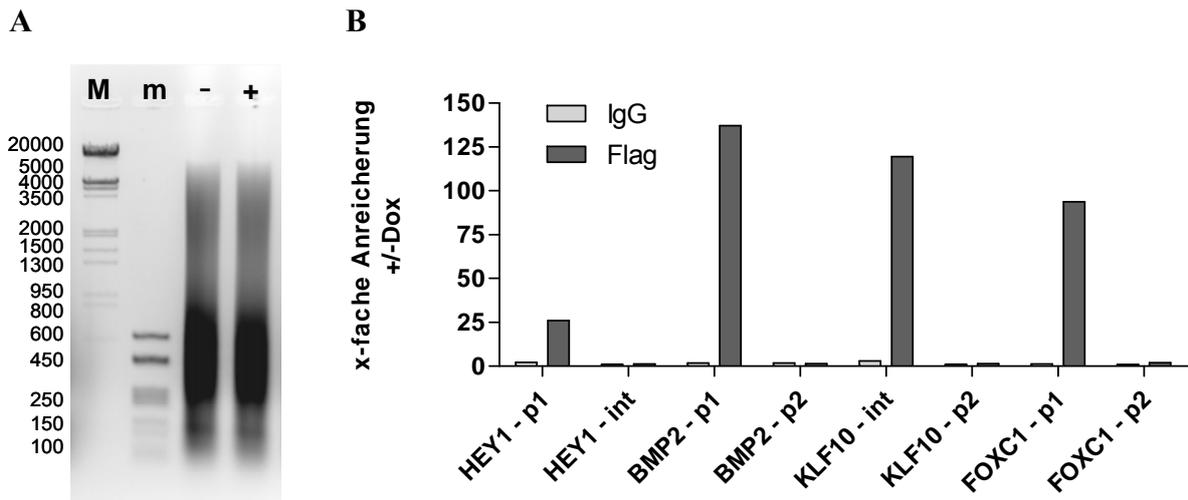


Abb. 5 Hey1-ChIP. A: Sonifiziertes Chromatin von nicht-induzierten Zellen (-) und induzierten Zellen (+). Marker M: lambda DNA/EcoRI, HindIII; Marker m: pBS-KS/HaeIII, die Größenangaben des Markers in bp sind ungefähre Größen. **B)** qRT-PCR einer Hey1-ChIP mit α Flag-Antikörper und unspezifischen IgG-Antikörper als Negativkontrolle. Gezeigt ist die Anreicherung der IPs von Doxyzyklin-induzierten Zellen gegenüber nicht-induzierter Zellen. Die Bezeichnungen p1, p2 und int beziehen sich auf die Positionen im Genom (siehe Abb. 4).

Eine ChIP mit 293-Hey2 Zellen ergab ebenfalls eine Anreicherung in den Promotorregionen der Gene HEY1, BMP2, KLF10 und FOXC1 (Daten nicht gezeigt).

7.2. Analyse von Hey1 Mutanten

7.2.1. Etablierung und Charakterisierung der Hey1 Mutanten

Um die Bedeutung der basischen Domäne für die DNA-Bindung und die Repression der Zielgene zu untersuchen, wurden Hey1 Mutanten hergestellt, die in dieser Domäne verändert waren.

Für die Mutagenese wurde die hHEY1-Sequenz des menschlichen cDNA Klonen BA41903 als Grundlage benutzt. Für die Mutante Hey1- Δ basic wurde die gesamte basische Domäne deletiert, bei der Mutante Hey1-RK₃ wurden drei Aminosäureaustausche (Arginin zu Lysin) in der basischen Domäne eingefügt (Abb. 6). Diese mutierten Arginin-Aminosäuren sind vermutlich im Vergleich zu anderen bHLH-DNA-Komplexen in der DNA-Bindung involviert (Voronova et al., 1990; Shimizu et al., 1997). Es wurde darauf geachtet, dass die Helix-Loop-Helix Struktur durch die eingefügten Mutationen nicht gestört wurde, bzw. dass der basische Charakter der Domäne erhalten blieb. Anschließend wurden die mutierten Sequenzen in pCS2pFlag und p199Flag-iEP Vektoren umkloniert.

hHEY1	ATTTTGGCCAGAAAAAGACGGAGAGGAATAATTGAGAAGCGCCGACGAGACCGGATCAAT
hHEY1-RK ₃	ATTTTGGCCAAAAAAGACGGAAAAGGAATAATTGAGAAGCGCCGAAAAAGACCGGATCAAT
hHEY1-Δbasic	ATTTTGGCC-----GATCGGATCAAT
	***** ** *****
hHey1	I L A R K R R R G I I E K R R R D R I N
hHey1-RK ₃	I L A K K R R K G I I E K R R K D R I N
hHey1-Δbasic	I L A - - - - - - - - - - D R I N

Abb. 6. Ausschnitt aus der hHEY1-Sequenz und den Sequenzen der Mutanten hHEY1-RK₃ und hHEY1-Δbasic. Oben ist die DNA-Sequenz, unten die Aminosäuresequenz dargestellt. Die Mutationen sind grau unterlegt, die Deletionen mit - gekennzeichnet, übereinstimmende DNA-Basen mit *. Das Alignment wurde mittels ClustalW erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Um die korrekte Expression der Konstrukte zu überprüfen, wurden HEK293T Zellen mit pCS2pFlag-Plasmiden transient transfiziert. Mittels Immunfluoreszenz wurde die intrazelluläre Lokalisation der Hey1-Mutanten im Vergleich zu Hey1 in den transfizierten Zellen überprüft (Abb. 7, A). Hey1 ist in den Zellkernen lokalisiert, ebenso wie die Hey1-RK₃-Mutante. Hey1-Δbasic zeigt hingegen eine Lokalisation in der gesamten Zelle. Eine Western Blot-Analyse der transient transfizierten Zellen zeigt die Proteinexpression der verwendeten Konstrukte (Abb. 7, B).

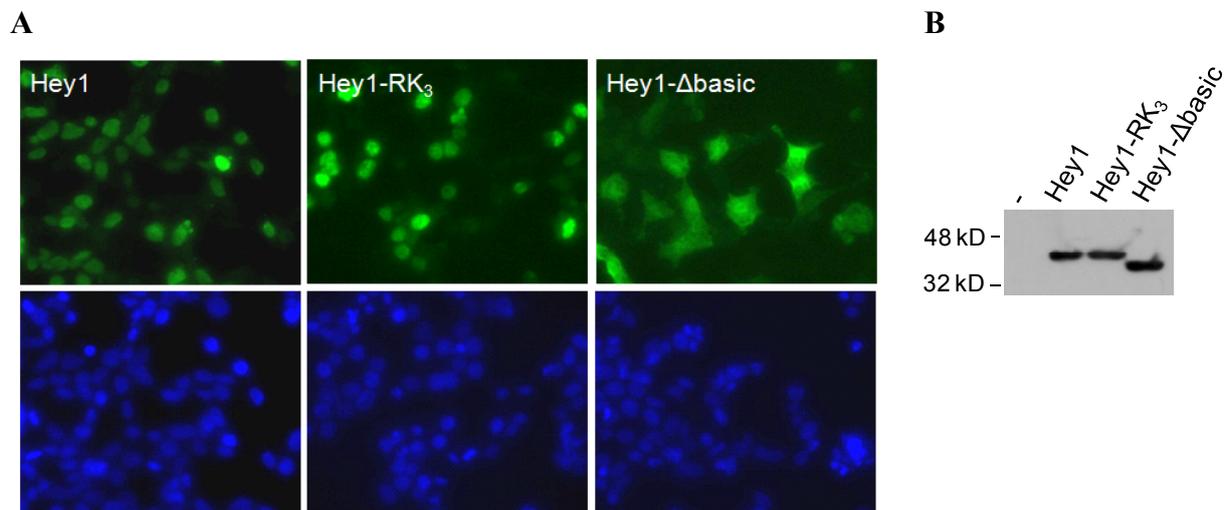


Abb. 7. Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mit Hey1 und den Mutanten Hey1-RK₃ und Hey1-Δbasic in pCS2pFlag-Vektoren. **A:** Immunfluoreszenz mit αFlag-Antikörper und αKaninchen-Alexa488 (oben) und DNA-Färbung mit Hoechst (unten). 100x Vergrößerung. **B:** Western Blot-Analyse mit αFlag-Antikörper. Negativkontrolle (-) Leervektor pCS2pFlag.

Um nun zu testen, ob die mutierten Domänen die Dimerisierung der Hey Proteine beeinträchtigen, wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt (Abb. 8). HEK293T Zellen wurden transient mit Flag-markierten mutierten und HA-markierten Wildtyp-Hey Expressionsplasmiden transfiziert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit αFlag-

Antikörper durchgeführt. Mittels Western Blot-Analyse mit α Flag- und α HA-Antikörper konnte gezeigt werden, dass Hey1-RK₃ und Hey1- Δ basic Homodimere mit Hey1 und Heterodimere mit Hey2 bilden können.

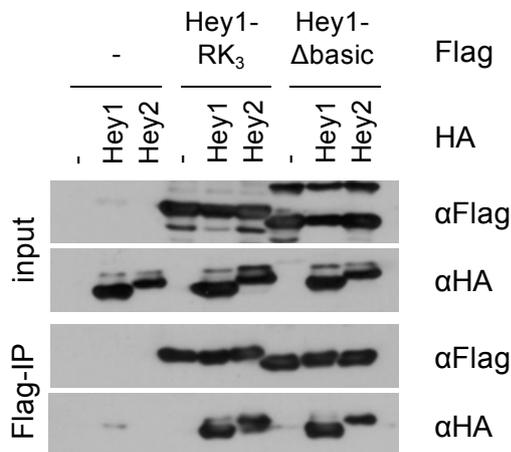


Abb. 8. Koimmunpräzipitation von Hey1-Mutanten und Wildtyp-Hey1 und -Hey2. HEK293T-Zellen wurden mit Flag-markierten mutierten und HA-markierten Wildtyp-HEY-Sequenzen in pCS2p-Plasmiden transfiziert. Die Immunpräzipitation wurde mit α Flag-Antikörper durchgeführt (α Flag-IP), die anschließende Western Blot-Analyse mit α Flag- und α HA-Antikörper. Als Negativkontrolle (-) wurden die Zellen mit pCS2pFlag, bzw. pCS2pHA Plasmiden ohne HEY Sequenzen transfiziert.

7.2.2. Zielgene von Hey1- Δ basic und Hey1-RK₃

Die mutierten und Flag-markierten hHEY1-Sequenzen wurden in lentivirale p199-iEP Konstrukte umklontiert und in 293-pWHE134 Zellen transduziert, um Doxyzyklin-induzierbare Zelllinien zu generieren. Die induzierbare Proteinexpression wurde mittels Western Blot-Analyse bestätigt (Abb. 9).

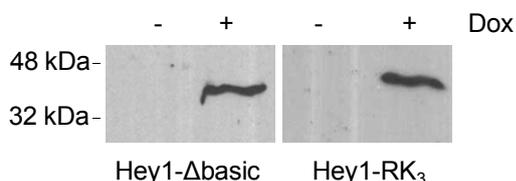


Abb. 9. Western Blot-Analyse der doxyzyklin-induzierbaren Zelllinien 293-Hey1- Δ basic und 293-Hey1-RK₃. Die Zellen wurden für 72 h mit 2 μ g/ml Doxyzyklin induziert und anschließend mit α Flag-Antikörper mittels Western Blot analysiert.

Aus induzierten und nicht-induzierten 293-Hey1- Δ basic- und 293-Hey1-RK₃-Zellen wurde RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben, um mit qRT-PCR die Expression von Hey1-Zielgenen zu untersuchen. Die mutierten Hey1 Proteine sind nicht mehr in der Lage die

Genexpression zu regulieren, da keines der untersuchten Zielgene (HEY1, BMP2, KLF10, FOXC1) nach Überexpression der Mutanten herunterreguliert ist (Abb. 10, A).

A

	Hey1- Δ basic	Hey1- RK ₃
HEY1	0,94	1,20
BMP2	1,00	1,23
KLF10	1,08	1,33
FOXC1	0,96	0,97

B

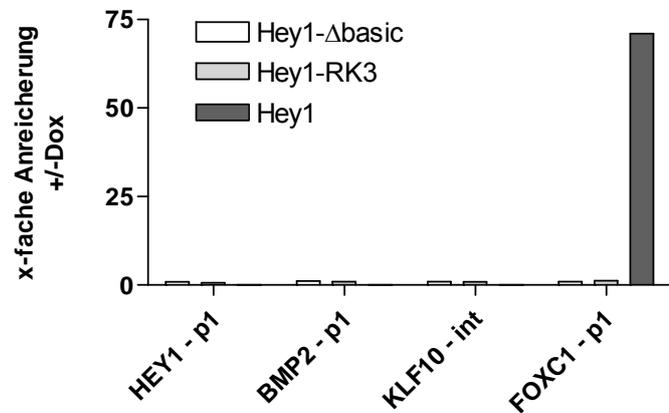


Abb. 10. Analyse der Hey1 Mutanten Hey1- Δ basic und Hey1-RK₃. **A:** Die Zelllinien 293-Hey1- Δ basic und 293-Hey1-RK₃ wurden für 72 h mit 2 μ g/ml Doxyzyklin induziert und mittels qRT-PCR auf die Regulation der Zielgene hin analysiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 3 klonalen Zelllinien (Hey1- Δ basic) bzw. 4 klonalen Zelllinien (Hey1-RK₃). **B:** Die Zelllinien 293-Hey1- Δ basic und 293-Hey1-RK₃ wurden für 72 h mit 50 ng/ml Doxyzyklin induziert und einer ChIP-Analyse mit α Flag-Antikörper unterworfen. Gezeigt sind nur die Ergebnisse der α Flag-ChIP, die ChIPs mit IgG-Kontrollantikörper waren negativ (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle wurde in 293-Hey1 Zellen der FOXC1 Promotor untersucht.

ChIP Experimente zeigten, dass im Gegensatz zu Wildtyp-Hey1 weder Hey1- Δ basic noch Hey1-RK₃ an Promotorregionen binden. In induzierten Zellen wurden mit α Flag-Antikörper keine der getesteten Promotorbereiche angereichert. Dies konnte für die Promotoren von HEY1 selbst, BMP2, KLF10 und FOXC1 gezeigt werden. Als Positivkontrolle wurde parallel eine ChIP mit 293-Hey1 Zellen durchgeführt, die eine Anreicherung in der FOXC1 Promotorregion ergab. Dadurch wurden methodische Fehler bei der Durchführung der ChIP ausgeschlossen.

7.3. ChIP-PET Sequenzierung

Die Methode der ChIP-PET ist eine Zusammenführung einer herkömmlichen ChIP und einer PET-Sequenzierung (Wei et al., 2006). Diese Sequenzierung wurde ursprünglich entwickelt, um cDNA-Bibliotheken effizient mit neuen Hochdurchsatz-Sequenziermethoden in relativ kurzer Zeit zu sequenzieren (Ng et al., 2005). Für diese Sequenzierung werden ca. 20 bp der 5'- und 3'-Enden jeder Sequenz isoliert und durch Ligation gepaart. Die dadurch entstehenden ca. 40 bp langen Paare, oder PETs ("paired-end ditags") werden zu längeren Fragmenten

aneinandergehängt, sequenziert und anschließend im Genom lokalisiert. Die Sequenzen der PETs grenzen einen genomischen Bereich ein, der dem ursprünglichen DNA-Fragment entspricht.

Bei der CHIP-PET Sequenzierung werden aus den aufgereinigten CHIP-Eluaten PETs gebildet und sequenziert. Werden mehrere PETs für einen genomischen Bereich sequenziert, so dass sie sich überlappen, spricht man von einem PET-Cluster. Die Anzahl der sequenzierten PETs in einem Cluster wird mit COC („Cluster Overlap Count“) angegeben. Die PET-Cluster repräsentieren putative Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors.

Die CHIP-PET Analyse wurde aus 293-Hey1 und 293-Hey2 Zellen mit α Flag-Antikörper durchgeführt. Die Daten beider CHIP-PET-Sequenzierungen sind zugänglich unter <http://t2g.bii.a-star.edu.sg/> und beinhalten u.a. die Positionen der PET-Cluster im Genom, den Namen der benachbarten annotierten Gene oder ESTs und den Abstand zwischen PET-Cluster und nächstgelegenen Gen oder EST. Mit Hilfe dieser Daten lässt sich neben der genauen Position der Bindungsstelle im Promotor auch die Sequenz eines putativen Bindemotiv bestimmen. Ein Vergleich der CHIP-PET Zielgene mit den Microarray Zielgenen zeigt zudem, welche Gene gleichzeitig gebunden und reguliert werden.

Die CHIP-PET Analyse ergab in beiden Zelllinien eine enorm hohe Anzahl an neuen möglichen Bindungsstellen. Bei der Hey1-CHIP-PET wurden insgesamt 12.614 Cluster definiert, bei Hey2 24.523 Cluster. Bei beiden CHIP-PETs haben die Cluster COC-Werte zwischen 200 und 5, das als Nachweisgrenze gesetzt wurde. Nur 0,12 % der Cluster für Hey1 und 0,04 % für Hey2 haben einen COC-Wert von 200-150. 12 %, bzw. 20 % der PETs haben einen COC von 150-25 und der Großteil von 88 %, bzw. 81 % der Cluster haben einen COC unter 25. Viele Gene wiesen mehrere Cluster in ihrer Nachbarschaft auf, so dass einzelnen Genen mehrere mögliche Hey-Bindestellen zugeordnet werden können (Abb. 11). Da viele Gene aus der Hey1-CHIP-PET auch in der Hey2-CHIP-PET gefunden wurden, scheinen Hey1 und Hey2 einen überlappenden Satz an Zielgenen zu besitzen. Von insgesamt 1453 Zielgenen aus der Hey1-CHIP-PET, sind 1147 Gene auch als Zielgene in der Hey2-CHIP-PET zu finden. Hey2 besitzt 3141 Zielgene (73 %), die nicht von Hey1 abgedeckt werden und somit Hey2 spezifisch sind. Hey1 hingegen weist nur 306 eigene Zielgene (20 %) auf.

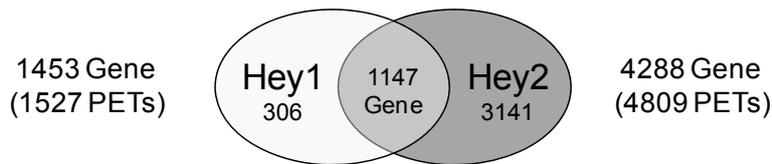


Abb. 11. Anzahl der Gene aus der Hey1- bzw. der Hey2-ChIP-PET, die einen oder mehrere PET-Cluster mit einem COC über 25 besitzen.

7.3.1. Validierung der PET-Cluster

Für die Validierung der Zielgene mittels qRT-PCR wurden insgesamt 23 PET-Cluster ausgewählt, die eindeutig in den Promotorbereichen (0 bis -1 kb), im 5'UTR oder im ersten Intron von annotierten Genen lagen und einen COC-Wert von 200 - 10 hatten. Mit einer nach dem gleichen Protokoll unabhängig durchgeführten ChIP konnten alle Zielgene validiert werden (Abb. 12). Als Positivkontrolle diente der FOXC1 Promotor, der in vorherigen ChIPs gut angereichert werden konnte, als Negativkontrolle der Promotor von CCNB1, der keine PET-Cluster aufwies. Die Anreicherung in der qRT-PCR für die ausgewählten Zielgene war sehr unterschiedlich zum COC-Wert der Cluster. Auch Cluster mit einem COC von 10 waren im Vergleich zur Negativkontrolle (mit unspezifischem Antikörper) angereichert und konnten somit validiert werden. Da aber die Anreicherung für die Gene mit geringem COC-Wert insgesamt etwas geringfügiger ausfiel, wurden für alle nachfolgenden Analysen nur Cluster mit einem COC von über 25 in Betracht gezogen.

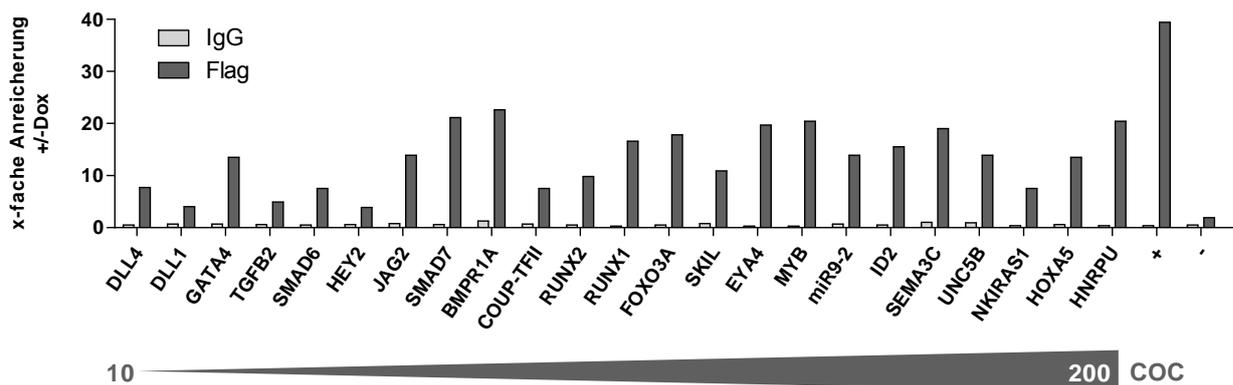


Abb. 12. Validierung der Hey1 ChIP-PET Zielgene. Die ausgewählten Zielgene besitzen unterschiedliche COC (Cluster Overlap Count) Werte von 10 (DDL4) bis 200 (HNRPU). Als Positivkontrolle (+) der ChIP diente FOXC1, als Negativkontrolle (-) CCNB1 (ohne Cluster).

Die gleichen Gene wurden für die Hey2-ChIP überprüft. Auch hier konnten alle Gene als direkte Zielgene validiert werden (Daten nicht gezeigt).

7.3.2. Position der PET-Cluster im Genom

Nicht alle Cluster der Hey1- und der Hey2-ChIP-PET lagen im proximalen Promotorbereich. Viele Cluster lagen auch in kodierenden Sequenzen, in intronischen Sequenzen oder auch mehrere kb in 5'-Richtung zum Transkriptionsstart.

Abb. 13 zeigt Beispiele mit Clustern, die verschiedene Positionen im Genom besitzen. HEY1 und BMP2 zeigen putative Bindestellen im proximalen Promotorbereich bis -0,5 kb. SMAD7 und JAG2 hingegen besitzen Cluster direkt in kodierenden Bereich des ersten und zweiten Exons. Bei HES1 treten zusätzlich zu Bindestellen im Promotorbereich auch Cluster in 3'-Richtung der kodierenden Region auf.

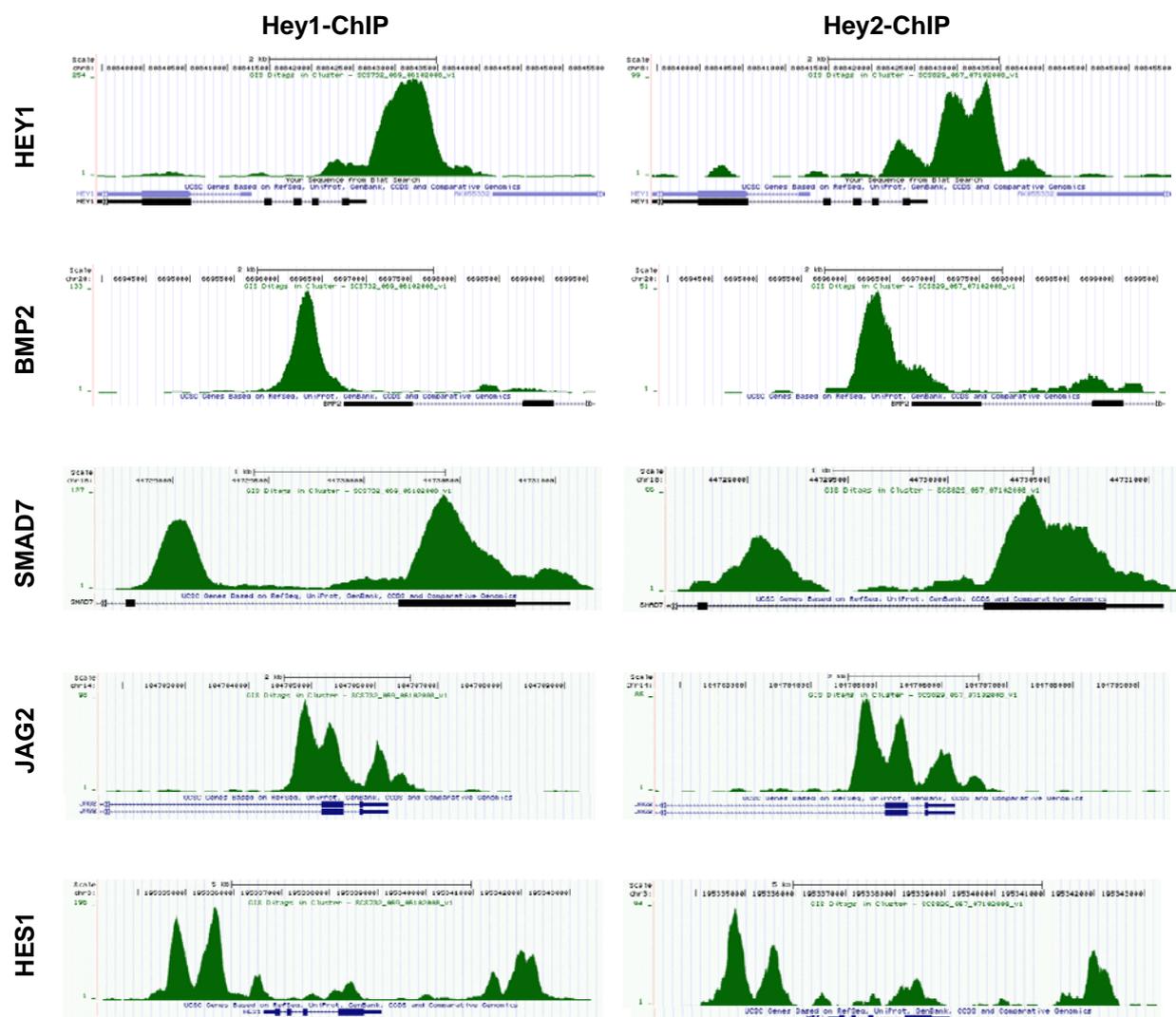


Abb. 13. Beispiele für PET-Cluster der Hey1- und der Hey2-ChIP-PET. Unter den Clustern (grün) sind die Exon-Intron-Strukturen der Gene im UCSC Genome Browser aufgezeigt (<http://genome.ucsc.edu/>). Schmale Balken: UTRs, stärkere Balken kodierende Sequenzen, zwischen den Balken sind die intronischen Sequenzen mit Pfeilen dargestellt.

Folgende Abbildung zeigt eine Übersicht der Clusterpositionen im Genom (Abb. 14). Der Großteil der Cluster liegt in einem Bereich von -0,5 bis 0 kb und im ersten Exon (insgesamt 55 % der Cluster für Hey1 bzw. 49 % für Hey2), wobei das erste Exon die 5'UTR- und eventuell kodierende Regionen besitzt. Auch im ersten Intron sind viele Cluster lokalisiert (10 % bzw. 9 %). Der Anteil nimmt rapide ab, entfernt man sich von diesen Bereichen. In allen nachfolgenden Exons sind 6 %, bzw. 4 % der Cluster lokalisiert, in den nachfolgenden Introns 2 %, bzw. 1 %. Nahe dem proximalen Promotor liegen in 5'-Richtung zwischen -1 kb und -0,5 kb ebenfalls nur 4 % bzw. 3 % der Cluster und in dem großen Bereich bis -10 kb sind es 7 % bzw. 6 %. 15 % bzw. 26 % der Cluster liegen zwischen den Genen mit einem Abstand von über 10 kb zur nächsten benachbarten kodierenden Sequenz.

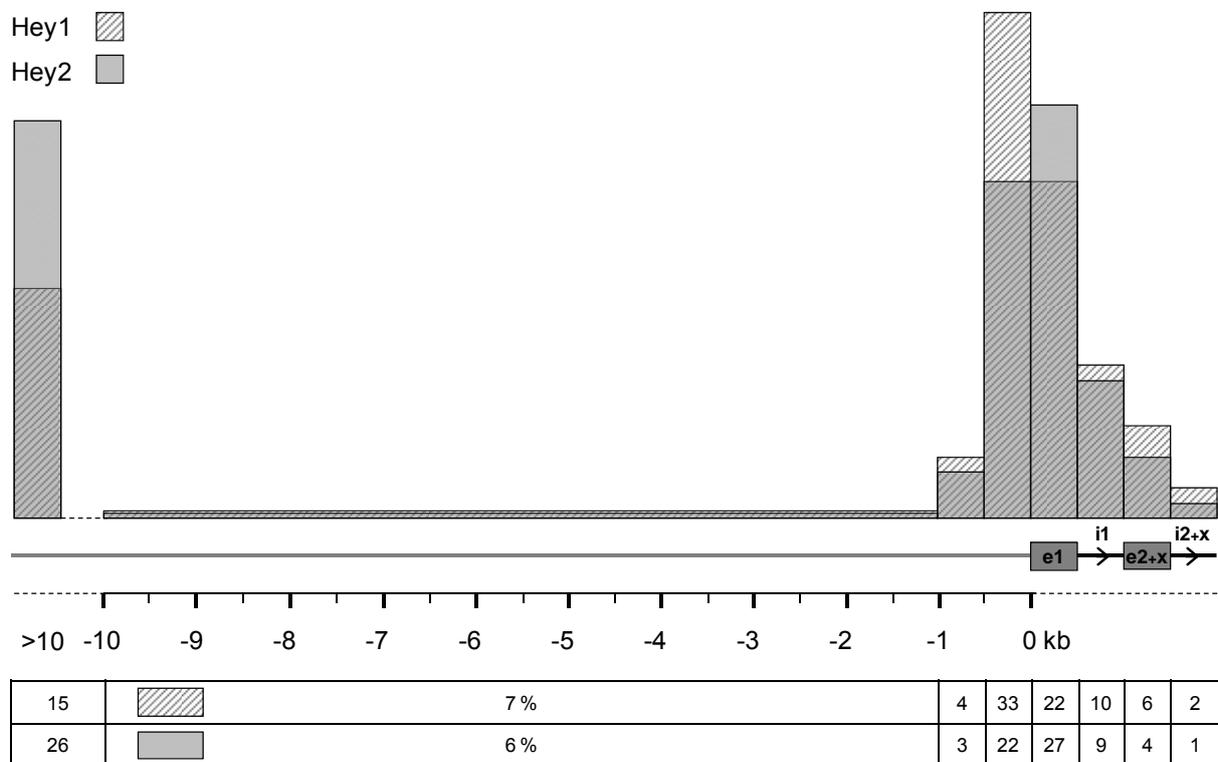


Abb. 14. Verteilung der PET-Cluster der Hey1- und der Hey2-ChIP-PET im Genom. Die Fläche der Balken ist proportional zum prozentualen Anteil aller PET-Cluster. Exons und Introns sind schematisch dargestellt, ebenso der Bereich > 10 kb. 0: Beginn der kodierenden Region; e1: erstes Exon; e2+x: Exon 2 und alle folgenden Exons; i1: Intron 1; i2+x: Intron 2 und alle folgenden Introns.

7.3.3. Bestimmung eines Hey1-Bindemotivs

Für die Bestimmung eines Bindemotivs für Hey1 wurden die Sequenzen von 100 PET-Cluster mit den höchsten COC-Werten herangezogen und mit MotifVoter analysiert (Wijaya et al., 2008). Diese Analyse verwendet mehrere Programme parallel und gibt einen Überblick über

mögliche Bindemotive. Die verschiedenen putativen Motive lassen vermuten, dass die Bindestelle von Hey1 repetitiv ist und einen hohen CG-Anteil besitzt (Abb. 15). Das stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Hey1- oder Hey2-PET-Cluster oft in CpG-Inseln liegen. Dies trifft u.a. für die Gene BMP2, FOXC1, KLF10, HES1, HEY1 und HEY2 zu und ließ sich mit Hilfe des UCSC Programmes leicht bestimmen. Abb. x zeigt ein Beispiel der Gene BMP2 und KLF10 aus der Hey1-ChIP.

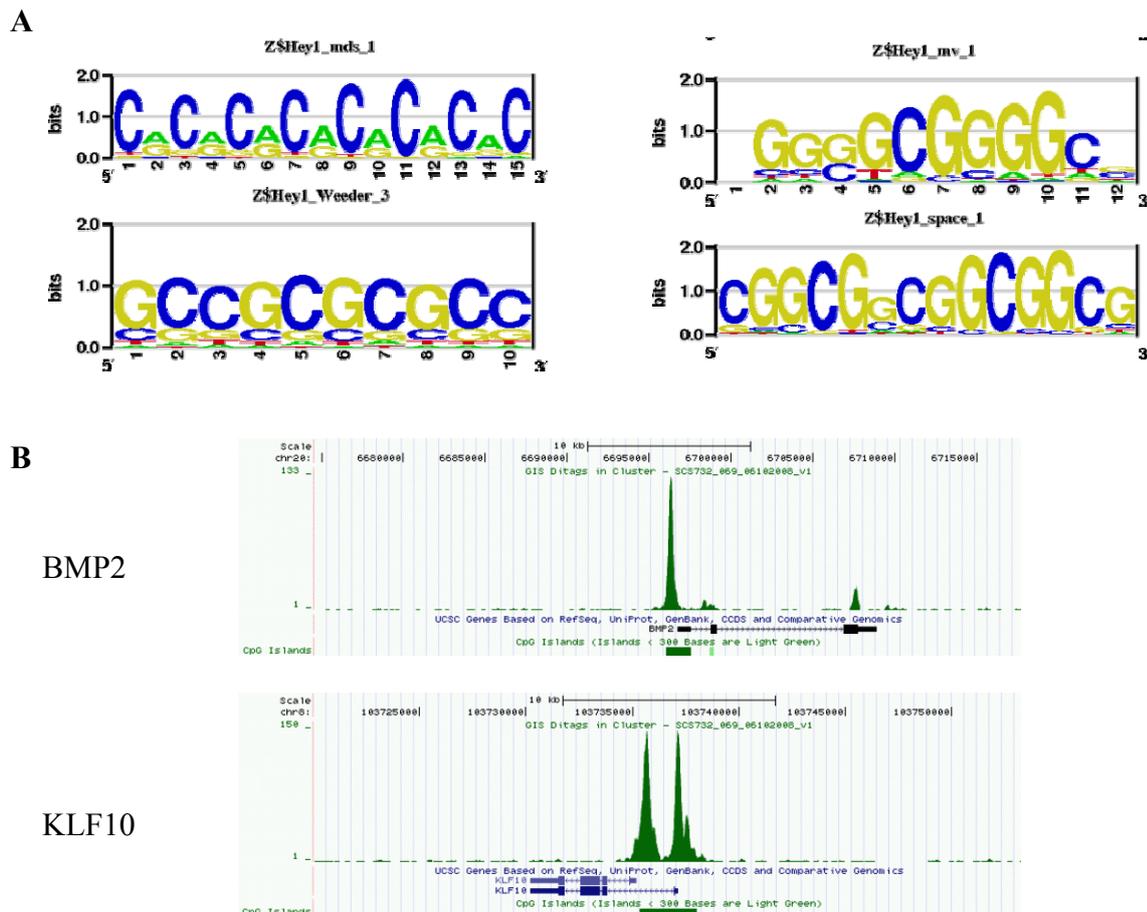


Abb. 15. A: Putative Bindemotive für Hey1. Dargestellt sind die Analysen von 4 verschiedenen Programmen bei MotifVoter. Es wurden Sequenzen +/- 200 bp vom Peak ausgewählt. **B: Lage der PET-Cluster der Hey1-ChIP-PET in CpG-Inseln am Beispiel von BMP2 und KLF10.**

7.3.4. Vergleich der ChIP-PET Sequenzierung mit den Microarray Daten

Vergleicht man die Zielgene, die durch die ChIP-PET Sequenzierung ermittelt wurden mit den regulierten Genen der Microarrays, wird eine große Überlappung deutlich (Tab. 5). Die herunterregulierten Gene nach Hey1-Überexpression besitzen zu 100 % (< -2-fach), bzw. 62 % (< -1,5-fach) einen PET-Cluster in unmittelbarer Nachbarschaft. Auch die durch Hey2

herunterregulierten Gene weisen zu 62 % (< -2-fach) und 58 % (< -1,5-fach) PET-Cluster auf. Der Anteil der hochregulierten Gene mit PET-Cluster ist geringer. Nur 19 % (> 1,5-fach), bzw. 20 % (> 2-fach) der Hey2 hochregulierten Gene besitzen PET-Cluster und die durch Hey1 hochregulierten Gene besitzen keine Cluster.

Tab. 5. Anteil der regulierten Gene mit einem PET-Cluster in der ChIP-PET Sequenzierung.

	293-Hey1	293-Hey2
< -2	100 % (n = 1) *	62 % (n = 59)
< -1,5	62 % (n = 13)	58 % (n = 311)
> 1,5	0 % (n = 0)	19 % (n = 27)
> 2	0 % (n = 0)	20 % (n = 3)

* (vgl. dazu Tab. 3 in Kapitel 7.1.2)

7.4. Embryonale Stammzellen und Kardiomyozyten

Da die bisher gefundenen Zielgene der Hey Proteine in nur einer Zelllinie untersucht wurden, stellt sich nun die Frage, ob sich diese auch in anderen Zelltypen verifizieren lassen. Als weiteres Modell wurden embryonale Stammzellen und Kardiomyozyten, die sich aus den Stammzellen differenzieren lassen, herangezogen.

7.4.1. Etablierung und Charakterisierung der Zelllinien

Die murinen embryonalen Stammzellen J1 (Klon CM7/1) können sehr effizient zu Kardiomyozyten differenziert werden (Zandstra et al., 2003). Sie tragen ein Konstrukt, das das Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des herzmuskelspezifischen α -MHC Promotors enthält. Werden die Zellen zur Differenzierung angeregt, kann mit G418 auf die α -MHC Expression und somit auf Kardiomyozyten (KM) selektioniert werden.

Die vollständige und erfolgreiche Differenzierung der ES-Zellen zu Kardiomyozyten wurde zuerst mit Hilfe einer Expressionsanalyse verschiedener Marker untersucht (Abb. 16). Die Differenzierung erfolgte in orbital rotierenden Petrischalen, um eine gleichmäßige Bildung der Embryoid Bodies (EB) zu ermöglichen. Ab Tag 9 der Differenzierung (EB d9) fingen die EBs an zu kontrahieren. An diesem Tag wurde dem Zellkulturmedium G418 zugefügt. Nach weiteren 6 Tagen Differenzierung (EB d15) wurden die Kardiomyozyten der kontrahierenden EBs vereinzelt und auf Zellkulturschalen ausplattiert. Eine qRT-PCR Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung ergab, dass die ES-Zell Marker Oct4 und Nanog während der Differenzierung herunterreguliert wurden (Abb. 16). Oct4 war sogar, im Gegensatz zu Nanog, in den differenzierten Kardiomyozyten nicht mehr nachweisbar. Der frühe mesodermale Marker Brachyury (T) war früh während der Differenzierung hochreguliert, um dann wieder abzunehmen. Die kardialen Marker α MHC, Anf und Nkx2.5 wurden während der Differenzierung und in Kardiomyozyten stark hochreguliert, wobei Nkx2.5 in der etablierten Kardiomyozyten-Kultur eine niedrigere Expression zeigte, als in den späten EBs. Der Notch-Signalweg ist mit der Expression von Notch1, Hey1 und Hey2 zwischen Tag 7 und 11 hochreguliert. In dieser Zeitspanne beginnen die Kardiomyozyten mit Kontraktionen und sind somit ausgereift.

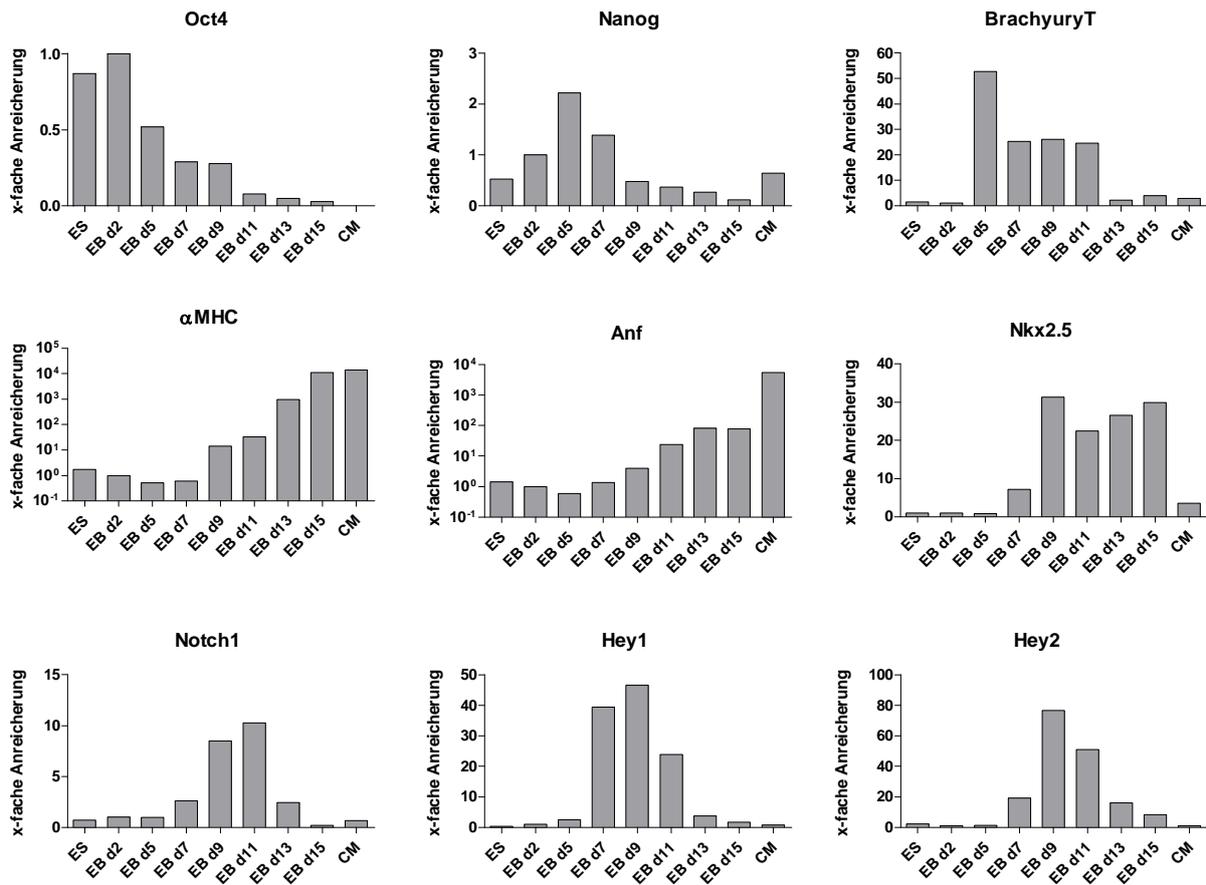


Abb. 16. Expressionsanalyse der ES-Zellen während der Differenzierung über Embryoid Bodies (EB) zu Kardiomyozyten (CM). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Zellmaterial entnommen, um mittels qRT-PCR verschiedene Marker zu testen. Ab EB d9 (Tag 9) wurde dem Zellkulturmedium G418 zugefügt, um auf Kardiomyozyten zu selektionieren.

Mit den ES-Zellen wurden nun stabile Linien generiert, die induzierbar murines Hey1 und Hey2 exprimieren. Dazu wurden die ES-Zellen mit pTol2-Plasmiden transfiziert, die eine Transposase-abhängige Integration der Konstrukte ins Genom vermitteln. Die Tol2-Plasmide enthalten die kodierenden Sequenzen von Flag-markiertem mHey1 und mHey2. Zusätzlich wurde ein Konstrukt transfiziert, das neben Hey1 über eine IRES für EGFP kodiert. Nachfolgend werden diese stabilen Zelllinien als ES-Hey1, ES-Hey1-GFP und ES-Hey2 bezeichnet.

Einzelklone der transfizierten ES-Zelllinien wurden auf Doxyzyklin-induzierbare Expression mit Western Blot und im Fall von Hey1-GFP auf GFP Fluoreszenz getestet. Zwei im Western Blot positive Klone wurden ausgewählt, um die Induktion genauer zu charakterisieren (Abb. 17). Dafür wurde die Proteinexpression mit 1 µg/ml Doxyzyklin über unterschiedliche Zeiträume induziert und mit Western Blot analysiert (Abb. 17, A). Nach 24 h ist eine schwache Proteinbande zu sehen, nach 48 und 72 h ist eine stärkere Überexpression erreicht.

Die GFP Expression der ES-Hey1-GFP Linien scheint eine unterschiedliche Expressionshöhe in individuellen Zellen zu haben (Abb. 17, B). Dieses Phänomen wurde bei allen induzierbaren ES-Hey1-GFP Linien festgestellt. Da eine Subklonierung einer Zelllinie zur gleichen heterogenen Expression in den Subklonen führte, wurde eine Verunreinigung der monoklonalen Linien mit nicht-induzierbaren Zellen ausgeschlossen.

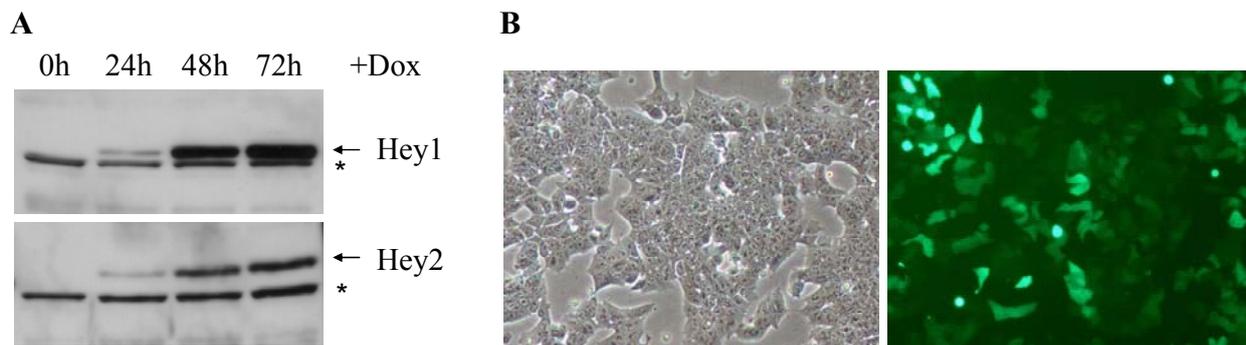


Abb. 17. A. Doxyzyklin-induzierbare Proteinexpression der Zelllinien ES-Hey1-GFP #11 und ES-Hey2 #24. Die Zellen wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin (Dox) für einen Zeitraum von 24, 48 und 72 h induziert und mit αFlag -Western Blot analysiert. * unspezifische Nebenbande **B. GFP Fluoreszenz der Zelllinie ES-Hey1-GFP #11.** Die Zellen wurden für 72 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin induziert und lebend fotografiert. Links Phasenkontrast, rechts GFP-Fluoreszenz, 10-fache Vergrößerung.

Zelllinien, die mit Western Blot Analyse positiv auf Hey Expression getestet wurden, wurden über Embryoid Bodies zu Kardiomyozyten differenziert. Für die Differenzierung wurden 19 Hey1-GFP-Linien ausgewählt. Nur 4 Linien fingen während der Differenzierung an zu kontrahieren, so dass nur diese Linien zu Monolayer-Kulturen ausplattiert wurden. Von diesen wiederum kontrahierten nur 2 Linien (KM-Hey1-GFP #11 und #14). Bei Hey1- und Hey2-Linien verhielt es sich ähnlich, hier wurden 5, bzw. 7 positive Zelllinien in EBs differenziert, je 2 Linien kontrahierten und je eine Linie konnte als kontrahierende Monolayer-Kultur etabliert werden (KM-Hey1 #3, KM-Hey2 #24).

In den Monolayer-Kulturen befanden sich, bis auf die Linie KM-Hey2 #24, zusätzlich G418-resistente Subpopulationen, die sich in der Morphologie stark von den umgebenden Kardiomyozyten unterschieden (Abb. 18). Diese Zellen waren sehr klein, kontrahierten nicht und proliferierten im Gegensatz zu den Kardiomyozyten sehr stark, so dass nach 7 Tagen in Monolayer-Kultur diese Subpopulationen die Kardiomyozyten überwucherten. Aus diesem Grund wurden diese Kardiomyozyten für die nachfolgenden Versuche nicht verwendet.

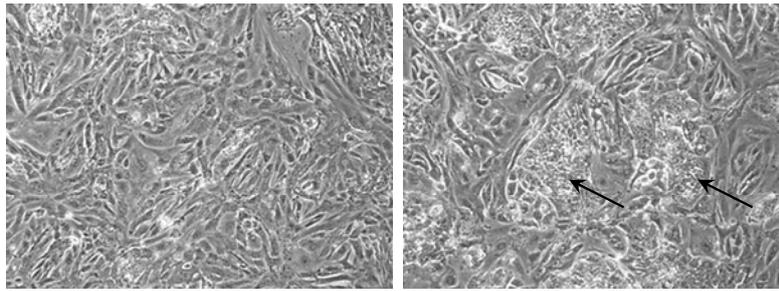


Abb. 18. Morphologie der Kardiomyozyten. Monolayer-Kulturen am 5. Tag nach dem Ausplattieren: KM-Hey2 #24 (links) und KM-Hey1-GFP #11 (rechts). Die Pfeile zeigen auf stark proliferierende G418-resistente Subpopulationen. 100x Vergrößerung.

7.4.2. Expressionsanalyse in ES-Zellen und Kardiomyozyten

In induzierbaren ES-Zellen und Kardiomyozyten wurden Hey1 und Hey2 durch Doxyzyklin-Zugabe überexprimiert, um die Expression von Hey Zielgenen mit Microarray-Analysen und qRT-PCR zu untersuchen.

Die ES-Zelllinien ES-Hey1-GFP #11 und ES-Hey2 #24 wurden für 72 h mit 2 µg/ml Doxyzyklin induziert. Die Linie KM-Hey2 #24 wurde von Tag 2 bis 5 der Monolayer-Kultur ebenfalls für 72 h mit 2 µg/ml Doxyzyklin induziert. Die RNA wurde extrahiert und mit Microarray-Analyse auf Expressionsunterschiede untersucht.

Tab. 6. Anzahl der regulierten Gene in Microarrays von ES-Zellen und Kardiomyozyten.

	ES-Hey1	ES-Hey2	KM-Hey2	Hey1 / Hey2*
< -2	11	40	15	5
< -1,5	236	689	319	39
> 1,5	540	1439	262	185
> 2	121	287	7	27

* gemeinsam regulierte Gene von ES-Hey1 und ES-Hey2

In den ES-Hey1 und ES-Hey2 Zellen sind mehr Gene hoch- als herunterreguliert (Tab. 6). Die große Anzahl an hochregulierten Genen steht im Gegensatz zu den Daten aus HEK293-Zellen, in denen kein Gen (293-Hey1), bzw. 15 Gene (293-Hey2) stärker als 2-fach hochreguliert waren.

Es wurden 25 regulierte Gene ausgewählt, die entweder hoch- oder herunterreguliert waren, um sie mit qRT-PCR zu überprüfen (Tab. 7). Für diese Validierung wurde die Expression der Gene in mehreren Klonen untersucht und gemittelt. Viele Gene in ES-Hey1 und ES-Hey2, die im Microarray stark (< -1,6) herunterreguliert waren, konnten bestätigt werden (Zic2, Lefty1

und -2, Jag1, Id2, Hes1 und Sema3e). Die Hochregulation der Gene Cpeb1 und Dub1 konnte bestätigt werden, wobei Dub1 nur nach Hey1 Überexpression reguliert war. Fgf1 ist nur nach Hey2 Überexpression herunterreguliert. Die Regulationen der Gene Eif1a und Plcb4 durch Hey1 und Hey2 konnten nicht validiert werden. Die hoch- und herunterregulierten Gene in den Kardiomyozyten KM-Hey2 konnten bis auf ein Gen (Mash2) nicht validiert werden.

Tab. 7. Regulierte Gene nach Hey Überexpression in ES-Hey1, ES-Hey2 und KM-Hey2 Zellen.

	Microarray			qRT-PCR		
	ES-Hey1	ES-Hey2	KM-Hey2	ES-Hey1	ES-Hey2	KM-Hey2
Zic2	-3,0	-2,1	1,9	-2,1	-5,5	-
Lefty1	-1,9	-3,4	-1,3	-2,1	-7,9	1,5
Lefty2	-2,2	-2,8	-1,3	-1,7	-5,3	1,4
Jag1	-1,9	-2,6	1,2	-1,3	-3,7	1,2
Dtna	-1,7	-1,6	-1,5	-1,1	1,1	1,1
Id2	-1,3	-3,0	1,2	-2,8	-1,7	-1,1
Hes1	-1,4	-2,2	1,3	-2,0	-4,1	1,8
Sema3e	1,0	-2,0	1,0	-1,1	-2,7	1,3
Krt7	1,0	-1,0	-1,7	1,5	1,0	-1,2
Mash2	1,1	1,1	-2,3	1,6	1,4	-1,6
Sema4a	1,2	-1,4	-1,7	1,2	1,1	1,5
Meis2	1,2	1,2	-2,3	1,7	2,2	-1,3
Nox4	1,3	1,1	-2,3	-	-	-
Prrx1	1,0	1,1	-2,2	2,4	1,2	1,2
Rgs4	1,1	-1,1	-2,1	-	-	1,0
Gbx2	-1,1	1,2	-1,9	1,2	1,5	-
CoupTFII	1,1	1,2	-1,8	-	-	-1,1
Fzd5	1,0	1,3	2,2	2,0	1,7	-1,1
Gfra2	-1,5	1,2	2,3	-1,3	-1,2	-1,7
Cpeb1	2,1	4,3	-1,4	3,5	3,2	1,7
Dub1	14,6	1,4	-1,0	8,7	1,5	1,4
Eif1a	6,9	1,6	1,8	1,2	1,1	1,0
Pmaip1	2,8	1,6	-1,2	2,3	2,4	-1,1
Plcb4	-1,1	3,3	-1,3	1,2	1,5	1,3
Fgf1	3,7	-2,3	-1,3	-1,1	-3,9	1,0

(-) in qRT-PCR nicht amplifizierbar

Vergleicht man die Zielgene von Hey1 und Hey2 in allen untersuchten Zelllinien (HEK293, ES-Zellen und KM), so wird deutlich, dass die Überlappung an gemeinsamen Zielgenen in zwei unterschiedlichen Zelllinien insgesamt sehr gering ist (Tab. 8). Das spricht dafür, dass die Hey Proteine zelltypabhängig unterschiedliche Gene regulieren. Da Hey2 sowohl in 293-Zellen als auch in ES-Zellen mehr Gene reguliert als Hey1, ist auch die Überlappung

zwischen diesen beiden Zelllinien im Hinblick auf die Hey2-regulierten Gene am höchsten. Wobei auch hier nur 2 Gene (Hes1 und Zic2) in 293- und in ES-Zellen stärker als 2-fach herunterreguliert sind.

Tab. 8. Anzahl der gemeinsamen Hey1- und Hey2-Zielgene in unterschiedlichen Zelllinien. 293: HEK293; ES: embryonale Stammzellen; KM: Kardiomyozyten.

	Hey1 293 - ES	Hey2 293 - ES	Hey2 293 - KM	Hey2 ES - KM
< -2	0	2 [*]	0	0
< -1,5	0	19	2	3
> 1,5	2	12	0	0
> 2	0	0	0	0

* Hes1, Zic2

7.4.3. ChIP in ES-Zellen und Kardiomyozyten

Mittels ChIP wurde nun überprüft, ob Hey1 und Hey2 auch in den ES-Zellen und Kardiomyozyten direkt an die Promotorregionen ihrer Zielgene binden. Es wurden 3 Gene ausgewählt (Lefty1, Lefty2 und Id2), die im Microarray und in der Validierung eine starke Herunterregulation nach Hey Überexpression zeigten (Tab. 7).

Ein Sequenzvergleich zwischen murinen und humanen genomischen Sequenzabschnitten mit Hilfe des Vista-Programmes zeigt die konservierten Bereiche (Abb. 19). Diese wurden genutzt, um mögliche Bindungsbereiche der Hey Proteine einzugrenzen.

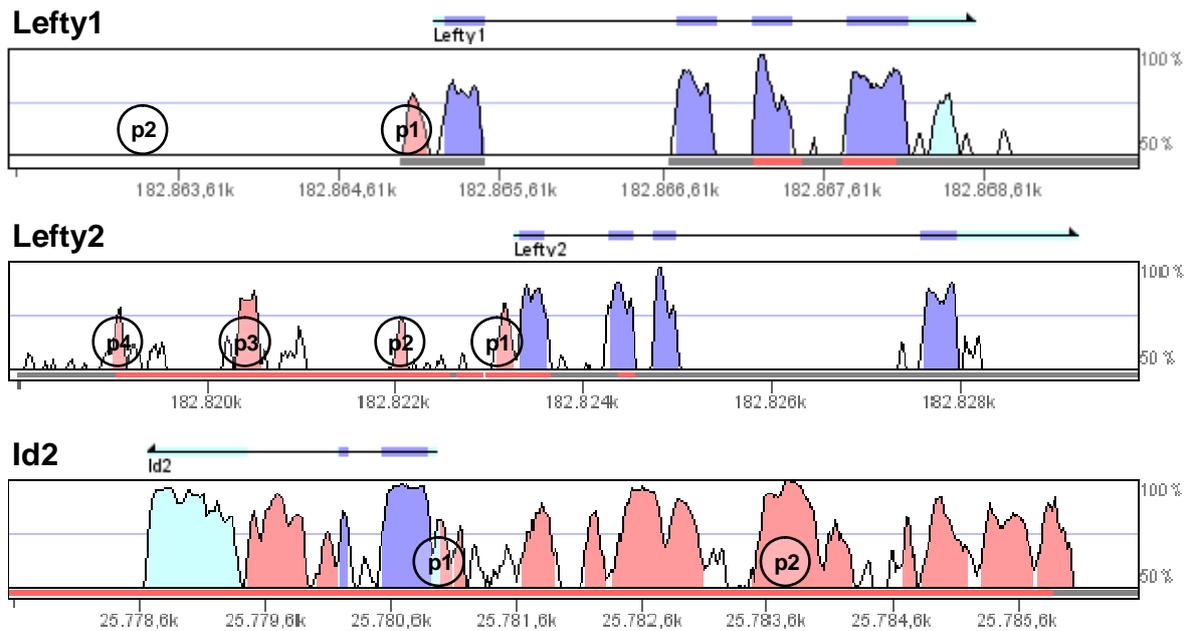


Abb. 19. Konservierte Bereiche zwischen murinen und humanen genomischen Sequenzen. Erklärung der Symbole und Farbkodierung siehe Abb. 4..

Eine Hey1- und eine Hey2-ChIP zeigte, dass beide Hey Proteine an den Lefty2-Promotor im Bereich p4 und an den Id2-Promotor im Bereich p2 binden (Abb. 20). Eine Bindung an den Lefty1-Promotor konnte für Hey1 nicht gezeigt werden, für Hey2 ist eine schwache Anreicherung zu erkennen (Abb. 20, B). Vermutlich müssten weitere Regionen getestet werden, um zu überprüfen, ob Lefty1 wirklich direkt von Hey1 und Hey2 gebunden wird.

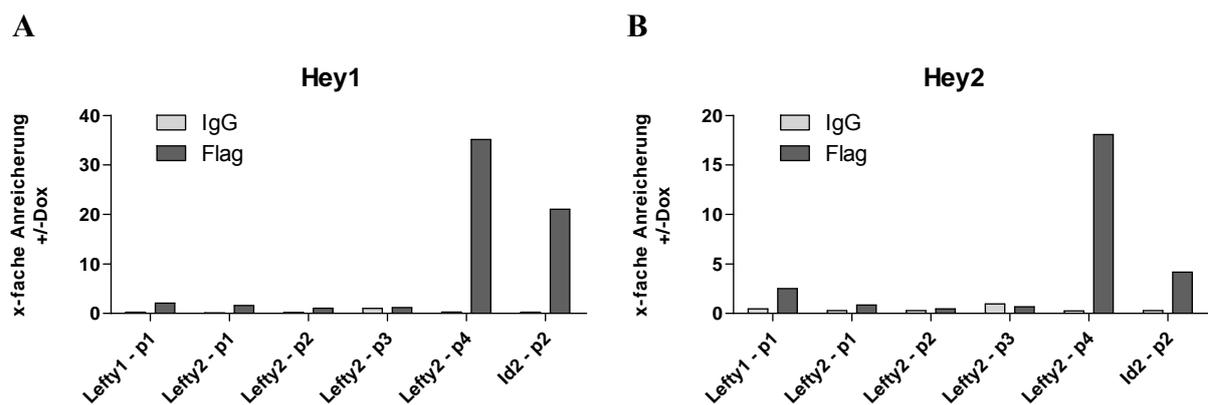


Abb. 20. ChIP aus ES-Hey1 (A) und ES-Hey2 (B) Zellen. qRT-PCRs von Hey1- und Hey2-ChIP mit α Flag-Antikörper und IgG als Negativkontrolle. Die Bezeichnungen p1 und p2 stehen für die Positionen der PCR-Produkte im Genom (siehe Abb. 19). Nicht gezeigt sind die Regionen Lefty1-p2 und Id2-p1, die beide negativ waren.

Auch mit Kardiomyozyten, die aus der Zelllinie ES-Hey2 #24 gewonnen wurden, wurden ChIP Experimente durchgeführt. Für diese ChIP wurden auf Grund der fehlenden regulierten Gene aus dem Microarray Gene ausgewählt, die für ES- und 293-Zellen bestätigt wurden (Lefty1, Lefty2, Id2, Hey1, Hey2, Bmp2, Tbx2). Diese Gene spielen eine wichtige Rolle während der Herzentwicklung und könnten somit in Kardiomyozyten direkt von Hey Proteinen reguliert werden.

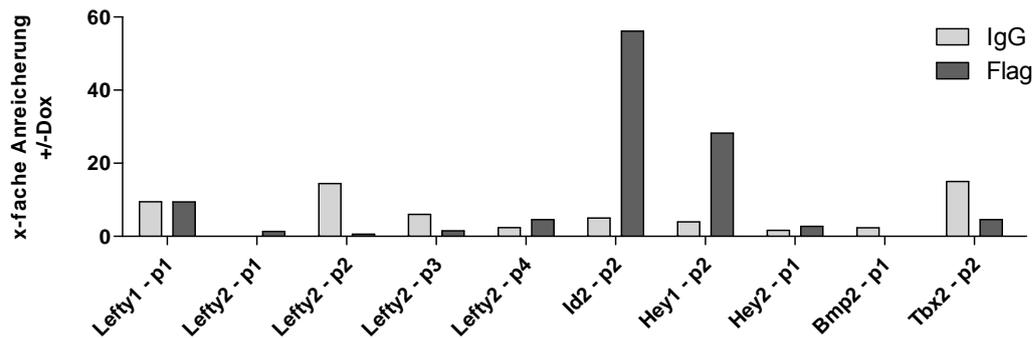


Abb. 21. Hey2-ChIP aus Kardiomyozyten. Die Bezeichnungen p1-p4 beziehen sich auf die Positionen im Genom wie in Abb. 19 dargestellt. Die Positionen für Hey1, Bmp2 und Tbx2 sind: Hey1 - p2: -500 bp; Hey2 - p1: -250 bp; Bmp2 - p1: 0 (TSS); Tbx2 - p2: -2400 bp.

Die Hey2-ChIP aus Kardiomyozyten zeigt einen hohen Hintergrund in den Negativkontrollen (Abb. 21). Lefty1-p1, Lefty2-p2 und Tbx2-p2 zeigen eine 10 - 15-fache Anreicherung mit IgG-Kontroll-Antikörper. Die spezifischen Anreicherungen für Id2 (56-fach) und Hey1 (28-fach) mit α Flag-Antikörper wurden in zwei weiteren unabhängigen Wiederholungen des Experiments untersucht, konnten aber nicht bestätigt werden.

7.5. Genontologie-Analyse aller Zielgene

Die Hey1- und Hey2-Zielgene, die in dieser Arbeit durch Microarray-Analysen und durch ChIP-PET Sequenzierung gefunden wurden, wurden einer Genontologie (GO) Analyse unterzogen. Diese Analyse gruppiert Gene in Untergruppen, um lange Genlisten in sinnvolle und aufschlussreiche Einheiten, wie "molekulare Funktion" oder "biologische Prozesse", aber auch "Signalwege" oder "Proteininteraktionen" einzuteilen (Zhang, 2005; <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>).

7.5.1. GO-Analyse der HEK293-Zielgene

Die hoch- und herunterregulierten Gene der Microarrays in HEK293-Zellen wurden zusammengefasst und analysiert. Die Hey1- und die Hey2-Zielgene konnten verschiedenen Signalwegen zugeordnet werden (Tab. 9). Der Id- und der Delta-Notch-Signalweg ist jeweils bei den Hey- und auch bei den Hey2-Zielgenen vertreten. Eine Liste aller Gene, die in den Gruppen enthalten sind, ist im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 10.2).

Tab. 9. GO-Analyse der Hey1- bzw. Hey2-Zielgene in HEK293-Zellen. Für diese Analyse wurde die Funktion "Wikipathways" bei WebGestalt ausgewählt. Alle Gene, die stärker als 1,5-fach reguliert sind, wurden miteinbezogen.

	beobachtet	erwartet	n	p-Wert
Hey1:				
DNA Reparaturmechanismen	4	0,18	67	0,0004
Ovarielle Infertilitätsgene	2	0,08	28	0,0117
Translationsfaktoren	2	0,14	51	0,0224
Id Signalweg	2	0,14	51	0,0224
Seneszenz und Autophagie	2	0,16	58	0,0238
Zellzykluskontrolle (G1-S)	2	0,18	66	0,0262
Apoptose	2	0,22	81	0,0295
Zellzyklus	2	0,23	85	0,0295
Delta-Notch Signalweg	2	0,23	84	0,0295
Hey2:				
Adipogenese	17	4,01	128	3,83*10 ⁻⁵
Seneszenz und Autophagie	9	1,82	58	0,0027
Id Signalweg	8	1,6	51	0,0037
Serotonin-Rezeptor Signalweg	5	0,59	19	0,0037
Delta-Notch Signalweg	10	2,63	84	0,0044
Enchondrale Ossifizierung	8	2,03	65	0,0111
Nukleäre Rezeptoren	6	1,19	38	0,0116
DNA Reparaturmechanismen	9	2,75	88	0,0157
TGFβ Rezeptor Signalweg	12	4,73	151	0,0238

(vorherige Seite) n: Anzahl der Referenzgene in dieser Gruppe; beobachtet: Anzahl der Gene, die in der Input- und der Referenzgenliste auftreten; erwartet: statistisch erwartete Anzahl der Gene aus der Referenzgruppe; p-Wert an häufiges Testen angeglichen.

Untersucht man die gemeinsamen Hey1- und Hey2-Zielgene der ChIP-PET im Hinblick auf die Zugehörigkeit zu verschiedenen Signalwegen, wird deutlich, dass die Hey Proteine wohl mit vielen verschiedenen Signalwegen interagieren können (siehe Tab. 10). Diese Signalwege (TGFβ-, MAPK-, Delta-Notch-, Id- und TNFα-Signalwege) spielen in vielen Vorgängen, wie der Embryonalentwicklung, der Gewebemöostase oder der Pathogenese von z.B. Krebs, entscheidende und grundlegende Rollen.

Tab. 10. GO-Analyse der 1147 gemeinsamen Hey1- und Hey2-Zielgene der ChIP-PET ("Wikipathways" bei WebGestalt). Eine Liste aller Gene, die in den Gruppen enthalten sind, ist im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 10.2).

	beobachtet	erwartet	n	p-Wert
TGFβ-Rezeptor Signalweg	24	3,33	155	$3,78 \cdot 10^{-12}$
MAPK Signalweg	20	3,48	162	$1,28 \cdot 10^{-08}$
Delta-Notch Signalweg	15	1,85	86	$1,28 \cdot 10^{-08}$
Id Signalweg	12	1,09	51	$1,41 \cdot 10^{-08}$
TNFα/NF-kB Signalweg	21	4,08	190	$1,71 \cdot 10^{-08}$
DNA Reparaturmechanismen	15	1,97	92	$1,71 \cdot 10^{-08}$
Apoptose	14	1,76	82	$2,45 \cdot 10^{-08}$
EGFR1 Signalweg	20	3,82	178	$2,45 \cdot 10^{-08}$
Enchondrale Ossifizierung	12	1,39	65	$1,21 \cdot 10^{-07}$
Androgen-Rezeptor Signalweg	15	2,47	115	$2,38 \cdot 10^{-07}$

n: Anzahl der Referenzgene in dieser Gruppe; beobachtet: Anzahl der Gene, die in der ChIP-PET- und der Referenzgenliste auftreten; erwartet: statistisch erwartete Anzahl der Gene aus der Referenzgruppe; p-Wert an häufiges Testen angeglichen.

7.5.2. GO-Analyse der Zielgene von ES-Zellen und Kardiomyozyten

Die Hey1-Zielgene aus ES-Zellen ließen sich keinem bestimmten Signalweg mit einem p-Wert von unter 0,05 zuordnen (siehe Tab. 11). Im Gegensatz dazu konnten die Hey2-Zielgene verschiedenen Signalwegen zugeordnet werden. Die hoch- und herunterregulierten Gene waren sehr unterschiedlich, deshalb wurden diese zwei Gruppen in der GO-Analyse getrennt ausgewertet. Die Gene, die in Hey1- und in Hey2-überexprimierenden ES-Zellen herunterreguliert sind, sind spezifisch im Delta-Notch-, Wnt- oder Id-Signalweg zugeordnet.

Tab. 11. GO-Analyse der Hey1- bzw. Hey2-Zielgene in ES-Zellen und Kardiomyozyten. Alle Gene, die stärker als 1,5-fach reguliert sind, wurden miteinbezogen ("Wikipathways" bei WebGestalt). Eine Liste aller Gene, die in den Gruppen enthalten sind, ist im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 10.2).

	beobachtet	erwartet	n	p-Wert
ES-Zellen:				
Hey1	-	-	-	> 0,05
Hey2 < -1,5				
Regulation des Aktinzytoskeletts	11	3,78	135	0,0275
Kontraktion der gestreiften Muskulatur	6	1,17	42	0,0275
Seneszenz und Autophagie	7	1,57	56	0,0275
Id Signalweg	6	1,34	48	0,0289
Hey2 > 1,5				
Ovarielle Infertilitätsgene	5	0,83	30	0,0444
Hey1 und Hey2 < -1,5				
Delta-Notch Signalweg	3	0,09	88	0,0005
Regulation des Aktinzytoskeletts	3	0,16	160	0,0008
Wnt Signalweg	3	0,13	135	0,0008
Id Signalweg	2	0,05	51	0,0015
Pluripotenzsignalwege in ES-Zellen	2	0,12	120	0,0063
Hey1 und Hey2 > 1,5				
-	-	-	-	> 0,05
Kardiomyozyten:				
Hey2 < -1,5				
Eicosanoid-Synthese	3	0,20	17	0,0234
IL-1 Signalweg	3	0,41	36	0,0494
Myometrium: Relaxation und Kontraktion	6	1,75	152	0,0494
Nukleäre Rezeptoren	3	0,44	38	0,0494
Ptf1a-verwandter Signalweg	2	0,13	11	0,0494
Hey2 > 1,5				
-	-	-	-	> 0,05

8. Diskussion

8.1. Hey Zielgene in HEK293 Zellen

8.1.1. Doxyzyklin-induzierbare Zelllinien

Für die Suche nach Zielgenen von Hey1 und Hey2 wurden zuerst HEK293-Zellen verwendet. Da die Hey Proteine entscheidende Entwicklungsvorgänge u.a. im embryonalen Herzen und in der Blutgefäßbildung spielen, stellt sich die Frage, ob die embryonale Nierenzelllinie HEK293 mit neuronalem Charakter (Shaw et al., 2002) diese Rolle während der Entwicklung erleuchten kann.

In der Literatur sind Ansätze beschrieben, Zielgene in Endothelzellen oder Kardiomyozyten zu finden. Bei diesen Experimenten wiesen die Zellen jeweils eine Hey2 Überexpression auf und die Expressionsmuster dieser Zellen wurde im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, bzw. -Gewebe mit Microarray-Analysen untersucht (Chi et al., 2003; Yu et al., 2009). Bei diesen Versuchen konnte aber nicht unterschieden werden, ob die Gene direkt oder indirekt von Hey2 reguliert wurden. Mit Hilfe von Chromatinimmunpräzipitationen (ChIPs) liesse sich nachweisen, ob die Gene mit verändertem Expressionsniveau direkt von einem Transkriptionsfaktor gebunden werden. Hilfreich für die Durchführung einer ChIP ist ein stabiles und reproduzierbares Zellkultursystem, das sich gut und schnell expandieren lässt. Die in dieser Arbeit verwendeten HEK293-Zellen sind leicht zu kultivieren, gut zu transfizieren und schnellwachsend. Außerdem hat das verwendete Doxyzyklin-induzierbare System (Forster et al., 1999; Wong et al., 2005) den Vorteil, dass die Zellen keine Überexpression des Transgens über einen langen Zeitraum aufweisen und so Langzeiteffekte, wie Differenzierung oder Seneszenz vermieden werden. Desweiteren gleichen sich induzierte und nicht-induzierte Zellen in ihrem Expressionsniveau zum Start des Experiments, so dass nach 2-3 Tagen bei Ende des Experiments die unterschiedlichen Expressionsmuster direkt auf die Hey-Proteine zurück zu führen sind.

In der Literatur sind ebenfalls ChIP-Experimente beschrieben, die in gut etablierten Zellkulturmodellen durchgeführt wurden und direkte Rückschlüsse auf die Regulationsvorgänge während der Entwicklung zuliessen (Jia et al., 2007).

8.1.2. Genregulation nach Hey Überexpression

Eine Microarray Analyse der HEK293-Zellen nach Hey Überexpression zeigte, dass die Zielgene nicht stark reguliert sind. Nur 3 %, bzw. 14 % der regulierten Zielgene von Hey1,

bzw. Hey2 sind stärker als 2-fach reguliert. Eine quantitative Sequenzierung des Transkriptoms der Zelllinie HEK293 weist auf eine hohe Expression von HEY1- und eine schwache Expression von HEY2-mRNA hin (Sultan et al., 2008). Die hohe Expression von endogenem HEY1 könnte dazu führen, dass eine Überexpression des transgenen HEY1 nur wenig Effekt auf das Expressionsniveau der Zielgene hat, da die Expressionshöhen der Zielgene schon durch das vorhandene Hey1 eingestellt sind (Farnham, 2009). Der Effekt der Hey2-Überexpression ist somit stärker, da weniger endogenes Hey2 in den Zellen vorliegt. Ob Hey2 auch in anderen Zelltypen oder Geweben mehr Zielgene als Hey1 besitzt, wurde mit einem Microarray in ES-Zellen geklärt (siehe Kapitel 7.4.2). Da auch hier Hey2 mehr Zielgene aufweist, könnte es von physiologischer Bedeutung sein.

Bei einer GO-Analyse stellte sich heraus, dass die Hey Proteine viele Zielgene in verschiedenen Signalwegen regulieren. So sind beispielsweise die herunterregulierten Zielgene BMP2, FOXC1 und KLF10 in verschiedenen Signalwegen involviert und spielen in der Entwicklung verschiedener Organe und Geweben wichtige Rollen. BMP2 wird während der Herzentwicklung im primitiven Herzschlauch (E7.5), später (ab E9.5) im Myokard des AV-Kanals exprimiert (Ma et al., 2005). Es wird diskutiert, ob in Atrien und Ventrikel eine Repression der BMP2 Expression durch Hey1 und Hey2 vorliegt (Rutenberg et al., 2006; Kokubo et al., 2007). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von CHIP-Experimenten erstmals eine direkte Bindung von Hey1, bzw. Hey2 an den BMP2-Promotor gezeigt. Dies könnte im murinen Herzen die Expression von Bmp2 in den myokardialen Zellen des AV-Kanals erklären, die als einzige Kardiomyozyten keines der Hey Gene exprimieren. Wird im gesamten Herzen Hey1 ektopisch exprimiert, dann ist die Bmp2 Expression stark herunterreguliert und der AV-Kanal ist reduziert oder vollständig verloren (Kokubo et al., 2007). Andererseits aktiviert die Bmp2 Expression im AV-Kanal Tbx2, das wiederum die Hey Expression negativ beeinflusst und so auf die jeweiligen Herzkammern beschränkt (Rutenberg et al., 2006; Kokubo et al., 2007). So regulieren beide Gene (Hey1, bzw. Hey2 und Bmp2) ihre spezifischen Expressionsareale.

FOXC1 ist in den mesenchymalen Zellen des AV-Kissens exprimiert (Winnier et al., 1999). Da die Hey Proteine in den endokardialen Zellen des Kissens exprimiert sind, liegt auch hier eine komplementäre Expression vor. Auch hier können die Hey Proteine direkt für das Expressionsmuster von FOXC1 verantwortlich sein. In FOXC1 KO Mäusen liegt ebenso wie bei Hey2, bzw. Hey1/L KO Mäusen ein ventrikulärer Septumdefekt und eine Klappendysplasie vor (Winnier et al., 1999). Auch während der frühen Blutgefäßentwicklung

zeigen beide KO Mäuse einen gestörten Umbaumechanismus des primitiven Blutgefäßgeflechts auf Grund fehlender arterieller Spezifizierung (Kume et al., 2001; Seo et al., 2006). Dies deutet auf eine Interaktion von Foxc1/2 Proteinen mit dem Notch-Signalweg hin, wobei für die Foxc Proteine eine dem Notch-Signalweg übergeordnete Rolle nachgewiesen wurde (Kume et al., 2001; Seo et al., 2006; Hayashi et al., 2008). Da Hey1 und Hey2 aber direkt an den FOXC1 Promotor binden, könnte zusätzlich eine negative Rückkopplung stattfinden.

Während der Entwicklung der glatten Gefäßmuskulatur besteht auch eine enge Interaktion zwischen dem Notch- und TGF β -Signalweg. Die Hey Proteine inhibieren TGF β - und NICD-induzierte Gene, die die kontraktile Entwicklung der Arterien vorantreiben, wie SM-Aktin, SM22 α oder Calponin1 (Tang et al., 2010). KLF10 wird von TGF β induziert und verstärkt den TGF β Signalweg (Johnsen et al., 2002a). Die Inhibition von KLF10 durch die Hey Proteine wäre ein weiterer Mechanismus den TGF β -Signalweg zu regulieren, um eine genaue Modulation zu erreichen. Eine Überexpression von TGF β führt zu einer Erhöhung der Gefäßdichte und zu einer fehlerhaften Lokalisierung der Gefäße in der Lunge (Zeng et al., 2001), wohingegen die TGF β KO Maus im Dottersack (E9.5) eine verringerte Gefäßanzahl und desorganisierte Gefäße besitzt (Martin et al., 1995). Eine genaue Regulation des TGF β -Signalweges ist somit nötig, um eine ausbalancierte Induktion der Blutgefäßentwicklung zu erreichen.

Diese Beispiele zeigen, dass die Hey Proteine mit verschiedenen Signalwegen interagieren und diese modulieren. So können Entwicklungsvorgänge im Herzen oder den Blutgefäßen genau induziert und für die richtige Dosis quantitativ oder zeitlich begrenzt reguliert werden.

Die Ergebnisse dieser Hey-induzierbaren HEK293-Zelllinien könnten auf Entwicklungsvorgänge in Organen übertragen werden und die Zellen könnten z.B. als Modell genutzt werden, um direkte DNA-Bindungen der Hey Proteine zu überprüfen.

8.1.3. Direkte Bindung von Hey an die Promotoren der Zielgene

In den Microarray-Analysen wurde ebenfalls gezeigt, dass Hey Proteine Repressoren sind und somit Einfluß auf die Transkription ausüben. Mit Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurde nun untersucht, ob Hey Proteine direkt an Promotorbereiche ihrer Zielgene binden. Wie schon erwähnt binden Hey Proteine *in vitro* an E-Box Sequenzen (CANNGT), wobei auch gezeigt wurde, dass diese *in vivo* nicht zwingend vorhanden sein müssen. So kann z.B.

Hey2 den VEGFR2-Promotor in HUVECs unabhängig der 2 vorhandenen E-Box Sequenzen binden und herunterregulieren (Holderfield et al., 2006).

Für eine erste ChIP mit anschließender qRT-PCR wurden Promotorbereiche ausgewählt, die eine hohe Konservierung zwischen der humanen und murinen Sequenz aufweisen. Es wurde angenommen, dass TFBS mit höherer Wahrscheinlichkeit in Bereichen liegen, die eine Konservierung in verschiedenen Spezies aufzeigen. Es wurde aber auch gezeigt, dass TFBS zwischen Mensch und Maus eine abweichende Konsensussequenz aufweisen, nicht an der gleichen Stelle im Promotor sind oder gänzlich von anderen Transkriptionsfaktoren (TFs) gebunden sind (Odom et al., 2007). Für die Hey Proteine hat sich für die Zielgene HEY1, BMP2, KLF10 und FOXC1 eine Bindung im konservierten Bereich bewahrheitet, was ebenfalls mit der ChIP-PET Sequenzierung gezeigt wurde. Interessanterweise kommen die Gene, die eine konservierte Region in der nicht-kodierenden Umgebung aufweisen, vor allem aus den Bereichen Transkriptionsregulation und Entwicklung, was für die hier untersuchten Gene zutrifft (Bejerano et al., 2004; Plessy et al., 2005).

Die Analysen der Hey1-Mutanten bestätigen die direkte Bindung der Hey Proteine an die DNA. Fehlt die basische Domäne oder sind die vermutlich DNA-kontaktierenden Aminosäuren mutiert, kann eine Bindung an die Promotoren von HEY1, BMP2, KLF10 und FOXC1 in einer ChIP nicht mehr nachgewiesen werden. Da bei den Mutanten nur die DNA-bindende basische Domäne betroffen ist und die HLH-Domäne vollständig ist, können noch Homo- oder Heterodimere gebildet werden, was mit Koimmunpräzipitation gezeigt wurde.

Das deutet darauf hin, dass bei den hier untersuchten Promotorregionen (HEY1, BMP2, KLF10, FOXC1) die DNA-Bindung von Hey1 nicht über andere Proteine vermittelt wird (indirekte DNA-Bindung), da diese Bindungen durch die mutierte basische Domäne nicht beeinflusst werden dürfte. Auch sind die Mutanten nicht mehr fähig, die Expressionslevel der Zielgene, die durch Hey1 mindestens 2-fach herunterreguliert wurden, zu regulieren. Dies untermauert die Hypothese, dass die basische Domäne essentiell für die Funktion der Hey Proteine ist. Die Herunterregulation der Zielgene (HEY1, BMP2, KLF10 und FOXC1) in HEK293 Zellen könnte somit direkt durch die DNA-Bindung ausgelöst werden und nicht über indirekte Mechanismen, wie z.B durch das Binden von Hey an einen aktivierenden Transkriptionsfaktor.

8.1.4. Genomweite Analyse der Hey Bindestellen mittels ChIP-PET

Die direkte Bindung der Hey Proteine über ihre bHLH-Domäne an die DNA kann man sich zunutze machen, um weitere direkte Zielgene zu finden. Die Methode der ChIP-PET wurde schon für einige Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc, p53 oder Oct4 durchgeführt (Loh et al., 2006; Wei et al., 2006; Zeller et al., 2006), jedoch nicht für die Hey Proteine. Bei dieser Methode werden genomweit putative Bindebereiche eines Transkriptionsfaktors sequenziert und so mögliche Zielgene bestimmt. Mit Hilfe der Position dieser sequenzierten Bindungsstellen lassen sich Aussagen treffen über den Regulationsmechanismus des TF und über das Bindemotiv.

Die Hey Proteine binden meist in einem Bereich von -0,5 kb bis in das erste Exon hinein. Dies legt den Schluß nahe, dass sie direkt mit der Transkriptionsmaschinerie interagieren und diese inhibieren und weniger an weiter weg entfernte Silencer binden. Der Anteil an ChIP-PET Cluster, der über 10 kb von kodierenden Region entfernt liegt, könnte von noch nicht annotierten Genen herrühren oder durch falsche Annotierung des Auswertungsprogrammes. Da es sich aber um einen sehr großen genomischen Bereich handelt ist der Anteil relativ gering.

Die Hey Proteine scheinen ein sehr ähnliches Bindemotiv zu besitzen, da sie bei der ChIP-PET einen überlappenden Satz an Zielgenen besitzen und ein sehr ähnliches Muster der Peaks aufweisen. Eine *in silico* Analyse der Hey1 PET-Cluster zeigte, dass die Sequenz dieses Bindemotivs vermutlich sehr GC-haltig sein könnte. Zudem wiesen die PCR-Produkte zur Quantifizierung der ChIP-PET sehr hohe Schmelzpunkte auf und waren größtenteils nur mit PCR-Zusätzen wie Ethylenglycol oder Betain amplifizierbar, was ebenfalls für ein stark GC-haltiges Bindemotiv spricht. Gene von Vertebraten weisen in der klassischen Promotorregion bis in kodierende Sequenzen hinein einen überdurchschnittlich hohen Anteil an unmethylierten GC-haltigen Sequenzen auf (Gardiner-Garden et al., 1987; Tabibzadeh et al., 2006). Diese sogenannten CpG Inseln sind mit 60 - 70 % aller Gene assoziiert und liegen in Promotoren von nahezu jedem konstitutiv exprimierten Gen und zu 40 % in niedrig oder gewebespezifisch exprimierten Promotoren (Brown et al., 2009; Solozobova et al., 2009). Promotoren mit CpG-Inseln fehlt häufig eine TATA-Box oder ein Initiator-Element (Inr), dafür sind sie signifikant mit dem Sp1-Bindemotiv, der G/C-Box (GGGCGGG) angereichert (Medvedeva et al., 2010). Sp1 interagiert vermutlich direkt mit der basalen Initiationsmaschinerie und rekrutiert weitere wichtige Faktoren, um die Transkription zu

starten oder zeitlich und räumlich zu regulieren (Lecuyer et al., 2002; Smale et al., 2003; Huang et al., 2010). Es ist vorstellbar, dass diese Transkriptionsinitiation durch ein Binden von Hey an die CpG-Inseln erschwert oder verhindert wird. Über den genauen Repressionsmechanismus können nur Vermutungen aufgestellt werden, möglicherweise rekrutieren die Hey Proteine weitere Bindungspartner, die mit der Transkriptionsmaschinerie interagieren. Diese Interaktionen könnten über die Orange Domäne, die HLH Domäne oder den konservierten C-Terminus der Hey Proteine vermittelt werden.

Silencer oder negativ regulatorische Elemente (NRE) bilden einen weiteren Mechanismus, die Transkription negativ zu beeinflussen (Ogbourne et al., 1998; Narlikar et al., 2009). Silencer sind stromaufwärts einer kodierenden Region lokalisiert und die dort gebundenen Repressoren interferieren direkt mit dem Transkriptionsinitiationskomplex. NREs können stromauf- oder -abwärts und in Introns oder Exons gefunden werden. Die dort gebundenen Repressoren verhindern durch ihre Bindung eine weitere Bindung von Transkriptionsaktivatoren. Sie können direkt an das gleiche Bindemotiv binden oder in die nahe Nachbarschaft des Aktivators. Da die Hey Proteine ebenso nicht nur stromaufwärts eines Gens an die DNA binden (vgl. Abb. 13), könnte es auch sein, dass Hey Proteine allein durch ihre DNA-Bindung verhindern, dass Aktivatoren die Transkription hochregulieren. Ob andere Transkriptionsfaktoren ein ähnliches Bindemotiv besitzen, wie es hier durch die Hey1 ChIP-PET gezeigt wurde, ist nicht bekannt. Somit können auch keine Aussagen über eventuelle kompetitive DNA-Bindungen gemacht werden. Da es sich bei der in dieser Arbeit durchgeführten *in silico* Analyse des Bindemotivs allerdings nur um die Vorhersage eines putativen Motivs handelt, könnten auch weitere Motive in Frage kommen.

Vergleicht man die Daten der ChIP-PET mit den Microarray Ergebnissen, fällt zuerst auf, dass bei weitem mehr herunterregulierte Gene einen PET-Cluster aufweisen, als hochregulierte Gene (64 % gegenüber 0 % für Hey1; 58 % gegenüber 19 % für Hey2). Dies spricht ebenso wie die Ergebnisse der Microarrays für eine Repressorfunktion der Hey Proteine.

Weiterhin ist der Anteil an Genen, die einen PET-Cluster aufweisen und gleichzeitig im Microarray eine Regulation zeigen, sehr gering (1,0 % für Hey1; 9,4 % für Hey2). Diese vermutlich stillen Bindungsstellen wurden auch in Studien für andere Transkriptionsfaktoren beschrieben (Martone et al., 2003; Yang et al., 2006; Krig et al., 2007). Vermutlich spielen diese Bindungsstellen in anderen Zelltypen eine Rolle, wo andere Mechanismen oder

Bindungspartner verfügbar sind (Martone et al., 2003). Nur ein kleiner Anteil der Transkriptionsfaktorbindestellen sind in einem bestimmten Zelltyp funktional. Manche TF weisen eine breite Spezifität auf und sind in vielen verschiedenen Zelltypen aktiv, andere TF zeigen eine zelltypspezifische Aktivität (Farnham, 2009). Vermutlich haben die Hey Proteine eine sehr spezifische Aktivität, da der Anteil an stillen TFBS sehr hoch ist.

Ein weiterer Grund für die hohe Anzahl der stillen TFBS wäre in der Art der Auswertung zu finden. Die Bestimmung der Zielgene bei der ChIP-PET beruht auf der Annahme, dass eine Bindungsstelle das nächstgelegene Gen reguliert. Tatsächlich können aber regulierende Elemente in der DNA tausende kb entfernt liegen und durch ihre Lage nicht eindeutig einem Gen zugeordnet werden (Farnham, 2009). Um diese Elemente detektieren zu können, müssten Methoden wie ChIA-PET oder 3C ("chromosome conformation capture") durchgeführt werden, die globale Chromatininteraktionen detektieren und somit weit entfernte Regulationselemente bestimmten Genen zuordnen können (Dekker et al., 2002; Fullwood et al., 2009).

8.2. Hey Zielgene in anderen Zelltypen

Um zu untersuchen, inwieweit sich die Zielgene der Hey Proteine in verschiedenen Zelllinien unterscheiden, wurden stabile ES-Zellen generiert, die ebenfalls induzierbar Hey1, bzw. Hey2 exprimieren. Als weiterer Zelltyp wurden Kardiomyozyten untersucht, die aus den ES-Zellen differenziert wurden.

Die Überexpression eines TFs in ES-Zellen, der normalerweise nicht direkt im ES-Zellstadium exprimiert ist, kann dennoch zu Genregulationen führen (Nishiyama et al., 2009). Durch fehlende Methylierungen des Chromatins in ES-Zellen ist die DNA offener und freier zugänglich, so dass die Überexpression eines TFs erhebliche Änderung des Transkriptoms hervorrufen kann (Silva et al., 2008; Nishiyama et al., 2009). Ebenso ist interessant, welche Zielgene in differenzierten Zellen, wie Kardiomyozyten vorliegen. Hier dürften weniger, aber zelltyp-spezifischere Bindestellen zur Verfügung stehen.

8.2.1. Zielgene in ES-Zellen

Die GO-Analyse der regulierten Gene des ES-Zell-Micorarrays zeigte unter anderem, dass Hey1 und Hey2 die Expression von Id Proteinen regulieren. Die Interaktion des Notch-Signalweges mit dem Id-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Stammzellstatus und der frühen Differenzierung (Meier-Stiegen et al., 2010). Notch1 treibt in

ES-Zellen den Eintritt in eine Differenzierungsrichtung an, indem Notch1 direkt schicksalsbestimmende TFs ("lineage specific transcription factors", LSTFs) induziert, z.B. MyoD, Runx, Sox9, Pax6, Myf5. Ebenso induziert Notch1 auch die Proliferation von Stammzellen, indem die Repressoren Hes, Hey und Id induziert werden. Diese Repressoren blockieren die LSTFs, bilden somit eine negative Rückkopplung und erhalten den Stammzellstatus. Die Zellen werden durch die Expression von gegensätzlich wirkenden TFs in einem Prädifferenzierungsstadium gehalten, bis die Menge und Verfügbarkeit von weiteren LSTFs oder inhibierenden Faktoren das weitere Schicksal der Zelle festlegt. Fehlt Notch Expression in ES-Zellen bleibt der Stammzellstatus zwar erhalten, die Anzahl der differenzierenden Zellen in Zellkultur ist aber verringert (Noggle et al., 2006).

Durch die Überexpression der Notch-Zielgene Hey1, bzw. Hey2 sind vermutlich Signalwege in Gang gesetzt worden, die eine Differenzierung einleiten oder modulieren. So sind z.B. die durch Hey1 und Hey2 herunterregulierten Gene Lefty1 und Lefty2 Modulatoren von Nodal, das u.a. Mesoderm spezifiziert und die Links-Rechts-Asymmetrie induziert. Ist der Gehalt von Nodal durch eine geänderte Lefty Expression gestört, kommt es zu Defekten während der Differenzierung (Tabibzadeh et al., 2006). Ein weiteres herunterreguliertes Hey Zielgen, Zic2 wird als Pluripotenzmarker in ES Zellen diskutiert, dessen Expression sich während der Differenzierung zunehmend in neurale Gewebe verlagert und mit weiteren Zic-Familienmitgliedern einen wichtigen Einfluss auf die neurale Entwicklung hat (Brown et al., 2009). Durch Hey Proteine hochregulierte Gene sind z.B. die Deubiquitinylase Dub1, das zytoplasmatische poly(A)-bindende Protein Cpeb1, oder Pmaip1/Noxa, das nach UV-Bestrahlung in ES-Zellen exprimiert wird (Solozobova et al., 2009). Für diese Gene ist nicht bekannt, ob sie einen regulatorischen Einfluss auf Differenzierungsvorgänge ausüben, da sie sehr unterschiedlichen Gruppen angehören und wichtige Aufgaben in der Aufrechterhaltung von grundlegenden Vorgängen in der Zelle erfüllen, wie z.B. Proteinabbau, Translation und DNA-Reperaturmechanismen.

Um die Richtung der Differenzierung, die durch die Hey Überexpression hervorgerufen worden sein könnte, genauer zu bestimmen, könnte das Expressionsmuster und die Morphologie der Zellen näher untersucht werden. Die ES-Zellen könnten durch LIF-Entzug zur Differenzierung angeregt werden und die Überexpression von Hey könnte zu verschiedenen Zeitpunkten über unterschiedliche Zeitdauer mit Dox angeschaltet werden. Dies würde klären, inwieweit die Hey Proteine in Differenzierungsvorgänge eingreifen oder bestimmte Differenzierungsrichtungen hervorrufen.

8.2.2. Kardiomyozyten als Zellkulturmodell für Genregulation

Die Kardiomyozyten, die sich in der Zellkultur aus ES-Zellen differenzieren lassen, durchlaufen ebenso wie im Embryo verschiedene Entwicklungsstadien. Anhand des Zeitpunkts der Differenzierung lassen sich die KM grob in die Differenzierungsstadien früh (bei Einsetzen der Kontraktionen, Tag 9-11), mittel und terminal (ab Tag 14) einteilen (Maltsev et al., 1994). Diese Gruppen lassen sich durch Genexpression verschiedener Marker, elektrophysiologische Untersuchungen von einzelnen Zellen oder durch die Zellmorphologie bestimmen. In der frühen kardialen Entwicklung werden z.B. GATA-4 und Nkx2.5 exprimiert, einige wenige Tage später folgen α - und β -MHC und MLC-2v. Das mittlere Stadium lässt sich durch die beginnende Expression von ANF und die abnehmende Expression von BrachyuryT und der Connexine 40, 43 und 45 festmachen (Rohwedel et al., 2001). Das stimmt mit dem Expressionsmuster der hier verwendeten EBs überein. An Tag 7-9 sind die Expressionslevel von Nkx2.5 und α MHC erhöht und markieren die frühe kardiale Differenzierung. Das mittlere Differenzierungsstadium in den EBs ist an Tag 11-13 mit steigender Anf- und sinkender BrachyuryT-Expression.

Die terminal ausdifferenzierten KM zeigen typische Morphologien (Schrittmacher-, Purkinje-, atrial- und ventrikulär-ähnliche Zellen) und haben die gleichen elektrophysiologischen Eigenschaften wie postnatale KM der Maus (Hescheler et al., 1997; Boheler et al., 2002; He et al., 2003). Natürlich müssten die KM aus dieser Arbeit näher untersucht werden, um ein genaues Entwicklungsstadium zu bestimmen, da die Differenzierung stark abhängig ist von der verwendeten ES-Zelllinie, des Mediums (vor allem des verwendeten FCS), von der Zellzahl zu Beginn der EB-Differenzierung und vom Zeitpunkt des EB-Ausplattierens (Wobus et al., 2002). Alleine durch die Differenzierungszeit und das Expressionsmuster, dürfte es sich hier um terminal differenzierte Kardiomyozyten handeln.

Der Notch-Signalweg spielt während der kardialen Entwicklung eine zentrale Rolle und ist u.a. involviert in der Kardiomyozyten-Differenzierung, der Musterbildung der verschiedenen Herzregionen, Klappenentwicklung und der Trabekulation (MacGrogan et al., 2010). Neben dem Notch-Signalweg sind weitere Signalwege ausschlaggebend in der Herzentwicklung, wie z.B. TGF β -, Fgf8-, Wnt- oder Shh-Signalwege (Dyer et al., 2009). Da der Notch-Signalweg mit diesen und weiteren Signalwegen interagiert, aber diese Signalwege nicht signifikant unter den Zielgenen in Kardiomyozyten vertreten sind, bedarf es hier noch weiterer Untersuchungen des Zellkultursystems. Die hier in dieser Arbeit verwendeten

Kardiomyozyten könnten in früheren Differenzierungsstadien analysiert werden und eventuell einige Tage früher ausplattiert werden, um die Genregulation oder die DNA-Bindung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung zu untersuchen.

Abschließend lässt sich zu den Hey Proteinen sagen, dass sie einerseits innerhalb der Familie eine große Überlappung an Zielgenen aufweisen und somit womöglich eine gewisse Redundanz aufweisen. Andererseits zeigen sie im Vergleich mit verschiedenen Zelltypen ein zelltypspezifisches Regulationspotential. In den drei untersuchten Zelllinien zeigen sie viele verschiedene Zielgene, die aber alle darauf hinweisen, dass die Hey Proteine Signalwege modulieren können, die in Entwicklungsprozessen einen Einfluss auf die Differenzierung der Organe haben. Um diese Interaktionen genauer zu analysieren, könnte der Einfluss der Hey Überexpression auf verschiedene Signalwege, wie z.B. TGF β -, Wnt- oder Id-Signalwege näher untersucht werden. Zusätzlich zur Genregulationen der Zielgene, könnten auch die Expressionshöhen verschiedener Proteine aus den Signalwegen oder ihre Proteinmodifikationen (z.B. Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, Lokalisierung) bestimmt werden. Diese Versuche könnten einerseits in verschiedenen Zellkulturen oder auch in embryonalen Geweben mit Hilfe von konditionalen transgenen Mäusen mit Western Blot oder Immunfluoreszenz durchgeführt werden. Darüberhinaus ist der genaue Mechanismus der Genregulation durch die Hey Proteine nicht geklärt. Neben der direkten DNA-Bindung über die bHLH-Domäne ist anzunehmen, dass weitere Protein-Protein-Interaktion von entscheidender Bedeutung sind, um eine Genregulation auszuführen, wie z.B. die Rekrutierung von Histondeacetylasen oder anderer Korepressoren, wie es für Hes1 gezeigt wurde (Fischer et al., 2007a). Eine Aufreinigung des putativen Hey-Proteinkomplexes könnte weitere Regulationsmöglichkeiten aufzeigen, um letztendlich die komplexe Funktion der Hey Proteine während der Entwicklung verschiedener Organe zu verstehen.

9. Literaturverzeichnis

- Apelqvist, A., H. Li, et al. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400(6747): 877-881.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, et al. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284(5415): 770-776.
- Balciunas, D., K. J. Wangensteen, et al. (2006). Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. *PLoS Genet* 2(11): e169.
- Bejerano, G., M. Pheasant, et al. (2004). Ultraconserved elements in the human genome. *Science* 304(5675): 1321-1325.
- Boheler, K. R., J. Czyz, et al. (2002). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 91(3): 189-201.
- Brown, L. and S. Brown (2009). *Zic2* is expressed in pluripotent cells in the blastocyst and adult brain expression overlaps with makers of neurogenesis. *Gene Expr Patterns* 9(1): 43-49.
- Chi, J. T., H. Y. Chang, et al. (2003). Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10623-10628.
- Chin, M. T., K. Maemura, et al. (2000). Cardiovascular basic helix loop helix factor 1, a novel transcriptional repressor expressed preferentially in the developing and adult cardiovascular system. *J Biol Chem* 275(9): 6381-6387.
- Dekker, J., K. Rippe, et al. (2002). Capturing chromosome conformation. *Science* 295(5558): 1306-1311.
- Diez, H., A. Fischer, et al. (2007). Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Exp Cell Res* 313(1): 1-9.
- Donovan, J., A. Kordylewska, et al. (2002). Tetralogy of fallot and other congenital heart defects in *Hey2* mutant mice. *Curr Biol* 12(18): 1605-1610.
- Dyer, L. A. and M. L. Kirby (2009). The role of secondary heart field in cardiac development. *Dev Biol* 336(2): 137-144.
- Ellisen, L. W., J. Bird, et al. (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66(4): 649-661.
- Farnham, P. J. (2009). Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat Rev Genet* 10(9): 605-616.
- Fischer, A. and M. Gessler (2003). Hey genes in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med* 13(6): 221-226.
- Fischer, A. and M. Gessler (2007a). Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res* 35(14): 4583-4596.
- Fischer, A., J. Klattig, et al. (2005). Hey basic helix-loop-helix transcription factors are repressors of GATA4 and GATA6 and restrict expression of the GATA target gene ANF in fetal hearts. *Mol Cell Biol* 25(20): 8960-8970.
- Fischer, A., C. Leimeister, et al. (2002). Hey bHLH factors in cardiovascular development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67: 63-70.
- Fischer, A., N. Schumacher, et al. (2004). The Notch target genes *Hey1* and *Hey2* are required for embryonic vascular development. *Genes Dev* 18(8): 901-911.
- Fischer, A., C. Steidl, et al. (2007b). Combined loss of *Hey1* and *HeyL* causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition. *Circ Res* 100(6): 856-863.

- Forster, K., V. Helbl, et al. (1999). Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 27(2): 708-710.
- Frazer, K. A., L. Pachter, et al. (2004). VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue): W273-279.
- Fu, Y., A. Chang, et al. (2009). Differential regulation of transforming growth factor beta signaling pathways by Notch in human endothelial cells. *J Biol Chem* 284(29): 19452-19462.
- Fullwood, M. J., M. H. Liu, et al. (2009). An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature* 462(7269): 58-64.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196(2): 261-282.
- Gessler, M., K. P. Knobloch, et al. (2002). Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in Hey2 $-/-$ mice. *Curr Biol* 12(18): 1601-1604.
- Ghosh, B. and S. D. Leach (2006). Interactions between hairy/enhancer of split-related proteins and the pancreatic transcription factor Ptf1-p48 modulate function of the PTF1 transcriptional complex. *Biochem J* 393(Pt 3): 679-685.
- Hald, J., J. P. Hjorth, et al. (2003). Activated Notch1 prevents differentiation of pancreatic acinar cells and attenuate endocrine development. *Dev Biol* 260(2): 426-437.
- Hatakeyama, J. and R. Kageyama (2004). Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol* 15(1): 83-89.
- Hayashi, H. and T. Kume (2008). Foxc transcription factors directly regulate Dll4 and Hey2 expression by interacting with the VEGF-Notch signaling pathways in endothelial cells. *PLoS One* 3(6): e2401.
- He, J. Q., Y. Ma, et al. (2003). Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 93(1): 32-39.
- Henderson, A. M., S. J. Wang, et al. (2001). The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J Biol Chem* 276(9): 6169-6176.
- Hescheler, J., B. K. Fleischmann, et al. (1997). Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 36(2): 149-162.
- High, F. A. and J. A. Epstein (2008). The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat Rev Genet* 9(1): 49-61.
- Holderfield, M. T., A. M. Henderson Anderson, et al. (2006). HESR1/CHF2 suppresses VEGFR2 transcription independent of binding to E-boxes. *Biochem Biophys Res Commun* 346(3): 637-648.
- Huang, W. C., S. T. Chen, et al. (2010). Involvement of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in EGF-induced c-Jun/Sp1-mediated gene expression. *Cell Mol Life Sci* 67(20): 3523-3533.
- Iso, T., V. Sartorelli, et al. (2001a). HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding. *Mol Cell Biol* 21(17): 6071-6079.
- Iso, T., V. Sartorelli, et al. (2001b). HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling. *Mol Cell Biol* 21(17): 6080-6089.
- Jadhav, A. P., H. A. Mason, et al. (2006). Notch 1 inhibits photoreceptor production in the developing mammalian retina. *Development* 133(5): 913-923.
- Jennings, B. H., D. M. Tyler, et al. (1999). Target specificities of Drosophila enhancer of split basic helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* 19(7): 4600-4610.
- Jia, J., M. Lin, et al. (2007). The Notch signaling pathway controls the size of the ocular lens by directly suppressing p57Kip2 expression. *Mol Cell Biol* 27(20): 7236-7247.

- Johnsen, S. A., M. Subramaniam, et al. (2002a). Transcriptional regulation of Smad2 is required for enhancement of TGFbeta/Smad signaling by TGFbeta inducible early gene. *J Cell Biochem* 87(2): 233-241.
- Joutel, A., C. Corpechot, et al. (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383(6602): 707-710.
- Kathiriya, I. S., I. N. King, et al. (2004). Hairy-related transcription factors inhibit GATA-dependent cardiac gene expression through a signal-responsive mechanism. *J Biol Chem* 279(52): 54937-54943.
- Kim, I. M., M. J. Wolf, et al. (2010). Gene deletion screen for cardiomyopathy in adult *Drosophila* identifies a new notch ligand. *Circ Res* 106(7): 1233-1243.
- Klaus, A., Y. Saga, et al. (2007). Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47): 18531-18536.
- Koibuchi, N. and M. T. Chin (2007). CHF1/Hey2 plays a pivotal role in left ventricular maturation through suppression of ectopic atrial gene expression. *Circ Res* 100(6): 850-855.
- Kokubo, H., Y. Lun, et al. (1999). Identification and expression of a novel family of bHLH cDNAs related to *Drosophila* hairy and enhancer of split. *Biochem Biophys Res Commun* 260(2): 459-465.
- Kokubo, H., S. Miyagawa-Tomita, et al. (2005). Hesr, a mediator of the Notch signaling, functions in heart and vessel development. *Trends Cardiovasc Med* 15(5): 190-194.
- Kokubo, H., S. Tomita-Miyagawa, et al. (2007). Hesr1 and Hesr2 regulate atrioventricular boundary formation in the developing heart through the repression of Tbx2. *Development* 134(4): 747-755.
- Krig, S. R., V. X. Jin, et al. (2007). Identification of genes directly regulated by the oncogene ZNF217 using chromatin immunoprecipitation (ChIP)-chip assays. *J Biol Chem* 282(13): 9703-9712.
- Kume, T., H. Jiang, et al. (2001). The murine winged helix transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are both required for cardiovascular development and somitogenesis. *Genes Dev* 15(18): 2470-2482.
- Kwon, C., L. Qian, et al. (2009). A regulatory pathway involving Notch1/beta-catenin/Is11 determines cardiac progenitor cell fate. *Nat Cell Biol* 11(8): 951-957.
- Lamar, E., G. Deblandre, et al. (2001). Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* 15(15): 1885-1899.
- le Noble, F., C. Klein, et al. (2008). Neural guidance molecules, tip cells, and mechanical factors in vascular development. *Cardiovasc Res* 78(2): 232-241.
- Lecuyer, E., S. Herblot, et al. (2002). The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* 100(7): 2430-2440.
- Leimeister, C., A. Externbrink, et al. (1999). Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 85(1-2): 173-177.
- Li, L., I. D. Krantz, et al. (1997). Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 16(3): 243-251.
- Loh, Y. H., Q. Wu, et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38(4): 431-440.
- Ma, L., M. F. Lu, et al. (2005). Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning. *Development* 132(24): 5601-5611.
- MacGrogan, D., M. Nus, et al. (2010). Notch signaling in cardiac development and disease. *Curr Top Dev Biol* 92: 333-365.

- Maltsev, V. A., A. M. Wobus, et al. (1994). Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 75(2): 233-244.
- Martin, J. S., M. C. Dickson, et al. (1995). Analysis of homozygous TGF beta 1 null mouse embryos demonstrates defects in yolk sac vasculogenesis and hematopoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 752: 300-308.
- Martone, R., G. Euskirchen, et al. (2003). Distribution of NF-kappaB-binding sites across human chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12247-12252.
- Medvedeva, Y. A., M. V. Fridman, et al. (2010). Intergenic, gene terminal, and intragenic CpG islands in the human genome. *BMC Genomics* 11: 48.
- Meier-Stiegen, F., R. Schwanbeck, et al. (2010). Activated Notch1 target genes during embryonic cell differentiation depend on the cellular context and include lineage determinants and inhibitors. *PLoS One* 5(7): e11481.
- Murre, C., P. S. McCaw, et al. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58(3): 537-544.
- Naito, A. T., I. Shiojima, et al. (2006). Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(52): 19812-19817.
- Nakagawa, O., D. G. McFadden, et al. (2000). Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13655-13660.
- Nakagawa, O., M. Nakagawa, et al. (1999). HRT1, HRT2, and HRT3: a new subclass of bHLH transcription factors marking specific cardiac, somitic, and pharyngeal arch segments. *Dev Biol* 216(1): 72-84.
- Nakatani, T., E. Mizuhara, et al. (2004). Helt, a novel basic-helix-loop-helix transcriptional repressor expressed in the developing central nervous system. *J Biol Chem* 279(16): 16356-16367.
- Narlikar, L. and I. Ovcharenko (2009). Identifying regulatory elements in eukaryotic genomes. *Brief Funct Genomic Proteomic* 8(4): 215-230.
- Ng, P., C. L. Wei, et al. (2005). Gene identification signature (GIS) analysis for transcriptome characterization and genome annotation. *Nat Methods* 2(2): 105-111.
- Niessen, K., Y. Fu, et al. (2008). Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol* 182(2): 315-325.
- Niessen, K. and A. Karsan (2007). Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 293(1): C1-11.
- Nishiyama, A., L. Xin, et al. (2009). Uncovering early response of gene regulatory networks in ESCs by systematic induction of transcription factors. *Cell Stem Cell* 5(4): 420-433.
- Noggle, S. A., D. Weiler, et al. (2006). Notch signaling is inactive but inducible in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 24(7): 1646-1653.
- Oda, T., A. G. Elkahoun, et al. (1997). Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* 16(3): 235-242.
- Odom, D. T., R. D. Dowell, et al. (2007). Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nat Genet* 39(6): 730-732.
- Ogbourne, S. and T. M. Antalis (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* 331 (Pt 1): 1-14.
- Orlando, V., H. Strutt, et al. (1997). Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* 11(2): 205-214.

- Pichon, B., V. Taelman, et al. (2004). Transcriptional repression by the bHLH-Orange factor XHRT1 does not involve the C-terminal YRPW motif. *Biochim Biophys Acta* 1680(1): 46-52.
- Plessy, C., T. Dickmeis, et al. (2005). Enhancer sequence conservation between vertebrates is favoured in developmental regulator genes. *Trends Genet* 21(4): 207-210.
- Rohwedel, J., K. Guan, et al. (2001). Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicol In Vitro* 15(6): 741-753.
- Ronchini, C. and A. J. Capobianco (2001). Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol* 21(17): 5925-5934.
- Ross, D. A., S. Hannenhalli, et al. (2006). Functional analysis of Hes-1 in preadipocytes. *Mol Endocrinol* 20(3): 698-705.
- Rupp, R. A., L. Snider, et al. (1994). *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev* 8(11): 1311-1323.
- Rutenberg, J. B., A. Fischer, et al. (2006). Developmental patterning of the cardiac atrioventricular canal by Notch and Hairy-related transcription factors. *Development* 133(21): 4381-4390.
- Sakata, Y., C. N. Kamei, et al. (2002). Ventricular septal defect and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor CHF1/Hey2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 16197-16202.
- Sakata, Y., N. Koibuchi, et al. (2006). The spectrum of cardiovascular anomalies in CHF1/Hey2 deficient mice reveals roles in endocardial cushion, myocardial and vascular maturation. *J Mol Cell Cardiol* 40(2): 267-273.
- Seo, S., H. Fujita, et al. (2006). The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development. *Dev Biol* 294(2): 458-470.
- Shaw, G., S. Morse, et al. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* 16(8): 869-871.
- Shimizu, T., A. Toumoto, et al. (1997). Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition. *Embo J* 16(15): 4689-4697.
- Silva, J. and A. Smith (2008). Capturing pluripotency. *Cell* 132(4): 532-536.
- Smale, S. T. and J. T. Kadonaga (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72: 449-479.
- Solozobova, V., A. Rolletschek, et al. (2009). Nuclear accumulation and activation of p53 in embryonic stem cells after DNA damage. *BMC Cell Biol* 10: 46.
- Stegmeier, F., G. Hu, et al. (2005). A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(37): 13212-13217.
- Steidl, C., C. Leimeister, et al. (2000). Characterization of the human and mouse HEY1, HEY2, and HEYL genes: cloning, mapping, and mutation screening of a new bHLH gene family. *Genomics* 66(2): 195-203.
- Sultan, M., M. H. Schulz, et al. (2008). A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* 321(5891): 956-960.
- Tabibzadeh, S. and A. Hemmati-Brivanlou (2006). Lefty at the crossroads of "stemness" and differentiative events. *Stem Cells* 24(9): 1998-2006.
- Takata, T. and F. Ishikawa (2003). Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochem Biophys Res Commun* 301(1): 250-257.

- Takizawa, T., W. Ochiai, et al. (2003). Enhanced gene activation by Notch and BMP signaling cross-talk. *Nucleic Acids Res* 31(19): 5723-5731.
- Tang, Y., S. Urs, et al. (2010). Notch and transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling pathways cooperatively regulate vascular smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 285(23): 17556-17563.
- Taylor, K. L., A. M. Henderson, et al. (2002). Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvasc Res* 64(3): 372-383.
- Timmerman, L. A., J. Grego-Bessa, et al. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 18(1): 99-115.
- Van Wayenbergh, R., V. Taelman, et al. (2003). Identification of BOIP, a novel cDNA highly expressed during spermatogenesis that encodes a protein interacting with the orange domain of the hairy-related transcription factor HRT1/Hey1 in *Xenopus* and mouse. *Dev Dyn* 228(4): 716-725.
- Voronova, A. and D. Baltimore (1990). Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12): 4722-4726.
- Weerkamp, F., T. C. Luis, et al. (2006). Identification of Notch target genes in uncommitted T-cell progenitors: No direct induction of a T-cell specific gene program. *Leukemia* 20(11): 1967-1977.
- Wei, C. L., Q. Wu, et al. (2006). A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 124(1): 207-219.
- Wijaya, E., S. M. Yiu, et al. (2008). MotifVoter: a novel ensemble method for fine-grained integration of generic motif finders. *Bioinformatics* 24(20): 2288-2295.
- Winnier, G. E., T. Kume, et al. (1999). Roles for the winged helix transcription factors MF1 and MFH1 in cardiovascular development revealed by nonallelic noncomplementation of null alleles. *Dev Biol* 213(2): 418-431.
- Wobus, A. M., K. Guan, et al. (2002). Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol* 185: 127-156.
- Wong, E. T., J. L. Kolman, et al. (2005). Reproducible doxycycline-inducible transgene expression at specific loci generated by Cre-recombinase mediated cassette exchange. *Nucleic Acids Res* 33(17): e147.
- Xin, M., E. M. Small, et al. (2007). Essential roles of the bHLH transcription factor Hrt2 in repression of atrial gene expression and maintenance of postnatal cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(19): 7975-7980.
- Yang, A., Z. Zhu, et al. (2006). Relationships between p63 binding, DNA sequence, transcription activity, and biological function in human cells. *Mol Cell* 24(4): 593-602.
- Yoon, K. and N. Gaiano (2005). Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* 8(6): 709-715.
- Yu, M., Y. Liu, et al. (2009). CHF1/Hey2 promotes physiological hypertrophy in response to pressure overload through selective repression and activation of specific transcriptional pathways. *OMICS* 13(6): 501-511.
- Zandstra, P. W., C. Bauwens, et al. (2003). Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Eng* 9(4): 767-778.
- Zeller, K. I., X. Zhao, et al. (2006). Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(47): 17834-17839.

- Zeng, P. Y., C. R. Vakoc, et al. (2006). In vivo dual cross-linking for identification of indirect DNA-associated proteins by chromatin immunoprecipitation. *Biotechniques* 41(6): 694, 696, 698.
- Zeng, X., M. Gray, et al. (2001). TGF-beta1 perturbs vascular development and inhibits epithelial differentiation in fetal lung in vivo. *Dev Dyn* 221(3): 289-301.

10. Anhang

10.1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CMV	Zytomegalie-Virus (Cytomegalovirus)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
EST	expressed sequence tag
FCS	fötales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser (MilliQ-aufgereinigtes Wasser)
IRES	internal ribosomal entry site
kb	Kilo Basenpaare
MEM-NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren (non essential amino acids)
p.a.	per analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PEI	Polyethylenimin
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
ssDNA	Lachs Spermien DNA (salmon sperm DNA)
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
UTR	nicht translatierte Region (untranslated region)

10.2. Genlisten der GO-Analysen

Folgend sind die Zielgene der Microarrays und der ChIP-PET aufgelistet, die bestimmten Signalwegen zugeordnet werden konnten (siehe Kapitel 7.5).

C: Anzahl der Referenzgene; O: Anzahl der Gene, die in der ChIP-PET- und der Referenzgenliste auftreten; E: statistisch erwartete Gene aus der Referenzgruppe; R: Verhältnis der Anreicherung; rawP: p-Wert des hypergeometrischen Tests; adjP: an häufiges Testen angeglichenen p-Wert.

10.2.1. GO-Analyse der regulierten Gene des Microarrays von HEK293 Zellen

Hey1:

DNA Reparaturmechanismen (C=67;O=4;E=0.18;R=21.79;rawP=3.38e-05;adjP=0.0004): ATM, CDKN1B, PMAIP1, TNFRSF10B.

Ovarielle Infertilitätsgene (C=28;O=2;E=0.08;R=26.07;rawP=0.0027;adjP=0.0117): ATM, CDKN1B.

Translationsfaktoren (C=51;O=2;E=0.14;R=14.31;rawP=0.0086;adjP=0.0224): EIF5A, EIF2S3.

Id Signalweg (C=51;O=2;E=0.14;R=14.31;rawP=0.0086;adjP=0.0224): BMP2, HES1.

Seneszenz und Autophagie (C=58;O=2;E=0.16;R=12.59;rawP=0.0110;adjP=0.0238): DKN1B, BMP2.

Zellzykluskontrolle (G1-S) (C=66;O=2;E=0.18;R=11.06;rawP=0.0141;adjP=0.0262): ATM, CDKN1B.

Apoptose (C=81;O=2;E=0.22;R=9.01;rawP=0.0208;adjP=0.0295): PMAIP1, TNFRSF10B.

Zellzyklus (C=85;O=2;E=0.23;R=8.59;rawP=0.0227;adjP=0.0295): ATM, CDKN1B.

Delta-Notch Signalweg (C=84;O=2;E=0.23;R=8.69;rawP=0.0222;adjP=0.0295): HES1, HEY1.

Hey2:

Adipogenese(C=128;O=17;E=4.01;R=4.24;rawP=5.17e-07;adjP=3.83e-05): TGFB1, PLIN2, BMP2, ID3, NR3C1, CISD1, PPARA, KLF15, GTF3A, LPL, HMGA1, CREB1, IRS4, LPIN1, NR2F1, NAMPT, FZD1.

Seneszenz und Autophagie (C=58;O=9;E=1.82;R=4.96;rawP=7.34e-05;adjP=0.0027): TGFB1, BMP2, CREG1, IGFBP5, CDKN1B, PLAT, BML1, MAPK1, CDKN2A.

Id Signalweg (C=51;O=8;E=1.60;R=5.01;rawP=0.0002;adjP=0.0037): BMP2, ID3, HES1, ELK3, ID2, SMAD5, VEGFA, BMP6.

Serotonin-Rezeptor Signalweg (C=19;O=5;E=0.59;R=8.41;rawP=0.0002;adjP=0.0037): GNAS, CREB1, EGR1, NR3C1, MAPK1.

Delta-Notch Signalweg (C=84;O=10;E=2.63;R=3.80;rawP=0.0003;adjP=0.0044): HES1, KAT2B, SPEN, NFKBIA, TLE1, HES5, FHL1, MAPK1, MAML3, HEY1.

Enchondrale Ossifizierung (C=65;O=8;E=2.03;R=3.93;rawP=0.0009;adjP=0.0111): TGFB1, CALM1, SLC38A2, PTCH1, VEGFA, SERPINH1, PLAT, BMP6.

Nukleäre Rezeptoren (C=38;O=6;E=1.19;R=5.05;rawP=0.0011;adjP=0.0116): THRB, NR2F2, NR1D2, NR3C1, NR2F1, PPARA.

DNA Reparaturmechanismen (C=88;O=9;E=2.75;R=3.27;rawP=0.0017;adjP=0.0157): TGFB1, HMGB1, PMAIP1, CDKN1B, BCL2, BCL2L11, MAPK1, CDKN2A, WNT5A.

TGF-beta Rezeptor Signalweg (C=151;O=12;E=4.73;R=2.54;rawP=0.0029;adjP=0.0238): TGFB1, STAMBPL1, SMAD2, KAT2B, HOXA9, SMAD7, SDC2, PPP2R2A, CAV1, SMAD6, ARRB2, FOXG1.

10.2.2. GO-Analyse der ChIP-PET aus HEK293-Zellen

TGFβ-Rezeptor Signalweg (C=155;O=24;E=3.33;R=7.22;rawP=4.40e-14;adjP=3.78e-12): STAMBPL1, RUNX2, PIK3R1, SMAD7, YAP1, ERBB2IP, CDKN1A, FOS, CCNE1, MAP2K3, ZFYVE9, SKIL, TGFB3, SMAD2, FNTA, HOXA9, JUNB, PIAS2, NUP153, NCOA1, SMAD6, PRKAR2A, CDK6, PARD3.

MAPK Signalweg (C=162;O=20;E=3.48;R=5.75;rawP=3.78e-10;adjP=1.28e-08): MAP2K5, AKT1, NR4A1, ACVR1B, MAP4K4, KRAS, FOS, PRKACA, GADD45A, RASGRF2, AKT3, PPP3R1, SRF, PPM1A, PPP3CC, TMEM37, MAP3K5, DUSP7, MAPK12, DUSP1.

Delta-Notch Signalweg (C=86;O=15;E=1.85;R=8.13;rawP=4.48e-10;adjP=1.28e-08): HEY2, HES1, NOTCH1, AKT1, LFNG, SPEN, NFKBIA, PIK3R1, PSEN2, JAG2, ZFPM1, FHL1, RELA, HEY1, MAML3.

Id Signalweg (C=51;O=12;E=1.09;R=10.96;rawP=6.57e-10;adjP=1.41e-08): BMP2, ELK4, HES1, ID3, ID1, IGF1R, ID2, ID4, RELA, CCNE1, PAX5, TCF7L2.

TNFα/NF-kB Signalweg (C=190;O=21;E=4.08;R=5.15;rawP=1.09e-09;adjP=1.71e-08): TBK1, MAP2K5, AKT1, CRADD, REL, DAP, SMARCA4, PTK2, PRKACA, KTN1, DDX3X, KPNA3, NFKBIA, TRAF3, NFKBIZ, GTF2I, RELA, YWHAH, TRAF4, FAF1, NR2C2.

DNA Reperaturmechanismen (C=92;O=15;E=1.97;R=7.60;rawP=1.19e-09;adjP=1.71e-08): HMGB1, MDM2, AKT1, PMAIP1, AKT3, WNT10A, SOD2, BBC3, CDKN1B, BCL2, WNT11, CDKN1A, WNT3, BCL2L11, CDKN2A.

Apoptose (C=82;O=14;E=1.76;R=7.96;rawP=2.28e-09;adjP=2.45e-08): MDM2, AKT1, CRADD, IGF1R, PMAIP1, NFKBIA, PIK3R1, BBC3, BCL2, TRAF3, HRK, BCL2L11, RELA, CDKN2A.

EGFR1 Signalweg (C=178;O=20;E=3.82;R=5.24;rawP=2.02e-09;adjP=2.45e-08): ELK4, MAP2K5, AKT1, RBBP7, PIK3R1, VAV2, RALGDS, KRAS, CEBPA, PLEC1, FOS, MAP2K3, SMAD2, WASL, GRB10, KLF11, PIK3C2B, ERFF1, SPRY2, DUSP1.

Enchondral Ossifizierung (C=65;O=12;E=1.39;R=8.60;rawP=1.27e-08;adjP=1.21e-07): IFT88, CALM2, FGFR3, RUNX2, GLI3, AKT1, IGF1R, CALM1, SLC38A2, BMPR1A, ADAMTS1, PRKACA.

Androgen-Rezeptor Signalweg (C=115;O=15;E=2.47;R=6.08;rawP=2.77e-08;adjP=2.38e-07): HMGB1, MDM2, RUNX2, AKT1, PIAS2, SVIL, NCOA1, RAN, RUNX1, RELA, YWHAH, HIPK3, CCNE1, NCOA2, NR2C2.

10.2.3. GO-Analyse der Microarrays in ES-Zellen und Kardiomyozyten

ES-Hey2 < -1,5

Regulation des Aktinzytoskeletts (C=135;O=11;E=3.78;R=2.91;rawP=0.0015;adjP=0.0275): Chrml, Fgf3, Gst2, Fgf1, Arhgef6, Gsn, Fgf18, Fgd1, Enah, Fgf17, Pip5k1c.

Kontraktion der gestreiften Muskulatur (C=42;O=6;E=1.17;R=5.11;rawP=0.0010;adjP=0.0275): Myom2, Myl9, Smpx, Tpm1, Acta2, Actc1.

Seneszenz und Autophagie (C=56;O=7;E=1.57;R=4.47;rawP=0.0009;adjP=0.0275): Gsn, Serpine1, Gstt2, Atg7, Sh3glb1, Thbs1, Igfbp7.

Id Signalweg (C=48;O=6;E=1.34;R=4.47;rawP=0.0021;adjP=0.0289): Id4, Hes1, Id2, Psmc4, Flt1, Id1.

ES-Hey2 > 1,5

Ovarielle Infertilitätsgene (C=30;O=5;E=0.83;R=6.06;rawP=0.0012;adjP=0.0444): Ptger2, Atm, Syne2, Dazl, Dmcl.

ES-Hey1 und Hey2 < -1,5

Delta-Notch Signalweg (C=88;O=3;E=0.09;R=34.74;rawP=9.29e-05;adjP=0.0005): Tcf3, Nfkb1a, Jag1.

Regulation des Aktinzytoskeletts (C=160;O=3;E=0.16;R=19.11;rawP=0.0005;adjP=0.0008): Fgf3, Fgf17, Enah.

Wnt Signalweg (C=135;O=3;E=0.13;R=22.64;rawP=0.0003;adjP=0.0008): Sox1, Tcf3, Sfrp1.

Id Signalweg (C=51;O=2;E=0.05;R=39.96;rawP=0.0012;adjP=0.0015): Tcf3, Id2.

Pluripotenz-Signalwege in ES-Zellen (C=120;O=2;E=0.12;R=16.98;rawP=0.0063;adjP=0.0063): Fgf3, Fgf17.

KM-Hey2 < -1,5

Eicosanoid-Synthese (C=17;O=3;E=0.20;R=15.32;rawP=0.0009;adjP=0.0234): Ptgs2, Ptgs1, Alox15.

IL-1 Signalweg (C=36;O=3;E=0.41;R=7.23;rawP=0.0081;adjP=0.0494): Il1rap, Irak3, Capn1.

Myometrium: Relaxation und Kontraktion (C=152;O=6;E=1.75;R=3.43;rawP=0.0084;adjP=0.0494): Ryr3, Arrb1, Atf5, Acta1, Rgs4, Adcy9.

Nukleäre Rezeptoren (C=38;O=3;E=0.44;R=6.85;rawP=0.0095;adjP=0.0494): Nr3c1, Rorc, Nr2f2.

Ptfla-verwandter Signalweg (C=11;O=2;E=0.13;R=15.78;rawP=0.0068;adjP=0.0494): Kat2b, Prox1.

Publikationen

"Hey bHLH factors in cardiovascular development."

Wiese C, **Heisig J**, Gessler M. *Pediatr Cardiol.* 2010 Apr;31(3):363-70

"TMEM16B, a novel protein with calcium-dependent chloride channel activity, associates with a presynaptic protein complex in photoreceptor terminals."

Stoehr H, **Heisig JB**, Benz PM, Schoeberl S, Milenkovic VM, Strauss O, Aartsen WM, Wijnholds J, Weber BH, Schulz HL. *J Neurosci.* 2009 May 27;29(21):6809-18.

Mündliche Präsentationen und Poster

Präsentationen:

03/2009 Internationaler Kongress der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie
(GfE), Hannover
"Identification of novel target genes for Hey bHLH transcription factors."

Poster:

12/2009 Klausurtagung des Rudolf Virchow Zentrums, DFG Forschungszentrum
für Experimentelle Biomedizin, Würzburg
"Identification of novel target genes for Hey bHLH transcription factors."

Mai 2007 Klausurtagung des Rudolf Virchow Zentrums, DFG Forschungszentrum
für Experimentelle Biomedizin, Würzburg
"Cardiac specific target genes of Hey transcriptional repressors."

Mär 2005 Kongress der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Halle/Saale
"Identification and characterization of members of a novel family of
transmembrane proteins with neuronal function."

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Gessler, der mir diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte. Er begleitete sie stets mit großem Interesse und Unterstützung, wusste jederzeit eine Antwort und viele neue Möglichkeiten weiterzuforschen. Danke für die gute Zusammenarbeit!

Bei Robert Hock möchte ich mich für die unkomplizierte Übernahme der Zweitgutachtens bedanken.

Ein Dank geht an Prof. Dr. Chia Lin Wei und Xiaodong Zhao aus Singapur für die CHIP-PET Analysen und für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente, die zu tollen Ergebnissen geführt haben.

Frau Dr. Susanne Kneitz möchte ich für die freundliche und äußerst hilfreiche Zusammenarbeit bei den Microarray Analysen danken.

Danke den Mitarbeitern des Lehrstuhls PCI für die Diskussionen und Einführungen in so manche Methoden, Geräte oder Chemikalien (oder das Ausleihen derselben) und für die netten Abende außerhalb des Laboralltags!

Ich möchte mich bei allen Arbeitskollegen der Entwicklungsbiochemie für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken und dass wir sowohl über die Arbeit, als auch über alles andere reden und lachen konnten. Ich habe die Zeit sehr genossen! Ich möchte mich bei Anja bedanken für die vielen real-times, die sie immer mit besonderer Sorgfalt und Enthusiasmus pipettiert hat und auch für die schönen Sommerabende bei ihr im Garten, die immer etwas besonderes waren. Ein besonderer Dank geht auch an Traudel für die vielen Stunden, Feiertage und Wochenenden, die wir gemeinsam oder abwechselnd in der Zellkultur verbracht haben und auf die ich mich immer verlassen konnte. Ich hoffe ich konnte dir auch nur im Ansatz zurückgeben, wie du mir geholfen hast!

Ein herzliches Dankeschön geht an Sukanya Narasimhan fürs Korrekturlesen.

Mein Dank geht auch an meine Familie, die mich immer unterstützt hat und mir viel Interesse, Rückhalt und bedingungsloses Verständnis entgegengebracht hat. Danke Cordi fürs Drucken und die Abgabe aus der Ferne. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Nicht zuletzt geht mein Dank an Martin, der mir immer verständnisvoll zur Seite stand und nie an mir gezweifelt hat, mit dem ich auch beim Sonntagsfrühstück über Methoden diskutieren konnte und danach einfach im Labor verschwinden konnte... Jetzt freu ich mich auf unsere gemeinsame Zukunft!

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Identifizierung neuer Zielgene der Hey bHLH Transkriptionsfaktoren“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Unterschrift