

Neue Aspekte von Nestin-exprimierenden Zellen in der Gefäßmuskulatur

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Grumbach, Alina Marie
aus Darmstadt

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Anatomie und Zellbiologie

AG Signaltransduktion

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorff

Gutachter: PD Dr. Johannes Kalder

Tag der Disputation: 11.11.2022

INHALTSVERZEICHNIS

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
III. LISTE DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Lungenentwicklung	1
1.1.1 Embryonale und fetale Phase.....	2
1.1.2 Die postnatale Phase	4
1.1.3 Die vaskuläre Entwicklung der Lunge.....	4
1.2 Progenitorzellen der Gefäßwand	7
1.2.1 Stammzellen in der Gefäßwand.....	7
1.3 Charakterisierung des Stammzellmarkers Nestin	11
1.3.1 Das Intermediärfilament Nestin.....	11
1.3.2 Vorkommen von Nestin-exprimierenden Zellen in verschiedenen Organen	13
1.3.3 Die Rolle von Nestin während der Entwicklung und im Adulten	13
1.3.4 Die Expression von Nestin in der Gefäßwand.....	14
1.4 Die DNA und ihre Modifikationen	17
1.4.1 DNA und ihre Verpackung	17
1.4.2 Modifikationsmöglichkeiten der DNA	18
1.4.3 Funktion von Histon-Methyltransferasen	21
1.4.4 Der Zusammenhang von Histonmethylierung und verschiedenen Erkrankungen.....	28
1.4.5 Lysin-spezifische Histon-Methyltransferasen am Beispiel von SETDB1.....	29
2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	34
3 MATERIAL UND METHODEN	35
3.1 Materialien	35
3.1.1 Untersuchungsmaterial	35
3.2 Geräte	36

3.3	Antikörper	36
3.3.1	Primärantikörper in der Immunhistochemie.....	36
3.3.2	Primärantikörper für die Immunfluoreszenz.....	36
3.3.3	Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz	37
3.4	Methoden	38
3.4.1	Azanfärbung.....	38
3.4.1.1	Verwendete Chemikalien, Puffer und Lösungen	38
3.4.1.2	Durchführung	38
3.4.2	Immunhistochemie.....	40
3.4.2.1	Verwendete Chemikalien, Puffer und Lösungen	40
3.4.2.2	Durchführung	40
3.4.3	Immunfluoreszenz	42
3.4.3.1	Verwendete Chemikalien, Puffer und Lösungen	42
3.4.3.2	Durchführung	42
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Nestin-Expression in der Lunge bei SETDB1-Knockout-Feten	44
4.1.1	Nestin-Expression in den Lungengefäßen bei SETDB1-Knockout-Feten	44
4.1.2	Verifizierung der SETDB1-Knockout-Zellen anhand von Nestin-GFP innerhalb der Gefäßwand.....	47
4.1.2.1	Fehlende Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Endothelzellmarker CD31 in Lungengefäßen bei homozygoten SETDB1-Knockout-Feten .	48
4.1.2.2	Fehlende Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Endothelzellmarker CD31 in Kapillaren der Lunge bei homozygoten SETDB1-Knockout- Feten.....	50
4.1.2.3	Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Gefäßmuskelzellmarker SMA in Lungengefäßen von homozygoten SETDB1-Knockout-Feten.....	52
4.2	Verifizierung der Proliferationsfähigkeit von Nestin-exprimierenden Zellen mit SETDB1-Knockout	56

4.3	Unterschiede in Lungenmorphologie und -entwicklung bei Wildtyp-Mäusen und SETDB1-Knockout-Mäusen in Nestin-exprimierenden Zellen	60
4.3.1	Unterschiede in der Lungenmorphologie und -entwicklung bei Wildtyp- und SETDB1-Knockout-Feten in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von 18.5 dpc	61
4.3.2	Unterschiede in der Lungenmorphologie und -entwicklung bei Wildtyp- und SETDB1-Knockout-Mäusen in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von d1	63
4.3.3	Unterschiede in der Lungenmorphologie und -entwicklung anhand von Querschnitten auf Höhe des kardiopulmonalen Systems bei Wildtyp- und SETDB1-Knockout-Mäusen in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von 18.5 dpc und d1	65
4.4	Unterschiede bezüglich der Anzahl an proliferierenden Zellen bei WT-Feten und SETDB1^{p/p} in Nes⁺-Feten im Alter von 18.5 dpc sowie postnatalen Mäusen im Alter von d1	68
5	DISKUSSION	71
5.1	Identifizierung von Nestin-exprimierenden Zellen mit SETDB1-Knockout in der Lunge	71
5.2	Nestin-exprimierende Zellen als Vorläuferzellen der Gefäßwand?	75
5.3	Der Einfluss von SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen auf die Lungenentwicklung und -morphologie	77
5.4	Die Histon-Methyltransferase SETDB1 und ihr Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit im Gewebe	81
6	ZUSAMMENFASSUNG	85
7	SUMMARY	87
8	LITERATURVERZEICHNIS	89
9	ERKLÄRUNG	110
10	DANKSAGUNG	111

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Übersicht über die Stadien der Lungenentwicklung	2
Abbildung 2: Strukturelle Veränderungen in den verschiedenen Stadien der pulmonalen Entwicklung	3
Abbildung 3: Bildliche Darstellung der Gefäßanbindung eines 34-Tage alten humanen Embryos	5
Abbildung 4: Schichten der Gefäßwand	8
Abbildung 5: Schichten der Gefäßwand samt der bisher beschriebenen „Stammzell- Nischen“	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von Nestin	11
Abbildung 7: Unterschiede im strukturellen Aufbau zwischen Nestin und Vimentin....	12
Abbildung 8: Zell-Gefäßarchitektur von Arteriole zu Venole sowie Perizyten- Endothelzell-Interaktion.....	16
Abbildung 9: Die Verpackung der DNA und der Aufbau des Nucleosoms	18
Abbildung 10: Histonmodifikationen am Beispiel von H3 und H4.....	19
Abbildung 11: Umwandlung von Chromatin zu stillgelegtem Heterochromatin	20
Abbildung 12: Die Aminosäuren Arginin und Lysin samt ihrer Modifizierungen.....	22
Abbildung 13: Aminosäure-Sequenz der SET- und post-SET-Domäne verschiedener Histon-Methyltransferasen	23
Abbildung 14: Zusammenstellung der bisher am besten charakterisierten Positionen der Lysin-Methylierung	24
Abbildung 15: Darstellung verschiedener Histon-Methyltransferasen mit SET-Domäne bei Maus (Mm) und Mensch (Hs) sowie die jeweiligen Spezifitäten	29
Abbildung 16: Darstellung der SETDB1 Proteinstruktur beim Mensch.....	30
Abbildung 17: Nestin-GFP-exprimierende Zellen mit homozygotem und heterozygotem SETDB1-Knockout in Lungengefäßen verschiedener Größe	45
Abbildung 18: Lokalisation von Nestin-GFP in Kapillaren der Lunge von Feten mit homozygotem SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen	46
Abbildung 19: fehlende Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Endothelzellmarker CD31 bei homozygoten SETDB1-Knockout-Feten in Nestin- exprimierenden Zellen	49

Abbildung 20: fehlende Kolokalisation von dem Endothelzellmarker CD31 und Nestin-GFP in Kapillaren bei Feten mit homozygotem SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen	51
Abbildung 21: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA in glatten Gefäßmuskelzellen bei Feten mit homozygotem SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen	53
Abbildung 22: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA in glatten Gefäßmuskelzellen unterschiedlich großer Gefäße bei Feten mit homozygotem SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen	54
Abbildung 23: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA in glatten Gefäßmuskelzellen eines Lungengefäßes bei Feten mit homozygotem SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen	55
Abbildung 24: Kolokalisation von Nestin-GFP, SMA und PCNA in glatten Gefäßmuskelzellen bei heterozygotem Feten mit SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von 18.5 dpc	57
Abbildung 25: Kolokalisation von Nestin-GFP, SMA und PCNA in glatten Gefäßmuskelzellen bei einer zelltypunabhängigen transgenen Nestin-GFP-Maus im Alter von d1	58
Abbildung 26: Kolokalisation von Nestin-GFP, SMA und PCNA in glatten Gefäßmuskelzellen bei homozygotem Feten mit SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von 18.5 dpc	59
Abbildung 27: Unterschiede in der Lungenstruktur bei Wildtyp-Feten im Vergleich zu homozygoten und heterozygoten SETDB1-Knockout-Feten in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von 18.5 dpc	62
Abbildung 28: Unterschiede in der Lungenstruktur beim Wildtyp im Vergleich zu SETDB1 ^{+p} und SETDB1 ^{p/p} in Nes ⁺ -Mäusen im Alter von d1	64
Abbildung 29: Lungenquerschnitt einer Maus	65
Abbildung 30: Querschnitte auf Höhe des kardiopulmonalen Systems bei WT-, SETDB1 ^{+p} in Nes ⁺ - und SETDB1 ^{p/p} in Nes ⁺ - Mäusen im Alter von d1	66
Abbildung 31: Längsschnitt auf Höhe des kardiopulmonalen Systems bei WT-, SETDB1 ^{+p} in Nes ⁺ - und SETDB1 ^{p/p} in Nes ⁺ - Feten im Alter von 18.5 dpc	67

Abbildung 32: Unterschiede in Bezug auf die Anzahl proliferierender Zellen zwischen Wildtyp- sowie homozygoten SETDB1-Knockout-Feten im Alter von 18.5 dpc	69
Abbildung 33: Unterschiede in Bezug auf die Anzahl proliferierender Zellen zwischen Wildtyp-Mäusen sowie SETDB1 ^{p/p} in Nes ⁺ - Mäusen im Alter von d1 ..	70

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Arteria (lat.) /Arterie
Ab	Aortenbogen
Abb.	Abbildung
Ac	Acetylierung
AK	Antikörper
ANK	Ankyrin
Ao	Aorta
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
At	Atrium (lat.)
B	Bronchiolus (lat.) /Bronchiolen
BDNF	brain-derived-neurotropic factor (engl.)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CARM1	coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (engl.)
Cav-1 α	caveolin-1alpha
CD31	cluster of differentiation 31 (engl.)
CD34	cluster of differentiation 34 (engl.)
Chromo	Chromodomäne
c-kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
c-MYC	zelluläres Myelocytomatose-Onkogen
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
C-ter	C-Terminus
Cy3	Cyanin-Farbstoff 3 (Indocarbocyanin)
Cy5	Cyanin-Farbstoff 5 (Indodicarbocyanin)
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidine

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
DOT1/Dot1	disruptor of telomeric silencing-1 (engl.)
DOT1L	Dot1-like protein (engl.)
dpc	days post coitum (engl.)
E	Embryonaltag
e	Oesophagus (lat.)
E _n	Glutaminsäure-reicher Abschnitt
ε	Epsilon
EC	Endothelzelle
EDS	Ethanmethansulphonat
EMT	epithel-mesenchymal Transition (engl.)
EPC	endotheliale Progenitorzellen
ESC	embryonale Stammzellen
ESET	Erg-associated SET domain (engl.)
ETOH	Ethanol
EZH	Enhancer-of-zest Homolog (engl.)
G	Lungengefäß
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GLP	G9a-like protein
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histon
h	Stunde / (n)
HCl	Chlorwasserstoff/ Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
HMT	Histon-Methyltransferase
HP1	histone protein 1 (engl.)
Hs	human (lat.)
HSPC	hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
HTT-Gen	Huntington-Gen
H ₂ O	Wasser

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IF	Intermediärfilament
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor (engl.)
K	Lysinrest
kD	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kn	Kapillarnetzwerk
K.O.	Knockout (engl.)
Lk	Lungenknospe
Lys	Lysin
M	Molar
MBD	Methyl-CpG-Bindedomäne
MC	Muskelzelle
MCF7	Michigan Cancer Foundation 7 (engl.)
Me / (me)	Methylierung
MeCP2	Methyl-CpG-Bindeprotein 2
mg	Milligramm
min	Minute / (n)
ml	Milliliter
Mm	Maus
N	Nukleolus (lat.) / Zellkern
n	Stichprobengröße
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NES	nuclear export signal (engl.) / nukleäres Exportsignal
NG2	neural/glial antigen 2 (engl.)
NLS	nuclear localization signal (engl.) / Kernlokalisierungssignal
NSCLC	nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
N-ter	N-Terminus (lat.)
OCT3/4	octamer binding transcription factor 3/4 (engl.)
o.g.	oben genannt
P	Perizyt

p	postnatal (engl.)
p/p	homozygot
Pa	Pulmonalarterie
PAP	Peroxidase Anti-Peroxidase
PB	phosphate buffer (engl.)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
Pc-Protein	Polycomb-Protein
PCNA	proliferating-cell-nuclear-antigen (engl.)
PDGF	platelet-derived growth factor (engl.)
PDGFR-β	platelet-derived growth factor receptor beta (engl.)
PECAM1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (engl.)
PFA	Paraformaldehyd
Ph	Phosphorylierung
pH	pondus hydrogenii (lat.) / Potential des Wasserstoffs
PRC	polycomb repressive complex (engl.)
PRMT	Protein-Arginin Methyltransferase
Pv	Pulmonalvene
RAC	Radial-alveolar Counts (engl.)
RGS-5	Regulator of G-protein signaling 5 (engl.)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
Sca-1	Stammzellen-Antigen-1
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (lat.)
SET/Set	Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax
SETDB1	SET Domain bifurcated 1 (engl.)
SETDB1 ^{+p} in Nes ⁺	heterozygote SETDB1-Knockouts in Nestin-exprimierenden Zellen
SETDB1 ^{p/p} in Nes ⁺	homozygote SETDB1-Knockouts in Nestin-exprimierenden Zellen
SIM	SUMO-Interaktionsmotiv
SMA	smooth muscle actin (engl.)
SMC	smooth muscle cell (engl.) / glatte Muskelzellen
SOX2	SRY-Box Transcription factor 2 (engl.)

SUMO	small ubiquitin-like modifiers (engl.)
SUV39H1	suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (engl.)
TTD	triple tudor domain (engl.)
u.a.	unter anderem
V	Vene
v.a.	vor allem
Vd	Vorderdarm
VEGFR2	vascular endothelial growth factor-rezeptor 2 (engl.)
versch.	verschiedene / (r)
VSMC	vascular smooth muscle cell (engl.)
VW-EPCs	vascular wall-resident EPCs (engl.)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
+/p	heterozygot
%	Prozent
*	Kapillare

III. LISTE DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN

Ammoniumchlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Anilin	VWR, Darmstadt, Deutschland
Anilinblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Azokarmin G	Chroma, Stuttgart, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dako EnVision+System-HRP	DAKO, Carpinteria, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche, Mannheim, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %)	Berkel AHK, Ludwigshafen, Deutschland
Eukitt Quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glukose (10 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glukose-Oxidase	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol (96 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Labelled Polymer Anti-mouse	Dako EnVision + System-HRP, USA
Labelled Polymer Anti-Rabbit	Dako EnVision + System-HRP, USA
Methanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nickelsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normalseren 2 % versch. Tierspezies	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Orange G	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Peroxidase-markiertes Polymer	DAKO, Hamburg, Deutschland

Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Super Frost Plus Objektträger	R.Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wolframatophosphorsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

1 EINLEITUNG

1.1 Lungenentwicklung

Die Entwicklung der Lunge hat ihren Ursprung im Vorderdarm des Endoderms, einem Gewebe aus dem viele weitere Organe ihren Ursprung finden (Herriges and Morrisey 2014). Sowohl das Überleben des Vorderdarms, als auch die weitere Differenzierung steht unter dem Einfluss vieler Transkriptionsfaktorgene, die frühzeitig im Endoderm gebildet werden (Kuo et al. 1997). Über eine Vielzahl von Verzweigungen in Kombination (Koordination) mit Gefäßentwicklung entsteht ein baumartiges Gerüst aus epithelialen Kanälen, die sich schließlich zu Atemwegen und Alveolen differenzieren (Cardoso und Lü 2006).

Die Lungenentwicklung lässt sich in drei große Hauptphasen einteilen: die embryonale, die fetale und die postnatale Phase (Schittny 2017). Während in der Embryonalphase die Organogenese stattfindet (Schittny 2017), kommt es in der fetalen Phase zur finalen Anlage des luftleitenden Bronchialbaums inklusive des gasaustauschenden terminalen Baumes mit Anlage der Alveolen (Duncker und Kummer 2008). Diese Phase lässt sich nochmals unterteilen in eine pseudoglanduläre, eine kanalikuläre und eine sakkuläre Phase (Schittny 2017). In der postnatalen Phase kommt es schließlich zur Ausreifung der Alveolen und der Mikrovaskularisation und somit zur Ausbildung der adulten Lungenstruktur (Duncker und Kummer 2008, Schittny et al. 1998/2008).

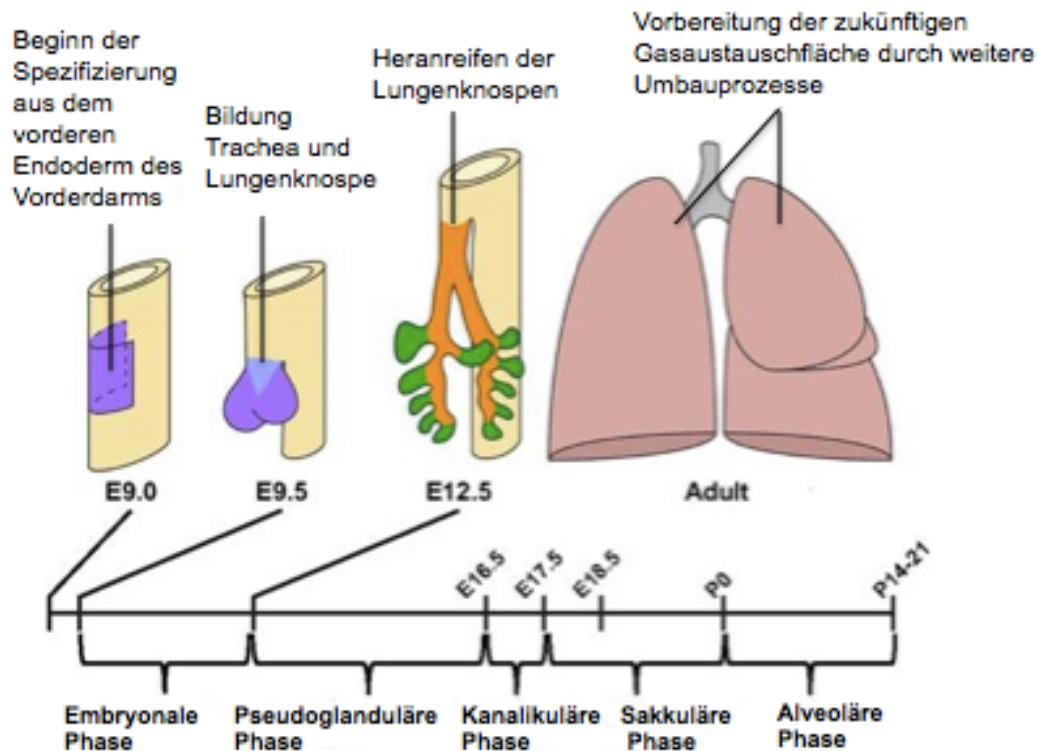


Abb. 1: Übersicht über die Stadien der Lungenentwicklung.

Abbildung modifiziert nach Herriges und Morrisey 2014.

1.1.1 Embryonale und fetale Phase

Sowohl die Lunge als auch die Trachea entwickeln sich aus dem Vorderdarm des Endoderms. Dieser Prozess beginnt bei der Maus ab dem Embryonaltag E9.5 mit der Ausstülpung von Epithelzellen und somit der Bildung der Trachea sowie zweier Lungenknospen.

Im Anschluss daran kommt es zu einem komplexen Verzweigungsprozess, der sogenannten pseudoglandulären Phase (E12.5-E16.5), in dem die beiden Lungenknospen zu einem baumartigen System aus Luftwegen und terminalen Bronchien heranreifen (Herriges und Morrisey 2014). In den beiden darauf folgenden Phasen, der kanalikulären (E16.5-E17.5) und der sakkulären Phase (E18.5-postnataler Tag (p) 5), kommt es zur weiteren Verzweigung und Verengung der terminalen Bronchien sowie zu der Ausbildung von epithelialen Bündeln, den Sacculi, die letztendlich zu Alveolen heranreifen und somit die zukünftige Gasaustauschfläche bilden (Herriges und Morrisey 2014). In

diesen Phasen kommt es also zum Heranreifen der Lungenstruktur und zur Vorbereitung auf das extrauterine Leben. Neben dem zunehmenden Heranreifen der Vaskularisation kommt es zur Reduktion des interstitiellen Gewebes und zur Differenzierung der Epithelzellen zu Typ I und Typ II Zellen. Ebenso kann eine Größenzunahme des pulmonalen Parenchyms sowie ein Ausdünnen der Septen zwischen den Lufträumen beobachtet werden (Post und Copland 2002).

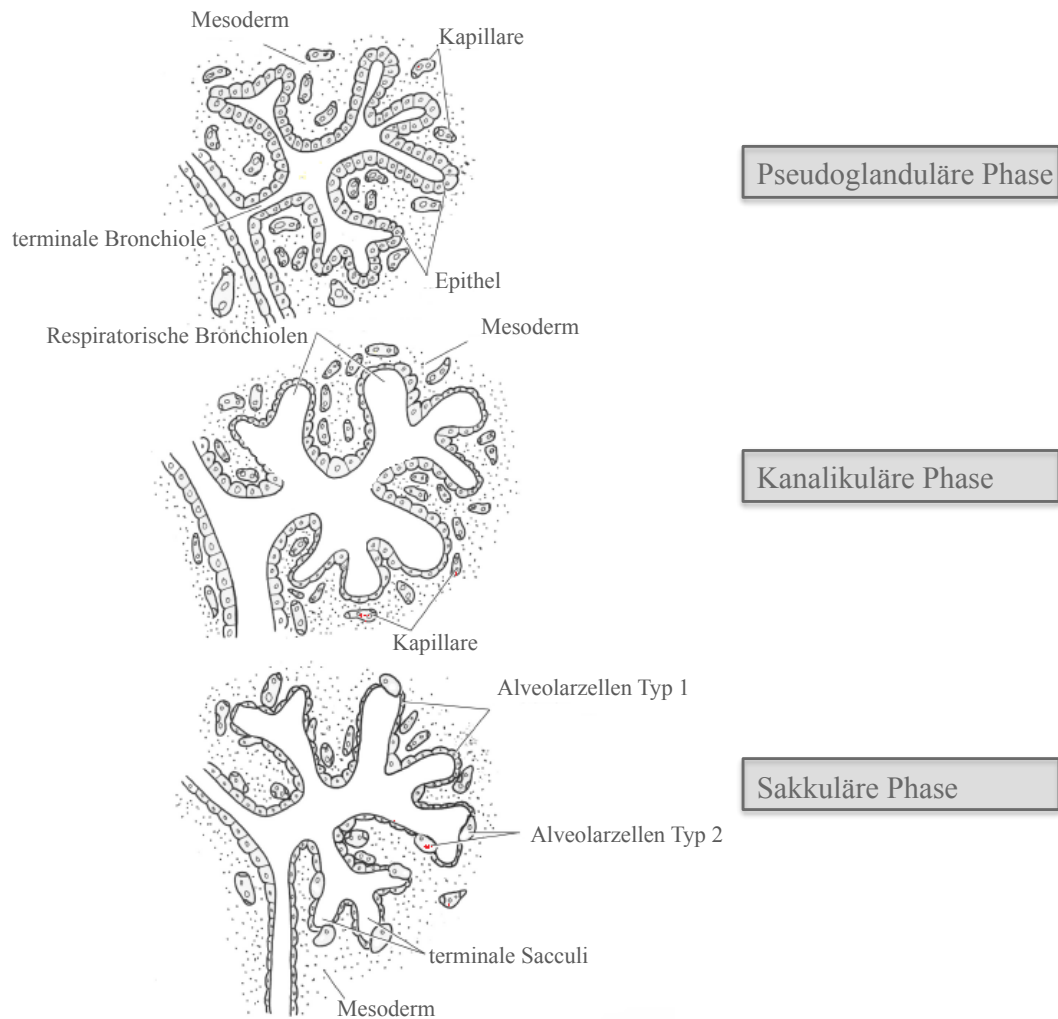


Abb. 2: Strukturelle Veränderungen in den verschiedenen Stadien der pulmonalen Entwicklung.

*Pseudoglanduläre Phase (oben), kanalikuläre Phase (mitte), sakkuläre Phase (unten).
Abbildung modifiziert nach McGeady et al. 2012.*

1.1.2 Die postnatale Phase

Bei der Geburt ist die bisher ausgebildete Lunge noch unreif. Dies beruht auf dem Fakt, dass die gasaustauschenden Alveolen zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend ausgebildet sind (Post und Copland 2002). Während der Alveolarisation kommt es zur Vergrößerung der Gasaustauschfläche durch Aussprossen neuer Septen in den bereits bestehenden terminalen Luftwegen (Schittny et al. 2008). Der Gasaustausch bei neugeborenen Mäusen findet also in sogenannten „primären Sacculi“ statt, welche im Unterschied zu den ausgereiften Alveolen glatte und dicke Wände besitzen und von der Größe her die der Alveolen übersteigen (Amy et al. 1977).

Die Wände der primären Sacculi besitzen im Gegensatz zu den reifen Alveolen ein doppeltes Kapillarnetzwerk. Der Beginn des Umbauprozesses findet in den ersten zwei bis drei Tagen mit der Bildung von Brücken statt, die wie Ausläufer ins Lumen ragen (Amy et al. 1977). Zu einer erneuten offensichtlichen Veränderung der Lungenstruktur kommt es dann am dritten bzw. vierten postnatalen Tag. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zur Ausdehnung der Brücken (sekundären Septen), die die dickwandigen Primärsepten der Sacculi in Untereinheiten und Alveolen unterteilen. Durch diese Umbauvorgänge wird die Gasaustauschfläche um ein Vielfaches vergrößert (Schittny et al. 1998). Dieses „Ausreifen“ der primären Sacculi zu Alveolen findet nicht an allen Orten zur selben Zeit statt, sondern erstreckt sich ca. bis zum vierzehnten postnatalen Tag, an dem die Lunge ein ähnliches Aussehen zu der Adulten aufweist (Amy et al. 1977).

1.1.3 Die vaskuläre Entwicklung der Lunge

Die Entwicklung der vaskulären Lungenstruktur ist abhängig von einer Vielzahl an positiven und negativen Mediatoren, welche in einer feinen Balance zueinander stehen müssen. Bei den beeinflussenden Molekülen handelt es sich zum Beispiel um Proteine der extrazellulären Matrix, Zelladhäsionsproteine, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (Warburton et al. 2000).

Frühere Studien vermuteten, dass die Gefäßstruktur der Lunge sich zum Zeitpunkt der Ausbildung der Lungenknospen durch ein Auswandern von bereits existierenden Blutgefäßen entwickelt (Angiogenese) (Hislop 2002). DeMello et al. (1997) postulierten, dass vor allem die proximalen Blutgefäße sich durch den Prozess der Angiogenese entwickeln, jedoch die peripheren durch den Prozess der Vaskulogenese aus Mesenchymzellen hervorgehen und sich mit zentralen Arterien verbinden.

Die Mesenchymzellen um die Lungenknospe herum bilden einen sogenannten vaskulären Plexus, welcher nach oben hin Kontakt zum Aortenbogen und nach unten mit dem linken Vorhof aufnimmt. Während der Verzweigung und Entstehung neuer Atemwege bildet sich ein neuer Kapillarplexus um jede einzelne neu geformte Lungenknospe herum und verbindet sich mit der Lungenzirkulation.

Letztendlich entsteht der Gefäßbaum durch steten Umbau, Rückbildung und Angiogenese der anfänglich geformten Gefäße nach der Vorlage des Bronchialbaumes (Schittny 2017).

Die pulmonalen Arterien verlaufen parallel zu den Aufzweigungen des Bronchialbaums, wohingegen die sich später ausbildenden Venen an der Oberfläche der Lungensegmente intersegmental bzw. interlobulär im Bindegewebe eingebettet verlaufen (Duncker 1990).

Hislop und Reid beschrieben in zwei früheren Arbeiten (1972/1973), dass die präazinären Arterien und Venen bereits in der 16. Schwangerschaftswoche ausgebildet sind, wohingegen die intraazinären Gefäße sich erst später ausbilden.

Ein Großteil sogar wird wie die Alveolargänge und die Alveoli erst nach der Geburt gebildet (Haworth 1995).

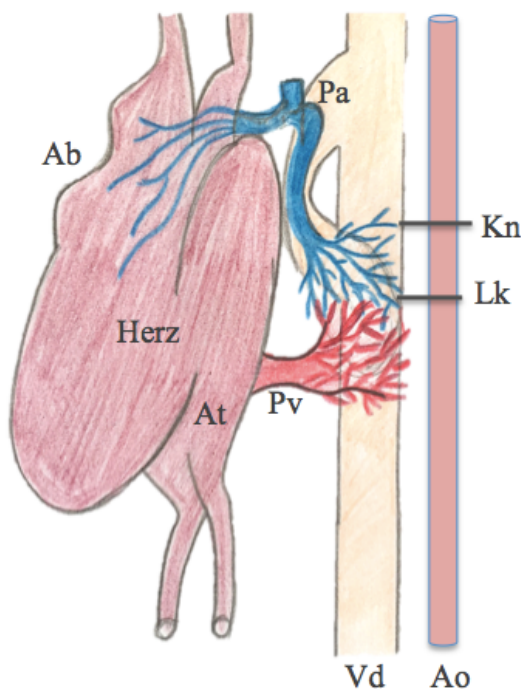


Abb. 3: Bildliche Darstellung der Gefäßanbindung eines 34-Tage alten humanen Embryos.

Eigene Abbildung nach Vorlage von Dr. Susan Hall in Hislop 2002. Pa (Pulmonalarterie), Pv (Pulmonalvene), Ao (Aorta), Ab (Aortenbogen), At (Atrium), Vd (Vorderdarm), Kn (Kapillarnetzwerk), Lk (Lungenknospe).

In der weiteren Phase der Lungenentwicklung nach der Geburt sieht man neben der Größenentwicklung der Lunge samt ihres Bronchialbaumes und der Ausbildung der Alveolen auch eine Veränderung der vaskulären Strukturen (Schittny 2017). Die Wandstärke passt sich den zunehmenden Gefäßdurchmessern postpartal an (Duncker 1990).

Im Unterschied zur adulten Lunge weisen die Gefäße der fetalen Lunge einen sehr viel höheren Anteil an muskulären Zellen und eine stärkere Wanddicke auf (Hislop und Reid 1972).

Man unterscheidet beim Wandaufbau der Arterien einen elastischen Typ und einen muskulären Typ. Die Arterien des elastischen Typs befinden sich in der herznahen Region, wohingegen die anschließenden Arteriensegmente vom muskulären Typ sind (Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

In Abhängigkeit von den intravasalen Druckverhältnissen verändert sich die Wanddicke der Arterien. Dementsprechend beobachtet man im fetalen Kreislauf gleiche Druckverhältnisse und eine ähnliche Wandstruktur in der A. pulmonalis samt ihrer großen Ausläufer wie in der Aorta. Das ist vor allem auf den offenen Ductus arteriosus zurückzuführen und ändert sich erst nach der Geburt (Duncker 1990).

Bei den peripheren kleinen arteriellen Gefäßen hingegen beobachtet man hohe Gefäßwiderstände und niedrige Strömungsfrequenzen. Dies ist auf den muskulären Typ (und somit die stärkere Kontraktilität) zurückzuführen und für die geringe Durchblutung der Lunge in der Fetalperiode verantwortlich (Hislop und Reid 1972). Bei der Geburt tragen genau diese peripheren Gefäße durch Dilatation und somit größere Gefäßdurchmesser zu dem Widerstandsverlust bei. Als Folge des Verschlusses des Ductus arteriosus und der Entfaltung und Öffnung des pulmonalen Gefäßsystems resultieren höhere Flussraten und niedrigere Druckverhältnisse und es kommt zu einem Umbau der Gefäßwände auf die sehr viel geringere Wanddicke der adulten Pulmonalarterien (Duncker 1990).

Andererseits bekommen auch mit zunehmender Lungengröße periphere, ursprünglich muskelfreie Arterien und Venen im Zusammenhang mit einer Zunahme des Durchmessers eine Wand mit komplettem bzw. partiellem Muskelbesatz (Duncker 1990).

1.2 Progenitorzellen der Gefäßwand

1.2.1 Stammzellen in der Gefäßwand

Stammzellen werden in der Literatur beschrieben als Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erneuern und die als Quelle vieler verschiedener anderer Zelllinien dienen (Warburton et al. 2008).

Stammzellen nehmen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und dem adulten Heranwachsen (Zhang et al. 2018 a) sowie als therapeutisches Target vieler verschiedener Erkrankungen (Yang et al. 2017) ein.

Man unterscheidet die embryonalen Stammzellen von den adulten Stammzellen. Bei den embryonalen Stammzellen handelt es sich um pluripotente Zellen, welche sich unbegrenzt vermehren (Walter 2015 b) und in alle unterschiedlichen Gewebearten ausdifferenzieren können (Jaenisch und Young 2008). Bei den adulten multipotenten oder unipotenten Stammzellen hingegen ist die Möglichkeit der Ausdifferenzierung begrenzt auf bestimmte Gewebearten (Wagers und Weissman 2004, Jaenisch und Young 2008). Die Bildung eines Gesamtorganismus ist daher nicht mehr möglich.

Eine wichtige Unterscheidung zwischen adulten Stammzellen und embryonalen Stammzellen oder Tumorzellen wurde von Warburton et al. 2008 aufgezeigt. Adulte Stammzellen stellen keine unendliche Ressource für Reparaturvorgänge durch die im Alter abnehmende Telomerlänge dar.

Demzufolge besitzen die endogenen Stammzellen ab einem bestimmten Punkt im Leben eine limitierte Einsatzmöglichkeit und somit Reparaturmöglichkeit.

Folkman et al. (1989) postulierten vor mehreren Jahrzehnten, dass der Prozess der Gefäßneubildung beim Adulten durch Aufkeimen/Sprossen aus bereits existierenden Gefäßen möglich sei (Angiogenese).

Viele Jahre wurde angenommen, dass die adulten Gefäßwandzellen ausdifferenziert und somit stillgelegt seien (zur Übersicht siehe Psaltis und Simari 2015). Dieser Gedankengang veränderte sich durch angiogenetische Forschung, wobei die Existenz von endothelialen Progenitorzellen (EPCs) im peripheren Blut von Asahara et al. 1997 belegt wurde.

In vielen darauffolgenden Arbeiten wurde zunächst das Knochenmark als eine Art Lager für EPCs beschrieben, welche von dort aus mobilisiert und über die vaskuläre Zirkulation zu den Arealen der Gefäßneubildung gebracht werden (Shi et al. 1998).

Doch auch außerhalb des Knochenmarks wurde in weiteren Studien die Existenz von multipotenten Stammzellen/Progenitorzellen für Endothelzellen in der Gefäßwand beschrieben (Alessandri et al. 2001, Zhang et al. 2018 a). Diese speziellen Stammzellen wurden als sogenannte „vascular wall-resident EPCs (VW-EPCs)“ bezeichnet (Zengin et al. 2006, Klein et al. 2010, Psaltis und Simari 2015). Sie nehmen eine entscheidende Rolle in der Gefäßneubildung bei der Entwicklung ein und sind ebenso wichtig in der Reparatur und Regeneration unter unphysiologischen Konditionen. Dabei wurde der frühere Gedanke von ausschließlich ausdifferenzierten adulten Gefäßen grundlegend überarbeitet (Zhang et al. 2018 a).

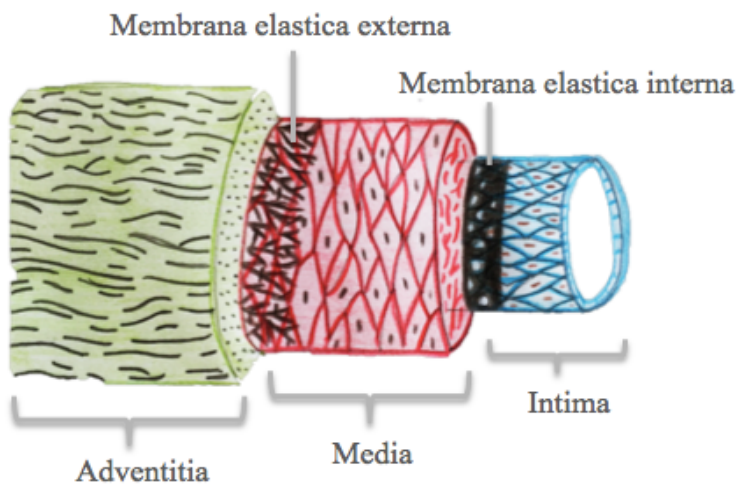


Abb. 4: Schichten der Gefäßwand.

Eigene Abbildung nach einer Vorlage aus Lüllmann-Rauch und Asan 2019.

Die Gefäßwand setzt sich aus drei verschiedenen Schichten zusammen (Psaltis et al. 2011). Die Tunica intima besteht vor allem aus Endothelzellen. Diese kleiden das Innere des Gefäßes aus (Mazurek et al. 2017). Subendothelial befindet sich ein unterschiedlich stark ausgeprägter bindegewebiger Raum mit wenigen Zellen und der extrazellulären Matrix (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Die Tunica media wird durch die konzentrisch zu den Endothelzellen verlaufenden glatten Muskelzellen gebildet (Mazurek et al. 2017).

Als äußerste Schicht verläuft die Tunica adventitia, welche vor allem aus Fibroblasten (Martinez-Quinones et al. 2018) und Kollagenmaterial aufgebaut ist und z.T. Vasa va-

orum sowie Nervenbündel beherbergt, welche für die Kontraktilität der Gefäßwand zuständig sind (Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

Neuere Arbeiten erlangten durch Studien an menschlichen Geweben sowie Tiermodellen die Erkenntnis über die Existenz von Vorläuferzellen und Stammzellen in allen drei Schichten der Gefäßwand (Zhang et al. 2018 a).

Zengin et al. beschrieben 2006 das Vorkommen von reichlich endothelialen Progenitorzellen in einer Zone zwischen den glatten Muskelzellen der Media und Adventitia der Gefäßwand. Diese Zone bezeichneten sie als „Vasculogenic Zone“.

In einer weiteren Studie untersuchten Torsney et al. 2007 atherosklerotische und normale Arterien, welche sie mittels Immunfluoreszenz (für Progenitorzellmarker) anfärbten. In diesen Untersuchungen konnten sie das Vorhandensein vaskulärer Stammzellen in neointimalen Läsionen sowie der Adventitia belegen. Diese Zellen zeigten ein positives Färbemuster für die Progenitorzellmarker CD34, Sca-1, c-kit, VEGFR2.

Darüber hinaus scheint die Gefäßwand noch weitere unterschiedliche Typen von Vorläuferzellen und Stammzellen mit einer Möglichkeit der Differenzierung in glatte Muskelzellen (SMC) (Hu et al. 2004), Fibroblasten (Klein et al. 2010) und Perizyten (Howson et al. 2005) zu beherbergen.

Während der initiale Schritt einer Gefäßneubildung (Vaskulogenese) von den Endothelzellen ausgeht, sind funktionelle und morphologische Reifungsprozesse auch von Perizyten oder glatten Muskelzellen abhängig (Carmeliet 2004).

Perizyten beobachtet man in kleinkalibrigen Gefäßen wie z.B. in Arteriolen, Kapillaren und postkapillären Venolen, an deren Gefäßaußenwand sie anliegen (Armulik et al. 2005). Die Literatur beschreibt verschiedene Arten von Perizyten, die sich in ihrer zellulären Struktur und auch in ihrer Funktion unterscheiden. Sie sollen auch an unterschiedlichen Stellen des Kapillarnetzes zu finden sein (Martinez-Quinones et al. 2018).

SMCs gehören ebenso wie die Perizyten zu den stabilisierenden Faktoren eines Gefäßnetzwerkes und sind im Gegensatz zu den Perizyten in größeren Gefäßen zu finden (Zhang et al. 2018 a).

Der embryonale Ursprung der kontraktilen Elemente wie Perizyten in der Gefäßwand sind hauptsächlich mesenchymale Zellen (Creazzo et al. 1998).

Aufgabe dieser Zellen ist es, neu durch Vaskulogenese geformte Gefäße zu stabilisieren und postnatale Angiogenese, z.B. bei ischämischen Erkrankungen, zu induzieren.

Diese Stabilität der Gefäße ist essenziell für den gewebeabhängigen Blutfluss.



Abb. 5: Schichten der Gefäßwand samt der bisher beschriebenen „Stammzell-Nischen“.

Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker PCNA eines großen Lungengefäßes (links). Die rechte Grafik zeigt die verschiedenen Schichten der Gefäßwand inklusive der bisher beschriebenen Stammzell-Nischen. Eigene Abbildung nach einer Vorlage von Klein et al. 2010.

1.3 Charakterisierung des Stammzellmarkers Nestin

1.3.1 Das Intermediärfilament Nestin

Lendahl et al. beschrieben 1990 Nestin, ein Intermediärfilament (IF) der Klasse VI, als neuronalen Stamm- und Progenitorzellmarker während der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Es findet sich auch noch im erwachsenen Gehirn im Zusammenhang mit der adulten Neurogenese (Bernal und Arranz 2018).

Intermediärfilamente gehören zu den Hauptkomponenten des Zytoskeletts und nehmen eine wichtige Rolle als Stützgerüst der Zellen ein (Etienne-Manneville 2018). Aktuell werden sechs verschiedene Typen der Intermediärfilamentfamilie beschrieben (Bernal und Arranz 2018). Diese haben einen sehr komplexen Aufbau und sind aus über 50 Proteinen zusammengesetzt, welche morphologisch ähnliche Filamente bilden (Bernal und Arranz 2018). Der grundsätzliche molekulare Aufbau der IFs besteht aus dem N-terminalen Kopf, einem zentralen stabförmigen Mittelteil (α -Helix) sowie einem C-terminalen Schwanz (Yamagishi et al. 2019).

Das Protein Nestin besitzt im Ganzen ein Molekulargewicht von 240 kD (Wiese et al. 2004) und setzt sich aus 1618 Aminosäuren zusammen (Xie et al. 2015).

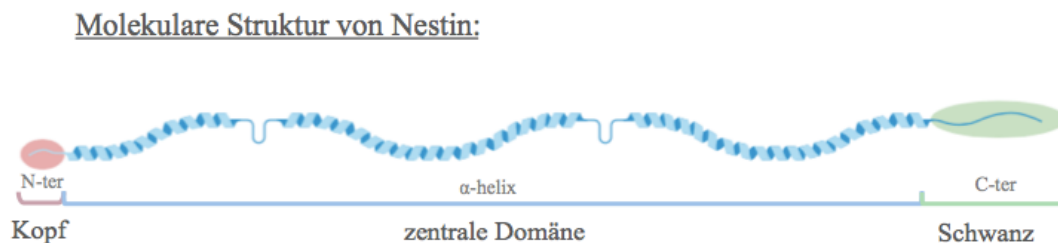


Abb. 6: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von Nestin.

Das Intermediärfilament Nestin teilt das gleiche Bauprinzip wie die anderen IF-Proteine mit seiner α -helikalen zentralen Domäne (blau), sowie seinem N-terminalen Kopfteil (rosa) und dem C-terminalen Schwanz (grün). Abbildung modifiziert nach Bernal und Arranz 2018.

Ein Unterschied zwischen Nestin und den meisten anderen Intermediärfilamenten beruht auf der Unmöglichkeit der eigenen Polymerisation. Dahingegen kopolymerisiert es mit anderen Typen der IF-Familie, wie zum Beispiel der Klasse III oder IV (Park et al. 2010). Die Erklärung für diese Unmöglichkeit liegt in dem untypischen kurzen N-Terminus („Kopfteil“), welcher bei den anderen IF-Proteinen für die Assemblierung verantwortlich ist (Park et al. 2010). Der untypisch lange C-Terminus hingegen ist für die Interaktion mit anderen Zellbestandteilen, wie Mikrofilamenten und Mikrotubuli, zuständig (Wiese et al. 2004).

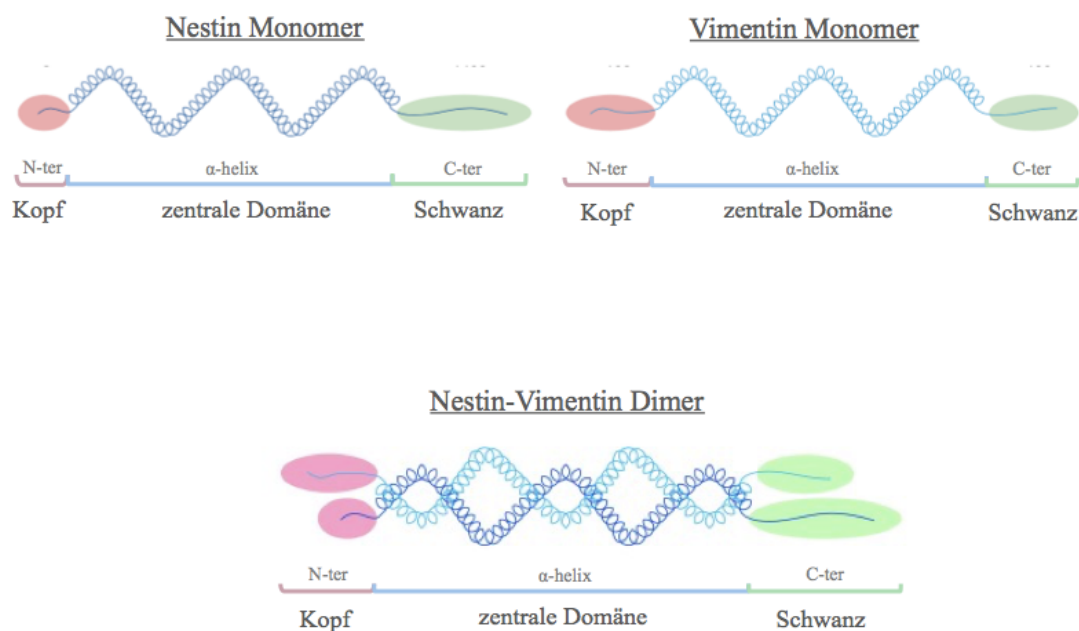


Abb. 7: Unterschiede im strukturellen Aufbau zwischen Nestin und Vimentin.

Nestin (oben links) weist im Gegensatz zu Vimentin (oben rechts) einen deutlich kürzeren N-Terminus (rosa) und einen dafür wesentlich längeren C-Terminus (grün) auf. Ebenfalls dargestellt die Kopolymerisation von Nestin mit Vimentin (unten). Abbildung modifiziert nach Bernal und Arranz 2018.

1.3.2 Vorkommen von Nestin-exprimierenden Zellen in verschiedenen Organen

Nach der Erstbeschreibung 1990 durch Lendahl et al. beschrieben zahlreiche Publikationen ebenso die Expression von Nestin auch in anderen Organen außerhalb des zentralen Nervensystems. Viele Arbeiten belegen das Vorkommen von Nestin in unterschiedlichen Geweben vielfach als Stamm- oder Progenitorzellen (Bernal und Arranz 2018). So ist sein Vorkommen in adulten Geweben vor allem in Bereichen mit aktiver Proliferation, Geweberegeneration aber auch Wundheilung belegt worden, wie z.B. im Knochenmark (Méndez-Ferrer et al. 2010), der Niere (Jiang et al. 2015) oder auch dem Hoden (Davidoff et al. 2004) oder dem Skelettmuskel (Vaittinen et al. 2001). Aber auch in der Pathogenese scheint Nestin eine entscheidende Rolle einzunehmen. Aufgrund der Expression in vielen unterschiedlichen humanen Tumorentitäten wird die Frage bezüglich der Rolle von Nestin als ein diagnostischer oder prognostischer Marker von Tumoren ausgiebig diskutiert (Krupkova et al. 2010, Neradil und Veselska 2015, Nowak und Dziegiel 2018).

1.3.3 Die Rolle von Nestin während der Entwicklung und im Adulten

Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, ist Nestin weitaus mehr als ein neuronaler Stammzellmarker. Seine Expression ist keinesfalls auf das Nervensystem begrenzt, denn auch viele Zellen anderer Gewebe, wie der sich entwickelnde Muskel oder das Herz, weisen ein positives Färbemuster für Nestin in der frühen Entwicklung auf (Kachinsky 1994/1995, Hertig et al. 2018).

Kommen diese Zellen in einen differenzierten Zustand, kann man eine reduzierte Nestin-Expression beobachten, welche häufig in Begleitung einer Hochregulierung anderer gewebespezifischer IF-Proteine einhergeht (Park et al. 2010).

In Adulten sind die Nestin-exprimierenden Zellen auf Areale begrenzt, welche der Regeneration dienen und wo sie als Reservoir von Stamm- und Progenitorzellen fungieren (Park et al. 2010). Im Falle einer Gewebeerletzung ist in der Literatur häufig von einer Hochregulierung oder Reexpression von Nestin die Rede. Es wird in diesem Falle im Kontext von Proliferation, Differenzierung und Migration gesehen (Wiese et al. 2004, Ishiwata et al. 2011).

About et al. (2000) verglichen zum Beispiel die Unterschiede der Nestin-Expression im Embryo und im adulten menschlichen Zahn und das unter normalen und pathologischen

Konditionen. Sie haben aufgezeigt, dass die Nestin-Expression im jungen (permanenten) Zahn auf die Odontoblasten begrenzt ist und im älteren bereits fehlt. In kariösen Zähnen hingegen beobachtet man eine Hochregulierung von Nestin in Odontoblasten, welche die geschwächte Stelle umgeben (About et al. 2000).

Interessanterweise haben bereits Frisé et al. 1995 einen Unterschied in der Ausprägung der Nestin-Expression in Zellen im Falle einer Rückenmarksverletzung erkennen können. Aufgrund der Beobachtung sowohl einer erhöhten Nestin-Expression in den ependymalen Zellen als auch in Zellen außerhalb dieser Zellschicht, welche eine positive Färbung für Nestin verzeichneten, entstand die Annahme, dass im Falle einer solchen Gewebeschädigung neue Zellen aus den Nestin-exprimierenden Zellen generiert werden können (Frisé et al. 1995, Johansson et al. 1999, Cawsey et al. 2015).

Eine ähnliche Beobachtung wurde von El-Helou et al. (2005, 2008) am Herzen beschrieben. Während gesunde adulte ventrikuläre Kardiomyozyten keine Nestin-Expression aufweisen, beobachtet man im Gegensatz dazu im Falle einer hypoxischen Schädigung des Myokards eine Expression des Intermediärfilaments insbesondere um die Infarktregion herum (Calderone 2018).

Doch nicht nur in den Kardiomyozyten war eine Expression des Intermediärfilaments zu verzeichnen, ebenso zeigte sich eine Expression in Endothelzellen und VSMCs (El-Helou et al. 2013). Der Effekt einer Hochregulierung in diesen Zellen auf die Gefäßneubildung und den Gefäßumbau wird im Folgenden beschrieben.

1.3.4 Die Expression von Nestin in der Gefäßwand

Wie zuvor bereits erwähnt, konnte eine positive Färbereaktion für Nestin auch in Gefäßzellen wie Endothelzellen (Calderone 2018) oder VSMCs (Davidoff et al. 2004, Calderone 2018) beobachtet werden. In vielen Quellen wird eine Hochregulierung der Nestin-Expression im Zusammenhang mit angiogenetischen Prozessen beschrieben. Mit der Frage, inwieweit das Intermediärfilament Nestin als mögliches Target in der Tumorthherapie dient oder als Marker für Angiogenese eine entscheidende Rolle einnimmt, haben sich z.B. Matsuda et al. 2013 beschäftigt. In der Literatur wurde oftmals eine Überexpression in Endothelzellen beschrieben, welche mit einer pathologischen Angiogenese und damit einer Tumorgenese einhergeht (Liang et al. 2015). Hingegen konnten Matsuda et al. 2013 ebenfalls die Beobachtung machen, dass bei Nestin-Knockouts in Endothelzellen eine reduzierte Tumorbildung bzw. reduziertes Zellwachstum in Pankre-

askarzinomen zu verzeichnen ist. Schon häufig wurde Nestin als Marker für Endothelzellen in neu entstandenen Gefäßen beschrieben (Mokry et al. 2004). Wie bereits eingangs erwähnt, ist ein Unterschied in der fetalen und adulten Nestin-Expression zu verzeichnen, welche sich ebenso in Endothelzellen darlegt. Während eine hohe Nestin-Expression in Endothelzellen im Rahmen der Vaskulogenese bei Tieren in der Fetalzeit zu finden ist, ist die Expression in der adulten Gefäßstruktur wieder heruntergefahren. Dort scheint die Expression auf neu geformte Endothelzellen begrenzt zu sein, welche sich im Rahmen der Angiogenese bilden (Teranishi et al. 2007). Teranishi et al. untersuchten 2007 die Nestin-Expression in kolorektalen Karzinomen von Patienten. Sie konnten ebenfalls eine Expression des Intermediärfilaments in den kleinen Gefäßen der Darmtumore beobachten. Mit Hilfe des Proliferationsmarkers PCNA konnten sie ebenso nachweisen, dass diese Zellen proliferierende Zellen waren. Ein ähnliches Ergebnis wurde 2012 von Yamahatsu et al. in Gefäßen des Adenokarzinoms vom Pankreas beschrieben.

Neben der Rolle in der Tumorgenese wurde Nestin ebenso im Zusammenhang mit Reparaturprozessen bzw. pathologischen Zuständen im Gewebe, wie z.B. bei neu geformten Blutgefäßen im Bereich der Narbenbildung nach Myokardinfarkt beschrieben (Calderone 2012). Eine erhöhte Nestin-Expression der Zellen ist ebenso in den Gefäßläsionen bei pulmonaler Hypertonie zu detektieren (Bhagwani et al. 2019).

Oikawa et al. beschrieben 2010 neben Endothelzellen das Vorkommen von Nestin in sich entwickelnden vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). Sie verzeichneten eine ausgeprägte Expression in Embryonen, welche ca. 3-6 Wochen nach der Geburt bereits heruntergefahren und im Adulten schließlich aufgehoben war. In dieser Arbeit ließ sich ebenfalls eine erhöhte Nestin-Expression in glatten Muskelzellen im Zuge von Ballon-Kathetereingriffen belegen. Oikawa et al. (2010) beschrieben Tage nach dem Eingriff die Entstehung einer Neointima, welche eine ausgeprägte Nestin-Expression aufwies.

Tardif et al. zeigten in zwei unterschiedlichen Arbeiten (2014, 2015) ebenfalls das Vorhandensein von Nestin in VSMCs in krankem bzw. verletztem Gewebe. In der Arbeit von 2014 setzten sie Ratten mit induziertem Typ-I-Diabetes einer Hyperglykämie aus und konnten dabei eine reduzierte Nestin-Expression in den VSMCs verzeichnen. Des Weiteren konnten sie aufzeigen, dass die Gefäßumstrukturierung aufgrund hypertensi-

ver Verhältnisse mit einer Hochregulierung von Nestin in VSMCs zu beobachten war (Tardif et al. 2015).

Perizyten werden, wie bereits erwähnt, im Bereich des kapillären Gefäßsystems beobachtet. Sie nehmen eine wichtige Stützfunktion in der Gefäßstruktur ein und liegen der Außenwand der Kapillare an. Dass in diesen Zellen ebenfalls eine Nestin-Expression zu detektieren ist, zeigte eine 2004 publizierte Arbeit unserer Arbeitsgruppe (Davidoff et al. 2004).

Anhand eines Modells an adulten Ratten konnten sie mittels Injektion von Ethandimethansulphonat (EDS) eine bereits existierende Population von Leydig-Zellen im Hoden eliminieren. Im Anschluss konnte aufgezeigt werden, dass die anschließend sich neu entwickelnden Leydig-Zellen sowohl Nestin-positive Perizyten als auch VSMCs als Vorläuferzellen aufweisen (Davidoff et al. 2004).

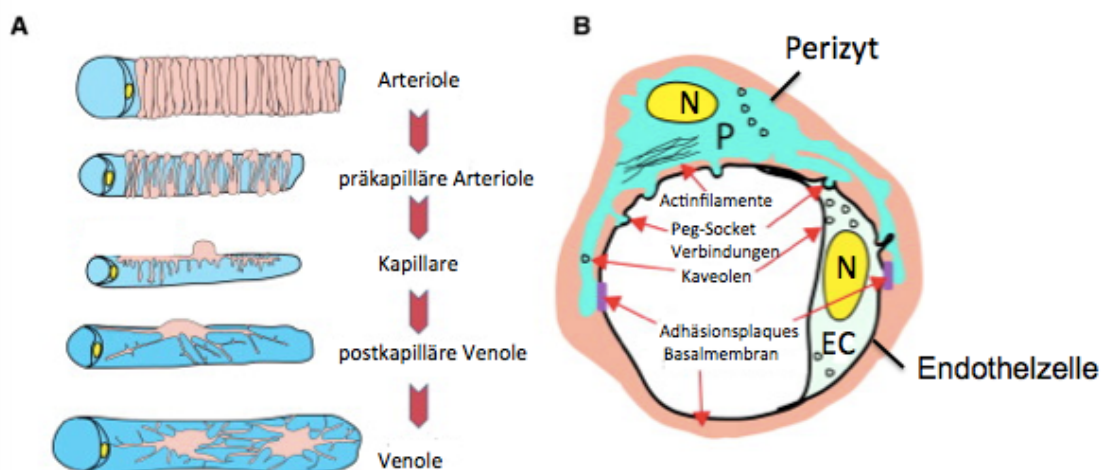


Abb. 8: Zell-Gefäßarchitektur von Arteriole zu Venole sowie Perizyten-Endothelzell-Interaktion.

(A) Zusammenstellung der Zell-Gefäßwandarchitektur von Arteriole zu Venole. (B) Schematische Darstellung eines Perizyten (P) mit Endothelzell-Interaktion (EC), Darstellung der Zellkerne (N, gelb) sowie der weiteren Zellbestandteile (siehe Beschriftung). Abbildung modifiziert nach Armulik et al. 2011.

1.4 Die DNA und ihre Modifikationen

1.4.1 DNA und ihre Verpackung

In eukaryotischen Zellen liegt der Großteil der genetischen Information im Nucleolus als Chromatin vor (Bartke et al. 2010). Als Chromatin wird die Einheit aus DNA, RNA sowie chromosomalen Proteinen bezeichnet (Schmidt 2017 a). Die chromosomalen Proteine lassen sich unterteilen in Histone und Nicht-Histon-Proteine (Schmidt 2017 a).

Die Struktur des Chromatins wird vorrangig durch Wechselwirkungen zwischen DNA und Histonen bestimmt, wobei sich ein DNA-Strang aus 146 bp um einen Kern aus acht Histonen, dem sogenannten Histonoktamer, windet und somit das Element eines Nucleosoms bildet (Luger et al. 1997).

Bisher wurden fünf verschiedene Typen von Histonen beschrieben: H1, H2A, H2B, H3, H4 (Schiebel 2015). Je zwei Histone der Typen H2A, H2B, H3 und H4 bilden das Oktamer und somit den Kern des Nucleosoms (White et al. 2001). Das Histon H1 nimmt eine gesonderte Stellung ein. Dieses, auch als „Linker-Histon“ bezeichnet, befindet sich zwischen den Nucleosomen und verbindet diese, indem es eine Bindung mit der Linker-DNA und dem Nucleosom selbst eingeht (Schmidt 2017 a). Die einzelnen Histontypen unterscheiden sich bezüglich ihres Grundgerüsts kaum. Gemeinsam ist allen eine im Zentrum liegende globuläre Domäne mit peripheren flexiblen amino- und carboxyterminalen Armen (Schiebel 2015). Diese spielen erstens eine entscheidende Rolle bei der Assoziation mit anderen Histonen, zweitens bei der Bindung der DNA (Schmidt 2017 b).

Die Verbindung zwischen DNA und Histon wird durch den hohen Anteil basischer Aminosäuren in Histonen, wie Arginin und Lysin, hervorgerufen (Schmidt 2017 a). Bemerkenswerterweise zeigt sich eine relativ konstante Aminosäuresequenz der Histone im Laufe der fortschreitenden Entwicklung (Schiebel 2015). Dennoch existieren innerhalb eines Histontypes sogenannte Subtypen und es gibt die Möglichkeit der Modifikation von AS-Seitenketten der flexiblen Arme (Schiebel 2015).

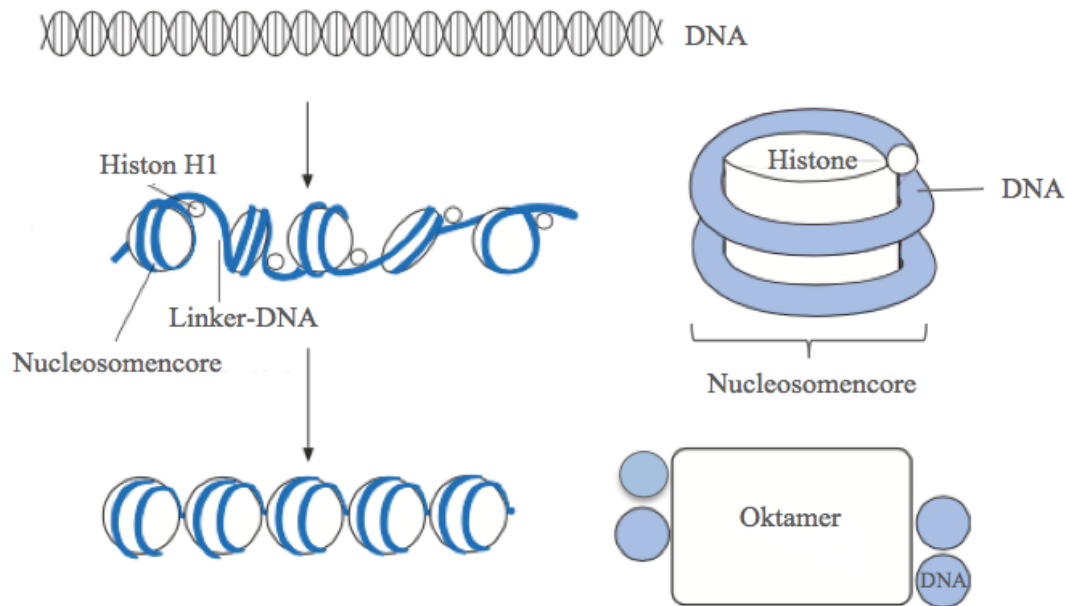


Abb. 9: Die Verpackung der DNA und der Aufbau des Nucleosoms.

Abbildung modifiziert nach Buselmaier und Tariverdian 2007 in Schmidt (2017 a).

Die enge Beziehung zwischen der DNA-Sequenz und dem Histonoktamer wird durch Wechselwirkungen zwischen der DNA und vor allem dem aminoterminalen Ende von Histon H3 hervorgerufen (Schiebel 2015). Die N-terminalen Enden ragen aus dem Nucleosom heraus (Pepenella et al. 2014). Diese spielen eine große Rolle sowohl bei der Interaktion mit der DNA, als auch bei der Regulierung der Chromatinstruktur, da an den N-terminalen Enden eine Vielzahl von Modifizierungen stattfindet (Mozzetta et al. 2015).

1.4.2 Modifikationsmöglichkeiten der DNA

Epigenetische Mechanismen, wie die Histon- und DNA-Modifizierung, nehmen Einfluss auf den Aufbau des Chromatins und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Regulierung genetischer Prozesse (Del Rizzo und Trievel 2011).

Da die DNA einer menschlichen Zelle eine beachtliche Länge aufweist, ist sie, wie oben bereits beschrieben, im Zellkern als Chromatin verpackt. Für verschiedene Prozesse bedarf es jedoch der Zugänglichkeit einzelner Proteine für bestimmte DNA-Abschnitte. Dieses „Auflockern“ der DNA wird durch Modifizierung der Aminosäuren gewährleistet (Schmidt 2017 a). Zu den wichtigsten Histon-Modifizierungen gehören die Acetylie-

rung, die Phosphorylierung, die Methylierung und die Ubiquitinierung (Schmidt 2017 b).

Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Acetyltransferasen, welche einen Acetylrest auf die Aminosäuren übertragen. Die Methylierung wird durch sogenannte Histon-Methyltransferasen durchgeführt. Diese Enzyme sind für die Übertragung von Methylgruppen auf Lysin- oder Argininreste der Histone H3 und H4 verantwortlich (Schiebel 2015). Um den ganzen Prozess der Methylierung wieder rückgängig zu machen, können Histon-Demethylasen die Methylgruppen wieder entfernen (Schiebel 2015).

Die Art und Weise, wie die Chromatinstruktur verändert wird und somit die Transkription aktiviert oder reprimiert, hängt zum einen von der Art der Modifizierung ab, zum anderen vom Ort der Modifikation (also der Aminosäure und ihrer Position) (Schmidt 2017 b). Da Histon-Acetyltransferasen Acetylgruppen übertragen und somit zu einer verringerten positiven Ladung der Histone beitragen, kommt es in der Folge zu einer Destabilisierung des DNA-Histon-Komplexes und damit zur Aktivierung der Genexpression (Schiebel 2015). Andere Modifikationen führen dazu, dass spezielle Proteine an sie binden, die dann weitere Vorgänge vermitteln oder direkt die Chromatinstruktur beeinflussen (Schiebel 2015). Beispiele für solche Proteine sind das HP1 und das Polycomb-(Pc-)Protein (Schiebel 2015). Methylierte Lysine z.B. tragen eine Bindungsstelle für Proteine mit einer sogenannten Chromodomäne, wie sie beim HP1 vorliegt (Schiebel 2015). HP1 geht eine spezifische Bindung mit Lysin 9 des Histon H3 ein und begünstigt somit die Kondensation von Chromatin und damit einhergehend die Repression der genetischen Aktivität (Bannister et al. 2001).

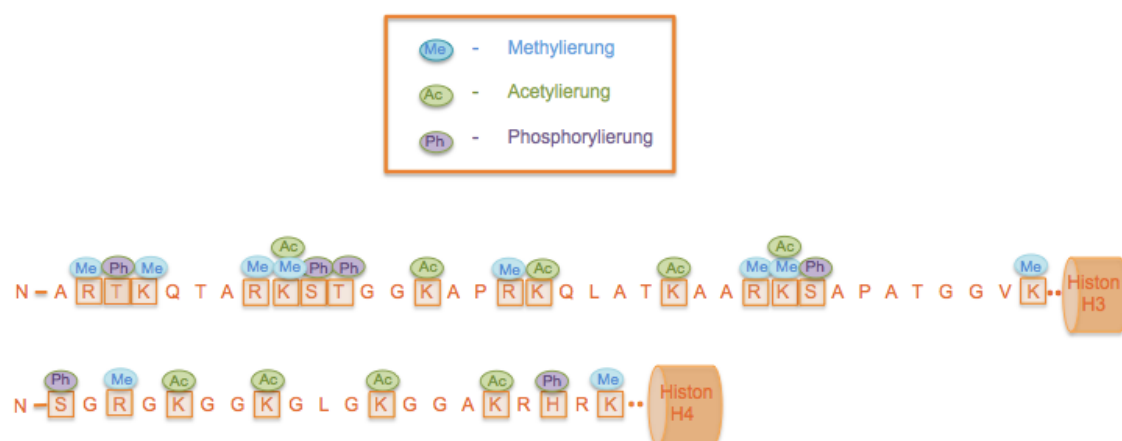


Abb. 10: Histonmodifikationen am Beispiel von H3 und H4.

Eigene Abbildung nach Vorlage von Spivakov und Fisher 2007.

Eine weitere entscheidende Rolle in der epigenetischen Modifikation nimmt die DNA-Methylierung ein (Robertson 2005). Diese durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysierte Reaktion hat die Besonderheit in Eukaryoten auf die C5-Position von Cytosin beschränkt zu sein. Eine häufig zu beobachtende Sequenz ist die Abfolge 5'-CpG-3' (Walter 2015 a). Eine Vielzahl an Funktionen wurde dieser Methylierung zugeschrieben, wie z.B. der Einfluss auf die Transkription sowie auf die Chromatinstruktur (Ehrlich und Wang 1981). Der Einfluss auf die genetische Information kommt nicht durch eine veränderte Basenpaarung zustande, sondern durch Behinderung eines Bindegliedes der DNA für spezielle Proteine. Andersherum existieren ebenfalls Proteine, welche spezifisch an modifizierte DNA binden, wie z.B. MeCP2 (Walter 2015 a). Durch die Bindung von MeCP2 an methylierte DNA werden weitere Proteine aktiviert und gebunden, welche zu den modifizierenden Effekten im Chromatin führen. Zu diesen Proteinen zählen z.B. Histon-Deacetylasen (HDAC) oder Cytosin-Methyltransferasen (Valinluck et al. 2004).

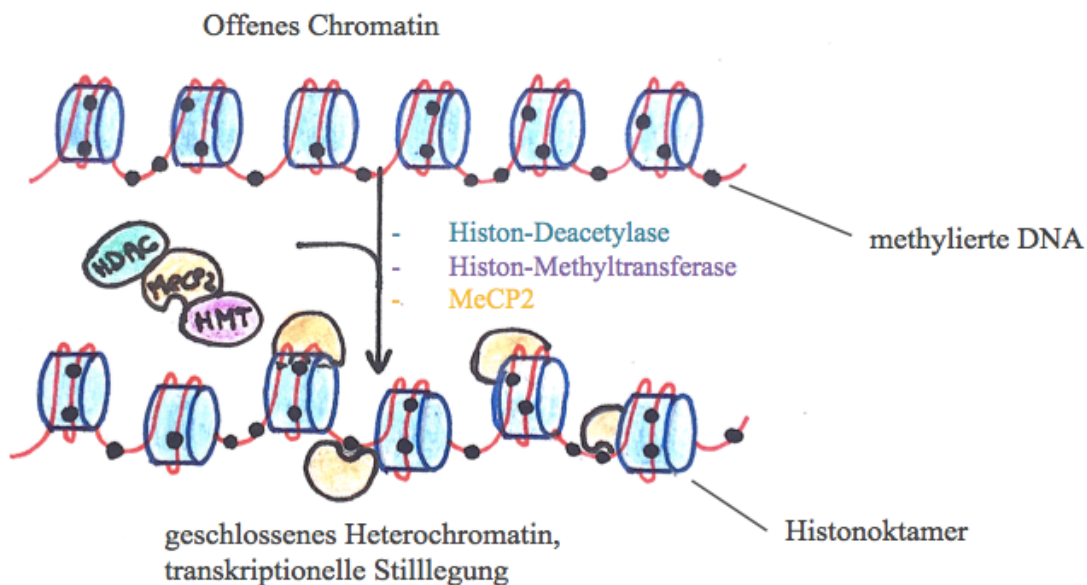


Abb. 11: Umwandlung von Chromatin zu stillgelegtem Heterochromatin.

Bindung von MeCP2 an methylierte DNA (schwarze Punkte) und somit Aktivierung verschiedener Proteine (Histon-Deacetylase, Histon-Methyltransferase), welche zur Kondensation der Chromatinstruktur beitragen. Eigene Abbildung auf der Basis von Robertson 2005 in Walter (2015 a).

1.4.3 Funktion von Histon-Methyltransferasen

Wie wir bereits wissen, ist die physiologische Vorlage für die Transkription das Chromatin. Epigenetische Mechanismen schreiten insofern in den Prozess ein, indem sie die DNA-Struktur verändern und somit einen Zugangsweg zur DNA schaffen oder ihn versperren (Dambacher et al. 2010).

Der Vorgang der Histonmethylierung wurde erstmalig 1964 beschrieben (Murray 1964). Der Zusammenhang hinter diesem Prozess war lange Zeit unklar. Anfang der 2000er erschienen Arbeiten, in denen ein direkter Zusammenhang zwischen der Histonmethylierung sowie der Organisation der Chromatinstruktur und der Aktivität von Genen beschrieben wurde (Lachner und Jenuwein 2002). Wie bereits vorher erwähnt, werden die Enzyme dieser Reaktion als Histon-Methyltransferasen bezeichnet. Im Gegensatz zur Acetylierung, welche lediglich am Lysin erfolgen kann, ist die Methylierung sowohl am Arginin als auch am Lysin möglich. Die Methyltransferasen haben somit die Aufgabe der Übertragung von Methylgruppen des S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf Lysin oder Arginin (Vaquero et al. 2003). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden ist, dass Arginin nur mono- oder dimethyliert werden kann (Zhang und Reinberg 2001, Kim et al. 2014). Die Enzyme dieser Reaktion werden als Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) bezeichnet (Krause et al. 2007). Lysin hingegen kann über seine ϵ -Aminogruppe entweder mono-, di- oder trimethyliert werden (Zhang und Reinberg 2001). Neben der PRMT-Gruppe existieren zwei weitere Gruppen in der Familie der Histonmethylierung: die Methyltransferasen mit SET-Domäne und die Proteine ohne SET-Domäne (Kim et al. 2014).

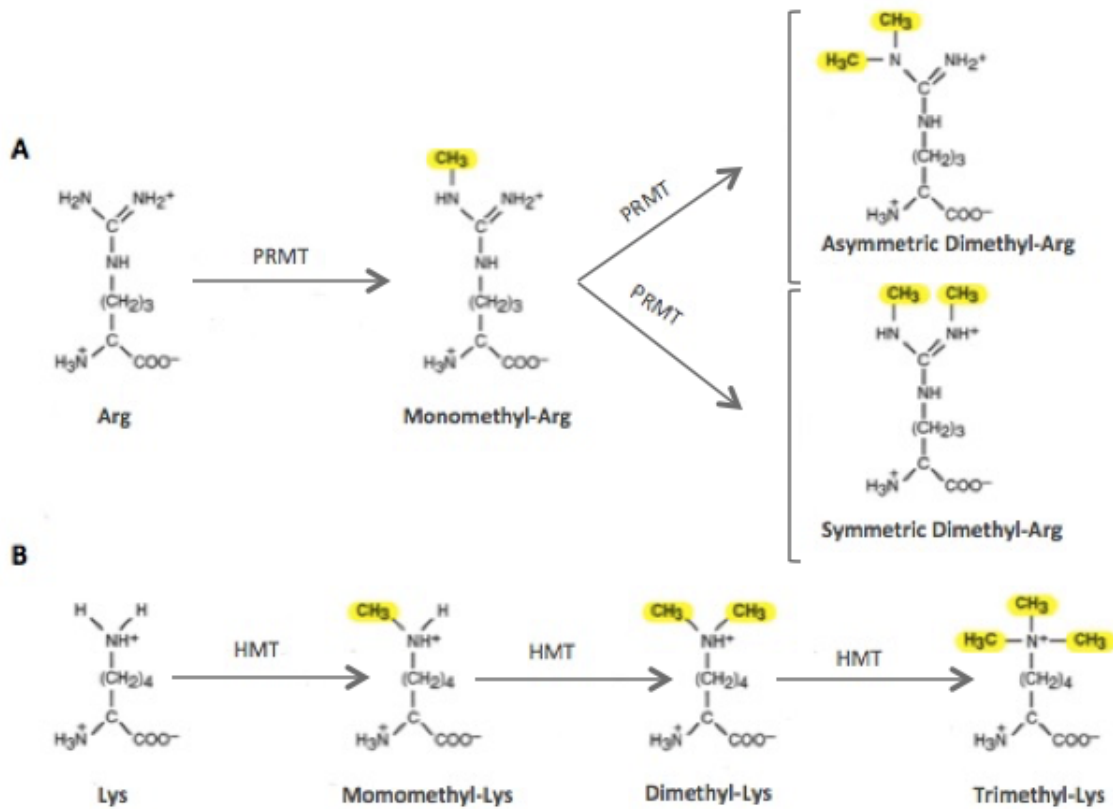


Abb. 12: Die Aminosäuren Arginin und Lysin samt ihrer Modifizierungen.

(A) Molekularstruktur von Arginin (Arg) und die Modifizierung in Mono-, und Dimethylarginin katalysiert durch Protein-Arginin Methyltransferasen (PRMT). (B) Die Molekularstruktur von Lysin (Lys) sowie von Mono-, Di- und Trimethyllysin katalysiert durch Histon-Methyltransferasen (HMT). Abbildung modifiziert nach Zhang und Reinberg 2001.

Die SET-Domäne, welche aus ca. 130 Aminosäuren besteht (Jenuwein et al. 1998), verdankt ihren Namen den drei Proteinen, in denen sie erstmalig bei *Drosophila melanogaster* beschrieben worden ist: Su(var)3-9, Enhancer of Zeste und Trithorax (Dillon et al. 2005). Insgesamt konnten bei Mensch und Maus über 50 Proteine beschrieben werden, die eine solche SET-Domäne aufweisen (Lachner et al. 2003).

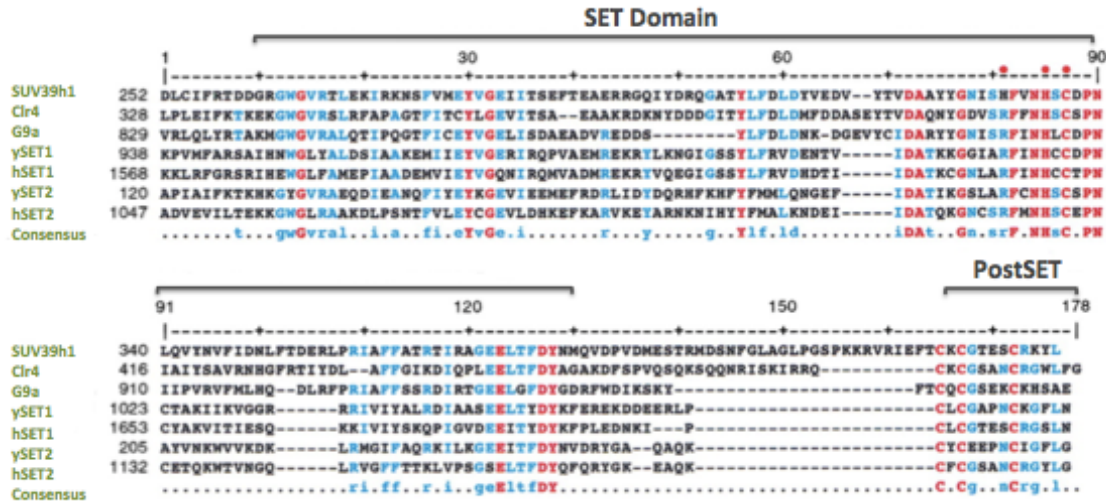


Abb. 13: Aminosäure-Sequenz der SET- und post-SET-Domäne verschiedener Histone-Methyltransferasen.

Die SET-Domäne und die post-SET-Domäne sind in der jeweiligen Klammer dargestellt. Einige Aminosäuren (AS) sind mit einem roten Punkt markiert. Bei ihnen konnte nachgewiesen werden, dass sie die HMT-Aktivität beeinflussen. Die Anzahl der jeweiligen AS sind hinter dem Namen (grün) dargestellt. Abbildung modifiziert nach Zhang und Reinberg 2001.

DOT1/DOT1L (disruptor of telomeric silencing-1) gehört zu der dritten Gruppe der Histone-Methyltransferasen und besitzt keine SET-Domäne (Min et al. 2003).

Im Weiteren wird hauptsächlich auf das Thema der lysinspezifischen Methylierung von Histonen eingegangen, da dies das Thema der Arbeit beinhaltet.

Als erste Histone-Lysin-Methyltransferase wurde die SUV39H1, eine SET-Domänen beinhaltende Methyltransferase, beschrieben (Rea et al. 2000). Studien mit SUV39H1 konnten die enzymatische Aktivität der SET-Domäne sowie zwei benachbarter cysteinreicher Regionen, der sogenannten pre-SET und post-SET-Domäne, belegen (Rea et al. 2000, Schultz et al. 2002). SUV39H1 ist spezifisch für die Methylierung des Lysin-9 am Histone H3 (Rea et al. 2000). Mittlerweile sind eine Vielzahl an lysinspezifischen Histone-Methyltransferasen gefunden worden, welche auf Histone H3 und H4 beschränkt sind. Die bisher am besten charakterisierten Methylierungen finden an speziellen Lysin-

resten entweder am N-terminalen Schwanz (für H3: K4, K9, K27 und K36 sowie für H4: K20) oder in der globulären Domäne (für H3: K79) statt (Vaquero et al. 2003, Dambacher et al. 2010). Ebenso wurden weitere bisher wenig charakterisierte Stellen der Lysin-Methylierung beschrieben. Einen Überblick zeigt die Abbildung 14.

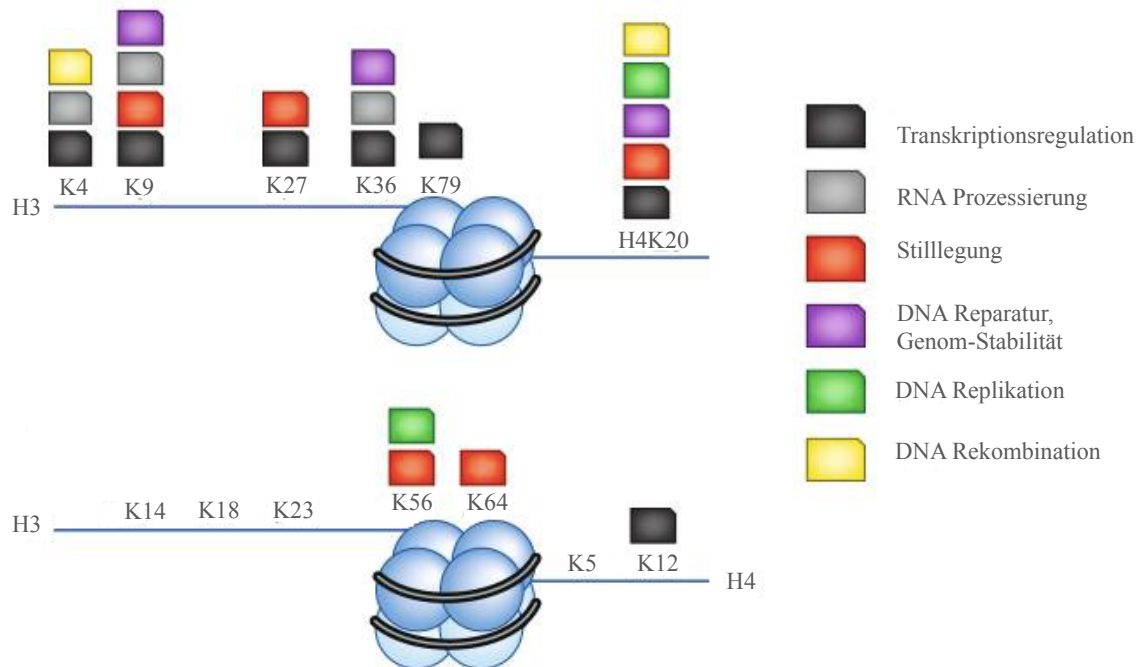


Abb. 14: Zusammenstellung der bisher am besten charakterisierten Positionen der Lysin-Methylierung.

Darstellung verschiedener methylierter Lysinreste. Lysin (K) kann an verschiedenen Stellen im Histon (3 oder 4) methyliert werden. Die Position wird entsprechend durch die dahinterstehende Zahl angegeben. Um die Histone (blau) ist die DNA (schwarze Linien) gewickelt. Rechts dargestellt sind die möglichen Funktionen abhängig von der Methylierung und somit der Chromatinstruktur. Abbildung modifiziert nach Husmann und Gozani 2019.

Der Einfluss der Methylierung auf die Transkription oder nukleäre Funktionen ist abhängig vom Ort der Methylierung (Position des Lysinrestes), als auch von der Anzahl an Methylierungen (Mono-, Di- oder Trimethylierung) (Mozzetta et al. 2015). Im Folgenden werden einige Beispiele dargestellt.

Aktivierung durch Histonmethylierung:

Methylierungen, die mit aktiver Transkription in Verbindung gebracht werden sind H3K4, H3K36 und H3K79 (Schotta et al. 2004, Hyun et al. 2017).

Markenzeichen für aktiv transkribiertes Chromatin ist H3K4me3. Es findet sich vorzugsweise in der Promoterregion (Santos-Rosa et al. 2002) und im Bereich des Transkriptionsstarts (Hyun et al. 2017). Die Methyltransferase Set9, welche für die Methylierung von Lysin 4 des Histon H3 verantwortlich ist, besitzt wie viele Histon-Methyltransferasen eine SET-Domäne. Besonderheit ist jedoch, dass bei ihr die prä- und post-SET-Domäne fehlt (Nishioka et al. 2002 a). Nishioka et al. beschreiben 2002 ebenfalls die H3K4-Methylierung als beeinflussenden Faktor für die Suv39H1 vermittelte H3K9-Methylierung. Durch die Methylierung von H3K4 soll die Methylierung von H3K9 durch Su(var)3-9 verhindert werden (Nishioka et al. 2002 a).

Dot1 katalysiert als einziges Enzym die Methylierung von Histon H3 an der Lysinstelle 79 (Feng et al. 2002, Farooq et al. 2016). Wie viele andere Methyltransferasen katalysiert es alle drei Stadien (Mono-, Di- und Trimethylierung) von H3K79 (Frederiks et al. 2008, Farooq et al. 2016). Dot1 beinhaltet im Gegensatz zu vielen anderen Histon-Methyltransferasen keine SET-Domäne (Min et al. 2003, Ng et al. 2002, Farooq et al. 2016, Hyun et al. 2017). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Methylierung nicht wie die meisten Histonlysinmethylierungen an den terminalen Enden stattfindet, sondern, wie bereits vorher erwähnt, in der globulären Domäne (Hyun et al. 2017). In *S. cerevisiae* konnten die Dot1-vermittelten H3K79-Trimethylierungen in transkribierten Regionen aktiver Gene beobachtet werden (Farooq et al. 2016). Ebenso konnten Studien bei Menschen und in *Drosophila* (Schübeler et al. 2004) verschiedene Methylierungsstadien von H3K79 während der Transkription von Genen in Verbindung bringen. Seit der erstmaligen Entdeckung der Methyltransferase konnte eine Vielzahl an Funktionen sowie die Rolle der Dot1-vermittelten H3K79-Methylierung z.B. im Zusammenhang mit der Transkriptions- und Zellzyklusregulierung beschrieben werden (Nguyen und Zhang 2011).

In *S. cerevisiae* werden alle Stadien der H3K36-Methylierung durch die Histon-Methyltransferase Set2 (SET domain containing protein-2) vermittelt (Strahl et al. 2002), während in größeren Eukaryoten eine Vielzahl von Proteinen existiert, die diese Methylierungen umsetzt (McDaniel und Strahl 2017).

Aufmerksamkeit erweckte die H3K36-Methylierung in den darauffolgenden Jahren durch die Vielzahl an entdeckten Funktionen und Einflüssen, wie z.B. im Rahmen der

Transkriptionsregulation (Bannister et al. 2005, Zaghi et al. 2020), der „DNA damage response“ (Pai et al. 2014) und in Verbindung mit DNA-Methylierung (Weinberg et al. 2019, Zaghi et al. 2020).

Repression durch Histonmethylierung:

Drei Lysinmethylierungen, die häufig mit transkriptionell inaktivem Chromatin in Verbindung gebracht werden, sind H3K9, H3K27 und H4K20 (Kouzarides 2007, Dambacher et al. 2010, Hyun et al. 2017).

Als Charakteristikum für transkriptionell repressives Chromatin gilt methyliertes H3K9 (Lachner et al. 2003).

Die Su(var)3-9-Proteine enthalten neben der SET-Domäne auch eine sogenannte Chromodomäne. Diese ist ebenso in einer Vielzahl von Chromatinbindeproteinen zu finden (Koonin et al. 1995). Einige Studien haben den Zusammenhang von Suv39h1 und dem HP1 aufgezeigt. Kommt es zur Methylierung von H3K9, erkennt die Chromodomäne des HP1 diese Methylierung und führt somit zur Heterochromatinbildung (Haldar et al. 2011). H3K27me₃ ist ebenfalls charakteristisch für transkriptionelle Repression. Verantwortlich für alle drei Modalitäten der Methylierung (Mono-, Di- und Trimethylierung) ist die EZH2- Untergruppe (Enhancer-of-zest homolog 2) innerhalb des PRC2 (polycomb repressive complex 2) (Hyun et al. 2017). Als eigenständige Unit besitzt EZH1/2 keine enzymatische Aktivität. Erst die Kooperation als PRC2 ermöglicht die Lysinmethylierung von H3K27 (Hyun et al. 2017). Den Fakt, dass verschiedene Methylierungsstadien oder Kombinationen unterschiedliche Chromatinregionen oder sogar ganze Chromosomen charakterisieren können, zeigt sich z.B. bei der H3K27-Trimethylierung in Zusammenhang mit der H3K9-Dimethylierung bei inaktiven X-Chromosomen (Plath et al. 2003, Silva et al. 2003, Okamoto et al. 2004).

Im Gegensatz dazu sind die H3K27-Monomethylierung zusammen mit der H3K9-Trimethylierung mit perizentrischem Heterochromatin in Verbindung zu bringen (Peters et al. 2003).

Großes Interesse ist in den letzten Jahren auf die Funktion der Histon-H4K20-Methylierung gelegt worden. Auch diese Methylierung gehört zu einer der zuerst beschriebenen Methylierungen und stellt einen entscheidenden Faktor für biologische Prozesse dar (Jørgensen et al. 2013). Die Monomethylierung wird durch die Histon-Methyltransferase SET8 (auch bezeichnet als PR-SET7) vermittelt (Nishioka et al. 2002 b). Daneben existieren viele Di- und Trimethyltransferasen, wobei die Mehrzahl der

entsprechenden Methylierungen durch die Transferasen SUV4-20H1 und SUV4-20H2 umgesetzt werden (Jørgensen et al. 2013). Wie bei den meisten Histonmodifikationen ist die Funktion abhängig vom Methylierungsstatus. Einfluss auf DNA-Replikation sowie „DNA Damage Repair“ hat die Mono- und Dimethylierung von H4K20. Die Trimethylierung hingegen gilt als Charakteristikum für stillgelegte heterochromatische Bereiche der DNA (Jørgensen et al. 2013).

1.4.4 Der Zusammenhang von Histonmethylierung und verschiedenen Erkrankungen

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Auswirkung von Mutationen bzw. Fehlregulationen im Rahmen der Histonmethylierung, der Methyltransferasen oder auch bei den Bindungsproteinen. In vielen Studien konnte ein Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten aufgezeigt werden (Hyun et al. 2017).

So konnte eine Hochregulierung der Histon-Methyltransferase G9a in verschiedenen Tumoren beobachtet werden (Casciello et al. 2015, Hua et al. 2014).

G9a ist für die Mono- und Dimethylierung von H3K9 verantwortlich. Eine Überexpression von G9a führt zur verstärkten Methylierung (Hypermethylierung) von H3K9 an speziellen Tumorsuppressorgenen. In der Folge kommt es zur Unterdrückung ihrer Expression (Casciello et al. 2015).

Einen weiteren Zusammenhang der Fehlregulation von Histonmethylierung mit neurodegenerativen Erkrankungen konnten Walker et al. 2013 belegen. Dafür untersuchten sie Alzheimer-Mausmodelle, in denen sie erhöhte H3K9-Methylierungen im BDNF-Gen (brain-derived-neurotropic factor) beobachteten (Walker et al. 2013). BDNF scheint eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung sowie der Gedächtnisleistung zu spielen (Lipsky und Marini 2007). Folge der abnormal erhöhten H3K9-Methylierung ist die Herunterregulierung der BDNF-Expression in Neuronen (Walker et al. 2013). Ryu et al. untersuchten in einer ihrer Studien 2006 den Zusammenhang zwischen ESET, einer H3K9-Methyltransferase, sowie trimethyliertem H3K9 in Bezug auf die Krankheitsentstehung der Chorea Huntington, einer autosomal-dominant vererbaren neurodegenerativen Erkrankung (Ryu et al. 2006). Sie ermittelten erhöhte Expressions-Level der Histon-Methyltransferase ESET und H3K9me in Patienten mit Chorea Huntington und konnten somit heilende Effekte bei der Herunterregulierung des ESET-Promoters beobachten (Ryu et al. 2006).

1.4.5 Lysin-spezifische Histon-Methyltransferasen am Beispiel von SETDB1

Es existiert eine Vielzahl von Lysin-spezifischen Histon-Methyltransferasen sowie einige, die besonders die Methylierung des Lysinrestes 9 am Histon H3 katalysieren.

Beispiele der dazu gehörigen Histon-Methyltransferasen sind SUV39H1, SUV39H2 und SETDB1 (SET Domain bifurcated 1) (Hyun et al. 2017). Ebenso auf die Methylierung von H3K9 spezifiziert sind die Methyltransferasen GLP und G9A (Kang 2015). SUV39H1 und H2 sind als erste Methyltransferasen entdeckt worden, als Schlüsselkomponenten von konstitutivem Heterochromatin (Peters et al. 2001). SETDB1 ist zunächst entdeckt worden im Zusammenhang mit Repression der Gentranskription in Euchromatin und fakultativem Heterochromatin (Schultz et al. 2002, Adoue et al. 2019).

Das SETDB1-Gen ist im humanen Chromosom an Stelle 1q21 lokalisiert (Batham et al. 2019). Es kodiert für eine Histon-H3-Lysin-9-Methyltransferase. Diese ist auch bekannt als ESET oder KMT1E (Kang 2015). SETDB1 ist im Unterschied zu den anderen H3K9-Histon-Methyltransferasen die Einzige, welche alle drei Formen der Methylierung (Mono-, Di- und Trimethylierung) katalysiert (Zhu et al. 2020).

In Abbildung 15 sind drei Histon-Methyltransferasen mit SET-Domäne von Maus (Mm) und Mensch (Hs) dargestellt. Sie besitzen zusätzlich verschiedene Proteine, wie eine Chromodomäne (chromo), eine Methyl-CpG-Bindedomäne (MBD) oder wie im G9a beinhaltet, Ankyrinwiederholungen (ANK) oder glutaminsäurereiche Abschnitte.

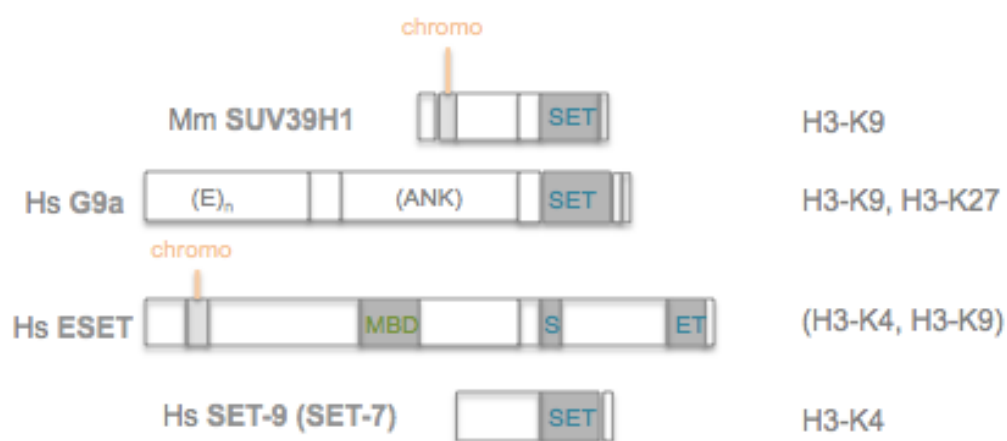


Abb. 15: Darstellung verschiedener Histon-Methyltransferasen mit SET-Domäne bei Maus (Mm) und Mensch (Hs) sowie die jeweiligen Spezifitäten.

Eigene Abbildung nach Vorlage von Knippers aus Molekulare Genetik, 9. Auflage, 2006 Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Struktureller Aufbau von SETDB1:

SETDB1 besteht aus 1291 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 143,1 kD (Batham et al. 2019). Strukturell setzt sich der C-Terminus von SETDB1 aus einer SET sowie pre-SET und post-SET-Domäne zusammen, welche für die H3K9-spezifische Lysinmethylierung verantwortlich ist (Batham et al. 2019, Fukuda und Shinkai 2020). Das Besondere bei SETDB1 ist, dass die SET-Domäne durch Insertion vieler hunderter Aminosäuren unterbrochen ist. Diese Unterbrechung ist einzigartig für SETDB1 (Kang 2015). Die genaue Bedeutung bzw. der Einfluss dieser Aminosäurekette auf das SETDB1 ist bisher noch ungeklärt (Kang 2015, Batham et al. 2019). Weitere Bestandteile der Histon-Methyltransferase sind eine Methyl-CpG-Bindedomäne (MBD) (Zhang und Reinberg 2001, Batham et al. 2019) sowie drei Tudor-Domänen (Fukuda und Shinkai 2020). Tudordomänen wurden bisher als Proteine beschrieben, welche an Methylarginin- und lysin von Histon- und Nichthiston-Proteinen binden und somit Einfluss auf viele epigenetische Prozesse ausüben (Kang 2015, Ying und Chen 2012). Die im SETDB1 hintereinander liegende Tudor-Domäne (TTD) ist einzigartig und hat als Aufgabe die Erkennung von Methyllys- und Arginin-Sequenzen am Histon H3 (Guo et al. 2021).

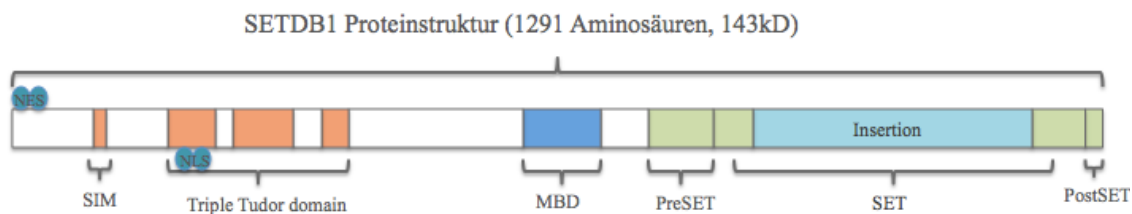


Abb. 16: Darstellung der SETDB1 Proteinstruktur beim Mensch.

Das SETDB1-Protein beinhaltet im N-terminalen Ende drei Tudordomänen (TTD/triple Tudor domain, orange) sowie eine Methyl-CpG-Bindedomäne (MBD, dunkelblau). Ebenfalls befindet sich in diesem Bereich ein SUMO-Interaktionsmotiv (SIM, orange) in der Nachbarschaft von einem nukleären Exportsignal (NES, blaue Kreise) sowie einem Kernlokalisierungssignal (NLS, blaue Kreise in TTD). Der C-Terminus setzt sich aus Pre-SET, SET und Post-SET-Domäne (grün) zusammen. Die SET-Domäne zeichnet sich durch eine Insertion (hellblau) aus. Eigene Abbildung nach Vorlage von Fukuda und Shinkai 2020.

Die Methyl-CPG-Bindedomäne im SETDB1 scheint einen möglichen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Histonmethylierung zu schaffen (Zhang und Reinberg 2001). In der Literatur werden verschiedene Wege beschrieben, in denen beide Prozesse miteinander vereint werden (Zhang und Reinberg 2001, Walter 2015 a). Zum einen führen Methyl-CPG-Bindungsproteine dazu, dass Histon-Deacetylasen (HDAC) an sie binden, die Histone deacetylieren und für eine Methylierung durch Histon-Methyltransferasen zugänglich machen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass in Chromatinregionen mit Hypoacetylierung die MBD-beinhaltenen HMTs direkt binden und die Histonschwänze methylieren. Diese rekrutieren anschließend DNMTs, um DNA zu methylieren (Zhang und Reinberg 2001). Was unklar bleibt, ist die Frage, ob die Methylbindedomäne von SETDB1 selektiv methylierte DNA bindet. Fakt ist jedoch, dass sie zwei mit der DNA interagierende Arginin-Reste beinhaltet, welche ebenso in den MBD-Domänen von MBD1 und MeCP2 zu finden sind (Kang 2015). Dies macht die Funktionsfähigkeit der Methylbindedomäne des SETDB1 wahrscheinlicher.

Funktionen:

Die Funktionen von SETDB1 sind vielfältig und eine Reihe von Arbeiten haben den Einfluss von SETDB1 im Rahmen der Genexpression (Zhu et al. 2020, Jiang et al. 2017, Kang 2015), u.a. bei tumorösen Prozessen (Rodriguez-Paredes et al. 2014, Ceol et al. 2011, Ryu et al. 2006) sowie bei Erhalt und Differenzierung embryonaler Stammzellen (ESCs) beschrieben (Kang 2015).

Das Spektrum an Einflussmöglichkeiten der H3K9-Methylierung auf die Chromatinstruktur wurde bereits vielfach untersucht und beschrieben. So ist ein Zusammenhang mit der Stilllegung der Transkription, der Heterochromatinbildung sowie der X-Inaktivierung (Keniry et al. 2016, Zhu et al. 2020) belegt worden.

Ein Zusammenhang mit erhöhter Zellproliferation bei verschiedenen Tumoren ist ebenfalls mehrfach beschrieben worden. Zu diesen gehören Karzinome der Leber (Fei et al. 2015, Zhang et al. 2018 b), der Lunge (Sun et al. 2015, Cruz-Tapias et al. 2019), des Dickdarms (Cao et al. 2020) sowie der Mamma (Wu et al. 2018, Batham et al. 2019, Zhou et al. 2020).

Sun et al. untersuchten in ihrer Studie 2015 die Rolle von SETDB1 beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC). Sie zeigten einen positiven Einfluss von SETDB1 auf den WNT- β -Catenin-Stoffwechselweg, verbunden mit einer reduzierten p53-Expression und einem gesteigerten Wachstum des NSCLC (Sun et al. 2015). Yang et al. zeigten in ihrer Arbeit von 2019, dass eine Überexpression von SETDB1 die Zellproliferation, Migration und Invasion bei Brustkrebs erhöhte. Eine Depletion von SETDB1 hingegen senkte die Lungenmetastasierung in vivo (Yang et al. 2019). Eine erhöhte Expression von SETDB1 wurde auch bei Melanomen entdeckt (Ceol et al. 2011).

Diese Studien weisen darauf hin, dass SETDB1 eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese und Metastasierung einnimmt. Aus diesem Grund erscheint diese Histon-Methyltransferase als mögliches epigenetisches Target für die klinische Therapie.

Nach der heutigen Studienlage kann bei SETDB1 von einer bedeutenden Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung sowie der Instandhaltung embryonaler Stammzellen ausgegangen werden. Koide et al. beschrieben 2016 die Methyltransferase SETDB1 als essenziellen Faktor für die Instandhaltung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs) in Mausmodellen. Dodge et al. belegten 2004 eine hohe Letalität bei SETDB1-Knockout-Mäusen zwischen E3.5 und E5.5 (Dodge et al. 2004). Das Ausmaß des Defektes beschrieben Dodge et al. 2004 in ihrer Arbeit, in der sie bei „null mutant“-Blastozysten keine embryonalen Stammzelllinien nachweisen konnten. Interessanter-

weise wird bei dem Ausschalten anderer H3K9-Methyltransferasen eine spätere Letalität der Tiere beobachtet. Tachibana et al. untersuchten dies 2002 in einer Studie mit G9A-Null-Mutanten (Letalität zwischen E9.5 und E12.5) sowie 2005 mit GLP-mutierten Embryonen (Letalität um E9.5).

Weitere Studien zeigten ebenfalls den Einfluss von SETDB1 auf die frühe neuronale Entwicklung sowie den Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen (Tan et al. 2012, Zhu et al. 2020). Tan et al. konnten in ihrer Arbeit von 2012 hohe Expressionslevel von SETDB1 in der frühen neuronalen Entwicklung bei Mäusen belegen. Ebenfalls zeigte sich im Verlauf eine Herunterregulierung der Expression. Bei fehlender Histon-Methyltransferase konnten ausgeprägte Gehirndefekte und sogar frühe Letalität beschrieben werden. In Zusammenhang mit Schizophrenie konnten Chase et al. 2013 im Vergleich zu gesunden Patienten erhöhte Expressionen der H3K9-Methyltransferasen in kortikalen Gewebestücken verstorbener Patienten mit Schizophrenie aufzeigen (Chase et al. 2013). Ähnliche Entdeckungen haben Ryu et al. bereits 2006 in Verbindung mit Chorea Huntington gemacht. Sie belegten einen signifikanten Anstieg der ESET-Expression als auch der H3K9-Trimethylierung sowohl in Patienten mit Chorea Huntington als auch in R6/2 Mäusen (Ryu et al. 2006). Als Ursache der Erkrankung sind Mutationen im HTT-Gen und die daraus resultierende vermehrte Abfolge der CAG-Sequenz nachgewiesen worden (MacDonald et al. 1993).

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

SETDB1 wurde primär als Histon-Methyltransferase bezeichnet, welche speziell für die Methylierung von Histon H3 am Lysinrest 9 verantwortlich ist. In den vergangenen Jahren stand die übergeordnete Funktion von SETDB1 im Vordergrund der Forschung. In diesem Zusammenhang belegten Publikationen den genaueren Zusammenhang mit der Genexpression. Ebenso wurde beschrieben, dass SETDB1-Knockout-Mäuse um die Geburt herum starben. Der Grund dafür konnte bisher nicht belegt werden. Es ist jedoch naheliegend, dass SETDB1 eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung einnimmt.

In den von uns untersuchten Mäusen war SETDB1 ausschließlich in Zellen, die Nestin exprimieren, ausgeschaltet. Nestin ist ursprünglich als Intermediärfilament sowie Stamm- und Progenitorzellmarker in der neuronalen Entwicklung bekannt geworden. Vor dem Hintergrund, dass auch diese Knockout-Mäuse mit fehlendem SETDB1 nur in Nestin-exprimierenden Zellen zumeist um die Geburt herum sterben, stellte sich die Frage, ob dafür Lungenstörungen, d.h. Nestin-exprimierende Zellen der Lunge, verantwortlich sein könnten.

Um sich dieser Fragestellung zu nähern, war zunächst die zelluläre Charakterisierung der Nestin-Expression von Interesse.

Anschließend sollte untersucht werden, ob ein SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen mit Veränderungen der perinatalen Lungenentwicklung einhergeht.

Danach wurde getestet, ob die Proliferation Nestin-exprimierender Zellen mit SETDB1-Knockout im Zusammenhang mit potenziellen strukturellen Lungenveränderungen unterschiedlich ist.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Für die Studie wurde perinatales Mausgewebe genutzt. Perinatale Wildtyp-Mäuse (Tag 1 postnatal) in Gießen wurden mit Bouin fixiert und in Paraffin eingebettet. Bei den Tieren wurden die Richtlinien des Tierschutzgesetzes beachtet und alle notwendigen Maßnahmen durchgeführt. Die Meldung der Vorhaben („Tötungsanzeigen“) wurden durch die Tierschutzbeauftragten der Justus-Liebig-Universität Gießen unter den JLU-Nummern A38/2011_V54-19c2015(1)GI20/23 und A29/2009_V54-19c20/15cGI20/23 bestätigt.

Fixiertes Gewebe perinataler Nestin-GFP-Mäuse wurde unserer Arbeitsgruppe von Dr. Grigori Enikolopov, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA, zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen einer langjährigen Zusammenarbeit erhielten wir hierbei für Immunfluoreszenz-Analysen an Kryomaterial immersionsfixierte (4% PFA) perinatale Nestin-GFP-Mäuse (Mignone et al. 2004, Davidoff et al. 2004, Saboor et al. 2016, Reckmann et al. 2018).

Daneben lag uns auch Untersuchungsmaterial von Nestin-GFP-Mäusen vor, bei denen in Nestin-exprimierenden Zellen SETDB1 fehlt. Diesbezüglich wurden uns bereits fixierte perinatale (18.5 dpc und Tag 1 postnatal) homozygote sowie heterozygote Mäuse mit SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen und eine entsprechende Anzahl von Wildtypen überlassen. Bei den Knockouts war das SETDB1-Gen, welches für eine Histonmethyltransferase kodiert, mittels Cre/lox P-System in Nestin-exprimierenden Zellen ausgeknockt und die Promoterregion mit GFP gekoppelt.

3.2 Geräte

Fluoreszenz Mikroskop, Axioskop 2 plus	(Zeiss, München)
Kryostat, CM1900	(Leica, Wetzlar)
Axiostar Plus	(Zeiss, München)
Rotationsmikrotom RM2255	(Leica, Wetzlar)
Axioplan 2 imaging	(Zeiss, München)
Motic SMZ-171	(Motic, Wetzlar)
Wärmeschrank Heraeus B5042	(Heraeus, Deutschland)

3.3 Antikörper

3.3.1 Primärantikörper in der Immunhistochemie

PCNA-Antikörper:

- Abcam ab 92552 (vormals Epitomics #2714-1) (Berlin, Deutschland)
- Monoklonal aus Kaninchen
- Verdünnung: 1:500 in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % Natriumazid

3.3.2 Primärantikörper für die Immunfluoreszenz

CD31-Antikörper:

- Dianova DIA-310-M (Hamburg, Deutschland)
- Monoklonal aus Ratte
- Verdünnung: 1:20 in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % Natriumazid

SMA-Antikörper:

- Sigma # A 5228 (St. Louis, USA)
- Monoklonal aus Maus
- Verdünnung: 1:500 - 1:1000 in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % Natriumazid

PCNA-Antikörper:

- Abcam ab 92552 (vormals Epitomics #2714-1) (Berlin, Deutschland)
- Monoklonal aus Kaninchen
- Verdünnung: 1:500 in PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % Natriumazid

3.3.3 Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Cy3-Goat-anti-Rabbit IgG:

- Jackson Immuno Research über Dianova 111-166-045 (Hamburg, Deutschland)
- Verdünnung: 1:500 in PBS

Cy3-Donkey-anti-Rat:

- Jackson Immuno Research über Dianova #68682 (712-165-153) (Hamburg, Deutschland)
- Verdünnung: 1:1250 in PBS

Cy3-Goat-anti-Mouse IgG:

- Jackson Immuno Research über Dianova #115-165-003 (Hamburg, Deutschland)
- Verdünnung: 1:500 in PBS

Cy5-Donkey-anti-Mouse IgG:

- Jackson Immuno Research über Dianova 715-175-151 (Hamburg, Deutschland)
- Verdünnung: 1:800 in PBS

3.4 Methoden

3.4.1 Azanfärbung

3.4.1.1 Verwendete Chemikalien, Puffer und Lösungen

- Xylol
- Ethanol (70 %, 96 %, 100 %)
- Aqua dest.
- Anilinalkohol: 100 ml 90 %iger Ethanol mit 0,1 ml Anilin
- Azokarminlösung: 0,1 g Azokarmin G mit 100 ml Aqua dest., kurz aufkochen, filtrieren und je 100 ml Filtrat 1 ml Eisessig dazugeben
- 5 % Wolframatophosphorsäure
- Anilinblau-Orange-Gemisch: 0,5g Anilinblau, 2g Orange G in 100ml Aqua dest., 8ml Eisessig aufkochen und filtrieren
- Anilinblau-Orange-Gebrauchslösung: 1 Teil Anilinblau-Orange-Gemisch + 2 Teile Aqua dest.
- Isopropanol absolut
- Eukitt Quick-hardening mounting medium
- Super Frost Plus Objektträger

3.4.1.2 Durchführung

Von den Bouin-fixierten Geweben der Nestinzellspezifischen-Knockout-Mäuse (n=22, homozygote und heterozygote Knockouts und Wildtypen) sowie von anderen Wildtypen (n=3) wurden mithilfe des Rotationsmikrotoms 6 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgelegt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet. Ebenso wurde auch noch Kryogewebe der Knockouts (n=5, homozygote Knockouts und ein Wildtyp), welches mit PFA fixiert wurde, geschnitten (siehe 3.4.3.2 Immunfluoreszenz) und ebenfalls Azan-gefärbt.

Im Folgenden werden die Versuchsschritte schematisch unter Angabe der Inkubationszeiten dargestellt.

- Entparaffinieren in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe, dann in Wasser bringen für jeweils 5 min

- Schnitte für 5 min in Anilinalkohol stellen
- Azokarminlösung im Wärmeschrank bei 56 °C vorwärmen und anschließend die Schnitte für 10-15 min färben
- Spülen mit Aqua dest.
- Differenzieren mit Anilinalkohol
- Spülen mit Aqua dest.
- Für ca. 2 Stunden in 5 %ige Wolframatophosphorsäure
- Spülen mit Aqua dest.
- Anilinblau-Orange-Gebrauchslösung für 1-2 Stunden
- Spülen mit Aqua dest.
- 2-5 min in Isopropanol entwässern, in Xylol geben
- Eindeckung mit Eukitt Quick-hardening mounting medium
- Lagerung und Trocknung bei Raumtemperatur

Anschließend wurden von den Schnitten Bilder mit einem Mikroskop (Axioskop 2 plus) angefertigt.

3.4.2 Immunhistochemie

3.4.2.1 Verwendete Chemikalien, Puffer und Lösungen

- Super Frost Plus Objektträger
- Xylol
- Ethanol (100 %, 96 %, 70 %)
- H₂O₂ / Methanol (2 ml H₂O₂ 30 % + 50 ml Methanol)
- Aqua dest.
- PBS: 0,13 M NaCl; 0,05 M Na₂HPO₄; mit HCl auf pH 7,4 einstellen
- Primärantikörper (siehe Liste) in Verdünnungspuffer: PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃
- Peroxidase-markiertes Polymer (Dako EnVision + System-HRP, Labelled Polymer, Anti-mouse / Anti-rabbit)
- PB 0,1 M pH 7,4 (4,9 g KH₂PO₄; 29,2 g Na₂HPO₄ * 2 H₂O gelöst in 2 Liter Aqua dest. und auf pH 7,4 eingestellt)
- DAB-Stammlösung (1 g DAB in 44,4 ml PBS, pH 7,4) in 45 ml PB 0,1 M
- Ammoniumchlorid
- Nickelsulfat (0,05 M, 4 °C) (130 mg Nickelsulfat, 10 ml Aqua dest., bei 4°C lagern)
- Glukose 10 % (-20 °C)
- Glukose-Oxidase (-20 °C) 0,18 mg / 150 µl Aqua dest.
- Eukitt Quick-hardening mounting medium

3.4.2.2 Durchführung

Von den Bouin-fixierten Geweben der Nestinzellspezifischen-Knockout-Mäuse (n=9, homozygote und heterozygote Knockouts und Wildtypen) sowie von anderen Wildtypen (n=3) wurden mithilfe des Rotationsmikrotoms 6 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgelegt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet.

Im Folgenden werden die Versuchsschritte systematisch unter Angabe der Inkubationszeiten dargestellt.

- Entparaffinieren mit Xylol insgesamt dreimal für 5 min

- Rehydrieren in einer Ethanolreihe (abnehmender Ethanolgehalt 100 %, 96 %, 70 %) für jeweils 5 min sowie für 30 min in H₂O₂ / Methanol (2 ml H₂O₂ 30 % + 50 ml Methanol)
- Spülen mit Aqua dest. für 5 min
- Spülen mit PBS für 5 min
- Inkubation mit dem Primärantikörper über 24 h bei 4 °C (Verdünnung: PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃)
- Spülen mit PBS dreimal für jeweils 5 min
- Zugabe des Peroxidase-markierten Polymer für 30 min bei Raumtemperatur
- Spülen mit PBS und PB für jeweils 10 min
- Entwicklung der Peroxidase-Aktivität mit Diaminobenzidin (DAB):
 - 1 ml DAB-Stammlösung (1 g DAB in 44,4 ml PBS, pH 7,4) in 45 ml PB 0,1 M
 - + 18 mg / 100 µl Ammoniumchlorid
 - + 900 µl Nickelsulfat (0,05 M, 4 °C) (130 mg Nickelsulfat, 10 ml Aqua dest., bei 4 °C lagern)
 - + 900 µl Glukose 10 % (-20 °C)
 - Rühren und filtrieren
 - Vor der Reaktion Zugabe von Glukose-Oxidase (-20 °C) 0,18 mg / 150 µl Aqua dest. und ca. 15 min einwirken lassen (abhängig von dem verwendeten Antikörper)
- Spülen mit PB für 10 min
- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe
- Eindecken mit Eukitt

Von den Schnitten wurden anschließend Bilder mit dem Mikroskop (Axioskop 2 plus) angefertigt. Zur Kontrolle wurde auf jedem Objektträger ein Schnitt anstelle des Primärantikörpers nur mit der Pufferlösung (PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃) inkubiert.

3.4.3 Immunfluoreszenz

3.4.3.1 Verwendete Chemikalien, Puffer und Lösungen

- Super Frost Plus Objektträger
- PBS: 0,136 M NaCl; 0,05 M Na₂HPO₄ * 2 H₂O ; mit HCl auf pH 7,4 einstellen
- 2 % Normalserum verschiedener Tierspezies (20 µl Serum + 980 µl PBS)
- Primärantikörper (siehe Liste) in Verdünnungspuffer: PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃
- Sekundärantikörper (siehe Liste) in Verdünnungspuffer: PBS
- DAPI = 4',6-Diamidine-2-phenylindole dihydrochloride, Verdünnung: 1:1250 (bei einer Konzentration von 1 mg / ml)
- 4 % PFA (40 g PFA + 500 ml H₂O auf 70 °C erhitzen; 2 M NaOH dazugeben; 500 ml 0,2 M PB zugeben und den pH auf 7,2-7,4 einstellen)
- Eindecken mit gepuffertem Glycerol 3:1 (Glycerol + PBS)

3.4.3.2 Durchführung

Von dem PFA-fixierten Kryo-Gewebe der Knockout-Gruppen (n=7, homozygot und heterozygot sowie Wildtyp) und von einem anderen Wildtyp wurden mit dem Kryostat (CM1900) 10 µm dicke Schnitte bei ca. -18 °C angefertigt und auf Objektträger gezogen. Die Objektträger wurden anschließend bei Raumtemperatur für 1 h getrocknet.

Bei der Durchführung des Versuches wurde speziell darauf geachtet, dass die Lichtexposition auf die Schnitte so gering wie möglich gehalten wird, um die Fluoreszenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und der verwendeten Antikörper zu schützen. Aufgrund dessen wurden die Schnitte während des Versuches durchgehend in einer abgedunkelten „Feuchtekammer“ gelagert und inkubiert.

Im Folgenden sind die Einzelschritte des Versuchablaufs systematisch dargestellt.

- Teilweise Vorbehandlung der Schnitte mit PBS und 0,1 % Triton je nach Antikörper für 10 min zur Verbesserung der Permeabilität des Gewebes
- Spülen in PBS dreimal für je 10 min
- Blockung mit 2 %igem Normalserum in PBS von verschiedenen Tierspezies für 60 min bei Raumtemperatur

- Zugabe des Primärantikörpers (Verdünnung mit PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃) und Inkubation über Nacht bei 4 °C
- Spülen mit PBS zweimal je 10 min
- Zugabe des Sekundärantikörpers in Verbindung mit DAPI (Verdünnung mit PBS für 1 h bei Raumtemperatur)
- Bei Durchführung der Doppelfärbung erfolgt die Färbung mit zwei verschiedenen Primärantikörpern, sowie den entsprechenden Sekundärantikörpern
- Spülen mit PBS zweimal je 10 min
- Fixierung mit 4 % PFA für 10 min
- Spülen mit PBS zweimal je 10 min
- Eindecken mit gepuffertem Glycerol (3:1 Glycerol + PBS) und Aufbewahrung der Schnitte bei 4 °C

Von den Schnitten wurden anschließend Bilder mit dem Fluoreszenz Mikroskop (Axioskop 2 plus) angefertigt. Als Kontrolle wurde auf jedem Objektträger ein Schnitt anstelle des Primärantikörpers nur mit der Pufferlösung (PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN₃) inkubiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Nestin-Expression in der Lunge bei SETDB1-Knockout-Feten

4.1.1 Nestin-Expression in den Lungengefäßen bei SETDB1-Knockout-Feten

In unseren ersten Versuchen wurde der Fokus auf die Lokalisation von Nestin-exprimierenden Zellen in der Lunge gelegt. Hierfür wurden Kryo-Schnitte von SETDB1^{+p}- und ^{p/p} in Nes⁺- Feten im Alter von 18.5 dpc untersucht.

Bei den SETDB1-Knockout-Feten wurde das SETDB1-Gen explizit in Nestin-exprimierenden Zellen ausgeschaltet und Nestin mit GFP gekoppelt.

Die Nestin-GFP-Färbung konnte innerhalb der kompletten Lunge in zahlreichen Zellen dargestellt werden und ist größtenteils auf größere und kleinere Gefäße (Abb. 17) einschließlich der Kapillaren (Abb. 18) begrenzt. Dies trifft sowohl auf die SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Feten, als auch auf die SETDB1^{+p} in Nes⁺- Feten zu. Ein Unterschied bezüglich des Färbemusters konnte nicht beobachtet werden (Abb. 17).

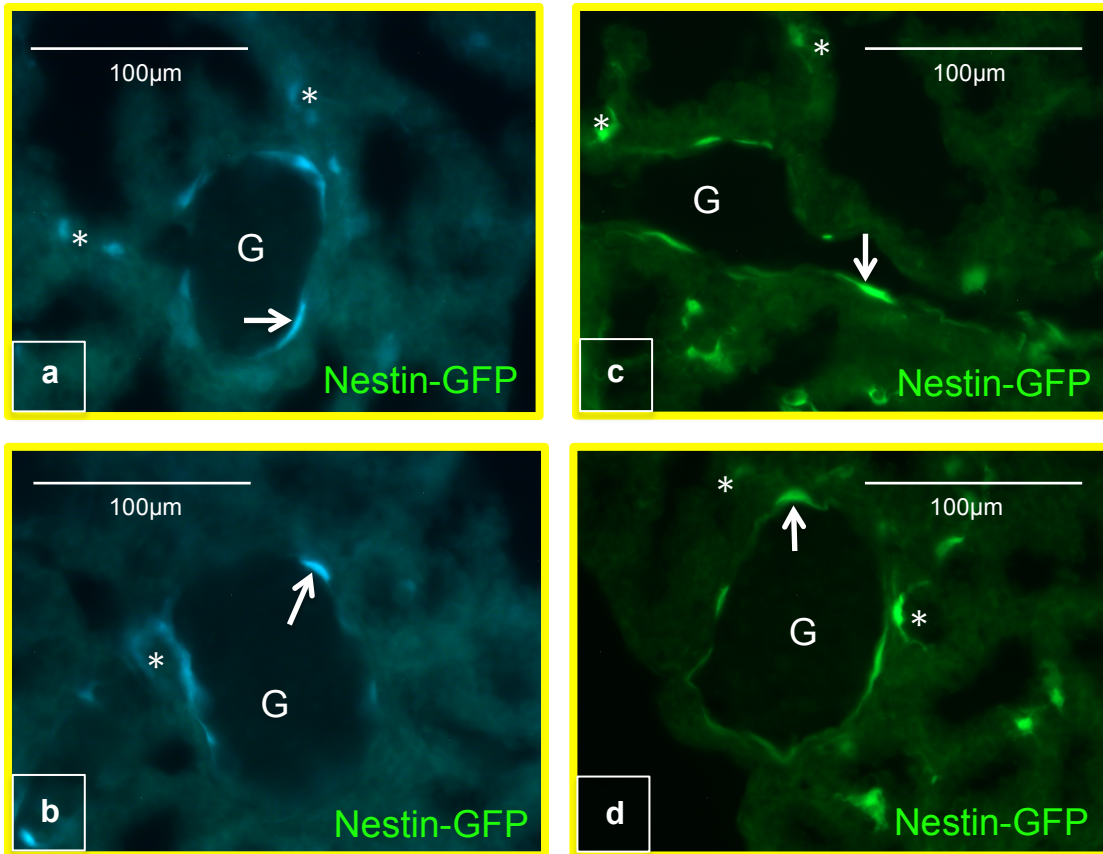


Abb. 17: Nestin-GFP-exprimierende Zellen mit homozygotem und heterozygotem SETDB1-Knockout in Lungengefäßen verschiedener Größe

a,b: SETDB1^{+/p} in Nes⁺: Aufnahme eines Gefäßquerschnitts der Lunge (G) mit positivem Nestin-GFP-Signal (grün, Pfeile) in der Gefäßwand des transgenen SETDB1-Knockout-Feten. Ebenso angefärbt sind die Gefäßwände der Kapillaren ().*

c,d: SETDB1^{pp} in Nes⁺: Übersichtsaufnahme eines Lungengefäßes (G) im Längs- und Querschnitt mit positiven Nestin-GFP-Zellen (grün, Pfeile) in dem SETDB1^{pp} in Nes⁺-Feten.

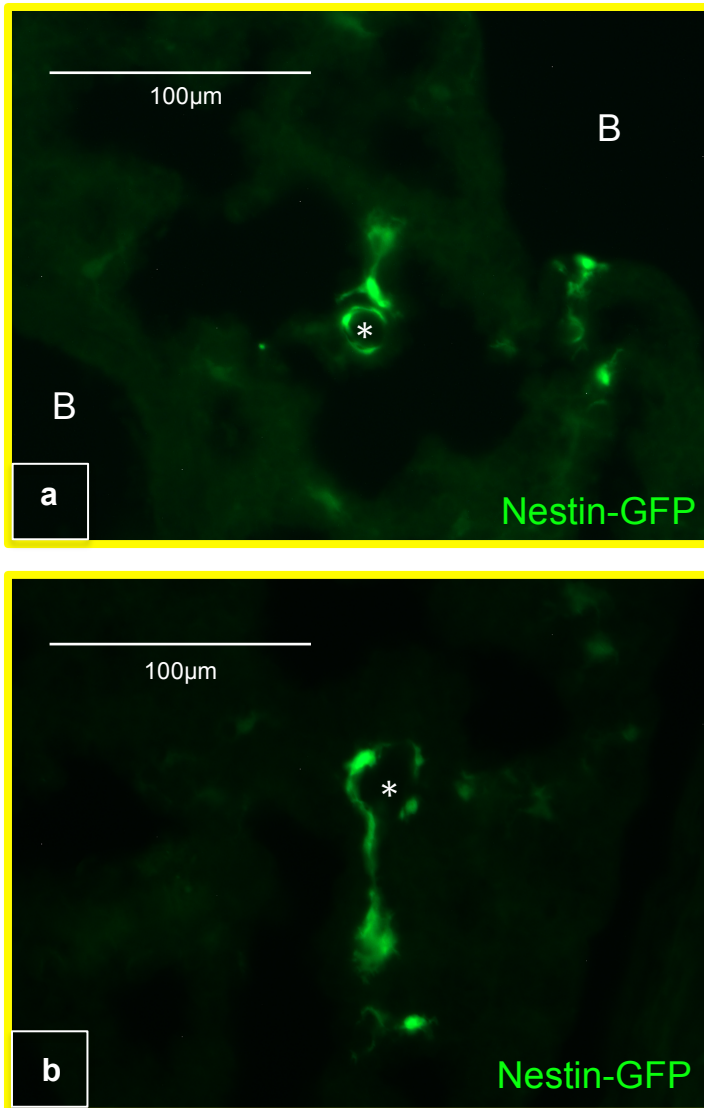


Abb. 18: Lokalisation von Nestin-GFP in Kapillaren der Lunge von Feten mit homozygotem SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen

a,b: Nestin-GFP (grün) in Kapillaren () der Lunge. Die Nestin-GFP-Expression zeigte sich in Wänden unterschiedlich großer Gefäße.*

Die Bronchioli (B) hingegen weisen kein Signal für Nestin-GFP auf.

4.1.2 Verifizierung der SETDB1-Knockout-Zellen anhand von Nestin-GFP innerhalb der Gefäßwand

Nachdem das Vorhandensein der Nestin-GFP-Expression innerhalb der Lungengefäße bestätigt werden konnte, stellte sich anschließend die Frage, um welchen Zelltyp es sich hierbei handelt.

Um dies genauer verifizieren zu können, wurden im Folgenden Immunfluoreszenzfärbungen mit den Antikörpern gegen CD31 und SMA an Lungenschnitten von SETDB1^{P/P} in Nes⁺- Feten durchgeführt. CD31, auch bekannt als „platelet endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1) oder auch „cluster of differentiation 31“, richtet sich gegen ein Endothelzell-Protein (CD31). Es dient somit der Identifizierung von Endothelzellen (Dissertation Berndt C. 2011, Saboor et al. 2016).

Zur Darstellung von glatten Gefäßmuskelzellen wurde der Antikörper SMA verwendet. Dieser richtet sich gegen das in glatten Muskelzellen enthaltene Cytoskelettprotein (smooth muscle actin) (Dissertation Berndt C. 2011, Saboor et al. 2016).

4.1.2.1 Fehlende Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Endothelzellmarker

CD31 in Lungengefäßen bei homozygoten SETDB1-Knockout-Feten

In den folgenden Immunfluoreszenz-Untersuchungen lag der Fokus auf der Spezifizierung der Nestin-GFP-positiven Zellen. Zunächst erfolgte die Untersuchung mittels des Endothelzellmarkers CD31.

Die Untersuchungen wurden erneut an Lungenabschnitten von SETDB1^{p/p} in Nes⁺-Feten im Alter von 18.5 dpc durchgeführt. Ziel war es also, zu verifizieren, ob es sich bei den Nestin-exprimierenden Zellen mit SETDB1-Knockout um Endothelzellen handelt.

Abbildung 19 zeigt eine Übersichtsaufnahme von einer Arterie (Abb. 19 a-c) sowie einer Vene (Abb. 19 d-f). Die Arterie zeichnet sich durch eine kräftige Muskelschicht (Abb. 19 a-c (siehe doppelköpfigen Pfeil in c)) aus, die Vene hingegen durch ihre schmalere Gefäßwand (Abb. 19 d-f). Neben den Nestin-GFP-positiven großen Gefäßen sind im umliegenden Gewebe weitere Nestin-GFP-Signale zu verzeichnen, welche sich in kleineren Gefäßen befinden. Sowohl um die Arterie als auch um die Vene sind ebenfalls Bronchioli ohne Nestin-GFP-Signal angeschnitten (Abb. 19, siehe B). Weder in Venen noch in Arterien gibt es eine Kolokalisation von CD31-positiven Endothelzellen und Nestin-GFP-positiven Zellen (Abb. 19, siehe c und f).

Es ist eindeutig erkennbar, dass sich die Nestin-GFP-exprimierenden Zellen (Abb. 19, siehe MC in c und f) in der Gefäßmuskelschicht befinden. CD31 hingegen ist für die Färbung der Endothelzellschicht verantwortlich. Diese Zellen kleiden das Gefäßlumen aus und ragen ins Lumen hinein (Abb. 19, siehe EC in b und e).

Dass es sich nicht um dieselbe Zelle handelt, sondern um zwei unterschiedliche Zelltypen ist in Abb. 19 c und f klar erkennbar. Die Nestin-GFP-exprimierenden glatten Muskelzellen befinden sich lumenfern und liegen von außen den Endothelzellen auf (Abb. 19, siehe c und f (EC, MC)).

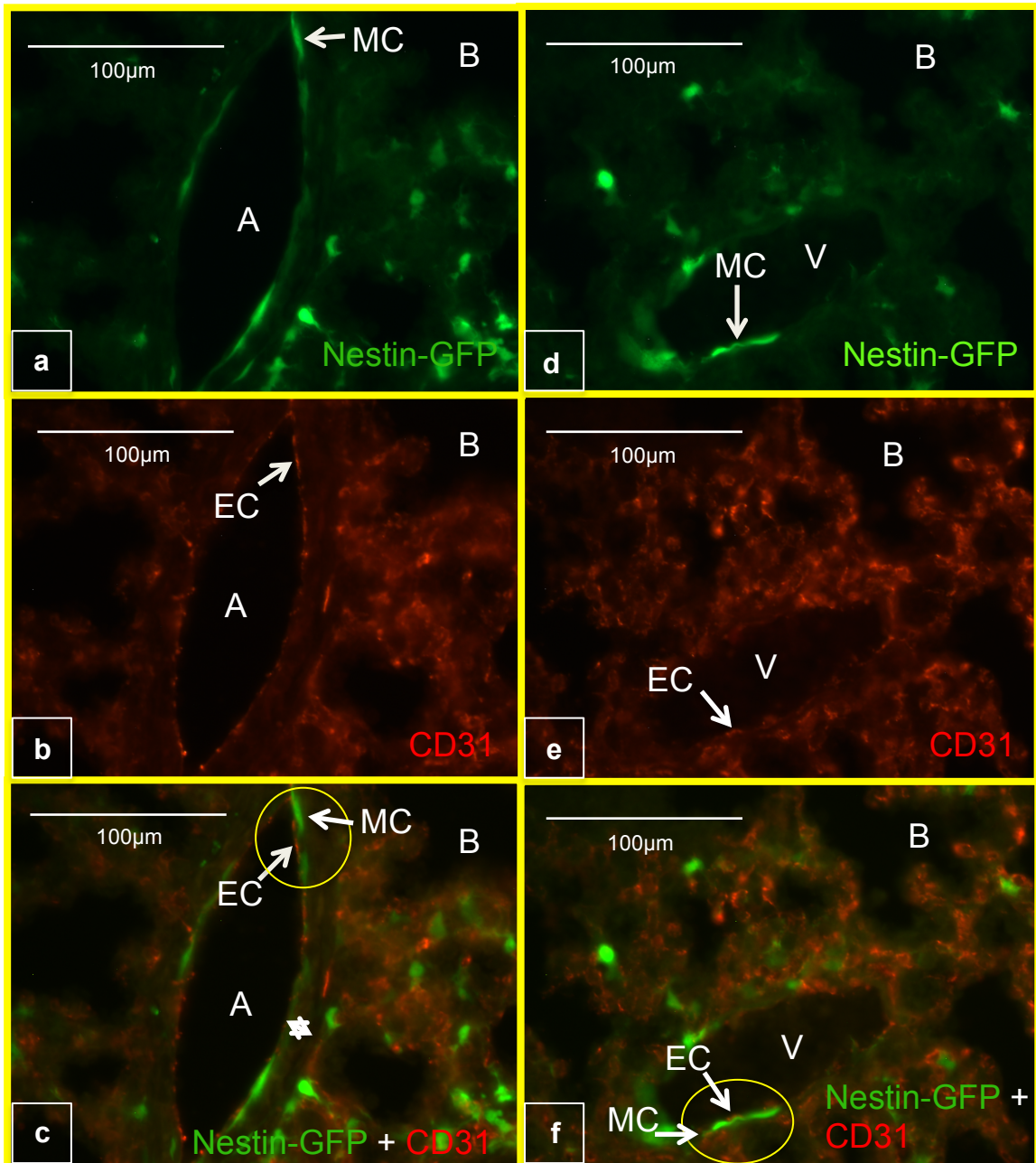


Abb. 19: fehlende Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Endothelzellmarker CD31 bei homozygoten SETDB1-Knockout-Feten in Nestin-exprimierenden Zellen

Nestin-GFP und CD31 sind in einer Arterie (A) (a-c) und Vene (V) (d-f) dargestellt. CD31-positive Endothelzellen erscheinen in rot (b und e), Nestin-GFP-positive Zellen sieht man in grün (a und d). Bei gleichzeitiger Darstellung von Nestin-GFP und CD31 sieht man keine Mischfarbe von CD31 und Nestin-GFP (c und f). Die CD31-positiven Zellen befinden sich luminal der Nestin-GFP-positiven Zellen (c und f, siehe Kreis). (MC) bezeichnet Nestin-GFP gefärbte Muskelzellen, (EC) CD31-positive Endothelzellen, (B) Bronchiolus.

4.1.2.2 Fehlende Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Endothelzellmarker

CD31 in Kapillaren der Lunge bei homozygoten SETDB1-Knockout-Feten

Wie bereits beschrieben, wurde Nestin-GFP nicht nur in den großen Gefäßen der Lunge beobachtet, sondern ist ebenso in Kapillaren zu finden.

Auch hier erfolgten zur Identifizierung der Zelltypen Färbungen von Lungenabschnitten mit dem Endothelzellmarker CD31.

In Abbildung 20 konnten einige Kapillare (Abb. 20, siehe *) mittels Immunfluoreszenzfärbungen dargestellt werden.

In Querschnitten von Kapillaren erkannte man die zirkulär um das Lumen verlaufende Endothelschicht mithilfe des gegen Endothelzellproteine gerichteten Antikörpers CD31 (Abb. 20 c und d). Abbildung 20 a und b zeigt die Fluoreszenz von Nestin-GFP. Bei den hier angefärbten Zellen handelt es sich um Perizyten, welche mit ihren Fortsätzen um die Kapillaren herumliegen. Bei den Perizyten findet sich ein GFP-Signal sowohl beim Zellkern als auch bei den Fortsätzen (Abb. 20 b, siehe P).

Dass es sich hierbei um keine Kolokalisation von Nestin-GFP und CD31 handelt, wird in Abbildung 20 e und f verdeutlicht. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die CD31-positiven Endothelzellen keine Nestin-GFP-Expression aufweisen und es sich somit um Zellen unterschiedlichen Types handelt. Bei den Kapillaren weisen lediglich die Perizyten ohne Endothelzellschicht eine Nestin-GFP-Expression auf und gehören somit ebenfalls zu den Nestin-exprimierenden Zellen in der Lunge.

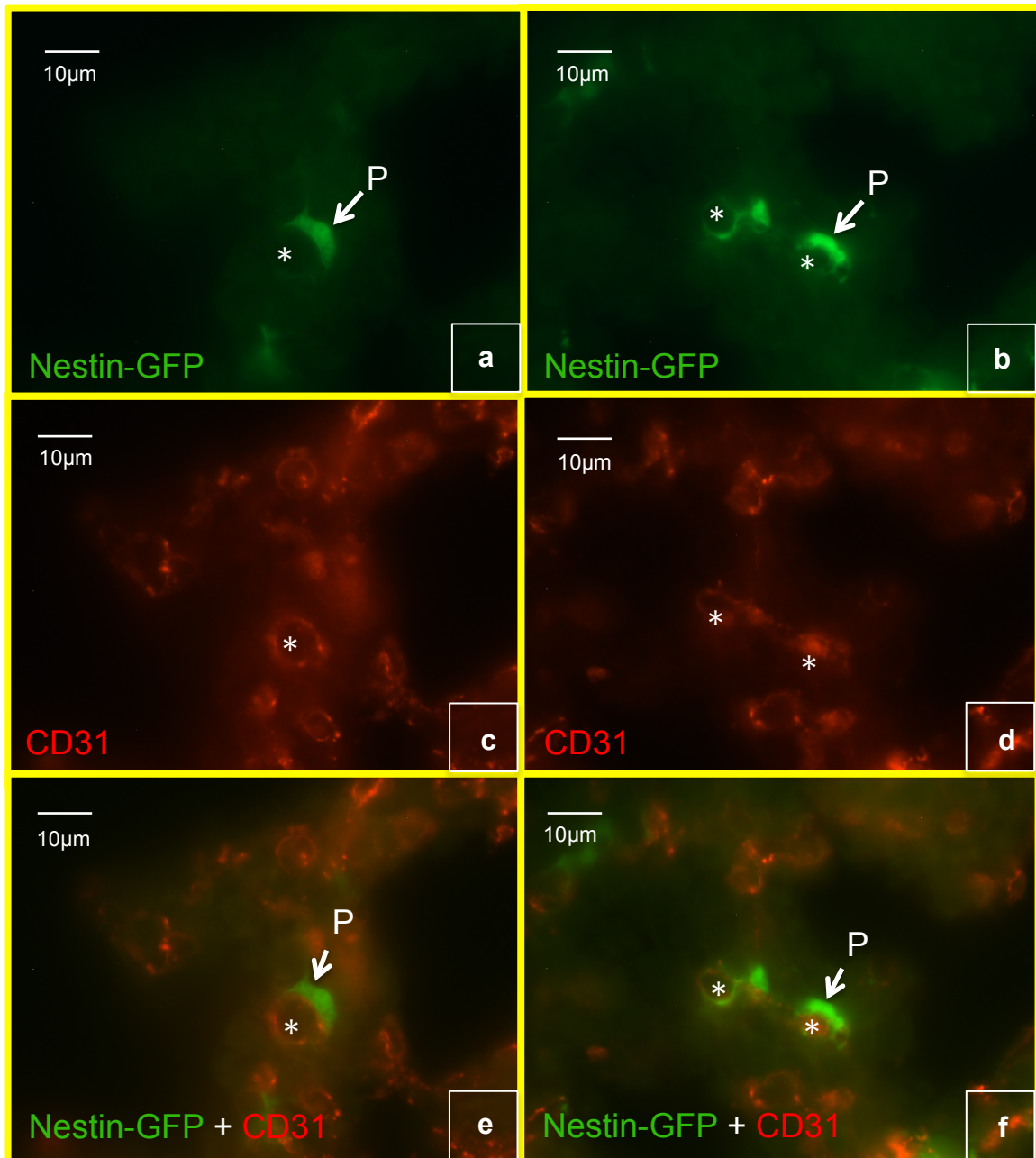


Abb. 20: fehlende Kolokalisation von dem Endothelzellmarker CD31 und Nestin-GFP in Kapillaren bei Feten mit homozygotem SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen

a,b: Nestin-GFP-(grün) positiv angefärbte Perizyten (P) um Kapillarwand ().*

c,d: positive Färbung der Endothelzellen (rot) in der Kapillarwand () mit dem Endothelzellmarker CD31.*

e,f: keine Kolokalisation von Nestin-GFP (grün) und dem Endothelzellmarker CD31 (rot) in Kapillaren ().*

4.1.2.3 Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Gefäßmuskelzellmarker SMA in Lungengefäßen von homozygoten SETDB1-Knockout-Feten

Parallel zu den Untersuchungen mit dem Endothelzellmarker CD31 wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit dem Gefäßmuskelzellmarker SMA angefertigt. Ziel der Untersuchung war herauszufinden, ob es sich bei den Nestin-exprimierenden Zellen in größeren Gefäßen von SETDB1^{P/P} in Nes⁺- Feten um glatte Gefäßmuskelzellen handelt. Um dies zu untersuchen, wurden Lungenabschnitte der SETDB1^{P/P} in Nes⁺- Feten mit dem SMA-Antikörper gefärbt und die Lokalisation von Nestin-GFP und SMA unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop) verglichen.

Exemplarisch sieht man in Abbildung 21, 22 und 23 eine typische Lokalisation von Nestin-GFP und SMA.

Betrachtet man zunächst nur die Nestin-GFP-Lokalisation, so kann festgestellt werden, dass nicht alle Zellen der Gefäßmuskulatur Nestin-exprimierende Zellen sind. Es ist jedoch eindeutig, dass es sich bei den Nestin-exprimierenden Zellen in der Gefäßwand um glatte Muskelzellen handelt (Abb. 21-23). Während der SMA-Antikörper das Zytoplasma der glatten Gefäßmuskelzellen anfärbt (Abb. 21 und 22, siehe c und d), kann das Nestin-GFP-Signal primär im Zellkern der Muskelzelle beobachtet werden (Abb. 21 und 22, siehe a und b).

Die Koexpression von Nestin-GFP und dem Muskelzellmarker SMA kann also eindeutig belegt werden (Abb. 21 und 22, siehe e und f sowie Abb. 23 c).

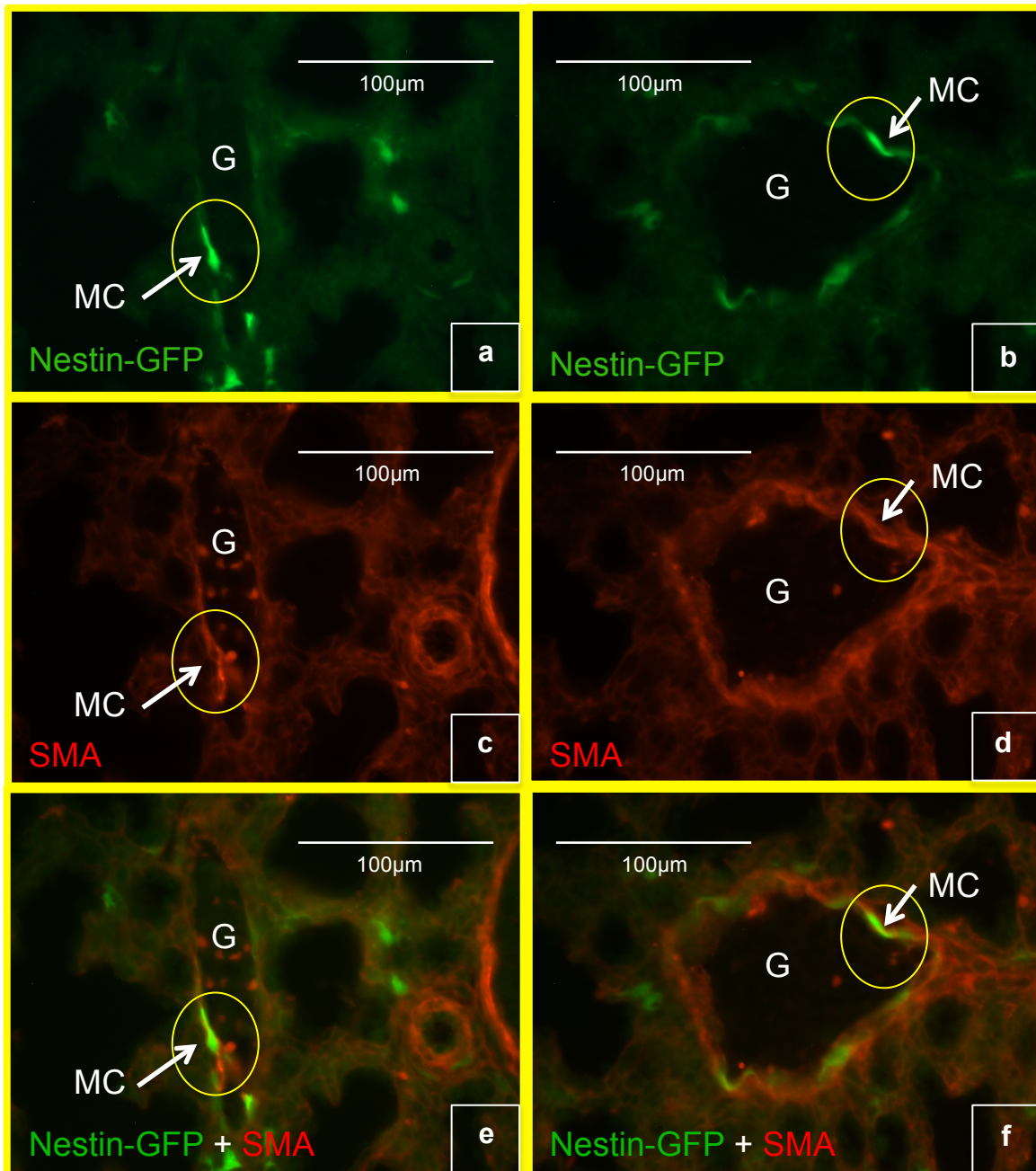


Abb. 21: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA in glatten Gefäßmuskelzellen bei Feten mit homozygotem SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen

a,b: Nestin-GFP (grün) färbt den Zellkern der glatten Gefäßmuskelzelle (MC).

c,d: positive SMA-Färbung (rot) des Zytoplasma der Gefäßmuskelzelle (MC).

e,f: Kolokalisation von Nestin-GFP (grün) und SMA (rot) ist nachweisbar in glatten Gefäßmuskelzellen (MC) in größeren Gefäßen (G) der Lunge (gelbes Signal).

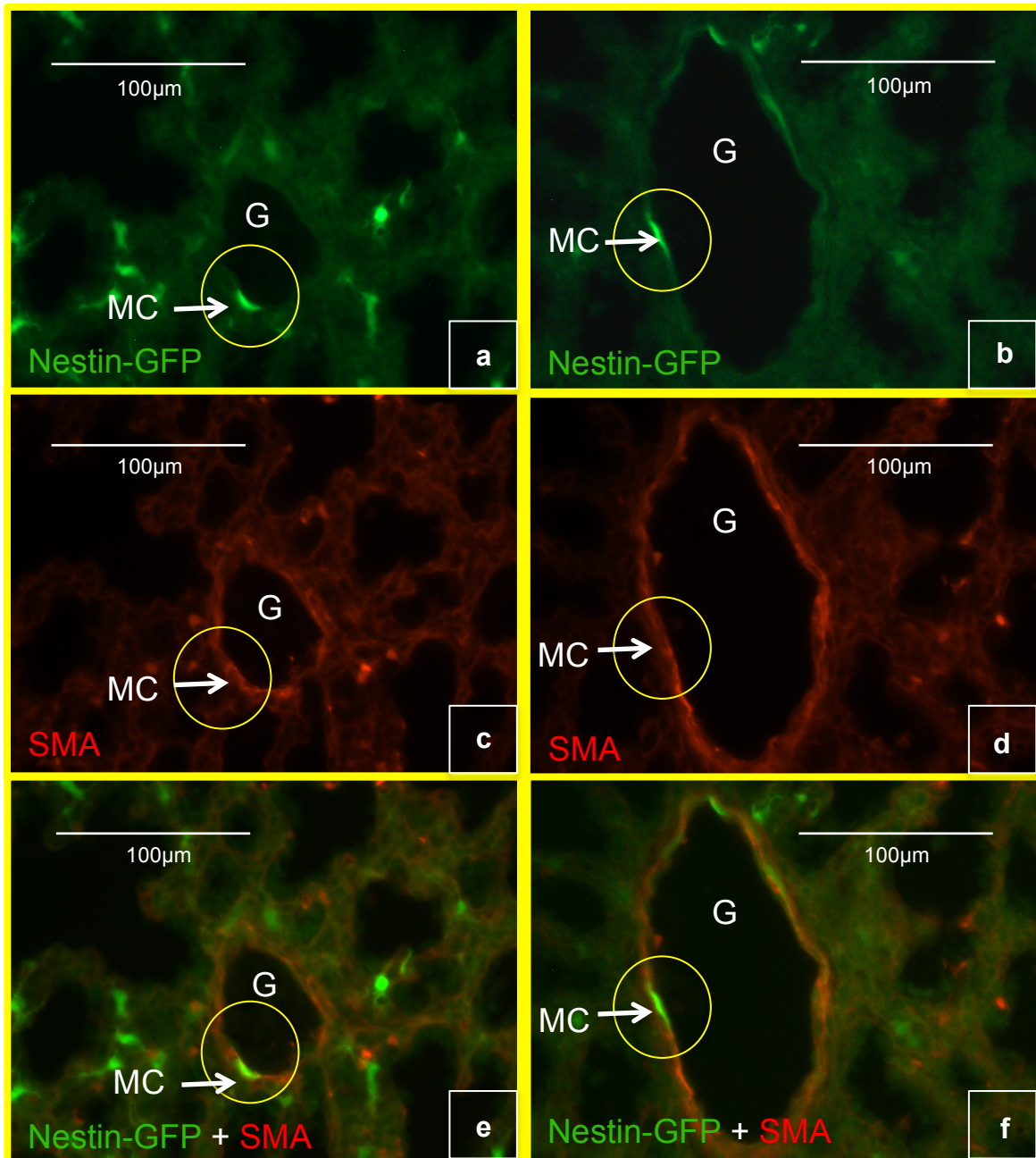


Abb. 22: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA in glatten Gefäßmuskelzellen unterschiedlich großer Gefäße bei Feten mit homozygotem SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen

a,b: Nestin-GFP (grün) färbt den Zellkern der glatten Gefäßmuskelzelle (MC).

c,d: positive SMA-Färbung (rot) des Zytoplasma der Gefäßmuskelzelle (MC).

e,f: Kolokalisation von Nestin-GFP (grün) und SMA (rot) ist nachweisbar in glatten Gefäßmuskelzellen (MC) in unterschiedlich großen Gefäßen (G) der Lunge.

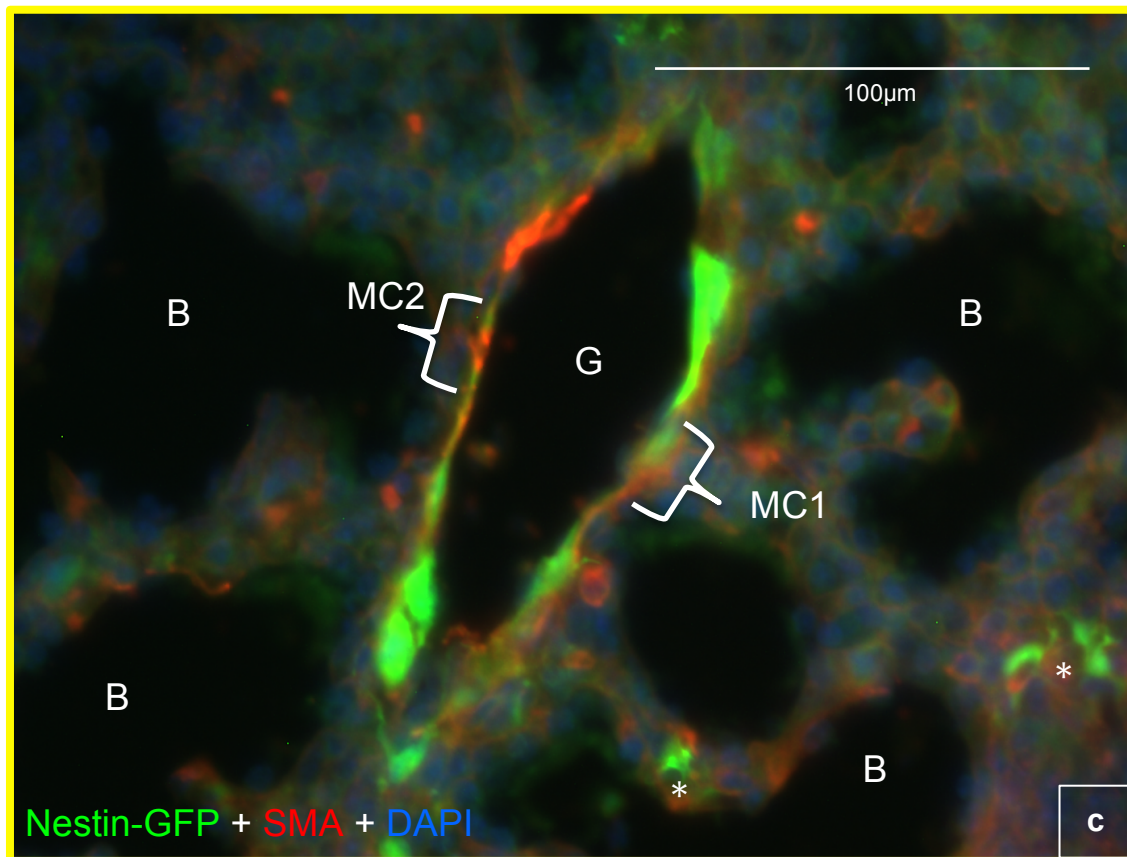
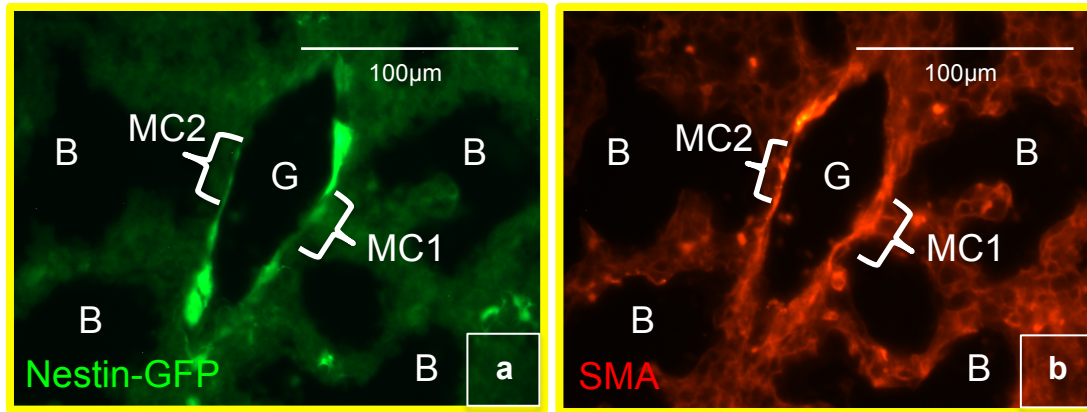


Abb. 23: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA in glatten Gefäßmuskelzellen eines Lungengefäßes bei Feten mit homozygotem SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen

a-c: Übersichtsaufnahme eines Lungengefäßes (G) mit Nestin-GFP/- und SMA-positiven glatten Gefäßmuskelzellen (MC1 und MC2); Nestin-GFP färbt primär den Zellkern der Gefäßmuskelzelle (grün), SMA färbt das Zytoplasma der Muskelzelle (rot); umliegend weitere Nestin-GFP-positive Kapillare () und Nestin-GFP-negative Bronchioli (B); Darstellung der Zellkerne mittels DAPI (blau).*

4.2 Verifizierung der Proliferationsfähigkeit von Nestin-exprimierenden Zellen mit SETDB1-Knockout

Wie bereits eingangs erwähnt (siehe 1.3), konnten Nestin-exprimierende Zellen innerhalb verschiedener Gewebe auch außerhalb des Gehirns als Stamm- oder Progenitorzellen identifiziert werden. Ebenso wurde eine erhöhte Nestin-Expression besonders in sich entwickelnden oder in Regeneration befindlichen Organen nachgewiesen, während die Expression im Adulten herunterreguliert war.

In den folgenden Untersuchungen lag der Fokus darauf, herauszufinden, ob es sich bei den Nestin-exprimierenden Zellen mit SETDB1-Knockout um proliferierende Zellen handelt. Als Untersuchungsmaterial standen transgene Nestin-GFP-Mäuse am postnatalen Tag 1 sowie SETDB1^{+p} in Nes⁺- (18.5 dpc) und SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Feten (18.5 dpc) zur Verfügung. Um zu untersuchen, ob Nestin-exprimierende glatte Gefäßmuskelnzellen mit SETDB1-Knockout auch Proliferationspotenzial besitzen, wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen an Kryoschnitten der Lunge mit Antikörpern gegen den Muskelzellmarker SMA und den Proliferationsmarker PCNA durchgeführt. Im Lungengewebe aller drei Mausgruppen ließen sich proliferierende Nestin-GFP-positive Gefäßmuskelnzellen darstellen (Abb. 24, 25, 26). Abbildung 24 a zeigt eine Übersichtsaufnahme eines Lungengefäßes des SETDB1^{+p} in Nes⁺- Feten sowie in b und c einen vergrößerten Gefäßausschnitt mit zwei Nestin-GFP-positiven Gefäßmuskelnzellen (MC1 und MC2). Die SMA-positive Gefäßmuskelnzelle wird in lila dargestellt (siehe gelbe Pfeile in Abb. 24 b und c). Dass es sich bei diesen Zellen um proliferierende Zellen handelt wird in Abb. 24 c anhand der gelben Mischfarbe verdeutlicht (Abb. 24 c, MC1 und MC2). In Abbildung 25 wurde ebenfalls eine Lungenübersichtsaufnahme einer transgenen Nestin-GFP-Maus (Abb. 25 a), sowie zwei vergrößerte Gefäßausschnitte (Abb. 25 b und c) dargestellt. Man erkennt die Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA (Abb. 25 b, gelber Kasten). Dass es sich hierbei ebenfalls um proliferierende Zellen handelt wird in Abb. 25 c anhand der Mischfärbung (gelber Stern) deutlich. Abbildung 26 zeigt eine Übersichtsaufnahme eines Lungengefäßes des SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Feten. Die glatte Gefäßmuskelschicht kommt in dieser Abbildung in blau zur Darstellung (Abb. 26 a). In Abb. 26 b, c und d sieht man die isolierte Darstellung von SMA, Nestin-GFP und PCNA am selben Schnitt in schwarz/weiß. Die gelben Pfeile weisen auf die proliferierenden Nestin-GFP-positiven glatten Gefäßmuskelnzellen (Abb. 26 a-d).

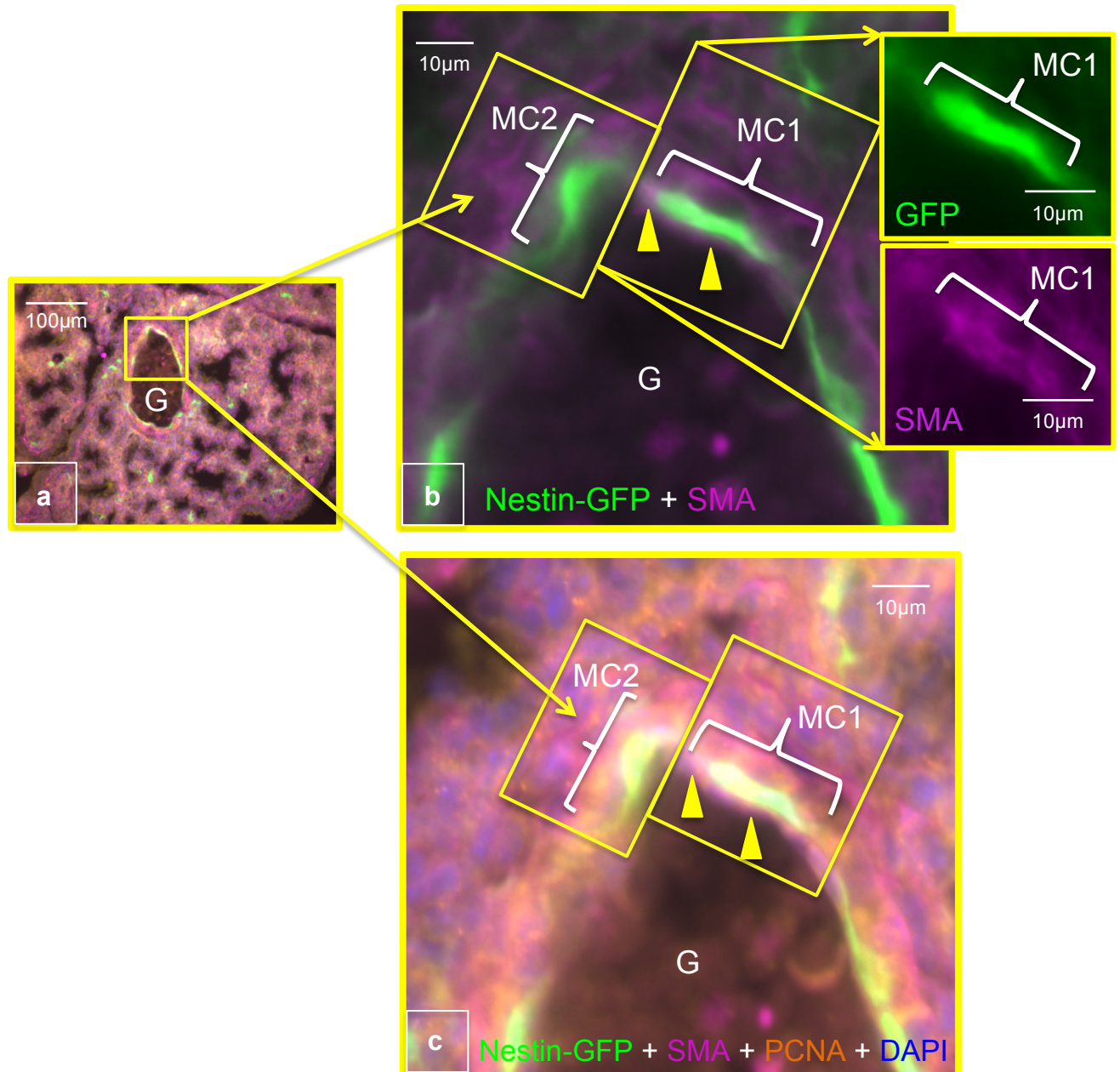


Abb. 24: Kolokalisation von Nestin-GFP, SMA und PCNA in glatten Gefäßmuskelzellen bei heterozygotem Feten mit SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von 18.5 dpc

a: Übersichtsaufnahme eines Lungengefäßes (G) bei SETDB1^{+p} in Nes⁺-Feten.

b: vergrößerte Aufnahme des Lungengefäßes (G) mit Darstellung von zwei Nestin-GFP- (grün) und SMA-positiven (lila, gelbe Pfeile) glatten Gefäßmuskelzellen (MC1, MC2). Nestin-GFP färbt dabei besonders den Kern. c: Kolokalisation von Nestin-GFP (grün),

SMA (lila) sowie PCNA (orange), dargestellt anhand einer Mischfarbe (gelb). Im Hintergrund ebenfalls Färbung aller Zellkerne mittels DAPI (blau).

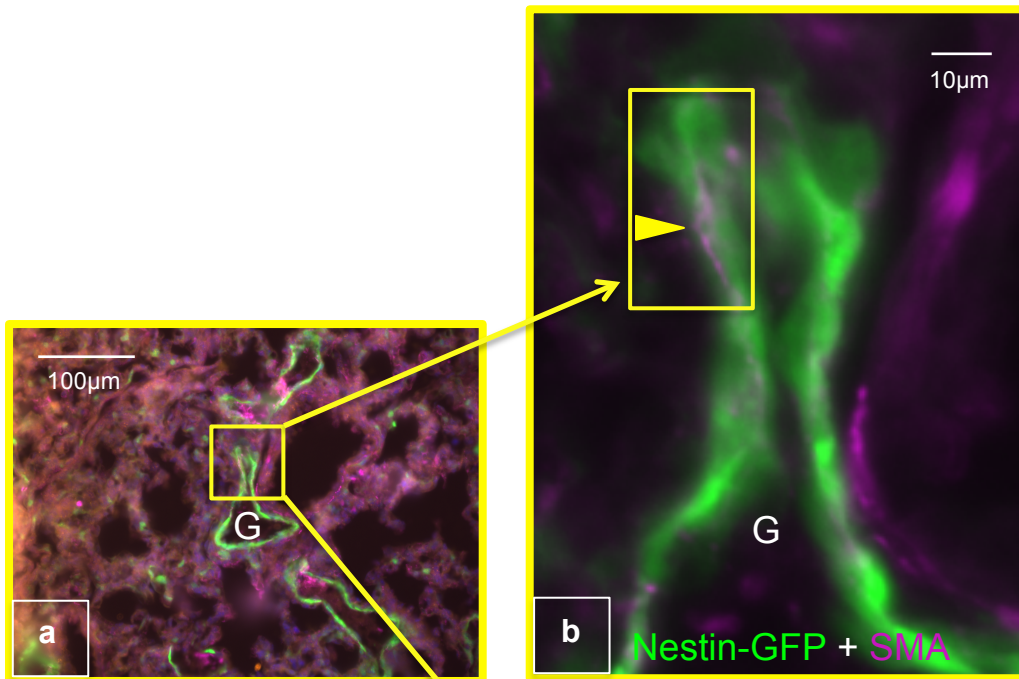


Abb. 25: Kolokalisation von Nestin-GFP, SMA und PCNA in glatten Gefäßmuskelzellen bei einer zelltypunabhängigen transgenen Nestin-GFP-Maus im Alter von d1

a: Übersichtsaufnahme eines Lungengefäßes (G) bei der Nestin-GFP-Maus.

b: vergrößerte Aufnahme des Lungengefäßes (G) mit Darstellung von Nestin-GFP- (grün) und SMA-positiven (lila, gelber Pfeilkopf) glatten Gefäßmuskelzellen.

c: Kolokalisation von Nestin-GFP (grün), SMA (lila) und PCNA (orange, Stern). Die Zellkerne wurden mithilfe des Blaufarbstoffes DAPI angefärbt.

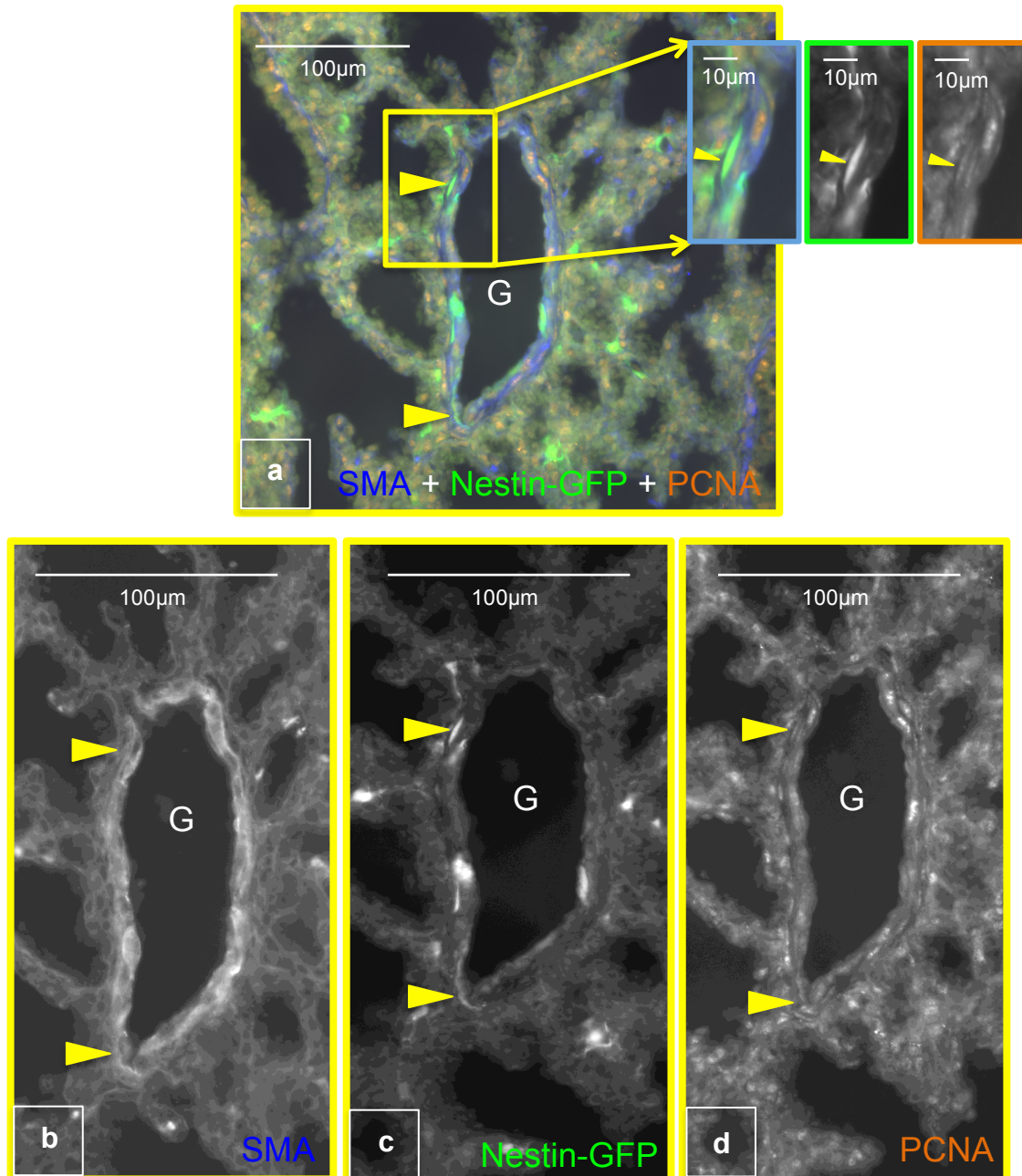


Abb. 26: Kolokalisation von Nestin-GFP, SMA und PCNA in glatten Gefäßmuskelzellen bei homozygotem Feten mit SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von 18.5 dpc

a: Übersichtsaufnahme eines Lungengefäßes (G) bei SETDB1^{pp} in Nes⁺-Feten. Es zeigt sich eine Kolokalisation von Nestin-GFP (grün) und PCNA (orange) in SMA-positiven (blau) glatten Gefäßmuskelzellen (gelbe Pfeile, vergrößerter Ausschnitt in farbigen Kästen). b: Färbung der glatten Gefäßmuskelschicht mit dem Muskelzellmarker SMA. Hierbei kommt es zur Anfärbung des Zytoplasmas der Gefäßmuskelzellen. c: einzelne glatte Gefäßmuskelzellen zeigen eine positive Färbung für Nestin-GFP (gelbe Pfeile). d: Darstellung proliferierender Zellen mittels des Proliferationsmarkers PCNA.

4.3 Unterschiede in Lungenmorphologie und -entwicklung bei Wildtyp-Mäusen und SETDB1-Knockout-Mäusen in Nestin-exprimierenden Zellen

Bei der Suche nach morphologischen Unterschieden bezüglich der Lungenentwicklung zwischen Wildtyp-Mäusen und den SETDB1-Knockout-Mäusen (in Nestin-exprimierenden Zellen) wurden im Folgenden Paraffinlängs- und Querschnitte aller Mäuse auf Höhe des kardiopulmonalen Systems angefertigt und die Lungenstruktur mittels histologischer Übersichtsfärbung (Azanfärbung) beurteilt.

Bei den untersuchten Wildtyp- sowie SETDB1-Knockout-Mäusen handelte es sich sowohl um pränatale Feten (18.5 dpc) als auch postnatale Mäuse (d1).

Im Fokus der Untersuchung lagen Auffälligkeiten in der Lungenstruktur sowie Zeichen einer Lungenunterentwicklung aufgrund des fehlenden SETDB1-Gens in den Nestin-exprimierenden Zellen als mögliche Ursache einer perinatalen Todesursache.

Es wurde ebenfalls zwischen SETDB1^{+p} in Nes⁺- Mäusen und SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Mäusen verglichen.

Zur Beurteilung der Lungenentwicklung wurde auf die verschiedenen Differenzierungsphasen der Lungenentwicklung bei Mäusen Bezug genommen. Von Interesse waren Auffälligkeiten in der Vaskularisation, der Größe des Lungenparenchyms, der Entwicklung des interstitiellen Gewebes sowie der Anzahl an Alveolen.

4.3.1 Unterschiede in der Lungenmorphologie und -entwicklung bei Wildtyp- und SETDB1-Knockout-Feten in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von 18.5 dpc

Für die Untersuchung möglicher Unterschiede in der Lungenentwicklung und morphologischer Auffälligkeiten wurden im Folgenden Übersichtsfärbungen mit Azan von Paraffin-Präparaten angefertigt.

Durch die Azanfärbung konnten verschiedene Gewebe- und Zellarten farblich dargestellt werden. Neben dunkelblau gefärbten Kollagenfasern nehmen zelluläre Strukturen, u.a. auch glatte Muskelzellen, eine orange-rote Farbe an.

In Abbildung 27 sind Übersichtsfärbungen der Lunge von Wildtyp-Feten (Abb. 27 a-d) mit denen von SETDB1^{+/-p} (Abb. 27 e-h) und SETDB1^{p/p} in Nes⁺-Feten (Abb. 27 i-l) im Alter von 18.5 dpc verglichen worden.

Bereits in der kleinsten Vergrößerung (Abb. 27 a,e,i) ist die dichtere Lungenstruktur der homozygoten und heterozygoten Knockout-Feten zu beobachten. Näher betrachtet zeigen die Lungenabschnitte der heterozygoten (^{+/-p}) (Abb. 27 h) und homozygoten (^{p/p}) (Abb. 27 l) Feten deutlich unterentwickelte Lungenbereiche mit breiten interstitiellen Septen sowie einer reduzierten Anzahl an sakkulären Strukturen. Im Vergleich zum WT erscheinen die SETDB1-Knockout-Lungen weniger weit entwickelt.

Die Lungen der Wildtyp-Feten zeichnen sich durch schmale interstitielle Septen und reichlich Sacculae aus (Abb. 27 b und c).

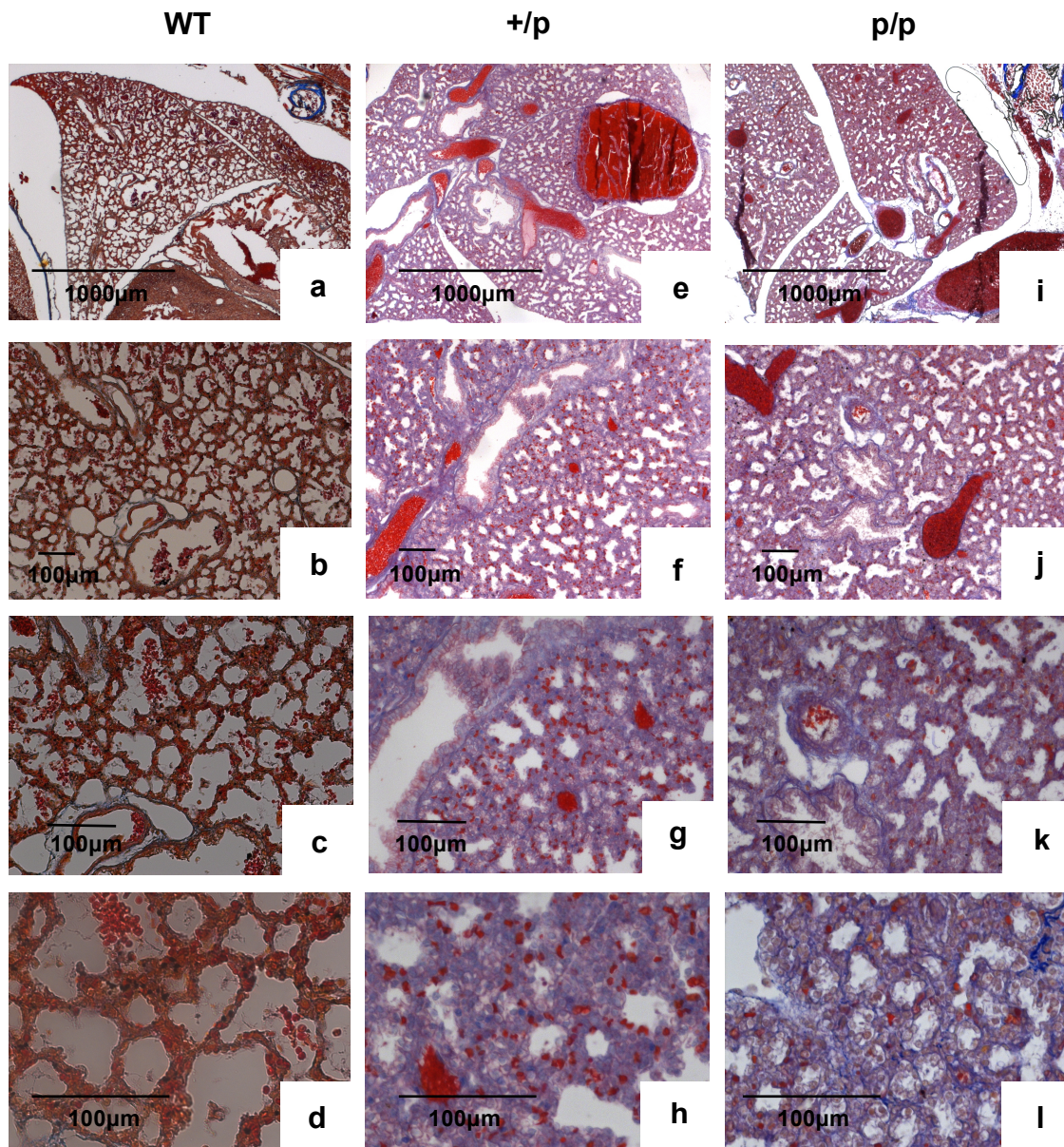


Abb. 27: Unterschiede in der Lungenstruktur bei Wildtyp-Feten im Vergleich zu homozygoten und heterozygoten *SETDB1*-Knockout-Feten in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von 18.5 dpc

*a-l: Übersichtsaufnahmen von azangefärbten Lungenabschnitten im Alter von 18.5 dpc bei WT- (a-d), *SETDB1*^{+p} in Nes⁺- (e-h) und *SETDB1*^{p/p} in Nes⁺- Feten (i-l).*

*Sowohl der *SETDB1*^{+p} in Nes⁺- Fet (e-h) als auch der *SETDB1*^{p/p} in Nes⁺- Fet (i-l) weisen ein verdichtetes Lungengewebe mit breiten interstitiellen Septen und reichlich mesenchyalem Gewebe und somit auch schlechter ausgebildeten sakkulären Strukturen im Vergleich zum WT (a-d) auf.*

4.3.2 Unterschiede in der Lungenmorphologie und -entwicklung bei Wildtyp- und SETDB1-Knockout-Mäusen in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von d1

Für die Untersuchung der Lungenentwicklung und die Suche nach möglichen Unterschieden oder Verzögerungen in den Entwicklungsphasen der Lunge wurden auch postnatale Mäuse im Alter von d1 in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Schnitte angefertigt.

Zur besseren Übersicht wurden die Schnitte in verschiedenen Vergrößerungen unter dem Mikroskop beurteilt und abgelichtet.

In Abbildung 28 sind verschiedene Übersichtsaufnahmen sowohl von Wildtyp- (a-d), SETDB1^{+p} in Nes⁺- (e-h) und SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Mäusen (i-l) im Alter von d1 angefertigt worden.

Vergleicht man zunächst die Wildtyp-Maus (a-d) mit der SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Maus (Abb. 28 i-l) so ist auf den ersten Blick bereits ein Unterschied in der Lungenstruktur zu erkennen. Die Lungenabschnitte der SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Maus (i-l) zeigen weniger entwickelte Lungenbereiche mit breiten interstitiellen Septen und eine geringe Anzahl an primären Sacculae (Abb. 28 i-l). Die Wildtyp-Mäuse (a-d) hingegen zeichnen sich durch eine hohe Anzahl an primären Sacculae aus. Das Interstitium ist schmal (Abb. 28 b). Die SETDB1^{+p} in Nes⁺- Maus (e-h) zeigt jedoch bis auf minimal breitere interstitielle Septen keine weitere offensichtliche Entwicklungsverzögerung verglichen zum Wildtyp. Die Anzahl an primären Sacculae erscheint im Vergleich zum Wildtyp ebenso nicht vermindert (vergleiche Abb. 28 b und f).

Deutliche Unterschiede in der Lungenstruktur lassen sich also nur bei der SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Maus beobachten (Abb. 28 i-l).

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch mit HE-Färbung und Kryomaterial.

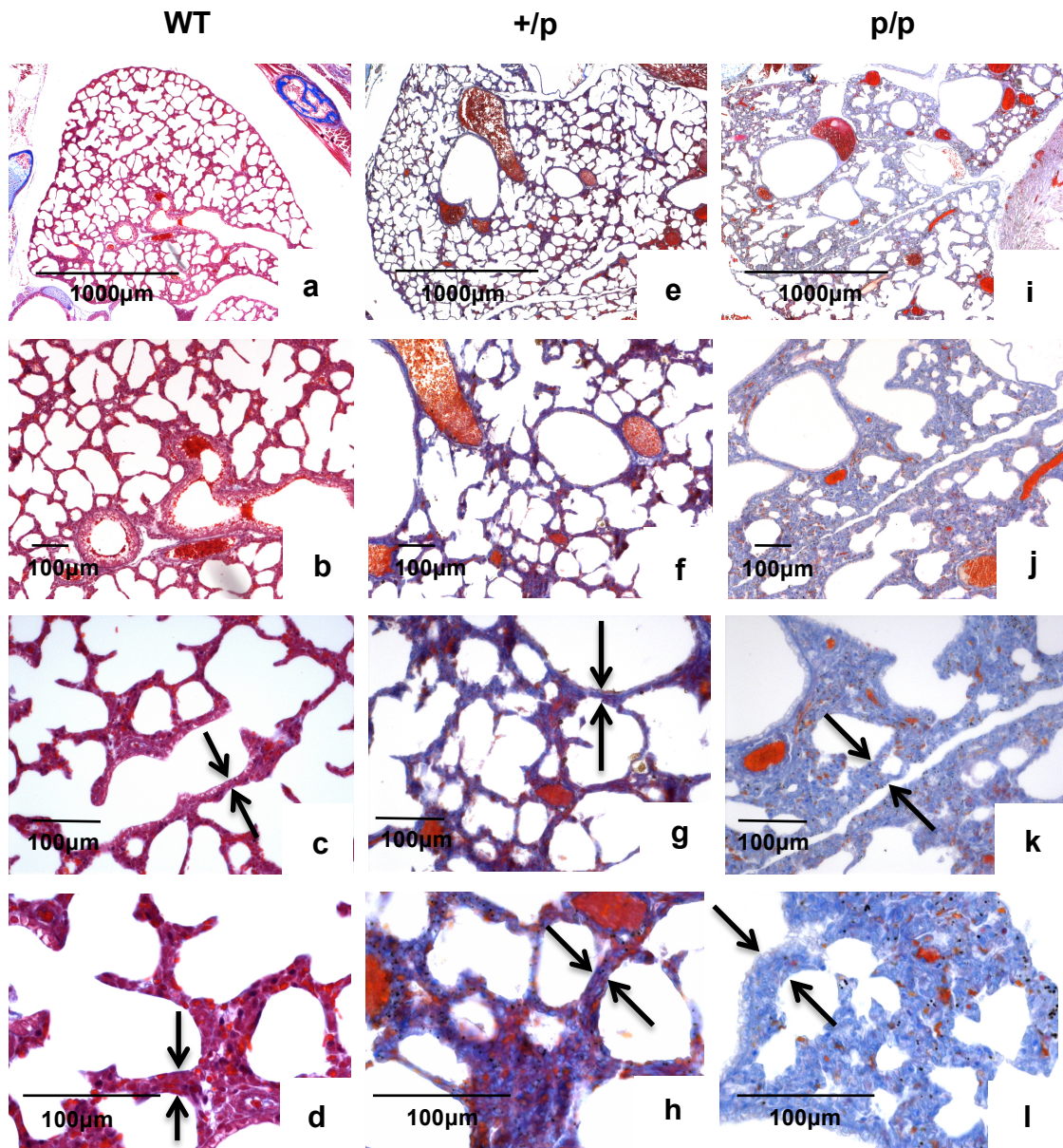


Abb. 28: Unterschiede in der Lungenstruktur beim Wildtyp im Vergleich zu $SETDB1^{+/p}$ und $SETDB1^{p/p}$ in Nes^+ -Mäusen im Alter von d1

a-l: Übersichtsaufnahmen von azangefärbten Lungenabschnitten im Alter von d1 bei WT (a-d), $SETDB1^{+/p}$ in Nes^+ (e-h), und $SETDB1^{p/p}$ in Nes^+ -Mäusen (i-l). Im Gegensatz zum Wildtyp weisen die Lungenabschnitte der $SETDB1^{p/p}$ in Nes^+ -Maus (i-l) vermehrt mesenchymales Gewebe (siehe Pfeile) und weniger sakkuläre Strukturen auf. Die $SETDB1^{+/p}$ in Nes^+ -Maus (e-h) zeichnet sich jedoch durch eine ähnliche Lungenstruktur wie die der WT-Maus (a-d) aus.

4.3.3 Unterschiede in der Lungenmorphologie und -entwicklung anhand von Querschnitten auf Höhe des kardiopulmonalen Systems bei Wildtyp- und SETDB1-Knockout-Mäusen in Nestin-exprimierenden Zellen im Alter von 18.5 dpc und d1

Für die folgenden Untersuchungen wurden Feten im Alter von 18.5 dpc sowie Mäuse im Alter von d1 in Paraffin eingebettet und schließlich Querschnitte angefertigt. Von Interesse waren vor allem die Schnitte auf Höhe des kardiopulmonalen Systems. Ziel war es, die Lunge als Ganzes im Querschnitt betrachten zu können und Unterschiede in der Lungenstruktur zwischen WT-, SETDB1^{P/P} in Nes⁺- Mäusen sowie SETDB1^{+P} in Nes⁺- Mäusen zu untersuchen. Unterschiede innerhalb verschiedener Abschnitte einer Lunge waren ebenfalls von Interesse. Zur besseren Beurteilung dienten vergrößerte Ausschnitte der Lungenquerschnitte wie in Abbildung 29 dargestellt.

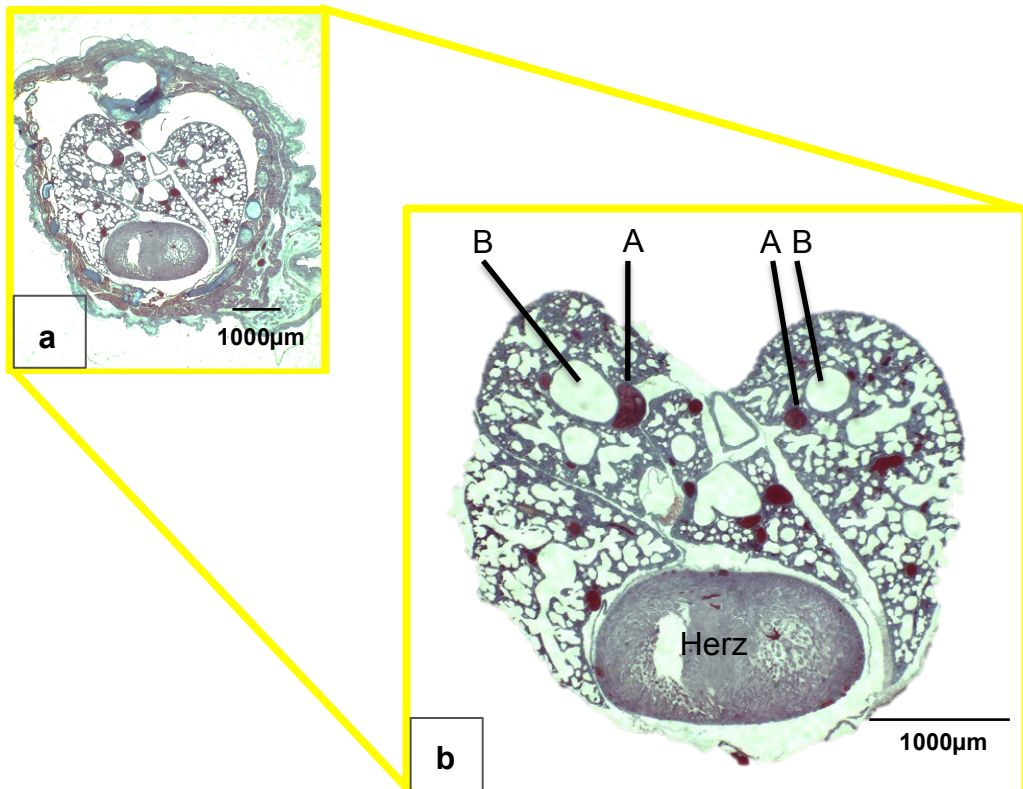


Abb. 29: Lungenquerschnitt einer Maus

a: Lungenquerschnitt einer Maus mit Anschnitt des Herzens samt des umliegenden Weichteilgewebes und der knöchernen Struktur.

b: Vergrößerung des Lungenquerschnittes ohne umliegendes Weichteilgewebe und knöchernen Strukturen. Ebenfalls dargestellt die verschiedenen Lungenflügel samt pulmonaler Arterien (A) sowie Bronchiolen (B) und dem Herz.

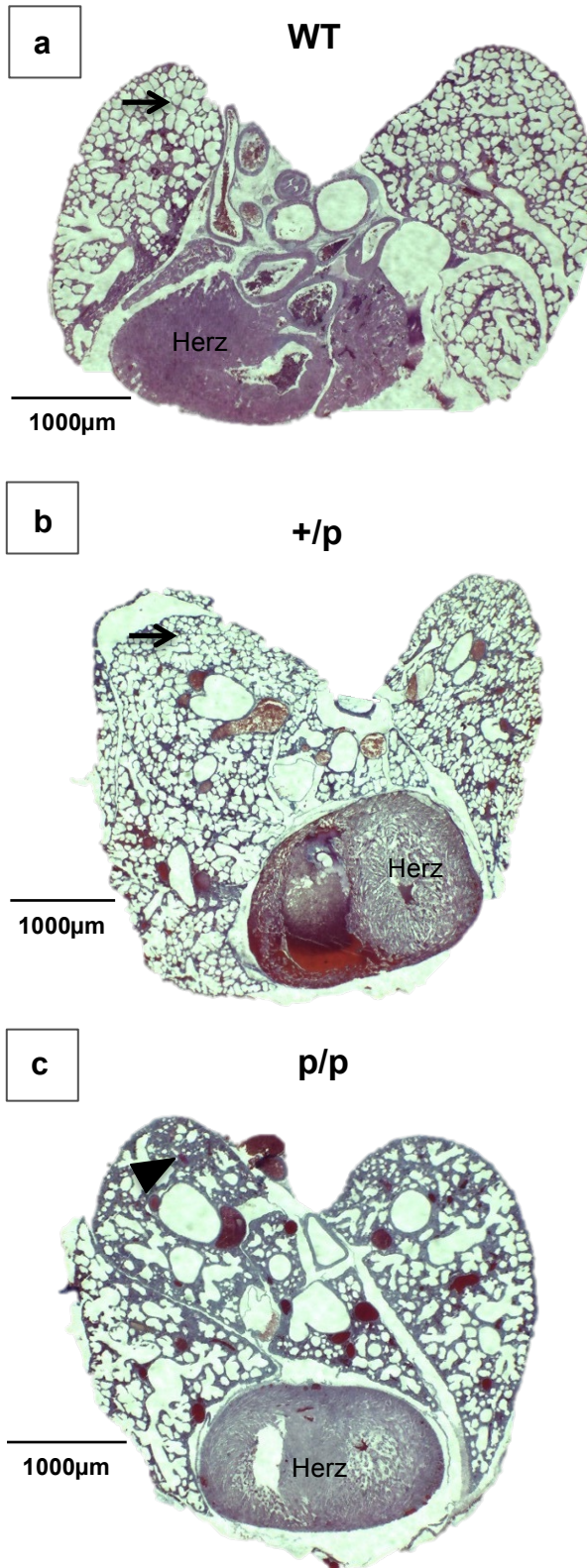


Abb. 30:

Querschnitte auf Höhe des kardiopulmonalen Systems bei WT-, $SETDB1^{+/p}$ in Nes^+ - und $SETDB1^{p/p}$ in Nes^+ - Mäusen im Alter von d1

a-c: Darstellung der verschiedenen Lungenflügel samt eines Querschnittes vom Herzen.

Die WT-Maus (a) sowie $SETDB1^{+/p}$ in Nes^+ - Maus (b) weisen ein schmales interstitielles Gewebe und reichlich sakkuläre Strukturen (siehe Pfeile) auf. Im Gegensatz dazu kann bei der $SETDB1^{p/p}$ in Nes^+ - Maus (c) ein deutlich breiteres interstitielles Gewebe sowie eine reduzierte Anzahl an primären Sacculae beobachtet werden (siehe c, Pfeilkopf).

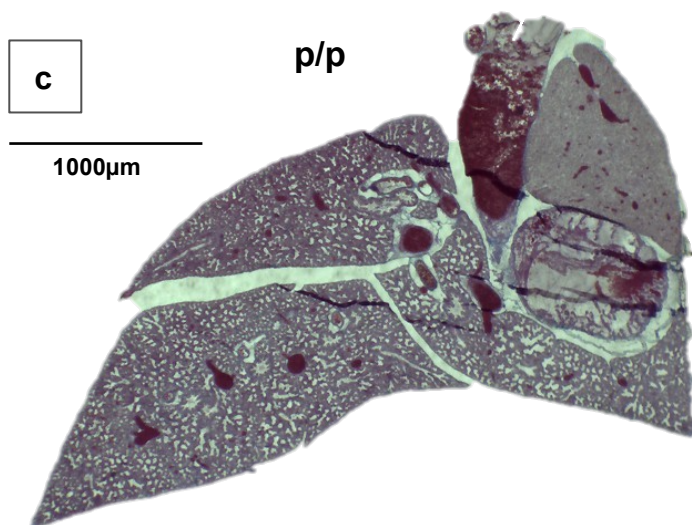
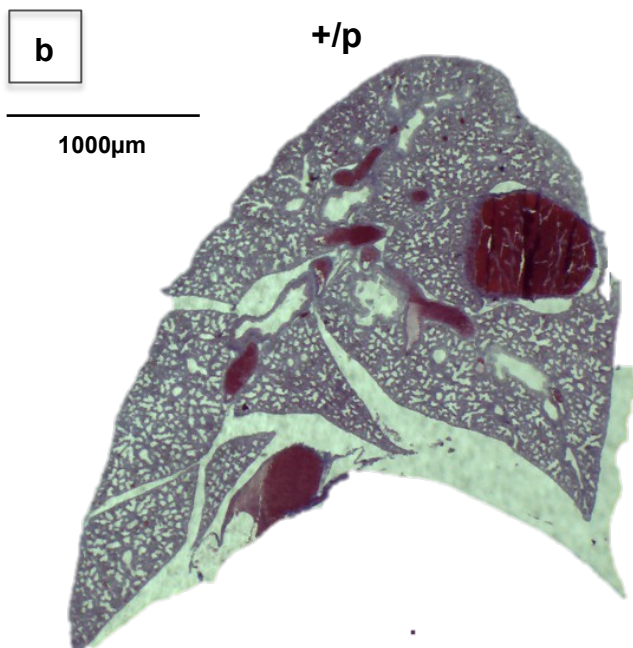
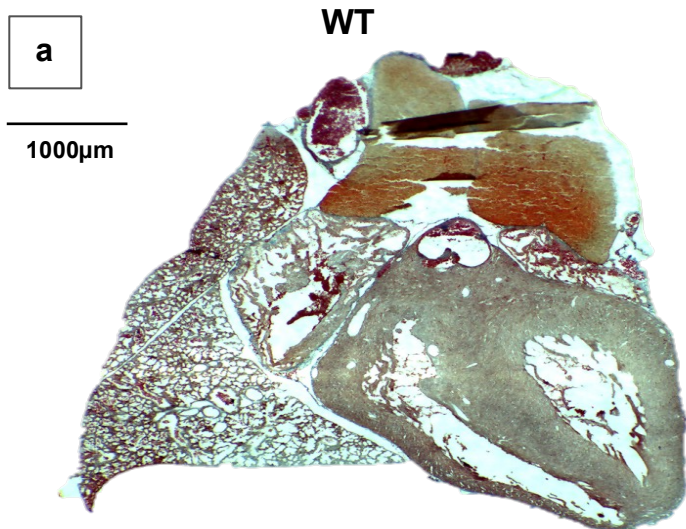


Abb. 31:

Längsschnitt auf Höhe des kardiopulmonalen Systems bei WT-, SETDB1^{+/p} in Nes⁺- und SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Feten im Alter von 18.5 dpc

a-c: Darstellung der verschiedenen Lungenflügel, teilweise mit Anschnitt eines Längsschnittes vom Herzen.

a: Längsschnitt des WT-Feten.

b und c: Längsschnitt des SETDB1^{+/p} in Nes⁺- (b) und SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Feten (c). Im Gegensatz zu den beiden SETDB1^{+/p} in Nes⁺- und SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Feten weist der WT-Fet (a) schmalere interstitielle Septen und somit ein ausgereifteres Lungensystem auf.

4.4 Unterschiede bezüglich der Anzahl an proliferierenden Zellen bei WT- Feten und SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Feten im Alter von 18.5 dpc sowie postnatalen Mäusen im Alter von d1

Im Fokus der folgenden Untersuchungen standen Unterschiede bezüglich der Anzahl an proliferierenden Zellen zwischen den SETDB1^{p/p} in Nes⁺- Mäusen und den WT-Mäusen. Ziel war es herauszufinden, ob bei den Lungen der Knockout-Mäuse im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen eine Entwicklungsverzögerung bzw. Unterentwicklung im Zusammenhang mit veränderter Proliferation der Lungen zu beobachten ist. Ein besonderes Augenmerk wurde vor allem auf veränderte Proliferation in pulmonalen Gefäßen gelegt. Hierfür wurden Paraffinschnitte von Wildtyp- und SETDB1^{p/p} in Nes⁺-Mäusen im Alter von 18.5 dpc und postnatalen Tag 1 angefertigt. Die Färbung der proliferierenden Zellen erfolgte mit dem Proliferationsmarker PCNA.

Abbildung 32 zeigt verschiedene Lungenübersichtsaufnahmen beider Mäuse im Alter 18.5 dpc. Verglichen zum Wildtyp (Abb. 32 a und b) kann man in den Lungen der Knockout-Mäuse (Abb. 32 c und d) eine deutlich dichtere Lungenstruktur (wie bereits in 4.3 beschrieben) beobachten. Die dichtere Lungenstruktur und erhöhte Zellzahl bei den Knockouts (Abb. 32 c und d) zeichnet sich somit auch durch eine erhöhte Anzahl an in Proliferation befindlichen Zellen aus. Der Wildtyp hingegen sieht in der Lungenstruktur bereits relativ differenziert aus (Abb. 32 a und b). In Bezug auf die pulmonalen Gefäße können keine Unterschiede bezüglich veränderter Proliferation beobachtet werden. Diese Ergebnisse können weitestgehend auf die postnatalen Mäuse übertragen werden. Die Lungenausschnitte der in Abbildung 33 dargestellten postnatalen WT- und Knockout-Mäuse sind verglichen zu den 18.5 dpc alten Feten deutlich weiter entwickelt, was anhand der größeren und vermehrten primären Sacculae sowie der schmalen Septen zu sehen ist. Außerdem verhält sich die Verteilung der in Proliferation befindlichen Zellen ähnlich zu den 18.5 dpc alten Feten (vergleiche Abb. 32 a-d und Abb. 33 a-d). Bedingt durch die weiterhin dichtere und unreifere Lungenstruktur bei den Knockout-Mäusen erscheint die Anzahl an proliferierenden Zellen bei den Knockouts (Abb. 33 c und d) höher im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 33 a und b).

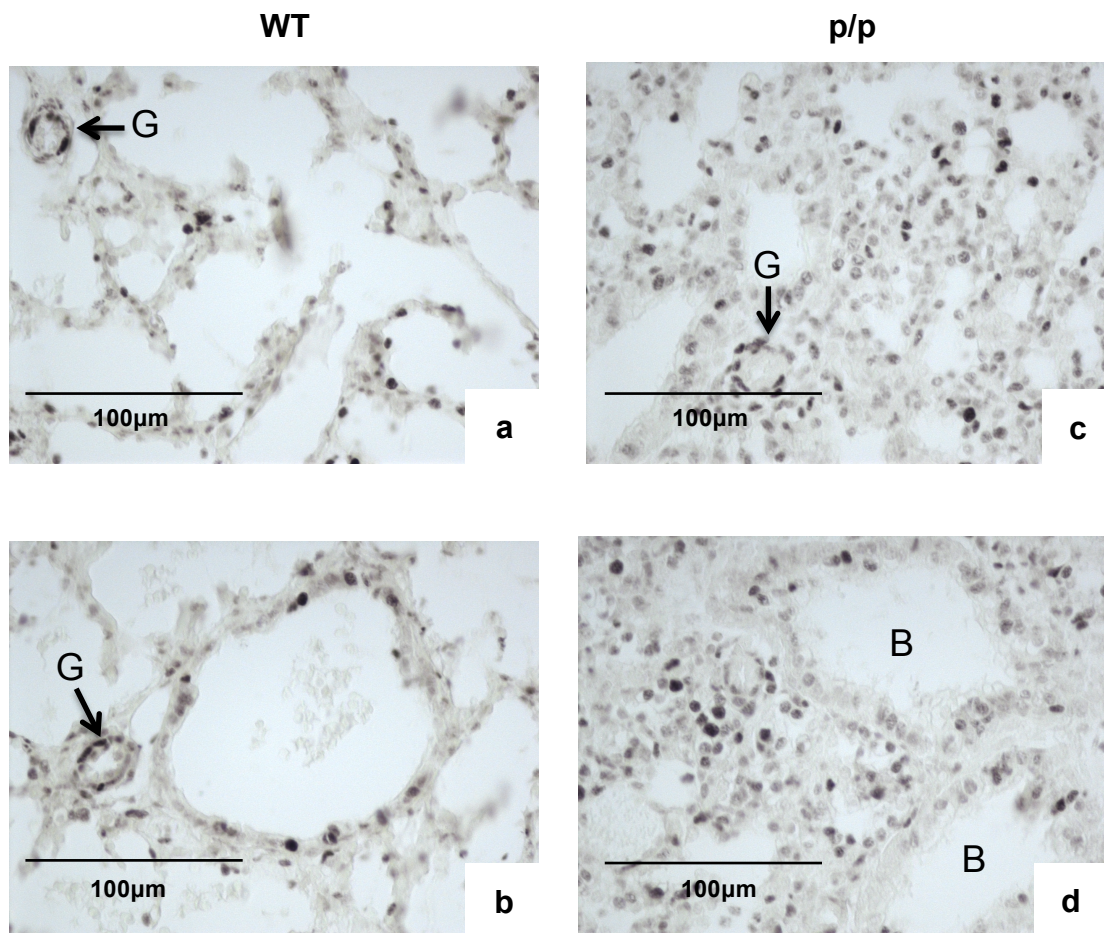


Abb. 32: Unterschiede in Bezug auf die Anzahl proliferierender Zellen zwischen Wildtyp- sowie homozygoten SETDB1-Knockout-Feten im Alter von 18.5 dpc

a-d: Lungenübersichtsfärbungen von Wildtyp (a und b) und homozygotem (p/p) (c und d) SETDB1-Knockout im Alter von 18.5 dpc mit dem Proliferationsmarker PCNA. Betrachtet man vor allem die Lungengefäße (G) so können keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp (a und b) und Knockout (c und d) beobachtet werden. Die dichtere Lungenstruktur und das vermehrte interstitielle Gewebe beim Knockout (c und d) bedingen auch die pulmonal erhöhte Anzahl proliferierender Zellen verglichen zum Wildtyp (a und b). Ebenfalls angeschnitten sind die Bronchiolen (B).

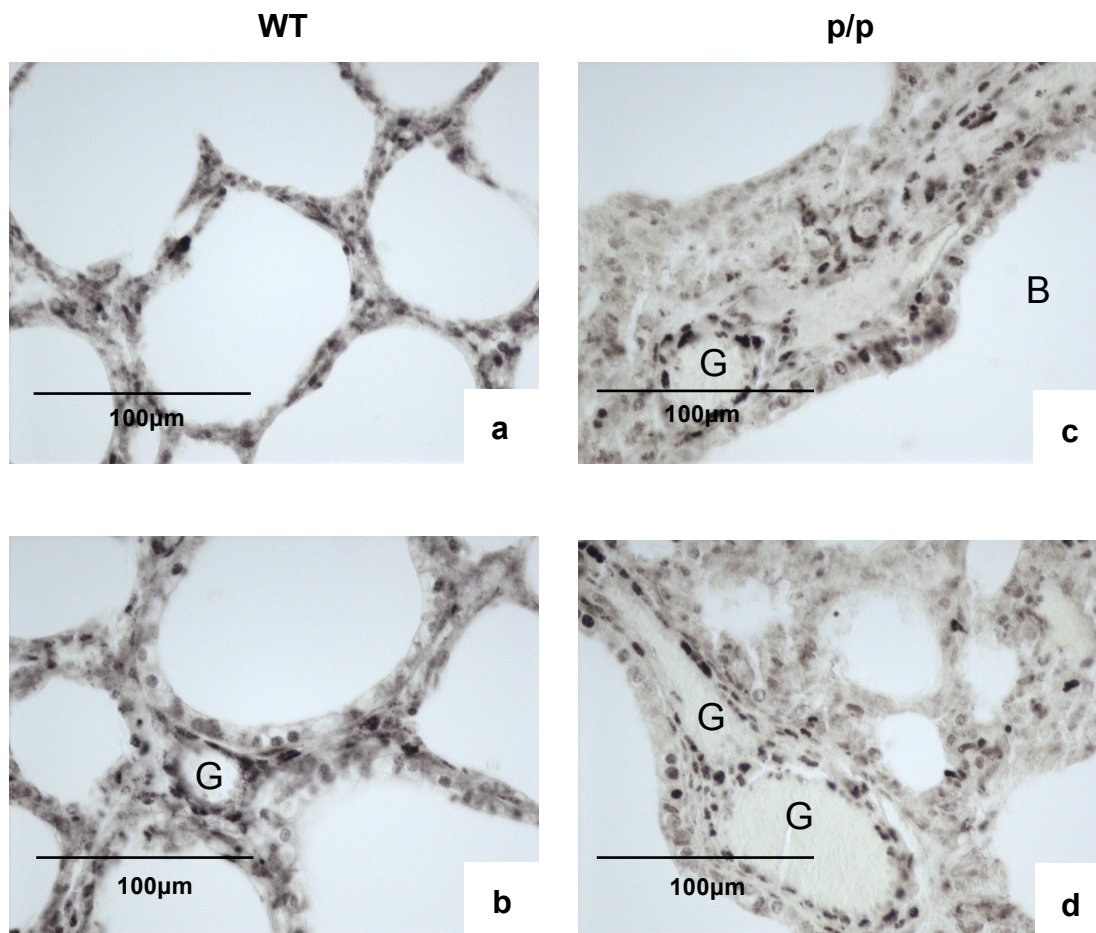


Abb. 33: Unterschiede in Bezug auf die Anzahl proliferierender Zellen zwischen Wildtyp-Mäusen sowie $SETDB1^{p/p}$ in Nes^+ -Mäusen im Alter von d1

a-d: Lungenübersichtsfärbungen von Wildtyp (a und b), sowie homozygotem (p/p) $SETDB1$ -Knockout (c und d) im Alter von d1 mit dem Proliferationsmarker PCNA. Die WT- (a und b) und die $SETDB1^{p/p}$ in Nes^+ - Mäuse (c und d) weisen ähnliche Färbungsmuster verglichen zu den 18.5 dpc alten Feten auf. In Bezug auf die Anzahl an proliferierenden Zellen im Gefäß (G) können keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout beobachtet werden. Der Knockout (c und d) zeichnet sich durch eine dichtere Lungenstruktur und vermehrt interstitiellem Gewebe aus und beinhaltet dabei auch mehr proliferierende Zellen im Vergleich zum Wildtyp (siehe c und d, verglichen zu a und b). Teilweise ebenfalls angeschnitten sind die mit (B) gekennzeichneten Bronchiolen (siehe c).

5 DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen befassen sich mit dem Einfluss und der Funktion der Histon-Methyltransferase SETDB1 auf Nestin-exprimierende Zellen. Besonders von Interesse waren in diesem Zusammenhang Auffälligkeiten im Lungenkreislauf als mögliche Todesursache von Mäusen mit SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen, die meist um die Geburt herum versterben. Die Nestin-exprimierenden Zellen (mit SETDB1-Knockout) in der Lunge ließen sich als Gefäßmuskelzellen identifizieren. Hierbei handelte es sich primär um proliferative Zellen. Durch histologische Übersichtsfärbungen konnten Unterschiede in der Lungenstruktur als Hinweis auf eventuelle Entwicklungsverzögerungen in der Lunge zwischen homozygotem und heterozygotem Knockout sowie dem Wildtyp festgestellt werden. Morphologische Gefäßveränderungen waren nicht zu erkennen.

5.1 Identifizierung von Nestin-exprimierenden Zellen mit SETDB1-Knockout in der Lunge

In Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen mit einem Nestin-GFP-Mausmodell (Berndt et al. 2008, Saboor et al. 2016) konnten auch in dem hier untersuchten Mausmodell die Zellen mit SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen als glatte Muskelzellen des Lungengefäßsystems identifiziert werden. Mikroskopisch konnten keine morphologischen Gefäßveränderungen verglichen mit Wildtyp-Mäusen beobachtet werden.

Die Histon-Methyltransferase SETDB1 wurde wiederholt in Zusammenhang mit Repression der Gentranskription beschrieben (Schultz et al. 2002). Ebenso konnte der Einfluss auf den Erhalt und die Differenzierung embryonaler Stammzellen beobachtet werden (Kang 2015). Aufgrund der Letalität unserer Mauspopulation mit SETDB1-Knockout um die Geburt herum, stellte sich die Frage, ob der Lungenkreislauf durch die Funktionen der Histon-Methyltransferase SETDB1 beeinflusst wird und welche Veränderungen innerhalb der Lunge durch das Ausschalten der Histon-Methyltransferase in speziellen Zellen beobachtet werden können.

Dazu war in der vorliegenden Arbeit zunächst die Identifizierung und Lokalisation der Nestin-GFP-Zellen mit SETDB1-Knockout in der Lunge von Interesse. Vorteile bei den

mittels Cre/loxP-System behandelten Mäusen war die Möglichkeit des gezielten Ausschaltens eines gewünschten Gens in lebenden Organismen innerhalb einer speziellen Zell- oder Gewebeart und / oder Zeitspanne (Kim et al. 2018). Bei den zuvor gängigen Methoden resultierte das Ausschalten eines Gens häufig in Letalität des Phänotypes. Somit konnten keine Rückschlüsse bezüglich der Auswirkung des Knockouts auf den lebendigen Organismus gezogen werden. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Möglichkeit des Ausschaltens von Genen innerhalb gezielter Zellpopulationen. Während bei den herkömmlichen Verfahren die Genveränderung zu Veränderungen in einer Mehrheit der Gewebe und Zelllinien führt, kann mittels Cre/loxP die gewünschte Zellpopulation bestimmt werden und somit auch genauere Rückschlüsse gezogen werden (Kos 2004). In unseren Mausmodellen wurde das SETDB1-Gen speziell in Nestin-exprimierenden Zellen ausgeschaltet und diese mit dem grün fluoreszierenden Protein gekoppelt. Dies ermöglichte uns, mit Hilfe von Immunfluoreszenzen das grün fluoreszierende Protein (GFP) darzustellen und somit die Zellen mit SETDB1-Knockout zu identifizieren. Untersuchungen mit ESET-null-Embryonen zeigten bereits eine Letalität der Embryonen in der Periimplantationsphase (Dodge et al. 2004). Verglichen dazu zeigte das Ausschalten anderer Histon-Methyltransferasen, wie z.B. bei G9a-null-Embryonen eine spätere Letalität der Mäuse im Zeitraum von E9.5 - E12.5 (Tachibana et al. 2002). Interessanterweise beeinflusst die Histon-Methyltransferase die Embryonalentwicklung in einem solchen Ausmaß, dass sogar das Ausschalten des Gens in einer einzelnen Zellpopulation (wie bei uns in Nestin-exprimierenden Zellen) zum Tode der Mäuse um die Geburt herum führt.

Als Nestin-exprimierende Zellen mit SETDB1-Knockout konnten innerhalb der Lunge zahlreiche Zellen identifiziert werden. Diese waren vor allem in Gefäßen unterschiedlicher Größe inklusive Kapillaren zu finden.

Das Intermediärfilament Nestin konnte neben der primären Beschreibung als neuronaler Stamm- und Progenitorzellmarker während der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Lendahl et al. 1990) bereits vielfach außerhalb des Gehirns in vielen Organen beschrieben werden (Kachinsky et al. 1994/1995, Hertig et al. 2018). In diesem Zusammenhang zeigte sich häufig eine erhöhte Nestin-Expression während der Embryonalentwicklung sowie eine Herunterregulation im ausdifferenzierten Zustand (einhergehend mit der Zunahme anderer Intermediärfilamente) (Park et al. 2010). Eine erneute Überexpression konnte schließlich im Adulten vermehrt bei pathologischen Zuständen

(wie Tumoren) (Teranishi et al. 2007) oder nach Zellschäden beobachtet werden (About et al. 2000, El-Helou et al. 2005, Calderone 2012).

Nestin-exprimierende Zellen wurden häufig in Endothelzellen beschrieben (Mokrý et al. 2004, Calderone 2018). Es konnte jedoch auch mehrfach der Nachweis von Nestin-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen erfolgen (Oikawa et al. 2010, Calderone 2018, Tardif et al. 2015, Davidoff et al. 2004, Saboor et al. 2016, Reckmann et al. 2018). In unseren Untersuchungen konnte eine eindeutige Nestin-GFP-Lokalisation und somit die Lokalisation des SETDB1-Knockouts in glatten Gefäßmuskelzellen der Lunge nachgewiesen werden. Es konnte sowohl bei den Arterien als auch bei den Venen neben den Nestin-exprimierenden Zellen eine große Population von glatten Gefäßmuskelzellen auch ohne Nestin-GFP-Signal dargestellt werden. Die Endothelzellen der Lungengefäße zeigten kein Nestin-GFP-Signal. In den kleineren Gefäßen wie Kapillaren konnten an vielen Stellen ebenfalls Zellen mit SETDB1-Knockout wahrgenommen werden. Diesbezüglich ist die Lokalisation in den um Kapillare gelegenen Perizyten zu vermuten. Zur Identifizierung des Zelltypes mit Nestin-GFP-Expression und SETDB1-Knockout in den Lungengefäßen wurden Färbungen sowohl mit dem Endothelzellmarker CD31, als auch mit dem glatten Muskelzellmarker SMA angefertigt.

Für eine genauere Differenzierung der Perizyten gibt es einige Marker, wie das PDGFR- β (platelet-derived growth factor receptor β) oder das NG2 (neural/glial Antigen 2), ein Co-Protein von PDGF. Diese Proteine werden jedoch nicht nur von Perizyten exprimiert, sodass es zu keiner spezifischen Darstellung der Perizyten kommt. Die Schwierigkeit der Entwicklung eines spezifischen Perizyten-Markers liegt in dem breiten Spektrum an Funktionen sowie Lokalisationen in zahlreichen Organen (Bergers und Song 2005). Neben den o.g. zwei Proteinen, welche sich an der Zelloberfläche von Perizyten befinden, existieren ebenso drei intrazelluläre Proteine, die zur Detektion von Perizyten geeignet sind. Diese sind Desmin, alpha-smooth muscle actin und RGS-5 (ein GTPase-aktivierendes Protein) (Bergers und Song 2005).

Perizyten nehmen eine entscheidende Rolle ein und haben zahlreiche Funktionen. Kommt es zum Verlust von Perizyten in Gefäßen, so kann dies letztendlich zu Ödembildung und embryonaler Letalität führen, ausgelöst durch Hämorrhagie und Hyperdilatation (Bergers und Song 2005). In unserer Arbeit wurden die Perizyten durch eine klassische SMA-Färbung dargestellt und durch die morphologische Untersuchung von Kapillaren detektiert.

Auch in diesem Modell konnten die Nestin-GFP-positiven Zellen bei den SETDB1-Knockout-Mäusen als glatte Gefäßmuskelzellen identifiziert werden. Bereits in vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte die Expression von Nestin in Gefäßen sowohl im Hoden (Davidoff et al. 2004), als auch Nebenhoden (Dissertation, Reckmann AN. 2017, Reckmann et al. 2018) und in der Lunge im Rahmen der Gefäßentwicklung adulter Mäuse sowie bei der pulmonalen Hypertonie (Dissertation Berndt C. 2011) beschrieben werden. Somit konnte anhand unserer SETDB1-Knockout-Mäuse die Lokalisation der Nestin-GFP-Zellen mit SETDB1-Knockout ebenfalls innerhalb verschiedener Gefäßwände der Lunge beschrieben und diese als glatte Muskelzellen identifiziert werden.

5.2 Nestin-exprimierende Zellen als Vorläuferzellen der Gefäßwand?

Vor dem Hintergrund, dass Nestin-exprimierende Zellen in der Literatur bereits vielfach als Stamm- und Progenitorzellen beschrieben wurden, sollte im Folgenden herausgefunden werden, ob es sich bei unseren Nestin-positiven glatten Gefäßmuskelzellen mit SETDB1-Knockout ebenfalls um Zellen mit Proliferationspotential handelt.

Ein Proliferationspotential Nestin-positiver Gefäßmuskelzellen wurde in den vergangenen Jahren sowohl im Hoden und Nebenhoden (Davidoff et al. 2004, Dissertation Reckmann AN. 2017, Reckmann et al. 2018) als auch in der Lunge (Dissertation Berndt C. 2011, Saboor et al. 2016) durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben. Proliferationsfähigkeit in Nestin-exprimierenden Zellen mit SETDB1-Knockout konnte sowohl bei heterozygoten als auch homozygoten Knockouts dargestellt werden. Zum Einsatz kamen immunfluoreszierende Untersuchungen mit dem gegen glatte Gefäßmuskelzellen gerichteten smooth muscle actin (SMA) und dem Proliferationsmarker PCNA. Eine Kollokalisierung der glatten Nestin-GFP-Muskelzellen mit dem Proliferationsmarker PCNA konnte innerhalb der Lungengefäße sowohl bei heterozygotem als auch homozygotem Knockout dargestellt werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse erfolgte parallel die Untersuchung transgener Nestin-GFP-Mäuse ohne SETDB1-Knockout. In diesem Fall konnte ebenfalls Proliferationspotenzial von Nestin-GFP-Zellen, welche als glatte Muskelzellen zu verzeichnen waren, bestätigt werden. Die Methode der Immunfluoreszenz ermöglichte uns in diesem Fall eine Mehrfachmarkierung der Schnitte. Aufgrund der geringen Überlappung zu anderen Fluorochromen erfolgte neben dem Sekundärantikörper Cy3 die Verwendung eines zusätzlichen Sekundärantikörpers Cy5 (Indodicarbocyanine). Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskop konnten sowohl die Einzelfärbungen als auch die Mehrfachfärbung dargestellt werden und somit auch die Kollokalisierung von SMA, PCNA und Nestin-GFP sicher beurteilt werden.

Aufgrund der fluoreszierenden Farbstoffe war es von Bedeutung, die lichteinwirkende Zeitspanne so gering wie möglich zu halten, da die Fluoreszenz durch zunehmenden Lichteinfall beeinflusst wird. Ebenfalls konnte eine deutliche Unterscheidung in der Qualität der Antikörper beobachtet werden. Von Nachteil war die teilweise vermehrte gewebeunspezifische Färbung einiger zur Verfügung stehender Antikörper. Ebenfalls zeigten sich aufgrund der Nutzung ganzer Mäuse teilweise Probleme im Vordringen der Fixierung und Färbung bis ins Innere der Tiere.

In der Gefäßwand wurde bereits mehrfach das Vorhandensein von Stammzellen mit der Möglichkeit der Differenzierung in glatte Muskelzellen (Hu et al. 2004) oder Perizyten (Howson et al. 2005) beschrieben. Neben den Endothelzellen, denen der initiale Schritt der Gefäßneubildung zugesprochen wird, scheinen funktionelle und morphologische Reifungsprozesse auch im Aufgabengebiet der Perizyten und glatten Muskelzellen zu liegen (Carmeliet 2004). Ebenso wie Nestin, welches häufig in Verbindung mit Stamm- und Progenitorzellen beschrieben wurde (Bernal und Arranz 2018), wird auch SETDB1 eine bedeutende Rolle in der frühen Entwicklung sowie für das Fortbestehen embryonaler Stammzellen zugesprochen (Koide et al. 2016).

Dodge et al. 2004 konnten bei SETDB1-Knockout-Mäusen in „null-mutant“- Blastozysten keine embryonalen Stammzellen nachweisen. Sie beobachteten eine hohe Letalität der Mäuse zwischen E3.5 und E5.5. Analog zu Nestin zeigte sich eine erhöhte SETDB1-Expression in der frühen neuronalen Entwicklung und eine Abnahme bei Adulten (Tan et al. 2012). Auch bei verschiedenen Tumoren zeigt sich eine Gemeinsamkeit in der erhöhten Expression von Nestin (Teranishi et al. 2007) und SETDB1 (Sun et al. 2015, Batham et al. 2019). In diesem Zusammenhang konnte durch Überexpression beider Proteine eine erhöhte Zellproliferation sowie verschlechterte Prognosen bei verschiedensten Karzinomen beobachtet werden (Chen et al. 2014, Yang et al. 2019). Cao et al. untersuchten 2020 den Einfluss von SETDB1 auf die Entstehung und Entwicklung des kolorektalen Karzinoms. Sie konnten bei Herunterregulation von SETDB1 in SW480- und HCT116-Zellen eine reduzierte Zellproliferation sowie Migration und Invasion zusammen mit einem erhöhten Absterben von Tumorzellen beobachten (Cao et al. 2020).

5.3 Der Einfluss von SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen auf die Lungenentwicklung und -morphologie

In den hier vorliegenden Untersuchungen konnte ein Unterschied in der Lungenmorphologie zwischen den heterozygoten als auch bei den homozygoten Knockouts zum Wildtyp gezeigt werden. Um einen zeitlichen Verlauf beurteilen zu können, erfolgten die Analysen an pränatalen (18.5 dpc) und postnatalen (d1) Mäusen.

Normalerweise kommt es in den späten Stadien der regelrechten Lungenentwicklung im Bereich des Alveolarepithels zu einer ausgeprägten Differenzierung als Bestandteil der Vorbereitung auf die Geburt und den Gasaustausch (Yu et al. 2004). In unseren Versuchen konnten Unterschiede in Bezug auf die Ausdifferenzierung der Lungenstruktur zwischen Wildtyp und Knockout beobachtet werden. Die Lungenstruktur der 18.5 dpc alten Feten zeigte bei den homozygoten und heterozygoten Knockouts ähnliche Auffälligkeiten. Diese Lungen schienen weniger sakkuläre Räume aufzuweisen und mehr mesenchymales Gewebe verglichen zum Wildtyp zu haben. Bei den Wildtyp-Feten hingegen zeigte sich eine normale Entwicklung der sakkulären Formation, welche sich in Richtung Alveolen differenzieren. Betrachtet man die d1-alten Mäuse, so konnten ähnliche Veränderungen beobachtet werden. Die Wildtypen zeichneten sich durch eine regelrechte Entwicklung der sakkulären Strukturen aus. Dementsprechend fand sich auch eine Reduktion des mesenchymalen Gewebes. Dies betraf den kompletten Lungenflügel. Verglichen dazu zeigte sich bei homozygoten SETDB1-Knockouts vermehrt Mesenchym, resultierend in einer Hemmung der Sakkulierung. Interessanterweise zeigten die heterozygoten Knockouts zwar noch Zeichen einer Entwicklungsverzögerung, jedoch deutliche Fortschritte in der Entwicklung der Alveolen. Verglichen zu anderen Methyltransferasen, wie CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1), konnten O'Brien et al. 2010 ähnliche Lungenveränderungen bei CARM1-Knockout-Embryonen im Alter von 18.5 dpc beobachten. Die Lungen der CARM1-Knockout-Embryonen zeigten ebenfalls eine zellreichere Lungenstruktur, verdickte Septen und weniger Luftraum im Vergleich zu den Wildtypen. Die CARM1-Knockout-Embryonen zeigten ein Überleben bis kurz nach der Geburt. Anschließend litten sie unter Atemnot, zeigten ein bläuliches Kolorit und starben ca. 20 min postpartal (Yadav et al. 2003). Da die Züchtung der Tiere in einem externen Labor stattfand, können wir keine Aussagen bezüglich des postpartalen Verlaufs der d1-alten Mäuse treffen.

In anderen Studien mit Knockout-Mäusen wurden Auffälligkeiten in der Lungenentwicklung ebenfalls erst im späteren Gestationsalter (ab 17.5 dpc) beschrieben. Yu et al. (2004) untersuchten Knockout-Embryonen, in denen das Ausschalten der Dehydrocholesterol-7-Reduktase zu einem Cholesterol-Mangel führte. In frühen Stadien der Lungenentwicklung (von Beginn der Entstehung der Lungenknospe bis hin zur sakkulären Phase) konnten keine Veränderungen verglichen zum Wildtyp gefunden werden. Hingegen auffällig war die spätere Entwicklung in der sakkulären Phase, welche sich durch Lungenhypoplasie samt partiell entwickelter epithelialer Tubuli, reduziertem Raum an terminalen Sakkuli und verzögerter Gefäßentwicklung auszeichnete (Yu et al. 2004). Eine Untersuchung der frühen Lungenentwicklung war in unserem Fall aufgrund des fehlenden Bestandes junger Embryonen nicht möglich. Aus diesem Grund konnte lediglich die Lungenentwicklung im späten Gestationsalter untersucht werden. Auch wir konnten Auffälligkeiten in der Lunge mit vermehrt mesenchymalem Gewebe und reduzierten sakkulären Strukturen beobachten.

Die Anfertigung der Querschnitte auf Höhe des kardiopulmonalen Systems bei unseren Mäusen ermöglichte die gleichzeitige Betrachtung aller Lungenflügel innerhalb einer Ebene. Somit konnten auch Unterschiede bezüglich des mesenchymalen Anteils und der sakkulären Strukturen innerhalb eines einzelnen Lungenflügels detektiert werden.

Die Verdickung des mesenchymalen Gewebes zwischen den Alveolen bei den Knockout-Mäusen könnte eine mögliche Ursache einer Hypoxie bei Geburt sein.

Yu et al. untersuchten 2004 ebenfalls den Abstand zwischen Lungen und knöchernem Brustkorb, um somit Aussagen über Größenunterschiede der Lungen zu treffen. Sinnvoll wäre in diesem Zusammenhang sicherlich die Bestimmung der einzelnen Lungengewichte sowie die Bestimmung der Lungen-Körper-Ratio, um mögliche Lungenhypoplasien belegen zu können.

Die Verwendung der Querschnitte scheint mir in diesem Zusammenhang jedoch schwer aufgrund einiger beeinflussender Variablen. Die knöchernen Strukturen des Brustkorbes und das innenliegend weiche Lungengewebe erschwerte das Anfertigen der Schnitte und führte in unserem Fall ebenso zu diskreten Verformungen des Brustkorbes. Wichtig wäre in diesem Zusammenhang ebenfalls die einheitliche Verwendung von Schnitten auf ein und derselben Höhe des kardiopulmonalen Systems mit Anschnitt des maximalen Lungendurchmessers.

Zur spezifischeren Untersuchung wäre eine Lungen-Morphometrie der terminalen Sacculae zwischen Knockout und Wildtyp ebenfalls denkbar. Zur Quantifizierung der Alveolarisation können Radial-alveolar Counts (RAC) herangezogen werden.

Hinderungsgrund für die Nutzung derartiger Methoden bei unserer Mauspopulation war vor allem die große Variation in der Anzahl der Mäuse innerhalb der einzelnen perinatalen Altersgruppen. Weiterhin gab es jeweils nur wenige Mäuse der jeweiligen Knockout-Gruppe (z.B. homozygot Knockout mit Nestin-GFP und ohne GFP,...). Außerdem waren die Gruppengrößen gering aufgrund der verschiedenen postpartal genutzten Fixierungs- bzw. Einbettungsverfahren mit zum Teil notwendigerweise geänderten Färbefahren. Dies erschwerte eine ausgedehntere Untersuchung zum zeitlichen Verlauf der Embryonalentwicklung zwischen homozygoten, heterozygoten und Wildtyp-Mäusen. Somit war die N-Anzahl der Mäuse pro Untergruppe unter Berücksichtigung aller äußeren Faktoren (Alter, Vorbehandlung, Färbemethode, heterozygote oder homozygote Maus, mit oder ohne GFP-Transgen) gering und ist als kritisch zu bewerten. Dennoch war es möglich mitsamt der vorhandenen Materialien einen qualitativen Vergleich zwischen Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Mäusen sowohl pränatal als auch postnatal zu machen und Entwicklungsveränderungen zu beobachten. Um sicher signifikante Aussagen treffen zu können, wären weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl der genutzten Mausuntergruppen sowie zusätzlichen Altersgruppen sinnvoll.

Die Mäuse waren nach Institutsumzug jedoch nicht mehr verfügbar. Die Rolle von SETDB1 in diesem Kontext konnte letztendlich nicht eindeutig beurteilt werden.

SETDB1 wird in der Literatur vor allem die Funktion der Modifizierung von Chromatin zugesprochen. Dabei benötigt die Histon-Methyltransferase zahlreiche Protein-Partner. In der bislang vorliegenden Literatur wird angenommen, dass die primäre Funktion von SETDB1 in der Regulierung der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren liegt (Kang 2015).

Transkriptionsfaktoren, oder auch microRNAs und viele Wachstumsfaktoren nehmen auch im Rahmen der Lungenentwicklung eine entscheidene Rolle ein. Ihre Funktionen beinhalten neben der Regulation der Differenzierung auch die der Proliferation und der Migration. Die Notwendigkeit einer geregelten Interaktion zwischen Zellen der Tubuli und der Kapillaren, welche für eine korrekte Lungenmorphologie zuständig sind, konnte anhand von Studien mit Knockout-Mäusen gezeigt werden. Ebenso zeigten Dysregulationen dieser Signalkaskaden durch Genmutationen reichlich Lungenerkrankungen mit verändertem Kapillarnetzwerk oder Alveolarstruktur (Bolte et al. 2018).

Betrachtet man diese beiden Signalkaskaden, so könnte eine Störung im Zusammenspiel möglicherweise durch das Ausschalten von SETDB1 verursacht sein, was letztendlich die regelrechte Entwicklung der Lungenstruktur behindert.

5.4 Die Histon-Methyltransferase SETDB1 und ihr Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit im Gewebe

Vor dem Hintergrund des engen Zusammenhangs zwischen der Lungenentwicklung insgesamt und der pulmonalen Gefäßentwicklung (Yu et al. 2004), legten wir im Folgenden unser Augenmerk auf morphologische und proliferative Veränderungen in den pulmonalen Gefäßen. Die kapilläre Gefäßentwicklung spielt vor allem in den späteren Entwicklungsstadien der Lunge (wie es bei uns der Fall ist) eine wichtige Rolle für die Reifung der alveolären Gasaustauschfläche. Dies hat die Reduktion des Mesenchyms zur Folge, das für die Trennung des Kapillarbetts und der Alveolarepithelzellen zuständig ist (Warburton et al. 2000). Bei einem SETDB1-Knockout in Zellen von Lunge und Darm wurden keine Gefäße untersucht (Na et al. 2020, Cao et al. 2020).

Für unsere Untersuchung standen sowohl Wildtyp- als auch homozygote SETDB1-Knockout-Mäuse (18.5 dpc und d1) zur Verfügung. Die Färbungen mit dem Proliferationsmarker PCNA zeigten keine Unterschiede in der Anzahl proliferierender Zellen in den pulmonalen Gefäßen. Auch waren die Gefäße morphologisch unauffällig. Da nur Mäuse zu einem Entwicklungszeitpunkt untersucht werden konnten, können wir jedoch nicht ausschließen, dass in den vaskulären Nestin-exprimierenden Zellen mit SETDB1-Knockout Veränderungen der Proliferation in früheren Stadien zu beobachten wären. Darüberhinaus wären ebenso Veränderungen in der Proliferation auch in den Tagen nach der Geburt möglich. Dies können wir jedoch nicht belegen, da der Großteil der Mäuse zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben war.

Auch in anderen Mausmodellen wurde der Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit im Rahmen der Lungenentwicklung bei Knockout-Mäusen untersucht (Epaud et al. 2012, O'Brien et al. 2010). Epaud et al. 2012 konnten bei IGF-1R^{-/-} Knockout-Mäusen neben einer Retardierung der Lungenentwicklung ebenso eine erhöhte Zellproliferation und Apoptose beobachten. Ähnliche Ergebnisse haben auch wir in unserem Knockout-Modell erwartet, jedoch konnte eine Zunahme der Zellproliferation nicht beobachtet werden. Aussagen bezüglich eines erhöhten Zelltodes bei unseren Knockout-Mäusen können wir nicht treffen, da keine Untersuchungen mit Apoptose-Markern durchgeführt wurden. O'Brien et al. machten 2010 ähnliche Beobachtungen bei CARM1-Knockout Mäusen. Wie bereits bei 5.3 beschrieben, zeigten die Embryonen mit CARM1-Knockout ähnliche Entwicklungsverzögerungen im Alter von 18.5 dpc verglichen mit unseren SETDB1-Knockouts. Die Autoren stellten sich die Frage, ob die Hyperzellula-

rität aus einer Zunahme der Proliferation und Abnahme der Apoptose resultiert (O'Brien et al. 2010). Sie konnten anhand von Färbungen mit dem Proliferationsmarker Ki67 eine Zunahme der Proliferation bestätigen. In Bezug auf eine geringere Apoptoserate konnten O'Brien et al. 2010 keine signifikanten Beobachtungen machen.

Epaud et al. 2012 interessierten ebenfalls, ob die verzögerte Lungenentwicklung ihrer Knockouts auf Veränderungen der Zelldifferenzierung zurückzuführen ist. Hierfür untersuchten sie die mikrovaskuläre Organisation sowie die kapilläre Komplexität unter der Verwendung von CD31 an E17.5 und E19.5 alten Knockouts. Sie konnten hierbei eine verringerte Endothelzellichte im Lungenparenchym der Knockouts beobachten. Färbungen mit dem Endothelzellmarker CD31 wurden auch mit unseren Knockouts durchgeführt. Primäres Ziel unserer Färbung war zunächst die Identifizierung der Nestin-exprimierenden SETDB1-Knockout-Zellen, welche vor allem als VSMC identifiziert werden konnten. Ein Augenmerk auf die mikrovaskuläre Organisation bzw. Kapillarkomplexität erfolgte aus diesem Grund nicht. Da diese Veränderungen jedoch im Zeitraum E17.5 und E19.5 aufgezeigt werden konnten, ist nicht auszuschließen, dass auch bei unseren Mäusen (18.5 dpc und d1) Veränderungen zu beobachten gewesen wären.

Na et al. konnten 2020 eine verminderte Proliferation von SETDB1-defizienten humanen A549-Lungenkarzinomzellen im Vergleich zu nicht behandelten A549-Zellen nachweisen. In unserem Fall konnte kein Unterschied zwischen den Wildtyp-Mäusen und den Mäusen mit SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen bezüglich der Proliferationsfähigkeit beobachtet werden. Möglicherweise wären differenziertere Untersuchungen mit isolierten Zellen unseres Mausmodelles sinnvoll und würden zu sichereren Ergebnissen führen. Ein Vergleich zu Zellen unseres Mausmodells ohne SETDB1-Knockout wäre ebenfalls denkbar. Zur signifikanten Beurteilung der Ergebnisse kann die Verwendung von Zell-Proliferations-Assays zur Hilfe gezogen werden.

Na et al. untersuchten 2020 neben der Proliferationsfähigkeit ebenfalls die Migrationsaktivität und konnten in ihrem Fall eine deutliche Zunahme der Migrationsaktivität bei SETDB1-Knockout-Zellen beobachten (Na et al. 2020). Aufgrund der fehlenden Kultivierung isolierter Zellen konnte eine Beurteilung der Migrationsaktivität bei uns ebenfalls nicht erfolgen.

Ebenso zeigten Na et al. 2020 eine Reduktion von β -Catenin und E-Cadherin im SETDB1-Knockout, welche eine entscheidende Rolle in der Zell-Zell-Interaktion sowie der Signaltransduktion und der embryonalen Entwicklung einnehmen. Eine gezielte Un-

tersuchung dieser beiden Proteine erfolgte bei unseren Versuchen nicht. Unterschiede im Lungenverband bzw. Auffälligkeiten bei der Zell-Zell-Interaktion konnten aber nicht beobachtet werden. In Bezug auf unsere Mausmodelle wäre die Betrachtung dieser Proteine im Nachhinein als sinnvoll zu erachten. Denn es konnte nachgewiesen werden, dass das Herunterregulieren von E-Cadherin zu einer verstärkten Expression einiger pluripotenter Gene führt, wie z.B. Nestin, OCT3/4, SOX2 und c-MYC (Farmakovskaya et al. 2016).

Auch in Brustkrebszellen scheint SETDB1 Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit zu haben (Yang et al. 2019). Ebenso konnten sie nachweisen, dass SETDB1 als Induktor für EMT (epithel-mesenchymal Transition) in MCF7-Zellen fungiert (Yang et al. 2019). Vergleichbares konnten Cao et al. 2020 in HCT116-Zellen beim kolorektalen Karzinom feststellen.

Bei den Zellen, für die bislang eine Beeinflussung durch SETDB1 beschrieben wurde, handelt es sich häufig um bösartige Zellen epithelialen Ursprungs. Dies ist z.B. bei den Lungenkarzinomzellen, den Zellen des kolorektalen Karzinoms und den Brustkrebszellen der Fall (Cao et al. 2020, Yang et al. 2019).

In unserem Mausmodell wurde SETDB1 gezielt in Nestin-exprimierenden Zellen ausgeschaltet, welche sich vorrangig in den pulmonalen Gefäßen finden ließen. Somit ist das Besondere der hier vorliegenden Studie die Untersuchung von SETDB1 in Zellen anderen Ursprungs.

Bezogen auf den nicht-epithelialen Bereich ist auch von Interesse, dass in Folge einer Deletion von SETDB1 eine Vergrößerung des Meckel-Knorpels anstelle der normalerweise auftretenden Degeneration beobachtet werden konnte (Yahiro et al. 2017). Bei den Chondrozyten konnte hierbei eine Vergrößerung der einzelnen Zellen gesichtet werden. Neben dieser Hypertrophie konnte mithilfe von Proliferationsanalysen auch eine erhöhte Proliferation in Chondrozyten des Meckel-Knorpels ohne SETDB1 nachgewiesen werden (Yahiro et al. 2017).

Neben der Nutzung klassischer Marker für proliferierende Zellen wäre in Bezug auf die Frage nach einer abnormalen Gefäßentwicklung ebenso der Einsatz spezifischer Gefäßmarker, wie Cav-1 α denkbar gewesen. Cav-1 α lässt sich speziell im Endothel von in Entwicklung befindlichen Kapillaren und Blutgefäßen der Lunge nachweisen (Yu et al. 2004). Interessant wäre in unserem Zusammenhang eine Beobachtung des Cav-1 α -Färbemusters während der frühen und späten Lungenentwicklung (E13.5-E20.5) gerade

in unserem Mausmodell, bei welchen die benachbarten vaskulären glatten Muskelzellen und Perizyten SETDB1 negativ sind.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass verschiedene Arbeiten bereits eine frühe Letalität von SETDB1-Knockout-Mäusen beschrieben haben, wobei die genaue Ursache bzw. Funktion von SETDB1 in diesem Zusammenhang bislang nicht sicher geklärt werden konnte. Die peripartale Letalität bei unserem Mausmodell (SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen) zeigt, dass das Ausschalten der Histon-Methyltransferase SETDB1 allein in einer Subpopulation von Zellen weitreichende Folgen für die embryonale Entwicklung hat.

6 ZUSAMMENFASSUNG

SETDB1 ist eine Histon-Methyltransferase, welche für die Di- und Tri-Methylierung des Histon H3 an Lysin 9 verantwortlich ist und an der transkriptionellen Abschaltung euchromatischer Gene beteiligt ist.

Das Intermediärfilament Nestin ist vor allem bekannt als neuronaler Stammzellmarker und wurde in den vergangenen Jahren mehrfach auch als Marker von Vorläuferzellen für andere Zelltypen identifiziert. So konnte die Expression von Nestin auch im Gefäßsystem, z.B. von Hoden, Nebenhoden und Lunge beschrieben werden.

Noch unveröffentlichte Daten zeigen, dass Mäuse mit einem SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen eine Letalität um die Geburt herum aufweisen. Die genaue Ursache ist bisher unbekannt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob pulmonale Veränderungen ursächlich sein können. Diesbezüglich wurde bei Mäusen mit SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen die Morphologie der Lunge prä- und postnatal mit der von Wildtyp-Mäusen verglichen. Initial wurden die Nestin-exprimierenden Zellen mit SETDB1-Knockout, die durch GFP-Expression sichtbar waren, identifiziert. Dabei ließ sich Nestin-GFP im Gefäßsystem nachweisen.

Eine exakte Zellzuordnung erfolgte durch Färbungen mit dem Endothelzellmarker CD31 sowie dem glatten Muskelzellmarker SMA (smooth muscle actin). Nestin-GFP fand sich in vaskulären glatten Muskelzellen. Eine Lokalisation in Endothelzellen konnte ausgeschlossen werden. Ebenso fanden sich in kleineren Gefäßen wie Kapillaren Nestin-exprimierende Zellen, welche am ehesten den Perizyten zugeordnet wurden. Die gleiche Nestin-GFP-Lokalisation zeigte sich auch in Nestin-GFP-Mäusen ohne SETDB1-Knockout.

Bei beiden Mausgruppen ließen sich mit Hilfe des Proliferationsmarkers PCNA proliferierende Nestin-GFP-positive Gefäßmuskelzellen nachweisen.

Für die Untersuchung struktureller Auffälligkeiten der Lunge wurden Azan-Übersichtsfärbungen bei Mäusen mit SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen angefertigt, die Lungenstruktur beurteilt und mit dem Wildtyp verglichen.

Hierbei konnte bei SETDB1-Knockout-Mäusen unmittelbar vor und nach der Geburt eine Entwicklungsretardierung beobachtet werden. Die Knockout-Mäuse zeichneten sich durch eine dichtere Lungenstruktur mit verbreiterten interstitiellen Septen und weniger sakkulären bzw. alveolären Strukturen aus.

Mit der PCNA-Färbung sollte auch ein Einfluss von SETDB1 auf die Proliferationsfähigkeit in den pulmonalen (Nestin-exprimierenden) Gefäßzellen an Tag 18.5 dpc und postnatal Tag 1 untersucht werden. Ein Unterschied in den pulmonalen Gefäßen konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Auch gab es keinen Hinweis darauf, dass der SETDB1-Knockout in Nestin-exprimierenden Zellen indirekt die Proliferation anderer pulmonaler Strukturen beeinflusst hat.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass der SETDB1-Knockout Nestin-exprimierender Zellen in der Lunge vornehmlich vaskuläre glatte Muskelzellen betrifft und perinatal mit strukturellen Veränderungen der Lunge verbunden ist. Somit könnte das Versterben der Mehrzahl der Tiere um die Geburt herum mit pulmonalen Veränderungen in Verbindung stehen.

7 SUMMARY

SETDB1 is a histone methyltransferase which is responsible for the di- and trimethylation of histone H3 on lysine 9 and is involved in the transcriptional silencing of euchromatic genes.

The intermediate filament nestin is known as a neuronal stem cell marker and has been identified as a marker for precursor cells of other cell types. The expression of nestin could also be described in the vascular system of different organs like testis, epididymis and lung.

Unpublished data show that mice with a SETDB1 knockout specifically in nestin-expressing cells die perinatally. The underlying reasons are unknown.

In the present work it was investigated whether pulmonary changes could be involved. In this regard, pre- and postnatal lung morphology of mice with SETDB1 knockout in nestin-expressing cells was compared with wild-type mice. Initially, the nestin-expressing cells with SETDB1 knockout, visible by GFP expression, were identified. By this, nestin-GFP could be detected in the vascular system.

More detailed cellular characterisation was performed by stainings with the endothelial cell marker CD31 and the smooth muscle cell marker SMA (smooth muscle actin).

Nestin-GFP was found in vascular smooth muscle cells. An expression in endothelial cells could be excluded. In capillaries, nestin was also found and most likely exclusively expressed in pericytes. The same nestin-GFP localization was visible in nestin-GFP mice without SETDB1 knockout.

By use of the proliferation marker PCNA, proliferating nestin-GFP positive vascular muscle cells were found.

To investigate structural abnormalities of the lung, classical histological stainings (azan) were performed in mice with SETDB1 knockout in nestin-expressing cells and compared with the wild-type. Compared to the wild-type, SETDB1 knockout mice showed a developmental delay immediately before and after birth. The knockout mice were characterized by a denser lung structure with thicker interstitial septa and less saccular or alveolar structures.

Comparing the PCNA staining pattern on day 18.5 dpc and postnatal day 1 there was not found any evidence of SETDB1 on cell proliferation between wild-type and knockouts neither directly in the pulmonary (nestin-expressing) vascular cells nor indirectly in other pulmonary structures.

Results suggest, that in the lung the SETDB1 knockout within nestin-expressing cells is in particular related to vascular smooth muscle cells and perinatally associated with structural changes. Thus, the death around birth of the majority of these cell-type specific SETDB1 knockouts may be associated with pulmonal changes.

8 LITERATURVERZEICHNIS

About I, Laurent-Maquin D, Lendahl U, Mitsiadis TA. (2000) Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions. *Am J Pathol* 157:287-295

Adoue V, Binet B, Malbec A, Fourquet J, Romagnoli P, van Meerwijk JPM, Amigorena S, Joffre OP. (2019) The histone methyltransferase SETDB1 controls T helper cell lineage integrity by repressing endogenous retroviruses. *Immunity* 50:629-644.e8

Alessandri G, Girelli M, Taccagni G, Colombo A, Nicosia R, Caruso A, Baronio M, Pagano S, Cova L, Parati E. (2001) Human vasculogenesis ex vivo: embryonal aorta as a tool for isolation of endothelial cell progenitors. *Lab Invest* 81:875–885

Amy RW, Bowes D, Burri PH, Haines J, Thurlbeck WM. (1977) Postnatal growth of the mouse lung. *J Anat* 124:131-151

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97:512-523

Armulik A, Genové G, Betsholtz C. (2011) Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* 21:193-215

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967

Bannister AJ, Schneider R, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. (2005) Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *J Biol Chem* 280:17732-17736

Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410:120-124

Bartke T, Vermeulen M, Xhemalce B, Robson SC, Mann M, Kouzarides T. (2010) Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell* 143:470-484

Batham J, Lim PS, Rao S. (2019) SETDB-1: a potential epigenetic regulator in breast cancer metastasis. *Cancers* 11:1143

Bergers G, Song S. (2005) The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 7:452-464

Bernal A, Arranz L. (2018) Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci* 75:2177-2195

Berndt C. (2011) Expression und Lokalisation des neuronalen Stammzellmarkers Nestin in den Gefäßwänden der Lunge von neugeborenen und adulten Mäusen. (Dissertation)

Berndt C, Saboor F, Müller D, Middendorff R. (2008) Nestin expression in lung vasculature. 25. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg. Poster DOI: 10.3337/anatges.2008.0007

Bhagwani AR, Hultman S, Farkas D, Moncayo R, Dandamudi K, Zadu AK, Cool CD, Farkas L. (2019) Endothelial cells are a source of Nestin expression in Pulmonary Arterial Hypertension. *PLoS One* 14:e0213890

Bolte C, Whitsett JA, Kalin TV, Kalinichenko VV. (2018) Transcription factors regulating embryonic development of pulmonary vasculature. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 228:1-20

Calderone A. (2012) Nestin⁺ cells and healing the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H1-9

Calderone A. (2018) The biological role of nestin⁽⁺⁾- cells in physiological and pathological cardiovascular remodeling. *Front Cell Dev Biol* 6:15

Cao N, Yu Y, Zhu H, Chen M, Chen P, Zhuo M, Mao Y, Li L, Zhao Q, Wu M, Ye M. (2020) SETDB1 promotes the progression of colorectal cancer via epigenetically silencing p21 expression. *Cell Death Dis* 11:351

Cardoso WV, Lü J. (2006) Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development* 133:1611-1624

Carmeliet P. (2004) Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med* 255:538-561

Casciello F, Windloch K, Gannon F, Lee JS. (2015) Functional role of G9a histone methyltransferase in cancer. *Front Immunol* 6:487

Cawsey T, Duflou J, Weickert CS, Gorrie CA. (2015) Nestin-positive ependymal cells are increased in the human spinal cord after traumatic central nervous system injury. *J Neurotrauma* 32:1393-1402

Ceol CJ, Houvras Y, Jane-Valbuena J, Bilodeau S, Orlando DA, Battisti V, Fritsch L, Lin WM, Hollmann TJ, Ferré F, Bourque C, Burke CJ, Turner L, Uong A, Johnson LA, Beroukhim R, Mermel CH, Loda M, Ait-Si-Ali S, Garraway LA, Young RA, Zon LI. (2011) The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature* 471:513-517

Chase KA, Gavin DP, Guidotti A, Sharma RP. (2013) Histone methylation at H3K9: evidence for a restrictive epigenome in schizophrenia. *Schizophr Res* 149:15-20

Chen Z, Wang J, Cai L, Zhong B, Luo H, Hao Y, Yu W, Wang B, Su C, Lei Y, Bella AE, Xiang AP, Wang T. (2014) Role of the stem cell-associated intermediate fila-

ment nestin in malignant proliferation of non-small cell lung cancer. PLoS One 9:e85584

Creazzo TL, Godt RE, Leatherbury L, Conway SJ, Kirby ML. (1998) Role of cardiac neural crest cells in cardiovascular development. *Annu Rev Physiol* 60:267-286

Cruz-Tapias P, Zakharova V, Perez-Fernandez OM, Mantilla W, Ramírez-Clavijo S, Ait-Si-Ali S. (2019) Expression of the major and pro-oncogenic H3K9 lysine methyltransferase SETDB1 in non-small cell lung cancer. *Cancers* 11:1134

Dambacher S, Hahn M, Schotta G. (2010) Epigenetic regulation of development by histone lysine methylation. *Heredity* 105:24-37

Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Müller D. (2004) Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol* 167:935–944

Del Rizzo PA, Trievel RC. (2011) Substrate and product specificities of SET domain methyltransferases. *Epigenetics* 6:1059-1067

deMello DE, Sawyer D, Galvin N, Reid LM. (1997) Early fetal development of lung vasculature. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:568-581

Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X. (2005) The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* 6:227

Dodge JE, Kang YK, Beppu H, Lei H, Li E. (2004) Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development. *Mol Cell Biol* 24:2478-2486

Duncker HR. (1990) Respirationstrakt. In: *Humanembryologie* (K.V. Hinrichsen (Hrsg.)) S. 571-595 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg)

Duncker HR, Kummer W. (2008) Atemsystem. In: Anatomie, Band 1, 17. Auflage (Benninghoff/Drenckhahn (Hrsg.)) S.534-583 (Elsevier, Urban & Fischer Verlag München Jena)

Ehrlich M, Wang RY. (1981) 5-Methylcytosine in eukaryotic DNA. *Science* 212:1350-1357

El-Helou V, Beguin PC, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Aumont A, Biernaskie J, Villeneuve L, Leung TK, Fernandes KJ, Calderone A. (2008) The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 45:694-702

El-Helou V, Chabot A, Gosselin H, Villeneuve L, Clavet-Lanthier ME, Tanguay JF, Enkolopov G, Fernandes KJ, Jasmin JF, Calderone A. (2013) Cardiac resident nestin (+) cells participate in reparative vascularisation. *J Cell Physiol* 228:1844-1853

El-Helou V, Dupuis J, Proulx C, Drapeau J, Clement R, Gosselin H, Villeneuve L, Manganas L, Calderone A. (2005) Resident nestin+ neural-like cells and fibers are detected in normal and damaged rat myocardium. *Hypertension* 46:1219-1225

Epaud R, Aubey F, Xu J, Chaker Z, Clemessy M, Dautin A, Ahamed K, Bonora M, Hoyeau N, Fléjou JF, Mailleux A, Clement A, Henrion-Caude A, Holzenberger M. (2012) Knockout of insulin-like growth factor-1 receptor impairs distal lung morphogenesis. *PLoS One* 7:e48071

Etienne-Manneville S. (2018) Cytoplasmic intermediate filaments in cell biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 34:1-28

Farmakovskaya M, Khromova N, Rybko V, Dugina V, Kopnin B, Kopnin P. (2016) E-Cadherin repression increases amount of cancer stem cells in human A549 lung adenocarcinoma and stimulates tumor growth. *Cell Cycle* 15:1084-1092

Farooq Z, Banday S, Pandita TK, Altaf M. (2016) The many faces of histone H3K79 methylation. *Mutat Res Rev Mutat Res* 768:46-52

Fei Q, Shang K, Zhang J, Chuai S, Kong D, Zhou T, Fu S, Liang Y, Li C, Chen Z, Zhao Y, Yu Z, Huang Z, Hu M, Ying H, Chen Z, Zhang Y, Xing F, Zhu J, Xu H, Zhao K, Lu C, Atadja P, Xiao ZX, Li E, Shou J. (2015) Histone methyltransferase SETDB1 regulates liver cancer cell growth through methylation of p53. *Nat Commun* 6:8651

Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, Zhang Y. (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* 12:1052-1058

Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. (1989) Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339:58-61

Frederiks F, Tzouros M, Oudgenoeg G, van Welsem T, Fornerod M, Krijgsveld J, van Leeuwen F. (2008) Nonprocessive methylation by Dot1 leads to functional redundancy of histone H3K79 methylation states. *Nat Struct Mol Biol* 15:550-557

Frisén J, Johansson CB, Török C, Risling M, Lendahl U. (1995) Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 131:453-464

Fukuda K, Shinkai Y. (2020) SETDB1-mediated silencing of retroelements. *Viruses* 12:596

Guo Y, Mao X, Xiong L, Xia A, You J, Lin G, Wu C, Huang L, Wang Y, Yang S. (2021) Structure-guided discovery of a potent and selective cell-active inhibitor of SETDB1 tudor domain. *Angew Chem Int Ed Engl* 60:8760-8765

Haldar S, Saini A, Nanda JS, Saini S, Singh J. (2011) Role of Swi6/HP1 self-association-mediated recruitment of Clr4/Suv39 in establishment and maintenance of heterochromatin in fission yeast. *J Biol Chem* 286:9308-9320

Haworth SG. (1995) Development of the normal and hypertensive pulmonary vasculature. *Exp Physiol* 80:843-853

Herriges M, Morrisey EE. (2014) Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development* 141:502-513

Hertig V, Matos-Nieves A, Garg V, Villeneuve L, Mamarbachi M, Caland L, Calderone A. (2018) Nestin expression is dynamically regulated in cardiomyocytes during embryogenesis. *J Cell Physiol* 233:3218-3229

Hislop A. (2002) Airway and blood vessel interaction during lung development. *J Anat* 201:325-334

Hislop A, Reid L. (1972) Intra-pulmonary arterial development during fetal life-branching pattern and structure. *J Anat* 113:35-48

Hislop A, Reid L. (1973) Pulmonary arterial development during childhood: branching pattern and structure. *Thorax* 28:129-135

Howson KM, Aplin AC, Gelati M, Alessandri G, Parati EA, Nicosia RF. (2005) The postnatal rat aorta contains pericyte progenitor cells that form spheroidal colonies in suspension culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C1396-1407

Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, Xu Q. (2004) Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest* 113:1258-1265

Hua KT, Wang MY, Chen MW, Wei LH, Chen CK, Ko CH, Jeng YM, Sung PL, Jan YH, Hsiao M, Kuo ML, Yen ML. (2014) The H3K9 methyltransferase G9a is a marker of aggressive ovarian cancer that promotes peritoneal metastasis. *Mol Cancer* 13:189

Husmann D, Gozani O. (2019) Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nat Struct Mol Biol* 26:880–889

Hyun K, Jeon J, Park K, Kim J. (2017) Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp Mol Med* 49:e324

Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z. (2011) Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 17:409-418

Jaenisch R, Young R. (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132:567–582

Jenuwein T, Laible G, Dorn R, Reuter G. (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Sci* 54:80-93

Jiang MH, Li G, Liu J, Liu L, Wu B, Huang W, He W, Deng C, Wang D, Li C, Lahn BT, Shi C, Xiang AP. (2015) Nestin(+) kidney resident mesenchymal stem cells for the treatment of acute kidney ischemia injury. *Biomaterials* 50:56-66

Jiang Y, Loh YE, Rajarajan P, Hirayama T, Liao W, Kassim BS, Javidfar B, Hartley BJ, Kleofas L, Park RB, Labonte B, Ho SM, Chandrasekaran S, Do C, Ramirez BR, Peter CJ, C W JT, Safaie BM, Morishita H, Roussos P, Nestler EJ, Schaefer A, Tycko B, Brennand KJ, Yagi T, Shen L, Akbarian S. (2017) The methyltransferase SETDB1 regulates a large neuron-specific topological chromatin domain. *Nat Genet* 49:1239-1250

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34

Jørgensen S, Schotta G, Sørensen CS. (2013) Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res* 41:2797-2806

Kachinsky AM, Dominov JA, Miller JB. (1994) Myogenesis and the intermediate filament protein, nestin. *Dev Biol* 165:216–228

Kachinsky AM, Dominov JA, Miller JB. (1995) Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J Histochem Cytochem* 43:843-847

Kang YK. (2015) SETDB1 in early embryos and embryonic stem cells. *Curr Issues Mol Biol* 17:1-10

Keniry A, Gearing LJ, Jansz N, Liu J, Holik AZ, Hickey PF, Kinkel SA, Moore DL, Breslin K, Chen K, Liu R, Phillips C, Pakusch M, Biben C, Sheridan JM, Kile BT, Carmichael C, Ritchie ME, Hilton DJ, Blewitt ME. (2016) Setdb1-mediated H3K9 methylation is enriched on the inactive X and plays a role in its epigenetic silencing. *Epigenetics Chromatin* 9:16

Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. (2018) Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res* 34:147-159

Kim W, Choi M, Kim JE. (2014) The histone methyltransferase Dot1/DOT1L as a critical regulator of the cell cycle. *Cell Cycle* 13:726-738

Klein D, Hohn HP, Kleff V, Tilki D, Ergün S. (2010) Vascular wall-resident stem cells. *Histol Histopathol* 25:681-689

Koide S, Oshima M, Takubo K, Yamazaki S, Nitta E, Saraya A, Aoyama K, Kato Y, Miyagi S, Nakajima-Takagi Y, Chiba T, Matsui H, Arai F, Suzuki Y, Kimura H, Nakauchi H, Suda T, Shinkai Y, Iwama A. (2016) Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of nonhematopoietic genes. *Blood* 128:638-649

Koonin EV, Zhou S, Lucchesi JC. (1995) The chromo superfamily: new members, duplication of the chromo domain and possible role in delivering transcription regulators to chromatin. *Nucleic Acids Res* 23:4229–4233

Kos CH. (2004) Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev* 62:243-246

Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705

Krause CD, Yang ZH, Kim YS, Lee JH, Cook JR, Pestka S. (2007) Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 113:50-87

Krupkova O Jr, Loja T, Zambo I, Veselska R. (2010) Nestin expression in human tumors and tumor cell lines. *Neoplasma* 57:291-298

Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C, Leiden JM. (1997) GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11:1048-1060

Lachner M, Jenuwein T. (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 14:286-298

Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T. (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* 116:2117-2124

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585–595

Liang ZW, Wang Z, Chen H, Li C, Zhou T, Yang Z, Yang X, Yang Y, Gao G, Cai W. (2015) Nestin-mediated cytoskeletal remodeling in endothelial cells: novel mechanistic insight into VEGF-induced cell migration in angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 308:C349-358

Lipsky RH, Marini AM. (2007) Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 1122:130-143

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-260

Lüllmann Rauch R, Asan E. (2019) Kreislauforgane. In: Taschenlehrbuch Histologie, 6., vollständig überarbeitete Auflage (Lüllmann-Rauch/Asan (Hrsg.)) S. 301-356 (Georg Thieme Verlag KG)

MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, Myers RH, Lin C, Srinidhi L, Barnes G, Taylor SA, James M, Groot N, MacFarlane H, Jenkins B, Anderson MA, Wexler NS, Gusella JF, Bates GP, Baxendale S, Hummerich H, Kirby S, North M, Youngman S, Mott R, Zehetner G, Sedlacek Z, Poustka A, Frischauf AM, Lehrach H, Buckler AJ, Church D, Doucette-Stamm L, O'Donovan MC, Riba-Ramirez L, Shah M, Stanton VP, Strobel SA, Draths KM, Wales JL, Dervan P, Housman DE, Altherr M, Shiang R, Thompson L, Fielder T, Wasmuth JJ, Tagle D, Valdes J, Elmer L, Allard M, Castilla L, Swaroop M, Blanchard K, Collins FS, Snell R, Holloway T, Gillespie K, Datson N, Shaw D, Harper PS. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72:971-983

Martinez-Quinones P, McCarthy CG, Watts SW, Klee NS, Komic A, Calmasini FB, Priviero F, Warner A, Chenghao Y, Wenceslau CF. (2018) Hypertension induced morphological and physiological changes in cells of the arterial wall. *Am J Hypertens* 31:1067-1078

Matsuda Y, Hagio M, Ishiwata T. (2013) Nestin: a novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 19:42-48

Mazurek R, Dave JM, Chandran RR, Misra A, Sheikh AQ, Greif DM. (2017) Vascular cells in blood vessel wall development and disease. *Adv Pharmacol* 78:323-350

McDaniel SL, Strahl BD. (2017) Shaping the cellular landscape with Set2/SETD2 methylation. *Cell Mol Life Sci* 74:3317-3334

McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT, Cahalan S. (2012) Respiratory System. In: *Veterinary Embryology*, S. 225-232 (Blackwell Publishing Ltd UK USA Australia)

Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466:829-834

Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G. (2004) Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 469:311-324

Min J, Feng Q, Li Z, Zhang Y, Xu RM. (2003) Structure of the catalytic domain of human DOT1L, a non-SET domain nucleosomal histone methyltransferase. *Cell* 112:711-723

Mokry J, Cizkova D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolár Z, English D. (2004) Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev* 13:658-664

Mozzetta C, Pontis J, Ait-Si-Ali S. (2015) Functional crosstalk between lysine methyltransferases on histone substrates: the case of G9A/GLP and polycomb repressive complex 2. *Antioxid Redox Signal* 22:1365-1381

Murray K. (1964) The occurrence of epsilon-N-methyl lysine in histones. *Biochemistry* 3:10-15

Na HH, Moon S, Kim KC. (2020) Knockout of SETDB1 gene using the CRISPR/cas9 system increases migration and transforming activities via complex regulations of E-cadherin, β -catenin, STAT3, and Akt. *Biochem Biophys Res Commun* 533:486-492

Neradil J, Veselska R. (2015) Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci* 106:803-811

Ng HH, Feng Q, Wang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Zhang Y, Struhl K. (2002) Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev* 16:1518-1527

Nguyen AT, Zhang Y. (2011) The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes Dev* 25:1345-1358

Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D. (2002 a) Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates trans-

cription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* 16:479-489

Nishioka K, Rice JC, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Werner J, Wang Y, Chuikov S, Valenzuela P, Tempst P, Steward R, Lis JT, Allis CD, Reinberg D. (2002 b) PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* 9:1201-1213

Nowak A, Dziegiel P. (2018) Implications of nestin in breast cancer pathogenesis (Review). *Int J Oncol* 53:477-487

O'Brien KB, Alberich-Jordà M, Yadav N, Kocher O, Diruscio A, Ebralidze A, Levantini E, Sng NJ, Bhasin M, Caron T, Kim D, Steidl U, Huang G, Halmos B, Rodig SJ, Bedford MT, Tenen DG, Kobayashi S. (2010) CARM1 is required for proper control of proliferation and differentiation of pulmonary epithelial cells. *Development* 137:2147-2156

Oikawa H, Hayashi K, Maesawa C, Masuda T, Sobue K. (2010) Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 316:940-950

Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. (2004) Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 303:644-649

Pai CC, Deegan RS, Subramanian L, Gal C, Sarkar S, Blaikley EJ, Walker C, Hulme L, Bernhard E, Codlin S, Bähler J, Allshire R, Whitehall S, Humphrey TC. (2014) A histone H3K36 chromatin switch coordinates DNA double-strand break repair pathway choice. *Nat Commun* 5:4091

Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di CG, Liu XM, Shao Y, Ma BF, Lee JH, Ha KS, Walton N, Lahn BT. (2010) Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells* 28:2162-2171

Peppenella S, Murphy KJ, Hayes JJ. (2014) Intra- and inter-nucleosome interactions of the core histone tail domains in higher-order chromatin structure. *Chromosoma* 123:3-13

Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T. (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12:1577-1589

Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T. (2001) Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107:323-337

Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, de la Cruz CC, Otte AP, Panning B, Zhang Y. (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300:131-135

Post M, Copland I. (2002) Overview of lung development. *Acta Pharmacol Sin* 23:4-7

Psaltis PJ, Harbuzariu A, Delacroix S, Holroyd EW, Simari RD. (2011) Resident vascular progenitor cells- diverse origins, phenotype, and function. *J Cardiovasc Transl Res* 4:161-176

Psaltis PJ, Simari RD. (2015) Vascular wall progenitor cells in health and disease. *Circ Res* 116:1392-1412

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406:593-599

Reckmann AN. (2017) Nestin expression in glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten des Nebenhodens und der Lunge (Dissertation).

Reckmann AN, Tomczyk CUM, Davidoff MS, Michurina TV, Arnhold S, Müller D, Mietens A, Middendorff R. (2018) Nestin in the epididymis is expressed in vascular wall cells and is regulated during postnatal development and in case of testosterone deficiency. *PLoS One* 13:e0194585

Robertson KD. (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6:597-610

Rodriguez-Paredes M, Martinez de Paz A, Simó-Riudalbas L, Sayols S, Moutinho C, Moran S, Villanueva A, Vázquez-Cedeira M, Lazo PA, Carneiro F, Moura CS, Vieira J, Teixeira MR, Esteller M. (2014) Gene amplification of the histone methyltransferase SETDB1 contributes to human lung tumorigenesis. *Oncogene* 33:2807-2813

Ryu H, Lee J, Hagerty SW, Soh BY, McAlpin SE, Cormier KA, Smith KM, Ferrante RJ. (2006) ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19176-19181

Saboor F, Reckmann AN, Tomczyk CU, Peters DM, Weissmann N, Kaschtanow A, Schermuly RT, Michurina TV, Enikolopov G, Müller D, Mietens A, Middendorff R. (2016) Nestin-expressing vascular wall cells drive development of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 47:876-888

Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419:407-411

Schiebel E. (2015) DNA im Zellkern: Chromatin und Chromosomen. In: *Molekulare Genetik, 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage* (Nordheim/Knippers (Hrsg.)) S. 141-159 (George Thieme Verlag, Stuttgart NewYork)

Schittny JC. (2017) Development of the lung. *Cell Tissue Res* 367:427-444

Schittny JC, Djonov V, Fine A, Burri PH. (1998) Programmed cell death contributes to postnatal lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:786-793

Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M. (2008) Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L246-254

Schmidt O. (2017 a) Organisation des Erbguts. In: *Genetik und Molekularbiologie* (Olaf Fritsche (Hrsg.)) S. 13-32 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg)

Schmidt O. (2017 b) Regulation der Genexpression bei Eukaryoten. In: *Genetik und Molekularbiologie* (Olaf Fritsche (Hrsg.)) S. 111-129 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg)

Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T. (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18:1251-1262

Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ 3rd. (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 16:919-932

Schübeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J, Bell SP, Groudine M. (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* 18:1263-1271

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92:362-367

Silva J, Mak W, Zvetkova I, Appanah R, Nesterova TB, Webster Z, Peters AH, Jenuwein T, Otte AP, Brockdorff N. (2003) Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell* 4:481-495

Spivakov M, Fisher AG. (2007) Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet* 8:263-271

Strahl BD, Grant PA, Briggs SD, Sun ZW, Bone JR, Caldwell JA, Mollah S, Cook RG, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD. (2002) Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 22:1298-1306

Sun QY, Ding LW, Xiao JF, Chien W, Lim SL, Hattori N, Goodglick L, Chia D, Mah V, Alavi M, Kim SR, Doan NB, Said JW, Loh XY, Xu L, Liu LZ, Yang H, Hayano T, Shi S, Xie D, Lin DC, Koeffler HP. (2015) SETDB1 accelerates tumorigenesis by regulating the WNT signalling pathway. *J Pathol* 235:559-570

Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y. (2002) G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev* 16:1779-1791

Tachibana M, Ueda J, Fukuda M, Takeda N, Ohta T, Iwanari H, Sakihama T, Kodama T, Hamakubo T, Shinkai Y. (2005) Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev* 19:815-826

Tan SL, Nishi M, Ohtsuka T, Matsui T, Takemoto K, Kamio-Miura A, Aburatani H, Shinkai Y, Kageyama R. (2012) Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development. *Development* 139:3806-3816

Tardif K, Hertig V, Dumais C, Villeneuve L, Perrault L, Tanguay JF, Calderone A. (2014) Nestin downregulation in rat vascular smooth muscle cells represents an early marker of vascular disease in experimental type I diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 13:119

Tardif K, Hertig V, Duquette N, Villeneuve L, El-Hamamsy I, Tanguay JF, Calderone A. (2015) Nestin upregulation characterizes vascular remodeling secondary to hypertension in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 308:H1265-1274

Teranishi N, Naito Z, Ishiwata T, Tanaka N, Furukawa K, Seya T, Shinji S, Tajiri T. (2007) Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *Int J Oncol* 30:593-603

Torsney E, Mandal K, Halliday A, Jahangiri M, Xu Q. (2007) Characterisation of progenitor cells in human atherosclerotic vessels. *Atherosclerosis* 191:259-264

Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Hurme T, Rantanen J, Lendahl U, Eriksson JE, Kalimo H. (2001) The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:588-597

Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. (2004) Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 32:4100-4108

Vaquero A, Loyola A, Reinberg D. (2003) The constantly changing face of chromatin. *Sci Aging Knowledge Environ* 2003:RE4

Wagers AJ, Weissman IL. (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116:639-648

Walker MP, LaFerla FM, Oddo SS, Brewer GJ. (2013) Reversible epigenetic histone modifications and Bdnf expression in neurons with aging and from a mouse model of Alzheimer's disease. *Age (Dordr)* 35:519-531

Walter J. (2015 a) Epigenetische Mechanismen. In: *Molekulare Genetik*, 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage (Nordheim/Knippers (Hrsg.)) S. 443-458 (George Thieme Verlag, Stuttgart NewYork)

Walter J. (2015 b) Funktionelle Genomanalysen. In: Molekulare Genetik, 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage (Nordheim/Knippers (Hrsg.)) S. 543-550 (George Thieme Verlag, Stuttgart NewYork)

Warburton D, Perin L, Defilippo R, Bellusci S, Shi W, Driscoll B. (2008) Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration. Proc Am Thorac Soc 5:703-706

Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. (2000) The molecular basis of lung morphogenesis. Mech Dev 92:55-81

Weinberg DN, Papillon-Cavanagh S, Chen H, Yue Y, Chen X, Rajagopalan KN, Horth C, McGuire JT, Xu X, Nikbakht H, Lemiesz AE, Marchione DM, Marunde MR, Meiners MJ, Cheek MA, Keogh MC, Bareke E, Djedid A, Harutyunyan AS, Jadoo N, Garcia BA, Li H, Allis CD, Majewski J, Lu C. (2019) The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA methylation landscape. Nature 573:281-286

White CL, Suto RK, Luger K. (2001) Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. EMBO J 20:5207-5218

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. (2004) Nestin expression - a property of multi-lineage progenitor cells? Cell Mol Life Sci 61:2510-2522

Wu M, Fan B, Guo Q, Li Y, Chen R, Lv N, Diao Y, Luo Y. (2018) Knockdown of SETDB1 inhibits breast cancer progression by miR-381-3p-related regulation. Biol Res 51:39

Xie L, Zeng X, Hu J, Chen Q. (2015) Characterization of nestin, a selective marker for bone marrow derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Int 2015:762098

Yadav N, Lee J, Kim J, Shen J, Hu MC, Aldaz CM, Bedford MT. (2003) Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6464-6468

Yahiro K, Higashihori N, Moriyama K. (2017) Histone methyltransferase Setdb1 is indispensable for Meckel's cartilage development. *Biochem Biophys Res Commun* 482:883-888

Yamagishi A, Susaki M, Takano Y, Mizusawa M, Mishima M, Iijima M, Kuroda S, Okada T, Nakamura C. (2019) The structural function of nestin in cell body softening is correlated with cancer cell metastasis. *Int J Biol Sci* 15:1546-1556

Yamahatsu K, Matsuda Y, Ishiwata T, Uchida E, Naito Z. (2012) Nestin as a novel therapeutic target for pancreatic cancer via tumor angiogenesis. *Int J Oncol* 40:1345-1357

Yang B, Qiu Y, Zhou N, Ouyang H, Ding J, Cheng B, Sun J. (2017) Application of stem cells in oral disease therapy: progresses and perspectives. *Front Physiol* 8:197

Yang W, Su Y, Hou C, Chen L, Zhou D, Ren K, Zhou Z, Zhang R, Liu X. (2019) SETDB1 induces epithelial-mesenchymal transition in breast carcinoma by directly binding with Snail promoter. *Oncol Rep* 41:1284-1292

Ying M, Chen D. (2012) Tudor domain-containing proteins of *Drosophila melanogaster*. *Dev Growth Differ* 54:32-43

Yu H, Wessels A, Chen J, Phelps AL, Oatis J, Tint GS, Patel SB. (2004) Late gestational lung hypoplasia in a mouse model of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *BMC Dev Biol* 4:1

Zaghi M, Broccoli V, Sessa A. (2020) H3K36 methylation in neural development and associated diseases. *Front Genet* 10:1291

Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergün S. (2006) Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 133:1543-1551

Zhang L, Issa Bhaloo S, Chen T, Zhou B, Xu Q. (2018 a) Role of resident stem cells in vessel formation and arteriosclerosis. *Circ Res* 122:1608-1624

Zhang Y, Huang J, Li Q, Chen K, Liang Y, Zhan Z, Ye F, Ni W, Chen L, Ding Y. (2018 b) Histone methyltransferase SETDB1 promotes cells proliferation and migration by interacting with Tiam1 in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 18:539

Zhang Y, Reinberg D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15:2343-2360

Zhou Z, Wu B, Tang X, Yang W, Zou Q, Wang H. (2020) High SET domain bifurcated 1 (SETDB1) expression predicts poor prognosis in breast carcinoma. *Med Sci Monit* 26:e922982

Zhu Y, Sun D, Jakovcevski M, Jiang Y. (2020) Epigenetic mechanism of SETDB1 in brain: implications for neuropsychiatric disorders. *Transl Psychiatry* 10:115

9 ERKLÄRUNG

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der gegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/ Datum

Alina Marie Grumbach

10 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Middendorff für die umfangreiche Unterstützung und Hilfe bei der Fertigstellung meiner Arbeit bedanken. Ebenso möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe und vor allem Sabine Tasch für jegliche Hilfe, tollen Beistand und viele schöne Momente in den vergangenen Jahren danken.

Großen Beistand habe ich ebenfalls durch meine Eltern Anne und Rolf sowie meine Schwester Caro erhalten, die mich während aller Höhen und Tiefen stets mit guten Worten und Rückhalt begleitet haben. Nicht zu vergessen ein großes Dankeschön an meine Oma, die mich während meiner kompletten Studien- und Doktorandenzeit begleitet hat und eine große seelische Unterstützung für mich war. Vielen Dank für dein Durchhaltevermögen beim Daumendrücken!

Ganz zum Schluss noch ein großes Dankeschön an Sven, der mir immer den Rücken freigehalten hat und mich in meiner Arbeit immer bestärkt hat. Es war nicht immer eine leichte Zeit, aber wir haben diese super gemeistert.

Vielen Dank für Eure ganze Unterstützung.

Für meinen Opa.