

Die Bedeutung des Zytokins Cardiotrophin-1 (CT-1) für die Herzzell-Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus

Lena Mascheck



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. M. Bergmann**

und

**dem Physiologischen Institut
Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. H. Sauer**

**Die Bedeutung des Zytokins Cardiotrophin-1 (CT-1)
für die Herzzell-Differenzierung embryonaler
Stammzellen der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig Universität Gießen

eingereicht von

Lena Mascheck

Tierärztin aus Fritzlar

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. M. Bergmann
Prof. Dr. H. Sauer

Tag der Disputation: 17.04.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung	17
1.1 Stammzellen	18
1.2 Cardiotrophin-1	19
1.3 Hypoxie	22
1.4 Reoxygenierung	23
1.5 Kardiale Transkriptionsfaktoren	24
1.6 Wachstumsfaktoren	26
1.7 Kardiale Gene.....	28
1.8 Kalzium.....	29
1.9 Reaktive Sauerstoffspezies	30
1.10 Stickstoffmonoxid.....	31
1.11 Kerntranslokation.....	31
1.12 Zielsetzung der Arbeit	32
2. Material	37
2.1 Firmen.....	37
2.2 Geräte und Laborbedarf	38
2.3 Chemikalien	39
2.4 Antikörper	41
2.5 Puffer	42
2.6 Medien.....	43
2.7 Hemmstoffe.....	43
2.8 Substanzen	44
2.8.1 DCFH-DA	44
2.8.2 DAF-FM	455
2.8.3 Fluo-4-AM	45
2.8.4 Cardiotrophin-1	45
3. Methoden	47
3.1 Stammzellkultur.....	47
3.1.1 Zellkultur embryonaler Stammzellen der Maus.....	47
3.1.2 Kultivierung von Fibroblasten	47
3.1.3 Kultivierung der embryonalen Stammzellen auf MEFs	48
3.1.4 Passagieren der Stammzellen und Präparieren einer Spinnerflasche	48
3.1.5 Einfrieren der ES-Zellen	50

3.2	Behandlung mit CT-1, physiologischer Hypoxie und Reoxygenierung	50
3.2.1	Behandlung mit CT-1	50
3.2.2	Behandlung mit Hypoxie und Reoxygenierung	51
3.3	Isolation embryonaler Kardiomyozyten	52
3.4	Immunhistochemie	52
3.5	Konfokale Lasermikroskopie	54
3.5.1	Messung intrazellulärer Kalziumtransienten	56
3.5.2	Messung reaktiver Sauerstoffspezies.....	56
3.5.3	Stickstoffmonoxid Messung	57
3.5.4	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	57
3.6	Western Blot	57
3.6.1	Proteinextraktion	57
3.6.2	Gelelektrophorese und Blotten.....	58
3.6.3	Spezifischer Proteinnachweis.....	59
3.6.4	„Stripping“	61
3.7	siRNA	61
3.8	Statistik.....	62
4.	Ergebnisse	63
4.1	Endogene Expression von CT-1 und gp130 während der Differenzierung in EBs ...	63
4.2	Hochregulation von Wachstumsfaktoren unter CT-1 Behandlung.....	64
4.3	Hochregulation kardialer Transkriptionsfaktoren unter CT-1 Behandlung.....	66
4.4	Hochregulation kardialer Gene unter CT-1 Behandlung.....	68
4.5	Anzahl und Größe kontrahierender Areale nach CT-1 Behandlung	70
4.6	Größenzunahme der EBs unter Behandlung mit CT-1	72
4.7	Einfluss von CT-1 auf die Generierung intrazellulärer Signalmoleküle	73
4.7.1	Entstehung intrazellulärer Kalzium Transienten unter CT-1 Behandlung.....	73
4.7.2	Generierung von ROS nach CT-1 Behandlung	76
4.7.3	Einfluss von CT-1 auf die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase und Generierung von NO.....	77
4.7.3.1	Generierung von NO unter CT-1 Behandlung	77
4.7.3.2	Phosphorylierung der eNOS nach CT-1 Behandlung.....	78
4.8	Translokation von CT-1 in den Zellkern	79
4.8.1	Translokation von CT-1 in den Zellkern nach Behandlung mit exogenem CT-1	79

4.8.2	Translokation von intrazellulärem CT-1 in den Zellkern nach Behandlung mit Hypoxie (1% O ₂)	81
4.9	Hemmung der Kerntranslokation von CT-1	83
4.9.1	Inhibition der Translokation von CT-1 in den Zellkern nach Behandlung mit exogenem CT-1 durch Vorbehandlung mit BAPTA, NMPG und L-NAME	83
4.9.2	Inhibition der Translokation von CT-1 in den Zellkern nach Hypoxie (1% O ₂) durch Vorbehandlung mit BAPTA, NMPG und L-NAME	85
4.10	Einfluss der Hemmstoffe BAPTA, NMPG und L-NAME auf die Kardiomyogenese. 87	
4.10.1	Abnahme der Größe und Anzahl kontrahierender Areale	87
4.10.2	Abnahme der Expression kardialer Gene	89
4.11	Auswirkung der endogenen CT-1-Gen Inaktivierung durch si-RNA.....	92
4.11.1	Abnahme der CT-1 Expression nach CT-1 siRNA Behandlung	92
4.11.2	Abnahme der kontrahierenden Areale nach siRNA Inaktivierung von CT-1.....	94
4.11.3	Abnahme der Expression von Wachstumsfaktoren nach siRNA Inaktivierung von CT-1....	94
4.11.4	Abnahme der Expression kardialer Transkriptionsfaktoren nach siRNA Inaktivierung von CT-1.....	95
4.11.5	Abnahme der Expression kardialer Proteine nach siRNA Inaktivierung von CT-1	96
4.12	Einfluss der spezifischen Hemmung des gp130 vermittelten Signalweges auf die Kardiomyogenese	97
4.12.1	Hemmung der JAK2 und PI3K.....	98
4.12.2	Hemmung der ERK1/2 und p38 MAPK.....	99
4.13	Expression von CT-1 unter Behandlung mit Hypoxie (1% O₂).....	101
4.14	Expression von CT-1 unter Bedingungen der Reoxygenierung.....	102
4.15	Generierung von ROS und NO unter Reoxygenierung	103
4.15.1	Stimulation der ROS und NO Generierung unter Reoxygenierung	103
4.15.2	Hemmung der ROS Generierung.....	105
4.15.3	Hemmung der NO Generierung	106
4.16	Phosphorylierung von Signalmolekülen	107
4.16.1	Phosphorylierung von JAK, STAT, PI3K und AKT nach Hypoxie (1% O ₂).....	107
4.16.2	Phosphorylierung von JAK, STAT, PI3K und AKT nach Reoxygenierung.....	109

4.17 Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren.....	111
4.17.1 Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren nach Hypoxie (1% O ₂)	111
4.17.2 Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren nach Reoxygenierung	112
4.18 Stimulation der Kardiomyogenese nach Hypoxie/Reoxygenierung.....	114
4.18.1 Zunahme der Anzahl kontrahierender Areale unter Hypoxie/ Reoxygenierung	114
4.18.2 Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Expression kardialer Gene	115
4.18.3 Inhibierung der Kardiomyogenese nach Hypoxie	115
4.19 Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Kardiomyogenese	117
4.19.1 Herunterregulation der Proteinexpression von CT-1 und der Wachstumsfaktoren VEGF und PDGFbb nach chronischer Hypoxie	117
4.19.2 Einfluss chronischer Hypoxie auf die Expression von Stammzellmarkern	119
4.19.3 Einfluss chronischer Hypoxie auf die Expression kardialer Gene.....	120
5 Diskussion	121
5.1 Das EB-Modell zur Untersuchung der Kardiomyogenese	122
5.2 Einfluss von CT-1 auf die Expression von Wachstumsfaktoren, kardialen Transkriptionsfaktoren und kardialen Genen	123
5.3 Intrazelluläre Kalzium-, NO- und ROS Signale nach CT-1 Behandlung	124
5.4 Translokation von CT-1 in den Zellkern	125
5.5 Auswirkung der spezifischen Hemmung des gp130 gekoppelten Signalweges auf die Kardiomyogenese	127
5.6 Bedeutung von CT-1 für die Kardiomyogenese	128
5.7 Expression von CT-1 nach Hypoxie/Reoxygenierung	131
5.8 Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Kardiomyogenese	131
5.9 Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Kardiomyogenese	132
5.10 Klinische Bedeutung	134
6. Zusammenfassung	135
7. Referenzen.....	126
8. Publikationen	149

9. Danksagung	151
10. Erklärung	153

Abkürzungsverzeichnis

A	AG490
Abb.	Abbildung
aFGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-1 (fibroblast growth factor-1)
AG490	Inhibitor der JAK-2
Ak	Antikörper
AKT	Protein Kinase B
AM	Acetoxymethyl
α -MHC	α -Myosin schwere Kette (α -myosin heavy chain)
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid (atrial natriuretic peptide)
aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser (aqua bidestillata)
Ar/ArKr	Argon /Krypton-Laser
BAPTA-AM	1,2-Bis(o-Aminophenoxy)Ethan-N,N,N,N'-Tetraessigsäure
Bcl-2	B-Zell Lymphom-2 (B-cell lymphoma 2)
β -MHC	β -Myosin schwere Kette (β -Myosin heavy chain)
BMP4	Knochenmorphogenetisches Protein 4 (bone morphogenetic protein 4)
BNP	natriuretisches Peptid Typ B (brain natriuretic peptide)
kont	Kontrolle
Ca ²⁺	bivalentes Kalziumion
c-myc	zelluläres Myelozytomatose Onkogen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT-1	Cardiotrophin-1
CTF1	Cardiotrophin-1 Gen Symbol
Cy 3	Indocarbocyanin
Cy 5	Indodicarbocyanin
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-dichlorofluoreszein
DAG	Diacylglycerol
DCF	2',7'-Dichlorofluoreszein
DCFH	nicht fluoreszierendes 2',7'-Dichlorofluoreszein
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluoreszein-Diacetat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco`s standardisiertes Nährmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DRAQ	DNA interagierendes Agens
EBs	Embryonalkörperchen
EB-Modell	Embryonalkörperchen- Modell
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK1/2	extrazellulär signalregulierte Kinase 1/2
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al	und andere (et alia)
Feeder	Fibroblastenzellen
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (fibroblast growth factor-2)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälber Serum
Flk-1	Fetale Leberkinase-1 (VEGF-Rezeptor-2)
Fluo-4-AM	1-[2-Amino-5-(2,7-difluoro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl) phenoxy]-2-(2-amino-5-methyl-phenoxy) ethane-N,N,N',N'-Tetraessigsäure, pentaacetoxymethylester
<i>g</i>	Erdbeschleunigung ; $1g = 9,81 \text{ m/s}^2$
<i>g</i>	Gramm
GATA4	GATA bindendes Protein 4
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gp130	Glykoprotein 130
gp130-/-	Homozygot negativ Glykoprotein 130
Grb2	Wachstumsfaktor gebundenes Protein 2 (Growth factor receptor-bound protein 2)
H	Hypoxie (1% O ₂)
H+B	Hypoxie (1% O ₂) + BAPTA-AM (EBs vorbehandelt mit BAPTA-AM)
H+N	Hypoxie (1% O ₂) + NMPG (EBs vorbehandelt mit NMPG)
H+L	Hypoxie (1% O ₂) + L-NAME (EBs vorbehandelt mit L-NAME)
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HCN	durch Hyperpolarisation aktivierte Ionenkanäle (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

hESC	humane embryonale Stammzellen
HeNe	Helium /Neon-Laser
HIF1 α	Hypoxie induzierter Faktor 1- α
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H/R	Hypoxie (1%O ₂)/ Reoxygenierung
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IL-1	Interleukin-1
IL-1 α	Interleukin-1 alpha
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-11	Interleukin-11
IL-33	Interleukin-33
IL-37	Interleukin-37
Image J	Bildanalyse Java Programm (Image Processing and Analysis in Java)
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbecco's Medium
iNOS	Induzierte Stickstoffmonoxid Synthase
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP3R	Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
Isl-1	Insulinen verstärkendes Protein (Insulin gene enhancer protein)
JAK2	Janus Kinase 2
K	Konzentration
KCl	Kaliumchlorid
kDa	atomare Masseneinheit (kilo Dalton)
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Klf-4	Kruppel-ähnlicher Faktor 4
kont	Kontrolle
LIF	Leukämie inhibierender Faktor (Leucemia inhibitory factor)
LIFR β	Leukämie inhibierender Faktor (Leukemia inhibitory factor receptor β)
Lin-28	Lin-28 homolog A
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginine-Methylester HCl
LY29	LY294002 Inhibitor der PI3K

M	Molar (mol/l)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (mitogen-activated protein kinase)
MCP	multipotente kardiovaskuläre Vorläuferzellen (multipotent cardiovascular progenitor cells)
MEF	embryonale Fibroblasten der Maus
MEF2c	Myocyten verstärkender Faktor 2c
MEM	Minimal essentielle Aminosäuren
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MESP1	Mesoderm Posteriores Protein (Mesoderm posterior protein)
mES-Zellen	embryonale Stammzellen der Maus
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MLC1a,-2a,-2v	Myosin leichte Kette-1a,-2a (-Atrium), -2v (Ventrikel)
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
MYH7	β –Myosin schwere Kette-Isoform 7 (Myosin heavy chain 7)
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
nanog	Homöoboxprotein NANOG
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ Austauscher
NE	Neon
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
NK	Nicht-Kardiomyozyten

Nkx2.5	Homöoboxprotein Nkx-2.5
NLS	Kernlokalisationssequenz
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NMPG	N-(2-Mercapto-propionyl)glycin
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid -Synthase
O ₂	molekularer Sauerstoff
Oct-4	Octamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PBST	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Triton-X-100 (Phosphate Buffered Saline Triton-X-100)
PD98	PD98059 Inhibitor der ERK1/2
PDGF	Blutplättchen Wachstumsfaktor (Platelet derived growth factor)
PDGFR α , β	PDGF Rezeptor- α , β
p-eNOS	phosphorylierte endotheliale NO Synthase
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasma Membran Kalzium Pumpe
Raf/Ras	Proteinkinasen (rapidly accelerated fibrosarcoma/ rat sarcoma)
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinases
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
scram	Negativkontrolle: Mischung aus unspezifisch bindenden mRNAs (scrambled)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
siRNA	kurze interferierende RNA (small interfering RNA)
SKF	SKF86002 Inhibitor der p38 MAPK

STAT3	Signalumformer und Transkriptionsaktivator 3 (signal transducer and activator of transcription 3)
SOCCs	speichergesteuerte Kalziumkanäle (store operated calcium channels)
Sox-2	Geschlechtsbestimmende Region Y - Box 2 (sex determining region Y)-box 2
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEAD3	Transkriptionsfaktor 3 der TEA-Familie
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton-X-100	Octoxinol-9
Tween-20	Polysorbat 20
U	Einheit (units)
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR2	VEGF-Rezeptor-2 (vascular endothelial growth factor receptor 2)
VOCCs	spannungsabhängige Kalziumkanäle (voltage operated calcium channels)
vs.	Versus
%	Prozent
°C	Grad Celsius

1. Einleitung

Das kardiovaskuläre System ist das erste sich entwickelnde Organsystem, um den wachsenden Bedarf des Embryos an Sauerstoff und Nährstoffen zu decken (Ezashi et al., 2005). In der frühen Phase der Entwicklung ist die Aufnahme von Nährstoffen und O₂ noch durch Diffusion möglich, doch mit zunehmender Gewebedicke wird die Bildung des Blutgefäßsystems zur Versorgung des Embryos unerlässlich (Rüsse, 1998). Auch in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus entstehen Herz- und Gefäßzellen als eine der ersten Zelltypen (Hescheler et al., 1999).

Bisher wurde die allgemeine Ansicht vertreten, dass das Herz ein statisches Organ ist, in dem die Anzahl der Kardiomyozyten von Geburt an festgelegt wird und bis zum Lebensende konstant bleibt. Neueste Forschungen zeigen hingegen, dass es sich um ein plastisches Organ handelt, in dem Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten einige Male während der Lebenszeit ersetzt werden (Kajstura et al., 2012). Dennoch ist die Regenerationsfähigkeit adulter Kardiomyozyten begrenzt. Bei Herzerkrankungen, die mit einer Dysfunktion oder einem Verlust an Kardiomyozyten einhergehen, besteht die Hoffnung, durch Zelltransplantationen die Funktion des Herzens wiederherzustellen. ES-Zellen stellen dabei eine vielversprechende Quelle für funktionell intakte Kardiomyozyten dar, da sie potentiell sowohl geschädigtes Myokard, als auch Reizleitungsgewebe ersetzen können. Bevor Kardiomyozyten aus ES Zellen klinisch eingesetzt werden können, müssen zunächst effizientere Differenzierungsprotokolle erarbeitet werden um den bisher geringen Prozentsatz von 5% Kardiomyozyten pro EB (Buggisch et al., 2007) anzuheben. Des Weiteren stellt die begrenzte Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten, bei einem notwendigen Bedarf von circa 1×10^8 Transplantatzellen pro chirurgischem Eingriff (van der Spoel et al., 2011), ein erhebliches Problem dar. Die erfolgreiche Nutzung von ES-Zellen zu Transplantationszwecken setzt die Generierung einer möglichst reinen, ausdifferenzierten Kardiomyozytenpopulation voraus. Aus diesem Grund ist das Verständnis der grundlegenden Mechanismen der kardialen Entwicklung für eine selektive Differenzierung von ES-Zellen essentiell. Frühere Arbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, dass die kardiale Differenzierung in sich entwickelnden ES-Zellen durch die Generierung von intrazellulären Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) gesteigert werden kann (Buggisch et al.,

2007; Schmelter et al., 2006; Bartsch et al., 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit CT-1 zu einer Stimulation der Kardiomyogenese und einer erhöhten Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 führt (Sauer et al., 2004).

1.1 Stammzellen

Im Vergleich zu anderen Zellen besitzen Stammzellen, neben der einzigartigen Fähigkeit zur fast unbegrenzten Proliferation und Selbsterneuerung, die Möglichkeit zur Differenzierung in verschiedenste Zellen des Körpers. Diese Eigenschaften machen sie zu einem interessanten in vitro Forschungsmodell. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse eines Embryos, der Blastozyste, an Tag 5-6 nach der Befruchtung isoliert. Im Unterschied zu den multipotenten, adulten Stammzellen, die sich nur in eine bestimmte Anzahl von Zelltypen differenzieren können, sind ES-Zellen pluripotent und können sich zu Zellen aller drei Keimblätter (Meso-, Endo- und Ektoderm) entwickeln. Im Gegensatz zu den totipotenten Stammzellen können sich die ES-Zellen allerdings nicht zu einem vollständigen Organismus entwickeln. Adulte Stammzellen kommen im Körper nur in einer begrenzten Anzahl vor. Darüber hinaus sind sie schwierig zu identifizieren, zu isolieren und zu kultivieren. Bekannt sind adulte Stammzellen aufgrund erfolgreicher und gängiger Therapien; beispielsweise bei der Bekämpfung von Leukämien, bei der hämatopoetische adulte Stammzellen aus dem Knochenmark erfolgreich transplantiert werden. Sie kommen aber auch in anderen Geweben, wie Gehirn, Fettgewebe, Skelett- und Herzmuskulatur, Zahnpulpa, Leber, Kornea und Retina vor (Passier und Mummery, 2003; Li und Ikehara, 2013). Ein großer Vorteil adulter Stammzellen liegt in der Möglichkeit der autologen Transplantation; sie können dem Patienten problemlos entnommen und nach Ausdifferenzierung ohne Abstoßungsreaktion in das Gewebe implantiert werden.

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) entstehen aus somatischen Zellen durch die exogene Transfektion mit 4 Transkriptionsfaktoren Oct-4, c-Myc, Klf-4 und Sox-2, welche die Zelle in ihren pluripotenten Zustand zurückversetzen (Yamanaka und Takahashi, 2006).

Neueste Forschungen haben gezeigt, dass kardiale Fibroblasten der Maus zuerst in iPS-Zellen dedifferenziert und anschließend zu funktionellen kardialen Kardiomyozyten transdifferenziert werden können. Dies bedeutet einen großen Fortschritt im Hinblick auf

eine potentielle Nutzung dieser autologen Zellquelle, ohne die Notwendigkeit einer exogenen Zelltransplantation (Jiang et al., 2012).

ES-Zellen der Maus werden seit Jahren verwendet und abhängig von der Zelllinie auf mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten der Maus (MEFs) oder auf mit Gelatine beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Zur Aufrechterhaltung ihrer Pluripotenz ist die Aktivierung des LIF-abhängigen JAK/STAT3 Signalweges notwendig. Das Zytokin LIF (Leukemia inhibitory factor) wird zum einen von den MEFs sezerniert und zum anderen extern dem Medium hinzugefügt, um die Stammzellen in ihrem pluripotenten, undifferenzierten Stadium zu halten (Burdon et al., 2002; Martin, 1981). Ein weiteres Signalmolekül, welches die Selbsterneuerung und Pluripotenz der ES-Zellen in vivo und in vitro erhält, ist der Transkriptionsfaktor Oct-4. Dieser wird ausschließlich in toti- und pluripotenten Stammzellen exprimiert (Ovitt und Scholer, 1998) und bildet gemeinsam mit Sox-2 und Nanog eine Regulationseinheit, welche die Pluripotenz der ES-Zellen erhält (Boyer et al., 2005; Chew et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Oct-4 bei der Reprogrammierung von somatischen Zellen zu iPS-Zellen, zusammen mit den Faktoren Sox-2, Nanog und Lin-28, eine bedeutende Rolle spielt (Yamanaka und Takahashi, 2006). In Abwesenheit von MEF und LIF differenzieren die ES-Zellen bei der Kultivierung in Spinnerflaschen, in denen sie ähnlich der normalen Embryogenese dreidimensionale Zellaggregate bilden, spontan zu verschiedenen Zelltypen, unter anderem auch zu Kardiomyozyten. Durch die Bildung der sogenannten Embryonalkörperchen (EBs) entstehen in-vitro Zell-Zell-Kontakte, die auch in-vivo während der normalen Entwicklung des Embryos auftreten. Die so nachempfundene Differenzierung eines Embryos ermöglicht die detaillierte Untersuchung von Entwicklungsmechanismen, sowie die Erzeugung spezifischer Zelltypen zur Generierung von Gewebe. Die Differenzierungsfähigkeit der ES-Zellen zu Kardiomyozyten ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wobei die Qualität des fetalen Kälberserums (FKS), die Wahl der ES-Zelllinie, die Zusammensetzung des Mediums, sowie das Alter der EBs eine wichtige Rolle spielen.

1.2 Cardiotrophin-1 (CT-1)

CT-1, ein 21.5kDa schweres Protein, gehört neben Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 11 (IL-11), Leukämie inhibierender Faktor (LIF), Oncostatin M, Cardiotrophin-ähnliches Zytokin und

Ciliary Neurotrophic factor zur Interleukin 6 Familie. Die IL-6 Zytokinfamilie spielt bei der Regulation komplexer zellulärer Prozesse wie Genaktivierung, Proliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle. CT-1 ist ein Zytokin, das aufgrund seiner hypertrophierenden Wirkung auf neonatale Kardiomyozyten der Ratte bekannt wurde (Pennica et al., 1995b). CT-1 wirkt über LIFR β /gp130 gekoppelte Signalwege. Nach Bindung von CT-1 durch LIFR β assoziiert Glykoprotein 130 (gp130) mit dem Ligand-Rezeptor Komplex und leitet das Signal ins Zellinnere weiter. CT-1 kann intrazellulär über mindestens vier verschiedene Signalwege JAK/STAT, ERK1/2, PI3K/AKT und p38 wirken (Craig et al., 2001; Kuwahara et al., 2000; Sauer et al., 2004; Sheng et al., 1997).

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von ERK1/2 und PI3K/AKT für die anti-apoptotische und protektive Wirkung von CT-1 verantwortlich ist (Brar et al., 2001b), während STAT3 bei der hypertrophen Wirkung von CT-1 eine große Rolle spielt (Zhao, 2006). Wollert bewies, dass neonatale Kardiomyozyten der Ratte unter CT-1 Behandlung ihre Form ändern, wobei es bei gleichbleibender Zellweite zu einer Zunahme der Zelllänge kommt. Diese Form entspricht einer volumenbedingten Hypertrophie, die durch eine Zunahme der Sarkomere in Reihe und einer Vergrößerung der Myozyten aufgrund einer Zunahme der Zelllänge versus der Zellweite charakterisiert ist (Wollert et al., 1996). Die ursprüngliche Entdeckung von CT-1 ist auf das Ausmaß der hypertrophierenden Wirkung, im Vergleich zu anderen Mitgliedern der IL-6 Familie, zurückzuführen. Dabei unterscheidet sich die CT-1 induzierte Hypertrophie grundlegend, sowohl im Phänotyp, als auch in der induzierten Genexpression, von einer sympathomimetisch induzierten Hypertrophie (Calabro et al., 2009). Hypertrophie ist eine kompensatorische Reaktion des Herzens auf eine Vielzahl von kardiovaskulären Erkrankungen. Die initial physiologische, kompensatorische Reaktion führt letztendlich zu einer pathologischen Hypertrophie, die mit einer Dilatation des Herzens und einem Versagen der Herzmuskelzellen endet. Es wird vermutet, dass die kardiale Hypertrophie mit einer Reaktivierung fetaler Gene einhergeht (Pennica et al., 1995a). Daher ist von Bedeutung, dass unter der Behandlung neonataler Kardiomyozyten der Ratte mit CT-1 und IL-6 eine Aktivierung von immediate early genes hervorgerufen werden konnte (Wollert und Chien, 1997).

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der IL-6 Familie wird CT-1 im Verlauf der frühen Embryogenese primär im embryonalen Herzschlauch exprimiert. Es wird daher vermutet,

dass CT-1 während des Wachstums und der Entwicklung der Kammern und Vorhöfe des Herzens eine Rolle spielt. Es soll dort das Überleben und die Proliferation unreifer Myozyten fördern (Sheng et al., 1996). CT-1 zeigt in der frühen Phase der Kardiomyogenese ein einzigartiges Expressionsmuster, mit einer ausschließlichen Expression in den Atrien und Ventrikeln. Auch in der späteren Entwicklung wird CT-1 vorwiegend und in hoher Konzentration im Myokard exprimiert (Sheng et al., 1996). Die Tatsache, dass die CT-1 Expression auch nach der Geburt in kardialen Muskelzellen fortgesetzt wird, lässt eine autokrine oder parakrine Wirkung, sowohl im embryonalen, als auch im adulten Herzen vermuten (Pennica et al., 1996). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass CT-1 in Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten (NK) synthetisiert wird, über den Koronarsinus in die periphere Blutbahn gelangt (Asai et al., 2000) und dort hämodynamische Effekte bewirkt (Latchman, 1999).

Neben seinen wichtigen Funktionen in embryonalen und neonatalen Geweben, zeigt CT-1 eine protektive Funktion im adulten Herzen. Die Förderung des Überlebens von Kardiomyozyten spielt sowohl beim Erhalt einer normalen Herzfunktion als auch während der normalen Herzentwicklung eine wichtige Rolle. Aufgrund der Tatsache, dass eine Verletzung des Herzens oft mit einer Narbenbildung und einer reduzierten kardialen Funktion einhergeht, ist die Fähigkeit von CT-1 die Proliferation und das Überleben von embryonalen und neonatalen Kardiomyozyten zu fördern, von großer Bedeutung. Dabei ist bemerkenswert, dass CT-1 sowohl bei Verabreichung vor der schädigenden Ischämie als auch bei Gabe während der Reoxygenierungsphase kardioprotektiv wirkt (Brar et al., 2001b; Jougasaki, 2010). Der protektive Effekt wird über die Aktivierung von ERK1/2, PI3K und AKT vermittelt (Brar et al., 2001b). Verschiedene Forschungsgruppen haben gezeigt, dass CT-1 neben seiner kardioprotektiven Wirkung auch Leber (Bustos et al., 2003; Marques et al., 2007) und Nervenzellen (Lesbordes et al., 2003) vor Apoptose schützen kann.

Im EB-Modell konnte gezeigt werden, dass CT-1 keine Zellhypertrophie induziert, sondern die Zellproliferation und die kardiomyogene Differenzierung stimuliert. Dies verläuft über einen Mechanismus in dem ROS als Signalmoleküle in der JAK/STAT und MAPK vermittelten Signaltransduktionskaskade, involviert sind (Sauer et al., 2004). Neben der proliferativen Wirkung auf Kardiomyozyten konnte eine Beteiligung von CT-1 bei der Wundheilung infolge eines Myokardinfarktes im Tiermodell gezeigt werden. Dort führt die Verabreichung von CT-

1 zu einer vermehrten Proliferation von Myofibroblasten und so zu einer Stimulation der myokardialen Regeneration (Drobic et al., 2007). Die Hauptfunktion von kardialen Fibroblasten liegt in der Synthese von Kollagen, die dem Erhalt der kardialen Matrix dient. Darüber hinaus könnten sie eine wichtige Rolle bei kardialen Remodellierungsvorgängen spielen. Kardiovaskuläre Patienten, die beispielsweise unter Myokardinfarkt, kongestivem Herzversagen, Hypertonie, Herzklappenfehlern oder Herzversagen leiden, zeigen deutlich erhöhte CT-1 Plasma Spiegel im Vergleich zu Kontrollpatienten, so dass die Bestimmung des CT-1 Gehaltes im Blut zu Diagnose und Prognosezwecken herangezogen werden kann (Jougasaki, 2010; Pemberton, 2007; Talwar et al., 2002; Tsutamoto et al., 2007; Zolk et al., 2002).

Interessanterweise wird CT-1 weithin zur Kultur von Kardiosphären als Bestandteil des Zellkulturmediums verwendet. Dies lässt vermuten, dass CT-1 gleichfalls Effekte auf die Differenzierung und/oder Proliferation kardialer Progenitorzellen (Messina et al., 2004; Ye et al., 2012) im adulten Herzen ausübt und folglich in Regenerierungs- und Reparaturvorgänge involviert ist (Freed et al., 2005)

Gp130^{-/-} Embryonen sterben an Tag 12 der Entwicklung und zeigen dabei eine auffällige Hypoplasie der Ventrikel, ohne Veränderungen des Septums oder der Trabekel (Yoshida et al., 1996). Hingegen zeigen homozygot negative CT-1 Mäuse keine schweren Herzmissbildungen, indes kommt es aufgrund des Verlustes sympathischer Neuronen, zu neuronalen Defiziten und zu einem erniedrigten basalen Blutdruck, sowie zu einer Steigerung der IL-6 mRNA Expression um das 5-Fache (Gritman et al., 2006).

Es besteht eine hohe speziesübergreifende Sequenzhomologie zwischen dem CT-1 der Maus und dem humanen CT-1 mit 88% identischen Sequenzen (Pennica et al., 1995b), weshalb von einer Vergleichbarkeit ausgegangen werden kann.

1.3 Hypoxie

Die frühe embryonale Entwicklung findet unter hypoxischen Bedingungen statt, die kardiale Differenzierungsvorgänge steuern. So ist sowohl die Morula während ihrer Wanderung durch den Eileiter, als auch die Blastozyste vor der Implantation im Uterus, einer Hypoxie ausgesetzt. Seitdem bekannt ist, dass Hypoxie über Hypoxie regulierte

Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Gene steuern kann, wird vermutet, dass niedrige Sauerstoffspiegel während der frühen Embryogenese erste Differenzierungsvorgänge initiieren (Simon und Keith, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die kurzzeitige Inkubation von mES-Zellen unter hypoxischer Atmosphäre zu einer Hochregulation der HIF-1 α Expression, einem Anstieg an intrazellulärem H₂O₂ und der vermehrten Expression von Zellzyklus-Regulator Proteinen und somit zu einer Stimulation der Differenzierung von ES-Zellen führt (Lee et al., 2008). Frühere Arbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, dass die Expression von CT-1 unter Behandlung mit chemischer (CoCl₂) und/oder physiologischer Hypoxie (1% O₂) über ROS und HIF-1 α reguliert wird. HIF-1 α -/- EBs zeigen keine Anzeichen einer kardialen Differenzierung und eine vermehrte CT-1 Expression nach Behandlung mit Prooxidantien oder Hypoxie bleibt aus (Ateghang et al., 2006). Die Arbeitsgruppe um Ng konnte zeigen, dass die Zugabe von externer HIF-1 α -cDNA in ES-Zellen zu einer Stimulation der Kardiomyogenese führt. Dies geschieht durch Steigerung der Anzahl kontrahierender Areale, sowie der Expression von kardialen Markern (Gata-4, Nkx2.5 und MLC2v). Des Weiteren werden CT-1, VEGF und p-eNOS unter hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert (Ng et al., 2010). Ferner wird ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von adulten Stammzellen und dem umgebenden Gewebemilieu vermutet. So ist interessanterweise das Knochenmark, in dem niedrige O₂ Spiegel herrschen, ein Ort im Organismus, wo vermehrt adulte Stammzellen vorkommen (Sauer und Wartenberg, 2011). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass unter Hypoxie kultivierte humane ES-Zellen eine höhere Expression des Stammzellmarkers Oct-4 aufwiesen und weniger Zellen spontan differenzierten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass ES-Zellen zum Erhalt ihrer Pluripotenz eine hypoxische Umgebung benötigen (Ezashi et al., 2005). Vor diesem Hintergrund interessierte uns der Einfluss von Hypoxie auf die Kardiomyogenese embryonaler Stammzellen.

1.4 Reoxygenierung

Im Rattenmodell eines Myokardinfarktes zeigten sich sowohl in der akuten Phase als auch längere Zeit nach Ligatur der Koronararterie, erhöhte CT-1 und gp130 mRNA Spiegel in Infarkt und Nichtinfarktgewebe, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Aoyama et al., 2000). Dies lässt vermuten, dass die CT-1 Regulierung eine wichtige Rolle bei Reparaturvorgängen im

Herzen spielt. Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten der Ratte konnten zeigen, dass CT-1 durch Aktivierung von p42/p44 MAPK und PI3K/AKT Signalwege kardioprotektiv wirkt und die Kardiomyozyten vor Reoxygenierungsschäden schützen kann. Dabei ist im Hinblick auf eine potentiell therapeutische Nutzung von großem Interesse, dass CT-1 sowohl bei Gabe vor der schädigenden Ischämie als auch bei Verabreichung während der Reoxygenierung die Zellen erfolgreich schützen kann (Brar et al., 2001a). Ebenso führt der Gentransfer von CT-1 in einem Mausmodell des Myokardinfarktes zu einer geringeren Infarktgröße, einem niedrigeren Apoptose-Index und einer erhöhten CT-1 und Bcl-2 Synthese im Myokard (Ruixing et al., 2007). Es ist bekannt, dass im Falle einer Ischämie und anschließender Reoxygenierung, die beispielsweise durch einen Herzinfarkt ausgelöst wird, ROS im betroffenen Gewebe entsteht (Hensley et al., 2000).

1.5 Kardiale Transkriptionsfaktoren

Das Herz ist das erste Organ, welches sich während der Embryogenese entwickelt. Man unterscheidet zwischen einem ersten und zweiten Herzfeld; beide enthalten multipotente kardiovaskuläre Progenitorzellen (MCP). Das erste Herzfeld wird in der Folge zu beiden Vorhöfen und dem linken Ventrikel, während sich das zweite Herzfeld zum rechten Ventrikel entwickelt (Meilhac et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Mesoderm Posteriores Protein 1 (MESP1) exprimierende Zellen Vorläuferzellen der MCP sind und zur Spezialisierung und Expression kardiovaskulärer Schlüssel-Transkriptionsfaktoren benötigt werden. Isl-1 wird unabhängig von MESP1 exprimiert und gemeinsam wirken sie stimulierend auf die kardiale Differenzierung (Bondue et al., 2011).

Die Entwicklung des Herzens wird hauptsächlich von den Transkriptionsfaktoren MEF-2c, GATA-4 und Nkx2.5 reguliert. Sie können über spezifische Bindungsstellen in der Promoterregion kardialer Gene, wie MLC2v und ANP, deren Expression aktivieren (Oka und Komuro, 2000). In der frühen Phase der embryonalen Entwicklung, im präkardialen Mesoderm, werden Nkx2.5 und GATA-4 koexprimiert und regulieren sich wechselseitig in ihrer Expression (Brewer et al., 2005). Im späteren Stadium der Herzentwicklung wirken sie gemeinsam regulierend auf die Transkription kardialer Gene und werden auch im adulten Herzen gebildet (Garg, 2003). Die Familie der GATA Transkriptionsfaktoren ist eine evolutionär konservierte Subfamilie von Transkriptionsfaktoren und besteht aus 6 Proteinen

GATA 1-6 (Chew et al., 2005). Während die Faktoren 1 - 3 die Differenzierung hämatopoetischer Zellen regulieren, werden die Transkriptionsfaktoren GATA-4 und 6 im präkardialen Mesoderm gebildet und sind an der Entwicklung und dem Wachstum des Herzens beteiligt (Brewer und Pizzey, 2006). Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie Hypoxie oder Drucküberbelastung, sowie durch Aktivierung des Sympathikus, kommt es zu einer vermehrten Expression von GATA-4 und darauffolgender Stimulation von ANP, BNP und Bcl-2 (Jiang et al., 2008).

Die gezielte kardiovaskuläre Programmierung pluripotenter embryonaler Stammzellen kann durch Einsatz von MESP1 und Nkx2.5 erreicht werden. Dabei fördert MESP1 die Expression früher und intermediärer Kardiomyozyten sowie kardiovaskulärer Zellmarker wie Flk-1, während Nkx2.5 präferentiell die Differenzierung ventrikulärer Zellen stimuliert, die Expression endothelialer Zelllinien wird dagegen nicht beeinflusst (David et al., 2009). Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass eine subtyp-spezifische Programmierung der pluripotenten Stammzellen möglich ist und bestätigen die molekulare Hierarchie mit einer übergeordneten Funktion von MESP1 und nachgeschalteter Wirkung von Transkriptionsfaktoren wie Nkx2.5 (David et al., 2009).

MEF2c (myocyte enhanced factor-2c) ist essentiell für die Differenzierung aller Muskelzelllinien während der Embryogenese (Edmondson et al., 1994; Morin et al., 2000). Die Deletion des *MEF2c* Gens führt zu einem verkleinerten linken und dem kompletten Verlust des rechten Ventrikels. Eine homozygote Mutation des Gens stellt aufgrund fehlender Organisation vorhandener Endothelzellen und dem Unvermögen der Differenzierung glatter Muskelzellen einen Letalfaktor dar (Lin et al., 1998). Es wird vermutet, dass MEF2c für die frühe Entwicklung des Herzens unerlässlich ist, doch für die spätere Formation nicht benötigt wird (Vong et al., 2005). Dies wird durch Ergebnisse an MEF2c Knockout Zebrafischen bestätigt, bei denen die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-4 und Nkx2.5 nicht beeinflusst wird, während es zu einem dramatischen Abfall der Expression von Sarkomerproteinen und myokardialen Markern kommt (Hinits et al., 2012).

TEAD3 (TEA domain family member 3) ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung des Herzens spielt. Knockout Mäuse zeigen eine abnormale Herzentwicklung, mit vergrößertem Perikard, einer dünnen

Ventrikelwand, einer reduzierten Trabekelanzahl, klinischer Bradykardie und sterben zwischen Tag 11 - 12 der embryonalen Entwicklung (Chen et al., 1994). TEAD3 wird während der Kardiomyogenese stark in kardialer Muskulatur, jedoch nicht in Skelettmuskulatur exprimiert und stimuliert durch Bindung an einen Troponin T Promoter die Expression von Sarkomerproteinen (Azakie et al., 2005). Indes konnte neben der Funktion als Regulator der kardialen Genexpression während der Embryonalentwicklung eine Aktivierung der TEAD3 Expression unter pathophysiologischen Konditionen, wie Hypoxie oder biomechanischem Stress, sowie durch α -adrenerge Stimulation gezeigt werden (Jin et al., 2011; Maeda et al., 2002).

1.6 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren spielen während der Entwicklung des Herzens eine große Rolle. Es ist offensichtlich, dass eine normale Herzentwicklung auf eine koordinierte räumliche und zeitliche Expression einer Vielzahl von Wachstumshormonen und ihrer Rezeptoren angewiesen ist. Eine Störung dieses spezifischen Expressionsmusters durch Zugabe von Hemmstoffen oder Verwendung von transgenen Tieren, führt zu schweren Entwicklungsstörungen, die mit einer erhöhten fetalen und/oder embryonalen Sterblichkeit einhergehen (Price et al., 2003). Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) sind Oberflächenrezeptoren für Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine. Wie der Name vermuten lässt, können diese Rezeptoren Tyrosinreste phosphorylieren. Die Rezeptoren des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), des Fibroblasten-Wachstumsfaktors (FGF) und des Blutplättchen Wachstumsfaktors (PDGF) gehören zur Gruppe der RTK. Durch Bindung des Liganden kommt es zur Dimerisierung und anschließenden Autophosphorylierung des Rezeptorkomplexes, so dass sich weitere Signalmoleküle an die autophosphorylierten Bindungsstellen anlagern können. Zu den Signalmolekülen, die an die phosphorylierten Tyrosinreste binden können, zählen die PI3K, PLC und das Adaptermolekül Grb2, welches zur Aktivierung des MAPK Signalwegs führt (Krauss, 2014). Weiter kann die Aktivierung von PLC durch Bildung von IP3 und DAG, zu einer intrazellulären Freisetzung von Kalzium führen (Streb et al., 1983) und so die Proteinkinase C aktivieren (Krauss, 2014).

VEGF ist sowohl für die Kardiomyogenese, als auch für die Vaskulogenese ein essentieller Faktor. Neueste Forschungen haben gezeigt, dass VEGF vermittelte Signalwege nicht nur die

Vaskulogenese regulieren, sondern über Aktivierung von kardiovaskulären VEGFR2⁺ Progenitorzellen auch die kardiovaskuläre Differenzierung steuern (Bekhite et al., 2011). Die Behandlung von ES-Zellen der Maus mit VEGF führt zu einer Stimulation der Kardiomyogenese über PI3K/AKT (Bekhite et al., 2011) sowie über ERK abhängige Signalwege (Chen et al., 2006). Weiter konnte eine effiziente Differenzierung von Kardiomyozyten aus hiPSC unter anderem durch Behandlung mit VEGF erreicht werden (Ye et al., 2013).

PDGF kann in die vier Isoformen PDGF-A,-B,C und D eingeteilt werden, die sich zu Dimeren zusammenlagern und dann über die Rezeptoren PDGFR α oder - β wirken. PDGFbb stimuliert die Kardiomyogenese in ES-Zellen (Sachinidis et al., 2003b) und fördert die epikardiale Zellmigration durch PI3K vermittelte Signalwege (Mellgren et al., 2008). Homozygot negative PDGFR- β Herzen zeigen schwere kardiale Missbildungen, die mit einem vollständigen Verlust der koronaren, vaskulären, glatten Muskulatur und einem primären Defekt im Epikard einhergehen (Mellgren et al., 2008). Mit PDGFbb behandelte Mäuse- und Rattenembryonen zeigen eine Vergrößerung des Herzens aufgrund einer Zunahme der Myofibrillen und eine vergrößerte Myokardzone mit gut entwickelten Sarkomeren, im Vergleich zur Kontrollgruppe oder mit PDGFaa behandelten Embryonen (Price et al., 2003).

FGF-2 spielt während der Embryogenese sowohl bei der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Richtung kardiogener Zelllinien als auch für die Proliferation des Hämangioblasten, einer Vorläuferzelle von hämatopoetischen und Endothelzellen, eine Rolle (Zhu et al., 2013; Solloway und Harvey, 2003; Lough und Sugi, 2000). FGF-2 wird bei hESC (Sauer et al., 2004) und hiPSC neben BMP4 und Activin-A eingesetzt, um Kardiomyozyten mit einer hohen Reinheit zu generieren (Zhang et al., 2012; BurrIDGE et al., 2011). Weiter scheint die Differenzierung kardialer Vorläuferzellen in reife Kardiomyozyten von der Fähigkeit der Zelle FGF-2 zu bilden, abzuhängen (Rosenblatt-Velin et al., 2005).

Atriales natriuretisches Peptid (ANP) ist ein Polypeptidhormon, das im Vorhof synthetisiert wird und während der embryonalen Entwicklung die Differenzierung von Kardiomyozyten in einem engen zeitlichen und räumlichen Rahmen regelt (Kuwahara und Nakao, 2010). Unter Kontrolle von ANP-EGFP (verstärkt grün fluoreszierendes Protein) stehende Kardiomyozyten zeigen das Vermögen sich sowohl in atriale Zellen als auch in Schrittmacherzellen zu differenzieren (Gassanov et al., 2004). Die Expression von ANP ist erst nach der Geburt

spezifisch für die Vorhöfe, vorher wird ANP sowohl in den Atrien als auch im Ventrikel exprimiert (Zeller et al., 1987).

1.7 Kardiale Gene

Viele kardiale Gene werden in der embryonalen Phase der Herzentwicklung sowohl in den Vorhöfen als auch Ventrikeln exprimiert und beschränken sich erst mit voranschreitender Entwicklung auf eine spezifische Lokalisation. Kardiomyozyten aus ES-Zellen können mit Hilfe der immunhistochemischen Antikörperfärbung gegen das Sarkomer α -Aktinin identifiziert werden, das in Z-Streifen von Myofibrillen der Skelett- und Herzmuskulatur die Quervernetzung der Aktinfilamente vermittelt (Langanger et al., 1984; Lemanski et al., 1980).

β -MHC (β -Myosin heavy chain), auch β -MYH7 genannt, ist im sich entwickelnden Herzen die dominante Isoform. Nach der Geburt wird β -MHC durch α -MHC ersetzt. Beide Gene liegen, durch 4,5 kbp getrennt, auf demselben Chromosom und können in ihrer Expression separat und koordiniert reguliert werden. Der Wechsel von der Isoform β -MHC zu α -MHC scheint zur Aufnahme der Herztätigkeit eine wichtige Rolle zu spielen (Lyons et al., 1990). Weiter steht die Expression von β -MHC unter Kontrolle der Transkriptionsfaktoren MEF-2c, Nkx2.5 und GATA4,5,6 (Kuwahara et al., 2012).

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels (HCN) werden in die vier Isoformen 1 – 4 eingeteilt. Sie werden während der Embryogenese sowohl im ventrikulären Myokard, als auch im Atrium exprimiert. Im adulten Herzen wird HCN4 in Schrittmacherzellen exprimiert und stellt dort die Hauptisoform dar, so dass die Expression auf das Reizleitungssystem und in erster Linie auf den Sinusknoten beschränkt ist (Wahl-Schott und Biel, 2009). Darüber hinaus wird die HCN4 Expression positiv durch den Transkriptionsfaktor MEF2c reguliert (Kuratomi et al., 2009).

Die Herzmuskulatur von Säugetieren enthält 4 verschiedene Formen der MLC (Freed et al., 2011). Die Hauptisoform im Atrium ist MLC1a und MLC2v im Ventrikel. MLC1a wird während der frühen Kardiomyogenese zudem in der fetalen Skelettmuskulatur und im Ventrikel exprimiert (Barton et al., 1988). Die Expression von MLC2a steigt ab Tag 9 post conceptionem kontinuierlich an und ist ab Tag 12 der Entwicklung auf den Vorhof

beschränkt, während die Expression von MLC2v schon relativ früh spezifisch für den Ventrikel ist (Kubalak et al., 1994). Die regionalspezifische Expression von MLC2a und MLC2v während der frühen Embryogenese ist ein genetischer Marker für die Spezialisierung der Kammern in Atrien und Ventrikel.

1.8 Kalzium

Kalzium-Ionen spielen als Signalmoleküle bei Proliferations- und Differenzierungsvorgängen eine wichtige Rolle. Zur Erzeugung eines intrazellulären Kalziumsignals verwenden die meisten Zellen zwei Prinzipien: es kommt zum einen zur Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, zum anderen kann Kalzium von extrazellulär in die Zelle einströmen und so zur Entstehung eines Kalziumtransienten beitragen. Weiter werden bei intrazellulären Speichern zwei funktionell verschiedene Kalziumkanäle, Inositol Triphosphat Rezeptoren (IP3R) und Ryanodin Rezeptoren (RyR), unterschieden. Extrazelluläres Kalzium kann entweder über spannungsabhängige Kalziumkanäle (VOCCs= voltage operated calcium channels) oder über Speicher-gesteuerte Kalziumkanäle (SOCCs= store operated calcium channels) in die Zelle gelangen (Berridge et al., 2000).

Die Kalziumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) wird während der Differenzierung von mES-Zellen hauptsächlich über IP3R moduliert, während der Kalzium-Einstrom über die Plasmamembran in erster Linie über die SOCCs erfolgt. Um die niedrigen intrazellulären Kalziumspiegel zu halten, spielen sowohl der Natrium/Kalzium Austausch (NCX) als auch die Plasma Membran Kalzium Pumpe (PMCA) eine wichtige Rolle. In mES-Zellen wurde mRNA für $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher NCX-1,-2,-3; IP3-Rezeptoren Typ-1,-2,-3 und PMCA-1 und 4 detektiert (Yanagida et al., 2004).

Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie beispielsweise kongestives Herzversagen, Herzklappenfehler, Hypertonie oder Myokardinfarkt, gehen häufig mit einer Erhöhung des CT-1 Plasma Spiegels einher, der mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Jougasaki, 2010; Pemberton, 2007; Talwar et al., 2002; Tsutamoto et al., 2007; Zolk et al., 2002). Ferner ist bekannt, dass intrazelluläre Kalzium Schwankungen an kardialen Dysfunktionen beteiligt sein können, so dass der Einfluss von CT-1 auf die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium von Bedeutung ist. Eine Studie an adulten Kardiomyozyten der Ratte hat gezeigt, dass

Behandlung mit 1 ng/ml CT-1 über 20 - 60 min zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Kalziums, sowie zu einer Verkürzung der Zellen führt (Ruiz-Hurtado et al., 2012). Ferner kommt es unter Behandlung mit CT-1 zur Zellmigration kardialer Fibroblasten, was mit dem Auftreten intrazellulärer Kalzium Signale verbunden ist (Freed et al., 2011).

1.9 Reaktive Sauerstoffspezies

ROS, wie das Superoxid-Anion, das reaktive Hydroxyl-Radikal, Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon und hypochlorige Säure sind aufgrund ihres lokalen Vorkommens, der hohen Diffusionsgeschwindigkeit, der schnellen Synthese und der einfachen Neutralisierung durch zelleigene Antioxidantien ideale Signalmoleküle (Gabbita et al., 2000). Sowohl ROS als auch NO spielen während der frühen Embryogenese eine entscheidende Rolle. Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass ROS über die Aktivierung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen die kardiale Differenzierung stimulieren können. Es wurde gezeigt, dass die kardiovaskuläre Differenzierung von ES-Zellen in einer antagonistischen Beziehung zu dem Auftreten von ROS steht. Während ständige ROS Exposition zu einer Hemmung der Kardiomyogenese führt, so fördern geringe ROS Spiegel die kardiale und vaskuläre Differenzierung (Sauer und Wartenberg, 2005). Obwohl ROS intrazellulär durch verschiedene Quellen, einschließlich Mitochondrien, gebildet werden, ist die membranständige NADPH-Oxidase die primäre Quelle für ROS. Dies erlaubt eine schnelle Regulation intrazellulärer ROS Spiegel. Innerhalb kürzester Zeit können so Signale von der Plasmamembran zum Zellkern weitergeleitet werden. ROS können zum einen direkt mit spezifischen Rezeptoren interagieren oder zum anderen verschiedene Signalmoleküle aktivieren, wie beispielsweise Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und Transkriptionsfaktoren. Weiterhin wirken ROS und intrazelluläres Kalzium zusammen in Signalkaskaden zur Steuerung der Zellproliferation, des Zellzyklus und des Zelltodes. Das intrazelluläre Zusammenspiel zwischen Oxidations- und Reduktionsäquivalenten ermöglicht die Funktion als sekundärer Botenstoff, der in Differenzierungsvorgänge involviert ist (Sauer et al., 2001b). Neueste Forschungen konnten zeigen, dass verschiedene Zytokine, wie IL-10 und IL-18, ihre kardiogenen Effekte über die Regulation intrazellulärer ROS vermitteln (Law et al., 2013).

1.10 Stickstoffmonoxid

Man unterscheidet nach Vorkommen und Wirkungsweise 3 NO-Synthasen (NOS): neuronale NOS (nNOS), induzierte NOS (iNOS) und endotheliale NOS (eNOS), die aus der Aminosäure L-Arginin NO generieren. Im sich entwickelnden Herzen des Embryos werden vorrangig die Isoformen iNOS und eNOS exprimiert (Bloch et al., 1999). Eine Exposition von ES-Zellen gegenüber NO führt sowohl zu einer Erhöhung der Anzahl und Größe kontrahierender Areale, als auch zur Expressionssteigerung kardialer Gene (MLC, Troponin I) und mRNA (MLC2v, Nkx2.5) (Kanno et al., 2004). Durch Verwendung von NO-Synthase Inhibitoren kann eine verzögerte Kardiomyogenese beobachtet werden (Bartsch et al., 2011; Bloch et al., 1999). Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass CT-1 die NOS hochreguliert, was in Zusammenhang mit dem blutdrucksenkenden Effekt von NO stehen könnte, der bei Ratten beobachtet wurde (Hamanaka et al., 2000; Jin et al., 1998). Bisherige Arbeiten legen nahe, dass NO und ROS Signalwege in einer engen Beziehung zum Auftreten von Kalzium Signalen stehen (Ji et al., 1999; Sauer et al., 2001b).

1.11 Kerntranslokation

Obwohl bereits einiges Wissen über die intrazellulären Signalkaskaden von CT-1 besteht, ist bislang nichts über die Bedeutung der endogenen, intrazellulären CT-1 Expression für die Wirkungsweise des exogenen CT-1 bekannt.

Es wird allgemein angenommen, dass hydrophile Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren außerhalb der Zelle verbleiben. Sie binden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und aktivieren so nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden, die meistens mit einer enzymatischen Reaktion, wie der Phosphorylierung von Bindungsstellen für weitere Signalmoleküle, einhergehen. Es besteht die zunehmende Evidenz, dass einige der Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone nach externer Zugabe in den Zellkern transloziert werden und in einer intrakrinen Art und Weise auf die Gentranskription wirken (Olsnes et al., 2003). Intrazelluläres IL-1 α bewirkt beispielsweise die Regulation der Zellproliferation, -Migration und -Alterung (Werman et al., 2004).

Des Weiteren können Proteine, die kleiner als 50 kDa sind, passiv durch die Kernporen gelangen (Macara, 2001). Größere Proteine werden aufgrund ihrer Kernlokalisationssequenz

(NLS) erkannt und aktiv durch die Kernporen transportiert. Indes sind die zugrundeliegenden Mechanismen bei fehlender NLS nicht vollständig geklärt. Die Translokation in den Zellkern wurde bisher für die Wachstumsfaktoren VEGF (Li und Keller, 2000) und FGF (Imamura et al., 1992; Sano et al., 1990) gezeigt, sowie für verschiedene Zytokine, die zur Interleukin-1 Familie gehören, wie IL-1 α (Grenfell et al., 1989; Hu et al., 2003), IL-33 und IL-37 (Ross et al., 2013), IL-5 (Jans et al., 1997) und Interferon γ (MacDonald et al., 1986). Im Falle von aFGF kann die Translokation bei einer externen Konzentration von 10 ng/ml visualisiert werden. Sie ist partiell charakterisiert durch die Beteiligung des Rezeptors und endozytotischen Vesikeln und zeigt zudem eine Abhängigkeit von der Aktivierung der PI3K (Olsnes et al., 2003).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass IL-33, das zur IL-1 Zytokinfamilie gehört, seine Wirkung in erster Linie im Kern entfaltet und erst bei Zelldefekten, über Bindung an den zugehörigen Rezeptor auf der Zelloberfläche, als Alarmsignal fungiert (Ali et al., 2010). Des Weiteren wird eine autokrine Wirkung von IL-6 vermutet, aufgrund der Beobachtung, dass neutralisierende Ak den proliferativen Effekt von IL-6 nicht hemmen konnten, während dies erfolgreich durch Anwendung von Antisense Nukleotiden erreicht wurde (Lu und Kerbel, 1993; Roth et al., 1995).

1.12 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl bereits einiges Wissen über die intrazellulären Signalkaskaden von CT-1 etabliert wurde, besteht keine Kenntnis über den Einfluss der endogenen intrazellulären CT-1 Expression auf intrazelluläre Signalkaskaden welche durch exogen, an den gp130/LIFR bindendes, CT-1 ausgelöst werden. Neue Forschungen konnten erfolgreich demonstrieren, dass Mitglieder der IL-1 Familie, nicht nur in der Lage sind an ihre zugehörigen Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu binden, sondern durch Translokation in den Zellkern intrazellulär in der produzierenden Zelle wirken und möglicherweise an der Regulation der Genexpression beteiligt sind (Ross et al., 2013). Ob exogenes CT-1 seine intrazelluläre Signalwirkung über eine Translokation von zellulärem CT-1 in den Zellkern ausüben könnte, wurde bislang noch nicht untersucht. Weiterhin ist unbekannt, inwiefern CT-1 die Expression von anderen prokardiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF-bb, FGF-2 und ANP zur Stimulation der Kardiomyogenese reguliert. Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um die Bedeutung

von CT-1 auf die Kardiomyogenese und die Regulation kardiogener Wachstumsfaktoren zu untersuchen. Hierbei wurden Schwerpunkte auf die Untersuchung des Einflusses intrazellulärer Kalziumsignale, ROS und NO auf die Translokation von CT-1 in den Zellkern, gelegt.

Ein weiterer Teil der Doktorarbeit befasst sich mit dem Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Kardiomyogenese von ES-Zellen der Maus. Es wird vermutet, dass niedrige Sauerstoffspiegel während der frühen Embryogenese über Hypoxie regulierte Transkriptionsfaktoren erste Differenzierungsvorgänge initiieren (Simon und Keith, 2008). Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten der Ratte konnten ferner zeigen, dass CT-1 kardioprotektiv wirkt und sowohl bei Gabe vor der schädigenden Ischämie, als auch bei Verabreichung während der Reoxygenierung die Zellen erfolgreich vor Reoxygenierungsschäden schützt (Brar et al., 2001a). Daher ergibt sich die Fragestellung, ob es unter dem pathologischen Zustand der Reoxygenierung zu einer Reaktivierung intrazellulärer prokardiogener Signalkaskaden kommt, die normalerweise ausschließlich während der frühen Embryogenese aktiv sind. In der vorliegenden Doktorarbeit soll folglich der Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf die Expression von CT-1, kardiogener Wachstumsfaktoren, kardialer Gene und die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden untersucht werden.

Im Einzelnen wurden die folgenden Themen untersucht.

1. Welchen Einfluss hat CT-1 auf die Generierung intrazellulärer Signalmoleküle?
2. Wird CT-1 in den Zellkern transloziert?
3. Welche Signalmoleküle vermitteln die Kerntranslokation von CT-1?
4. Welchen Einfluss hat CT-1 auf die Expression von Wachstumsfaktoren, kardialen Transkriptionsfaktoren und kardialen Genen?
5. Wird die Kardiomyogenese durch CT-1 stimuliert?

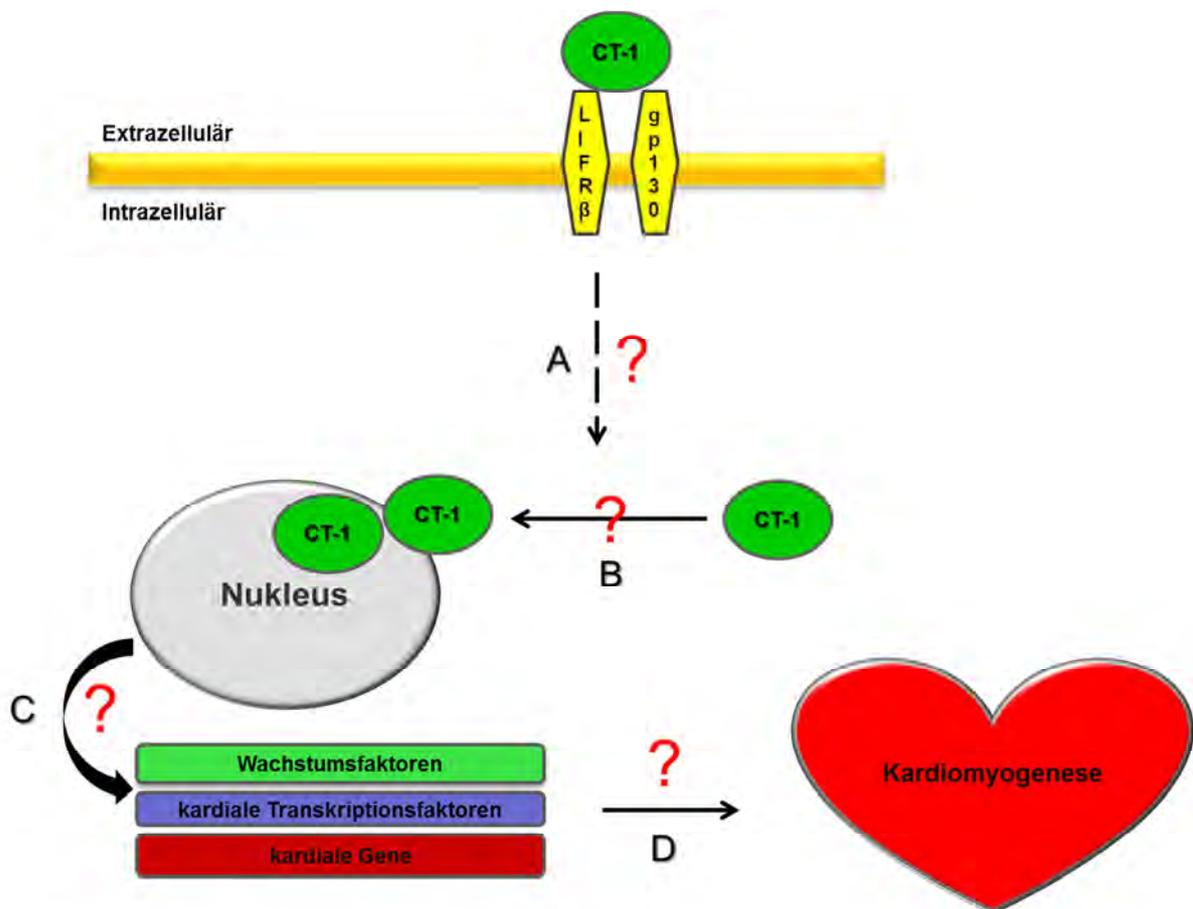


Abb.1.12.1: Zielsetzung der Arbeit: A) Kommt es unter Behandlung mit exogenem CT-1 zur Freisetzung intrazellulärer Signalmoleküle? B) Wird CT-1 in den Kern transloziert? C) Wie beeinflusst CT-1 die Expression von Wachstumsfaktoren, kardialen Transkriptionsfaktoren und kardialen Genen? D) Stimuliert CT-1 die Kardiomyogenese in ES-Zellen der Maus?

6. Wird CT-1 unter Hypoxie/Reoxygenierung vermehrt exprimiert?
7. Wie beeinflusst Hypoxie/Reoxygenierung die Expression von Signalmolekülen, Phosphoproteinen, Wachstumsfaktoren und kardialen Genen?
8. Wird CT-1 unter Hypoxie/Reoxygenierung in den Kern transloziert?
9. Wird die Kardiomyogenese durch Hypoxie/Reoxygenierung stimuliert?
10. Stimuliert chronische Hypoxie die Kardiomyogenese?

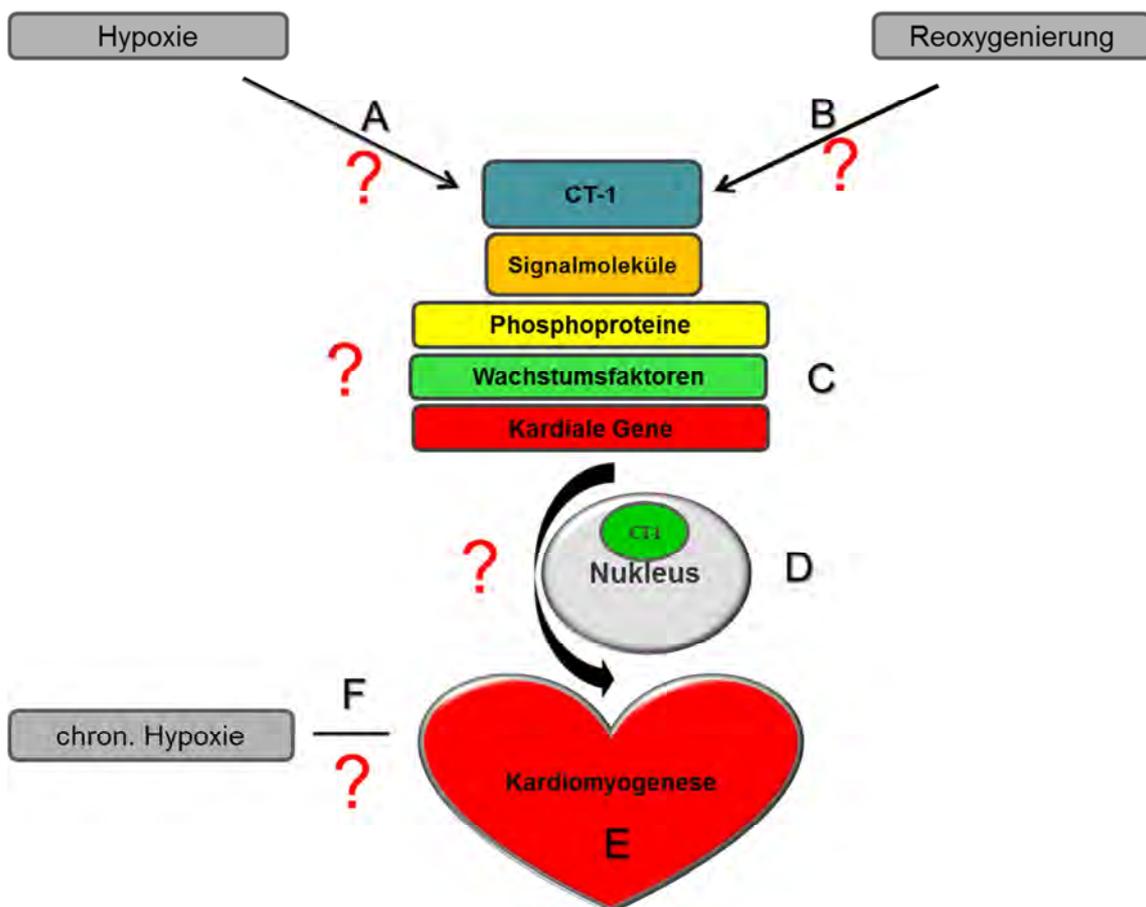


Abb.1.12.2 Zielsetzung der Arbeit: A,B) Kommt es unter Hypoxie/Reoxygenierung zu einer vermehrten Expression von CT-1? C) Wie beeinflusst Hypoxie/Reoxygenierung die Expression von Signalmolekülen, Phosphoproteinen, Wachstumsfaktoren und kardialen Genen? D) Kommt es unter Hypoxie/Reoxygenierung zu einer Translokation von CT-1 in den Zellkern? E) Stimuliert Hypoxie/Reoxygenierung die Kardiomyogenese? F) Stimuliert chronische Hypoxie die Kardiomyogenese?

2. Material

2.1 Firmen

Abcam plc	Cambridge, UK
Acris Antibodies GmbH	Herford, Deutschland
Ambion® by Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
BD-Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
Biochrom	Berlin, Deutschland
Biometra	Göttingen, Deutschland
BioSpherix	Demott, St. Lacona, USA
Biotec Fischer	Reiskirchen, Deutschland
Bio Vendor	Heidelberg, Deutschland
BioVision	Milpitas, USA
Biozol	Eching, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Gilson International	Limburg, Deutschland
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Hanna Instruments	Kehl am Rhein, Deutschland
Heidolph Elektro GmbH	Schwabach, Deutschland
Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
Integra Biosciences (IBS)	Fernwald, Deutschland
Invitrogen® by Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Labnet International	Windsor, Berkshire, UK
Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
Life Technologies™	Darmstadt, Deutschland
Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Mettler-Toledo	Giessen, Deutschland
New England Biolabs GmbH (NEB)	Frankfurt, Deutschland
PAA	Cölbe, Deutschland
PeQLab	Erlangen, Deutschland
R&D Systems	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland

Santa Cruz Biotechnology Inc.
Sarstedt Inc.
Sigma (-Aldrich)
Synaptic System
Tecan Deutschland GmbH
Thermo Fisher Scientific
Whatman™ GE Healthcare Life Sciences
Zeiss

Heidelberg, Deutschland
Nümbrecht, Deutschland
Taufkirchen, Deutschland
Göttingen, Deutschland
Crailsheim, Deutschland
Dreieich, Deutschland
Freiburg, Deutschland
Jena, Deutschland

2.2 Geräte und Laborbedarf

Bakteriologische Schalen	Greiner Bio-One
Cellspin Rührsystem	IBS
Deckgläschen	Roth
ECL	PeQLab, Chemi-Capt-50001
ELISA	Tecan Magellan Infinite M200
Feinwaage	Mettler Toledo
Falcons 15 und 50ml	Greiner bio-one Cellstar® tubes
Filterpapier	Biotec Fischer Universal Trockenpapier
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen, XCell Sure Lock
Heizblock	Biometra TB2 Thermoblock
Homogenisator	Pellet Pestle® Motor, Sigma
Hypoxiekammer	BioSpherix, C-Chamber-C 274
Inkubatoren	Thermo Fisher Scientific HERAccl® 240, HERAccl® 150
Immersionsöl	Leica Microsystems
konfokales Lasermikroskop	LeicaMicrosystems, DM-IRE2
Lichtmikroskop	Zeiss Axiovert 40C
Mischer	Heidolph
Neon™ Transfection System Model MPK5000	Invitrogen® by Life Technologies
pH-Meter	Sartorius, HANNA Instruments
Pipetten	Glaspipette von Roth Sterile Einmalpipetten von Becton Dickinson
Sauerstoffregulator	BioSpherix, ProOxP110 Single Setpoint Controller
Sauerstoffsensord	BioSpherix, E702 Oxygen Sensor
Schüttler	Labnet International Edmund Bühler Typ KL2 Stuart mini see-saw-rocker SSM4

Spinnerflaschen	IBS, Cellspin250
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific Type HSP18
Transfermembran	Whatman™ GE Healthcare Life Sciences
Wasserbad	Hirschmann
Zellkulturplatten	BD
Zentrifugen	Thermo Fisher Scientific Multifuge 15-R centrifuge Thermo Fisher Scientific Laborfuge300 Eppendorf 5417C

2.3 Chemikalien

AG490	Merck Millipore
AG1296	Merck Millipore
Bapta-AM	Merck Millipore
β-Mercaptoethanol	Sigma
Cardiotrophin-1	BioVendor
DAF-FM Diacetate	Life Technologies™
DMEM	Merck Millipore
DMSO	Merck Millipore
DRAQ5 (Kernfärbung 650)	NEB
Dulbecco`s 1x PBS ohne Ca ²⁺ & Mg ²⁺	PAA
ESGRO® LIF	Chemicon
Fetales Kälber Serum (FKS)	Sigma
Fluo-4-AM (Kalzium Indikator)	Life technologies™
Fluoromount-G™	Biozol
L-Glutamine 200mM (100x)	PAA
Glycerol	Sigma
IMDM (Basal Iscove`s Medium)	Biochrom
KH ₂ PO ₄	Roth
Luminol	Sigma
LY294002	Merck Millipore
Magermilchpulver	AppliChem
MEM (50x) Aminosäuren	Biochrom
Mitomycin-C	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth

Natriumpyruvat (100mM)	Biochrom
NaOH	Roth
NEA (100x)	Biochrom
N-(2-mercaptoethyl)glycine (NMPG)	Sigma
Neon® Transfection System 100µl Kit MPK1096	Life technologies™
N-Nitro-Larginine Methyl Ester, Hydrochlorid (L-NAME)	Merck Millipore
Nonidet P-40	AppliChem
Novex® Sharp Pre-Stained Proteinstandard	Life Technologies™
Nupage® Antioxidant	Life Technologies™
Nupage® MES SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies™
Nupage® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies™
Nupage® 4-12% Bis-Tris Gel 1mm	Life Technologies™
Nupage® Sample Reducing Agent (10x)	Life Technologies™
Nupage® Transfer Puffer (20x)	Life Technologies™
p-Coumaric acid	Sigma
PD98059	Merck Millipore
Penicillin /Streptomycin (100x)	PAA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma
Ponceau S	AppliChem
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Restore™ Western Blot Stripping Puffer	Thermo Fisher Scientific
Sigmacote	Sigma
Silencer® Select Pre-designed Ctf1 siRNA	Ambion® by life Technologies™
SKF86002	Merck Millipore
SU5614	Merck Millipore
SU5402	Merck Millipore
Sytox Green Kernfärbung	Life Technologies™
Tris	Roth
Triton® X-100	Sigma
Trypsin EDTA (1x)	Life T USA, Technologies™
Tween-20	Sigma
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma

2.4 Antikörper

Primäre Ak	Firma	Tier	K Immunhisto- chemie	K Westernblot	kDa
Anti- α -Aktinin	Abcam	Maus	1:100	1:1000	107
Anti-ANP	Santa Cruz	Kaninchen		1:500	17
Anti- β -Actin	Merck Millipore	Kaninchen		1:1000	45
Anti-CT-1	R&D Systems	Ratte	1:50	1:500	21
Anti-FGF-2	Merck Millipore	Maus		1:1000	17
Anti-GATA-4	Merck Millipore	Kaninchen		1:1000	44
Anti-HCN4	Abcam	Maus		1:1000	129
Anti-MEF2c	Santa Cruz	Ziege		1:500	42
Anti-MLC1a	Abcam	Maus		1:1000	47
Anti-MLC2a	Synaptic system	Maus		1:1000	19
Anti-MLC2v	Synaptic system	Maus		1:1000	24
Anti-MYH7	Santa Cruz	Maus		1:500	229
Anti-Nkx2.5	Abcam	Kaninchen		1:1000	72
Anti-PDGFB	Bio Vision	Kaninchen		1:500	18
Anti-p-AKT	NEB	Kaninchen		1:500	60
Anti-p-JAK2	Santa Cruz	Ziege		1:500	128
Anti-p-enos	NEB	Kaninchen		1:1000	140
Anti-p-PI3K	NEB	Kaninchen		1:1000	60/85
Anti-p-STAT-3	NEB	Kaninchen		1:1000	86
Anti-TEAD3	Abcam	Kaninchen		1:1000	49
Anti-VEGF	NEB	Kaninchen		1:500	19-22
Anti-VEGFR2	NEB	Kaninchen		1:1000	230
Anti-Vinculin	Sigma	Maus		1:1000	110

Sekundäre Ak

Alexa 488 anti Ratte	Life Technologies™	Esel	1:100		
Cy3 anti Maus	Sigma	Schaf	1:100		
Cy5 anti Maus	Sigma	Schaf	1:100		
HRP anti Kaninchen	NEB	Ziege		1:1000	
HRP anti Maus	NEB	Pferd		1:1000	

HRP anti Ratte	NEB	Ziege	1:1000
HRP anti Ziege	NEB	Kaninchen	1:1000

2.5 Puffer

10x PBS		26,0 mM	KCl
		14,7 mM	KH ₂ PO ₄
		1,4 mM	NaCl
		64,6 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
			in 1 Liter Aqua bidest lösen und pH mit HCl auf 7,4 einstellen
1x PBS	100 ml		10x PBS
	+ 900 ml		Aqua bidest
0,1% PBST	999 ml		1x PBS
	+ 1 ml	0,1%	Triton X-100
0,01% PBST	999 ml		1 x PBS
	+ 0,1 ml	0,01%	Triton X-100
Blockierungs Lösung (Immunhistochemie)	1ml	(10%)	FKS
	+ 9 ml		0,01% PBST
10 x TBS		0.5 mM	Tris
		0.6 mM	NaCl
			In 1 Liter Aqua bidest lösen, pH mit HCl auf 7,54 einstellen
0,1% TBST	100ml		10 x TBS
	+ 900ml		Aqua bidest
	+ 1 ml	0,1%	Tween-20
Blockierungs Lösung (Westernblot)	100 ml		0,1% TBST
	+ 5 g	5%	Magermilchpulver
RIPA-Puffer		50 mM	Tris, pH 7.4
		150 mM	NaCl
		1,0 %	Nonidet P-40
		0,5 %	SDS Natriumdesoxycholat
			In Aqua bidest (bidest) lösen, pH mit HCl auf 7,4 einstellen
Lysis-Puffer für Proteine	1 ml		RIPA
	+ 2 µl	0,2 %	Protease Inhibitor Cocktail (500x)
Lysis-Puffer für Phosphoproteine	1ml		RIPA (ohne Desoxycholat)
	+ 2 µl	0,2 %	Protease Inhibitor Cocktail (500x)
	+ 10 µl	1,0 %	Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)
	+ 10 µl	1 mM	EDTA (40 mM, pH 8)
	+ 25 µl	1 mM	Glycerophosphat (100 mM)

2.6 Medien

Nährmedium zum Erhalt der undifferenzierten Stammzellen „LIF Medium“	8,0 %	Basal ISCOVE'S Medium
	8,0 %	FKS
	0,1 mM	hitzeinaktiviertes FKS
	1,0 mM	β-Mercaptoethanol
	0,1 mM	Natrium-Pyruvate (100 mM)
	2,0 mM	NEA (100x)
	2,5 µg/ml	Glutamin (200 mM)
	1000U/ml	Plasmocin (25mg/ml) Lif (10 ⁷ units)
Differenzierungsmedium der Embryonalkörperchen „CCE-Medium“	15,6 %	Basal ISCOVE'S Medium
	0,1 mM	FKS
	1,0 mM	β-Mercaptoethanol
	0,1 mM	Natrium-Pyruvate (100 mM)
	2,0 mM	NEA (100x)
	0,4 %	Glutamin (200 mM) Pen/Strep (100x)
Nährmedium der Fibroblasten „MEF-Medium“	10,4 %	DMEM
	2,0 mM	hitzeinaktiviertes FKS
	0,1 mM	Glutamin (200mM)
	0,4 %	NEA (100x) Pen/Strep (100x)
Einfriermedium	72%	jeweiliges Nährmedium
	20%	hitzeinaktiviertes FKS
	8%	DMSO

2.7 Hemmstoffe

Zur Untersuchung des Einflusses von Signalmolekülen und Transduktionskaskaden auf die Kardiomyogenese werden EBs von Tag 4 - 7 mit spezifischen Hemmstoffen, in den angegebenen Konzentrationen, inkubiert und im Anschluss die Proteinexpression von Signalmolekülen, Wachstumsfaktoren, kardialen Transkriptionsfaktoren und kardialen Genen mittels Western Blot untersucht.

Bezeichnung	Inhibitor:	Konzentration	gelöst in	MW
AG490	JAK-2	25 µM	DMSO	294.3
BAPTA-AM	Kalzium Chelator	10-25 µM	DMSO	764.7
NMPG	Radikalfänger	100 µM	DMSO	163.2
L-NAME	NO-Synthase	50 µM	Aqua bidest	269.7
LY294002	PI3K	40 µM	DMSO	307.4
PD98059	ERK1/2	100 µM	DMSO	267.3
SKF86002	P38 MAPK	10 µM	DMSO	297.4

Tabelle 2.7: Übersicht der Hemmstoffe und verwendeten Konzentrationen

Zur Überprüfung des Einflusses des Hemmstoffes werden diese alleine, sowie in Kombination mit CT-1 eingesetzt. Dabei erfolgt die Vorinkubation der EBs mit den Hemmstoffen jeweils 1 h vor Behandlung mit CT-1. Ebenso wird dies bei Behandlungen mit Hypoxie durchgeführt. Auch hierbei werden die Zellen jeweils 1 h vor Versuchsbeginn mit den entsprechenden Hemmstoffen vorinkubiert; die Proteinextraktion erfolgt direkt im Anschluss.

2.8 Substanzen

2.8.1 DCFH-DA

DCFH-DA ist eine apolare, nichtfluoreszierende, zellpermeable Substanz und dient als Indikator für verschiedene reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Nach Diffusion in die Zelle wird das Diacetat des Farbstoffs von intrazellulären Esterasen abgespalten. Das entstehende polare DCFH ist nichtfluoreszierend und zellimpermeabel und wird durch intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies zur fluoreszierenden Form DCF oxidiert (Bass et al., 1983).

Die Fluoreszenzintensität, die bei 488 nm Wellenlänge angeregt wird, dient dabei als Indikator für die intrazelluläre Menge an ROS. Die Fluoreszenzemission wird bei einer Wellenlänge von 540 nm detektiert.

2.8.2 DAF-FM

Der Fluoreszenzmarker DAF-FM Diacetat ist ein Indikator zur Messung von intrazellulärem Stickstoffmonoxid. Aufgrund des zellpermeablen Diacetats kann DAF-FM passiv über die Zellmembran in die Zelle diffundieren. Einmal in der Zelle angelangt, wird das Diacetat von zelleigenen Esterasen abgespalten, das entstehende Produkt DAF-FM ist schwach fluoreszierend. Es kann die Zelle nicht mehr verlassen und reagiert in Gegenwart von Stickstoffmonoxid zum stark fluoreszierenden Benzotriazolderivat, welches bis zu 160-fach stärker fluoreszieren kann als DAF-FM (Kojima et al., 2001). Das Excitationsmaximum des Farbstoffs liegt bei 495 nm, das Emissionsmaximum bei 515 nm Wellenlänge.

2.8.3 Fluo-4-AM

Zur Sichtbarmachung (Imaging) von intrazellulären Kalziumtransienten wird der zellpermeable Farbstoff Fluo-4-AM verwendet. Fluo-4-Acetoxymethylester diffundiert in die Zelle, in der zelleigene Esterasen AM abspalten. Zum einen kann der Farbstoff nun die Zelle nicht mehr verlassen, zum anderen ist die Hydrolyse notwendig um den Farbstoff zur Kalziumbindung zu befähigen. Die Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Menge an gebundenem Kalzium und daher für quantitative Messungen geeignet (Gee et al., 2000). Fluo-4-AM wird zur Quantifizierung von Kalziumkonzentrationen im Rahmen von 100 nM bis 1 μ M verwendet. Das Absorptionsmaximum des grünfluoreszierenden Fluo-4 liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 516 nm.

2.8.4 Cardiotrophin-1

Das in vitro Experimenten eingesetzte CT-1 wurde von der Firma Bio Vendor bezogen (Katalognummer: RD172026100). Es handelt sich um rekombinantes humanes CT-1, das mit einer Reinheit von >90% in *Escherichia coli* hergestellt wurde. Es besitzt einen Endotoxingehalt von < 0,1ng/ μ g Protein. Pennica konnte zeigen, dass CT-1 keine Spezifität besitzt. Sowohl humanes als auch das CT-1 der Maus binden an den LIFR beider Zelllinien (Pennica et al., 1996).

3. Methoden

3.1 Stammzellkultur

3.1.1 Zellkultur embryonaler Stammzellen der Maus

Die in der Arbeit verwendeten Mausstammzellen mit der Bezeichnung CCE-S103 (Robertson et al., 1986) benötigen zum Erhalt ihrer Stammzeleigenschaften eine Unterlage aus mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblastenzellen der Maus (MEFs), den sogenannten „Feedern“. Diese Ammenzellen, welche die Stammzellen mit Nährstoffen versorgen, bilden das Zytokin LIF (Hu et al., 2003), das sie in einem undifferenzierten Stadium hält. Das zusätzlich zum Medium hinzugefügte LIF verstärkt diesen Effekt. Die Stammzellen werden in einem Rhythmus von 2 - 3 Tagen passagiert, wobei sie jeweils auf neue MEFs umgesetzt werden. In der Spinnerflaschenkultur, in Abwesenheit von LIF, bilden sie kleine, kugelförmige, dreidimensionale Strukturen, die sogenannten Embryonalkörperchen (EBs).

3.1.2 Kultivierung von Fibroblasten

MEFs werden in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt. Zum Auftauen wird ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C verwendet. Die im Einfriermedium enthaltenen Zellen werden mit 20 ml MEF-Medium gewaschen und anschließend in einer Dichte von 9×10^4 Zellen auf Gewebekulturschalen ausplattiert. Anschließend werden sie im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95% mit MEF-Medium kultiviert, bis sie zu 80% konfluent sind. Um ein Weiterwachsen der MEFs zu verhindern, werden sie mit dem Mitosehemmstoff Mitomycin C inaktiviert. Dies ist notwendig, damit die schnell proliferierenden MEFs nicht die langsamer wachsenden Stammzellen überwachsen. Mitomycin C wird aus dem Bakterium *Streptomyces caespitosus* gewonnen. Das antibiotisch wirkende Zytostatikum bindet an DNA-Stränge und verhindert so deren Dissoziation und in der Folge die Replikation der Zellen (Verweij und Pinedo, 1990).

Die MEFs werden für 3 h mit mitomycinhaltigem MEF-Medium, in einer Konzentration von 10 µg/ml, bei 37°C, 5%CO₂, im Dunkeln inkubiert und in drei aufeinanderfolgenden Waschschrinen mit MEF-Medium von Mitomycin befreit. Die so mitotisch inaktivierten Feeder-Zellen können nun als Wachstumsgrundlage für die Stammzellen dienen. Das

Medium wird alle 2 Tage gewechselt. Bis zur Verwendung können die Feeder maximal eine Woche aufbewahrt werden.

3.1.3 Kultivierung der embryonalen Stammzellen auf MEFs

Die in dieser Arbeit verwendete ES-Zelllinie CCE-S103 (Robertson et al., 1986) wird in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt. Die ES-Zellen werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 15 ml CCE-Medium gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 209g) wird das entstandene Pellet in 200 μl CCE-Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf die vorbereiteten mitotisch inaktivierten MEFs gegeben. Das Nährmedium der Stammzellen enthält zur Verhinderung der spontanen Differenzierung das Zytokin LIF (1000 U/ml). Die Zellen werden im Inkubator bei 37°C , 5% CO_2 und einer relativen Luftfeuchte von 95% in der Regel für 2-3 Tage kultiviert, bis sie eine Konfluenz von circa 70% erreichen. Dabei wachsen die Stammzellen in charakteristischen Kolonien, wie in Abb.3.1.3 (rechts) zu sehen ist.

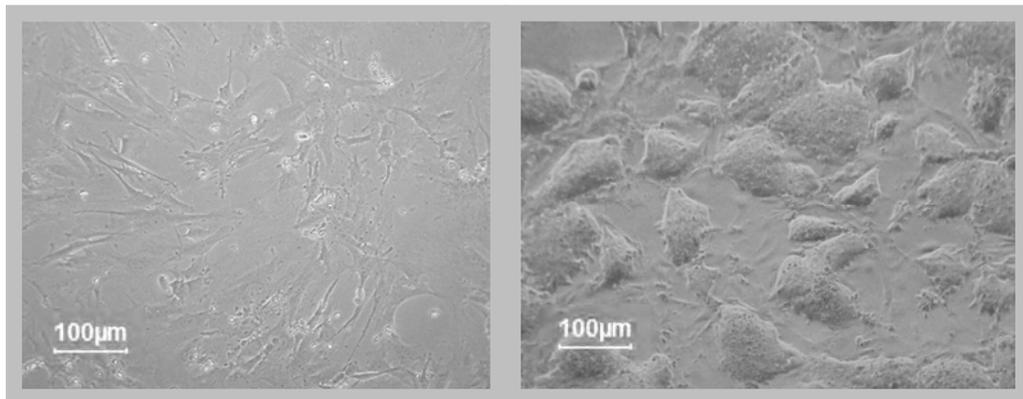


Abb.3.1.3 subkonfluente Feederzellen (links), Kolonien von CCE Stammzellen (rechts).

3.1.4 Passagieren der Stammzellen und Präparieren einer Spinnerflasche

Die mES-Zellen werden alle 2-3 Tage passagiert, das heißt ein Teil der Zellen wird auf neue, mitotisch inaktivierte MEFs umgesetzt. Dies ist notwendig, da eine zu hohe Dichte zu pH-Wert-Veränderungen, Stress und ungewollten Differenzierungsprozessen führt. Zum Entfernen des Mediums werden die Zellen zunächst mit 2 ml Trypsin/EDTA gewaschen und anschließend mit weiteren 2 ml für circa 3 min bei 37°C inkubiert, so dass sich die ES-Zellkolonien von der Gewebekulturschale ablösen und mit einer Pipette vorsichtig vereinzelt werden können. Je nach Dichte der Stammzellkultur werden 100-200 μl der Zellsuspension

auf eine vorbereitete Schale mit MEFs und LIF-haltigem Medium umgesetzt. In der Folge wird die Trypsin-Reaktion der verbleibenden Stammzellen mit 6 ml CCE-Medium abgestoppt und die Zellen in die mit 125 ml CCE-Medium vorbereitete Spinnerflasche überführt.

Die Kultivierung der ES-Zellen in Spinnerflaschen erfolgt im Inkubator bei 37°C, 5,3% CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95%. Für eine optimale Durchmischung des Mediums mit Nährstoffen, CO₂ und zur Formung der EBs, bewegen sich zwei Magnetrührarme mit einer Geschwindigkeit von 20 Umdrehungen pro Minute und je einem Richtungswechsel nach vier Umdrehungen. Zusätzlich zum Rotieren der Magnetrührarme verhindert eine Silikonschicht, mit der die Spinnerflaschen ausgekleidet werden, eine Adhärenz der Zellen. Täglich erfolgt ein Mediumwechsel mit 125 ml CCE-Medium. Die Deckel der Flaschen werden leicht aufgedreht, um einen Gasaustausch mit der Umgebungsluft zu gewährleisten.

Aufgrund der ausgeprägten Affinität der ES-Zellen zueinander, bilden diese in den Spinnerflaschen dreidimensionale, kugelförmige Aggregate, die sogenannten Embryonalkörperchen (EBs). Die Kultivierung der ES-Zellen in Differenzierungsmedium und das Fehlen des Zytokins LIF befähigt die Stammzellen zur Differenzierung in die Zelltypen der drei Keimblätter, wie beispielsweise Endothel-, Blut-, Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen. Zur Versuchsdurchführung werden die EBs an Tag 4 aus den Spinnerflaschen entnommen und entweder direkt zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen genutzt oder abhängig von der Fragestellung in bakteriologischen oder Gewebekulturschalen unter Behandlung mit verschiedenen Substanzen und täglichem Mediumwechsel inkubiert.

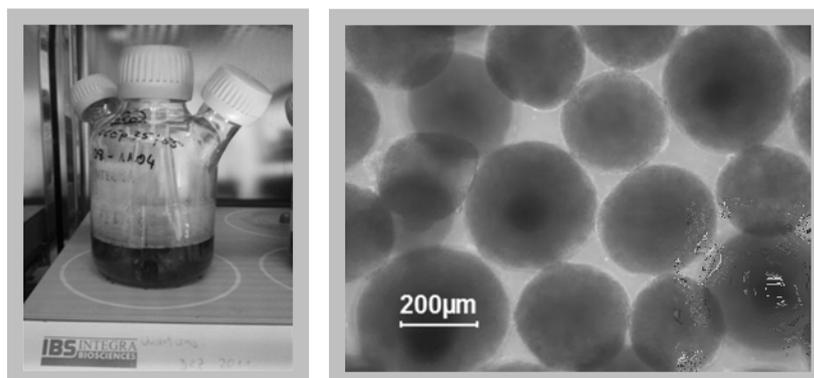


Abb. 3.1.4: Cellspin Spinnerflaschensystem (links) und Lichtmikroskopische Aufnahme der EBs an Tag 4 der Differenzierung (rechts).

3.1.5 Einfrieren der ES-Zellen

Zum Einfrieren müssen die Stammzellen eine ausreichende Konfluenz aufweisen. In der Folge werden sie, ähnlich des Passagier-Schrittes, mit 2 ml Trypsin/EDTA vereinzelt und die Trypsinreaktion mit CCE-Medium gestoppt. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 209g) wird das Pellet in Einfriermedium resuspendiert, in vorgekühlten Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren und nach 24 h zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2 Behandlung mit CT-1, physiologischer Hypoxie und Reoxygenierung

Um den Einfluss von CT-1, physiologischer Hypoxie (1% O₂) und Reoxygenierung auf die Stimulation der Kardiomyogenese zu untersuchen, werden die EBs nach folgendem Schema behandelt:

Substanz	Konzentration	Dauer der Behandlung	Auswertung
CT-1	1 - 50 ng/ml	Tag 4 - 7	kardiale Transkriptionsfaktoren Wachstumsfaktoren
CT-1	1 - 50 ng/ml	Tag 4 - 10	kontrahierende Areale kardiale Gene
Hypoxie	1% O ₂	Tag 4	Wachstumsfaktoren Signalmoleküle
Hypoxie/ Reoxygenierung	1% O ₂	Tag 4 bis Tag 10	schlagende Areale und kardiale Gene Tag 10
Chronische Hypoxie	1% O ₂	Tag 4 - 10	kardiale Gene
Reoxygenierung	1% O ₂	Tag 4	Wachstumsfaktoren

Tabelle 3.2.1: Behandlungsschema mit CT-1, Hypoxie, H/R und Reoxygenierung.

3.2.1 Behandlung mit CT-1

EBs werden an Tag 4 der Differenzierung in bakteriologischen Schalen oder Zellkulturschalen für die in der Tabelle angegebenen Zeiten mit Konzentrationen von 1 - 50 ng/ml CT-1 behandelt und im Anschluss eine Proteinextraktion durchgeführt. Während zur Untersuchung von Wachstumsfaktoren und kardialen Transkriptionsfaktoren die

Behandlungsdauer 3 Tage beträgt (Tag 4 - 7), werden die Zellen zur Untersuchung von kontrahierenden Arealen und kardialen Genen von Tag 4 - 10 behandelt.

3.2.2 Behandlung mit Hypoxie und Reoxygenierung

Um die Auswirkung von Hypoxie auf die Kardiomyogenese zu bestimmen werden, zur Bestimmung von Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen, EBs an Tag 4 der Differenzierung für einen Zeitraum von 2 bis 24 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert und die Proteine im Anschluss extrahiert. Zur Untersuchung der kardialen Genexpression werden EBs zum einen für einen Zeitraum von 2 bis 24 in einer Atmosphäre von 1% O₂ inkubiert, anschließend in normoxe Bedingungen überführt und die Proteine an Tag 10 isoliert. Zum anderen wird die Situation von chronischer Hypoxie simuliert, indem EBs von Tag 4 bis Tag 10 der Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen inkubiert werden.

Die EBs werden an Tag 4 aus der Spinnerflasche entnommen und jeweils circa 50 EBs in bakteriologische Schalen mit 5 ml CCE-Medium überführt. Die Zellen werden in der Hypoxiekammer, die sich innerhalb des Inkubators befindet, in 1%iger O₂ Atmosphäre inkubiert. Der Sauerstoffspiegel wird durch Begasung mit einem Gasgemisch bestehend aus 94,7% N₂ und 5,3% CO₂ eingestellt. Durch einen kontinuierlich messenden Sauerstoffsensoren und den ProOxP110 Single Setpoint Controller, der automatisch die Gaszufuhr bei Abweichungen von 1% O₂ regelt, wird eine konstante Hypoxie sichergestellt. Nach unterschiedlichen Hypoxiezeiten werden die bakteriologischen Schalen mit den enthaltenen EBs aus der Hypoxiekammer entnommen und die Proteine, wie unter 3.6.1 beschrieben, extrahiert.

Zu Reoxygenierungsversuchen werden die EBs für jeweils 4 h in der hypoxischen Atmosphäre inkubiert und anschließend für eine Zeitreihe von 5 min - 8 h zur Reoxygenierung im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95% belassen. Anschließend erfolgt die Proteinextraktion wie unter 3.6.1 beschrieben.



Abb.3.2.2 Hypoxiekammer (links) und Single Setpoint Controller (rechts).

3.3 Isolation embryonaler Kardiomyozyten

Stark kontrahierende EBs werden an Tag 8 - 12 der Differenzierung für 10 - 15 min auf dem Schüttler mit 3 ml Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend mit einer Pipette vorsichtig vereinzelt. Nach Überführung der vereinzelteten Zellen in CCE-Medium wird die Zellsuspension bei RT (5 min, 209g) abzentrifugiert. Das entstehende Pellet wird in CCE-Medium resuspendiert und die Zellen auf vorbereitete Coverslips (beschichtet mit 0,1% Gelatine) in Zellkulturschalen (Multiwell™ 24-well) ausplattiert. Nachdem die Zellen subkonfluent sind, in der Regel 2 - 3 Tage nach der Isolation, kann mit der Behandlung begonnen werden.

3.4 Immunhistochemie

Der Nachweis des kardialen Markers α -Aktinin, sowie des Zytokins CT-1 erfolgt nach dem Prinzip der indirekten Antikörperfärbung. Bei diesem Prinzip bindet der 1. Ak spezifisch an das Antigen, während der zweite, mit einem Fluochrom konjugierte Ak, an den ersten bindet. Durch Anregung des Fluorochroms mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, kommt es zur Freisetzung von Emissionslicht. Dieses kann mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops bildlich dargestellt werden. Vor der Fixierung mit eiskaltem, 100%-igem Methanol, bei -20°C , für mindestens 20 min, werden die Zellen zum Entfernen des Mediums 1-2 mal mit 1xPBS gewaschen. Nach der Fixierung mit Methanol werden sie erneut 3 mal mit 0,01% PBST gewaschen und für 10 min mit 1% PBST permeabilisiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschrift mit 0,01% PBST, werden die Zellen zum Blocken von unspezifischen Bindungen für 60 min mit 10% FKS bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem primären Ak gelöst in 10% FKS bei 4°C , über Nacht. Anschließend werden die Proben 3-4 mal mit 0,01% PBST gewaschen und für 60 min bei RT mit dem zweiten Ak, gelöst in 10% FKS,

inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 0,01% PBST kann eine Kernfärbung mit DRAQ (Konzentration 1:1000, gelöst in 1xPBS) für 8 min im Dunkeln bei RT durchgeführt werden. Bei einer Doppelfärbung erfolgt die Färbung mit dem zweiten Primärantikörper und entsprechendem Sekundärantikörper nach dem gleichen Protokoll. Nach der erfolgreichen Färbung werden die Deckgläschen zur Aufbewahrung mit Fluomount G eingedeckelt. Die Analyse der gefärbten Proben erfolgt mit dem konfokalen Lasermikroskop. Das Färbeprotokoll ist in Tabelle 3.4 noch einmal übersichtlich dargestellt.

Schritt	Dauer	Substanz	Temperatur
1. Waschen	1 min	1xPBS	RT
2. Fixieren	≥20 min	eiskaltes 100%-iges Methanol	-20°C
3. Permeabilisieren	10 min	1% PBST	RT
4. Blocken	60 min	10% FKS	RT
5. Primärer Ak	über Nacht	gelöst in 10% FKS	4°C
6. Sekundärer Ak	60 min	gelöst in 10% FKS	RT

Tabelle 3.4 Färbeprotokoll: Mit Ausnahme von Schritt 1 und 4 erfolgt nach jedem Schritt ein Waschschrift mit 0,01% PBST (3– 4-mal, 5 min)

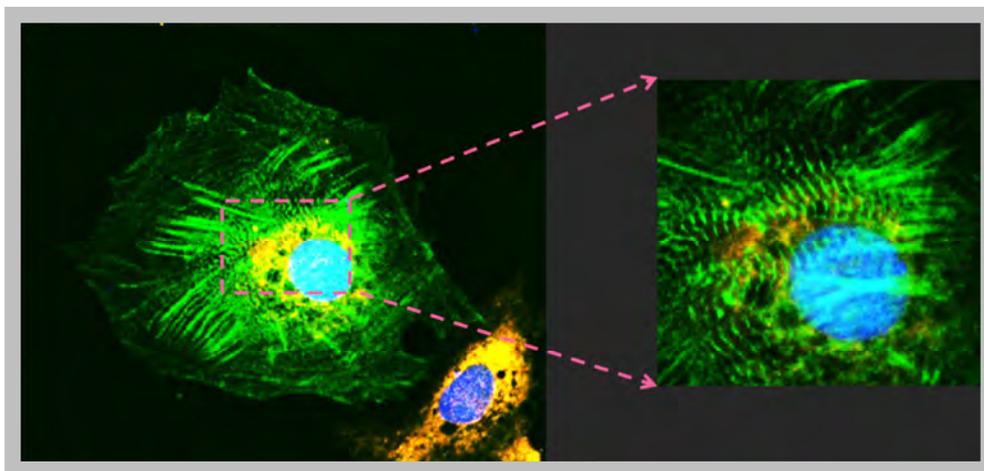


Abb.3.4: Indirekte Antikörperfärbung gegen α -Aktinin (grün), CT-1 (orange), sowie die Kernfärbung DRAQ (blau).

3.5 Konfokale Lasermikroskopie

Die konfokale Lasermikroskopie ist eines der Schlüsselwerkzeuge dieser Arbeit zur Untersuchung der Differenzierungsfähigkeit von ES-Zellen, der zellulären Lokalisation von CT-1, sowie der Generierung von intrazellulären Signalmolekülen. Ursprünglich entwickelt von Marvin Minsk und patentiert 1961 (Minsky, 1961) entwickelte sie sich, durch Innovationen der Lichtquellen, zu einem viel genutzten Werkzeug in der Untersuchung von einzelnen Zellen (Davidovits und Egger, 1973). Bei dieser Art der Mikroskopie handelt es sich um eine spezielle Art der Fluoreszenzmikroskopie, bei der charakteristische optische Übergänge von speziellen Fluoreszenzmolekülen angeregt werden. Dies erfolgt in der Regel mit monochromatischem Licht von spezifisch abgestimmten Lasern mit entsprechender Wellenlänge. Dabei treibt das elektrische Feld des Lasers die Elektronen in einen für das Molekül spezifischen angeregten Zustand. Die Anregung erfolgt dabei mit Lasern, deren Wellenlänge kürzer und somit energiereicher ist als der zu untersuchende Übergang. Durch spontane Emission von Licht, dessen Wellenlänge der Energiedifferenz zwischen angeregtem Niveau und dem energetischen Grundzustand des Moleküls entspricht, werden die Elektronen abgeregt und kehren wieder in den Grundzustand zurück. Diese Energiedifferenz ist in der Regel kleiner als die Anregungsenergie. Das von der Probe emittierte Licht ist somit in der Regel rot-verschoben und lässt sich durch entsprechende Optiken von der Anregungswellenlänge des Lasers, trennen. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tab.3.5 aufgelistet. Sie unterscheiden sich in ihren Absorptions- und Emissionsmaxima. Bei konstanter Wellenlänge und Stärke des Lasers ist die Anzahl der emittierten Photonen linear zur Anzahl der gebundenen Fluoreszenzmoleküle.

In dieser Arbeit wurde das konfokale Lasermikroskop DM-IRE2, der Firma Leica Microsystems, verwendet. Zur spezifischen Anregung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist es mit 3 verschiedenen Lasern ausgestattet. Zur Verfügung stehen ein Ar/ArKr (488 nm), und zwei HeNe Laser, die verschiedene Übergänge im Ne nutzen (543 nm, 594 nm und 632 nm).

Durch eine automatische Rastereinrichtung, welche den stark fokussierten Strahlengang des Absorptions- und Emissionslichtes in der Fokusebene ausrichtet (Ablenkung in der x/y-Achse), kann das konfokale Lasermikroskop eine sehr hohe räumliche Auflösung erzielen.

Das von der Probe emittierte Licht wird durch Filter und dichroische Spiegel derart aufgetrennt, dass das kurzwellige Anregungslicht auf die Probe trifft, während das langwellige Fluoreszenzlicht störungsfrei von einem Photomultiplier oder einer Kamera detektiert werden kann. Ein weiterer Vorteil der konfokalen Lasermikroskopie basiert auf dem Vermögen, die Lichtemission einer Probe auf einer einzigen Ebene zu detektieren, indem das von der Probe emittierte Licht aus einer Fokalebene gebündelt wird und sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, unterdrückt wird. Die entstehenden Aufnahmen besitzen somit eine bessere Auflösung und einen höheren Kontrast zu vergleichbaren Aufnahmen mit einem klassischen Fluoreszenzmikroskop. Dies ermöglicht die Fluoreszenzintensitäten verschiedener optischer Fokusebenen, die „optische Schnitte“ genannt werden, durch Heben und Senken des Mikroskopiertisches aufzuzeichnen und so klare Tiefenschnitte von dreidimensionalen Proben zu erlangen (Claxton, 2006).

Das konfokale Lasermikroskop ermöglicht somit sehr hochaufgelöste, räumliche Fluoreszenzmessungen mit hohem Kontrast, die mit der Computersoftware Leica LCS aufgezeichnet werden.

Fluoreszenzfarbstoff	Absorption (nm)	Emission (nm)
Alexa 488	488	520
Cy3	514	566
	552	570
Cy5	649	670
DAF-FM	488	515
Fluo-4	495	515

Tabelle:3.5: Absorptions und Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

3.5.1 Messung intrazellulärer Kalziumtransienten

Zur Sichtbarmachung (Imaging) von intrazellulären Kalziumtransienten wird der zellpermeable Farbstoff Fluo4-AM verwendet. Zur Anregung des Farbstoffs wird ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm benutzt, während die Emission bei 515 nm Wellenlänge aufgezeichnet wird. Zum „Live-Imaging“ von Kalziumtransienten in embryonalen Stammzellen werden EBs an Tag 3 der Differenzierung zunächst 10 min mit Trypsin/EDTA verdaut und die so gewonnenen Einzelzellen auf mit 0,1 % Gelatine beschichteten Deckgläschen zu einem Monolayer ausplattiert. Die so vereinzelteten Zellen können am nächsten Tag mit dem Farbstoff Fluo-4-AM (5 μ M) für 30 min bei 37°C in serumfreiem Medium gefärbt werden. Anschließend werden sie zum Entfernen des überschüssigen Farbstoffes mit serumfreiem Medium gewaschen und das gefärbte Deckgläschen in eine Mikroskopierkammer mit 1 ml serumfreiem Medium überführt. Mit Hilfe der Leica Software können im „Live Data Mode“ Kalziumtransienten unter der Zugabe von CT-1 untersucht werden. Beim Live Imaging wird die Fluoreszenz in einem Takt von 2 s über einen Zeitraum von 10 bis 15 min aufgezeichnet.

3.5.2 Messung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Entstehung von ROS in EBs wird durch Bestimmung der 2,7-dichlorofluoreszein (DCF)-Fluoreszenz-Intensität quantifiziert. Das zellpermeable Diacetat des Farbstoffs DCFH-DA gelangt in die Zelle und wird dort von intrazellulären Esterasen gespalten. Das entstehende DCFH ist nichtfluoreszierend und zellimpermeabel. Es wird durch intrazelluläre ROS zur fluoreszierenden Form DCF oxidiert.

Zur Messung intrazellulärer ROS werden 4 Tage alte EBs nach Stimulation mit 4 h Hypoxie (1% O₂) oder nach Inkubation mit CT-1 für unterschiedliche Zeiten während der anschließenden Reoxygenierung, bzw. Inkubationszeit mit CT-1 mit dem ROS-Indikator DCFH-DA (20 μ M) für 30 min im Dunkeln auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert und im Anschluss in frisches serumfreies Medium überführt. Nachfolgend wird durch Anregung der Proben mit dem Argonlaser (488 nm Wellenlänge) die maximale Fluoreszenzintensität, in einer Bandbreite von 500-535 nm, mit Hilfe des konfokalen Mikroskops aufgezeichnet.

3.5.3 Stickstoffmonoxid Messung

Für die Messung von intrazellulärem NO in EBs wird eine Stammlösung von 5 mM DAF-DA hergestellt und die EBs mit einer Endkonzentration von 10 μ M mit dem Farbstoff für 45 min bei 37°C auf dem Schüttler beladen. Zur Sicherstellung der kompletten Esterhydrolyse der intrazellulären Diacetate erfolgt nach der Färbung ein Mediumwechsel mit frischem serumfreiem Medium und die Zellen werden für weitere 30 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgt, nach Anregung der Proben mit dem Argon Laser (495 nm), die Detektion der maximalen Fluoreszenzintensität mit dem konfokalen Mikroskop bei einer Emissionswellenlänge von 515 nm.

3.5.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen und der Lebendmessungen

Die Auswertung der Fluoreszenz-Intensitäten erfolgt bei den Lebendmessungen (Live cell imaging) ROS, NO und Kalzium mit der Leica Software LCS Version 2.61. Zur Bestimmung der Größe der α -Aktinin positiven kardialen Areale und der zellulären Lokalisation von CT-1 bei Kerntranslokationsversuchen wird die Software Metamorph, Version 7.7.8.0, verwendet.

3.6 Western Blot

Western Blot bezeichnet die Übertragung von Proteinen auf eine Transfermembran, auf welcher sie durch eine anschließende indirekte Antikörperfärbung nachgewiesen werden können. In der Regel wird ein enzymgekoppelter sekundärer Ak zur Sichtbarmachung verwendet, wobei die Enzyme eine Chemilumineszenzreaktion katalysieren. Das in dieser Arbeit verwendete Enzym ist die Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase (HRP)).

3.6.1 Proteinextraktion

Die zur Proteinextraktion verwendeten EBs werden zum Entfernen des Mediums zunächst mit eiskaltem 1xPBS gewaschen und anschließend mit Lysispuffer und unter Verwendung des Homogenisators lysiert. Die Menge des benutzten Lysispuffers, der kurz vor Gebrauch mit Protease und Phosphatase-Inhibitoren versetzt wird, variiert dabei entsprechend der Menge

der zur Proteinextraktion verwendeten EBs. In der Regel werden für circa 60 EBs 100 µl Lysis Puffer verwendet. Nach der Homogenisierung der EBs wird das Zell-Lyse-Gemisch für 10 bis 20 min auf Eis inkubiert und im Anschluss in einer vorgekühlten Zentrifuge (10 min, 4°C, 24700g) abzentrifugiert. Nach Überführung des Überstandes in neue Reaktionsgefäße erfolgt die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -80°C. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951).

3.6.2 Gelelektrophorese und Blotten

Zur Auftrennung der Proteine wird ein NUPAGE® 4-12% Bis-Tris Gradientenminigel verwendet. Vor dem Auftragen der Proteine (50 µg/Probe), werden diese mit Probenpuffer, einem Reduktionsmittel (Reducing Agent) und nach Bedarf Aqua bidest zu einem Ladevolumen von 15 µl aufbereitet und bei 70°C für 10 min denaturiert. Als Laufpuffer wird MOPS oder MES, abhängig von der Größe der Zielgene, verwendet.

Die Gelelektrophoresekammer trennt bei 200V, 95 mA, in 40-55 min die Proteine anhand ihrer Größe auf. Der Transfer der Proteine des Gels auf eine Nitrozellulosemembran erfolgt mit Hilfe des XCell SureLock® Mini-Cell Blot Module der Firma Invitrogen, bei 30 V und 160 mA für 85 min. Dabei erfolgt die Schichtung wie in Abb.3.6.2 zu sehen. Im Anschluss kann der Erfolg des Proteintransfers auf die Nitrozellulosemembran mit Hilfe einer unspezifischen, reversiblen Proteinfärbung, der Ponceau-Färbung, überprüft werden.

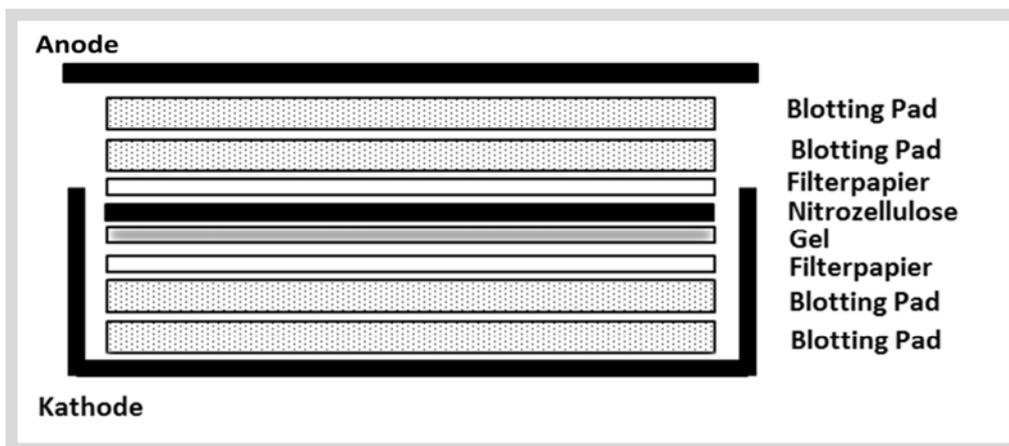


Abb.3.6.2: Schematische Darstellung der Schichtung zum Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran im XCell SureLock® Mini-Cell Blot Module der Firma Invitrogen.

3.6.3 Spezifischer Proteinnachweis

Im Anschluss an die Ponceau Färbung wird der Farbstoff durch Waschen mit 0,1% TBST entfernt und die Membran für 1 h bei RT in 5%iger Magermilchlösung auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Danach wird die Membran für 5 min mit 0,1% TBST gewaschen und der primäre Ak bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Alle sekundären HRP-gekoppelten Ak werden nach einem Waschschrift (3 mal 10 min mit 0,1%TBST) für 1 h bei RT auf der Membran belassen. Daraufhin erfolgt eine erneute Waschung (3 mal 10 min mit 0,1% TBST). Abschließend erfolgt eine Darstellung der Immunfärbung mit Hilfe des Enhanced Chemoluminescence Systems (ECL). Hierfür wird die Membran für 1 min in ECL Lösung inkubiert und in der Folge die Lumineszenz mit der Software Chemi-Capt-50001 visualisiert. Um die zu untersuchenden Proteine und das Gesamtprotein (GAPDH, Vinculin oder β -Aktin) gleichzeitig darstellen zu können, wird der Westernblot anhand der Größe der zu detektierenden Proteine unterteilt, so dass zeitgleich die Expression der zu untersuchenden Proteine und die Ladekontrolle (Gesamtprotein) erfasst werden können.

Schritte	Substanz	Dauer	Temperatur
1. Blocken	5% Magermilchlösung	60 min	RT
2. Primärer Ak	Gelöst in 5% BSA	über Nacht	4°C
3. Waschen	0,1% TBST	3x 10 min	RT
4. Sekundärer Ak	Gelöst in 5% BSA	60 min	RT
5. Waschen	0,1% TBST	3x 10 min	RT

Tabelle 3.6.3.1: Protokoll der Immunfärbung (Western Blot)

Substanz	Stammlösungen	Arbeits-Konzentration	Reaktionsansatz
Tris-HCl	100 mM pH 8,5	100 mM pH 8,5	10 ml
Luminol	250 mM Stamm	600 μ M	25 μ l
Cumarsäure	90 mM Stamm	900 μ M	50 μ l
Wasserstoffperoxid	30%	880 μ M	3 μ l

Tabelle 3.6.3.2: ECL-Lösung

Anschließend erfolgt eine densitometrische Auswertung der Westernblot Banden mit Hilfe der frei verfügbaren Java Software Image J (Version 1.4.3.67, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Die mit der Software Chemi-Capt-50001 visualisierten Westernblot Banden werden als TIFF Datei gespeichert. Im Anschluss wird die Datei mit dem Programm „Image J“ geöffnet und die Banden mittels eines Rechtecks markiert. Die integrierte Farbdichtevertelung der Banden des Westernblots werden durch ein Histogramm, wie beispielsweise in Abb.3.6.3, graphisch dargestellt. Dabei ist die Farbdichte der Westernblot Bande proportional zur Fläche des Histogramms (Schneider et al., 2012). Die Minima der entsprechenden Abschnitte einer Bande im Histogramm werden manuell verbunden und die daraus resultierende Linie als Grundlinie bezeichnet. Durch die Verwendung dieser Linie kann der Hintergrund des Westernblots von den Banden subtrahiert werden. Nach Subtraktion des jeweiligen Hintergrundes wird die Fläche der umschlossenen Areale bestimmt (Area under the Curve) und die erhaltenen Werte zur weiteren Auswertung in Microsoft® Excel® 2010 unter Microsoft® Windows® 7 kopiert.

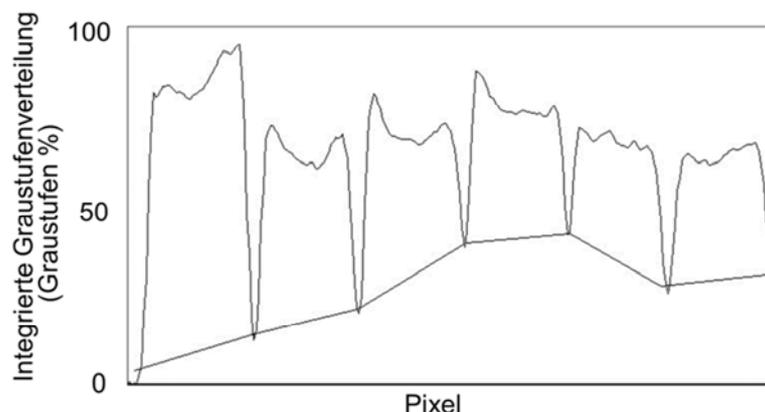


Abb.3.6.3: Histogrammische Darstellung der Farbdichtevertelung eines Westernblots mit 6 Banden durch das Bildverarbeitungsprogramm „Image J“. Die Grundlinie wird manuell eingezeichnet, indem die Minima der einzelnen Kurven verbunden werden.

Bei dem Vorhandensein von Doppelbanden wurden beide Banden zusammen in einem Rechteck markiert und derart die Intensität beider Banden integriert. Die integrierte Farbdichtevertelung, welche der Fläche unter dem Histogramm entspricht, wird im Folgenden als Intensität bezeichnet.

Zur systematischen Auswertung wird die Intensität des zu untersuchenden Proteins A_{Probe} und die des Gesamtproteins B_{Probe} (Bsp. GAPDH, Vinculin oder β -Aktin) bestimmt. Mit Hilfe

der Intensitäten der unbehandelten Kontrolle $A_{Kontrolle}$ des Proteins A und der Intensität der unbehandelten Kontrolle $B_{Kontrolle}$ des Gesamtproteins B kann die relativ normierte Proteinexpression unter Verwendung der Formel (Formel 3.6.3.1) bestimmt werden.

$$\text{(Formel 3.6.3.1)} \quad \text{Protein expression}_{norm} = \frac{A_{Probe}}{B_{Probe}} \cdot \frac{B_{Kontrolle}}{A_{Kontrolle}} \cdot 100$$

Der jeweilige Wert der $\text{Protein expression}_{norm}$ erlaubt den Vergleich der Proteinexpression zwischen behandelten und unbehandelten Proben.

3.6.4 „Stripping“

Bereits mit einer Antikörperfärbung behandelte Membranen können zur erneuten Verwendung mit Hilfe eines „Stripping Puffers“ von den zuvor gebundenen Antikörpern befreit werden. Dazu werden die Membranen für 15 - 30 min bei RT auf dem Schüttler in Restore™ Western Blot Stripping Puffer inkubiert. Anschließend werden die Blots dreimal für je 10 min mit 0,01% TBST gewaschen und sollten, vor erneuter Inkubation mit dem ersten Ak, für 60 min mit 5%-iger Milch geblockt werden. In der Folge können die Membranen mit neuen primären Ak inkubiert werden.

3.7 siRNA

Konfluente Stammzellen werden für 2 bis 4 min mit 2 ml Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend die Trypsinreaktion mit warmem 1x PBS gestoppt. Im folgenden Zentrifugationsschritt (5 min, 400g, bei RT) werden die Zellen vom Medium befreit und das entstehende Pellet in einem Resuspensions-Puffer gelöst. Zellen und siRNA werden nach Elektroporation (140 V, 10 ms) über Nacht mit Opti-MEM-Kulturmedium inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird, wie unter 3.1.4 beschrieben, eine Spinnerflasche präpariert. Dabei ist pro Versuchsdurchführung der Ansatz von 3 Spinnerflaschen notwendig. Die erste Spinnerflasche beinhaltet Zellen, die mit dem CTF1 siRNA Oligo mit der Sequenz (5'→3'GGAGGAAUACGUGCAGCAAtt) behandelt werden. Als Negativkontrolle dient eine zweite Spinnerflasche, bei der die Zellen mit einem Mix aus unspezifisch bindenden mRNAs

inkubiert werden, die auch „scrambled“ Gruppe genannt wird. Die dritte Flasche enthält Zellen, denen kein Oligo hinzugefügt wurde.

3.8 Statistik

Die Ergebnisse werden in Mittelwerten \pm Standardabweichung angegeben. Alle Versuche werden mindestens dreimal durchgeführt, wobei n für die Anzahl der unabhängigen Experimente steht. Die Signifikanz wird mit der Analyse der Varianz (one-way ANOVA) überprüft. Dabei wird $p < 0,05$ als signifikant *, $p < 0,01$ als sehr signifikant ** und $p < 0,001$ als hochsignifikant *** angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Endogene Expression von Cardiotrophin-1 (CT-1) und seinem Rezeptor Glykoprotein 130 (gp130) während der Differenzierung in EBs

Zur Korrelation der endogenen CT-1 und gp130 Expression mit der zeitlichen Differenzierung von EBs wurde eine Tageszeitreihe durchgeführt, bei der alle 2 Tage Proteinproben genommen wurden. Beginnend mit Tag 0, an dem konfluente ES-Zellkolonien von der Gewebekulturschale abgelöst werden und in eine Spinnerflasche überführt werden. Im weiteren Verlauf wurden aus der Spinnerflasche jeden 2. Tag EBs entnommen, eine Proteinextraktion, wie unter 3.6.1 beschrieben, durchgeführt und im Anschluss die Proteinexpression mittels Westernbot untersucht. CT-1 und sein Rezeptor gp130 zeigen einen ähnlichen Expressionsverlauf, mit einem Maximum an Tag 4 bis 6 und einer anschließenden Herunterregulation bis Tag 10. Maximale CT-1 $191\pm 33\%$ ($n = 4$) an Tag 4 (Abb.4.1 A) und gp130 Expression $466\pm 50\%$ ($n = 3$) an Tag 6 (Abb.4.1 B) der Differenzierung, im Vergleich zu Tag 0 (normiert auf 100%). Dies entspricht dem Zeitrahmen in dem die kardiale Differenzierung von EBs stattfindet (Hescheler et al., 1999).

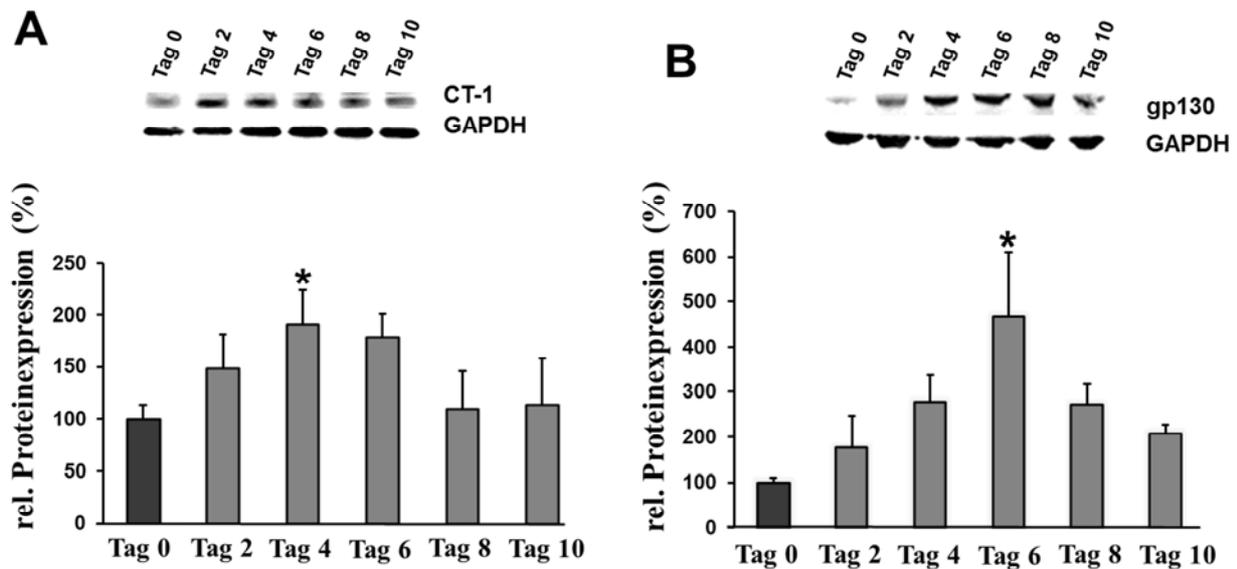


Abb.4.1: Endogene Proteinexpression von CT-1 (A) und gp130 (B) während der Differenzierung in EBs. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Western Blots, der untere Bildteil Balkendiagramme der CT-1 (n = 4) und gp130 Expression (n = 3). Es ist eine stetige Expressionssteigerung von CT-1 und gp130 während der Differenzierung von ES-Zellen zu erkennen. Die Proben wurden im Abstand von 2 Tagen genommen und die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht, dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. *p<0,01 statistisch signifikant vs. Proteinexpression an Tag 0 der Differenzierung (schwarzer Balken).

4.2 Hochregulation von Wachstumsfaktoren unter CT-1 Behandlung

Wachstumsfaktoren spielen während der Entwicklung des Herzens eine große Rolle. Zur Untersuchung des Einflusses von CT-1 auf die Expression von PDGFbb, VEGF, FGF-2 und ANP wurden EBs an Tag 4 der Differenzierung aus der Spinnerflasche entnommen und in der Folge von Tag 4 bis 7 mit CT-1 in einer Konzentration von 1 bis 50 ng/ml behandelt. Im Anschluss an die Behandlung erfolgte die Quantifizierung der Proteinexpression mittels Western Blot. Unter Einfluss von CT-1 ist eine konzentrationsabhängige Steigerung der Expression von PDGFbb, VEGF, FGF2 und ANP, zu sehen (Abb.4.2.1 A-D). Es ist deutlich, dass die Expression der Wachstumsfaktoren bereits durch niedrige CT-1 Konzentrationen im Bereich von 1 - 5 ng/ml gesteigert wird.

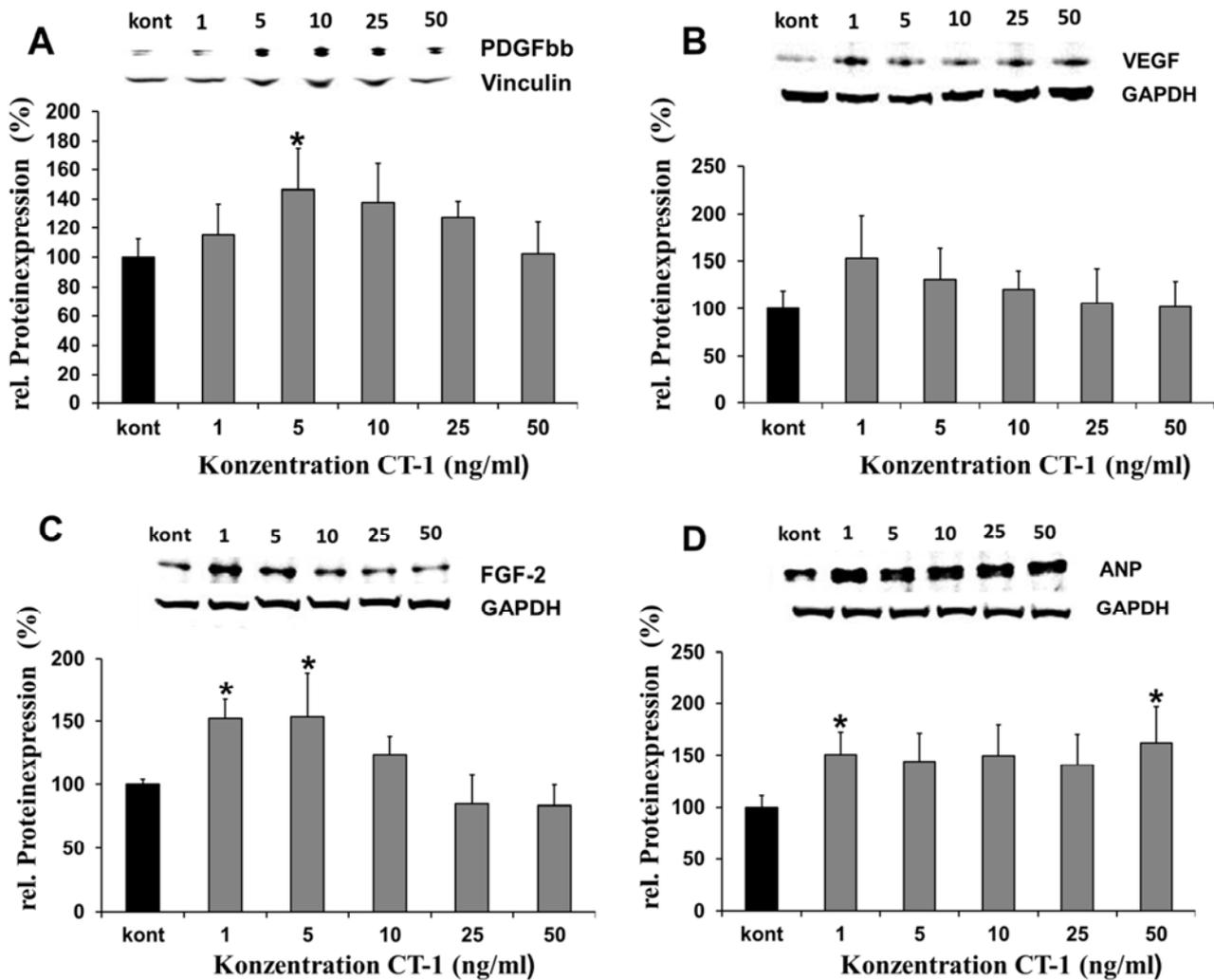


Abb.4.2.1: Konzentrationsabhängige Stimulation der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFbb (A), VEGF (B), FGF-2 (C) und des Peptidhormons ANP (D) unter Behandlung mit CT-1. Die obere Bildhälfte zeigt repräsentative Western Blots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression von PDGFbb (n = 3), VEGF (n = 3), FGF-2 (n = 4) und ANP (n = 6) unter Behandlung mit CT-1. EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung für 3 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von CT-1 (1 - 50ng/ml) behandelt und die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Der Expressionsnachweis von GAPDH oder Vinculin diente als interne Kontrolle. MW±SD,*p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

Es besteht eine signifikante Steigerung der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFbb, FGF-2 und ANP durch Behandlung mit CT-1 auf $147 \pm 29\%$, $152 \pm 15\%$ und $148 \pm 32\%$, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, normiert auf 100% (Abb.4.2.1, schwarzer Balken).

4.3 Hochregulation kardialer Transkriptionsfaktoren unter CT-1 Behandlung

Ferner kommt es unter Behandlung mit CT-1, wie unter 4.2 beschrieben, zu einer vermehrten Expression kardialer Transkriptionsfaktoren. Die Proteinsynthese von MEF2c, Nkx2.5, TEAD3 und GATA4 wird, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, signifikant stimuliert (n = 4). Des Weiteren ist auch hier ein konzentrationsabhängiger Effekt von CT-1 auf die Expression der Transkriptionsfaktoren zu erkennen (Abb.4.3.1 A-D). Maximale Stimulation der Expression wird durch Behandlung mit 5 - 10 ng/ml CT-1 erreicht.

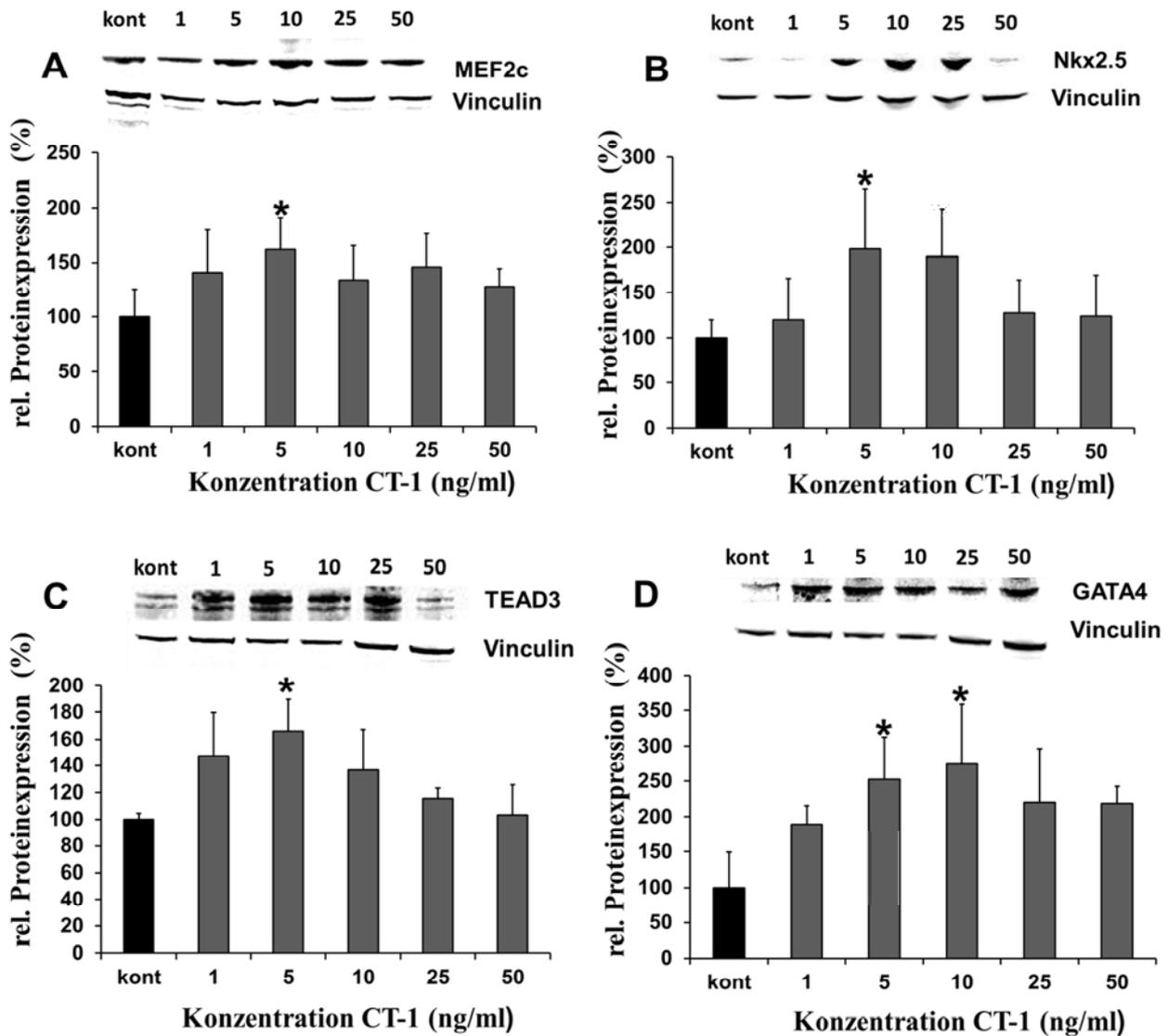


Abb.4.3.1: Konzentrationsabhängige Stimulation der Expression kardialer Transkriptionsfaktoren MEF2c (A), Nkx2.5 (B), TEAD3 (C) und GATA4 (D) unter Behandlung mit CT-1. Die obere Bildhälfte zeigt repräsentative Western Blots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression von MEF2c (n = 4), Nkx2.5 (n = 4), TEAD3 (n = 4) und GATA4 (n = 4) unter Behandlung mit CT-1.

EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung für 3 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von CT-1 (1-50 ng/ml) behandelt und die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Der Expressionsnachweis von Vinculin diente als interne Kontrolle. MW±SD,*p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

Der Vergleich der unterschiedlichen Expressionsstärke der Transkriptionsfaktoren untereinander zeigt einen signifikanten Einfluss von CT-1 auf die Proteinsynthese von MEF2c (161±30%), Nkx2.5 (198±77), TEAD3 (166±20) und GATA4 mit einem Maximum bei 252±60%, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb.4.3.1)

4.4 Hochregulation kardialer Gene unter CT-1 Behandlung

Um den Einfluss von CT-1 auf die Expression kardialer Gene zu untersuchen, wurden EBs an Tag 4 der Differenzierung aus der Spinnerflasche entnommen, von Tag 4 bis 10 mit Konzentrationen von 1 - 50 ng/ml CT-1 behandelt und im Anschluss die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Wie in den vorangehenden Versuchen ist eine konzentrationsabhängige Steigerung der kardialen Genexpression unter CT-1 Behandlung ersichtlich. Die Expression der kardialen Gene α -Aktinin (n = 4), MLC1a (n = 3), MLC2a (n = 3), MLC2v (n = 3) wird bei Konzentrationen von 10 - 25 ng/ml CT-1 signifikant stimuliert (Abb.4.4.1 A,C,D,E), während die Expression von MYH7 (n = 6) bereits bei niedrigen Konzentrationen von 1 ng/ml CT-1 signifikant zunimmt und eine maximale Proteinexpression bei 5 ng/ml CT-1 zeigt (Abb.4.4.1 F). Indes nimmt die Expression von HCN4 (n = 3) (Abb.4.4.1 B) unter Behandlung mit 10-25 ng/ml CT-1 deutlich zu, wird jedoch nicht signifikant gesteigert.

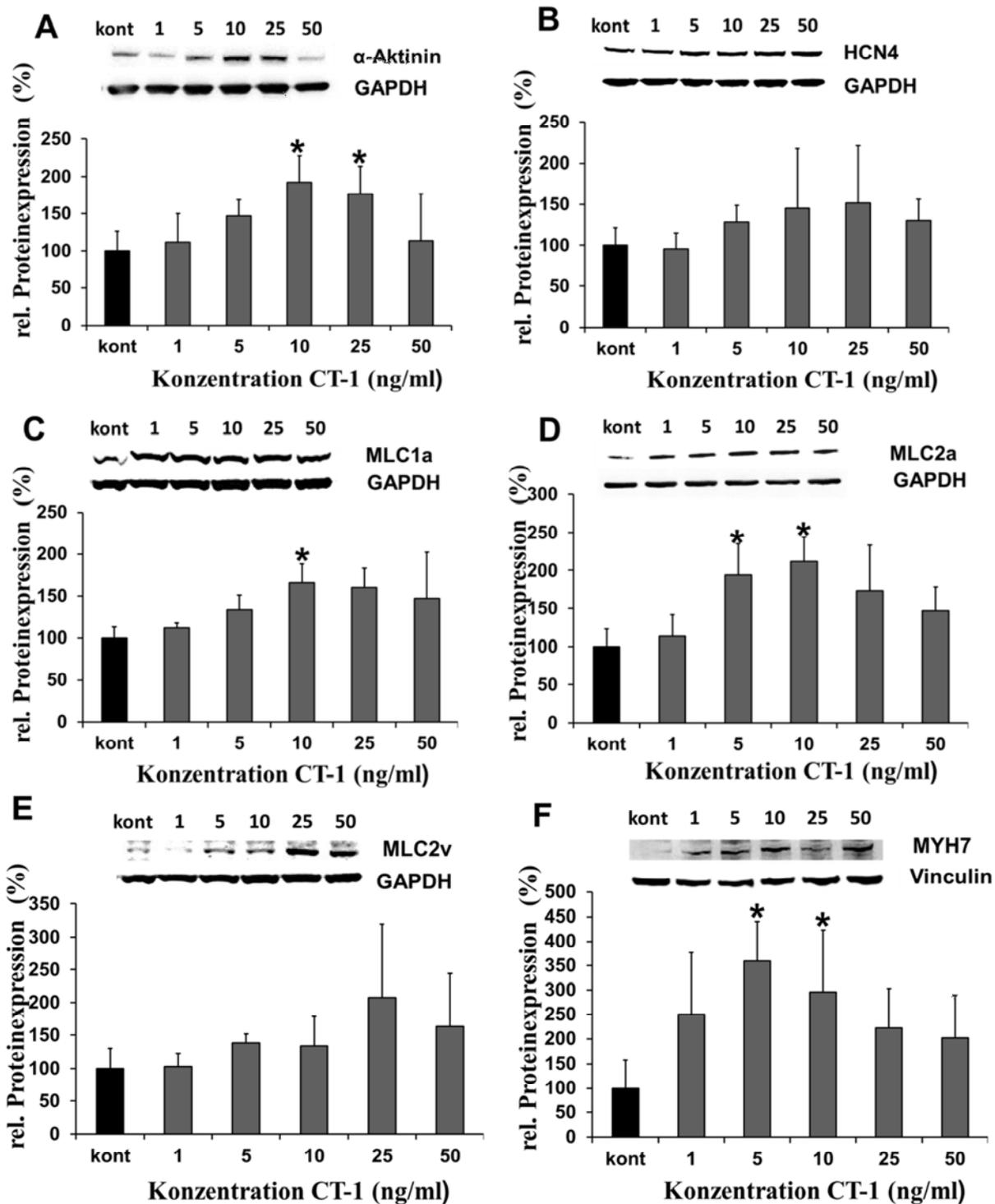


Abb.4.4.1: Konzentrationsabhängige Stimulation der Expression der kardialen Gene α -Aktinin (A), HCN4 (B), MLC1a (C), MLC2a (D), MLC2v (E) und MYH7 (F) unter Behandlung mit CT-1. Die obere Bildhälfte zeigt repräsentative Western Blots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression von α -Aktinin (n = 4), HCN4 (n = 3), MLC1a (n = 3), MLC2a (n = 3), MLC2v (n = 3) und MYH7 (n = 6) unter Behandlung mit CT-1. EBs wurden von Tag 4 der Differenzierung für 6 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von CT-1 (1 - 50 ng/ml) behandelt und die Proteinexpression

mittels Western Blot untersucht. Der Expressionsnachweis von GAPDH oder Vinculin diene als interne Kontrolle. MW \pm SD,*p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

Der Vergleich der kardialen Genexpression unter CT-1 Behandlung zeigt eine ausgeprägte Stimulation der MYH7 Expression (359 \pm 81%) im Vergleich zur Expression der kardialen Gene α -Aktinin (180 \pm 43%), HCN4 (151 \pm 69%), MLC1a (161 \pm 23%), MLC2a (212 \pm 32%) und MLC2v (207 \pm 112%).

4.5 Anzahl und Größe kontrahierender kardialer Areale nach CT-1 Behandlung

Zur Untersuchung ob CT-1 die Ausbildung funktioneller Kardiomyozyten fördert, sollte im Folgenden die Anzahl kontrahierender Areale unter CT-1 Behandlung bestimmt werden. Dazu wurden EBs an Tag 4 der Differenzierung auf Deckgläschen in Zellkulturschalen ausplattiert und im Anschluss von Tag 4 bis 10 mit CT-1 in einer Konzentration von 1 bis 50ng/ml behandelt (n = 4). Abschließend erfolgte an Tag 10 die Auszählung der kontrahierenden Areale und eine immunhistochemische Färbung gegen das sarkomere Protein α -Aktinin, um die Größe der Areale zu bestimmen. Wie in Abb.4.5 zu sehen, lässt sich eine konzentrationsabhängige Stimulation der Kardiomyogenese, mit einem Maximum zwischen 5 - 25 ng/ml CT-1, erkennen. Frühere Arbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, dass die Behandlung mit CT-1 (10 ng/ml) zu einer Erhöhung der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 führt, so dass die Größenzunahme der α -Aktinin positiven Areale auf eine Stimulation der Proliferation zurück gehen könnte (Sauer et al., 2004). Maximale Werte werden bei der Behandlung mit 5 ng/ml CT-1 erreicht. Dabei ist eine Zunahme der α -Aktinin positiven Areale auf 215 \pm 8% und der kontrahierenden Areale auf 214 \pm 74% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten.

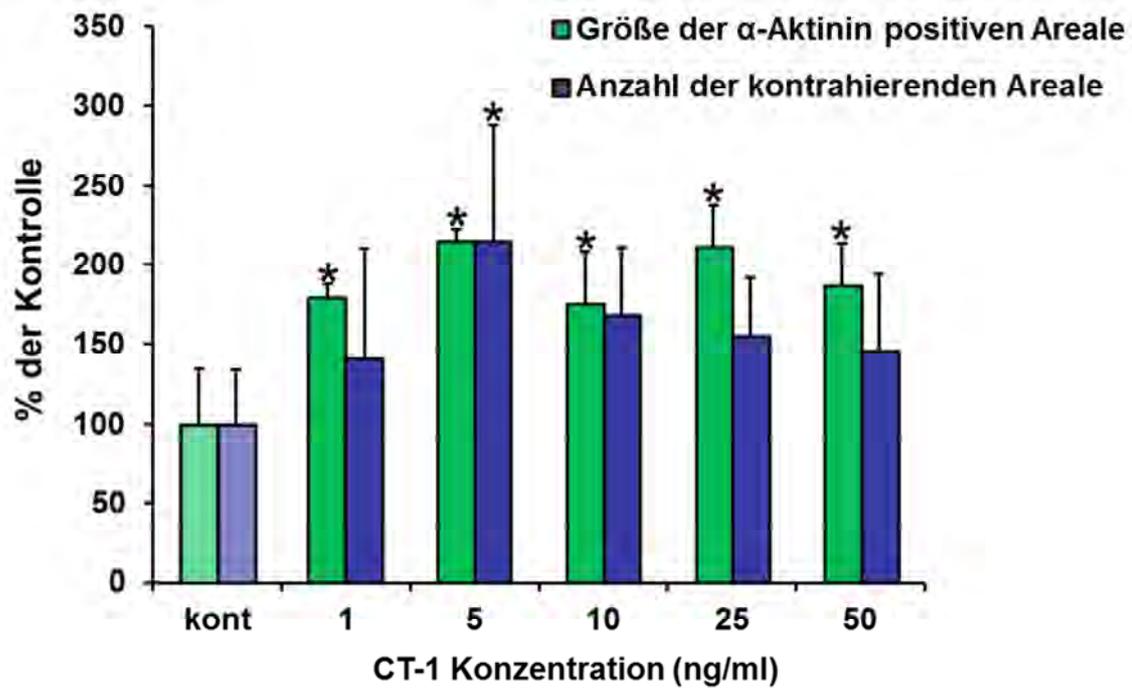
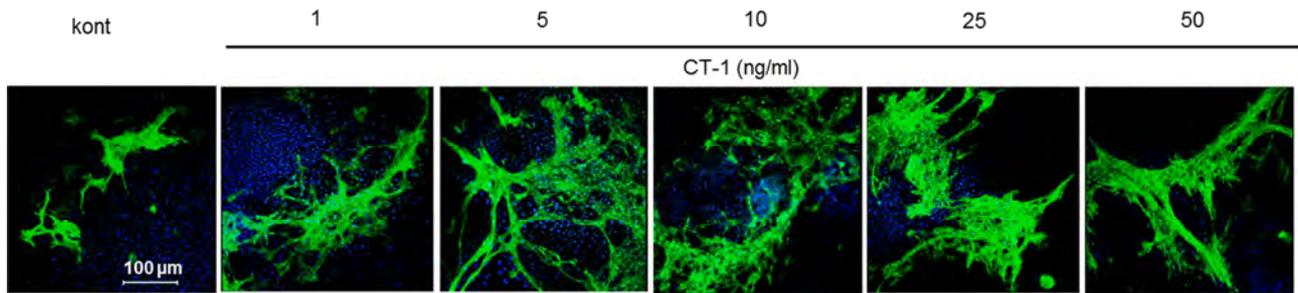


Abb.4.5: Anzahl und Größe kontrahierender Areale nach CT-1 Behandlung. Effekt unterschiedlicher CT-1 Konzentrationen auf den prozentualen Anteil kontrahierender kardialer Areale und Größe der α -Aktinin positiven Zellareale in EBs. Der obere Bildteil zeigt repräsentative immunhistochemische Färbungen α -Aktinin positiver Areale, der untere Bildteil zeigt Balkendiagramme von n = 4 unabhängigen Experimenten. Blauer Balken: Anzahl kontrahierender Areale in % ; grüner Balken: Größe der α -Aktinin positiven Zellareale in %, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. EBs wurden von Tag 4 - 10 mit Konzentrationen von 1 bis 50 ng/ml CT-1 inkubiert. MW \pm SD, n = 4, *p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.6 Größenzunahme der EBs unter Behandlung mit CT-1

Zur Überprüfung der Auswirkung von CT-1 auf den Phänotyp der EBs, wurden diese von Tag 4 bis 10 mit CT-1 in einer Konzentration von 1 bis 50 ng/ml behandelt (n = 3). Dies führt, wie in Abb.4.6 zu sehen, zu einer konzentrationsabhängigen Größenzunahme der EBs, die an Tag 10 bestimmt wurde. Dabei nimmt diese unter Behandlung mit 25 und 50 ng/ml CT-1 mit $154\pm 5\%$ und $178\pm 12\%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant zu.

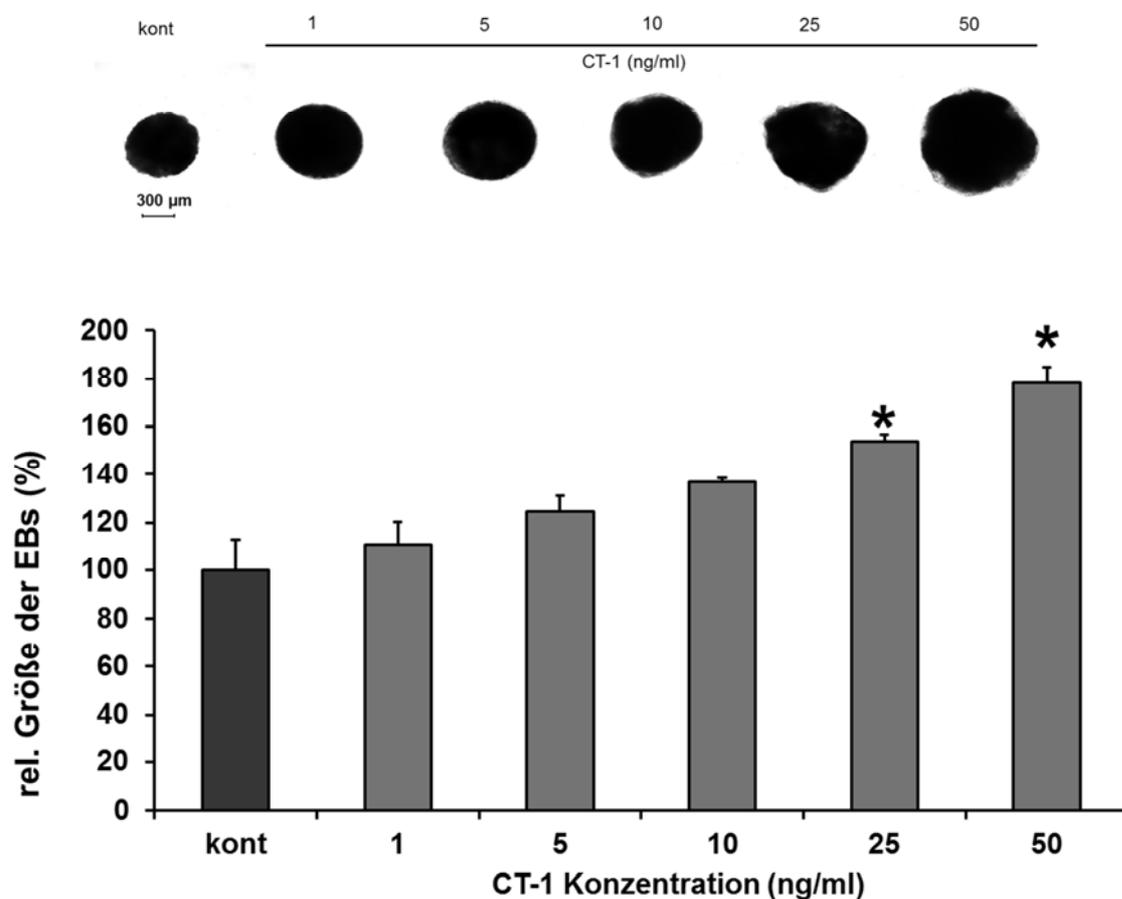


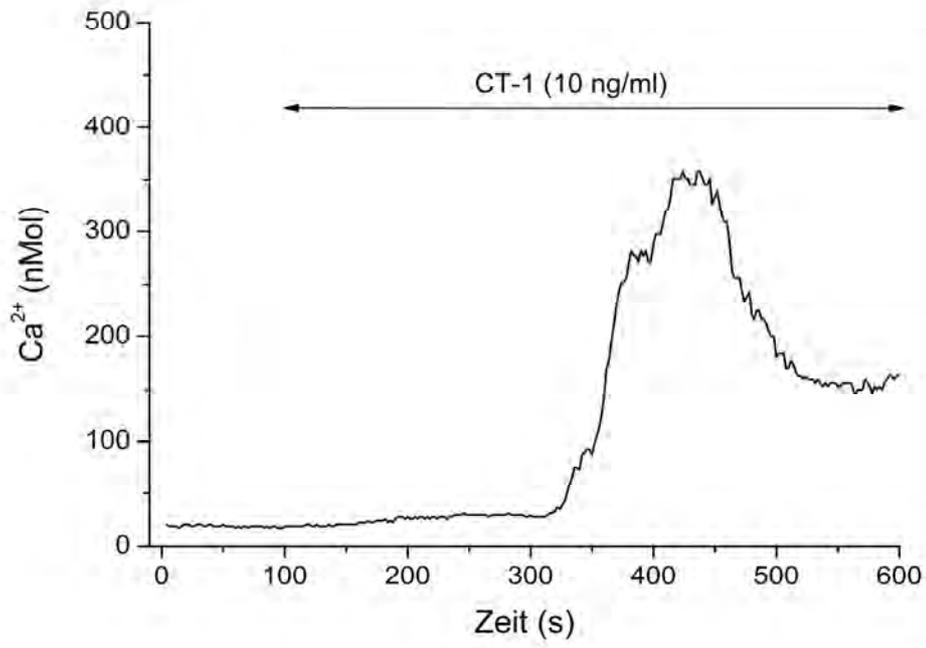
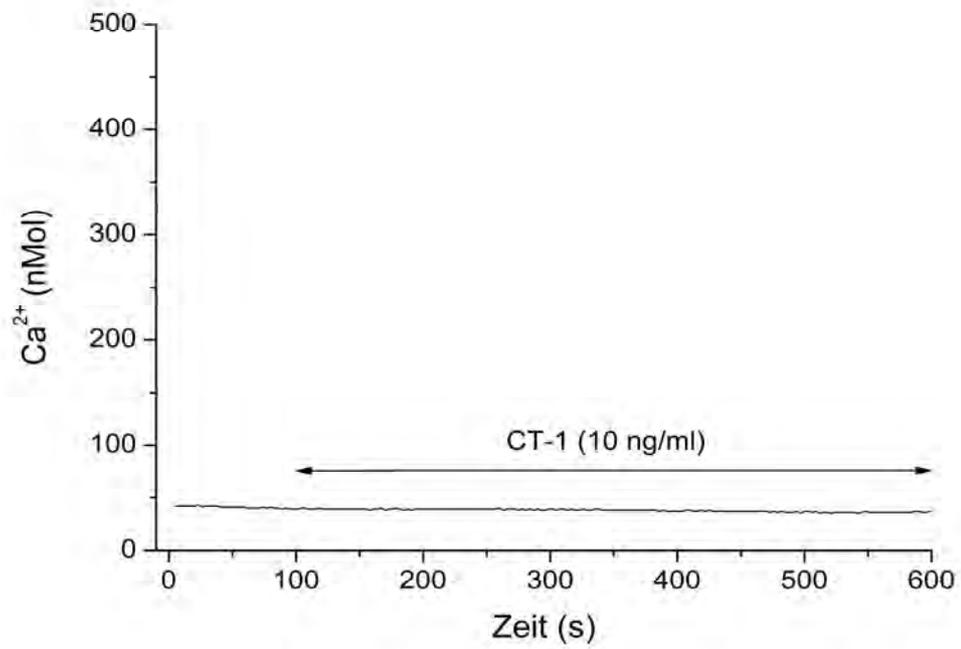
Abb.4.6: Konzentrationsabhängige Größenzunahme von EBs unter CT-1 Behandlung. Der obere Bildteil zeigt repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von EBs unter Behandlung mit CT-1. Der untere Bildteil zeigt Balkendiagramme von n = 3 unabhängigen Experimenten. EBs wurden von Tag 4 bis 10 mit CT-1 in Konzentrationen von 1-50 ng/ml behandelt. Die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. MW±SD, n = 3, *p<0,001 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.7 Einfluss von CT-1 auf die Generierung intrazellulärer Signalmoleküle

Kalzium, ROS und NO spielen als intrazelluläre Signalmoleküle in Bezug auf Proliferations- und Differenzierungsvorgänge eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass geringe ROS- und NO-Spiegel die kardiale Differenzierung in ES-Zellen fördern, so dass im Folgenden der Einfluss von CT-1 auf die Generierung von intrazellulärem Kalzium, ROS und NO untersucht werden soll.

4.7.1 Entstehung intrazellulärer Kalzium Transienten unter CT-1 Behandlung

Sich differenzierende Kardiomyozyten zeigen intrazelluläre Kalziumfluktuationen (Sauer et al., 2001a). In der vorliegenden Studie sollte die Wirkung von CT-1 auf die intrazelluläre Kalzium Freisetzung untersucht werden. Dazu werden Zellen an Tag 3 der Differenzierung zu einem Monolayer ausplattiert und an Tag 4, wie unter 3.5.1 beschrieben, mit dem zellpermeablen Farbstoff Fluo4-AM (5 μM) gefärbt und die entstehenden Kalzium Transienten unter Behandlung mit CT-1 mit Hilfe der Leica Software im Live Data Mode aufgezeichnet. Abb. 4.7.1. (A-D) zeigt die repräsentativen Kalziumspuren einer Zelle. Während eines Versuches wurden jeweils 20 Zellen markiert und die Kalziumfreisetzung über einen Zeitraum von 600 sec, mit einem Aufnahmetakt von 2 sec, aufgezeichnet. Wie in Abb.4.7.1.A zu sehen, kommt es circa 200 s nach Zugabe von CT-1 (10 ng/ml) zu einer starken Freisetzung von intrazellulärem Kalzium (n = 5). Dieser Effekt kann durch eine 1 stündige Vorinkubation der Zellen mit dem intrazellulären Kalzium Chelator BAPTA (10 μM) komplett inhibiert werden (Abb.4.7.1.B) (n = 3). Durch Verwendung des SERCA Inhibitors Thapsigargin (0,04 μM) werden die intrazellulären Kalzium Speicher entleert und die Entstehung eines Kalziumtransienten unter CT-1 Behandlung bleibt aus (Abb.4.7.1.C) (n = 3). Dies spricht für den Wirkmechanismus einer intrazellulären Kalzium Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Anschließend werden, durch die Verwendung eines Kalzium-freien Puffers, extrazellulär Kalzium-freie Konditionen geschaffen. Unter diesen Bedingungen bleibt die Entstehung des Kalzium Transienten unter CT-1 Behandlung aus (Abb. 4.7.1.D) (n = 3).

A**B**

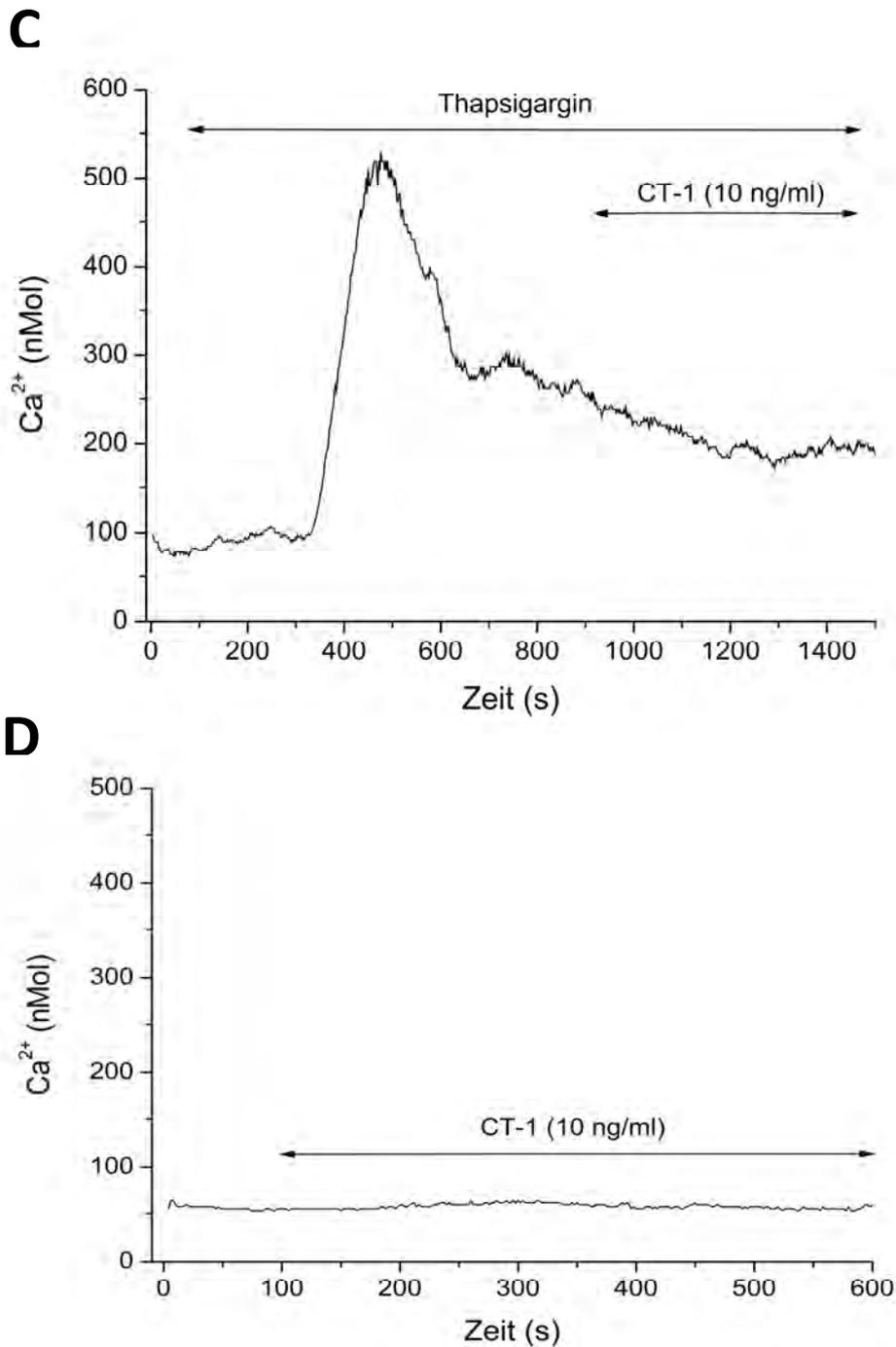


Abb.4.7.1: Intrazelluläre Kalzium Freisetzung nach CT-1 Behandlung. Die Graphen zeigen repräsentative Kalziumspuren von jeweils einer ES-Zelle an Tag 4 der Differenzierung. A) Transientes Kalziumsignal nach Zugabe von CT-1 (10 ng/ml) (n = 5). B) Ausbleiben des Kalziumsignals nach Vorbehandlung der Zellen für 1 h mit dem intrazellulären Kalzium Chelator BAPTA (10 μM) (n = 3). C) Nach vorangegangener Entleerung der intrazellulären Kalzium Speicher durch Behandlung der Zellen mit dem SERCA Hemmstoff Thapsigargin (0,04 μM) bleibt die Entstehung eines Kalziumtransienten nach CT-1 Zugabe aus (n = 3). D) unter Kalzium-freien Bedingungen bleibt die Entstehung eines Kalzium Transienten aus (n = 3). Die entstehenden Kalzium Transienten wurden mit der Leica Software im Live Data Mode aufgezeichnet.

4.7.2 Generierung von ROS nach CT-1 Behandlung

Geringe ROS-Spiegel fördern die kardiale und vaskuläre Differenzierung in EBs (Sauer und Wartenberg, 2005). Zur Untersuchung der CT-1 vermittelten intrazellulären Generierung von ROS wurden EBs an Tag 4 der Differenzierung aus der Spinnerflasche entnommen und, wie unter 3.5.2 beschrieben, gefärbt. Im Zeitverlauf von 5 bis 480 min wurde nach Behandlung mit CT-1 (n = 6) die Entstehung der intrazellulären ROS mit Hilfe des konfokalen Mikroskops aufgezeichnet. Wie in Abb.4.7.2 zu sehen, kommt es 5 bis 15 min nach Zugabe von CT-1 (10 ng/ml) zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären ROS ($308 \pm 28\%$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (normiert auf 100%). Im weiteren Verlauf verbleiben die intrazellulären ROS Spiegel auf einem erhöhten Niveau.

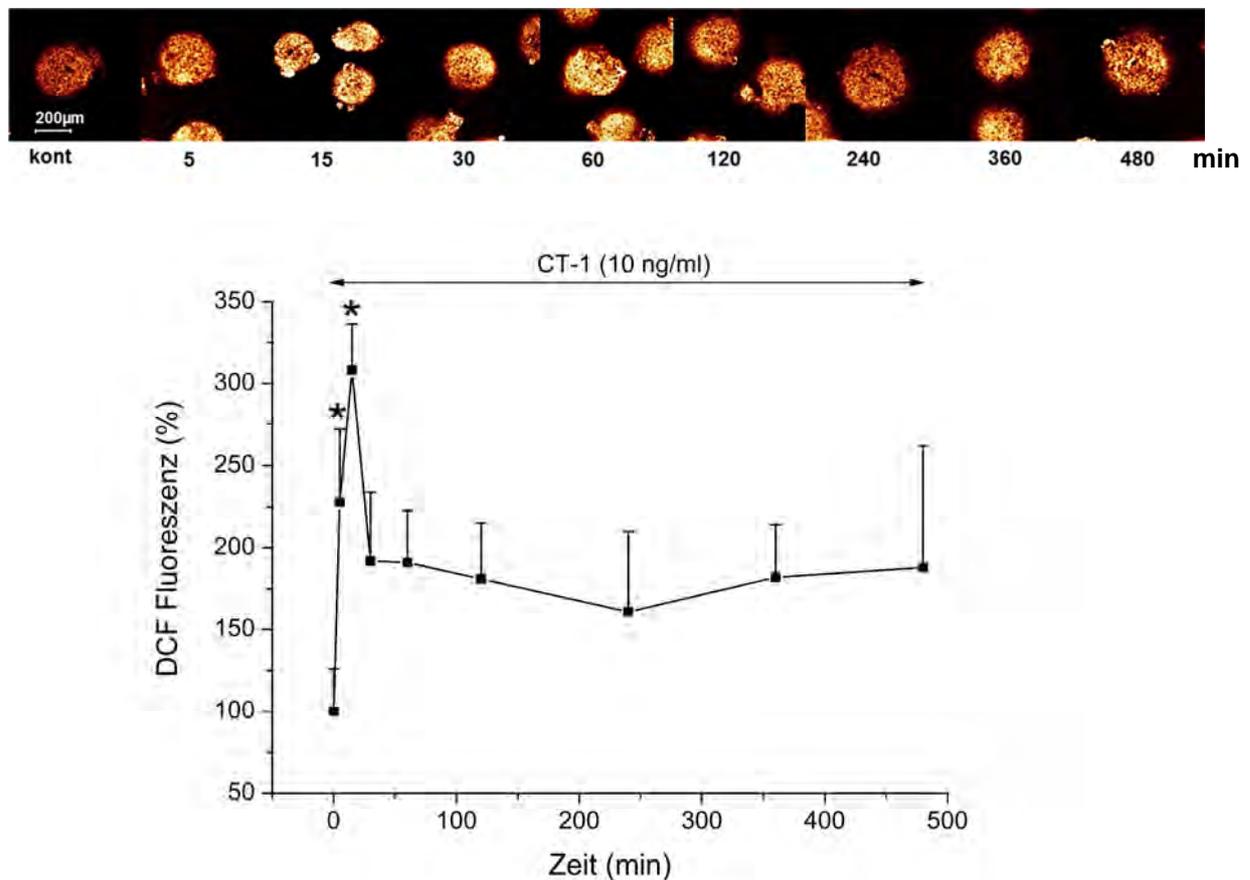


Abb.4.7.2: Generierung von intrazellulären ROS in EBs an Tag 4 der Differenzierung nach Behandlung mit CT-1. Tag 4 EBs wurden mit CT-1 (10 ng/ml) behandelt und die DCF-Fluoreszenz über einen Zeitraum von 5-480 min aufgezeichnet. Der obere Bildteil zeigt repräsentative DCF-Färbungen, der untere Bildteil ein Kurvendiagramm aus n = 6 unabhängigen Experimenten. MW \pm SD, *p<0,001 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.7.3 Einfluss von CT-1 auf die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase und Generierung von NO

Frühere Studien haben gezeigt, dass die exogene Exposition gegenüber NO die kardiale Differenzierung in ES-Zellen der Maus stimuliert (Kanno et al., 2004).

4.7.3.1 Generierung von NO unter CT-1 Behandlung

Zur Überprüfung des Einflusses von CT-1 auf die intrazelluläre Generierung von NO wurden 4 Tage alte EBs aus der Spinnerflasche entnommen und wie unter 3.5.3 beschrieben mit dem NO Indikator DAF-DA gefärbt. Im Zeitverlauf von 5 bis 480 min wurde unter Zugabe von CT-1 (10 ng/ml) (n = 5) die Entstehung von intrazellulärem NO mit Hilfe des konfokalen Mikroskops aufgezeichnet. Unter Behandlung mit CT-1 kommt es nach 60-120 min zu einem maximalen Anstieg von intrazellulärem NO auf $377 \pm 53\%$, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

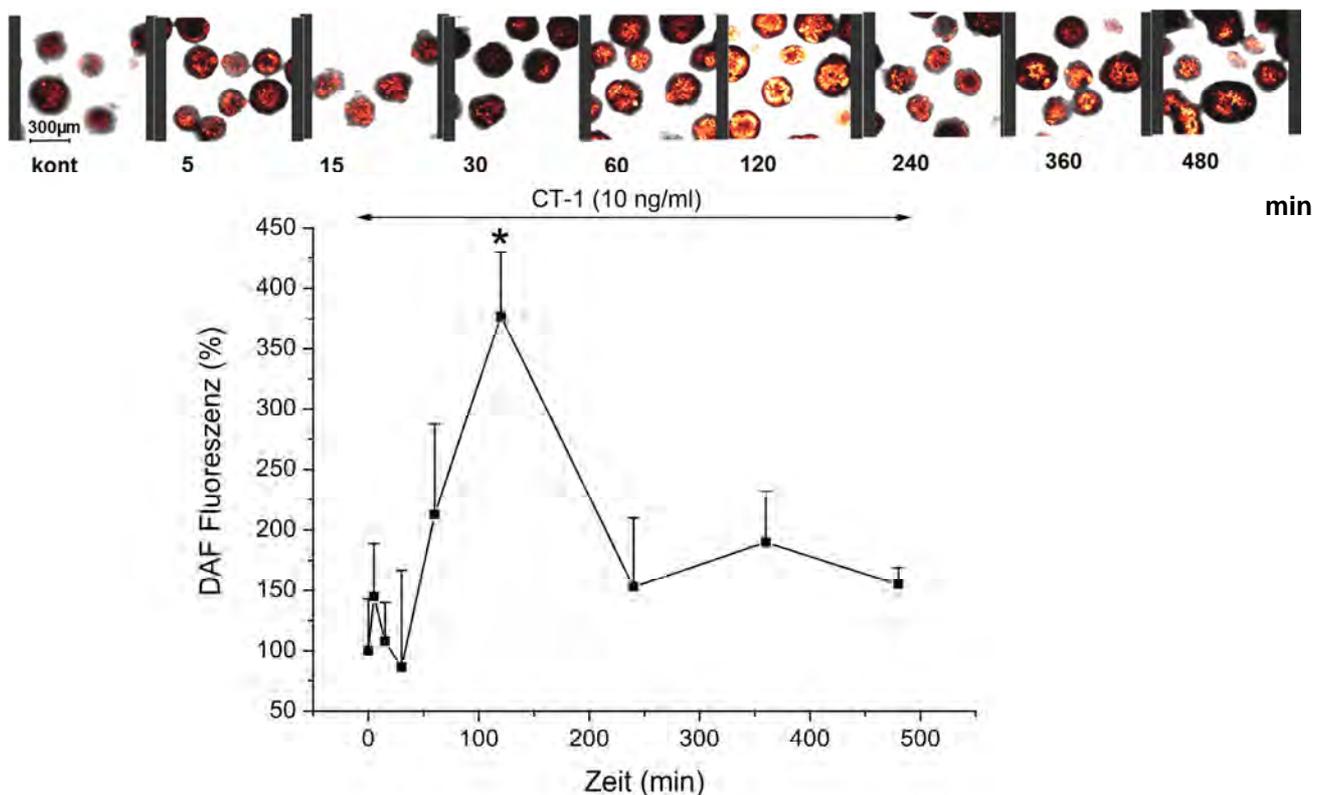


Abb.4.7.3.1: Generierung von intrazellulärem NO in EBs nach Behandlung mit CT-1. Im oberen Bildteil werden repräsentative Überlagerungsbilder einer Transmissionsaufnahme (grauschwarz) und eines Fluoreszenzbildes, der DAF-Fluoreszenz, gezeigt. Der untere Bildteil zeigt ein Kurvendiagramm aus n = 4 unabhängigen Experimenten. EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung mit CT-1 (10 ng/ml) behandelt und die DAF-Fluoreszenz über einen Zeitraum von 5-480 min aufgezeichnet. MW \pm SD, n = 4, *p<0,001 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.7.3.2 Phosphorylierung der eNOS nach CT-1 Behandlung

Man unterscheidet 3 Isoformen der NOS, die aus der Aminosäure L-Arginin NO generieren. Die Hauptisoform im sich entwickelnden Herzen stellt die eNOS dar (Bloch et al.,1999). Zur Versuchsdurchführung wurden EBs an Tag 4 der Differenzierung aus der Spinnerflasche entnommen und für eine Zeit von 5 bis 360 min mit CT-1 (10ng/ml) inkubiert. Im Anschluss wurden die Proteine extrahiert und die eNOS Phosphorylierung mittels Western Blot untersucht. Ein signifikanter Anstieg der eNOS-Phosphorylierung erfolgt bereits 15 min (213±37%) nach Behandlung mit CT-1 (Abb.4.7.3.2) (n = 4). Im weiteren Verlauf wird deutlich, dass die Phosphorylierung der eNOS bis 240 min nach CT-1 Behandlung relativ konstant bleibt.

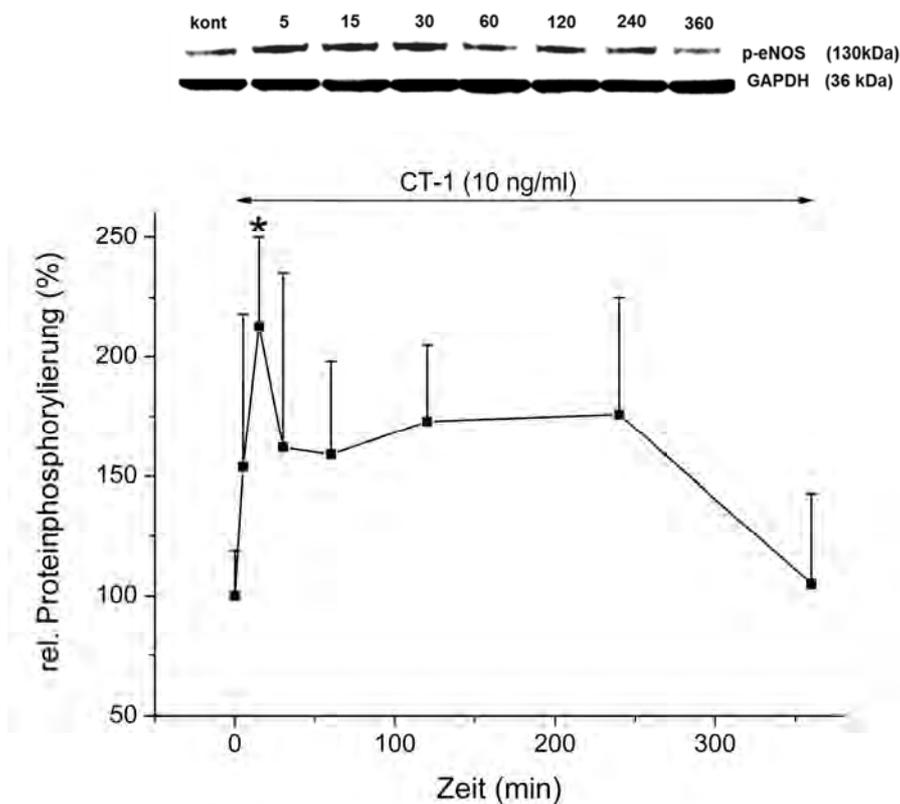


Abb.4.7.3.2: Phosphorylierung der eNOS nach CT-1 Behandlung. Die obere Bildhälfte zeigt repräsentative Western Blots der eNOS Phosphorylierung. Im unteren Bildteil ist der Verlauf der eNOS-Phosphorylierung in einem Kurvendiagramm aus n = 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. EBs Tag 4 wurden für einen Zeitraum von 5-360 min mit CT-1 (10 ng/ml) behandelt und die eNOS Phosphorylierung mittels Western Blot untersucht. Der Expressionsnachweis von GAPDH diente als interne Kontrolle. MW±SD, n = 4, *p<0,01 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.8 Translokation von CT-1 in den Zellkern

In Vorarbeiten unserer Gruppe wurde gezeigt, dass es bei einer Stimulation mit chemischer und physiologischer Hypoxie zu einer Translokation von internem, zellulärem CT-1 in den Zellkern kommt (Ateghang, 2006). Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von CT-1 vor und nach Stimulation der isolierten Kardiomyozyten mit CT-1 und Hypoxie wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten mit CT-1 (10ng/ml) und Hypoxie (1%) behandelt. Hierzu wurden Kardiomyozyten aus stark kontrahierenden EBs an Tag 8 der Differenzierung, wie unter 3.3 beschrieben isoliert und zu einem Monolayer ausplattiert. Nach 2 Tagen, demzufolge an Tag 10 der Differenzierung, wurden die subkonfluent gewachsenen Zellen für die folgenden Versuche verwendet. Zur Identifizierung der Kardiomyozyten erfolgte im Anschluss eine immunhistochemische Färbung gegen die Sarkomerstruktur α -Aktinin. Des Weiteren wurde intrazelluläres CT-1 angefärbt und eine Kernfärbung mit dem Farbstoff DRAQ[®] durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Analysesoftware Metamorph durch Berechnung des Kern zu Zytoplasma Verhältnisses von CT-1.

4.8.1 Translokation von CT-1 in den Zellkern nach Behandlung mit exogenem CT-1

CT-1 ist unter Kontrollbedingungen, wie in Abb. 4.8.1 deutlich zu sehen, vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Nach Behandlung mit exogenem CT-1 ist eine signifikante Verlagerung von intrazellulärem CT-1 in den Zellkern zu erkennen. Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von CT-1 wurden Kardiomyozyten, wie unter 3.3 beschrieben, isoliert und anschließend über einen Zeitraum von 1 bis 6 h mit CT-1 (10 ng/ml) behandelt (n = 9). Wie in Abb.4.8.1 zu sehen, steigt die nukleäre CT-1 Konzentration kontinuierlich nach CT-1 Behandlung an. Dies ist sowohl in Kardiomyozyten als auch Nicht-Kardiomyozyten (NK) zu beobachten. Maximale Werte werden nach 2-stündiger CT-1 Behandlung in Kardiomyozyten (243±68%), und in Nicht-Kardiomyozyten (211±68%) erreicht.

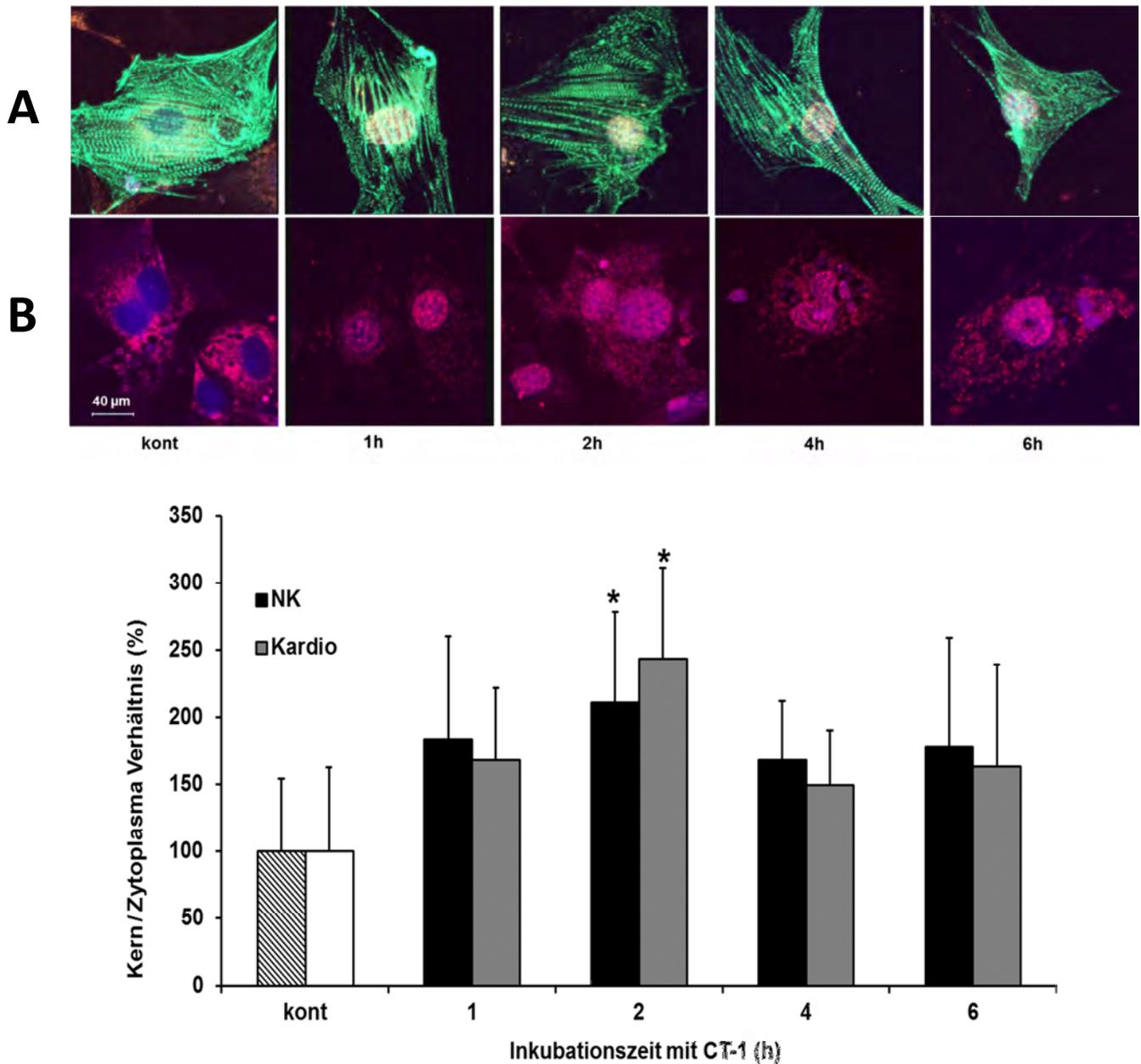


Abb.4.8.1: Translokation von CT-1 in den Zellkern nach Behandlung mit exogenem CT-1 (10 ng/ml) in Kardiomyozyten (A) und Nicht-Kardiomyozyten (B). Zeitverlauf der nukleären Translokation von CT-1. Die Zellen verblieben unbehandelt (kont) oder wurden für 1,2,4 und 6h mit CT-1 (10 ng/ml) behandelt. Kardiale und Nichtkardiale Zellen wurden aus EBs an Tag 8 der Differenzierung durch enzymatische Dissoziation gewonnen und mit CT-1 (10 ng/ml) behandelt. Im Folgenden wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch gegen CT-1 (orange/rot) gefärbt. Zur Identifizierung der Kardiomyozyten erfolgte gleichzeitig eine Färbung gegen die Sarkomerstruktur α -Aktinin (grün). Zellkerne wurden mit DRAQ5 (blau) angefärbt. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Fluoreszenzbilder von Kardiomyozyten (A) und Nicht-Kardiomyozyten (B). Die Maßstabsskala entspricht 40 μ m. Der untere Bildteil zeigt ein Balkendiagramm des Kern/Zytoplasma Verhältnisses(%) von CT-1 aus n = 9 unabhängigen Experimenten. MW \pm SD, *p<0,01 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.8.2 Translokation von intrazellulärem CT-1 in den Zellkern nach Behandlung mit Hypoxie (1% O₂)

Ein vergleichbarer Effekt der nukleären Translokation von CT-1 wird durch Inkubation der Kardiomyozyten unter Hypoxie (1% O₂) erreicht. Entsprechend der vorherigen Ergebnisse findet auch hier sowohl in Kardiomyozyten als auch Nicht-Kardiomyozyten ein sichtlicher Transport von CT-1 vom Zytoplasma in den Zellkern statt (Abb.4.8.2). Die repräsentativen Fluoreszenzbilder zeigen eine deutliche Zunahme der CT-1 Färbung im Zellkern mit Maxima nach 2 bis 4 h Hypoxie (n = 6). Im Hinblick auf die Stärke des Effektes lässt sich eine Steigerung des CT-1 Nukleus zu Zytoplasma Verhältnisses in Kardiomyozyten auf 203±48% und in Nicht-Kardiomyozyten auf 184±47% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle feststellen.

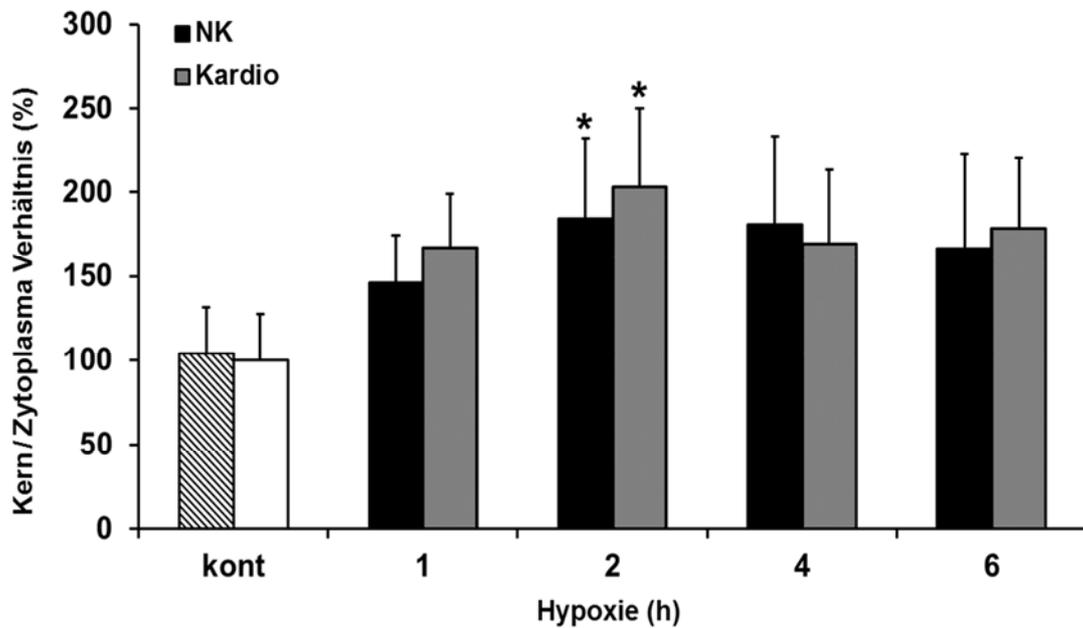
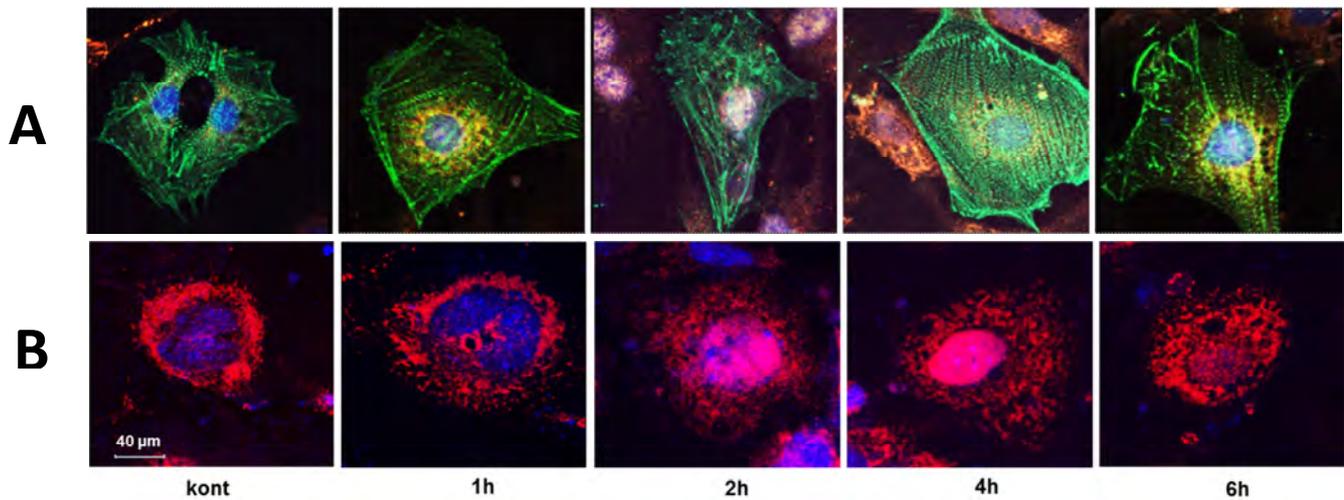


Abb. 4.8.2: Translokation von CT-1 in den Zellkern nach Inkubation in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂). Zeitverlauf der nukleären Translokation von CT-1. Kardiale und Nichtkardiale Zellen wurden aus EBs an Tag 8 der Differenzierung durch enzymatische Dissoziation gewonnen und blieben unbehandelt (kont) oder wurden für 1,2,4 und 6 h unter hypoxischen Konditionen (1% O₂) inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch gegen CT-1 (orange/rot) gefärbt. Zur Identifizierung der Kardiomyozyten erfolgte gleichzeitig eine Färbung gegen die Sarkomerstruktur α-Aktinin (grün). Zellkerne wurden mit DRAQ5 (blau) angefärbt. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Fluoreszenzbilder von Kardiomyozyten (A) und Nicht-Kardiomyozyten (B). Die Maßstabsskala entspricht 40 μm. Der untere Bildteil zeigt ein Balkendiagramm des Kern/Zytoplasma Verhältnisses (%) von CT-1 aus n = 7 unabhängigen Experimenten. MW±SD, *p<0,01 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.9 Hemmung der Kerntranslokation von CT-1

Zur Überprüfung der Hypothese, inwiefern die zuvor gemessenen Signalmoleküle Kalzium, ROS und NO mit dem Vorgang der Kerntranslokation von CT-1 aus dem Zytoplasma in den Zellkern in Zusammenhang stehen, wurden die Zellen 1 h vor Behandlung mit dem intrazellulären Kalzium Chelator BAPTA (5 μM), dem Radikalfänger NMPG (100 μM) und dem NO-Synthase Inhibitor L-NAME (50 μM) vorinkubiert.

4.9.1 Inhibition der Translokation von CT-1 in den Zellkern nach Behandlung mit exogenem CT-1 durch Vorbehandlung mit BAPTA, NMPG und L-NAME

Aufgrund des maximalen Effektes der Kerntranslokation nach 2 stündiger CT-1 Behandlung (Abb.4.8.1) erfolgt die Inkubation mit CT-1 im folgenden Versuch für jeweils 2 h. Erneut ist eine Translokation von CT-1 in den Zellkern nach 2-stündiger Behandlung mit CT-1 (10 ng/ml) deutlich (Abb.4.9.1). Indes kann dieser Effekt durch Vorbehandlung mit dem intrazellulärem Kalzium Chelatbildner BAPTA (5 μM), dem Radikalfänger NMPG (100 μM) und dem NOS-Inhibitor L-NAME (50 μM) deutlich inhibiert werden ($n = 4$). Wie in Abb.4.9.1 zu sehen, wird intrazelluläres CT-1 sowohl in Kardiomyozyten als auch in Nicht-Kardiomyozyten in den mit den Hemmstoffen behandelten Zellen nicht mehr in den Kern transloziert, sondern verbleibt im Zytoplasma.

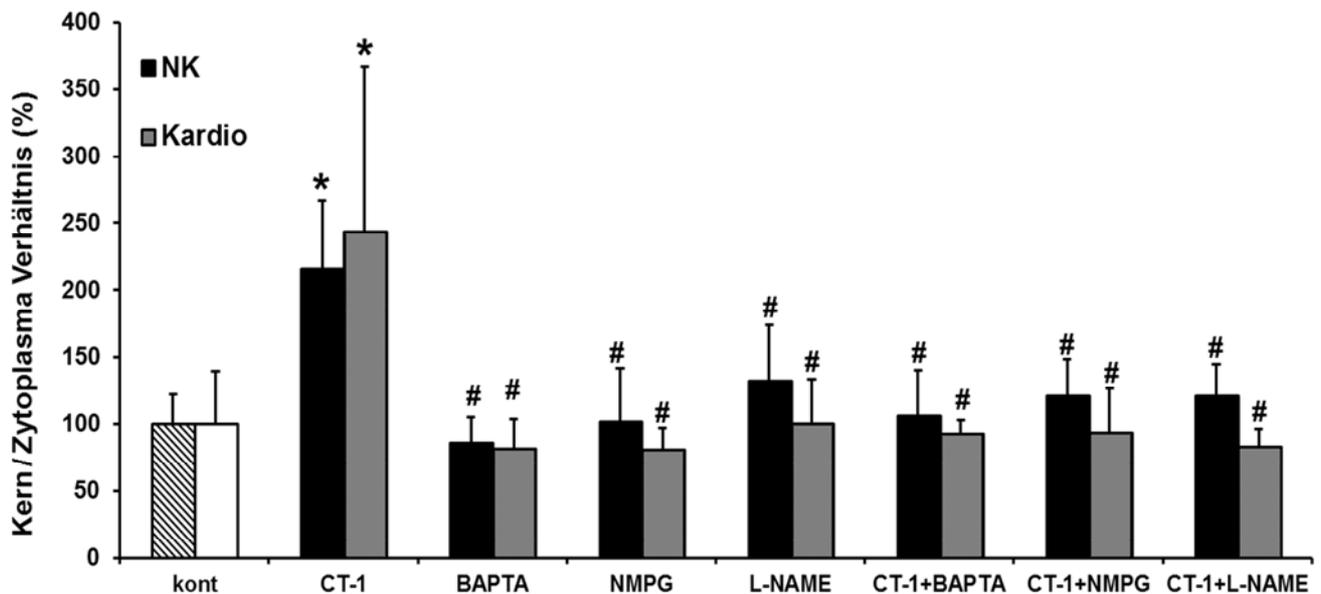
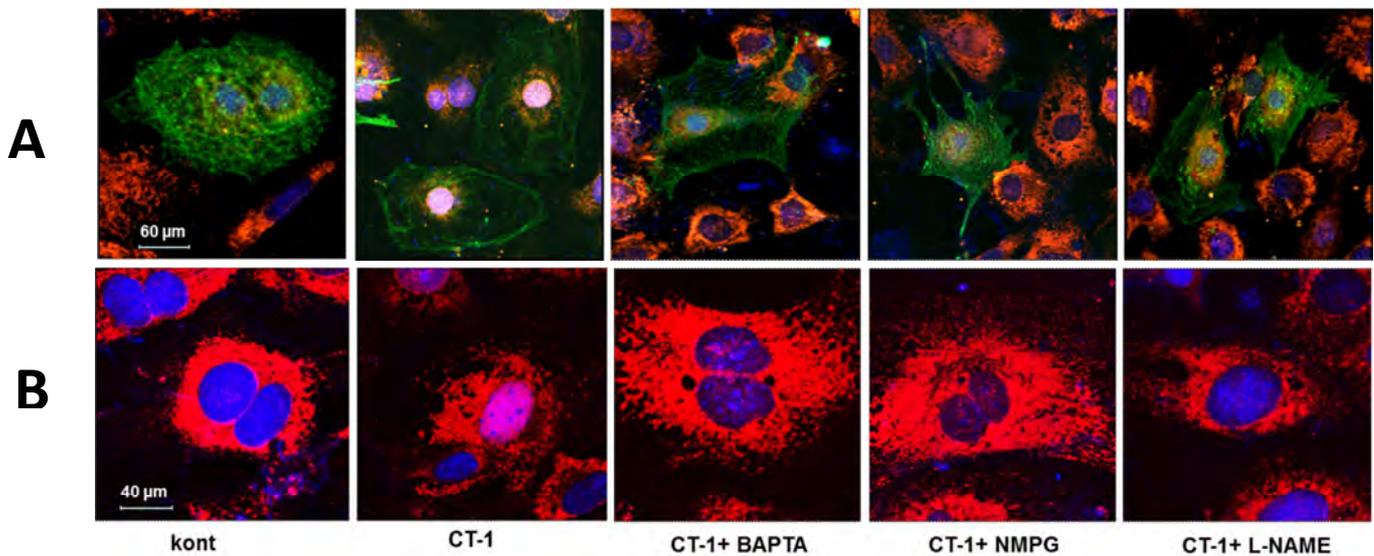


Abb.4.9.1: Inhibition der Translokation von CT-1 in den Zellkern nach CT-1 Behandlung durch Vorinkubation mit BAPTA, NMPG und L-NAME. Die repräsentativen Fluoreszenzbilder im oberen Bildteil zeigen eine Dreifachfärbung gegen α -Aktinin (grün), CT-1 (orange/rot) und die Kernfärbung DRAQ5 (blau). Die Maßstabsskala entspricht 60 μ m (A) und 40 μ m (B). Nach Präinkubation der Zellen für 1 h mit dem intrazellulärem Kalzium Chelatbildner BAPTA (5 μ M), dem Radikalfänger NMPG (100 μ M) und dem NOS-Inhibitor L-NAME (50 μ M) verbleibt CT-1 sowohl in Kardiomyozyten (A), als auch in Nicht-Kardiomyozyten (B) vorwiegend im Zytoplasma. Das Balkendiagramm in der unteren Bildhälfte zeigt das Kern/Zytoplasma Verhältnis (%) aus n = 4 unabhängigen Experimenten. Die Zellen blieben unbehandelt (kont) oder wurden in An- und Abwesenheit von CT-1 (10 ng/ml) mit BAPTA, NMPG und L-NAME behandelt. MW \pm SD, n = 4, *p<0,01 vs. unbehandelte Kontrolle, #p<0,05 vs. CT-1 behandelte Probe.

4.9.2 Inhibition der Translokation von CT-1 in den Zellkern nach Hypoxie (1% O₂) durch Vorbehandlung mit BAPTA, NMPG und L-NAME

Des Weiteren kann die unter Hypoxie (1% O₂) stimulierte CT-1 Kerntranslokation durch Vorbehandlung mit den Inhibitoren BAPTA (5 µM), NMPG (100 µM) und L-NAME (50 µM) signifikant gehemmt werden (Abb.4.9.2) (n = 5). Dabei wird die Translokation sowohl in Kardiomyozyten (A) als auch in Nicht-Kardiomyozyten (B) gehemmt.

Die aus EBs an Tag 8 der Differenzierung gewonnenen Einzelzellen wurden für 1 h mit den oben genannten Hemmstoffen vorinkubiert und nach 2 stündiger Inkubation unter hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) erfolgte die Fixierung und Immunhistochemische Färbung gegen α-Aktinin (grün), CT-1 (orange/rot) und eine Kernfärbung mit DRAQ5 (blau).

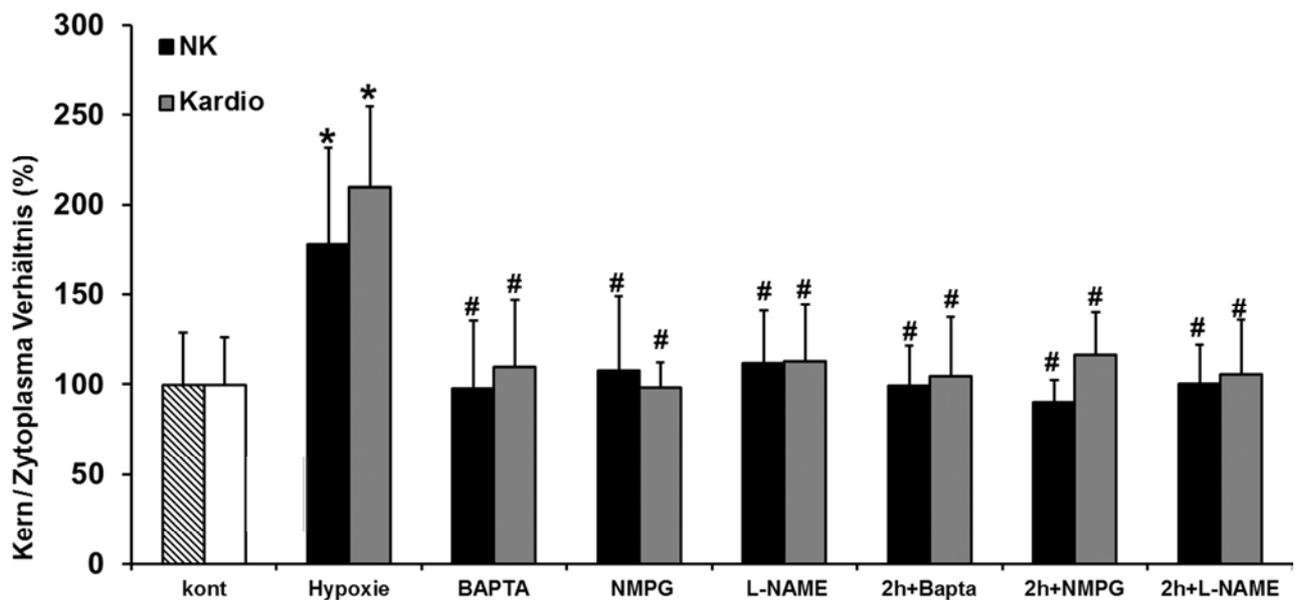
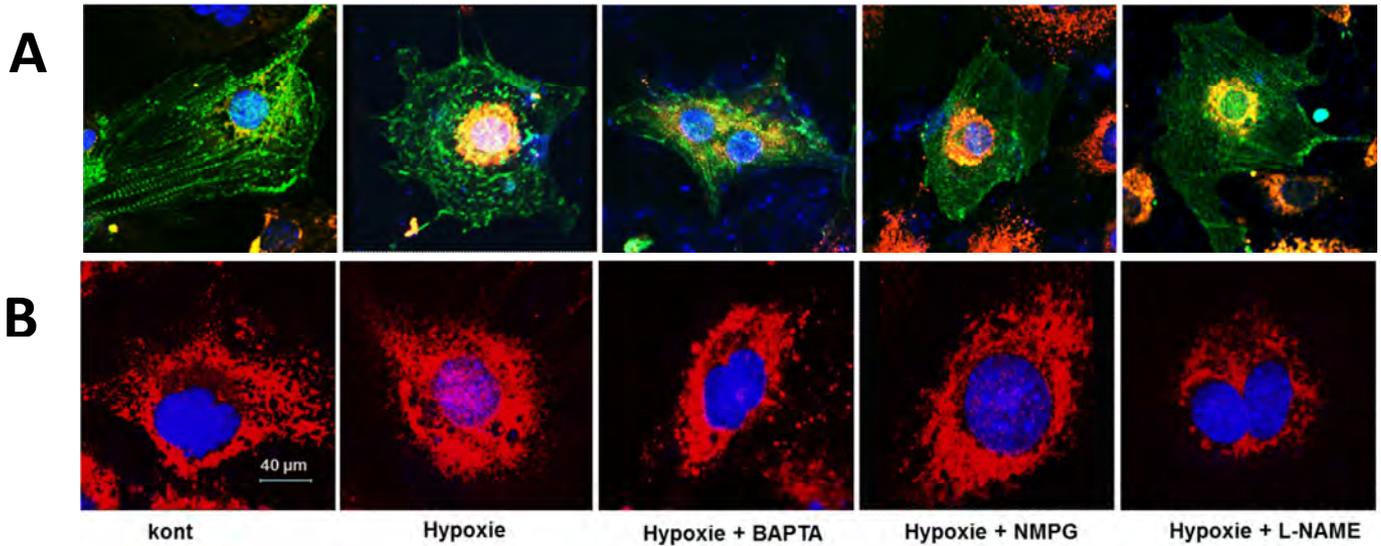


Abb.4.9.2: Aufhebung der Kerntranslokation von CT-1 unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) in Gegenwart der Inhibitoren BAPTA, NMPG und L-NAME. Die repräsentativen Fluoreszenzbilder im oberen Bildteil zeigen eine Dreifachfärbung gegen α -Aktinin (grün), CT-1 (orange/rot) und die Kernfärbung DRAQ5 (blau). Die Maßstabsskala entspricht 40 μ m. Nach Präinkubation der Zellen für 1h mit dem intrazellulärem Kalzium Chelatbildner BAPTA (5 μ M), dem Radikalfänger NMPG (100 μ M) und dem NOS-Inhibitor L-NAME (50 μ M) verbleibt CT-1 sowohl in Kardiomyozyten (A), als auch in Nicht-Kardiomyozyten (B) vorwiegend im Zytoplasma. Die untere Bildhälfte zeigt ein Balkendiagramm des Kern/Zytoplasma Verhältnisses (%) aus n = 5 unabhängigen Experimenten. Die Zellen blieben unbehandelt (kont) oder wurden in An- und Abwesenheit von Hypoxie (1% O₂) mit BAPTA, NMPG und L-NAME behandelt. MW \pm SD, n = 5, *p<0,01 vs. unbehandelte Kontrolle, #p<0,05 vs. hypoxische Probe.

4.10 Einfluss der Hemmstoffe BAPTA, NMPG und L-NAME auf die Kardiomyogenese

4.10.1 Abnahme der Größe und Anzahl kontrahierender Areale

Zur Überprüfung der Fragestellung, ob die unter CT-1 Behandlung generierten Signalmoleküle Kalzium, ROS und NO von Bedeutung für die Kardiomyogenese sind, wurden EBs von Tag 4 bis 10 mit dem Kalzium Chelator BAPTA (10 μ M), dem Radikalfänger NMPG (100 μ M) und dem NO-Synthase Inhibitor L-NAME (50 μ M), sowie jeweils in Kombination mit CT-1 (10 ng/ml) behandelt. Dabei erfolgte die Vorinkubation der Hemmstoffe 1 h vor Behandlung mit CT-1. Anschließend wurde die Anzahl der kontrahierenden Areale gezählt (n = 8) und die Größe der Areale durch eine immunhistochemische Färbung gegen α -Aktinin (n = 4) bestimmt. Die ausschließlich mit BAPTA, NMPG und L-NAME, sowie in Kombination mit CT-1 behandelten Zellen zeigen im Vergleich zur CT-1 Gruppe eine verringerte Anzahl kontrahierender Areale, sowie eine reduzierte Größe der α -Aktinin positiven Areale. Unter Behandlung mit CT-1 (10 ng/ml) kommt es, analog zu Versuch 4.5, zu einem Anstieg der Anzahl kontrahierender Areale $188\pm 57\%$ und Arealgröße $240\pm 27\%$, während dieser Effekt in den in Kombination mit CT-1 und Hemmstoffen behandelten Zellen ausbleibt. Die Anzahl der kontrahierenden Areale wird mit Werten von: $68\pm 43\%$ (BAPTA+CT-1), $70\pm 22\%$ (NMPG+CT-1) und $61\pm 43\%$ (L-NAME+CT-1), signifikant im Vergleich zur CT-1 behandelten Gruppe gehemmt. Infolgedessen ist ebenso die Arealgröße mit Werten von: $76\pm 52\%$ (BAPTA+CT-1), $73\pm 22\%$ (NMPG+CT-1) und $62\pm 24\%$ (L-NAME+CT-1) gegenüber der mit CT-1 behandelten Gruppe signifikant reduziert.

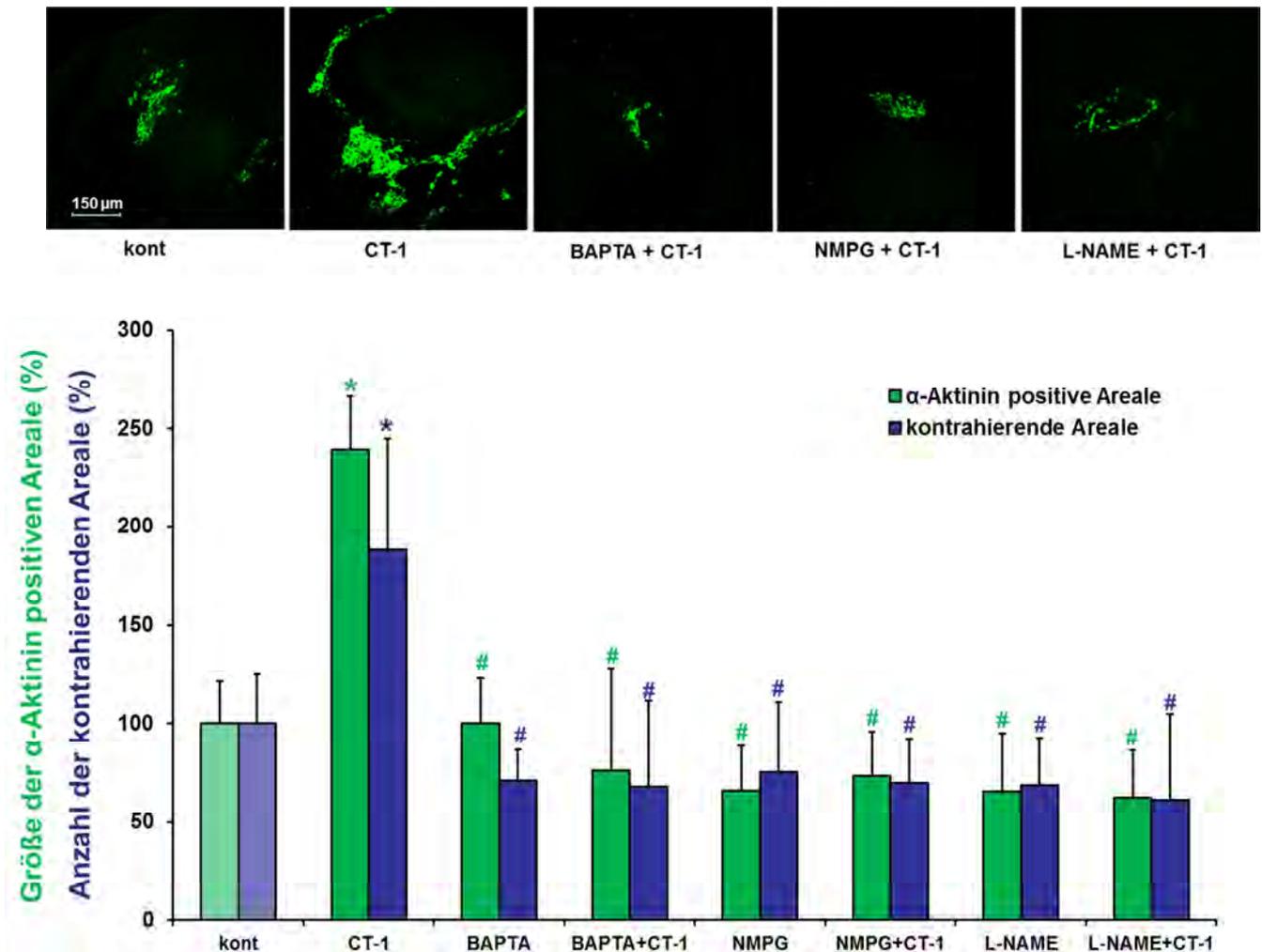
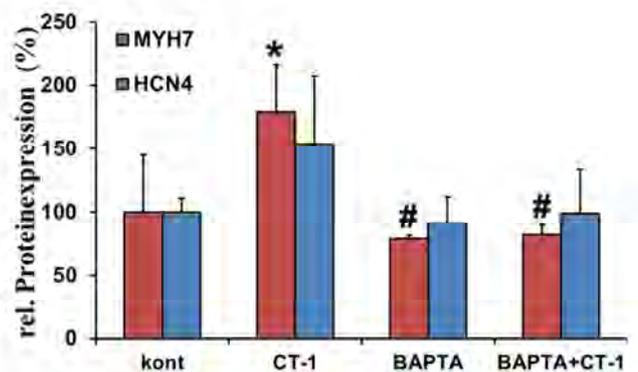
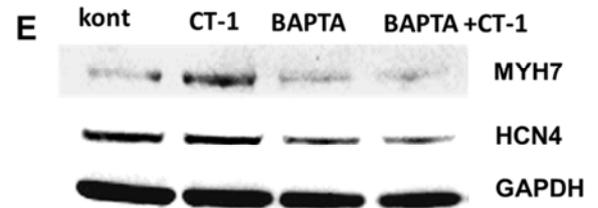
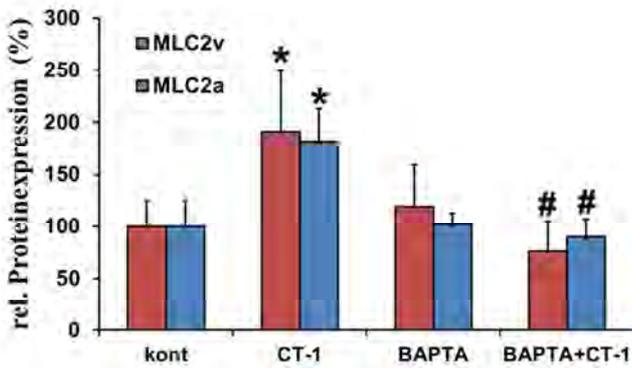
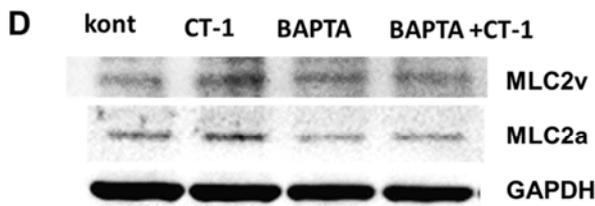
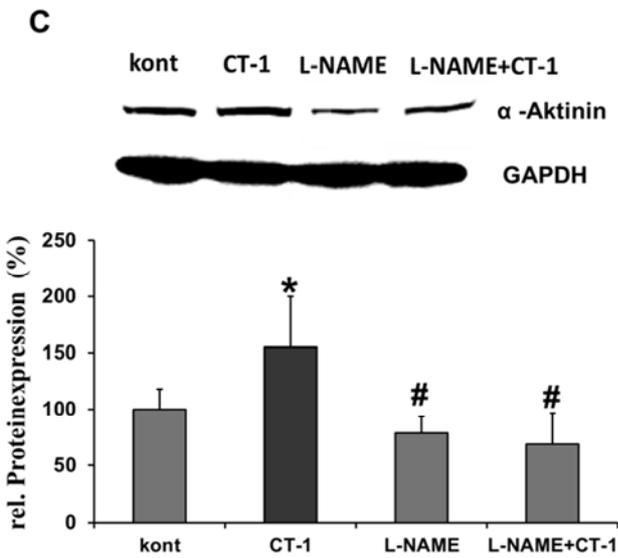
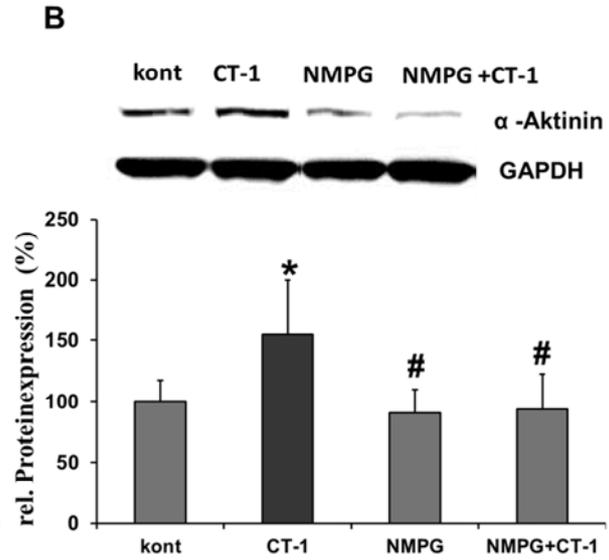
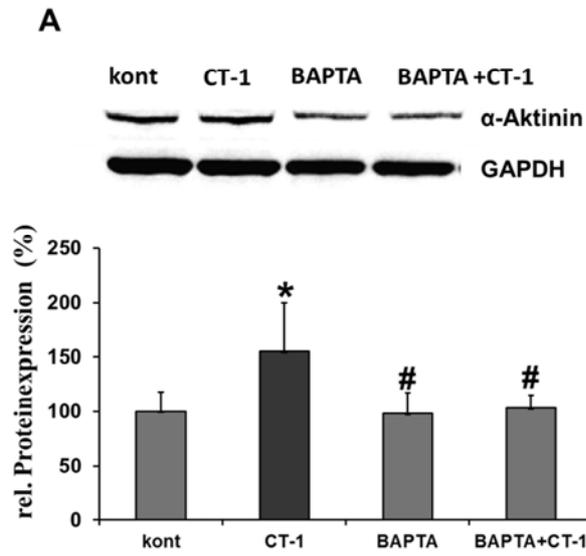


Abb.4.10.1: Hemmung der Kardiomyogenese durch Behandlung mit BAPTA, NMPG und L-NAME.

Die repräsentativen Fluoreszenzbilder im oberen Bildteil zeigen eine immunhistochemische Färbung gegen α -Aktinin (grün). Die Maßstabsskala entspricht 150 μ m. Die untere Bildhälfte zeigt ein Balkendiagramm der Größe der kardialen Areale (n = 4) (grüner Balken), sowie der Anzahl der kontrahierenden Areale (n = 8) (blauer Balken). EBs blieben unbehandelt (kont) oder wurden in An- und Abwesenheit von CT-1 (10 ng/ml) von Tag 4 - 10 mit dem intrazellulären Kalzium Chelatbildner BAPTA (10 μ M), dem Radikalfänger NMPG (100 μ M) und dem NOS-Inhibitor L-NAME (50 μ M) behandelt. MW \pm SD, *p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle, #P<0,05 vs. mit CT-1 behandelte Probe.

4.10.2 Abnahme der Expression kardialer Gene

Folglich ist von Interesse, inwieweit die Expression kardialer Gene durch die Behandlung mit dem Kalzium Chelator BAPTA, dem Radikalfänger NMPG und dem NO-Synthase Inhibitor L-NAME beeinflusst wird. Bei der Versuchsdurchführung wurden EBs an Tag 4 der Differenzierung aus der Spinnerflasche entnommen, für 48h mit den Hemmstoffen inkubiert und im Anschluss die Proteinexpression mittels Western Blot quantifiziert. Wie in Abb.4.10.2 zu sehen, wird die Expression der kardialen Gene α -Aktinin, MLC2v und MLC2a durch die Behandlung mit BAPTA, NMPG und L-NAME gehemmt (A (n = 6), B (n = 4), C (n = 4), D (n = 4), F (n = 3), H (n = 3)). Ebenso wird die Expression von MYH7 durch BAPTA und L-NAME herunterreguliert (E (n = 3), I (n = 3)), während NMPG keine Wirkung auf dieses Gen zu haben scheint (G (n = 3)). Der kardiale Marker für Schrittmacherzellen, HCN4, zeigt durch Behandlung mit dem Kalzium Chelator BAPTA und dem Inhibitor der NO-Synthase L-NAME eine verminderte Expression (E (n = 3), I (n = 3)).



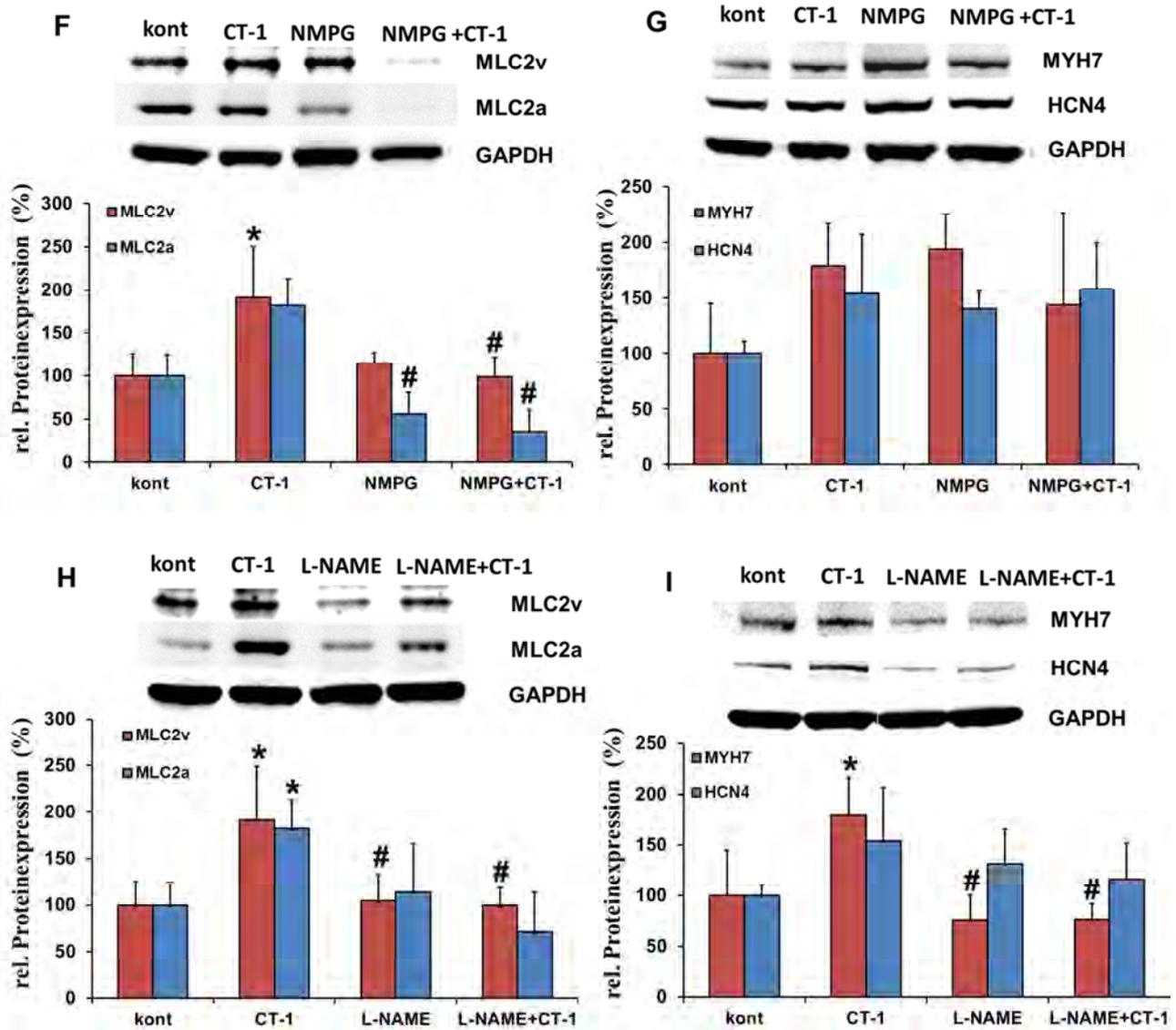


Abb.4.10.2: Western Blot Analyse der Expression kardialer Gene nach Behandlung mit dem intrazellulären Kalzium Chelator BAPTA, dem Radikalfänger NMPG und dem NO-Synthase Inhibitor L-NAME sowie CT-1. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Westernblots, die untere Bildhälfte Balkendiagramme der Proteinexpression der kardialen Marker. EBs blieben unbehandelt (kont) oder wurden in An- und Abwesenheit von CT-1 (10 ng/ml) von Tag 4 bis 6 mit BAPTA (10 μ M), NMPG (100 μ M) und L-NAME (50 μ M) behandelt. A) α -Aktinin (n = 6) Proteinexpression nach Behandlung mit BAPTA und CT-1, B) α -Aktinin (n = 4). Proteinexpression nach Behandlung mit NMPG und CT-1, C) α -Aktinin (n = 4). Proteinexpression nach Behandlung mit L-NAME und CT-1, D-E) MLC2a (n = 3), MLC2v (n = 3), HCN4 (n = 3) und MYH7 (n = 3). Proteinexpression nach Behandlung mit BAPTA und CT-1, F-G): MLC2a (n = 3), MLC2v (n = 3), HCN4 (n = 3) und MYH7 (n = 3). Proteinexpression nach Behandlung mit NMPG und CT-1, H-I): MLC2a (n = 3), MLC2v (n = 3), HCN4 (n = 3) und MYH7 (n = 3). Proteinexpression nach Behandlung mit L-NAME und CT-1. Dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. MW \pm SD, *p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle, #P<0,05 vs. mit CT-1 behandelte Probe.

4.11 Auswirkung der endogenen CT-1-Gen Inaktivierung durch si-RNA

Um die Relevanz von CT-1 auf die Kardiomyogenese, die Expression von Wachstumsfaktoren, kardialen Transkriptionsfaktoren und kardialen Genen zu untersuchen, wird die Expression von CT-1 infolge Gen-Inaktivierung durch Verwendung einer spezifischen CT-1 siRNA herunterreguliert.

4.11.1 Abnahme der CT-1 Expression nach CT-1 siRNA Behandlung

Zur Herstellung von CT-1 defizienten EBs wurden Stammzellen an Tag 0 der Differenzierung, wie unter 3.7 beschrieben, nach Elektroporation für 12 h mit dem CTF1 siRNA Oligo mit der Sequenz (5'→3'GGAGGAAUACGUGCAGCAAtt) inkubiert. Im Anschluss wurde aus den Zellen eine Spinnerflasche präpariert. Als Negativkontrolle dient hierbei die „scrambled“ Gruppe, bei der die Zellen mit einem Mix aus unspezifisch bindenden mRNAs inkubiert werden, während die 3. Spinnerflasche Zellen enthält, denen kein mRNA Oligo hinzugefügt wurde. Proteinproben wurden an Tag 4 der Differenzierung extrahiert und die Proteinexpression mittels Western Blot quantifiziert. Abb.4.11.1 zeigt die erfolgreiche Herunterregulation der CT-1 Expression in den CT-1 siRNA behandelten Zellen auf $39\pm 8\%$ im Vergleich zu den Kontrollgruppen Kontrolle $100\pm 19\%$ und scrambled $116\pm 23\%$. Die Proben wurden an Tag 4 der Differenzierung extrahiert und die Proteinexpression mittels Western Blot bestimmt (n = 3).

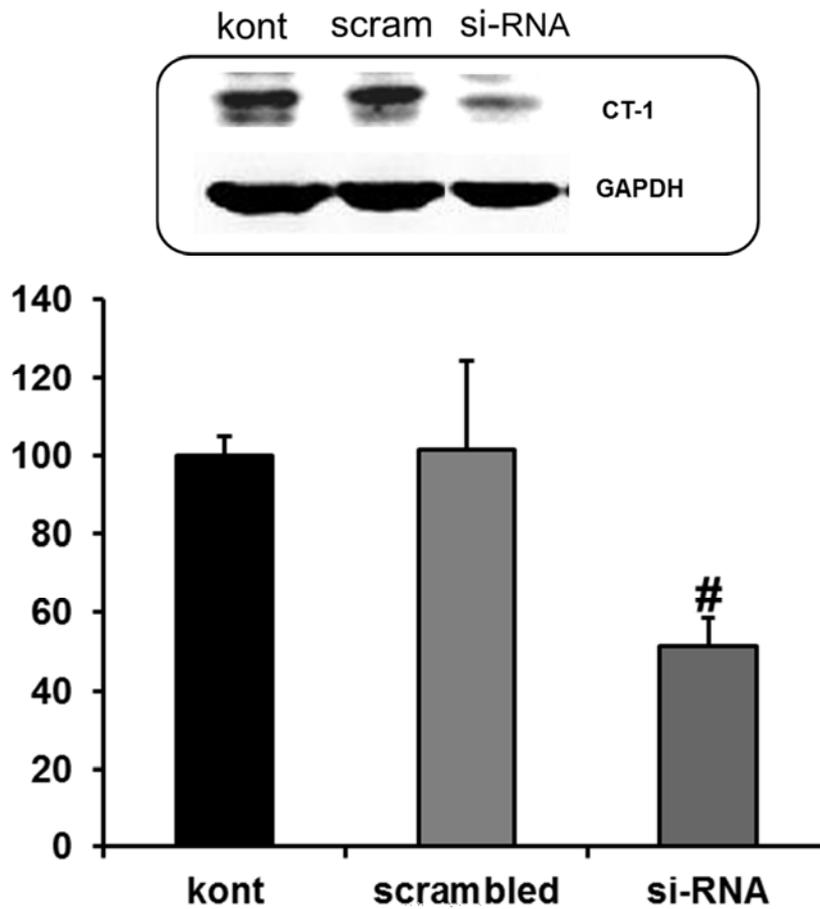


Abb.4.11.1: Herunterregulation der CT-1 Expression durch Gen-Inaktivierung von CT-1 mittels siRNA. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Westernblots der CT-1 Expression in den Gruppen Kontrolle, scrambled und si-RNA. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte an Tag 4 der Differenzierung mittels Western Blot. Dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. MW±SD, n = 3, #P<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle und scrambled.

4.11.2 Abnahme der kontrahierenden Areale nach siRNA Inaktivierung von CT-1

Zur Untersuchung des Einflusses von CT-1 auf die Kardiomyogenese wurden EBs der Gruppen Kontrolle, Scrambled und si-RNA an Tag 4 der Differenzierung auf Gewebekulturschalen ausplattiert und die Anzahl der kontrahierenden Areale an Tag 10 der Differenzierung für die einzelnen Gruppen bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigen die CT-1-siRNA behandelten EBs ($n = 6$) deutlich weniger schlagende Areale ($14 \pm 7\%$) im Vergleich zur Kontrolle (auf 100% normiert).

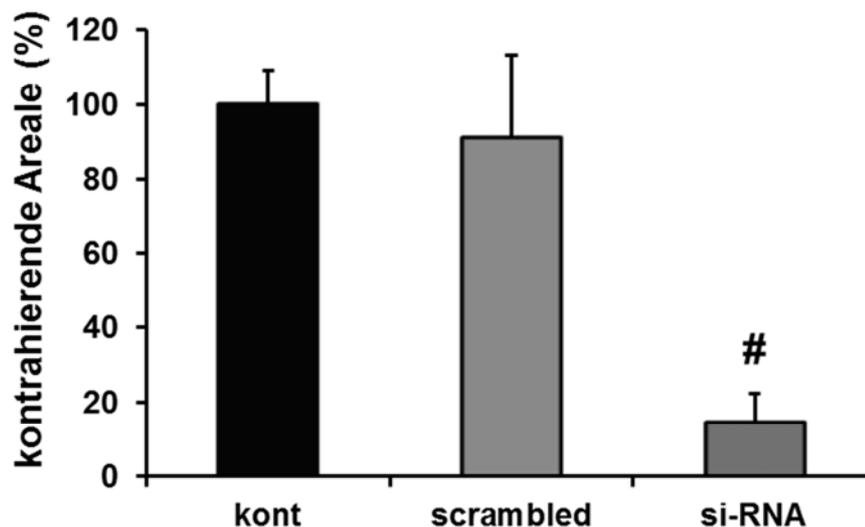


Abb.4.11.2: Abnahme der kontrahierenden Areale in CT-1 siRNA behandelten EBs. Die EBs wurden an Tag 4 ausplattiert und die Anzahl der kontrahierenden Areale lichtmikroskopisch an Tag 10 bestimmt. MW \pm SD, $n = 6$, # $P < 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle.

4.11.3 Abnahme der Expression von Wachstumsfaktoren nach siRNA Inaktivierung von CT-1

CT-1 reguliert die Expression der pro-kardiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, PDGFbb, FGF-2 und des Peptidhormons ANP zur Stimulation der Kardiomyogenese. Die Relevanz der unter 4.2 gezeigten CT-1 vermittelten Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren soll in den CT-1 siRNA behandelten Zellen überprüft werden. Bei Inaktivierung des CT-1 Genes wird deren Expression auf $73 \pm 9\%$ (PDGFbb), $63 \pm 16\%$ (FGF-2), $86 \pm 7\%$ (VEGF) und $45 \pm 20\%$ (ANP) reduziert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (normiert auf 100%) ($n = 4$).

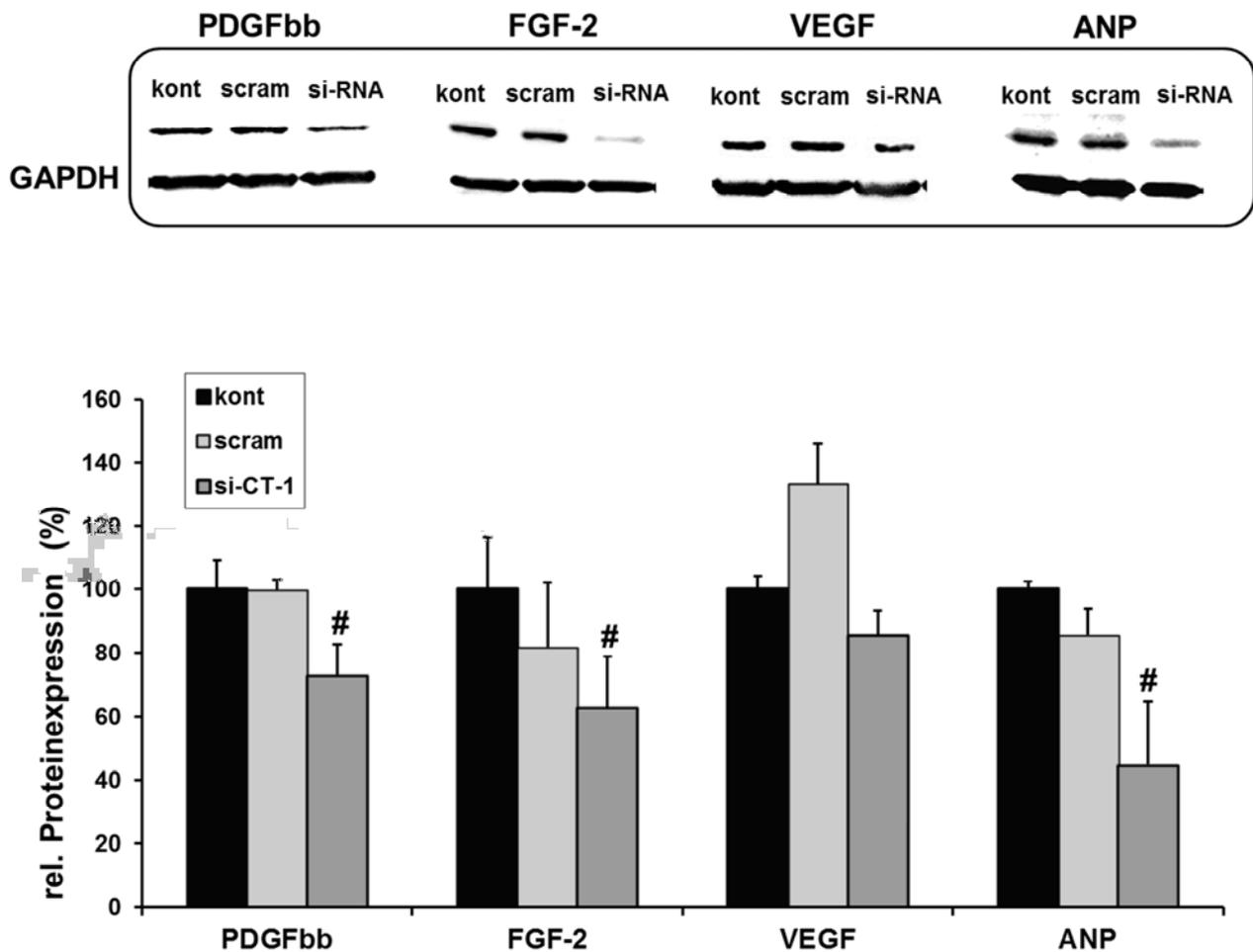


Abb. 4.11.3: Herunterregulation der Expression der Wachstumsfaktoren PDGFbb, FGF-2, VEGF und ANP nach siRNA Inaktivierung von CT-1. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Westernblots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression von PDGFbb, FGF-2, VEGF und ANP in siRNA behandelten EBs im Vergleich zur Kontrolle (normiert auf 100%) und der scrambled Gruppe aus n = 4 unabhängigen Experimenten. Die EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung nach Behandlung mit siRNA extrahiert und die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Der Expressionsnachweis von GAPDH diente als interne Kontrolle. MW±SD, n = 4, *p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.11.4 Abnahme der Expression kardialer Transkriptionsfaktoren nach siRNA Inaktivierung von CT-1

Weiter ist die Expression der Transkriptionsfaktoren Nkx2.5, MEF2c, GATA4 und TEAD3 in den CT-1 defizienten EBs signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert. Die Expression von

Nkx2.5, MEF2c, GATA4 und TEAD3 wird deutlich auf $55\pm 3\%$, $42\pm 21\%$, $34\pm 1\%$ und $37\pm 15\%$ reduziert (n=3).

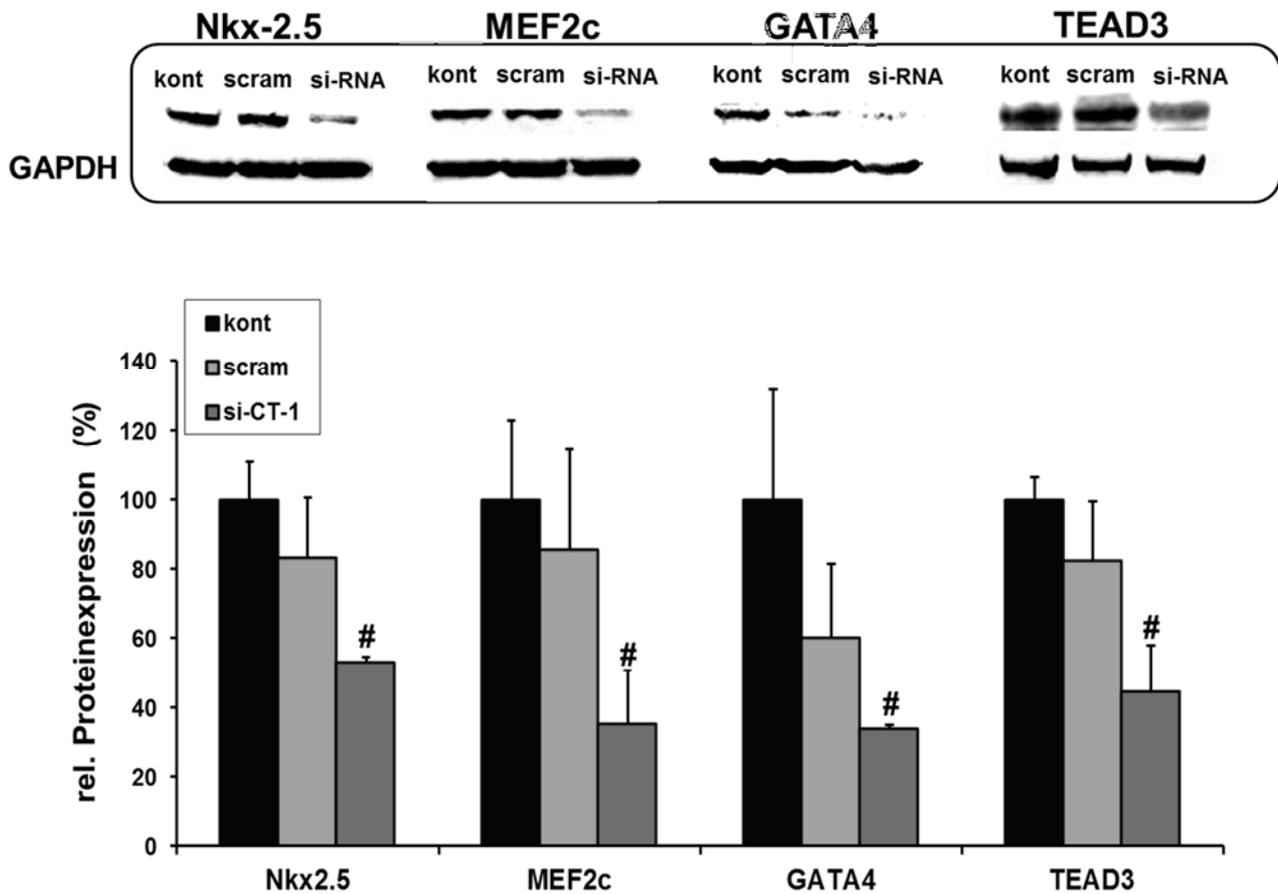


Abb.4.11.4: Herunterregulation der Expression kardialer Transkriptionsfaktoren nach siRNA Inaktivierung von CT-1. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Westernblots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression der kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5, MEF2c, GATA4 und TEAD3 in siRNA behandelten EBs im Vergleich zur Kontrolle (normiert auf 100%) und der scrambled Gruppe aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Die EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung nach Behandlung mit siRNA extrahiert und die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. MW±SD, n = 3, *p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.11.5 Abnahme der Expression kardialer Proteine nach siRNA Inaktivierung von CT-1

Die Expression der kardialen Proteine MLC1a ($55\pm 7\%$), MLC2a ($62\pm 15\%$), MLC2v ($56\pm 19\%$) und MYH7 ($53\pm 12\%$) ist in den CT-1 geninaktivierten EBs signifikant gegenüber der Kontrolle (normiert auf 100%) reduziert (n = 3). Die Expression des Sarkomerproteins α -Aktinin

($89 \pm 25\%$) und des Schrittmacherproteins HCN4 ($79 \pm 25\%$) wird leicht, aber nicht signifikant, reduziert.

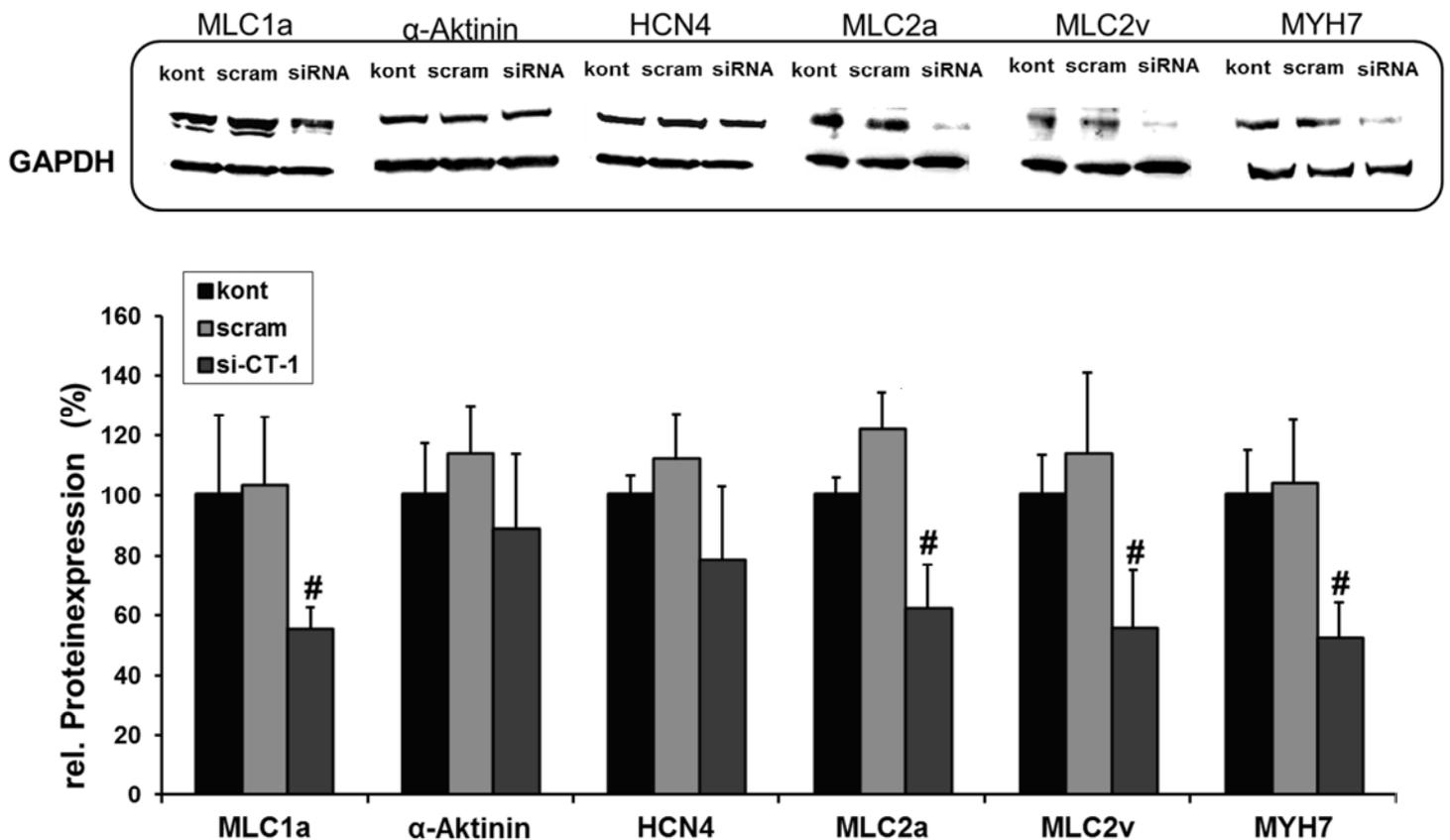


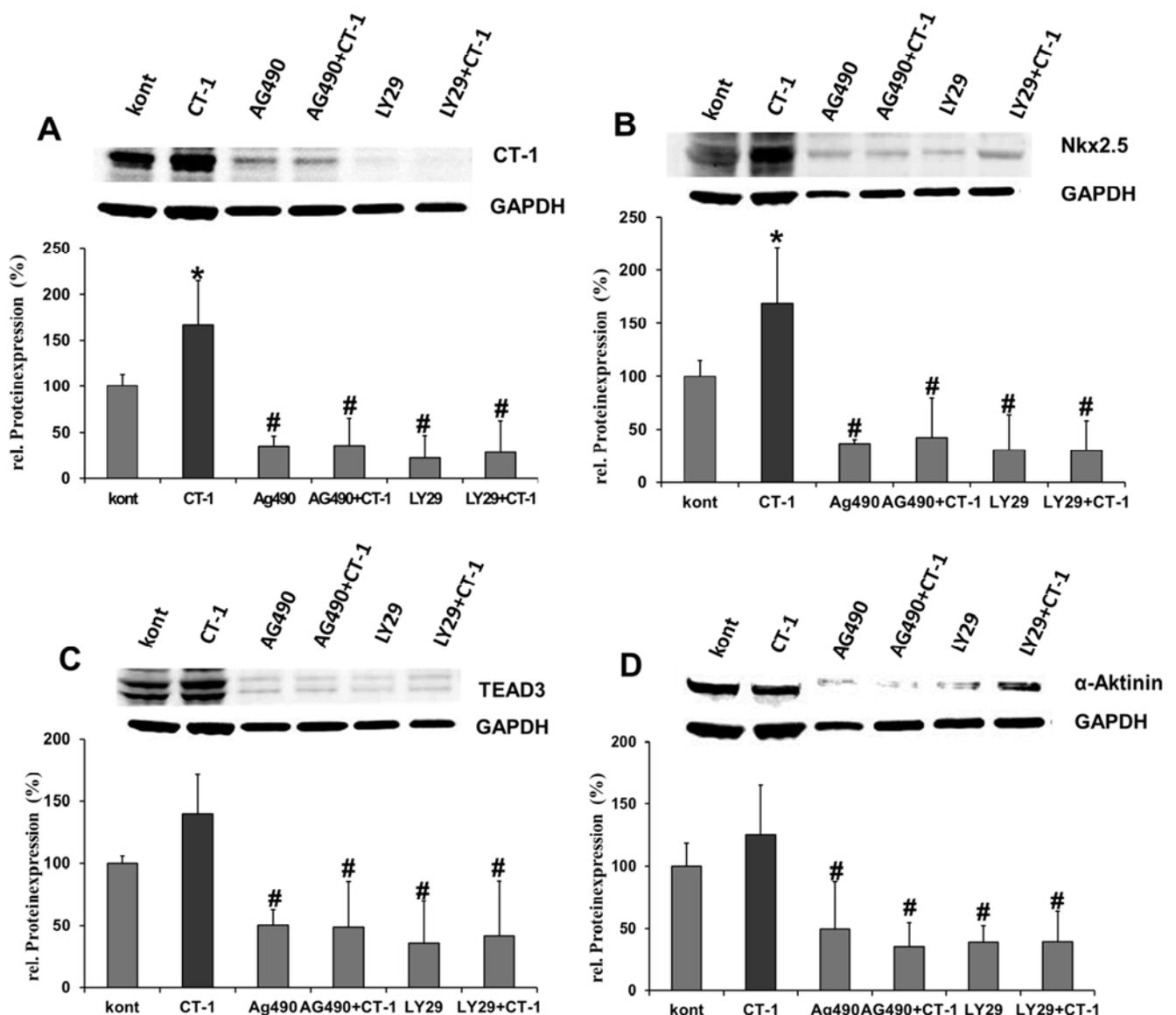
Abb.4.11.5: Herunterregulation kardialer Proteine nach siRNA Inaktivierung von CT-1. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Westernblots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression der kardialen Gene MLC1a, α -Aktinin, HCN4, MLC2a, MLC2v und MYH7 in siRNA behandelten EBs im Vergleich zur Kontrolle (normiert auf 100%) und der scrambled Gruppe aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Die EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung nach Behandlung mit siRNA extrahiert und die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. MW \pm SD, n = 3, *p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.12 Einfluss der spezifischen Hemmung des gp130 vermittelten Signalweges auf die Kardiomyogenese

Es ist bekannt, dass die zelluläre Signaltransduktion von CT-1 über Aktivierung von mindestens vier verschiedenen Signalwegen JAK/STAT, PI3K/AKT, ERK1/2 und p38 MAPK stattfinden kann (Craig et al., 2001; Kuwahara et al., 2000; Sauer et al., 2004; Sheng et al., 1997). Der Einfluss der einzelnen Signalwege auf die Kardiomyogenese soll im Folgenden untersucht werden.

4.12.1 Hemmung der JAK2 und PI3K

Durch Behandlung der Proben von Tag 4 bis 7 mit den Hemmstoffen der JAK2 (AG490) und der PI3K (LY29) wird der CT-1 vermittelte, stimulierende Effekt auf die Kardiomyogenese sichtlich gehemmt. Wie in Abb.4.12.1 zu sehen, wird die Proteinexpression von CT-1, sowohl unter alleiniger Verwendung der Hemmstoffe AG490 (35±11%) und LY294002 (22±24%), sowie in Kombination mit CT-1, AG490+CT-1 (36±29%) und LY294002+CT-1 (28±34%), signifikant gegenüber den allein mit CT-1 behandelten EBs (167±48%) gehemmt (A). Infolgedessen wird, in Übereinstimmung mit der CT-1 Herunterregulation, die Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 (B) und TEAD3 (C), als auch der kardialen Gene α -Aktinin, MLC1a, MLC2v, MYH7 und HCN4 (D, E, F, G, H) sowie die Expression der von VEGFR2 (I) durch Behandlung mit den Inhibitoren signifikant gehemmt (n = 3).



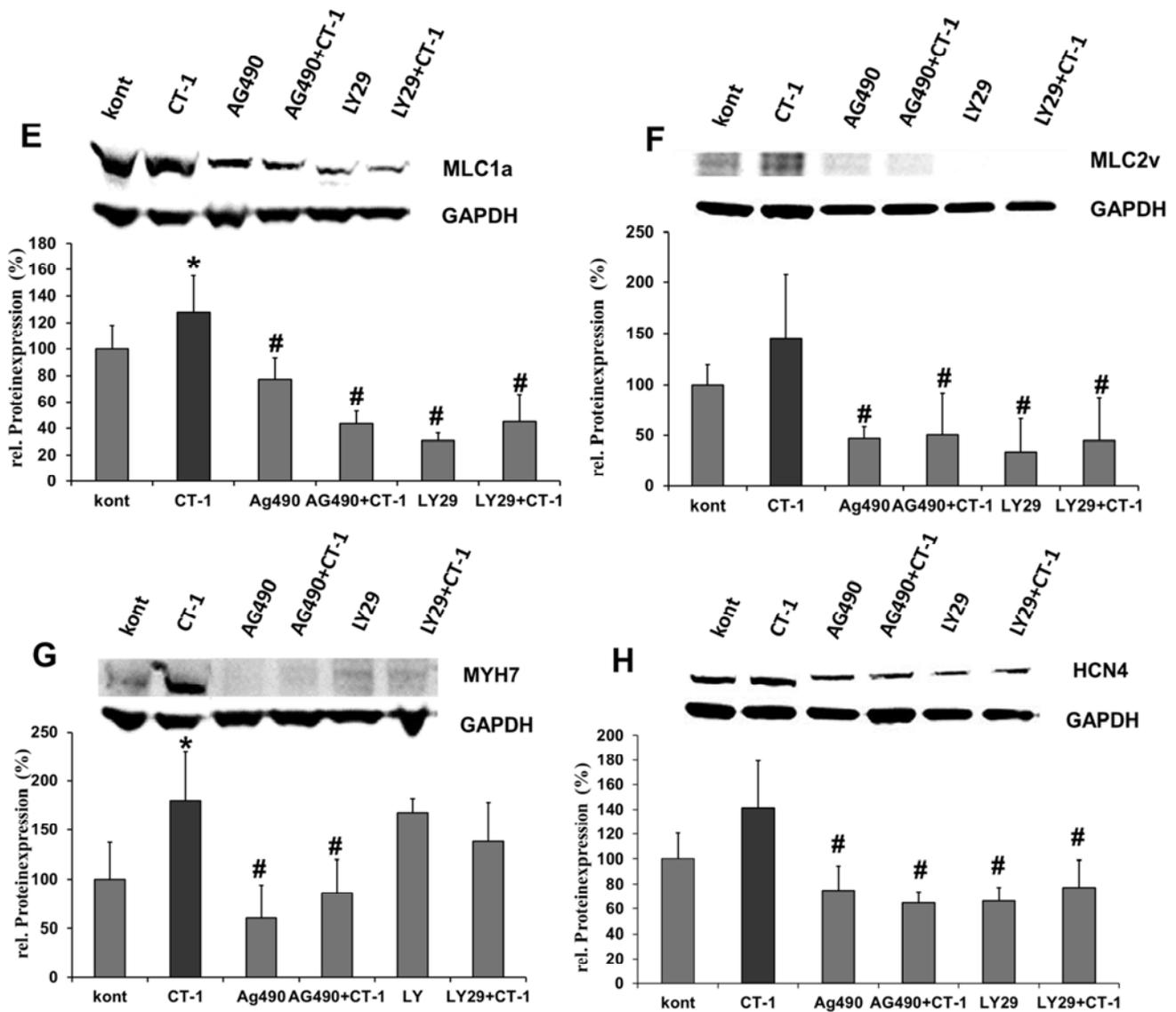


Abb.4.12.1: Inhibierung der Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und kardialer Marker nach Behandlung mit den Hemmstoffen der JAK2 und PI3K. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Westernblots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression von CT-1 (A), Nkx2.5 (B), TEAD3 (C), α -Aktinin (D), MLC1a (E), MLC2v (F), MYH7 (G), HCN4 (H) und VEGFR2 (I) aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Die EBs wurden von Tag 4 bis 7 mit dem JAK2 Inhibitor AG490 (25 μ M) und dem Inhibitor der PI3K LY294002 (25 μ M) in An und Abwesenheit von CT-1 (10 ng/ml) behandelt und die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. MW \pm SD, $n = 3$, * $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle, # $P < 0,05$ vs. mit CT-1 behandelte Probe (schwarzer Balken).

4.12.2 Hemmung der ERK1/2 und p38 MAPK

Durch Behandlung der Proben über 3 Tage mit den Hemmstoffen der ERK1/2 PD98059 (100 μ M) und der p38 MAPK SKF86002 (10 μ M) wird der CT-1 vermittelte, stimulierende Effekt auf die Kardiomyogenese deutlich aber nicht signifikant beeinflusst. Wie in Abb.4.12.2 zu

sehen, ist die Expression von CT-1, Nkx2.5 und TEAD3 nach Inkubation mit den Hemmstoffen leicht herunterreguliert (A, B, C), doch ist kein signifikanter Expressionsunterschied feststellbar. Die HCN4 Expression wird durch Hemmung von ERK1/2 und der p38 MAPK nicht beeinflusst (D).

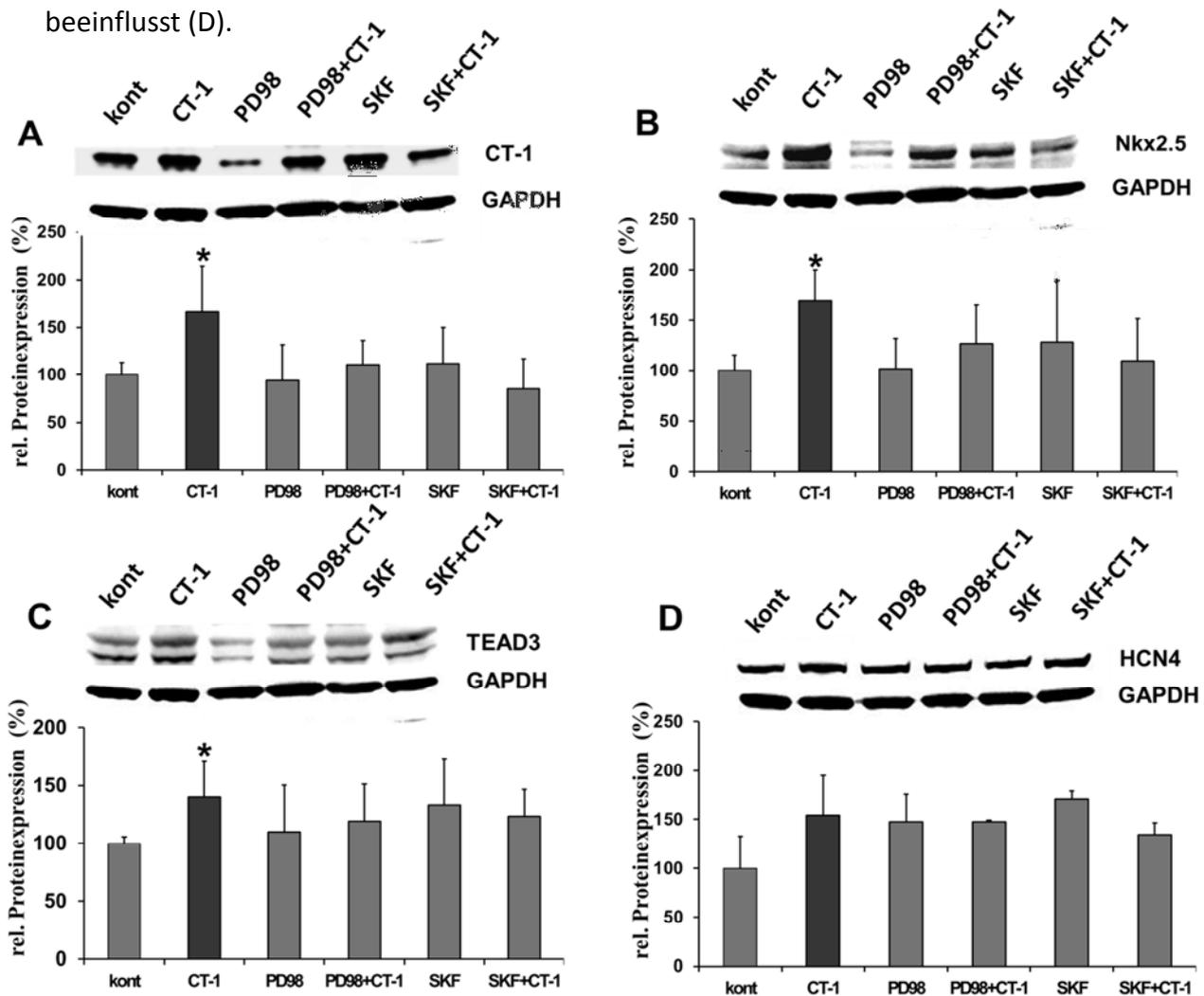


Abb.4.12.2: Einfluss des ERK1/2 Inhibitors und Hemmstoff der p38 MAPK auf die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und kardialer Marker. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Westernblots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression von CT-1 (A), Nkx2.5 (B), TEAD3 (C), HCN4 (D) aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Die EBs wurden von Tag 4 bis 7 mit dem ERK1/2 Inhibitor PD98059 (100 μ M) und dem Inhibitor der p38 MAPK SKF86002 (10 μ M) in An und Abwesenheit von CT-1 (10 ng/ml) behandelt und die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. MW \pm SD, n = 3, *p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.13 Expression von CT-1 unter Behandlung mit Hypoxie (1% O₂)

Das Herz entwickelt sich physiologisch unter hypoxischen Bedingungen. Diese könnten kardiale Differenzierungsvorgänge steuern. Im Folgenden soll die Expression von CT-1 in EBs bei Exposition mit 1% O₂ zur Nachahmung des Mikromilieus während der frühen embryonalen Entwicklung untersucht werden. Zur Versuchsdurchführung wurden 4 Tage alte EBs für einen Zeitraum von 2 bis 12 h in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert. Nach anschließender Proteinextraktion erfolgte die Bestimmung der CT-1 Proteinexpression mittels Western Blot. Unter Hypoxie wird die Proteinexpression von CT-1 kontinuierlich stimuliert, mit einem signifikanten Maximum nach 6 h (221±64%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (normiert auf 100%, schwarzer Balken Abb.4.14).

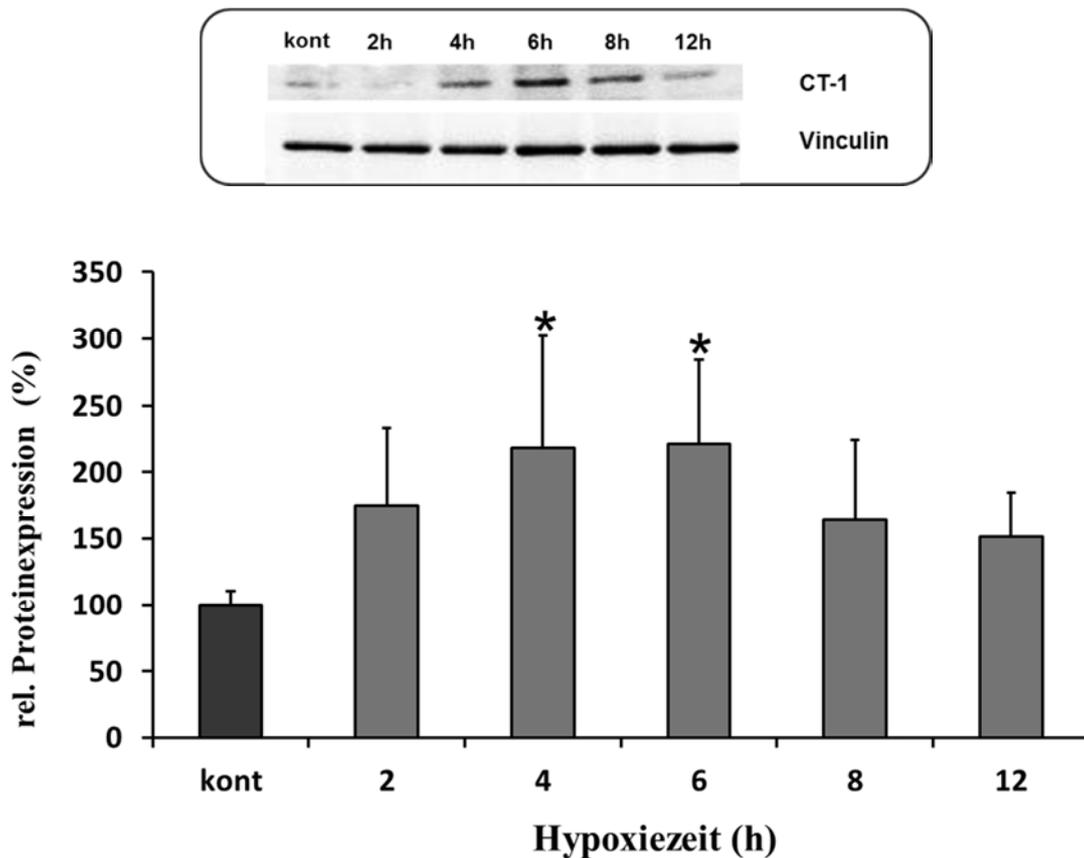


Abb.4.13: Stimulation der CT-1 Proteinexpression nach physiologischer Hypoxie (1% O₂). Der obere Bildteil zeigt einen repräsentativen Westernblot, der untere Bildteil ein Balkendiagramm der Proteinexpression von CT-1 aus n = 5 unabhängigen Experimenten. 4 Tage alte EBs wurden für einen Zeitraum von 2 bis 12 h in 1%iger O₂ Atmosphäre inkubiert und die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Dabei diente der Expressionsnachweis von Vinculin als interne Kontrolle. MW±SD, n = 5, *p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.14 Expression von CT-1 nach Reoxygenierung

Es ist bekannt, dass CT-1 kardioprotektiv wirkt und kardiales Gewebe erfolgreich vor Ischämie/Reoxygenierungsschäden schützen kann (Brar et al., 2001b; Jougasaki, 2010). Zur Untersuchung des Einflusses der Reoxygenierung im EB Modell wurden EBs an Tag 4 der Entwicklung nach 4 stündiger Hypoxie für einen Zeitraum von 0 bis 8 h unter normoxen Bedingungen reoxygeniert (n = 3). Wie in Abb.4.15 zu sehen kommt es nach 4-6 h Reoxygenierung zu einer maximalen Proteinexpression von CT-1 ($245\pm 43\%$), im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarzer Balken, normiert auf 100%).

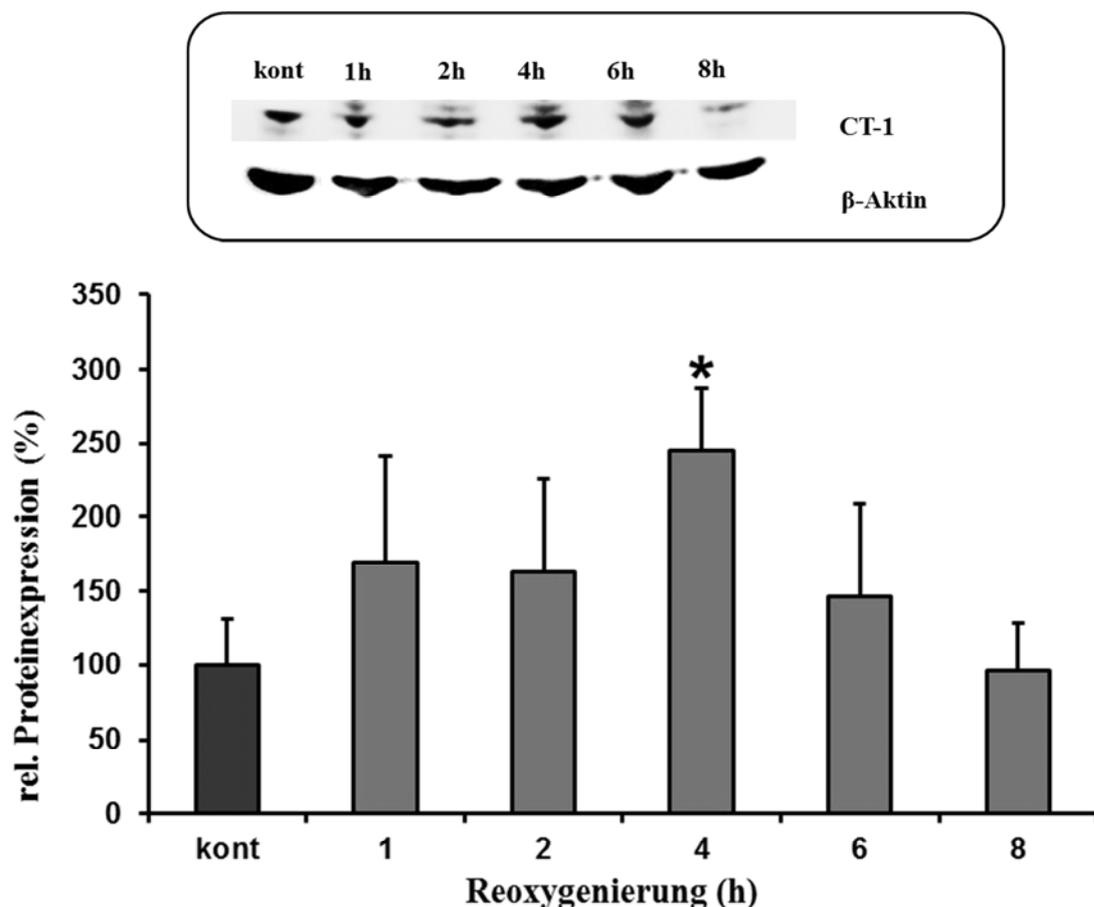


Abb.4.14: Zunahme der CT-1 Expression nach Reoxygenierung. Der obere Bildteil zeigt einen repräsentativen Westernblot der Proteinexpression von CT-1, der untere Bildteil ein Balkendiagramm aus n = 5 unabhängigen Experimenten. EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung 4 h unter hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert und über einen Zeitraum von 1 bis 8 h unter normoxen Bedingungen reoxygeniert. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot bestimmt. Der Expressionsnachweis von β -Aktin diente als interne Kontrolle. MW \pm SD, n = 3, *p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle (schwarzer Balken, normiert auf 100%).

4.15 Generierung von ROS und NO unter Reoxygenierung

4.15.1 Stimulation der ROS und NO Generierung unter Reoxygenierung

Unter Reoxygenierungsbedingungen kommt es zu einer starken Freisetzung der intrazellulären Signalmoleküle ROS und NO. Zur Versuchsdurchführung wurden 4 Tage alte EBs zunächst für 4 h in hypoxischer Atmosphäre (1%O₂) inkubiert und anschließend über einen Zeitraum von 0 bis 8 h die Entstehung von ROS und NO in der Reoxygenierungsphase, unter Benutzung des konfokalen Mikroskops, aufgezeichnet. Wie in Abb. 4.16.1 deutlich zu sehen, unterscheidet sich der zeitliche Verlauf der ROS und NO Generierung deutlich voneinander (n = 3). Während ROS direkt nach Beendigung der Hypoxie, in der frühen Phase der Reoxygenierung ansteigen und ein Maximum nach 2 h (229±31%) erreichen, erfolgt die maximale NO Freisetzung nach 6 h Reoxygenierung (445±142%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (normiert auf 100%).

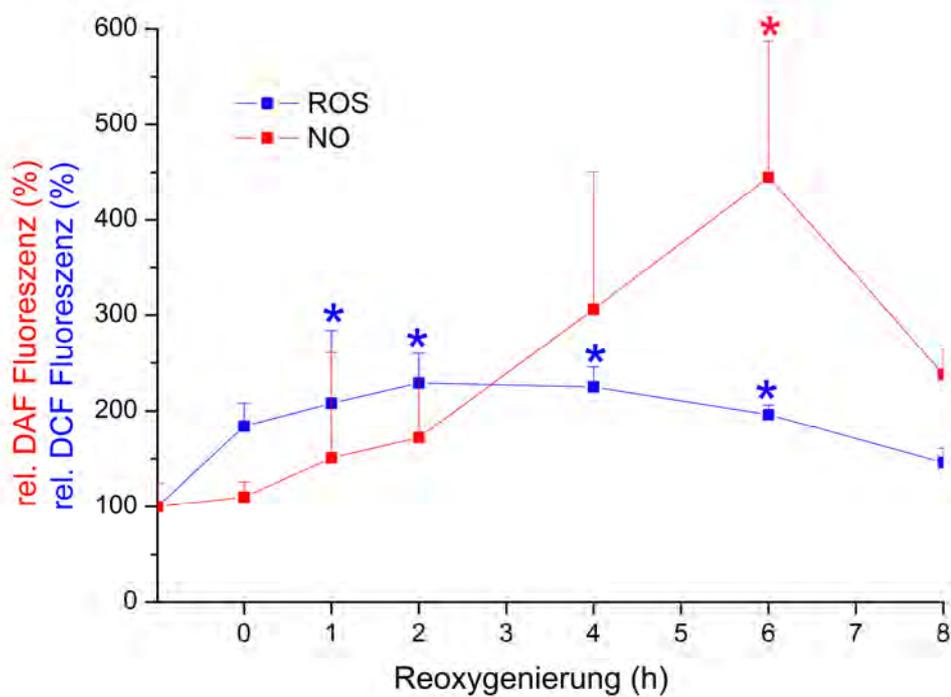
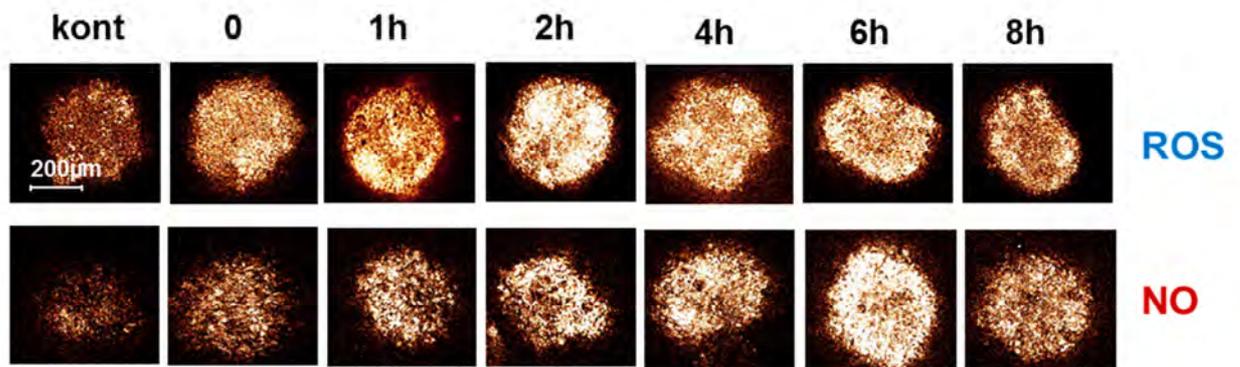


Abb.4.15.1: Zeitabhängige Stimulation der NO und ROS Generierung unter Reoxygenierung. Der obere Bildteil zeigt repräsentative DCF- und DAF-Färbungen, der untere Bildteil ein Kurvendiagramm aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung zunächst für 4 h unter hypoxischer Atmosphäre (1% O_2) inkubiert und anschließend über einen Zeitraum von 1 - 8 h unter normoxen Bedingungen reoxygeniert. $MW \pm SD$, $n = 3$, $*p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle (normiert auf 100%).

4.15.2 Hemmung der ROS Generierung

Aufgrund der maximalen ROS Freisetzung nach 2 h Reoxygenierung (Abb.4.15.1), wurden EBs an Tag 4 der Entwicklung, in An und Abwesenheit des Radikalfängers NMPG (100 μ M), für 4 h in hypoxischer Atmosphäre (1%O₂) inkubiert und anschließend für 2 h unter normoxen Bedingungen reoxygeniert. Erneut ist eine Stimulation der ROS Synthese nach 2 h Reoxygenierung (186 \pm 22%) zu beobachten; hingegen kann durch Vorinkubation der EBs mit dem Radikalfänger NMPG die ROS-Generation signifikant gegenüber der Reoxygenierungsgruppe gehemmt werden (162 \pm 38%) (Abb.4.15.2).

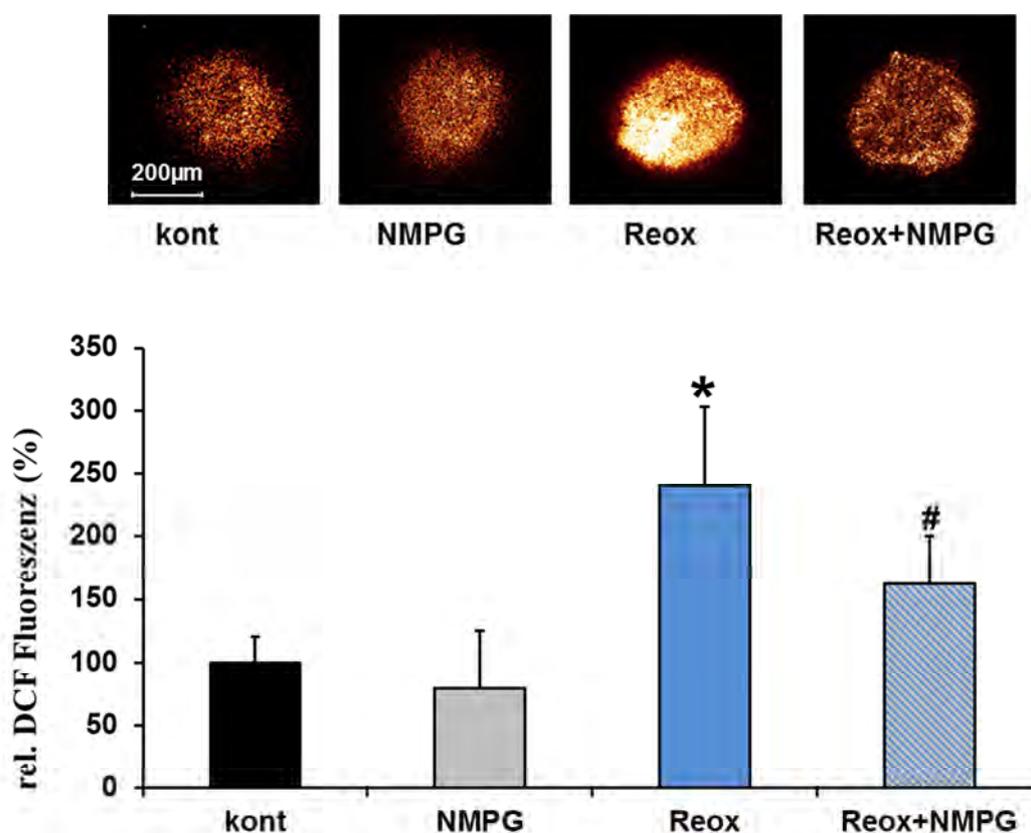


Abb.4.15.2: Hemmung der ROS-Synthese nach Reoxygenierung. Der obere Bildteil zeigt repräsentative DCF-Färbungen, der untere Bildteil ein Balkendiagramm aus n = 4 unabhängigen Experimenten. EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung in An und Abwesenheit von NMPG zunächst für 4 h in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert und anschließend für 2 h in normoxen Bedingungen reoxygeniert. Die Vorinkubation mit NMPG (100 μ M) erfolgte 1 h vor Versuchsbeginn. MW \pm SD, n = 4, *p<0,001 vs. unbehandelte Kontrolle, #p<0,05 vs. Reoxygenierung.

4.15.3 Hemmung der NO Generierung

Aufgrund der maximalen NO Freisetzung nach 6 h Reoxygenierung (Abb.4.15.1), wurden EBs an Tag 4 der Differenzierung in An und Abwesenheit von L-NAME (50 μ M), für 4 h in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert und anschließend für 6 h unter normoxen Bedingungen reoxygeniert. Dies resultierte in einer Steigerung der NO Generierung auf (305 \pm 51%). Dieser Effekt konnte nach Vorinkubation der EBs mit L-NAME, 1 h vor Versuchsbeginn, signifikant gegenüber der Reoxygenierungsgruppe verhindert werden (84 \pm 27%).

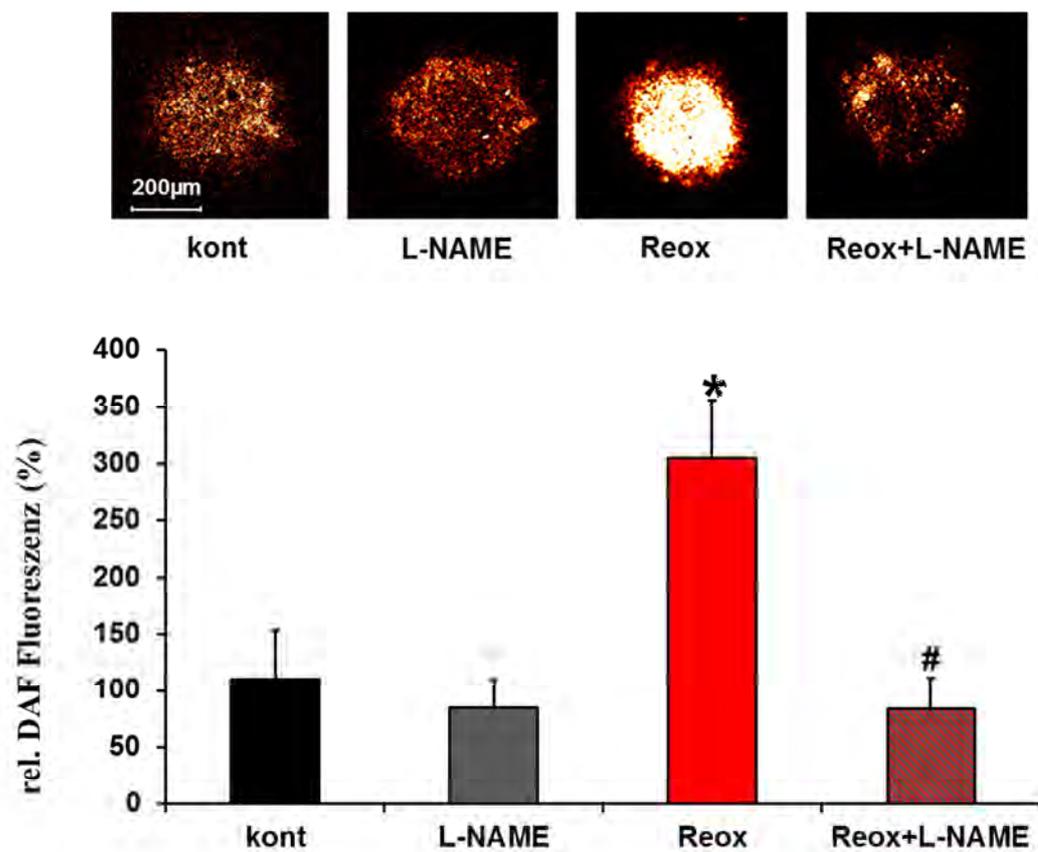


Abb.4.15.3: Hemmung der NO Synthese nach Reoxygenierung. Der obere Bildteil zeigt repräsentative DAF-Färbungen, der untere Bildteil ein Balkendiagramm aus n = 4 unabhängigen Experimenten. EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung in An und Abwesenheit von L-NAME zunächst für 4 h in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert und anschließend für 6 h in normoxen Bedingungen reoxygeniert. Die Vorinkubation mit L-NAME (50 μ M) erfolgte 1 h vor Versuchsbeginn. Bilder zeigen repräsentative DAF-Färbungen der jeweiligen Behandlungsgruppe. MW \pm SD, n = 4, *p<0,001 vs. unbehandelte Kontrolle, #p<0,001vs. Reoxygenierung.

4.16 Phosphorylierung von Signalmolekülen

Frühere Arbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, dass CT-1 die Aktivität der Signalmoleküle JAK2, STAT3 und PI3K durch Phosphorylierung steuert (Sauer et al., 2004). Aktivierung des RISK-Signalweges, zu dem Raf/Ras, ERK1/2, PI3K und AKT zählen, führt zur Regulation antiapoptotischer und kardioprotektiver Mechanismen (Hausenloy und Yellon, 2009). Zur Überprüfung, ob die genannte Signalkaskade bei der Stimulation der CT-1 Expression sowohl unter physiologischer Hypoxie (1% O₂), als auch unter Reoxygenierung eine Rolle spielt, wurden Proteinproben innerhalb eines Zeitraums von 5 bis 480 min nach Hypoxie und Reoxygenierung extrahiert.

4.16.1 Phosphorylierung von JAK, STAT, PI3K und Akt nach Hypoxie (1% O₂)

Zur Versuchsdurchführung wurden EBs an Tag 4 der Differenzierung über einen Zeitraum von 5 bis 480 min in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert. Nach anschließender Proteinextraktion erfolgte die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus der Signalmoleküle mittels Western Blot. Dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. Wie in Abbildung 4.17.1 zu sehen, kommt es nach Inkubation der Zellen in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung der Signalmoleküle JAK2 (n = 3) /STAT3 (n = 4) und PI3K (n = 4) /AKT (n = 3). Maximale Werte werden nach 60 bis 120 min Hypoxie erreicht (p-JAK2 (184±4%), p-STAT3 (237±3%), p-PI3K (223±21%)). Die Phosphorylierung von p-AKT zeigt 2 Expressionsmaxima nach 30 min (274±25%) und 360 min (204±52%), im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (normiert auf 100%).

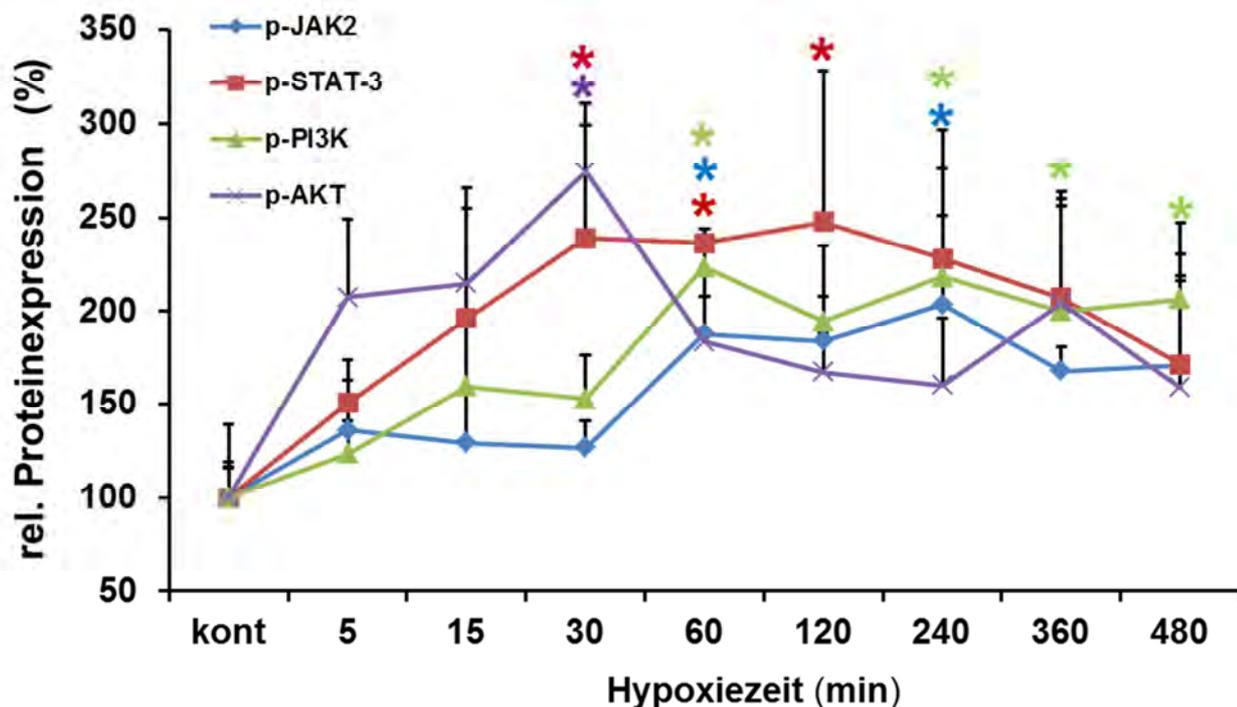
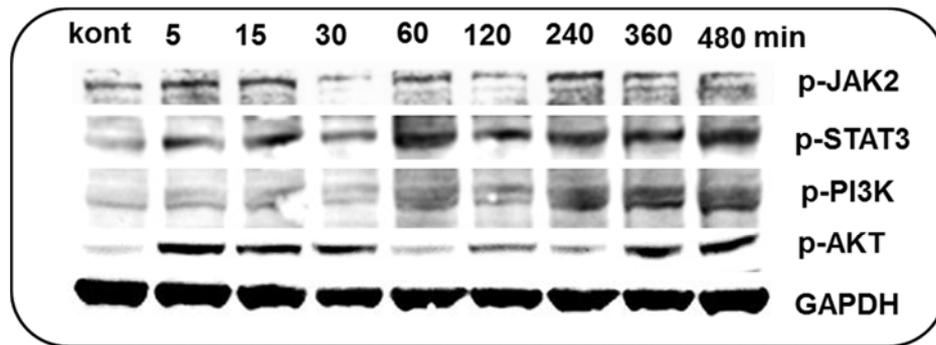


Abb.4.16.1: Zeitabhängige Phosphorylierung der Signalmoleküle JAK, STAT, PI3K und AKT nach Behandlung mit Hypoxie (1% O₂). Der obere Bildteil zeigt repräsentative Western Blots der Proteinphosphorylierung von JAK2 (n = 3), STAT3 (n = 4), PI3K (n = 4) und AKT (n = 3), der untere Bildteil ein Kurvendiagramm der Mittelwerte mit Standardabweichungen. EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung über einen Zeitraum von 5-480 min unter hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert und die Proteinphosphorylierung mittels Western Blot untersucht. Der Expressionsnachweis von GAPDH diente als interne Kontrolle. MW±SD, *p<0,01 vs. unbehandelte Kontrolle (normiert auf 100%).

4.16.2 Phosphorylierung von JAK, STAT, PI3K und AKT nach Reoxygenierung

Zur Untersuchung des Einflusses der Reoxygenierung auf die Phosphorylierung der Signalmoleküle JAK2, STAT-3, PI3K und AKT wurden EBs an Tag 4 der Entwicklung für 4 h in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert und über einen Zeitraum von 0 bis 480 min in normoxen Bedingungen reoxygeniert. Die Signalmoleküle JAK2 (n = 3), STAT-3 (n = 5) und PI3K (n = 5) zeigen einen ähnlichen Phosphorylierungsverlauf mit signifikanten Maxima nach 30 min STAT-3 (229±28%), PI3K (203±44%) und einer anschließenden Herunterregulation. AKT (n = 3) wird zeitversetzt mit einem Maximum nach 360 min (229±86%) phosphoryliert (Abb. 4.16.2).

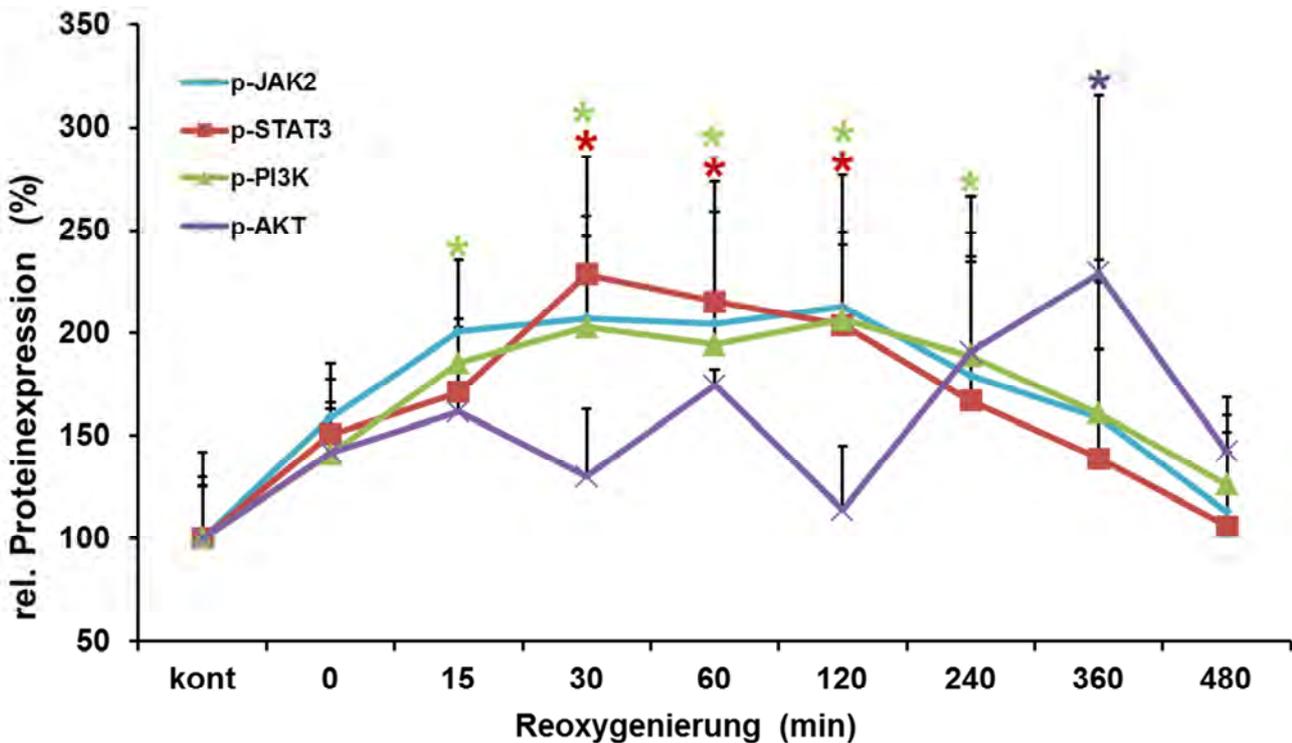
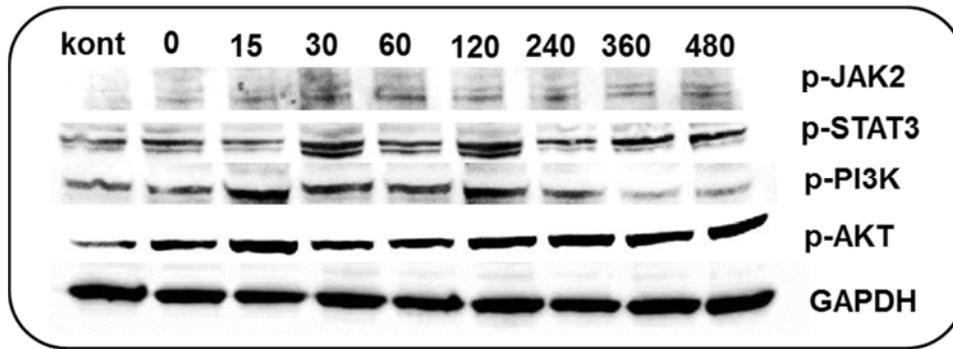


Abb.4.16.2: Zeitabhängige Phosphorylierung der Signalmoleküle JAK, STAT, PI3K und AKT nach Reoxygenierung. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Western Blots der Proteinphosphorylierung von JAK2 (n = 3), STAT3 (n = 5), PI3K (n = 5) und AKT (n = 3), der untere Bildteil ein Kurvendiagramm der Mittelwerte und Standardabweichungen. EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung für 4 h unter hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert und anschließend für einen Zeitraum von 5-480 min unter normoxen Bedingungen reoxygeniert. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot untersucht. Der Expressionsnachweis von GAPDH diente als interne Kontrolle. MW±SD, *p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle (normiert auf 100%).

4.17 Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren

Die Vermittlung der kardioprotektiven Wirkung über den RISK Signalweg kann über die Stimulation der Expression angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF sowie das Zytokin CT-1 erfolgen (Hausenloy und Yellon, 2009). Aus den ersten Experimenten mit CT-1 wird ersichtlich, dass CT-1 einen großen Einfluss auf die Expression von Wachstumsfaktoren hat. Dies wirft die Frage auf, ob die Expression der Wachstumsfaktoren unter Hypoxie und Reoxygenierung CT-1 vermittelt sein könnte.

4.17.1 Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren nach Hypoxie (1% O₂)

Zur Versuchsdurchführung wurden EBs an Tag 4 der Differenzierung für einen Zeitraum von 2 bis 12 h in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert. Die Expression der Wachstumsfaktoren VEGF, FGF-2 und PDGFbb wurde mittels Westernblot untersucht. Der Expressionsnachweis von Vinculin diente als interne Kontrolle. Wie in Abb. 4.18.1 zu sehen, kommt es nach Inkubation in hypoxischer Atmosphäre zu einer signifikanten Expressionssteigerung der Wachstumsfaktoren VEGF, FGF-2 und PDGFbb. Maximale Expressionswerte von VEGF (gelber Balken, n = 5) werden nach 2 h Hypoxie 202±59% erreicht und verbleiben bis 8 h Hypoxie auf einem erhöhten Niveau, während die Expression von FGF-2 (blauer Balken, n = 4) kontinuierlich gesteigert wird und nach 4 h Hypoxie 404±40% maximale Werte erreicht. PDGFbb (schwarzer Balken, n = 4) wird nach 12 h Hypoxie 210±57% vermehrt exprimiert.

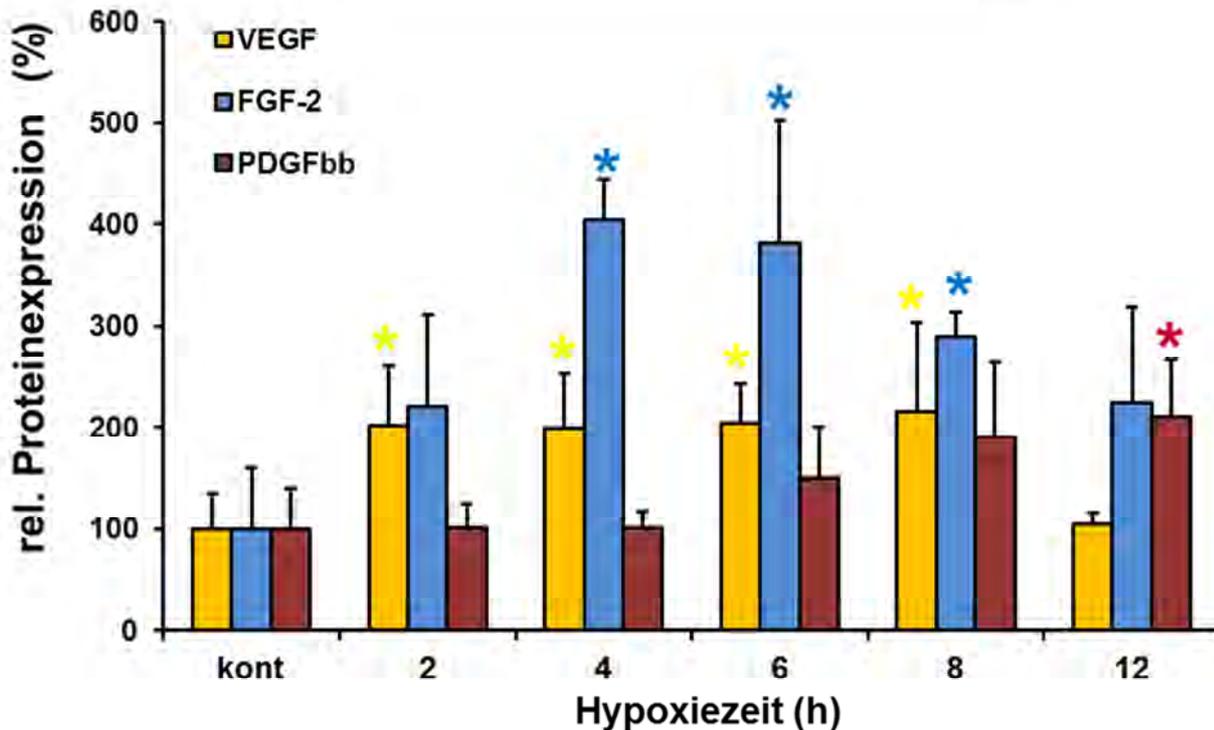
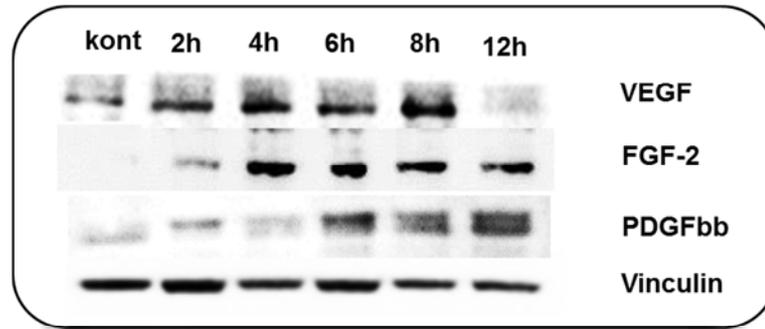


Abb.4.17.1: Vermehrte Expression der Wachstumsfaktoren VEGF, FGF-2 und PDGFbb nach Behandlung mit Hypoxie (1% O₂). Der obere Bildteil zeigt repräsentative Western Blots, der untere Bildteil ein Balkendiagramm der Proteinexpression von VEGF, FGF und PDGFbb aus n = 4 unabhängigen Experimenten. 4 Tage alte EBs wurden für einen Zeitraum von 2 bis 12 h in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert und im Anschluss die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. MW±SD, n = 4, *p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.17.2 Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren nach Reoxygenierung

Zur Versuchsdurchführung wurden EBs an Tag 4 der Differenzierung zunächst 4 h in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert und anschließend für einen Zeitraum von 0 bis 8 h in normoxen Bedingungen reoxygeniert. Die Expression von Wachstumsfaktoren in der

Reoxygenierungsphase wurde mittels Western Blot untersucht. Der Expressionsnachweis von GAPDH diente als interne Kontrolle.

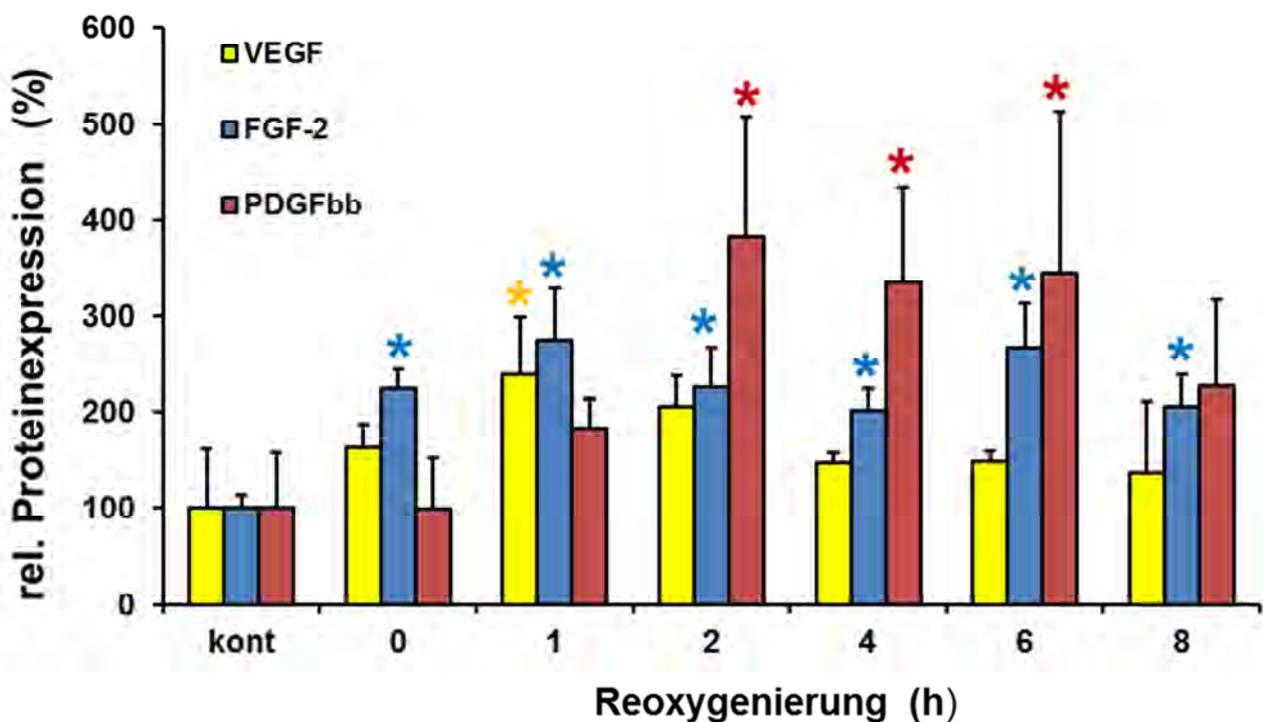
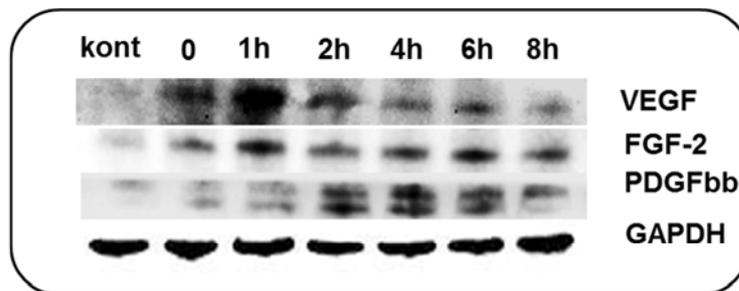


Abb.4.17.2: Vermehrte Expression der Wachstumsfaktoren VEGF, FGF-2 und PDGFbb nach Reoxygenierung. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Western Blots, der untere Bildteil ein Balkendiagramm der Proteinexpression von VEGF (n = 3), FGF (n = 3) und PDGFbb (n = 5). EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung zunächst für 4 h in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert und anschließend für einen Zeitraum von 0 bis 8 h unter normoxen Bedingungen reoxygeniert. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot untersucht. Dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. MW±SD, *p<0,01 vs. unbehandelte Kontrolle.

Die Expression der Wachstumsfaktoren VEGF (n = 3), FGF-2 (n = 3) und PDGFbb (n = 5) wird unter Reoxygenierung signifikant stimuliert. Maximale Proteinexpression werden für VEGF

(239±60%) und FGF-2 (275±54%) nach 1 h Reoxygenierung erreicht, während die Expression von PDGFbb (383±124%) nach 2 h Reoxygenierung am Stärksten ist.

4.18 Stimulation der Kardiomyogenese nach Hypoxie/Reoxygenierung

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine Zunahme der intrazellulären Botenstoffe ROS und NO, eine Phosphorylierung der Signalmoleküle JAK/STAT und PI3K/AKT, sowie eine Zunahme der Expression von Wachstumsfaktoren, sowohl unter hypoxen-, als auch unter reoxygenierungs-Bedingungen. Indes bleibt die Frage offen, inwiefern Hypoxie und Reoxygenierung die Kardiomyogenese beeinflussen. Ob die Kardiomyogenese aufgrund der gesteigerten Expression von CT-1, Wachstumsfaktoren und Phosphorylierung von Signalmolekülen stimuliert wird, soll im Folgenden überprüft werden.

4.18.1 Zunahme der Anzahl kontrahierender Areale unter Hypoxie/ Reoxygenierung

EBs wurden an Tag 4 der Entwicklung für einen Zeitraum von 2 bis 24 h in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert und die Anzahl der kontrahierenden Areale an Tag 10 der Differenzierung bestimmt. Die Inkubation der EBs erfolgte im Anschluss an die Hypoxie unter normoxen Bedingungen.

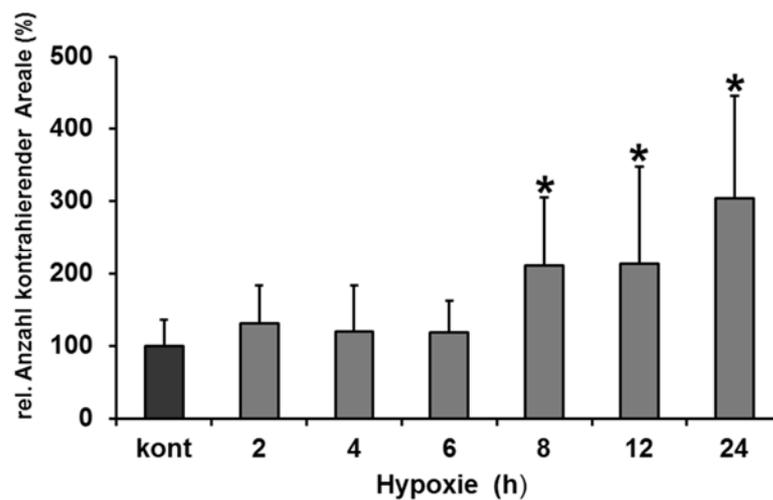


Abb.4.18.1: Stimulation der Kardiomyogenese durch Behandlung mit Hypoxie (1% O₂)/Reoxygenierung. EBs wurden an Tag 4 der Differenzierung für 2 bis 24 h unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) inkubiert. Das Balkendiagramm zeigt die relative Anzahl kontrahierender Areale an Tag 10 der Differenzierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarzer Balken, normiert auf 100%) aus n = 6 unabhängigen Experimenten. MW±SD, *p<0,01 vs. unbehandelte Kontrolle.

Wie in Abb.4.18.1 zu erkennen, kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl kontrahierender Areale nach 8 bis 24 stündiger Inkubation der EBs in hypoxischer Atmosphäre. Eine maximale Zunahme der kontrahierenden Areale ist nach 24 h ($305\pm 141\%$) Hypoxie im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($n = 6$).

4.18.2 Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Expression kardialer Gene

Zur Untersuchung der Wirkung von Hypoxie/ Reoxygenierung auf Proteinebene, wurden EBs an Tag 4 für einen Zeitraum von 2 bis 24 h hypoxischer Atmosphäre ($1\% O_2$) inkubiert und die Proteine an Tag 10 der Differenzierung extrahiert. Im Anschluss wurde die Expression der kardialen Gene HCN4 und MLC2v mittels Western Blot untersucht. Der Nachweis von GAPDH diente als interne Kontrolle. In Abb.4.18.2 (A, B) ist eine gesteigerte Expression der kardialen Gene HCN4 ($185\pm 21\%$) ($n = 4$) und MLC2v ($185\pm 19\%$) ($n = 3$) nach 12 h Hypoxie zu erkennen.

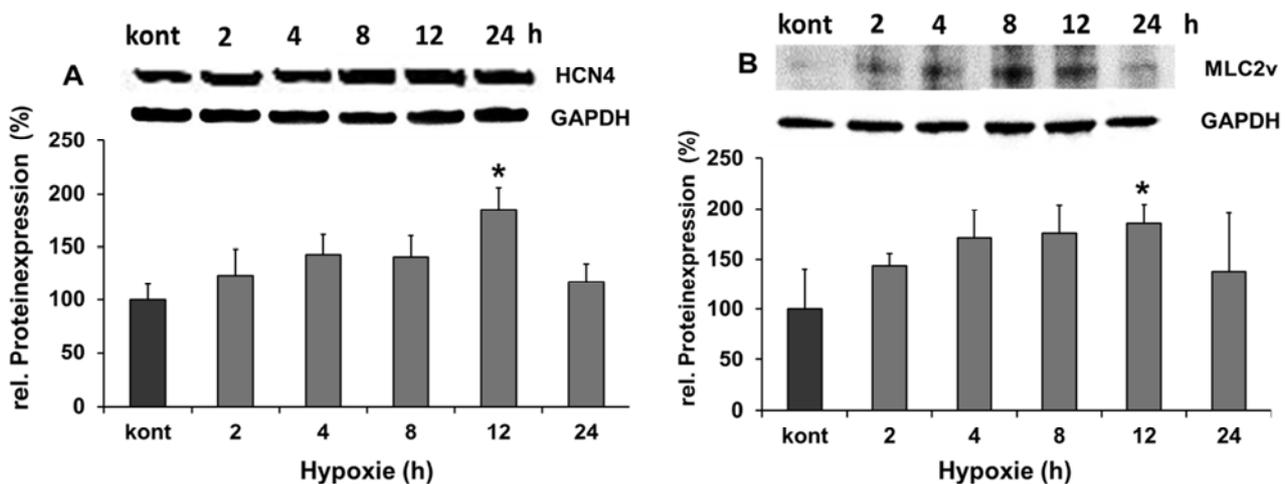


Abb.4.18.2: Stimulation der Expression kardialer Gene nach Hypoxie/ Reoxygenierung. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Western Blots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression von HCN4 (A) und MLC2v (B) aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten. EBs wurden an Tag 4 für einen Zeitraum von 2 bis 24 h unter hypoxischen Bedingungen ($1\% O_2$) inkubiert und an Tag 10 die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. MW \pm SD, $n = 4$, * $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle.

4.18.3 Inhibierung der Kardiomyogenese nach Hypoxie

Durch Präinkubation der EBs 1 h vor Versuchsbeginn, mit dem Kalzium Chelator BAPTA ($20 \mu M$), dem Radikalfänger NMPG ($100 \mu M$) und dem NO-Synthase Inhibitor L-NAME ($50 \mu M$), kann die gesteigerte CT-1 Expression herunterreguliert werden (Abb.4.18.3A). Die Expression

von TEAD3 wird sowohl durch NMPG und L-NAME als auch durch BAPTA gehemmt (Abb.4.18.3B). Des Weiteren ist eine signifikante Abnahme der kardialen Genexpression (α -Aktinin und MLC2v) nach Behandlung der EBs mit NMPG und L-NAME zu beobachten (Abb.4.18.3 C+D).

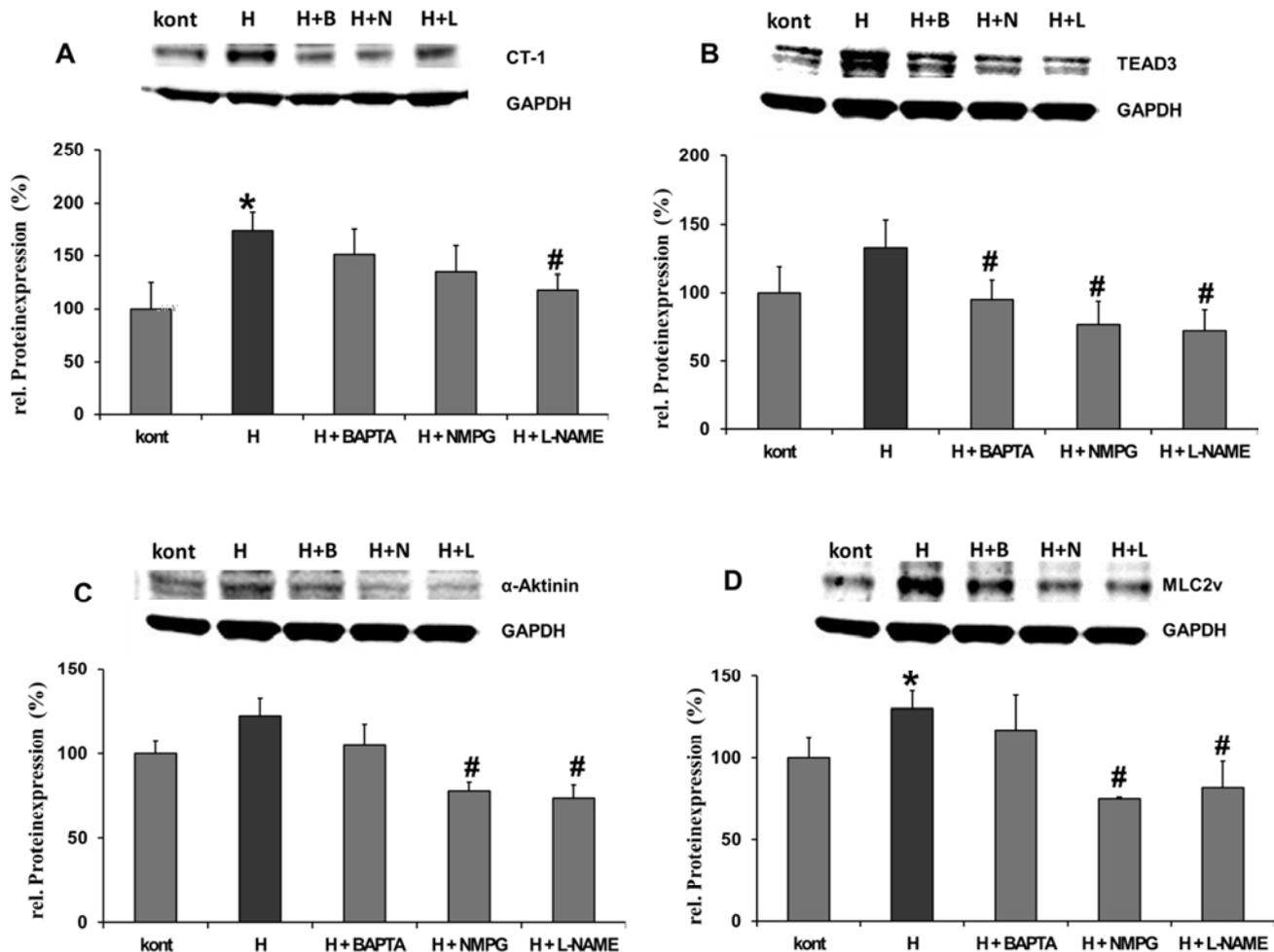


Abb.4.18.3: Inhibierung der Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und kardialer Gene nach Behandlung mit dem intrazellulären Kalzium Chelator BAPTA, dem Radikalfänger NMPG und dem NO-Synthase Inhibitor L-NAME sowie Hypoxie. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Western Blots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression von CT-1 (A), TEAD3 (B), α -Aktinin (C) und MLC2v (D) aus n = 4 unabhängigen Experimenten. EBs blieben unbehandelt (kont) oder wurden in Anwesenheit von Hypoxie (1% O₂) mit BAPTA (20 μ M), NMPG (100 μ M) und L-NAME (50 μ M) behandelt. Dabei diente der Expressionsnachweis von GAPDH als interne Kontrolle. MW \pm SD, *p<0,01 vs. unbehandelte Kontrolle, #p<0,05 vs. mit Hypoxie behandelte Probe.

4.19 Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Kardiomyogenese

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die kurzzeitige Exposition der Zellen gegenüber hypoxischen Bedingungen zu einer vermehrten Expression kardialer Gene und kontrahierender Areale führt. Im Folgenden soll untersucht werden, ob auch chronische Hypoxie (1% O₂) zu einer Stimulation der Kardiomyogenese führt. Dazu wurden EBs in einer Spinnerflasche von Tag 4 bis 10 in einer Atmosphäre von 1% O₂ inkubiert und im Anschluss die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht.

4.19.1 Herunterregulation der Proteinexpression von CT-1 und der Wachstumsfaktoren VEGF und PDGFbb nach chronischer Hypoxie

Bei Kultivierung der Zellen unter chronisch hypoxischen Bedingungen (1% O₂) für 6 Tage kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Proteinexpression von CT-1, VEGF und PDGFbb (Abb.4.19.1).

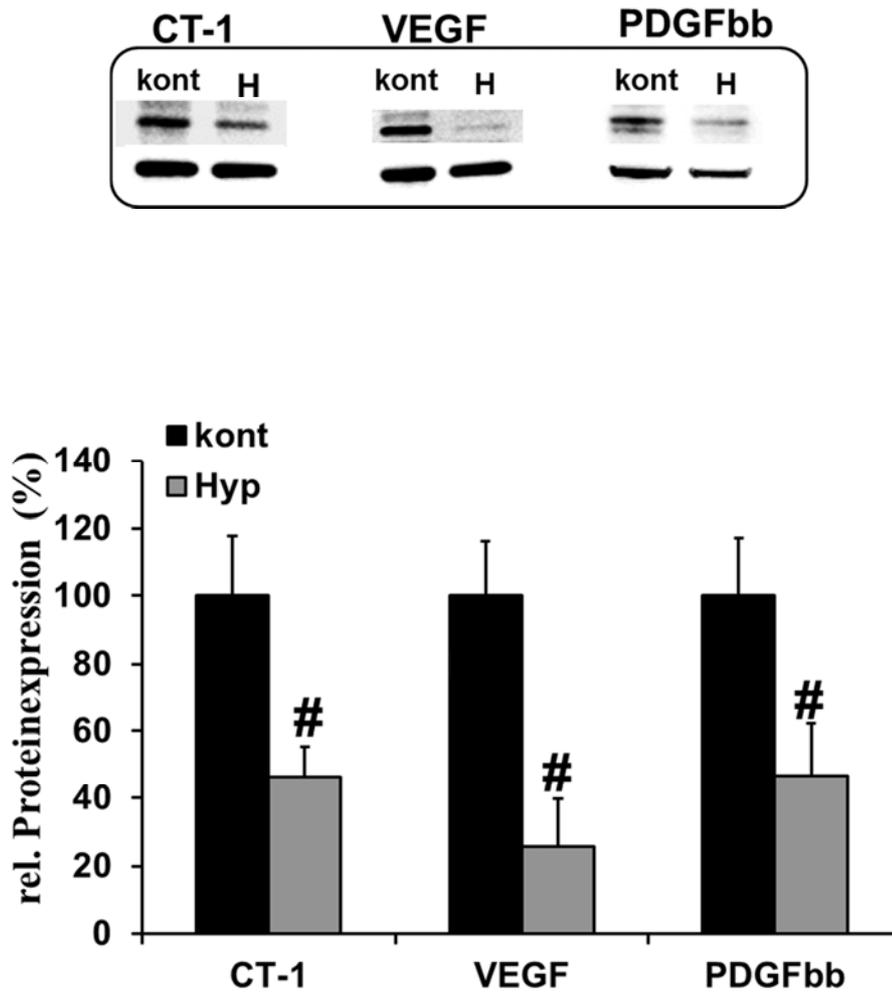


Abb.4.19.1: Herunterregulation der Proteinexpression von CT-1, VEGF und PDGFbb in EBs nach Behandlung mit chronischer Hypoxie. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Western Blots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression von CT-1, VEGF und PDGFbb aus n = 6 unabhängigen Experimenten. EBs blieben unbehandelt (kont) oder wurden von Tag 4 bis 10 in hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot untersucht. Der Expressionsnachweis von GAPDH diente als interne Kontrolle. MW±SD, n = 6, #P<0,001 vs. unbehandelte Kontrolle.

4.19.2 Einfluss chronischer Hypoxie auf die Expression von Stammzellmarkern

Der Einfluss chronischer Hypoxie auf die Expression der Stammzellmarker SOX-2, Oct3/4 und Nanog ist unterschiedlich. Während die Expression von SOX-2 und Nanog durch Inkubation von Tag 4 bis 10 in hypoxischer Atmosphäre gehemmt wird, ist die Expression von Oct3/4 unbeeinflusst.

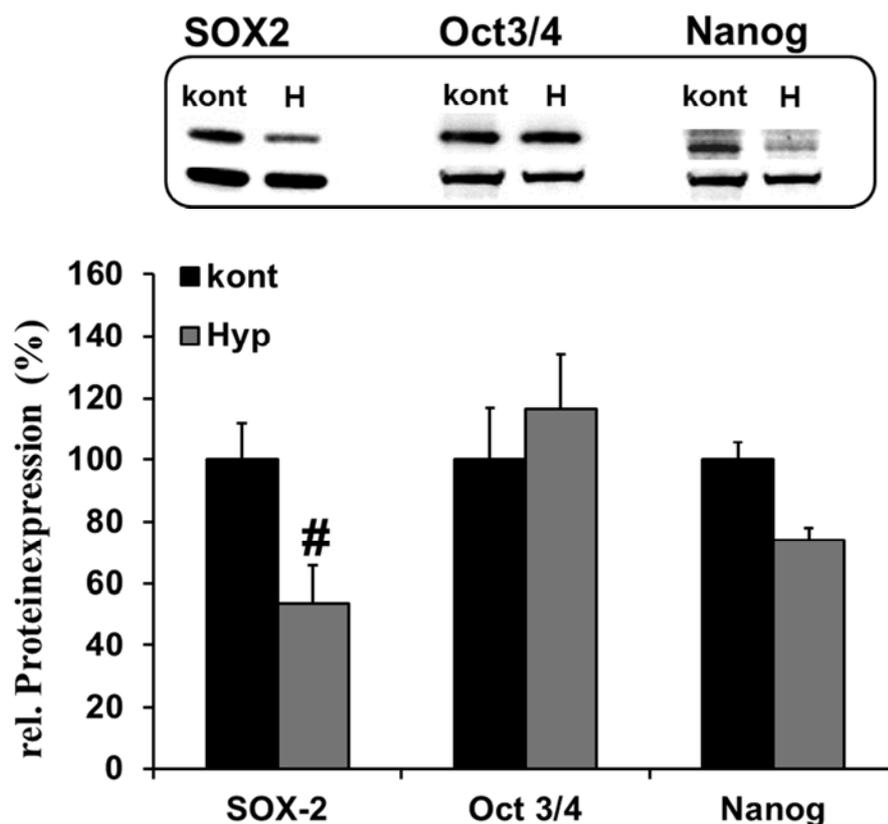


Abb.4.19.2: Einfluss chronischer Hypoxie auf die Expression der Stammzellmarker SOX-2, Oct3/4 und Nanog. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Western Blots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression von SOX-2, Oct3/4 und Nanog aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. EBs blieben unbehandelt (kont) oder wurden von Tag 4 bis 10 in hypoxischer Atmosphäre (1% O_2) inkubiert. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot untersucht. Der Expressionsnachweis von GAPDH diente als interne Kontrolle. $MW \pm SD$, $n = 3$, $\#P < 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle.

4.19.3 Einfluss chronischer Hypoxie auf die Expression kardialer Gene

Der Einfluss chronischer Hypoxie auf die Expression kardialer Gene ist ebenso von recht unterschiedlicher Natur. Im Gegensatz zur gesteigerten Expression von MYH7 wird das kardiale Protein MLC1a und das kardiovaskuläre Protein VEGFR2 signifikant herunter reguliert, während die Expression der kardialen Marker MLC2a und α -Aktinin weitgehend unbeeinflusst bleibt.

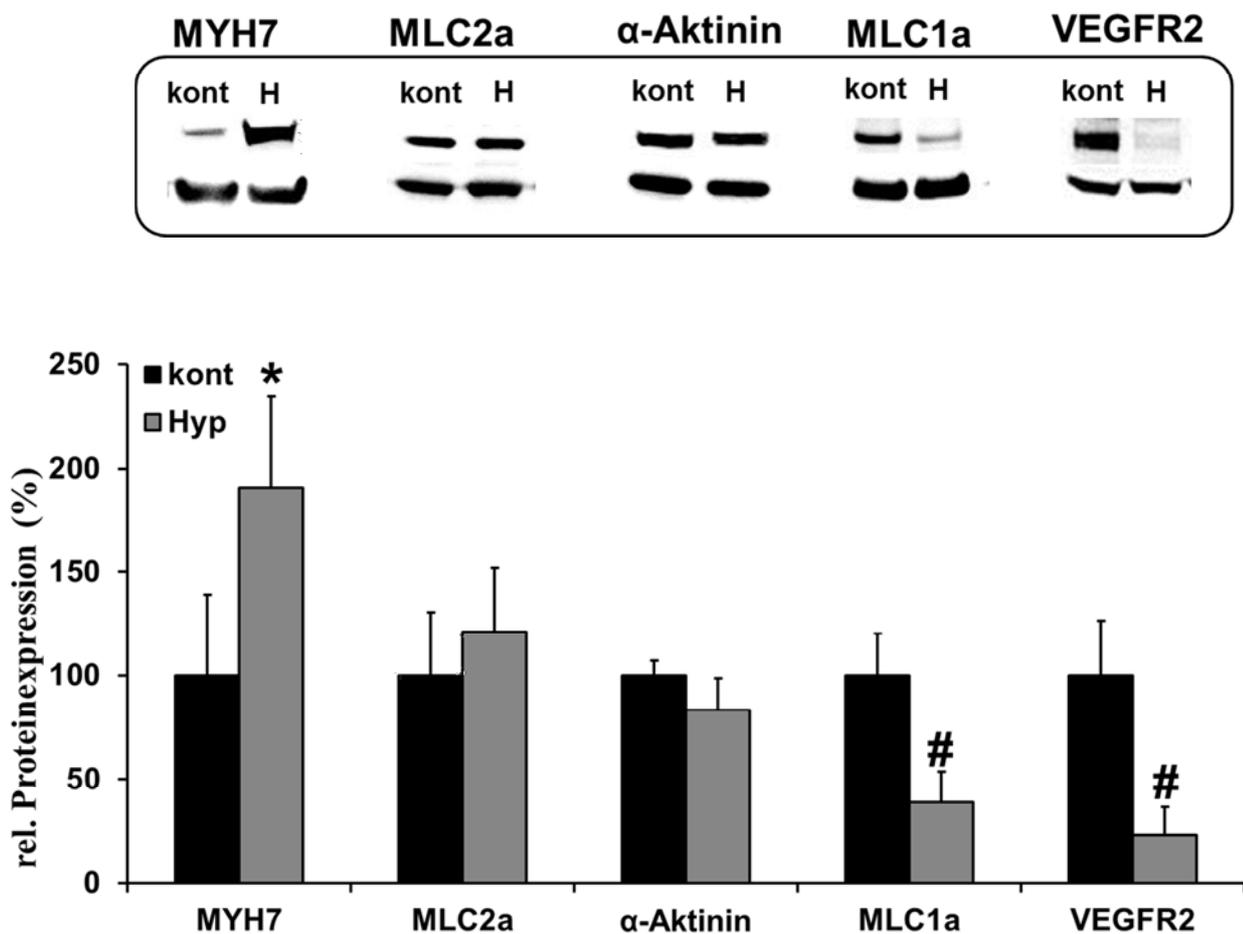


Abb.4.19.3: Einfluss chronischer Hypoxie auf die Expression kardialer Proteine. Der obere Bildteil zeigt repräsentative Western Blots, der untere Bildteil Balkendiagramme der Proteinexpression von MYH7, MLC2a, α -Aktinin, MLC1a und VEGFR2 aus $n = 6$ unabhängigen Experimenten. EBs blieben unbehandelt (kont) oder wurden von Tag 4 bis 10 in hypoxischer Atmosphäre (1%O₂) inkubiert. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot untersucht. Der Expressionsnachweis von GAPDH diente als interne Kontrolle. MW \pm SD, $n = 6$, * $p < 0,001$, # $P < 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle.

5 Diskussion

Viele Studien belegen die kardioprotektive Wirkung von CT-1, sowohl bei Verabreichung vor als auch nach einem schädigenden Einfluss, wie beispielsweise Hypoxie oder Reoxygenierung. Indes besteht wenig Kenntnis über die Bedeutung der CT-1 vermittelten Stimulation der Kardiomyogenese während der Entwicklung des Embryos. Die Identifikation von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, kardialen Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen, welche die Fähigkeit besitzen, die kardiale Differenzierung von ES-Zellen zu initiieren, ist ein bedeutendes Thema im Hinblick auf das Verständnis der Kardiomyogenese und der Weiterentwicklung der Stammzelltherapie zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen.

Obwohl die Rolle von CT-1 bezüglich seiner kardioprotektiven und hypertrophierenden Wirkung sowie der Differenzierung von Stammzellen bereits herausgestellt wurde, ist die Bedeutung des intrazellulären CT-1 für die biologische Funktion der Zelle ungeklärt. Die Daten dieser Studie zeigen, dass CT-1 ebenso wie sein pleiotropher Rezeptor gp130 im Zuge der Differenzierung ES-Zellen exprimiert werden. Des Weiteren führt die exogene Zugabe von CT-1 zu einer konzentrationsabhängigen Stimulation der Kardiomyogenese, einer vermehrten Expression von Transkriptionsfaktoren, die dafür bekannt sind die Kardiomyogenese zu steuern sowie kardialen Strukturgenen und HCN4, der ein Marker des ersten Herzfeldes ist und in Schrittmacherzellen des Herzens vorkommt. Interessanterweise zeigen frühere Publikationen, dass CT-1 ebenso wie LIF, ES-Zellen in einem undifferenzierten Stadium hält (Pennica et al., 1995b). Wohingegen, wie in den Ergebnissen dieser Studie gezeigt, die Zugabe von CT-1 zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung, d.h. an Tag 4 der Differenzierung, zur Stimulation der Kardiomyogenese führt. Vergleichende Resultate wurden für LIF beobachtet, welches mES-Zellen in einem undifferenzierten Stadium hält, jedoch in späteren Entwicklungsstadien essentiell für die Differenzierung ES-Zellen zu Kardiomyozyten ist (Bader et al., 2000). Schon seit längerem ist bekannt, dass eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren an der Regulation der Kardiomyogenese beteiligt sind (Kawai et al., 2004; Bekhite et al., 2011). Infolgedessen wurde untersucht, ob exogenes CT-1 die Expression von kardialen Wachstumsfaktoren, wie VEGF, FGF-2, PDGF-bb und ANP, stimuliert.

5.1 Das EB-Modell zur Untersuchung der Kardiomyogenese

ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen und differenzieren in Abwesenheit von MEFs spontan zu Embryo-ähnlichen Strukturen, die zahlreiche Aspekte der Embryogenese rekapitulieren. Dies beinhaltet die Bildung von Entoderm, Ektoderm, Mesoderm und voranschreitende Entwicklungsprozesse wie die Hämatopoese, Angiogenese und Kardiogenese. Die Vorteile des EB-Modells liegen zum einen in der Möglichkeit der einfachen Herstellung einer hohen Stückzahl an EBs, welche die Fähigkeit zur kardialen Differenzierung haben. Zum anderen können die Kulturbedingungen einfach verändert werden, so dass EBs gut geeignet sind um bestimmte Einflüsse auf die frühe Embryonalentwicklung zu studieren (Doetschman et al., 1993). Kardiomyozyten, die aus ES-Zellen generiert werden, exprimieren ähnliche herzspezifische Proteine, Ionenkanäle und Signalmoleküle wie adulte Kardiomyozyten (Sachinidis et al., 2003a). Die in dieser Arbeit verwendete ES-Zelllinie CCE ist zur Untersuchung der kardialen Differenzierung sehr gut geeignet. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops ist es möglich, beginnend von Tag 6 bis 7 der Entwicklung, kontrahierende Areale auszuzählen, wobei die maximale Anzahl der kontrahierenden Areale zumeist an Tag 10 erreicht wird. Ferner kann mittels der herzspezifischen α -Aktinin Immunfluoreszenzfärbung die kardiale Entwicklung der EBs, unter Behandlung mit CT-1 allein und in Kombination mit Inhibitoren, visuell gut nachvollzogen werden. Der in Abb.4.1 dargestellte zeitliche Expressionsverlauf von CT-1 und seinem Rezeptor gp130 in spontan differenzierenden EBs zeigt ein vergleichbares Expressionsmuster, mit einer frühen Hochregulation der Expression zwischen Tag 2 und 6 der Differenzierung. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von CT-1 an der frühen Embryogenese und an der Vermittlung der Kardiomyogenese, die in dieser Zeit der Entwicklung stattfindet (Hescheler et al., 1999). Die Vermutung, dass die Expression von CT-1 bereits in der frühen Phase der Entwicklung eine wesentliche Rolle spielt, wurde bereits von Sheng postuliert mit der Annahme, dass CT-1 für das Überleben und die Proliferation unreifer Myozyten eine wichtige Rolle spielt (Sheng et al., 1996).

5.2 Einfluss von CT-1 auf die Expression von Wachstumsfaktoren, kardialen Transkriptionsfaktoren und kardialen Genen

Wachstumsfaktoren spielen bei der Entwicklung des Herzens eine große Rolle. Es ist bekannt, dass die Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2 zusammen mit BMP4 und Activin A die Differenzierung kardialer Progenitorzellen in hES-Zellen induzieren (Yang et al., 2008), Flk1 (VEGFR2) positive kardiale Progenitorzellen die Vorstufe der Zelllinien von Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatter Muskulatur bilden (Kattman et al., 2006) und der Wachstumsfaktor FGF-2 in Kombination mit BMP-2 die Kardiomyogenese von ES-Zellen stimuliert (Kawai et al., 2004). Ferner wurde gezeigt, dass PDGF-bb ein kardiogener Wachstumsfaktor in mES-Zellen ist (Sachinidis et al., 2003a) und ANP die Differenzierung von Kardiomyozyten, in einem zeitlichen und räumlichen Rahmen regelt (Kawahara und Nakao, 2010).

Tatsächlich führt die Behandlung mit CT-1 zu einer verstärkten Proteinexpression von PDGFbb, VEGF, FGF-2 und ANP. Dies weist auf eine Transaktivierung prokardialer Faktoren nach CT-1 Behandlung hin. In der Folge führt die Inaktivierung des endogenen CT-1 zu einer Hemmung der Kardiomyogenese, zur Herunterregulation kardialer Transkriptionsfaktoren, kardialer Strukturproteine sowie kardialer Wachstumsfaktoren. Die Expression der Wachstumsfaktoren FGF-2, PDGF-bb und ANP ist in den CT-1 siRNA geninaktivierten EBs signifikant herunterreguliert, während die Herunterregulation der VEGF Expression keine Signifikanz aufweist. Diese Ergebnisse weisen auf eine primäre Rolle von CT-1 in der Regulation der Kardiomyogenese hin, die über eine Regulation der Expression kardialer Wachstumsfaktoren erfolgen könnte. Interessanterweise haben schon niedrige CT-1 Konzentrationen von 1 bis 5 ng/ml einen, steigernden Effekt auf die Expression der oben genannten Wachstumsfaktoren. Aufgrund der Ähnlichkeit der intrazellulären Signaltransduktionskaskaden von CT-1 und den Wachstumsfaktoren PDGFbb, VEGF und FGF-2 könnten Wechselwirkungen zwischen den Kaskaden bestehen und eine Aktivierung von gemeinsamen Signalmolekülen, wie der PI3K und MAPK, wäre möglich.

Weiter ist eine konzentrationsabhängige Expressionssteigerung kardialer Transkriptionsfaktoren und die Hochregulation kardialer Gene unter CT-1 Behandlung zu beobachten. Diese auf Proteinebene gezeigte Stimulation der Kardiomyogenese wird ebenso

auf funktioneller Ebene, anhand einer gesteigerten Anzahl kontrahierender Areale und visuell durch die Größenzunahme der α -Aktinin positiven Zellareale deutlich. Dabei scheint eine Dosierung von 5 bis 25 ng/ml CT-1 maximale Effekte zu induzieren. Frühere Arbeiten unserer Gruppe konnten zeigen, dass die Behandlung mit CT-1 (10 ng/ml) zu einer gesteigerten Proliferation der Kardiomyozyten in ES-Zellen der Maus führt (Sauer et al., 2004). Diese Daten legen nahe, dass CT-1 über die Stimulation von Wachstumsfaktoren, kardialen Transkriptionsfaktoren und kardialen Genen die Proliferation und Differenzierung funktioneller Kardiomyozyten fördert.

5.3 Intrazelluläre Kalzium-, NO- und ROS Signale nach CT-1 Behandlung

CT-1 vermittelt seine Effekte über LIFR β /gp130 gekoppelte Signalwege, durch die Aktivierung von mindestens 4 verschiedenen Signalwegen: 1.) JAK2/STAT3; 2.) ERK1/2; 3.) PI3K/AKT und 4.) p38MAPK (Craig et al., 2001; Kuwahara et al., 2000; Sauer et al., 2004; Sheng et al., 1997). Darüber hinaus kommt es nach CT-1 Behandlung zur Generierung intrazellulärer Signalmoleküle wie Kalzium, ROS und NO.

Kalzium Ionen spielen als Signalmoleküle bei Proliferations- und Differenzierungsvorgängen eine wichtige Rolle und intrazelluläre, ausbalancierte Kalziumspiegel sind für eine normale Herzaktion unabdingbar. Durch Vorbehandlung der Zellen mit dem intrazellulären Kalzium Chelator BAPTA, sowie durch Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher unter Behandlung mit dem SERCA Inhibitor Thapsigargin, wird die Entstehung eines Kalziumtransienten verhindert. Die Kalzium Freisetzung nach Behandlung mit CT-1 hängt offensichtlich von der freien Verfügbarkeit intrazellulären Kalziums ab. Indes scheinen extrazelluläre Kalzium Konzentrationen ebenso an der Entstehung eines Kalziumtransienten beteiligt zu sein, da in einem Kalzium freien Puffer kein CT-1 induziertes Kalziumsignal ausgelöst wird.

Sowohl ROS als auch NO spielen während der frühen Embryogenese eine entscheidende Rolle. Untersuchungen der letzten Jahre zeigen einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten intrazellulärer ROS, der Aktivierung der PI3K und der Stimulation der Kardiomyogenese. Dies kann durch Behandlung mit Radikalfängern oder Inhibitoren der PI3K verhindert werden (Sauer et al., 2001b). Frühere Arbeiten unserer Gruppe können eine

klare Beteiligung von ROS an CT-1 induzierten Signalkaskaden, welche die kardiale Zellproliferation regeln, zeigen (Sauer et al., 2004). Dies wird durch Versuche dieser Doktorarbeit bestätigt. Unter Behandlung von EBs mit CT-1 kommt es zu einer zeitabhängigen Entstehung intrazellulärer ROS mit einem Maximum nach 15 min. Dabei verbleiben die intrazellulären ROS Spiegel auf einem erhöhten Niveau. Die Beteiligung von ROS in Signalkaskaden von Wachstumsfaktoren und Zytokinen lässt einen generellen Mechanismus vermuten, der sowohl an der fetalen Herzentwicklung, als auch bei der Hypertrophie des adulten Herzens beteiligt ist (Sauer et al., 2004).

Des Weiteren führt die Behandlung von ES-Zellen mit exogenem NO zu einer deutlichen Stimulation der Anzahl und Größe schlagender Areale sowie einer vermehrten Expression kardialer Gene (Kanno et al., 2004). Durch Behandlung mit CT-1 konnte eine Steigerung der intrazellulären NO-Konzentration erreicht werden, mit maximalen Werten 60 bis 120 min nach CT-1 Behandlung.

Vergleicht man die zeitliche Reihenfolge der Kalzium-, ROS- und NO-Freisetzung, so wird deutlich, dass die Behandlung mit CT-1 zuerst die Entstehung eines intrazellulären Kalziumtransienten bewirkt, gefolgt von der Generierung intrazellulärer ROS und NO, deren Konzentration über die 8-stündige Behandlungsdauer erhöht bleibt. Das zeitlich versetzte Auftreten der Signalmoleküle Kalzium, ROS und NO nach CT-1 Behandlung lässt eine mögliche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Signalmolekülen in der CT-1 vermittelten Signaltransduktionskaskade vermuten.

5.4 Translokation von CT-1 in den Zellkern

Es wird allgemein angenommen, dass hydrophile Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren außerhalb der Zelle verbleiben, an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und so nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Die Translokation von CT-1 in den Zellkern und die Bedeutung des nukleären CT-1 wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Allerdings besteht aufgrund zahlreicher Studien die zunehmende Evidenz, dass einige der Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone nach externer Zugabe in den Zellkern transloziert werden und in einer intrakrinen Art und Weise auf die Gentranskription wirken (Olsnes et al., 2003). Immer mehr Hinweise deuten auf eine direkte

Einwirkung der Zytokine im Zellkern hin. Hierbei könnten die Polypeptidliganden und ihre Rezeptoren eine wichtige zusätzliche Signalfunktion besitzen. Die Translokation in den Zellkern wurde bisher für die Wachstumsfaktoren VEGF (Li und Keller, 2000) und FGF (Imamura et al., 1992; Sano et al., 1990) gezeigt sowie für verschiedene Zytokine, die zur Interleukin-1 Familie gehören, wie IL-1 α (Grenfell et al., 1989; Hu et al., 2003), IL-33 und IL-37 (Ross et al., 2013), sowie IL-5 (Jans et al., 1997) und Interferon γ (MacDonald et al., 1986). Dabei ist der Transport von Zytokinen, die keine NLS besitzen, noch unklar. Offensichtlich ist dennoch, dass Proteine, die kleiner als 50 kDa sind, keinen aktiven Transport benötigen, sondern passiv durch die Kernporen gelangen können (Macara, 2001). Zur Überprüfung der Fragestellung, ob es unter Behandlung mit CT-1 zu einer Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern kommt, wurden zuvor isolierte Kardiomyozyten für einen Zeitraum von 1 bis 6 h mit CT-1 behandelt. Tatsächlich führt die experimentelle Inkubation mit exogenem CT-1 zu einer Translokation des zytoplasmatischen CT-1 in den Zellkern, obwohl CT-1 keine NLS enthält. In der immunhistochemischen Färbung ist eine klare Verschiebung des zytoplasmatischen CT-1 in den Zellkern zu erkennen, mit maximalen Effekten 2 bis 4 h nach CT-1 Behandlung (Abb. 4.7.1) Ein vergleichbarer Effekt der Kerntranslokation lässt sich durch Inkubation der Zellen unter Hypoxie erreichen (Abb. 4.7.2). Nach Inkubation in hypoxischer Atmosphäre konnte eine Expressionssteigerung von CT-1 gezeigt werden (Abb.4.13). Auffällig ist, dass dieser Effekt sowohl in Kardiomyozyten als auch in Nicht-Kardiomyozyten auftritt. Durch die nachweislich prädominierende Expression von CT-1 in myokardialen Zellen während der frühen Embryogenese (Sheng et al., 1996), könnte es sich bei den Nicht-Kardiomyozyten vorrangig um myokardiale Fibroblasten handeln.

Zur Korrelation des Effektes der Kerntranslokation von CT-1 mit dem Auftreten der intrazellulären Signalmoleküle Kalzium, ROS und NO nach CT-1 Behandlung, wurden die Zellen vor der jeweiligen Behandlung mit den zugehörigen Inhibitoren BAPTA, NMPG und L-NAME präinkubiert. Nach Verwendung der Inhibitoren kommt es zu einer Verhinderung der CT-1 Kerntranslokation in An und Abwesenheit von CT-1 und Hypoxie (Abb.4.9.1; Abb.4.9.2). Dies zeigt die wesentliche Wirkung der Signalmoleküle auf die Kerntranslokation von CT-1, wobei das Fehlen einer Signalmolekülgruppe ausreicht, um den Vorgang der Kerntranslokation zu unterbinden. Vor diesem Hintergrund scheint ein notwendiges Zusammenspiel der einzelnen Signalmoleküle beim Vorgang der CT-1-Kerntranslokation zu

bestehen. Die Ergebnisse zeigen, dass die endogene, zytoplasmatische Expression von CT-1 unter physiologischen Bedingungen stattfindet. Daher vermuten wir, dass die exogene Zugabe von CT-1 zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führt um den Transport und die Verteilung von CT-1 zu regulieren. Einige Studien unterstützen die Beobachtung, dass eine Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und verschiedene Interleukine eine Rolle in intrazellulären und nukleären Signalkaskaden besitzen, die von ihrer klassischen Wirkweise über Membran gebundene Rezeptoren abweicht (Jans und Hassan, 1998).

Die unter 4.9.1 und 4.9.2 gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Translokation von CT-1 in den Zellkern eine erhebliche Rolle bei der CT-1 vermittelten Kardiomyogenese spielt. Durch die Behandlung der EBs mit dem Kalzium Chelator BAPTA, dem Radikalfänger NMPG und dem NO-Synthase Inhibitor L-NAME allein oder in Kombination mit CT-1, werden sowohl die Anzahl der kontrahierenden Areale als auch ihre Größe im Vergleich zur CT-1 behandelten Gruppe signifikant herunterreguliert (Abb.4.10.1). Diese auf funktioneller Ebene untersuchten Ergebnisse lassen eine Beteiligung der oben genannten Signalmoleküle an der CT-1 vermittelten Kardiomyogenese vermuten. Des Weiteren kommt es ebenso auf Proteinebene nach Behandlung mit den oben genannten Hemmstoffen zu einer signifikanten Inhibierung der Expression kardialer Gene, wie α -Aktinin, MLC2a, MLC2v, MYH7 und HCN4 (Abb.4.10.2). Dabei ist beachtenswert, dass die einzelnen Hemmstoffe nicht gleichermaßen auf alle kardialen Marker wirken, sondern die Expression von HCN4 beispielsweise nicht durch NMPG und L-NAME beeinflusst wird.

5.5 Auswirkung der spezifischen Hemmung des gp130 gekoppelten Signalweges auf die Kardiomyogenese

Nach Bindung von CT-1 durch den LIF Rezeptor assoziiert gp130 mit dem Ligand-Rezeptor-Komplex und leitet das Signal ins Zellinnere weiter. Die zelluläre Signaltransduktion von CT-1 kann über Aktivierung von mindestens 4 verschiedenen Signalwegen (JAK/STAT, PI3K/AKT, ERK1/2 und p38) stattfinden (Craig et al., 2001; Kuwahara et al., 2000; Sauer et al., 2004; Sheng et al., 1997). Durch Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren der einzelnen Signalwege kann ihr Einfluss auf die CT-1 vermittelte Kardiomyogenese abgeleitet werden. Die Hemmstoffe der JAK2 und PI3K zeigen eine signifikante Hemmwirkung auf die Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5, TEAD3 und der kardialen Gene α -Aktinin,

MLC1a, MLC2v, MYH7, HCN4 sowie auf die Expression des kardiovaskulären Markers VEGFR2 (Abb.4.12.1). Demgegenüber zeigen die Inhibitoren von ERK1/2 (PD98059) und der p38 MAPK (SKF86002) eine leichte Herunterregulation, aber keine signifikante Hemmwirkung auf die Expression der kardialen Gene.

5.6 Bedeutung von CT-1 für die Kardiomyogenese

Unter Behandlung mit CT-1 kommt es zu einer signifikanten Stimulation der Kardiomyogenese. Die mit CT-1 behandelten Zellen zeigen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht nur auf Proteinebene eine Expressionssteigerung kardialer Transkriptionsfaktoren und kardialer Gene, sondern ebenso auf funktioneller Ebene eine Zunahme der Anzahl kontrahierender Areale, sowie eine Steigerung der Arealgröße. Diese Ergebnisse zeigen die Funktion von CT-1 als Schlüsselfaktor der Herzentwicklung. Der Vergleich zur Literatur unterstützt die These, dass CT-1 eine zentrale Rolle bei der Differenzierung kardialer Zellen einnimmt. Es wurde bereits gezeigt, dass homozygot negative Mäuse für gp130 eine embryonale Letalität entwickeln, die mit einer auffälligen Hypoplasie der Ventrikel einhergeht (Yoshida et al., 1996). Dies weist auf eine bedeutende Rolle des gp130 vermittelten Signalweges für das kardiale Wachstum hin. Dennoch ist offen, welcher der Liganden des gp130 Signalweges bedeutend für die kardiale Entwicklung ist. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der IL-6 Familie wird CT-1 vorwiegend im frühen embryonalen Herzen der Maus exprimiert; dort ist die Expression auf myokardiale Zellen beschränkt (Sheng et al., 1996). Ferner ist bekannt, dass die Behandlung mit CT-1 zu einer gesteigerten Expression kardialer Marker wie ANP und einer Aktivierung von „immediate early genes“ führt (Wollert und Chien, 1997). Das Erscheinungsbild der gp130^{-/-} Mäuse, gekoppelt mit der frühen Expression von CT-1 im sich entwickelnden Herzen deutet darauf hin, dass es sich bei dem gesuchten Liganden um CT-1 handeln könnte, der für die kardiale Differenzierung und das Wachstum des Herzens relevant ist. CT-1^{-/-} Mäuse entwickeln im Gegensatz zu den gp130^{-/-} Mäusen keine offensichtlichen Herzmissbildungen, jedoch wurde die kardiale Funktion und Herzgröße nicht untersucht (Gritman et al., 2006). Daher liegt die Vermutung nahe, dass in diesem Fall verwandte, über den Rezeptor gp130 wirkende, Zytokine den Verlust von CT-1 während der kardialen Entwicklung ausgleichen. Aufgrund der

5 fachen Erhöhung der *IL6*-mRNA Genexpression in CT-1^{-/-} Mäusen (Gritman et al., 2006) spricht einiges dafür, dass IL-6 diese kompensatorische Funktion übernimmt.

Die Bedeutung der CT-1 vermittelten Kardiomyogenese wird in CT-1-defizienten EBs deutlich. siRNA Inhibition der CT-1 Expression führt zu einer signifikant verminderten Kardiomyogenese. In den siRNA behandelten Zellen ist die Anzahl der kontrahierenden Areale deutlich verringert (Abb.4.11.1) und die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und kardialer Gene signifikant gehemmt. Interessanterweise ist die Expression der Wachstumsfaktoren VEGF, FGF-2 und PDGFbb in den CT-1-defizienten EBs ebenfalls erheblich reduziert. Die Bedeutung von CT-1 auf die Expression von Wachstumsfaktoren, kardialen Transkriptionsfaktoren und kardialen Genen ist bemerkenswert und lässt die Schlussfolgerung zu, dass CT-1 ein Schlüsselfaktor der Kardiomyogenese ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter Behandlung mit CT-1 die Freisetzung intrazellulärer Signalmoleküle (Kalzium, ROS und NO) induziert wird, CT-1 abhängig vom Vorhandensein dieser Signalmoleküle in den Zellkern transloziert und in der Folge die Expression von Wachstumsfaktoren, kardialen Transkriptionsfaktoren und kardialen Genen und letztendlich die Kardiomyogenese stimuliert wird (Abb.5.9).

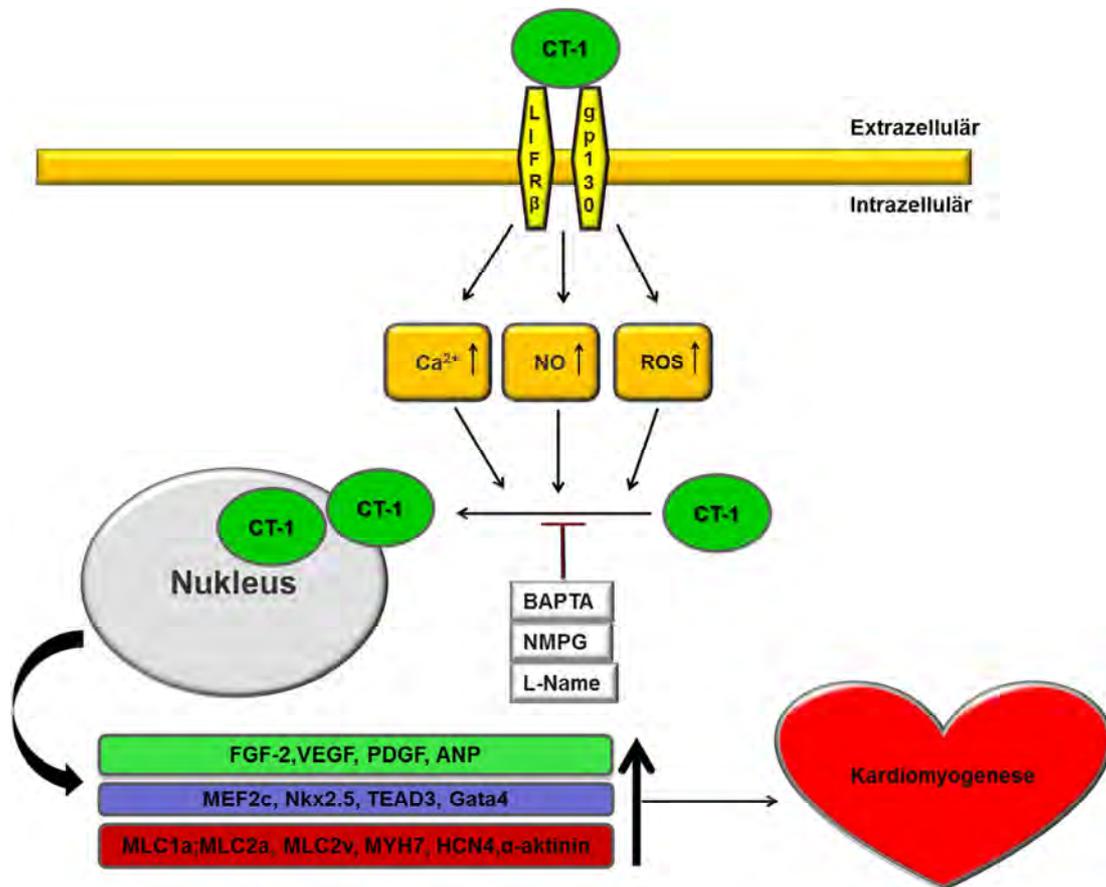


Abb.5.6: CT-1 stimuliert die Kardiomyogenese. Unter Behandlung mit CT-1 kommt es zur intrazellulären Freisetzung von Kalzium, ROS und NO und der Translokation von CT-1 in den Zellkern. Dies ist abhängig von der Generierung der intrazellulären Signalmoleküle und kann durch den Kalzium Chelator BAPTA, den Radikalfänger NMPG und dem NOS-Inhibitor L-NAME verhindert werden. CT-1 bewirkt eine Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren, kardialen Transkriptionsfaktoren und kardialen Genen und führt zusammenfassend zur Induktion der Kardiomyogenese.

5.7 Expression von CT-1 nach Hypoxie/Reoxygenierung

Hypoxie ist eine (patho-)physiologische Situation vorkommend a.) während des Wachstums von ES-Zellen in EBs (Wartenberg et al., 2001) b.) im embryonalen Herzen, durch Steigerung der Zellmasse aufgrund von Zellhyperplasie (Wikenheiser et al., 2006) und c.) bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie beispielsweise Aortenstenose (Talwar et al., 2001) oder Myokardinfarkt (Talwar et al., 2002). Die Untersuchung der CT-1 Expression in seiner physiologischen Umgebung soll nicht nur Aufschluss über die Rolle von CT-1 bei der kardialen Reparatur des Infarktherzens geben, sondern ebenso Einblicke in die kardiale Zellhyperplasie im embryonalen Herzen gewähren.

Unter Behandlung der Zellen mit Hypoxie (1% O₂) und Reoxygenierung kommt es zu einer vermehrten Proteinexpression von CT-1. Zahlreiche Studien zeigen die kardioprotektive Wirkung CT-1 unter verschiedenen Stressstimuli. Bemerkenswert ist, dass CT-1 dabei sowohl bei Verabreichung vor der schädigenden Ischämie, als auch bei Gabe während der Reoxygenierungsphase kardioprotektiv wirkt (Brar et al., 2001b; Jougasaki, 2010). Der protektive Effekt von CT-1 wird über die Aktivierung von ERK1/2, PI3K und AKT vermittelt (Brar et al., 2001b). Die Inkubation der EBs in hypoxischer Atmosphäre und unter Reoxygenierung bewirkt eine zeitabhängige Phosphorylierung und somit Aktivierung von JAK2/STAT3 und PI3K/AKT. Diese zum RISK-Signalweg zugehörigen Signalmoleküle regulieren antiapoptotische Mechanismen (Hausenloy und Yellon, 2004). Unsere Ergebnisse zeigen, dass es sowohl unter Hypoxie, als auch unter Reoxygenierungs-Bedingungen zu einer Stimulation des RISK-Signalweges und zu einer vermehrten Expression von CT-1 kommt. Ebenso werden die Wachstumsfaktoren VEGF, PDGFbb und FGF-2 nach Inkubation in hypoxischer Atmosphäre vermehrt exprimiert und während der Phase der Reoxygenierung ein zweites Mal hoch reguliert.

5.8 Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Kardiomyogenese

Es ist bekannt, dass Hypoxie über Hypoxie-regulierte Transkriptionsfaktoren die Genexpression steuern kann (Simon und Keith, 2008) und dass die Expression von CT-1 nach Behandlung mit chemischer Hypoxie (CoCl₂) über ROS und HIF-1 α reguliert wird (Ateghang et al., 2006). Ferner sind CT-1 Gewebespiegel bei Patienten nach Myokardinfarkt erhöht, was

auf eine Beteiligung von CT-1 an Reparaturvorgängen des Herzens hinweist (Aoyama et al., 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Aktivierung der Signalmoleküle JAK2/STAT3 und PI3K/AKT sowie eine gesteigerte Expression von Wachstumsfaktoren. Dies zeigt sich sowohl unter Hypoxie, als auch unter Reoxygenierungs-Bedingungen. Darüber hinaus kommt es unter Hypoxie/Reoxygenierung zur Generierung intrazellulärer Signalmoleküle wie ROS und NO. Diese auch für CT-1 beobachteten Effekte führen bekanntlich zu einer Stimulation der Kardiomyogenese (Kanno et al., 2004; Sauer et al., 2001b). Weitere Ergebnisse zeigen nach Exposition der EBs unter Hypoxie/Reoxygenierung eine gesteigerte Anzahl kontrahierender Areale, sowie eine vermehrte Expression kardialer Gene. Eine Trennung der Effekte der Hypoxie und Reoxygenierung kann in diesem Fall aufgrund des Umstandes, dass die kontrahierenden Areale erst ab Tag 7 der Differenzierung der EBs bestimmt werden können, nicht erfolgen, so dass hier nicht näher bestimmt werden kann, ob die beobachtete Stimulation der Kardiomyogenese auf die Aktivierung von Signalmolekülen und Wachstumsfaktoren unter Hypoxie oder unter Reoxygenierung zurückzuführen ist.

Vorbehandlung der EBs mit dem Kalzium Chelator BAPTA, dem Radikalfänger NMPG und dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME hemmen die Expression des kardialen Transkriptionsfaktors TEAD3 und vermindern die Expression der kardialen Gene α -Aktinin und MLC2v nach Inkubation in hypoxischer Atmosphäre. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Translokation von CT-1 in den Zellkern notwendig ist, um die Kardiomyogenese zu stimulieren.

5.9 Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Kardiomyogenese

Während der frühen Embryogenese wächst der Embryo in einem Gewebemilieu heran, das durch eine reduzierte O₂ Verfügbarkeit von 1,5-8% (Fischer und Bavister, 1993) gekennzeichnet ist. Die molekularen Mechanismen, die den Erhalt der Stammzelleigenschaft und die Proliferation der ES-Zellen unter hypoxen Bedingungen regulieren, sind noch weitgehend unbekannt. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass kurzzeitige Inkubation von EBs in hypoxischer Atmosphäre CT-1 vermittelte Signalkaskaden aktiviert, die Expression von Wachstumsfaktoren steigert und die Kardiomyogenese stimuliert. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen führt chronische Hypoxie zu einer Inhibierung der Differenzierung. EBs die chronischer Hypoxie ausgesetzt waren zeigen eine wesentlich verzögerte Entwicklung. Dies

wird deutlich anhand der gehemmten Expression von Wachstumsfaktoren und kardialen Genen und wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die Stammzellmarker, mit Ausnahme von SOX-2, weiterhin auf einem hohen Niveau exprimiert werden. Interessanterweise wird die Expression von β -MYH7 in hypoxischer Atmosphäre signifikant gesteigert. Diese Abweichung von der Expression der anderen kardialen Gene könnte durch den im Laufe der Differenzierung physiologischen Wechsel zur Isoform α -MHC begründet sein, der durch die O_2 Konzentration im Gewebe gesteuert werden könnte.

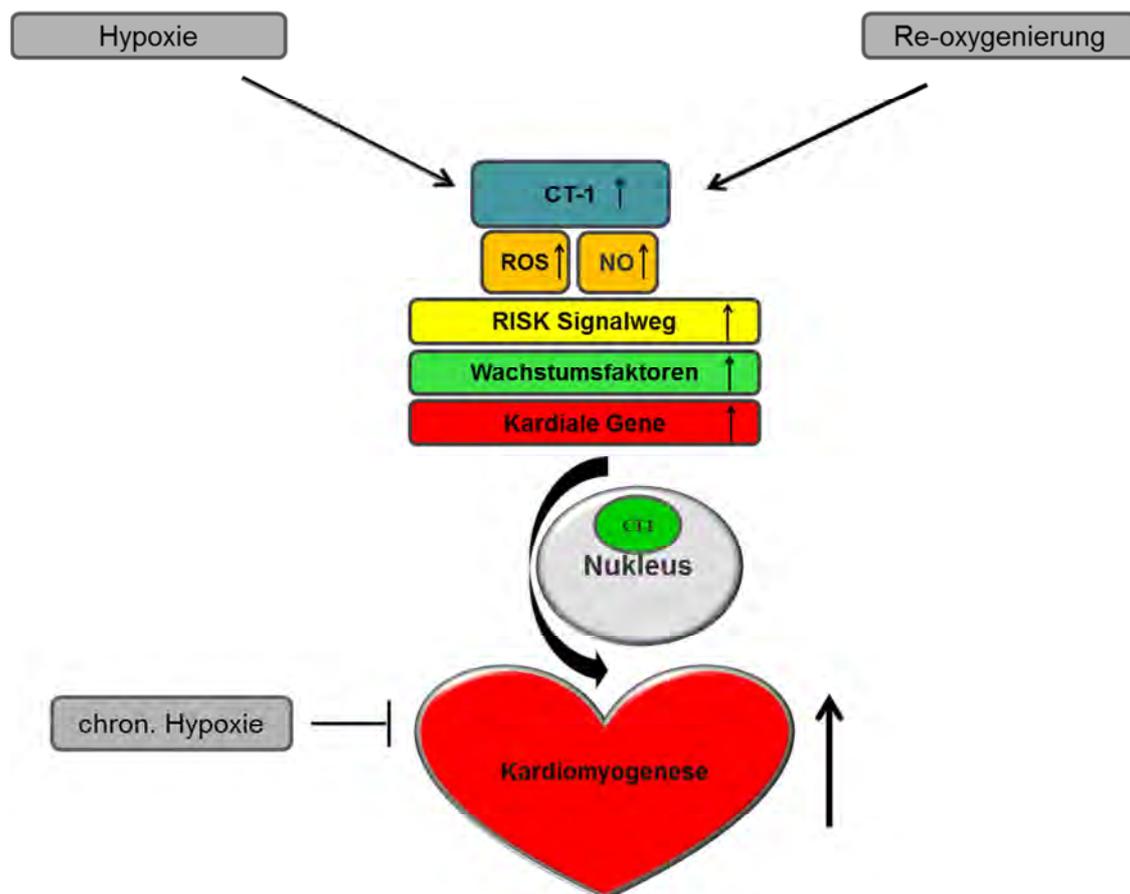


Abb.5.12: Stimulation der Kardiomyogenese unter Hypoxie/Reoxygenierung. Unter Hypoxie/Reoxygenierung kommt es zu einer vermehrten Expression von CT-1, zur Freisetzung der intrazellulären Signalmoleküle ROS und NO und zur Aktivierung des RISK-Signalweges, sowie zu einer Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren. CT-1 wird unter Hypoxie in den Kern transloziert und stimuliert in der Folge die Kardiomyogenese. Chronische Hypoxie führt zur Inhibition der Kardiomyogenese.

5.10 Klinische Bedeutung

Die American Heart Association zeigt in ihrer jährlichen statistischen Auswertung, dass im Durchschnitt alle 4 min ein Mensch an den Folgen eines Herzinfarktes stirbt (Go et al., 2013). Kardiale Erkrankungen stellen nach wie vor die führende Todesursache in industrialisierten Ländern dar, so liegt die Sterberate in Folge von kardiovaskulären Erkrankungen bei 32 %. Einen Eindruck von der wirtschaftlichen Relevanz vermitteln die entstehenden Kosten, die sich allein in Amerika auf über 11 Milliarden Dollar pro Jahr belaufen (Go et al., 2013).

CT-1-Plasmaspiegel sind bei Patienten, die unter kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzversagen, Bluthochdruck, Herzklappenfehlern und Myokardinfarkt leiden, erhöht und korrelieren mit der Schwere der Erkrankung (Pemberton, 2007; Talwar et al., 2002; Tsutamoto et al., 2007; Zolk et al., 2002). Folglich können CT-1-Plasmaspiegel zu prognostischen Zwecken bei Patienten mit chronischem Herzversagen herangezogen werden (Tsutamoto et al., 2007). Das Ziel der kardiovaskulären regenerativen Medizin ist die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien, die das Überleben und die Funktion kardialer Zellen fördern. Die Bildung von neuem Herzgewebe, das eine elektromechanische Ankopplung an das Empfängergewebe hat sowie über eine angemessene Gefäßversorgung verfügt, ist für eine normale Herzfunktion unabdingbar. Die hier vorgelegte Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen der CT-1 vermittelten Stimulation der Kardiomyogenese ist für die regenerative Medizin ein weiterer Baustein auf dem Weg zur therapeutischen Anwendung.

6. Zusammenfassung

Die Hauptidee dieser Arbeit liegt in der Herausarbeitung des Einflusses von CT-1 auf die Kardiomyogenese von ES Zellen. Das untersuchte in vitro Differenzierungspotential ES-Zellen unter CT-1-Behandlung zeigt eine Förderung der Entwicklung in Richtung kardialer Zellen. CT-1 induziert die Expression kardialer Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und Genen und fördert die Differenzierung funktioneller Kardiomyozyten in ES-Zellen der Maus. Die zentrale Bedeutung von CT-1 als Schlüsselfaktor der Kardiomyogenese wird in den CT-1 siRNA behandelten Zellen deutlich. In den CT-1-defizienten EBs wird die kardiale Differenzierung gehemmt. Dies wird anhand der herunterregulierten Expression kardialer Wachstumsfaktoren, kardialer Transkriptionsfaktoren und kardialer Marker deutlich.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der CT-1 vermittelten Signaltransduktionskaskaden JAK2 und PI3K zur Stimulation der Kardiomyogenese notwendig sind, während die Aktivierung von ERK1/2 und p38 eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass CT-1 abhängig von der Freisetzung der intrazellulären Signalmoleküle Kalzium, ROS und NO, in den Zellkern transloziert wird. Das Vorhandensein von CT-1 im Zellkern ist scheinbar von entscheidender Bedeutung für die Expression kardialer Gene.

Des Weiteren kommt es nach Hypoxie/Reoxygenierung zu einer vermehrten Expression von CT-1, zur Aktivierung des RISK Signalweges, einer deutlichen Expressionssteigerung von Wachstumsfaktoren und zur Stimulation der Kardiomyogenese. Im Gegensatz hierzu führt chronische Hypoxie zu einer Inhibierung der Differenzierung und zur Hemmung der Herzzelldifferenzierung. Diese Beobachtungen zeigen eine antagonistische Wirkung von akuter und chronischer Hypoxie auf die Kardiomyogenese.

7. Referenzen

- Ali,S., Nguyen,D.Q., Falk,W., and Martin,M.U. (2010). Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1512-1516.
- Aoyama,T., Takimoto,Y., Pennica,D., Inoue,R., Shinoda,E., Hattori,R., Yui,Y., and Sasayama,S. (2000). Augmented expression of cardiotrophin-1 and its receptor component, gp130, in both left and right ventricles after myocardial infarction in the rat. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32, 1821-1830.
- Asai,S., Saito,Y., Kuwahara,K., Mizuno,Y., Yoshimura,M., Higashikubo,C., Tsuji,T., Kishimoto,I., Harada,M., Hamanaka,I., Takahashi,N., Yasue,H., and Nakao,K. (2000). The heart is a source of circulating cardiotrophin-1 in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 320-323.
- Ateghang,B. (2006). Regulation of Cardiotrophin-1 Expression During Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation by Hypoxia and Reactive Oxygen Species.
- Ateghang,B., Wartenberg,M., Gassmann,M., and Sauer,H. (2006). Regulation of cardiotrophin-1 expression in mouse embryonic stem cells by HIF-1alpha and intracellular reactive oxygen species. *J. Cell Sci.* 119, 1043-1052.
- Azaki,A., Lamont,L., Fineman,J.R., and He,Y. (2005). Divergent transcriptional enhancer factor-1 regulates the cardiac troponin T promoter. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 289, C1522-C1534.
- Bader,A., Al-Dubai,H., and Weitzer,G. (2000). Leukemia inhibitory factor modulates cardiogenesis in embryoid bodies in opposite fashions. *Circ. Res.* 86, 787-794.
- Barton,P.J., Robert,B., Cohen,A., Garner,I., Sassoon,D., Weydert,A., and Buckingham,M.E. (1988). Structure and sequence of the myosin alkali light chain gene expressed in adult cardiac atria and fetal striated muscle. *J. Biol. Chem.* 263, 12669-12676.
- Bartsch,C., Bekhite,M.M., Wolheim,A., Richter,M., Ruhe,C., Wissuwa,B., Marciniak,A., Muller,J., Heller,R., Figulla,H.R., Sauer,H., and Wartenberg,M. (2011). NADPH oxidase and eNOS control cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells on ascorbic acid treatment. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 432-443.
- Bass,D.A., Parce,J.W., Dechatelet,L.R., Szejda,P., Seeds,M.C., and Thomas,M. (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130, 1910-1917.
- Bekhite,M.M., Finkensieper,A., Binas,S., Muller,J., Wetzker,R., Figulla,H.R., Sauer,H., and Wartenberg,M. (2011). VEGF-mediated PI3K class IA and PKC signaling in cardiomyogenesis and vasculogenesis of mouse embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* 124, 1819-1830.

- Berridge,M.J., Lipp,P., and Bootman,M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 11-21.
- Bloch,W., Fleischmann,B.K., Lorke,D.E., Andressen,C., Hops,B., Hescheler,J., and Addicks,K. (1999). Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc. Res.* *43*, 675-684.
- Bondue,A., Tannler,S., Chiapparo,G., Chabab,S., Ramialison,M., Paulissen,C., Beck,B., Harvey,R., and Blanpain,C. (2011). Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation. *J. Cell Biol.* *192*, 751-765.
- Boyer,L.A., Lee,T.I., Cole,M.F., Johnstone,S.E., Levine,S.S., Zucker,J.P., Guenther,M.G., Kumar,R.M., Murray,H.L., Jenner,R.G., Gifford,D.K., Melton,D.A., Jaenisch,R., and Young,R.A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* *122*, 947-956.
- Brar,B.K., Stephanou,A., Liao,Z., O'Leary,R.M., Pennica,D., Yellon,D.M., and Latchman,D.S. (2001a). Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischaemia and at reoxygenation. *Cardiovasc. Res.* *51*, 265-274.
- Brar,B.K., Stephanou,A., Pennica,D., and Latchman,D.S. (2001b). CT-1 mediated cardioprotection against ischaemic re-oxygenation injury is mediated by PI3 kinase, Akt and MEK1/2 pathways. *Cytokine* *16*, 93-96.
- Brewer,A. and Pizzey,J. (2006). GATA factors in vertebrate heart development and disease. *Expert. Rev. Mol. Med.* *8*, 1-20.
- Brewer,A.C., Alexandrovich,A., Mjaatvedt,C.H., Shah,A.M., Patient,R.K., and Pizzey,J.A. (2005). GATA factors lie upstream of Nkx 2.5 in the transcriptional regulatory cascade that effects cardiogenesis. *Stem Cells Dev.* *14*, 425-439.
- Buggisch,M., Ateghang,B., Ruhe,C., Strobel,C., Lange,S., Wartenberg,M., and Sauer,H. (2007). Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J. Cell Sci.* *120*, 885-894.
- Burdon,T., Smith,A., and Savatier,P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* *12*, 432-438.
- Burrige,P.W., Thompson,S., Millrod,M.A., Weinberg,S., Yuan,X., Peters,A., Mahairaki,V., Koliatsos,V.E., Tung,L., and Zambidis,E.T. (2011). A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability. *PLoS. One.* *6*, e18293.
- Bustos,M., Beraza,N., Lasarte,J.J., Baixeras,E., Alzuguren,P., Bordet,T., and Prieto,J. (2003). Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. *Gastroenterology* *125*, 192-201.
- Calabro,P., Limongelli,G., Riegler,L., Maddaloni,V., Palmieri,R., Golia,E., Roselli,T., Masarone,D., Pacileo,G., Golino,P., and Calabro,R. (2009). Novel insights into the role of cardiotrophin-1 in cardiovascular diseases. *J. Mol. Cell Cardiol.* *46*, 142-148.

- Chen, Y., Amende, I., Hampton, T.G., Yang, Y., Ke, Q., Min, J.Y., Xiao, Y.F., and Morgan, J.P. (2006). Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 291, H1653-H1658.
- Chen, Z., Friedrich, G.A., and Soriano, P. (1994). Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes Dev.* 8, 2293-2301.
- Chew, J.L., Loh, Y.H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W.L., Yeap, L.S., Li, P., Ang, Y.S., Lim, B., Robson, P., and Ng, H.H. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 25, 6031-6046.
- Claxton, T.J.F.a.M.W.D. (2006). *Microscopy, Confocal.*
- Craig, R., Wagner, M., McCardle, T., Craig, A.G., and Glembotski, C.C. (2001). The cytoprotective effects of the glycoprotein 130 receptor-coupled cytokine, cardiotrophin-1, require activation of NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 276, 37621-37629.
- David, R., Stieber, J., Fischer, E., Brunner, S., Brenner, C., Pfeiler, S., Schwarz, F., and Franz, W.M. (2009). Forward programming of pluripotent stem cells towards distinct cardiovascular cell types. *Cardiovasc. Res.* 84, 263-272.
- Davidovits, P. and Egger, M.D. (1973). Photomicrography of corneal endothelial cells in vivo. *Nature* 244, 366-367.
- Doetschman, T., Shull, M., Kier, A., and Coffin, J.D. (1993). Embryonic stem cell model systems for vascular morphogenesis and cardiac disorders. *Hypertension* 22, 618-629.
- Drobic, V., Cunnington, R.H., Bedosky, K.M., Raizman, J.E., Elimban, V.V., Rattan, S.G., and Dixon, I.M. (2007). Differential and combined effects of cardiotrophin-1 and TGF-beta1 on cardiac myofibroblast proliferation and contraction. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 293, H1053-H1064.
- Edmondson, D.G., Lyons, G.E., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1994). Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* 120, 1251-1263.
- Ezashi, T., Das, P., and Roberts, R.M. (2005). Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 4783-4788.
- Fischer, B. and Bavister, B.D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 99, 673-679.
- Freed, D.H., Chilton, L., Li, Y., Dangerfield, A.L., Raizman, J.E., Rattan, S.G., Visen, N., Hryshko, L.V., and Dixon, I.M. (2011). Role of myosin light chain kinase in cardiotrophin-1-induced cardiac myofibroblast cell migration. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 301, H514-H522.
- Freed, D.H., Cunnington, R.H., Dangerfield, A.L., Sutton, J.S., and Dixon, I.M. (2005). Emerging evidence for the role of cardiotrophin-1 in cardiac repair in the infarcted heart. *Cardiovasc. Res.* 65, 782-792.

- Gabbita,S.P., Robinson,K.A., Stewart,C.A., Floyd,R.A., and Hensley,K. (2000). Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 376, 1-13.
- Garg,V., Kathiriya,I.S., Barnes,R., Schluterman,M.K., King,I.N., Butler,C.A., Rothrock,C.R., Eapen,R.S., Hirayama-Yamada,K., Joo,K., Matsuoka,R., Cohen,J.C., and Srivastava,D. (2003). GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 424, 443-447.
- Gassanov,N., Er,F., Zagidullin,N., and Hoppe,U.C. (2004). Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype. *FASEB J.* 18, 1710-1712.
- Gee,K.R., Brown,K.A., Chen,W.N., Bishop-Stewart,J., Gray,D., and Johnson,I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 27, 97-106.
- Go,A.S., Mozaffarian,D., Roger,V.L., Benjamin,E.J., Berry,J.D., Borden,W.B., Bravata,D.M., Dai,S., Ford,E.S., Fox,C.S., Franco,S., Fullerton,H.J., Gillespie,C., Hailpern,S.M., Heit,J.A., Howard,V.J., Huffman,M.D., Kissela,B.M., Kittner,S.J., Lackland,D.T., Lichtman,J.H., Lisabeth,L.D., Magid,D., Marcus,G.M., Marelli,A., Matchar,D.B., McGuire,D.K., Mohler,E.R., Moy,C.S., Mussolino,M.E., Nichol,G., Paynter,N.P., Schreiner,P.J., Sorlie,P.D., Stein,J., Turan,T.N., Virani,S.S., Wong,N.D., Woo,D., and Turner,M.B. (2013). Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 127, 143-152.
- Grenfell,S., Smithers,N., Miller,K., and Solari,R. (1989). Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of human interleukin 1 alpha. *Biochem. J.* 264, 813-822.
- Gritman,K., Van Winkle,D.M., Lorentz,C.U., Pennica,D., and Habecker,B.A. (2006). The lack of cardiotrophin-1 alters expression of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor mRNA but does not impair cardiac injury response. *Cytokine* 36, 9-16.
- Hamanaka,I., Saito,Y., Nishikimi,T., Magaribuchi,T., Kamitani,S., Kuwahara,K., Ishikawa,M., Miyamoto,Y., Harada,M., Ogawa,E., Kajiyama,N., Takahashi,N., Izumi,T., Shirakami,G., Mori,K., Inobe,Y., Kishimoto,I., Masuda,I., Fukuda,K., and Nakao,K. (2000). Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and endocrine function of the heart. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 279, H388-H396.
- Hausenloy,D.J. and Yellon,D.M. (2004). New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc. Res.* 61, 448-460.
- Hausenloy,D.J. and Yellon,D.M. (2009). Cardioprotective growth factors. *Cardiovasc. Res.* 83, 179-194.
- Hensley,K., Robinson,K.A., Gabbita,S.P., Salsman,S., and Floyd,R.A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1456-1462.

- Hescheler,J., Fleischmann,B.K., Wartenberg,M., Bloch,W., Kolossov,E., Ji,G., Addicks,K., and Sauer,H. (1999). Establishment of ionic channels and signalling cascades in the embryonic stem cell-derived primitive endoderm and cardiovascular system. *CTO 165*, 153-164.
- Hinitz,Y., Pan,L., Walker,C., Dowd,J., Moens,C.B., and Hughes,S.M. (2012). Zebrafish *Mef2ca* and *Mef2cb* are essential for both first and second heart field cardiomyocyte differentiation. *Dev. Biol.* *369*, 199-210.
- Hu,B., Wang,S., Zhang,Y., Feghali,C.A., Dingman,J.R., and Wright,T.M. (2003). A nuclear target for interleukin-1 α : interaction with the growth suppressor *neclin* modulates proliferation and collagen expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 10008-10013.
- Imamura,T., Tokita,Y., and Mitsui,Y. (1992). Identification of a heparin-binding growth factor-1 nuclear translocation sequence by deletion mutation analysis. *J. Biol. Chem.* *267*, 5676-5679.
- Jans,D.A., Briggs,L.J., Gustin,S.E., Jans,P., Ford,S., and Young,I.G. (1997). The cytokine interleukin-5 (IL-5) effects cotransport of its receptor subunits to the nucleus in vitro. *FEBS Lett.* *410*, 368-372.
- Jans,D.A. and Hassan,G. (1998). Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: a role in signaling? *Bioessays* *20*, 400-411.
- Ji,G.J., Fleischmann,B.K., Bloch,W., Feelisch,M., Andressen,C., Addicks,K., and Hescheler,J. (1999). Regulation of the L-type Ca²⁺ channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition. *FASEB J.* *13*, 313-324.
- Jiang,B., Dong,H., Li,Q., Yu,Y., Zhang,Z., Zhang,Y., Wang,G., and Zhang,Z. (2012). Differentiation of Reprogrammed Mouse Cardiac Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes. *Cell Biochem. Biophys.*
- Jiang,S.Y., Xu,M., and Zhang,Y.Y. (2008). [Role of GATA-4 in cardiac development and remodeling]. *Sheng Li Ke. Xue. Jin. Zhan.* *39*, 302-306.
- Jin,H., Yang,R., Ko,A., Pennica,D., Wood,W.I., and Paoni,N.F. (1998). Effects of cardiotrophin-1 on haemodynamics and cardiac function in conscious rats. *Cytokine* *10*, 19-25.
- Jin,Y., Messmer-Blust,A.F., and Li,J. (2011). The role of transcription enhancer factors in cardiovascular biology. *Trends Cardiovasc. Med.* *21*, 1-5.
- Jougasaki,M. (2010). Cardiotrophin-1 in cardiovascular regulation. *Adv. Clin. Chem.* *52*, 41-76.
- Kajstura,J., Rota,M., Cappetta,D., Ogorek,B., Arranto,C., Bai,Y., Ferreira-Martins,J., Signore,S., Sanada,F., Matsuda,A., Kostyla,J., Caballero,M.V., Fiorini,C., D'Alessandro,D.A., Michler,R.E., del,M.F., Hosoda,T., Perrella,M.A., Leri,A., Buchholz,B.A., Loscalzo,J., and Anversa,P. (2012). Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart. *Circulation* *126*, 1869-1881.

- Kanno,S., Kim,P.K., Sallam,K., Lei,J., Billiar,T.R., and Shears,L.L. (2004). Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 12277-12281.
- Kattman,S.J., Huber,T.L., and Keller,G.M. (2006). Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev. Cell* *11*, 723-732.
- Kawai,T., Takahashi,T., Esaki,M., Ushikoshi,H., Nagano,S., Fujiwara,H., and Kosai,K. (2004). Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ. J.* *68*, 691-702.
- Kojima,H., Hirata,M., Kudo,Y., Kikuchi,K., and Nagano,T. (2001). Visualization of oxygen-concentration-dependent production of nitric oxide in rat hippocampal slices during aglycemia. *J. Neurochem.* *76*, 1404-1410.
- Krauss,G. (2014). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Wiley.
- Kubalak,S.W., Miller-Hance,W.C., O'Brien,T.X., Dyson,E., and Chien,K.R. (1994). Chamber specification of atrial myosin light chain-2 expression precedes septation during murine cardiogenesis. *J. Biol. Chem.* *269*, 16961-16970.
- Kuratomi,S., Ohmori,Y., Ito,M., Shimazaki,K., Muramatsu,S., Mizukami,H., Uosaki,H., Yamashita,J.K., Arai,Y., Kuwahara,K., and Takano,M. (2009). The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2. *Cardiovasc. Res.* *83*, 682-687.
- Kuwahara,K. and Nakao,K. (2010). Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. *Endocr. J.* *57*, 555-565.
- Kuwahara,K., Nishikimi,T., and Nakao,K. (2012). Transcriptional regulation of the fetal cardiac gene program. *J. Pharmacol. Sci.* *119*, 198-203.
- Kuwahara,K., Saito,Y., Kishimoto,I., Miyamoto,Y., Harada,M., Ogawa,E., Hamanaka,I., Kajiyama,N., Takahashi,N., Izumi,T., Kawakami,R., and Nakao,K. (2000). Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* *32*, 1385-1394.
- Langanger,G., De,M.J., Moeremans,M., Daneels,G., De,B.M., and Small,J.V. (1984). Ultrastructural localization of alpha-actinin and filamin in cultured cells with the immunogold staining (IGS) method. *J. Cell Biol.* *99*, 1324-1334.
- Latchman,D.S. (1999). Cardiotrophin-1 (CT-1): a novel hypertrophic and cardioprotective agent. *Int. J. Exp. Pathol.* *80*, 189-196.
- Law,S.K., Leung,C.S., Yau,K.L., Tse,C.L., Wong,C.K., Leung,F.P., Mascheck,L., Huang,Y., Sauer,H., and Tsang,S.Y. (2013). Regulation of multiple transcription factors by reactive oxygen species and effects of pro-inflammatory cytokines released during myocardial infarction on cardiac differentiation of embryonic stem cells. *Int. J. Cardiol.* *168*:3458-72.

- Lee,S.H., Lee,M.Y., and Han,H.J. (2008). Short-period hypoxia increases mouse embryonic stem cell proliferation through cooperation of arachidonic acid and PI3K/Akt signalling pathways. *Cell Prolif.* *41*, 230-247.
- Lemanski,L.F., Fuldner,R.A., and Paulson,D.J. (1980). Immunofluorescence studies for myosin, alpha-actinin and tropomyosin in developing hearts of normal and cardiac lethal mutant Mexican axolotls, *Ambystoma mexicanum*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *55*, 1-15.
- Lesbordes,J.C., Cifuentes-Diaz,C., Miroglio,A., Joshi,V., Bordet,T., Kahn,A., and Melki,J. (2003). Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 1233-1239.
- Li,M. and Ikehara,S. (2013). Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells Int.* 132642.
- Li,W. and Keller,G. (2000). VEGF nuclear accumulation correlates with phenotypical changes in endothelial cells. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 9)*, 1525-1534.
- Lin,Q., Lu,J., Yanagisawa,H., Webb,R., Lyons,G.E., Richardson,J.A., and Olson,E.N. (1998). Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development* *125*, 4565-4574.
- Lough,J. and Sugi,Y. (2000). Endoderm and heart development. *Dev. Dyn.* *217*, 327-342.
- Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L., and Randall,R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265-275.
- Lu,C. and Kerbel,R.S. (1993). Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J. Cell Biol.* *120*, 1281-1288.
- Lyons,G.E., Schiaffino,S., Sassoon,D., Barton,P., and Buckingham,M. (1990). Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J. Cell Biol.* *111*, 2427-2436.
- Macara,I.G. (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *65*, 570-94
- MacDonald,H.S., Kushnaryov,V.M., Sedmak,J.J., and Grossberg,S.E. (1986). Transport of gamma-interferon into the cell nucleus may be mediated by nuclear membrane receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *138*, 254-260.
- Maeda,T., Mazzulli,J.R., Farrance,I.K., and Stewart,A.F. (2002). Mouse DTEF-1 (ETFR-1, TEF-5) is a transcriptional activator in alpha 1-adrenergic agonist-stimulated cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *277*, 24346-24352.
- Marques,J.M., Belza,I., Holtmann,B., Pennica,D., Prieto,J., and Bustos,M. (2007). Cardiotrophin-1 is an essential factor in the natural defense of the liver against apoptosis. *Hepatology* *45*, 639-648.

- Martin,G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 7634-7638.
- Meilhac,S.M., Esner,M., Kelly,R.G., Nicolas,J.F., and Buckingham,M.E. (2004). The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev. Cell* 6, 685-698.
- Mellgren,A.M., Smith,C.L., Olsen,G.S., Eskiocak,B., Zhou,B., Kazi,M.N., Ruiz,F.R., Pu,W.T., and Tallquist,M.D. (2008). Platelet-derived growth factor receptor beta signaling is required for efficient epicardial cell migration and development of two distinct coronary vascular smooth muscle cell populations. *Circ. Res.* 103, 1393-1401.
- Messina,E., De,A.L., Frati,G., Morrone,S., Chimenti,S., Fiordaliso,F., Salio,M., Battaglia,M., Latronico,M.V., Coletta,M., Vivarelli,E., Frati,L., Cossu,G., and Giacomello,A. (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ. Res.* 95, 911-921.
- Minsky. (1961) Microscopy Apparatus. US Pat. 3,013,467.
- Morin,S., Charron,F., Robitaille,L., and Nemer,M. (2000). GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J.* 19, 2046-2055.
- Ng,K.M., Lee,Y.K., Chan,Y.C., Lai,W.H., Fung,M.L., Li,R.A., Siu,C.W., and Tse,H.F. (2010). Exogenous expression of HIF-1 alpha promotes cardiac differentiation of embryonic stem cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* 48, 1129-1137.
- Oka,T. and Komuro,I. (2000). Differentiation of cardiomyocyte. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 115, 337-344.
- Olsnes,S., Klingenberg,O., and Wiedlocha,A. (2003). Transport of exogenous growth factors and cytokines to the cytosol and to the nucleus. *Physiol Rev.* 83, 163-182.
- Ovitt,C.E. and Scholer,H.R. (1998). The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 1021-1031.
- Passier,R. and Mummery,C. (2003). Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc. Res.* 58, 324-335.
- Pemberton,C.J. (2007). Hypertension, cardiotrophin-1 and gp130: three points to heart failure? *J. Hypertens.* 25, 2008-2010.
- Pennica,D., King,K.L., Shaw,K.J., Luis,E., Rullamas,J., Luoh,S.M., Darbonne,W.C., Knutzon,D.S., Yen,R., Chien,K.R., and . (1995a). Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 1142-1146.
- Pennica,D., Shaw,K.J., Swanson,T.A., Moore,M.W., Shelton,D.L., Zioncheck,K.A., Rosenthal,A., Taga,T., Paoni,N.F., and Wood,W.I. (1995b). Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J. Biol. Chem.* 270, 10915-10922.

- Pennica,D., Wood,W.I., and Chien,K.R. (1996). Cardiotrophin-1: a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor-gp 130 dependent pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 81-91.
- Price,R.L., Haley,S.T., Bullard,T.A., Goldsmith,E.C., Simpson,D.G., Thielen,T.E., Yost,M.J., and Terracio,L. (2003). Effects of platelet-derived growth factor-AA and -BB on embryonic cardiac development. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 272, 424-433.
- Robertson,E., Bradley,A., Kuehn,M., and Evans,M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323, 445-448.
- Rosenblatt-Velin,N., Lepore,M.G., Cartoni,C., Beermann,F., and Pedrazzini,T. (2005). FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J. Clin. Invest* 115, 1724-1733.
- Ross,R., Grimm,J., Goedicke,S., Mobus,A.M., Bulau,A.M., Bufler,P., Ali,S., and Martin,M.U. (2013). Analysis of nuclear localization of interleukin-1 family cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 387, 219-227.
- Roth,M., Nauck,M., Tamm,M., Perruchoud,A.P., Ziesche,R., and Block,L.H. (1995). Intracellular interleukin 6 mediates platelet-derived growth factor-induced proliferation of nontransformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 1312-1316.
- Ruixing,Y., Jinzhen,W., Dezhai,Y., and Jiaquan,L. (2007). Cardioprotective role of cardiotrophin-1 gene transfer in a murine model of myocardial infarction. *Growth Factors* 25, 286-294.
- Ruiz-Hurtado,G., Gomez-Hurtado,N., Fernandez-Velasco,M., Calderon,E., Smani,T., Ordonez,A., Cachafeiro,V., Bosca,L., Diez,J., Gomez,A.M., and Delgado,C. (2012). Cardiotrophin-1 induces sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leak and arrhythmogenesis in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 96, 81-89.
- Rüsse (1998). *Herz- und Kreislaufsystem*. Parey Buchverlag Berlin.
- Sachinidis,A., Fleischmann,B.K., Kolossov,E., Wartenberg,M., Sauer,H., and Hescheler,J. (2003a). Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc. Res.* 58, 278-291.
- Sachinidis,A., Gissel,C., Nierhoff,D., Hippler-Altenburg,R., Sauer,H., Wartenberg,M., and Hescheler,J. (2003b). Identification of platelet-derived growth factor-BB as cardiogenesis-inducing factor in mouse embryonic stem cells under serum-free conditions. *Cell Physiol Biochem.* 13, 423-429.
- Sano,H., Forough,R., Maier,J.A., Case,J.P., Jackson,A., Engleka,K., Maciag,T., and Wilder,R.L. (1990). Detection of high levels of heparin binding growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. *J. Cell Biol.* 110, 1417-1426.
- Sauer,H., Neukirchen,W., Rahimi,G., Grunheck,F., Hescheler,J., and Wartenberg,M. (2004). Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin-1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* 294, 313-324.

- Sauer,H., Theben,T., Hescheler,J., Lindner,M., Brandt,M.C., and Wartenberg,M. (2001a). Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 281, H411-H421.
- Sauer,H. and Wartenberg,M. (2005). Reactive oxygen species as signaling molecules in cardiovascular differentiation of embryonic stem cells and tumor-induced angiogenesis. *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 1423-1434.
- Sauer, H. and Wartenberg, M. (2011). Impact of Reactive Oxygen and Reactive Nitrogen Species for Stem Cell Mobilization, Function and Cardiovascular Differentiation, *Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis*, Prof. Craig Atwood (Ed.), ISBN: 978-953-307-196-1, InTech, DOI: 10.5772/15329. 2011.
- Sauer,H., Wartenberg,M., and Hescheler,J. (2001b). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 11, 173-186.
- Schmelter,M., Ateghang,B., Helmig,S., Wartenberg,M., and Sauer,H. (2006). Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *FASEB J.* 20, 1182-1184.
- Schneider,C.A., Rasband,W.S., and Eliceiri,K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* 9, 671-675.
- Sheng,Z., Knowlton,K., Chen,J., Hoshijima,M., Brown,J.H., and Chien,K.R. (1997). Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 272, 5783-5791.
- Sheng,Z., Pennica,D., Wood,W.I., and Chien,K.R. (1996). Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiac myocyte survival. *Development* 122, 419-428.
- Simon,M.C. and Keith,B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 285-296.
- Solloway,M.J. and Harvey,R.P. (2003). Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovasc. Res.* 58, 264-277.
- Streb,H., Irvine,R.F., Berridge,M.J., and Schulz,I. (1983). Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306, 67-69.
- Talwar,S., Downie,P.F., Squire,I.B., Davies,J.E., Barnett,D.B., and Ng,L.L. (2001). Plasma N-terminal pro BNP and cardiotrophin-1 are elevated in aortic stenosis. *Eur. J. Heart Fail.* 3, 15-19.
- Talwar,S., Squire,I.B., O'Brien,R.J., Downie,P.F., Davies,J.E., and Ng,L.L. (2002). Plasma cardiotrophin-1 following acute myocardial infarction: relationship with left ventricular systolic dysfunction. *Clin. Sci.* 102, 9-14.

- Tsutamoto,T., Asai,S., Tanaka,T., Sakai,H., Nishiyama,K., Fujii,M., Yamamoto,T., Ohnishi,M., Wada,A., Saito,Y., and Horie,M. (2007). Plasma level of cardiotrophin-1 as a prognostic predictor in patients with chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 9, 1032-1037.
- van der Spoel,T.I., Jansen of Lorkeers SJ, Agostoni,P., van,B.E., Gyongyosi,M., Sluijter,J.P., Cramer,M.J., Doevendans,P.A., and Chamuleau,S.A. (2011). Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res.* 91, 649-658.
- Verweij,J. and Pinedo,H.M. (1990). Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs* 1, 5-13.
- Vong,L.H., Ragusa,M.J., and Schwarz,J.J. (2005). Generation of conditional Mef2cloxP/loxP mice for temporal- and tissue-specific analyses. *Genesis.* 43, 43-48.
- Wahl-Schott,C. and Biel,M. (2009). HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 470-494.
- Wartenberg,M., Donmez,F., Ling,F.C., Acker,H., Hescheler,J., and Sauer,H. (2001). Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *FASEB J.* 15, 995-1005.
- Werman,A., Werman-Venkert,R., White,R., Lee,J.K., Werman,B., Krelin,Y., Voronov,E., Dinarello,C.A., and Apte,R.N. (2004). The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 2434-2439.
- Wikenheiser,J., Doughman,Y.Q., Fisher,S.A., and Watanabe,M. (2006). Differential levels of tissue hypoxia in the developing chicken heart. *Dev. Dyn.* 235, 115-123.
- Wollert,K.C. and Chien,K.R. (1997). Cardiotrophin-1 and the role of gp130-dependent signaling pathways in cardiac growth and development. *J. Mol. Med.* 75, 492-501.
- Wollert,K.C., Taga,T., Saito,M., Narazaki,M., Kishimoto,T., Glembotski,C.C., Vernallis,A.B., Heath,J.K., Pennica,D., Wood,W.I., and Chien,K.R. (1996). Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 271, 9535-9545.
- Yamanaka,S. and Takahashi,K. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 51, 2346-2351.
- Yanagida,E., Shoji,S., Hirayama,Y., Yoshikawa,F., Otsu,K., Uematsu,H., Hiraoka,M., Furuichi,T., and Kawano,S. (2004). Functional expression of Ca²⁺ signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Calcium* 36, 135-146.
- Yang,L., Soonpaa,M.H., Adler,E.D., Roepke,T.K., Kattman,S.J., Kennedy,M., Henckaerts,E., Bonham,K., Abbott,G.W., Linden,R.M., Field,L.J., and Keller,G.M. (2008). Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 453, 524-528.
- Ye,J., Boyle,A., Shih,H., Sievers,R.E., Zhang,Y., Prasad,M., Su,H., Zhou,Y., Grossman,W., Bernstein,H.S., and Yeghiazarians,Y. (2012). Sca-1⁺ cardiosphere-derived cells are enriched

for Isl1-expressing cardiac precursors and improve cardiac function after myocardial injury. *PLoS. One.* 7, e30329.

Ye,L., Zhang,S., Greder,L., Dutton,J., Keirstead,S.A., Lepley,M., Zhang,L., Kaufman,D., and Zhang,J. (2013). Effective cardiac myocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells requires VEGF. *PLoS. One.* 8, e53764.

Yoshida,K., Taga,T., Saito,M., Suematsu,S., Kumanogoh,A., Tanaka,T., Fujiwara,H., Hirata,M., Yamagami,T., Nakahata,T., Hirabayashi,T., Yoneda,Y., Tanaka,K., Wang,W.Z., Mori,C., Shiota,K., Yoshida,N., and Kishimoto,T. (1996). Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 407-411.

Zeller,R., Bloch,K.D., Williams,B.S., Arceci,R.J., and Seidman,C.E. (1987). Localized expression of the atrial natriuretic factor gene during cardiac embryogenesis. *Genes Dev.* 1, 693-698.

Zhang,J., Klos,M., Wilson,G.F., Herman,A.M., Lian,X., Raval,K.K., Barron,M.R., Hou,L., Soerens,A.G., Yu,J., Palecek,S.P., Lyons,G.E., Thomson,J.A., Herron,T.J., Jalife,J., and Kamp,T.J. (2012). Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circ. Res.* 111, 1125-1136.

Zhao,H.N. (2006). Effect of cardiotrophin-1 on cardiac transcription factor GATA4 expression in rat cardiomyocytes.

Zhu,M.X., Zhao,J.Y., and Chen,G.A. (2013). Mesoderm is committed to hemato-endothelial and cardiac lineages in human embryoid bodies by sequential exposure to cytokines. *Exp. Cell Res.* 319, 21-34.

Zolk,O., Ng,L.L., O'Brien,R.J., Weyand,M., and Eschenhagen,T. (2002). Augmented expression of cardiotrophin-1 in failing human hearts is accompanied by diminished glycoprotein 130 receptor protein abundance. *Circulation* 106, 1442-1446.

8. Publikationen

8.1 Wissenschaftliche Vorträge und Publikationen in Posterform

- L. Mascheck, F. Sharifpanah, M. Wartenberg, H. Sauer
Cardiotrophin-1 (CT-1) nuclear translocation is a prerequisite for the stimulation of cardiomyogenesis from mouse embryonic stem cells
Vortrag: DPG Heidelberg "92nd Annual Meeting of the German Physiological Society" (2013)
- L. Mascheck, F. Sharifpanah, M. Wartenberg, H. Sauer
The impact of hypoxia and Cardiotrophin-1 for cardiomyogenesis of embryonic stem cells
Poster Präsentation DPG Heidelberg "92nd Annual Meeting of the German Physiological Society" (2013) (Poster Award)
- L. Mascheck, F. Sharifpanah, M. Wartenberg und H. Sauer
Stimulation of cardiomyogenesis from mouse embryonic stem cells by cardiotrophin-1 (CT-1): the impact of CT-1 nuclear translocation
Vortrag: 79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (2013)

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Sauer des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Giessen für die Bereitstellung des Themas, der sehr engagierten Betreuung meiner Forschungstätigkeiten, der vielen hilfreichen Diskussionen und konstruktiven Ideen. Auch für die Möglichkeit an interessanten und aktuellen Forschungsthemen in Hongkong zu arbeiten, welche durch die DAAD finanziert wurden, möchte ich mich herzlich bei Prof. Sauer und der DAAD bedanken. Des Weiteren bin ich der Von Behring-Röntgen-Stiftung zu großem Dank verpflichtet, die durch das Stipendium den finanziellen Rahmen dieser Doktorarbeit geschaffen hat.

Herrn Prof. Dr. M. Bergmann danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, sein Interesse und die konstruktiven Anregungen bei der Erstellung der Doktorarbeit.

Ein großer Dank geht an die Arbeitsgruppe Sauer, insbesondere möchte ich mich bei Elham, Barbara, Sascha, Febina und Yuhan für die Einarbeitung, die gute Zusammenarbeit den zahlreichen wertvollen Tipps, die Motivation und für eure Freundschaft bedanken, ohne euch wäre mir die Arbeit sicherlich viel schwerer gefallen.

Meinen Eltern, Manni, Jan, Harald und Anna danke ich für die liebevolle Unterstützung, die Ruhe und Geduld, mit der sie mich auch während der schwierigen Phasen stets motiviert haben.

10. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Lena Mascheck _____



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6315-3



9 783835 196315 3