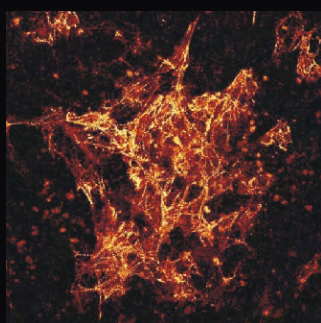
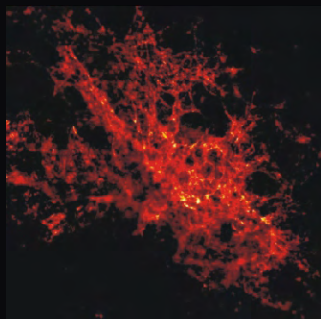
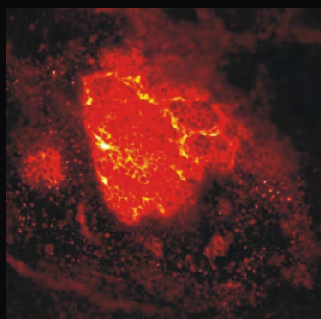


**AUSWIRKUNGEN MECHANISCHER ZUGBELASTUNG
AUF DIE ENDOTHELZELL- UND KARDIOMYOZYTEN-
DIFFERENZIERUNG EMBRYONALER STAMMZELLEN
DER MAUS**

MAIKE SCHMELTER



INAUGURAL-DISSERTATION

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.

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

1. Auflage 2007

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 Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Professor Dr. rer. nat. R. Gerstberger
und
dem Physiologischen Institut
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Professor Dr. phil. nat. Heinrich Sauer**

**Auswirkungen mechanischer Zugbelastung auf die
Endothelzell- und Kardiomyozytendifferenzierung
embryonaler Stammzellen der Maus**

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

eingereicht von

MAIKE SCHMELTER

Tierärztin aus Bad Dürkheim

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Herr Prof. Dr. rer. nat. R. Gerstberger

Herr Prof. Dr. phil. nat. H. Sauer

Tag der Disputation: 09. März 2007

Für meine Freunde und Familie

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, daß plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat“

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929)

Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte 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.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich von folgenden Personen Unterstützung erhalten:

Herrn Professor Dr. phil. nat. Heinrich Sauer

Herrn Professor Dr. rer. nat. Rüdiger Gerstberger

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar Geldwerte und Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. phil. nat. Heinrich Sauer von mir selbst ausgeführt worden.

Freinsheim, den 9. März 2007

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Schematische Zusammenfassung der Toti - und Pluripotenz von ES - Zellen	7
Tabelle 2-1 Geräte	27
Tabelle 2-2 Chemikalien	28
Tabelle 2-3 Puffer, Lösungen und Medien	30
Tabelle 2-4 Zielgene	48
Tabelle 2-5 Housekeeping Gene	49
Tabelle 2-6 Zusammenfassung und Konzentrationen der Inhibitoren	51
Tabelle 2-7 Zusammenfassung der Radikalfänger	52

Inhaltsverzeichnis

TABELLENVERZEICHNIS	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGEN	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Auswirkungen mechanischer Zugbelastung auf Zellen und Gewebe	2
1.2 Klassifikation und Fähigkeiten von Stammzellen	3
1.2.1 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)	4
1.2.2 Die Embryonalentwicklung der Maus in den ersten Tagen nach der Befruchtung der Eizelle	5
1.2.3 Totipotenz und Pluripotenz	6
1.2.4 Forschung mit embryonalen Stammzellen	7
1.3 Adulte Stammzellen	9
1.4 Die Vaskulogenese	10
1.5 Die Endothelzelle	11
1.6 Die Kardiomyogenese und der Aufbau von Herzzellen	12
1.7 Hypoxieabhängige Regulation kardiovaskulärer Signaltransduktionswege	13
1.7.1 Hypoxie-induzierter Faktor (hypoxia inducible factor) (HIF)	13
1.7.2 Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor) (VEGF)	14
1.7.3 Kardiale Transkriptionsfaktoren GATA 4 und MEF-2c	15
1.8 ROI (reaktive Sauerstoffintermediate)	16
1.8.1 Entstehungsweise der ROI	16
1.8.2 Die NADPH-Oxidase als Quelle der intrazellulären ROI	17
1.8.3 Abbau der intrazellulären ROI	19
1.9 Die Funktion der ROI in der zellulären Mechanotransduktion	20
1.10 Zelluläre Signaltransduktion mitogen-aktivierter Proteinkinasen	21
1.10.1 Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK)/JNK	21
1.10.2 Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK 1/2)	22

1.10.3	p38 mitogen-aktivierte Mapkinase (p38)	22
1.11	Aufgabenstellung	24
2	MATERIAL & METHODEN	25
2.1	Firmen	25
2.2	Zellkultur	31
2.2.1	Die Stammzelllinie CCE S103	31
2.2.2	Fibroblasten der Maus	32
2.2.3	Kultivierung der Zelllinie CCE S103 im zweidimensionalen Zellverband	32
2.3	Kultivierung der Zelllinie CCE S103 im dreidimensionalen Zellverband: multizelluläre Embryonalkörperchen	34
2.4	Applikation mechanischer Zugbelastung auf die Zelllinie CCE S103 im Flexercell System®	35
2.5	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	37
2.5.1	Technik	37
2.5.2	Präparation der EBs für die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (cLSM)	39
2.6	Immunzytochemie	39
2.6.1	Sekundäre Antikörper	41
2.6.2	Durchführung der immunzytochemischen Markierung	42
2.7	RT-PCR	44
2.7.1	Durchführung der RT-PCR	44
2.8	Durchführung der RNA-Isolation	45
2.8.1	DNase Behandlung der isolierten RNA	47
2.8.2	komplementäre DNA (cDNA) Synthese der isolierten RNA	48
2.8.2.1	Verwendete Primer der RT-PCR	48
2.9	Inhibitoren und Radikalfänger	49
2.9.1.1	Inhibitoren	49
2.9.1.1.1	SB203580 – Inhibitor der p38 Mitogen-aktivierten Kinase	49
2.9.1.1.2	SP600125 – Inhibitor der t-Jun-NH2 terminale Kinase	50
2.9.1.1.3	UO126 – Inhibitor der extrazellulär Signal-regulierten Kinase	50
2.9.1.2	Radikalfänger	51
2.9.1.2.1	Trolox	51
2.9.1.2.2	N- (2-Mercaptopropionyl)glycin	52

2.10	Nachweis reaktiver Sauerstoffintermediate mittels 2'-7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (H₂DCFDA)	53
2.10.1	Der Fluoreszenzfarbstoff H ₂ DCFDA	53
2.10.2	Versuchsdurchführung der ROI-Messung	54
2.11	Statistik	55
3	ERGEBNISSE	56
3.1	Einfluss mechanischer Zugbelastung auf die CD31-Expression	56
3.2	Einfluss mechanischer Zugbelastung auf die Kardiomyozytendifferenzierung	58
3.3	Redoxabhängige Regulation von HIF-1α nach mechanischer Zugbelastung in ES-Zellen	61
3.4	Redoxabhängige Regulation der VEGF Expression nach mechanischer Zugbelastung	64
3.5	Generierung von ROI unter mechanischer Zugbelastung	67
3.6	Aktivierung der MAPKs p38, ERK 1/2 und JNK durch mechanische Zugbelastung und die Rolle der ROI als Signalmoleküle	70
3.7	p38	70
3.8	ERK 1/2	73
3.9	JNK	77
3.10	Die Funktion der MAPKs in der Vaskulo- und Kardiomyogenese von ES-Zellen unter mechanischer Zugbelastung	79
3.11	Die Rolle der NADPH-Oxidase als eine Quelle der ROI unter mechanischer Zugbelastung	83
3.12	Die Aktivierung kardialer Transkriptionsfaktoren von ES-Zellen nach mechanischer Zugbelastung	87
3.12.1	Die Untersuchung von GATA 4 nach mechanischer Zugbelastung	87
3.12.2	Die Untersuchung von MEF-2c nach mechanischer Zugbelastung	88
3.13	Der Einfluss der Radikalfänger Trolox und NMPG auf die Endothelzell- und Kardiomyozytendifferenzierung von ES-Zellen nach mechanischer Zugbelastung	90
3.14	Untersuchung der Zytotoxizität mechanischer Zugbelastung auf ES-Zellen der Maus.	93

4	DISKUSSION	56
4.1	Die positive Auswirkung mechanischer Zugbelastung auf die kardiovaskuläre Differenzierung von ES-Zellen der Maus	96
4.2	Die Rolle von HIF-1 α und VEGF in der vaskulären Signalkaskade von ES-Zellen nach mechanischer Zugbelastung	98
4.3	Die Funktion intrazellulärer ROI in der kardiovaskulären Signalkaskade von ES-Zellen nach mechanischer Zugbelastung	99
4.4	Die Rolle der NADPH-Oxidase nach mechanischer Zugbelastung bei der Freisetzung von ROI	101
4.5	Die Rolle der MAPKs nach mechanischer Zugbelastung in der kardiovaskulären Signaltransduktion	103
4.6	Mechanische Zugbelastung als Aktivator von p38	103
4.7	Mechanische Zugbelastung als Aktivator von ERK 1/2	105
4.8	Mechanische Zugbelastung als Aktivator von JNK	106
4.9	Die Funktion der kardialen Transkriptionsfaktoren GATA 4 und MEF-2c nach mechanischer Zugbelastung	108
4.10	Schematische Zusammenfassung der mechanisch-stimulierten kardiovaskulären Signalkaskade von ES-Zellen der Maus	110
5	ZUSAMMENFASSUNG	110
6	LITERATUR	112
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	112
8	DANKSAGUNG	131

Abkürzungen

A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
AEBSF	4- (2-Aminoethyl) -Benzensulfonyl Fluorid
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP-1	Aktivator-Protein-1 (activating protein 1)
ASK	Apoptose-regulierende Kinase (apoptosis signal-regulating kinase)
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BMK	große Mitogen-aktivierte Kinase (big mitogen activated kinase)
Ca ²⁺	Kalzium
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
DCF	2'-7'-Dichlorofluorescein
DMEM	Dulbecco modifiziertes Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagles Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure

EB	Embryonalkörperchen (embryoid body)
EC	Embryonale Karzinomazellen (embryonal carcinoma)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Embryonale Keimzellen (embryonal germ cell)
ES	Embryonale Stammzelle (embryonic stem cell)
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
F	Fluoreszenz
FCS	fötale Kälberserum
g-Zahl	relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB)
GTP	Guanosin-Triphosphat
H ₂ DCF	2'-7'-Dichlorofluorescin
H ₂ DCFDA	2'-7'-Dichlorofluorescin-Diacetat
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor (hypoxia inducible factor)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HUVEC	humane Endothelzellen der Umbilikalvene (human umbilical vein endothelial cells)
IgG	Immunglobulin G
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbecco Nährmedium (Iscoves Modified Dulbecco's Medium)
JNK	c-Jun-NH2 terminale Kinase
LIF	Leukämie inhibierender Faktor (leukemia inhibitory factor)
cLSM	konfokale Laser-Raster-Mikroskopie
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEF-2c	Myozyten aktivierender Faktor 2c (myocyte enhancer factor-2c)
MEM	Essenzielle Aminosäurelösung (Minimal essential medium)
MEK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase Kinase (MAP kinase kinase)
MEKK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase Kinase Kinase (MAP kinase kinase kinase)
MLK	gemischt abstammende Kinase (mixed lineage kinase)

MKK	MAPK Kinase (des JNK oder p38 MAPK Signalweges)
MMP	Matrix-Metalloproteinkinase
MMLV RT	aus dem murinen Leukämievirus isolierte Reverse Transkriptase (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)
Mox 1	<i>Nox</i> 1 mitogene Oxidase (<i>Nox</i> 1 mitogenic oxidase)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger-RNA)
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NEA	Nicht-essenzielle Aminosäuren
NMPG	N- (2-Mercaptopropionyl)glycin
<i>Nox</i> 1	Mox 1 mitogene Oxidase (Mox 1 mitogenic oxidase)
O ₂	molekularer Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
OH [·]	Hydroxylradikal

p38	p38 mitogen-aktivierte MAPkinase
PBS(T)	phosphatgepufferte Salzlösung (mit Triton)
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor)
PECAM	endotheliales Adhäsionsmolekül (platelet/endothelial cell adhesion molecule)
PLGF	plazentärer Wachstumsfaktor (placental growth factor)
PKC	Proteinkinase C
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion (quantitative polymerase-chain-reaction)
Raf	Ras-aktivierter Faktor
Ras	Rattensarcomavirus (Rat sarcoma virus)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
ROI	reaktive Sauerstoffintermediate
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase

SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SB203580	Imidazolderivat, spezifischer Blocker der p38 MAPK
SP600125	spezifischer Blocker der c-Jun-NH2 terminale Kinase
TAK	TGF β -aktivierte Kinase (TGF β activated kinase)
Trolox	Tocopherol-Derivat
UO126	spezifischer Blocker der extrazellulär Signal-regulierten Kinase (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4- (2-aminoophenylthio)butadien)
V	Volumen
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
VSMCs	glatte Gefäßmuskulaturzellen (vascular smooth muscle cells)

1 Einleitung

Für die Entstehung eines lebensfähigen Wirbeltieres (*Vertebrata*) ist die störungsfreie Entwicklung des kardiovaskulären Systems während der embryonalen Frühphase eine unabdingbare Voraussetzung. Hinsichtlich beteiligter embryonaler Signalkaskaden bleiben zum momentanen Zeitpunkt viele Fragen noch unbeantwortet. Deshalb stehen diese Kaskaden im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus (*Mus musculus*) bieten in diesem Zusammenhang eine einzigartige Möglichkeit, die Differenzierungsvorgänge eines zellulären Systems unter künstlichen Bedingungen zu untersuchen. Die Maus eignet sich aus mehreren Gründen als Versuchsmodell, um den komplexen menschlichen Organismus zu verstehen und analysieren:

- Das Genom der Maus weist auf eine nahe evolutionäre Verwandtschaft zum Menschen hin (Waterston et al, 2002).
- Die evolutive Distanz zwischen Maus und Mensch wird auf 90 Millionen Jahre geschätzt (Hedges 2002).
- Menschliche Gene besitzen häufig Orthologe in der Maus; die mittlere Identität auf der Aminosäureebene liegt hier bei ungefähr 80% (Waterston et al, 2002).
- Mäuse sind ohne großen Kostenaufwand zu züchten und besitzen eine hohe Reproduktionsrate.

Durch Kultivierung von murinen ES-Zellen (Wobus et al, 1991) in Form von Embryonalkörperchen (embryoid bodies = EBs) konnte die Entwicklung von frühen Kardiomyoblasten zu differenzierten Kardiomyozyten (Maltsev et al, 1994), sowie eine Einleitung der Vaskulogenese durch Endothelzellentstehung (Wartenberg et al, 1998) *in vitro* nachgewiesen werden.

Die Differenzierung von ES-Zellen zu Endothelzellen wird mitunter durch Interaktionen der hypoplastischen Zellen des primitiven Endoderms ausgelöst (Hescheler et al, 1999).

Die meisten molekularen Steuermechanismen im Rahmen der Entwicklung des Herzkreislaufsystems sind gegenwärtig noch nicht vollständig erforscht und lassen weiterhin viele Fragen unbeantwortet.

Die vorliegende Dissertation untersucht die Auswirkungen mechanischer Zugbelastung auf die kardiovaskuläre Differenzierung von ES-Zellen der Maus sowie die Bedeutung der intrazellulär gebildeten reaktiven Sauerstoffintermediate (ROI) im Rahmen der kardiovaskulären Signalkaskade. Die präsentierten Ergebnisse geben neuartige und interessante Einblicke in die basalen Mechanismen der Stammzelldifferenzierung unter dem Einfluss mechanischer Kräfte.

1.1 Auswirkungen mechanischer Zugbelastung auf Zellen und Gewebe

Das Einwirken externer physikalischer Kräfte auf Zellen oder Zellverbände sowie das Vorkommen physiologischer intrazellulärer Zugspannungen werden als essenziell in der Signalübermittlung von Zellen angesehen. Sie nehmen nachweislich Einfluss auf Zellstrukturen, Zellüberleben, Proliferation und Zelldifferenzierung (Voronov et al, 2004). Auch während der Schwangerschaft kommt es hinsichtlich des embryonalen Wachstums im Mutterleib zu auftretenden Zug- und Spannungs Kräften und es wird angenommen, dass diese von großer Bedeutung für eine störungsfreie Entwicklung des Embryo sind.

In *vivo* ist vaskuläres Endothelium unterschiedlichen Arten von mechanischen Kräften ausgesetzt. Mechanische Zugbelastung ist eine Folge der Radius- und Längenzunahme von größeren Arterien. Zusätzliche mechanische Reize entstehen durch Pulsationen, wie beispielsweise in den Gefäßen des Lungenkreislaufes (Mir et al, 2002).

Es ist bekannt, dass bedeutsame embryonale Prozesse wie die Entwicklung der fetalen Lunge (Moore et al, 2005; Liu et al, 2000), die Morphogenese des Herzens (Voronov et al 2002; Reckova et al, 2003; Voronov et al 2004), die Arteriogenese (Heil, 2004) und die mikrovaskuläre Remodellierung (Murfee et al, 2004; Skalac, 1996) teilweise auf Einflüssen mechanischer Faktoren beruhen.

Untersuchungen der Frühentwicklung von Vertebraten wurden an Hühnerembryonen durchgeführt und lieferten wichtige Informationen. Die embryonale Entwicklung des Herzens und die Herzrotation beim Hühnerembryo sind eine Folge des lokalen biomechanischen

Umfeldes. Die mechanischen Kräfte entstehen durch den Blutstrom in den splanchnopleuralen und omphalomesenterischen Venen des Embryos (Voronov et al, 2002; Voronov et al, 2004; Murfee et al, 2004).

Untersuchungen über Anomalien in der Links-rechts-Asymmetrie im Embryo der Maus unter mechanischer Zugbelastung lieferten weitere Erkenntnisse über das Verhalten von Zellen unter mechanischen Einwirkungen. Experimentell wurde hier gezeigt, dass ein artifizieller rechtsorientierter Flüssigkeitsstrom, welcher der physiologisch linksgerichteten laminaren Strömung am Primitivknoten entgegengesetzt ist, die embryonale Links-rechts-Asymmetrie zerstört (Skalac, 1996).

Prinzipiell können unterschiedliche Zelltypen eines Organismus auf das Einwirken von mechanischen Kräften ansprechen; die Mechanismen der Zellreaktionen auf diese Stimuli sind noch unbekannt.

Zugbelastungen können aber auch pathologische Veränderungen an Zellen und Geweben zur Folge haben. Dies geschieht häufig bei mechanischen Einwirkungen, die ein physiologisches Maß überschreiten. Die häufigsten Auswirkungen zeigen sich in den Krankheitsformen der kardialen Hypertrophie (Taber et al, 2001) und der Arteriosklerose (Nonaka et al, 2002).

1.2 Klassifikation und Fähigkeiten von Stammzellen

Stammzellen besitzen die einzigartige Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und in die unterschiedlichen Gewebearten eines Organismus zu differenzieren. Sie sind in ihrer Teilungsfähigkeit unbegrenzt; nur die Lebensdauer des Gesamtorganismus begrenzt ihr vorhandenes Potenzial. Tochterzellen einer Stammzelle besitzen die Fähigkeit, weiterhin als Stammzelle zu fungieren. Molekulare Signale können die Entwicklung in typspezifische Zellen, wie Blut-, Haut- oder Nervenzellen, einleiten.

Die unerschöpfliche Selbsterneuerung von Stammzellen ist von großem wissenschaftlichen Interesse. So wird seit längerer Zeit versucht, die außergewöhnlichen Eigenschaften der Zellen zu nutzen, um beschädigte Zellen und Gewebe eines Organismus durch transplantierte Stammzellen zu ersetzen. Möglicherweise können ES-Zellen eines Tages als „Ersatzmaterial“ in der Medizin dienlich sein.

Grundsätzlich unterteilt man Stammzellen in zwei Gruppen:

- embryonale Stammzellen
- adulte Stammzellen

1.2.1 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

In *vitro* sind Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) unbegrenzt kultivierbare, pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse der Säugerblastozyste isoliert werden. (Smith, 2001). ES-Zellen sind *in vivo* und *in vitro* in der Lage, sich in Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) sowie in Zellen der Keimbahn auszudifferenzieren. Diese ES-Zellen besitzen noch ihr vollständiges Differenzierungspotential und können sich zu allen spezialisierten Zellarten eines Lebewesens entwickeln.

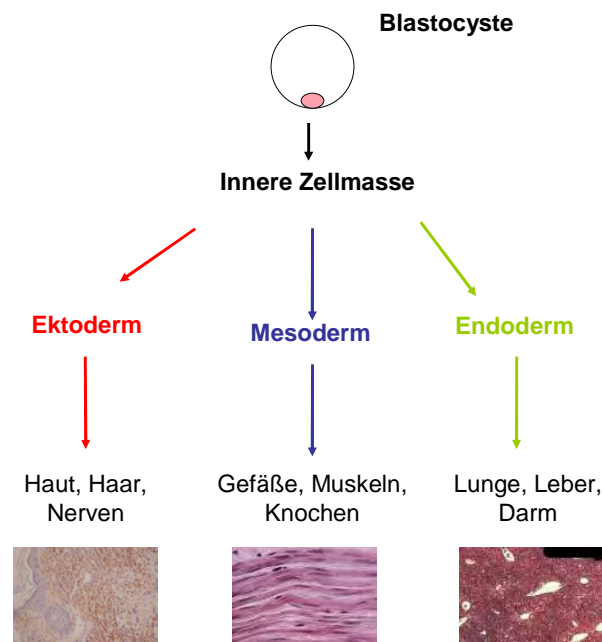


Abbildung 1-1 Differenzierung von ES-Zellen, nach Vorlage des National Institute of Health, Department of Health and Human Services, Juni 2001

Aus der Inneren Zellmasse der Blastozyste können sich die drei Keimblätter Ektoderm, Endoderm und Mesoderm entwickeln. Diese drei Keimschichten bilden die Grundlage für eine Differenzierung in die unterschiedlichen Zellarten, wie z.B. Gefäß-, Knochen- und Muskelzellen.

1.2.2 Die Embryonalentwicklung der Maus in den ersten Tagen nach der Befruchtung der Eizelle

Post coitum (p.c.) kommt es bei der Maus während der Migration der befruchteten Eizelle durch den Eileiter (Dauer 3 bis 4 Tage) schon zu den ersten Zellteilungen.

Die totipotenten Blastomeren kompaktieren sich am dritten Tag p.c., das Morulastadium ist eingeleitet und es kommt zu den ersten induzierten Zelldifferenzierungen.

Bei der Maus spielt der in *vivo* exprimierte Transkriptionsfaktor Oct 4 bei der Weiterentwicklung zur Blastozyste bis zum vierten Tag p.c. eine entscheidende Rolle (Schöler et al, 1990; Pesce et al, 1998; Nichols et al, 1998). Die Keimblase setzt sich aus dem Trophektoderm, einer mit Flüssigkeit gefüllten Hohlkugel mit einzellschichtiger Hülle, und der an der Innenwand sitzenden Inneren Zellmasse zusammen. Die Lage der Inneren Zellmasse ist vom Spermieeintrittspunkt in die Oozyte und der Lage des zweiten Polkörpers festgelegt und beeinflusst zur Zeit der Präimplantation die Entstehung der Körperplanachsen (Tam et al, 2001).

Die äußere Zellschicht der Blastozyste reift bis zum fünften Tag p.c. zum Hypoblasten (primitives Endoderm). Die weiteren Zellen der Keimblase formieren zum Epiblasten (primitives Ektoderm). Ein passiver Wassereinstrom lässt die Blastozyste anschwellen und führt schließlich zu einem Austritt des Embryos aus der Zona pellucida (Wiley et al, 1990) und zur intrauterinen Einnistung. Trophektoderm und Hypoblast bilden in der weiteren Entwicklung das extraembryonale Gewebe. Das Trophektoderm entwickelt sich zum Trophoblastenanteil der Plazenta und aus dem Hypoblasten entsteht der endodermale Teil des Dottersacks (Kunath et al, 2002; Bielinska et al, 1999). Aus dem Epiblasten hingegen entwickeln sich neben extraembryonalem Mesoderm vor allem sämtliche embryonalen Gewebe (Kanatsu et al, 1996).

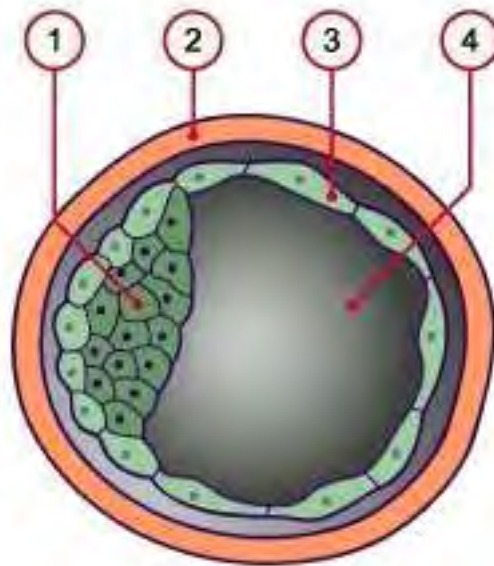


Abbildung 1-2 Blastozyste, nach Vorlage der Internetseite www.embryology.ch

Querschnitt durch eine embryonale Blastozyste. Beschriftung: (1) Innere Zellmasse, (2) Zona pellucida, (3) Trophektoderm, (4) Blastocoel.

1.2.3 Totipotenz und Pluripotenz

Nach der Verschmelzung von Ei- und Samenzelle entstehen nach den ersten Zellteilungen totipotente Stammzellen. Aus der befruchteten Eizelle entwickelt sich zunächst über das Vierzellstadium die Blastozyste mit der Inneren und Äußeren Zellmasse. In der Blastozyste bilden sich nachfolgend aus dem Trophoblasten die Plazenta und aus dem Embryoblasten alle anderen Körperzellen. Daher nennt man Zellen bis zum Achtzellstadium totipotent. Entnimmt man Zellen der Blastozyste aus dem Embryoblasten, sind diese pluripotent, d.h. sie können alle Zelle eines Körpers bilden, mit Ausnahme der Plazenta (Niemann et al, 2003; Schöler 2005).

Tabelle 1-1 Schematische Zusammenfassung der Toti - und Pluripotenz von ES - Zellen

totipotente Zellen	umfassen die Zellen des Embryos bis zum Achtzellstadium. Die Zellen besitzen die Möglichkeit, in alle Körperzellen zu differenzieren. Ein Zellbeispiel stellt die befruchtete Eizelle dar.
pluripotente Zellen	Umfassen die aus der Inneren Zellmasse der Blastozyste isolierten Zellen. Sie sind unbegrenzt kultivierbar. Alle Arten von Körperzellen der Hauptgewebetypen können sich aus pluripotenten Zellen entwickeln. Ausgenommen sind lediglich Bestandteile der Plazenta. Die Fähigkeit, einen lebensfähigen Organismus zu bilden, liegt hier nicht vor.

Innerhalb der Gruppe pluripotenter Zellen unterscheidet man weiterhin:

- ES-Zellen aus der Inneren Zellmasse der Blastozyste (Embryonale Stammzellen)
- EG-Zellen (Embryonale Keimzellen)
- EC-Zellen (Embryonale Karzinomzellen)

1.2.4 Forschung mit embryonalen Stammzellen

ES-Zelllinien aus Blastozysten von Mäusen können seit 1981 erfolgreich isoliert und kultiviert werden (Martin, 1981).

Bei humanen Embryonen gelang die Isolierung und Kultivierung von ES-Zellen erstmals im Jahre 1998 (Thomson et al, 1998). Die Forschung an humanen Zelllinien verfolgt das Ziel der Transplantation von Stammzellen etwa zur Behandlung von Herzmuskel- und Gefäßerkrankungen beim Menschen. Die Transplantation undifferenzierter ES-Zellen zu

Therapie Zwecken ist zurzeit klinisch noch nicht anwendbar. Meist kommt es nach der Zellübertragung im Organismus des Empfängers zur Bildung von Teratokarzinomen (Wakitani et al, 2003). Dagegen läuft die Zelltransplantation aufgereinigter, terminal differenzierter Kardiomyozyten ins Herz ohne Tumorentstehung ab, da Stammzellen nach ihrer Ausdifferenzierung die Kapazität zur Proliferation verlieren (Klug, 1996).

Bei der ES-Zellforschung der Maus wird *in vitro* versucht, die Zelldifferenzierung eines Mäuseembryos zu imitieren. ES-Zellen kultiviert in embryoid bodies (EBs) in einem Spinnerflaschen-System (Wartenberg et al, 1998) ermöglichen eine Analyse der Entwicklung von Vorläuferzellen zu spezialisierten Zelltypen (Hescheler et al, 2002).

Die Grundlage dieser Zellkulturtechnik beruht auf der innerhalb weniger Stunden stattfindenden Aggregation von undifferenzierten ES-Zellen zu großen, kugeligen Zellverbänden. In den Zellverbänden und in Abwesenheit von leukemia inhibitory factor (LIF) können Stammzellen spontan in unterschiedliche Zelltypen differenzieren (Frey, 1992). Bei LIF handelt es sich um ein pleiotropes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 32 bis 62 kDA, das ursprünglich zur Unterdrückung der Proliferation der murinen myeloiden leukämischen Zelllinie M1 eingesetzt wurde. LIF Rezeptoren konnten auf vielen Zellarten nachgewiesen werden, einschließlich Monozyten, Leberzellen, Plazentazellen und ES-Zellen (Smith, 1998; Gough et al, 1988). Nur durch gezielte Kontrolle der Kultivierung der undifferenzierten ES-Zellen kann das Differenzierungsverhalten der Zellen künstlich gesteuert werden. Überlässt man die ES-Zellen sich selbst, entsteht spontan ein Gemisch spezialisierter Zellarten. Um dieses Verhalten zu unterdrücken, wachsen ES-Zellen auf einem Nährboden von Fibroblasten heran. Hierbei dienen die grundierenden Fibroblasten als sogenannte „Ammenzellen“. Ein Teil ihrer Funktion besteht in der Ernährung der aufsitzenden ES-Zellen. Zusätzlich produzieren sie einen gewissen Anteil des LIF und unterdrücken somit auch die spontane Stammzelldifferenzierung. Fibroblasten alleine sind nicht in der Lage, die Kulturmedien zu konditionieren, da sie nur eine gespleißte LIF-Variante sezernieren, die an ein Protein der extrazellulären Matrix bindet (Rathjen et al, 1990; Mereau et al, 1993). In der Routine-Forschung werden ES-Zellen folglich in einer Kombination von inaktivierten Fibroblasten und rekombinanten LIFs kultiviert.

1.3 Adulte Stammzellen

Undifferenzierte, teilungsfähige Zellen, die in spezialisierten Geweben von Organismen zu finden sind, werden als adulte Stammzellen bezeichnet. Während ES-Zellen nur im frühen Embryo vorkommen, sind adulte Stammzellen im Organismus nach der Geburt vorhanden.

Adulte Stammzellen haben zum gegenwärtigen Forschungsstand gegenüber den ES-Zellen ein reduziertes Entwicklungspotential. Sie werden deshalb oft als multipotente Zellen bezeichnet (siehe Abbildung 1.3). Adulte Stammzellen können sich zu hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Vorläuferzellen entwickeln. Nicht-hämatopoetische Vorläuferzellen können in Muskel- und Knochenzellen, sowie in Vorläuferzellen anderer Gewebe differenzieren. Hämatopoetische Vorläuferzellen bilden die Basis von myeloiden und lymphoiden Körperzellen.

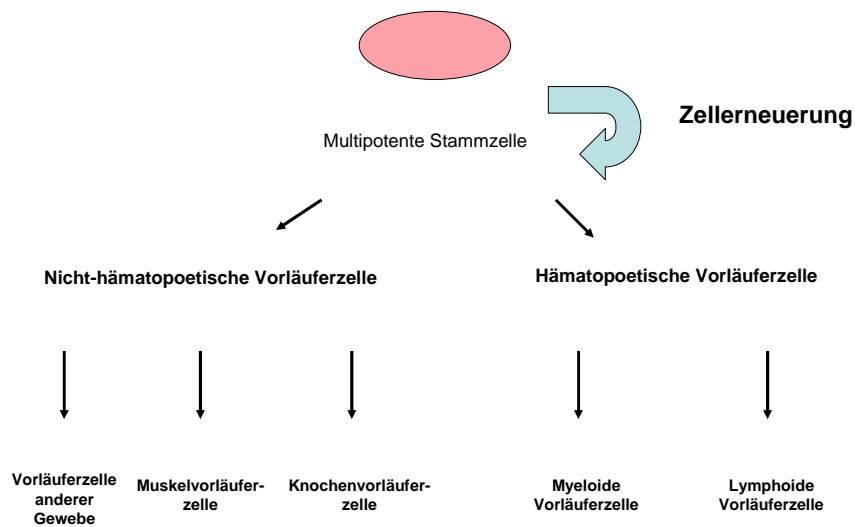


Abbildung 1-3 Differenzierung adulter Stammzellen, nach Vorlage des National Institute of Health, Department of Health and Human Services, Juni 2001

Adulte Stammzellen sind multipotent. Die Zellen können sich zu hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Vorläuferzellen entwickeln. Nicht-hämatopoetische Vorläuferzellen können in Muskel- und Knochenzellen, sowie in Vorläuferzellen anderer Gewebe differenzieren. Hämatopoetische Vorläuferzellen bilden die Basis von myeloiden und lymphoiden Körperzellen

Unter Mithilfe bestimmter Wachstumsfaktoren können die Zellen *in vitro* angeregt werden, sich in bestimmte Zelltypen zu entwickeln.

Eine Aufgabe adulter Stammzellen ist das Ersetzen und Austauschen von Zellen eines Organismus, die durch Krankheit und Verletzungen geschädigt wurden (Leblond, 1964).

Gesehen an der Gesamtzahl der Körperzellen ist der prozentuale Anteil an adulten Stammzellen als sehr gering zu beschreiben. Dementsprechend ist beispielsweise nur etwa jede zehntausendste Zelle im Knochenmark eine hämatopoetische Stammzelle (Weissmann, 2000).

Als Quellen adulter Stammzellen lassen sich z. B. Knochenmark, Blut, Kornea und Retina des Augapfels, Leber, Gehirn, Skelettmuskeln und Zahnpulpa nennen. Adulte Stammzellen können im Rahmen einer medizinischen Therapie Patienten problemlos entnommen werden. Implantationsversuche adulter Stammzellen führen beim Menschen zu keiner Abstoßungsreaktion oder Entartung.

Die wichtigsten Informationen über adulte Stammzellen stammen aus Analysen hämatopoetischer adulter Stammzellen aus dem Knochenmark und dem Blut.

1.4 Die Vaskulogenese

Das Blutgefäßsystem von Wirbeltieren ist ein weitverzweigtes Netzwerk, das in der embryonalen Frühphase entsteht. Während des Gefäßwachstums können Fehlregulationen neoplastische, inflammatorische, infektiöse, ischämische und immunologische Störungen zur Folge haben. Die Vaskulogenese bezieht sich auf die embryonale Neubildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen. Die Begriffe Angiogenese und Arteriogenese stehen für Sprossungen aus bereits existierenden und vollständig ausgebildeten Gefäßen. Physiologische Angiogenese findet im menschlichen Organismus nur noch beim Aufbau der Uterusschleimhaut und der Wundheilung (infolge von Verletzungen) statt (LeCouter et al., 2001). Hierbei muss die Endothelzelle fähig sein, bei Aktivierung aus ihrer gereiften Struktur auszutreten und durch koordinierte Sprossung das Wachstum neuer Gefäße zu ermöglichen.

1.5 Die Endothelzelle

Bei Endothelzellen handelt es sich um Körperzellen, die das Lumen von Blut- und Lymphgefäßen, sowie die Herzkammern und -vorhöfe auskleiden. Unabhängig von ihren je nach Gefäßart unterschiedlichen Aufbau sind alle Gefäße des Herz-Kreislaufsystems mit einer einzelligen Lage Endothelzellen ausgekleidet. Histologisch gesehen, lassen sich Endothelzellen als abgeflachte, auf einer Basalmembran sitzende Zellen beschreiben. Eine Ausnahme hiervon bilden nur die hochendothelialen Venolen der Milz und des Milzsinus. Die Zellen sind (bis auf wenige Ausnahmen, wie z. B. die Lebersinusoiden) über Desmosomen und tight junctions fest miteinander gekoppelt.

- Das Endothel ist zusätzlich noch in eine Vielzahl verschiedenster physiologischer Prozesse eingebunden.
- Es reguliert als Barriere den nutritiven Stoffaustausch zwischen dem intravasalen und extravasalen Raum.
- Die Fließfähigkeit des Blutes kann durch die Hemmung und Aktivierung von Gerinnungsprozessen beeinflusst werden.
- Herzkreislaufregulierende Botenstoffe, wie z.B. das Stickstoffmonoxid oder Endothelin können von Endothelzellen produziert und in die Blutbahn abgegeben werden.

Verschiedene körpereigene oder mikrobielle Substanzen können das Endothel lokal aktivieren. Diese Aktivierung hat eine Bindung bestimmter weißer Blutkörperchen (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und T-Zellen) aus dem Blut an das Endothel zur Folge. Diese Bindung aktiviert diese Zellen ihrerseits und führt zu einer Transmigration der Zellen durch das Endothel in das darunterliegende Gewebe. Infektionen und Entzündungen können auf diese Weise bekämpft werden.

Betrachtet man die embryonale Endothelzellentwicklung der Maus *in vivo*, so erscheinen Endothelzellen erstmals in der dritten Woche p.c. im Extraembryonalraum auf dem Dottersack (*Vesicula umbilicalis*). Extraembryonale Mesenchymzellen bilden die Grundlage der ersten Blutinseln.

Der Aufbau von Endothelzellen kann, abhängig von Vorkommen und Funktion der Zellen im Organismus, sehr unterschiedlich sein. In Muskulatur, Bindegewebe oder Lunge kleidet geschlossenes Endothel das Gefäßlumen aus. In Darmzotten und Niereninterstitium ist das Endothel zum Austausch von größeren Substanzen fenestriert. Im Glomerulum der Niere ist das Endothel sogar mit Poren versehen. Ein diskontinuierliches Endothel mit diskontinuierlicher Basalmembran findet man in den Sinusoiden von Leber, Milz und Knochenmark.

Eine Ausnahme der Endothelbarrieren bildet die Blut-Hirnschranke. Hier findet man ein geschlossenes Endothel. Die tight junctions stellen eine Barriere für Hormone, Proteine und nicht lipidlösliche, wasserlösliche Substanzen dar und sichern somit den Neuronen ein konstantes Milieu.

1.6 Die Kardiomyogenese und der Aufbau von Herzzellen

Die humane Herzentwicklung findet zwischen der dritten und siebten Embryonalwoche statt und schließt mit der Bildung des vierkammerigen Herzens ab. Die Entwicklung des Herzens aus seinen meist paarig angelegten Kardiomyoblasten benötigt die Interaktion verschiedenster Zelltypen.

Die Herzmuskulatur ist eine Sonderform der quergestreiften Muskulatur. Sie besteht aus großen, meist einkernigen Herzmuskelzellen. Der Zellkern liegt in diesen Zellen meist zentral.

Unter dem Mikroskop stellen sich die Myofilamente in Kardiomyozyten nicht einheitlich in schlanken Myofibrillen da, sondern bilden streifenförmige Gebilde. Zwischen diesen fibrillären Strukturen kann man Mitochondrien, Glykogen und Granula ausmachen. Die von Myofibrillen gebildeten Strukturen nennt man Sarkomere. Sie ähneln im Prinzip der quergestreiften Skelettmuskulatur. Pro Sarkomer findet man nur einen T-Tubulus. Das sarkoplasmatische Retikulum ist einfacher ausgebildet als in der Skelettmuskulatur, die Terminalzellen und Triaden fehlen. Durch vereinzelte glatte endoplasmatische Retikulum-Zysternen am T-Tubuli entstehen Dyaden.

Kardiomyozyten kommunizieren mechanisch über Glanzstreifen, die sogenannten *Disci intercalares*.

In *vitro* ermöglicht die typische, spontan rhythmische Kontraktion der Kardiomyozyten eine einfache lichtmikroskopische Identifikation und Unterscheidung von anderen kultivierten Zellen.

Das Phänomen kontrahierender Areale tritt in der Kultivierung von ES-Zellen der Maus ab dem achten Tag der Differenzierung auf.

Die Kontraktionsfrequenz embryonaler Herzzellen der Maus stimmt in *vitro* nicht mit der Herzfrequenz eines Mäuseembryos überein. Diese ist in der Zellkultivierung deutlich herabgesetzt und liegt bei 80 bis 90 Schlägen pro Minuten (Sauer et al, 2001).

1.7 Hypoxieabhängige Regulation kardiovaskulärer Signaltransduktionswege

1.7.1 Hypoxie-induzierter Faktor (hypoxia inducible factor) (HIF)

Die zelluläre Sauerstoffkonzentration spielt in der Expressionsregulation verschiedener Gene eine wichtige Rolle.

Das unreife Gefäßbett expandiert durch Sprossung und reift zu einem System stabiler Gefäße. Hypoxie spielt bei der Stimulierung der Gefäßbettausdehnung eine entscheidende Rolle. Zellen werden über einfache Diffusion mit Sauerstoff versorgt. Wird die Grenze des Sauerstoffdiffusionsvermögens überschritten, ist die Folge der Hypoxie eine Induzierung des hypoxie-induzierten Faktors (HIF) und anderer Gene, welche die Angiogenese stimulieren (Pugh et al, 2003).

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist ein $\alpha\beta$ -Heterodimer und liegt unter hypoxischen Bedingungen im Zellkern vor. Dort besitzt der Transkriptionsfaktor die Möglichkeit, bestimmte DNA-Abschnitte zu erkennen und an diese zu binden. HIF-1 α kann nur durch Assoziation mit der Untereinheit HIF-1 β mit den spezifischen Genen interagieren. HIF-1 α ist durch Hypoxie induzierbar und somit der kontrollierende Faktor (Wang et al, 1995).

Durch HIF-1 induzierte Gene sichern das Überleben der Zellen unter hypoxischen Bedingungen. Bei Aktivierung der Erythropoese wird über Erythropoetinausschüttung die Anzahl der roten Blutkörperchen erhöht und somit eine verbesserte Sauerstoffversorgung der Zellen garantiert. Als langfristige Antwort leitet das Hypoxie-induzierte HIF eine Aktivierung

anderer gefäßproliferativer Gene ein. Auf diese Weise wird dem Sauerstoffmangel mittels Angiogenese entgegengewirkt. HIF-1 führt somit zu einer Aktivierung des EPO-Genes (Semenza et al, 2001).

Experimentell kommt es unter Hypoxie zu einer erhöhten mitochondrialen ROI-Generierung. Dieses zeigt sich in einem Anstieg und einer Stabilisierung der HIF-1 α Untereinheit, und somit von HIF (Emma et al, 2001). Bis heute wurden drei HIF-1 α Isoformen identifiziert (Wiesener et al, 1998).

Unter normalen intrazellulären Sauerstoffbedingungen sind die Expression von HIF-1 α und HIF-1 β gering bis gar nicht vorhanden. Die Aktivierung von HIF-1 α führt weiterhin zu einer Gentranskription des Glukosetransporters, glykolytischer Gene und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (Hua Zhong et al, 2004).

1.7.2 Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor) (VEGF)

Die Angiogenese spielt in Frühstadien der Embryonalentwicklung und bei der Metastasierung von Tumoren eine bedeutende Rolle.

Bei VEGF handelt es sich um den Schlüsselregulator physiologischer Angiogenese (Ferrara et al, 1998; Carmeliet et al, 1996). Es wurden bis heute fünf Isoformen des Genes identifiziert. Der Prototyp der VEGF-Familie, der VEGF-A gehört zu einer Genfamilie, der auch der PLGF, der VEGF-B, der VEGF-C, der VEGF-E und der VEGF-D angehören. Der VEGF-A ist der Regulator für das Wachstum der Blutgefäße, während VEGF-C und -D für die Lymphgefäßentwicklung mitverantwortlich sind (Karkkainen et al, 2002).

Bei pathologischem Gefäßwachstum, wie es bei Neoplasien, Retinopathien oder anderen Störungen auftritt, wird dem VEGF eine bedeutende Rolle zugeschrieben. VEGF mRNA wird in einigen Primärtumoren gebildet (Ferrara et al, 1991). Die VEGF-Expression kann durch Hypoxie, aktivierte Onkogene und bestimmte Zytokine gesteigert werden. VEGF induziert Zellproliferation und Zellmigration mitunter von Endothelzellen. Apoptose kann durch die Anwesenheit von VEGF reduziert werden (Neufeld et al, 1999; Pradeep et al, 2005).

1.7.3 Kardiale Transkriptionsfaktoren GATA 4 und MEF-2c

Für die Steuerung der kardialen Differenzierung ist das Vorhandensein spezieller Transkriptionsfaktoren maßgeblich, die zu bestimmten Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung an einem gezielten Ort im Embryo exprimiert werden.

Der kardiale Transkriptionsfaktor GATA 4 induziert zelluläre Überlebenssignale in Kardiomyozyten. Über diesen Signalweg kann entweder das Überleben von Kardiomyozyten gesichert oder deren Apoptose beeinflusst werden (Suzuki et al, 2004). GATA 4 wurde ursprünglich als Regulator der Kardiogenese und der herzspezifischen Gene ANP und BNP angesehen. (Kovacic et al, 1998; Kuo et al, 1997; Nicholas et al, 1999).

Die Entwicklung kardialer Hypertrophie wird durch GATA 4 entscheidend beeinflusst (Charron et al, 1999; Molkenin, 2000). Eine Überexpression von GATA 4 im Herzen transgener Mäuse führt zu einer Induzierung der Herzmuskelhypertrophie (Liang, 2001).

Der kardiale Transkriptionsfaktor MEF-2c nimmt auf die embryonale Herzformation und die physiologische Entwicklung des vaskulären Plexus entscheidenden Einfluss.

Die Organisation funktionsfähiger Gefäßstrukturen und die Differenzierung zu glatter Muskulatur bleibt in MEF-2c Knockoutmäusen reduziert (Yang et al, 2000).

Im Zusammenhang mit der Herzentwicklung werden MEF-2c Interaktionen mit dem Kofaktor p300 und Smad-Proteinen nachgewiesen (Illi et al, 2005).

Das MEF-2 Protein gehört einer Familie von Transkriptionsfaktoren an, die MEF-2a, MEF-2b, MEF-2c und MEF-2d umfassen. Diese kooperieren innerhalb der Muskeldifferenzierung mit Mitgliedern der MyoD Familie (Kaushal et al, 1994; Molkenin et al, 1995). Zusätzlich werden MEF-2a und MEF-2c während der Embryogenese und im adulten Gehirn (einschließlich Cortex und Cerebellum) exprimiert (Leifer et al, 1994; McDermott et al, 1993).

Die Expression des kardialen Transkriptionsfaktors MEF-2c kann redoxsensitiv reguliert werden (Suzaki et al, 2002).

1.8 ROI (reaktive Sauerstoffintermediate)

Ein Radikal ist ein Atom, auf dessen äußerster Elektronenhülle sich ein unpaares Elektron befindet.

Eine zu hohe Konzentration an Sauerstoffradikalen (auch oxidativer Stress genannt) ist laut Forschungsergebnissen an Alterungsprozessen des Organismus und an der Pathogenese und Progression zahlreicher Erkrankungen (Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Rheuma oder neurodegenerative Erkrankungen) mitbeteiligt. Exogene Einflüsse wie z. B. Tabakrauch, Schwermetalle, Alkohol oder Ozon induzieren eine erhöhte Konzentration an freien Radikalen (Maity et al; 2003; Davis et al, 1990). Die Folge der ROI können oxidative Schäden an Zellen und Gewebe sein (Honda et al, 2001; Burkle 2001).

Zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffintermediate (ROI) gehören Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale (OH^{\cdot}), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Singulett-Sauerstoff (1O_2). Für einen stabileren Zustand der ROI müssen auf der äußersten Elektronenhülle Elektronenpaare zu finden sein. Somit ist eine Kurzlebigkeit dieser Radikale vorprogrammiert.

1.8.1 Entstehungsweise der ROI

Es gibt für reaktive Sauerstoffspezies zwei mögliche Entstehungsweisen. Bei der physikalischen Aktivierung von Sauerstoff kann aus molekularem Sauerstoff (O_2) Singulett-Sauerstoff (1O_2) entstehen. Ursachen einer Aktivierung können elektromagnetische Felder, UV-Licht oder γ -Strahlung sein, jedoch ändert sich bei diesem Vorgang lediglich der Spin, nicht die Anzahl der Elektronen.

Die chemische Reduktion von Sauerstoff zu Wasser erfordert vier Teilschritte. Hierbei ist nur die erste Stufe energieabhängig (endotherm). Alle weiteren Schritte laufen exotherm und spontan oder mit geeignetem Reaktionspartner ab. Nach der Ein-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff erhält man zuerst das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$). Nach der Übertragung eines weiteren Elektrons wird das stabilere und membranpermeable Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet. Dieses wird im nächsten Reduktionsschritt unter Anwesenheit von Übergangsmetallionen oder Semichinonen in das reaktionsfreudige Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) überführt (Haber-Weiss-Reaktion).

Bei der Xanthin-Oxidase und Superoxiddismutase werden Ein-Elektronen-Reaktionen katalysiert (Fridovich, 1995). Im Gegensatz dazu kann die Flavoenzym-gekoppelte Oxidase direkt zwei Elektronen auf den molekularen Sauerstoff übertragen (Massey, 1994).

1.8.2 Die NADPH-Oxidase als Quelle der intrazellulären ROI

ROIs können an den verschiedensten Orten einer Zelle produziert werden. Die Hauptquellen können enzymatischer und nicht-enzymatischer Herkunft sein und von Zelltyp zu Zelltyp variieren. Mögliche Entstehungsorte sind beispielsweise die Cytochrom P-450 Oxidase im Endoplasmatischen Retikulum (Capdevila et al, 1981), die NADPH-Oxireduktase der Mikrosomen (Mohazzab et Wolin, 1972) sowie innerhalb der Peroxysomen verschiedene Oxidasen (Boveris et al, 1972).

Analysenschwerpunkte liegen heutzutage bei den Plasmamembran-gebundenen Oxidasen, insbesondere bei der NADPH-Oxidase phagozytierender Zellen (Segal et al, 1997). Neutrophile Granulozyten und andere phagozytierende Zellen können im Rahmen der Bakterienbekämpfung Superoxide einsetzen. Superoxide können zu H_2O_2 , HOCl und OH^- reagieren. Innerhalb kürzester Zeit können somit große Mengen an ROI produziert werden und als biologische Abwehrreaktion (Babior et al, 1973) eingesetzt werden; diese Reaktion wird auch „respiratory burst“ genannt.



Abbildung 1-4 Reaktionsgleichung des „respiratory burst“

Auch in nicht phagozytierenden Zellen wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder Fibroblasten wurde das Vorkommen der NADPH-Oxidase nachgewiesen (Bayrakutan et al, 1998; Fukui et al, 1995). Die ROI-Konzentrationen innerhalb dieser Zellen sind geringer und fungieren hier zur Vermittlung intrazellulärer Signale.

Die NADPH-Oxidase beinhaltet ein membrangebundenes Flavocytochrom, bestehend aus den zwei Untereinheiten gp91-phox und p22-phox. Um eine Aktivierung der NADPH-Oxidase abhängigen Superoxid-Produktion zu erreichen, ist eine Beteiligung der zytosolischen Untereinheiten p47-phox und p67-phox notwendig. Während der Aktivierung der NADPH-Oxidase wandern die Zytosolproteine zur Plasmamembran und assoziieren dort mit dem oben

genannten Flavocytochrom, um den aktiven Proteinkomplex zu formieren (Jones et al, 1994; Sheppard et al, 2005). Nach Phosphorylierung durch PKC bindet die p47-phox Untereinheit an die p67-phox Einheit. Die Folge ist eine Konformationsänderung mit anschließender Bindung an das Cytochrom und die Aktivierung des Enzyms.

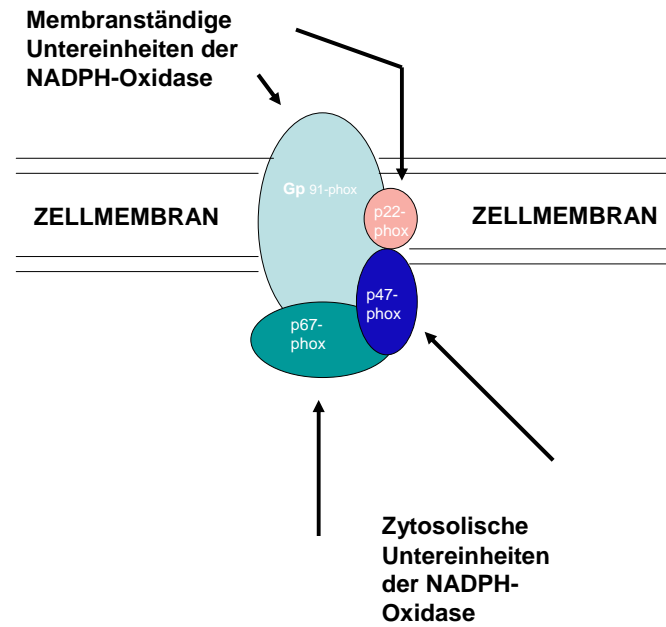


Abbildung 1-5 Schematische Darstellung der Aktivierung der NADPH-Oxidase

Nach Verbindung der zytosolischen Untereinheiten p47-phox, p67-phox und Rac mit dem membranständigen Cytochrom, bestehend aus p22-phox und gp91-phox (Nox), kommt es zur Aktivierung der NADPH-Oxidase.

Darüber hinaus wurde mit der p40-phox noch eine weitere zytosolische Untereinheit identifiziert. Diese ist für die Enzymaktivität nachweislich nicht essenziell. Die Hauptfunktion konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Ihre Funktionalität liegt in der Assemblierung der NADPH-Oxidase durch eine erhöhte Affinität von p47-phox zu den weiteren Untereinheiten (Cross, 2000).

Gp91-phox stellt die katalytische Hälfte des membranständigen Flavocytochroms der NADPH-Oxidase in Phagozyten dar. In den letzten Jahren konnten gp91-Homologe in den verschiedenen Körperzellen nachgewiesen werden. Nach Einführung einer einheitlichen Nomenklatur wird gp91 auch als *Nox 2* (NADPH-Oxidase 2) und seine Homologe wiederum

als *Nox 1*, *Nox 3*, *Nox 4* und *Nox 5* bezeichnet (Lassegue et al, 2001; Kikuchi et al, 2000; Banfi et al, 2004).

Außerdem konnten NADPH-Oxidasen mit einer zusätzlichen Peroxidase-Domäne identifiziert werden. Diese wurden als *Duox 1* und *Duox 2* (duale Oxidase) bezeichnet (Edens et al, 2001).

1.8.3 Abbau der intrazellulären ROI

Zellen verfügen über eine Reihe von Hilfsmechanismen, um sich vor zu hohen Konzentrationen an intrazellulären ROIs zu schützen. Zuerst müssen die Enzyme Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathionperoxidase genannt werden. Diese katalysieren den ROI-Abbau. In dieser chemischen Reaktion konvertiert die Superoxiddismutase $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 , währenddessen die Katalase und die Glutathionperoxidase für den vollständigen Abbau von H_2O_2 zu H_2O zuständig sind.

Weiterhin verfügt die Zelle auch über intrazelluläre Antioxidantien, wie beispielsweise Vitamin E und Thioredoxin (Takenaka et al, 1991). Diese Stoffe haben die Möglichkeit, mit den freien Radikalen Komplexe einzugehen und sie somit für die Zelle unschädlich zu machen. Vitamin E steht über das Schlüsselenzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit dem NADPH- und NADH-Pool in Kontakt und hat damit Einfluss auf die zelluläre Sauerstoffspannung.

ROIs wurden lange Zeit als negative und toxische Moleküle betrachtet und als Ursache vieler Krankheitsbilder gesehen. In aktuelleren Studien kommt jedoch immer mehr die Tendenz auf, dass sie nicht nur unerwünschte Abfallprodukte des Zellmetabolismus sind, sondern als Botenstoffe wichtige Aufgaben in der Signaltransduktion von Zellen übernehmen (Foncea, 2000). Intrazelluläre ROI-Konzentrationen nehmen Einfluss auf MAPK-Kaskaden und übermitteln somit mitogene und Stress-aktivierte Signale. In mehreren Studien konnte eine Aktivierung der p38 mitogen-aktivierten MAPK (p38), der c-Jun-NH2 terminalen Kinase (JNK) und der extrazellulär Signal-regulierten Kinase (ERK1/2) durch exogen zugeführte Sauerstoffradikale nachgewiesen werden (Aikawa et al, 2001; Dong et al, 2004).

In neuesten Untersuchungen wurde gezeigt, dass reaktive Sauerstoffradikale durch eine Induzierung des Hypoxie-induzierten Faktors und eine parallel gesteigerte Expression des

VEGF nachweisbar Einfluss auf die kardiovaskuläre Differenzierung haben (Goyal et al, 2004; Ushio-Fukai et al, 2004). Auch in der Kardiomyogenese von ES-Zellen konnte ein Zusammenhang zwischen ROI, der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) und der Herzzellentwicklung festgestellt werden (Ushio-Fukai et al, 2004; Sauer et al, 2000).

ROI sind auf unterschiedliche Arten und Weisen in der Lage, in zelluläre Signalkaskaden einzugreifen und die Zellentwicklung mitzusteuern. Freie Sauerstoffradikale erfüllen ihre Aufgaben als zelluläre Informationsvermittler häufig jedoch nur, wenn diese in geringen intrazellulären Konzentrationen vorliegen.

1.9 Die Funktion der ROI in der zellulären Mechanotransduktion

Mögliche Entstehungsorte der ROI sind die membranassoziierte NADPH-Oxidase oder die mitochondriale Atmungskette. Der NADPH-Oxidase wird eine Beteiligung an der Regulation des vaskulären Tonus, dem Wachstum der glatten Gefäßmuskulatur, Entzündungsreaktionen und der Aktivität der Matrix-Metalloproteinkinasen (MMP) zugeschrieben (Gosh et al, 2004; Escobales et al, 2005).

Mitochondrien stehen mit dem Zytoskelett über Aktinverbindungen in Kontakt und können auf diese Art und Weise mechanisch aktiviert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass unter Zugbelastung in HUVEC-Zellen eine verstärkte ROI-Generierung auftritt. Ursache der intrazellulären Erhöhung der ROI-Konzentration ist in einer Aktivierung der mitochondrialen Atmungskette zu sehen. Dieser Effekt konnte in HUVEC-Zellen ohne Mitochondrien nicht beobachtet werden. Dementsprechend konnten auch in der Mutterzelllinie die ROI-Generierung nach Zerstörung des Zytoskeletts mit Cytochalasin D inhibiert werden (Epstein, 2003). Positive Effekte physikalischer Stimuli auf die Differenzierung von ES-Zellen werden schon länger diskutiert (Shyy, 2003).

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie wurde von der Arbeitsgruppe Chen der Einfluss laminarer Scherkräfte auf die Differenzierung von ES-Zellen untersucht. Die ES-Zellen wurden dabei zeitweise einem Flüssigkeitsstrom ausgesetzt und anschließend auf spezifische Marker für Endothelzellen analysiert. Hierbei konnte ein signifikanter Anstieg der Expression von CD31, von Willebrandfaktor und VE-Cadherin registriert werden (Wang et al, 2005).

1.10 Zelluläre Signaltransduktion mitogen-aktivierter Proteinkinasen

Innerhalb der Zellen eines Organismus stellt die Informationsübermittlung eine lebenswichtige Funktion dar.

Einige Mediatoren der Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Zellkern bilden die Mapkinasen (MAPKs). In den Aufgabenbereich der MAPKs fallen die Übermittlung der Signale für Differenzierung, Apoptose oder Proliferation von Zellen. Kinasen modulieren die Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung; somit können externe Stimuli genregulatorisch beantwortet werden.

Mittlerweile lassen sich drei verschiedene Subtypen von MAPKs benennen. Diese unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität und Regulation. Hierzu zählen die:

- extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK)
- c-Jun-NH2 terminale Kinase (JNK)
- sowie die p38 mitogen-aktivierte Mapkinase

Die Aktivierung aller drei MAPKs wurden bei Herzmuskelhypertrophie beobachtet (Markou et al, 2002).

Als vierte MAPK wurde zusätzlich die große mitogen aktivierte Kinase 1 (BMK 1) identifiziert. Ihre physiologische Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Bei einigen Zellarten wird diesem Signalweg die Regulation sogenannter „early response genes“ wie c-jun zugeschrieben (Kato et al, 1997).

1.10.1 Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK)/JNK

Die Stress-aktivierte Proteinkinase Jun-N-terminale kinase SAPK/JNK wird vorzugsweise durch UV- und Gammastrahlung, inflammatorische Zytokine und in manchen Fällen auch Wachstumsfaktoren phosphoryliert. Neben der zellulären Antwort auf Stress und Entzündungen reguliert die JNK Prozesse wie Proliferation, Gewebsmorphologie und Apoptose (Paul et al, 1997).

Die ausschlaggebende Signaleinheit der JNK besteht aus Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase (MAPKKK), meist extrazellulär Signal-regulierte Kinase Kinase 1-4 (MEKK1-4) oder einer der gemischt abstammende Kinase (MLK), welche die Eigenschaft besitzen, MAPK Kinase 4-7 (MKK4-7) zu phosphorylieren und zu aktivieren. Letztere ist eine der SAPK/JNK vorgeschaltete Kinase. Die Stressignale werden über die GTPasen der Rho-Familie weitergeleitet (siehe Abbildung 1-6).

1.10.2 Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK 1/2)

MAPKs dieser Familie wurden am intensivsten untersucht und beeinflussen den Phänotyp von Zellen. ERK 1/2 hat Einfluss auf den Differenzierungsgrad von Thymozyten, Skelettmuskelzellen, Herzmuskelzellen und Nierenepithelzellen.

ERK wird durch extrazellulär Signal-regulierte Kinase Kinase 1/2 (MEK 1/2) via Phosphorylierung von Threonin 202 und Tyrosin 204 aktiviert. Nach Bindung von Wachstumsfaktoren oder anderen Agonisten an die Wachstumsrezeptoren einer Zelle wird in der Regel das Protein Raf durch RasGTP an die innere Oberfläche der Plasmamembran gebunden und durch Konformationsänderungen aktiviert (Denhardt, 1996; Morrison, Cutler, 1994). Diese Induzierung führt zum Ablauf einer hierarchischen intrazellulären Signalkaskade von Raf über MEK1/2 bis hin zu ERK 1/2. Die aktivierte MAPK reguliert die Aktivität weiter zentral gelegener Proteinkinasen und schließlich die der Transkriptionsfaktoren (siehe Abbildung 1-6).

1.10.3 p38 mitogen-aktivierte Mapkinase (p38)

Die p38 MAPK wird durch externe Einflüsse wie Hitzeschock, oxidativer Stress und osmotischer Schock aktiviert. Auch inflammatorische Zytokine und vasoaktiver Stress kombiniert mit Ischämie beeinflussen die Aktivität der MAPK. Durch p38 kann die Regulation von Entzündungsreaktionen, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod kontrolliert werden (Ono et al, 2000).

Wie auch bei den anderen MAPKs besteht die Signaleinheit der p38 aus MAPKKK, meist MEKK oder eine der MLK. Diese besitzen die Möglichkeit, MKK3/6 zu phosphorylieren und zu aktivieren. Letztere ist eine der p38 MAP Kinase vorgeschaltete Kinase. Die Aktivierung

der MKK3 und MKK6 erfolgt durch die Phosphorylierung von Serin und Threonin. Die Stresssignale werden in dieser Kaskade durch die kleinen GTPasen der Rho-Familie übertragen.

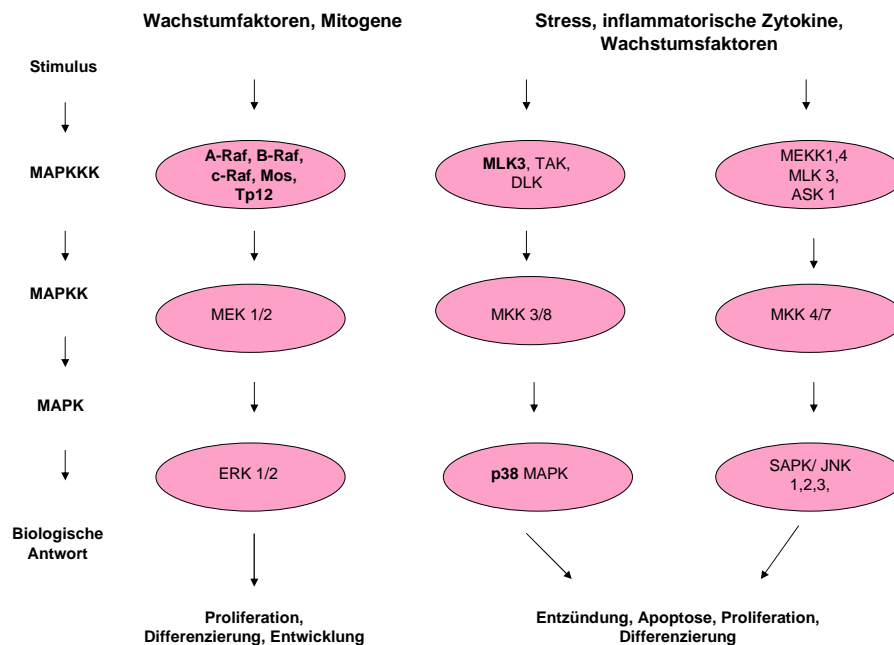


Abbildung 1-6 MAPK-Signalkaskaden, nach Vorlage der Internetseite von Cell Signaling, www.cellsignaling.de

Verschiedene Wachstumsfaktoren, Mitogene, Stress und Zytokine wirken stimulierend auf die Phosphorylierung der MAPKs ERK 1/2, p38 und SAPK/JNK. Die Stimulierung läuft über verschiedene, den MAPKs vorgeschaltete, Enzyme, welche ebenfalls Kinasen darstellen. Folge der MAPKs-Phosphorylation sind Proliferation, Differenzierung, Entzündung und Apoptose.

1.11 Aufgabenstellung

Mechanische Zugbelastung ist ein physiologischer Stimulus für die kardiovaskuläre Embryoentwicklung beim Vertebraten.

Embryonale Stammzellen der Maus stellen ein *in vitro* Modell für den frühen Postimplantations-Embryo dar. Differenzierungsvorgänge durch mechanische Zugbelastung könnten in diesem Modell induziert und analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob mechanische Zugbelastung die kardiovaskuläre Differenzierung ES-Zellen der Maus induziert.

ROIs sind als Signalmoleküle an der Transduktion mechanischer Zugbelastung beteiligt. Weitere Fragestellung der Dissertation ist, ob die Einwirkung von mechanischen Kräften zu einer intrazellulären ROI-Generierung führt.

ROIs fördern die Aktivierung der MAPKs p38, JNK und ERK 1/2, sowie von HIF-1 α und VEGF. Es soll untersucht werden, ob ROI in die durch mechanische Zugbelastung initiierte Signalkaskade eingreift.

Die Quelle der mechanisch induzierten ROI-Freisetzung soll identifiziert werden. Hierzu wird die Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten unter mechanischer Zugbelastung untersucht.

Mittels verschiedener Radikalfänger soll die durch Zugbelastung hervorgerufene ROI-Generierung inhibiert und ein Effekt auf die Differenzierung von ES-Zellen beobachtet werden.

Kardiale Transkriptionsfaktoren unterstützen die embryonale Entwicklung des Herzens. Es soll untersucht werden, ob diese Faktoren nach mechanischer Zugbelastung verstärkt exprimiert werden und ob diese Vorgänge redoxsensitiv reguliert sind.

2 Material & Methoden

2.1 Firmen

Abcam Limited, Cambridgeshire, UK

ABR, Golden, USA

Abgene, Hamburg, Deutschland

Ambion, Woodward Austin, USA

Alexis, Grünberg, Deutschland

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Biochrom, Berlin, Deutschland

Biorad GmbH, München, Deutschland

Bühler, Hechingen, Deutschland

Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland

Cell Signaling, Cummin Center Beverly, USA

Chemicon International, Hampshire, UK

Dianova, Hamburg, Deutschland

Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Gilson International B.V., Bad Camberg, Deutschland

GFL, Burgwald, Deutschland

Hanna, Kehl am Rhein, Deutschland

Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Langenbrick, Emmendingen, Deutschland

Leica, Bensheim, Deutschland

Menzelgläser, Braunschweig, Deutschland

Molecular Probes, Eugene, USA

Roth, Karlsruhe, Deutschland

PAA, Cölbe, Deutschland

Promega, Mannheim, Deutschland

Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, USA

Sartorius, Goettingen, Deutschland

Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Zeiss, Jena, Deutschland

Tabelle 2-1 Geräte

Geräte	Firmen gemäß Liste 2.1
Bioflexplatten	14
Brutschränke	19
Cellspin Rührsystem	20
Deckgläschen	22
Digitales pH-Meter	18
Icycler	8
Konfokale Lasermikroskope	21,23
Lichtmikroskop	33
Objekträger	24
Pipetten	15,16
Schüttler	9
Spinnerflaschen	20
Sterilbank	19
Flexercell System [®]	14
Wasserbad	18
Zellkulturplatten	7
Zentrifugen	15,19

Tabelle 2-2 Chemikalien

Chemikalien	Firmen gemäß Liste 2.1
4- (2-Aminoethyl) -Benzensulfonyl Fluorid (AEBSF)	10
β-Mercaptoethanol	32
Chloroform	28
DNase I	21
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10
DPI	32
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	21
ESGRO	12
Iscoves modifiziertes Dulbecco Nährmedium (IMDM)	7
Fötale Kälberserum (FCS)	32
Glutamin	28
2'-7'-Dichlorofluorescin (H ₂ DCF)	25
Essenzielle Aminosäurelösung (MEM)	28
Mitomycin	32
aus dem murinen Leukämievirus isolierte Reverse Transkriptase (MMLV RT)	8
N- (2-Mercaptopropionyl)-glycin	32

Material & Methoden

nicht essenzielles Medium (NEA)	7
Natriumpyruvat	7
Paraformaldehyd	32
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	28
Penicillin/Streptomycin	28
Primäre Antikörper	1, 2, 11, 32
Primer	21
RNAIce	32
Imidazolderivat, spezifischer Blocker der p38 MAPK (SB203580)	5
Sekundäre Antikörper	12, 13
Sigmacote	32
spezifischer Blocker der c-Jun-NH2 terminale Kinase (SP600125)	12
SYBR Green Supermix	8
Trizol	21
Triton X-100	32
Trypsin	21
Trolox	32

spezifischer Blocker der extrazellulär Signal-regulierten Kinase (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4- (2-aminophenylthio)-butadien)) (UO126)	29
---	----

Tabelle 2-3 Puffer, Lösungen und Medien

PBST (1%, 0,1%, 0,01%)	<p>PBS + 1% (v/v) Triton X-100</p> <p>PBS + 0,1% (v/v) Triton X-100</p> <p>PBS + 0,01% (v/v) Triton X-100</p>
Iscoves Medium mit 18% FCS	<p>500 ml IMDM Medium ohne Glutamin</p> <p>40,0 ml hitze-inaktiviertes FCS</p> <p>50,0 ml FCS</p> <p>6,25 ml NEA</p> <p>6,25 ml Glutamin</p> <p>6,25 ml β-Mercaptoethanol</p> <p>5,0 ml MEM</p> <p>1,5 ml Penicillin/Streptomycin</p>

<p>10fach PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)</p>	<p>4 g KCl 4 g KH₂PO₄ 160 g NaCl 23 g Na₂HPO₄×H₂O in H₂O gelöst, pH mit HCl auf 7,4 eingestellt</p>
<p>LIF-Medium</p>	<p>50 ml Iscoves Medium mit 18% FCS 1 ml ESGRO-Lösung (LIF)</p>

2.2 Zellkultur

2.2.1 Die Stammzelllinie CCE S103

Die Stammzelllinie CCE S103 wurde bereits 1986 von der Arbeitsgruppe Robertson aus Mäuseembryonen isoliert (Robertson et al, 1986).

In Zellkultur, auf einem Monolayer von Fibroblasten der Maus wachsend, können die Zellen undifferenziert über lange Zeiträume kultiviert werden.

Alle Experimente der vorliegenden Dissertation werden mit der ES-Zelllinie CCE S103 durchgeführt.

Im undifferenzierten Entwicklungsstadium werden Stammzellen auf Fibroblasten gezüchtet und ein täglicher Mediumwechsel durchgeführt. Um zu diesem Zeitpunkt der Kultivierung eine spontane Differenzierung zu inhibieren, wird dem Iscoves Nährmedium das Zytokin LIF zugesetzt.

2.2.2 Fibroblasten der Maus

Fibroblasten fungieren bei der Zellkultur von ES-Zellen als sogenannte „Ammenzellen“. Sie haben einerseits ernährende Funktion, andererseits produzieren sie auch eine gewisse Menge des LIF-Faktors zur Unterdrückung der Stammzellendifferenzierung. In der ES-Zellkultivierung wird in der Regel eine Kombination aus Fibroblastenkultur und extern zugeführtem LIF eingesetzt.

Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei einer Temperatur von +37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchte von 95%.

Die Fibroblasten werden aus Mäuseembryonen an Tag zwölf der Trächtigkeit isoliert und anschließend kultiviert. Sie können bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert und nach Bedarf aufgetaut und kultiviert werden.

In der Zellkultur werden Fibroblasten in Iscoves Medium mit 18% FCS ausgesät und bis zur Konfluenz herangezogen.

Nach dem Erreichen einer festgelegten Zelldichte werden die Zellen für zwei Stunden in einer mitomycinhaltigen Nährlösung inkubiert. Mitomycin C ist ein zur Gruppe der Antibiotika gehöriges zytostatisches Medikament, gewonnen aus *Streptomyces caesitosus*. Es wirkt über Alkylierung und Cross-linking von DNA und unterbindet auf diesem Weg die weitere Replikation der Zellen. Diesen Vorgang nennt man die Inaktivierung der Fibroblasten.

Auf der Oberfläche dieser Zellschicht werden die undifferenzierten Stammzellen angezüchtet.

2.2.3 Kultivierung der Zelllinie CCE S103 im zweidimensionalen Zellverband

Nach dem Auftauen können die Stammzellen auf inaktivierten Fibroblasten ausgesät und kultiviert werden. Einmal täglich wird das Nährmedium vollständig abgenommen und durch frisches Medium ausgetauscht. Innerhalb von zwei bis drei Tagen erreichen die Zellen einen konfluenten Zustand. Unter dem Lichtmikroskop kann der Zusammenschluss von Einzelzellen zu größeren Zellverbänden (auf einem Untergrund von Fibroblasten heranwachsend) verfolgt werden. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei einer Temperatur von + 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchte von 95%.



Abbildung 2-1 Undifferenzierte Stammzellen im zweidimensionalen Verband

Das Bild zeigt das Wachstum undifferenzierter ES-Zellen in Zellkultur. Die Stammzellen sitzen auf einer grundierenden Schicht von Fibroblasten der Maus.

Das proteolytische Agens Trypsin-EDTA wird verwendet, um die entstandenen Zellverbände wieder in Einzelzellen zu dissoziieren. Dazu werden die Zellen mit 37°C-warmem PBS gewaschen, und eine dünne Schicht Trypsin-EDTA auf die Zellen in der Kulturschale aufgetragen. Nach einer Inkubation der Zellen über einen Zeitraum von drei bis fünf Minuten lassen sich die aufgelockerten Zellverbände mittels einer Pipette vorsichtig in Einzelzellen auftrennen. Die Reaktion wird durch die Zugabe des Kulturmediums in vierfacher Menge abgestoppt.

Dieses Verfahren dient einerseits dazu, präkonfluente Kulturen von Stammzellen neu zu passagieren, auf neue inaktivierte Fibroblasten auszusäen und weiter zu kultivieren. Andererseits können die hier gewonnenen Einzelzellen in Spinnerflaschen-Systeme überführt werden. Die dissoziierten Stammzellen erhalten in den Spinnerflaschen die Möglichkeit, spontan zu differenzieren.

2.3 Kultivierung der Zelllinie CCE S103 im dreidimensionalen Zellverband: multizelluläre Embryonalkörperchen

Nach der enzymatischen Dissoziierung werden die Einzelzellen in Spinnerflaschen mit einem Fassungsvermögen von 250 ml überführt. Das Anfangsvolumen von 100 ml Iscoves Medium mit 18% FCS wird am darauf folgenden Tag auf 250 ml aufgefüllt. Täglich werden 100 ml des Nährmediums mit frischem Kulturmedium ausgetauscht.

Innerhalb der Spinnerflaschen können die vereinzelt Zellen aggregieren, sodass Embryonalkörperchen entstehen. In diesen Zellzusammenschlüssen beginnt die spontane Differenzierung der ES-Zellen.

In einer Spinnerflasche können bis zu 1000 EBs mit einem Durchmesser von bis zu drei Millimetern herangezüchtet werden.



Abbildung 2-2 Embryonalkörperchen (EB)

Bis zu 1000 Embryonalkörperchen können in einem Spinnerflaschen-System herangezogen werden. Der Durchmesser der EBs liegt bei zwei bis maximal drei Millimetern. In diesen kugeligen Zellverbände haben die undifferenzierten Stammzellen die Möglichkeit, spontan zu differenzieren.

Um der Zelladhäsion vorzubeugen, sind die Spinnerflaschen mit einer silikonhaltigen Substanz (Sigmacote) an ihren inneren Glaswänden und den zwei Rührklöppeln überzogen. Die Klöppel werden von einem magnetischen Rührtrieb (Cellspin Rührsystem) mit 20 Umdrehungen pro Minuten und Richtungswechsel nach jeweils vier Umdrehungen

gleichmäßig bewegt. Hierdurch wird eine homogene Temperatur- und Nährstoffverteilung, sowie eine gleichmäßige CO₂-Sättigung innerhalb des Mediums sichergestellt.

Durch ein nicht vollständiges Verschließen der Spinnerflaschenhalse ist ein Gasaustausch mit der Umgebungsluft garantiert.

Die Kultivierungsbedingungen in den Spinnerflaschen im Brutschrank liegen bei einer Temperatur von + 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchte von 95%. Entsprechend der vorgesehenen Versuche können die EBs zu unterschiedlichen Wachstumsstadien aus dem System entnommen und für Experimente verwendet werden.

2.4 Applikation mechanischer Zugbelastung auf die Zelllinie CCE S103 im Flexercell System[®]

Abhängig von Funktion und Lage sind die Körperzellen eines Organismus einer Deformation durch Zug- und Druckspannungen ausgesetzt. In *vitro* verändern Zellen, die während des Wachstums mechanischer Zugbelastung ausgesetzt werden, spezifisch ihren Stoffwechsel und ihr Erscheinungsbild.

Nach drei Tagen Wachstum der EBs im Spinnerflaschen-System werden sie aus der Flasche entnommen und auf spezielle, kollagenbeschichtete Multischalen (Bioflexplatten) mit elastischem Silikonboden gesetzt. Ein täglicher Wechsel des Nährmediums wird durchgeführt. Die Kulturbedingungen werden unverändert beibehalten.

Nach 24 Stunden haben die ausgesäten EBs festen Kontakt zur flexiblen Membran aufgenommen, und somit kann durch Dehnung der elastischen Membran eine Zug- und Druckspannung auf die anhaftenden Zellen ausgeübt werden. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Differenzierung der ES-Zellen im Anfangsstadium (Sachinidis et al, 2003). Diese mechanische Belastung im Flexercell System[®], kann mit den in *vivo* auftretenden mechanischen Kräften, denen Zellen während des physiologischen Wachstums ausgesetzt sind, gleichgesetzt werden. Adhärente Zellen können über unterschiedliche Zeiträume und mit verschiedenen Zugbelastungen behandelt werden. Das Computerprogramm FX-3000 des Flexercell Systems[®] bietet die Möglichkeit, eine prozentuale Dehnung der elastischen Membran einzustellen. Mit der vorhandenen Vakuumpumpe kann aus technischen Gründen eine Dehnung der Membran über 20% nicht durchgeführt werden.

Die Hauptuntersuchungen dieser Studie werden bei einer zweistündigen mechanischen Zugbelastung der EBs durchgeführt. Im Rahmen jedes Versuches wird eine unbehandelte Probe (Kontrolle) mit einer Probe nach mechanischer Zugbelastung verglichen. In speziellen Experimenten werden einige Zellproben mit unterschiedlichen Radikalfängern und spezifischen Blockern vor der mechanischen Zugbelastung inkubiert.

Die Multiwellschale verfügt über unabhängige Vertiefungen. Jede der elastischen Silikonmembranen ist mit Kollagen beschichtet. Nach durchschnittlich 24 Stunden sind die anfangs schwimmenden EBs adhären.

Nach dem Einsetzen der Bioflexplatten in das Flexercell System® wird der elastische Boden der Schalen über computergesteuerte Ventile mit Vakuum und Druckluft bewegt. Neben der mechanischen Bewegung der Zellen kann auch durch den Flüssigkeitsstrom Stress, der sogenannte „shear Stress“, entstehen und zusätzlich auf die Zellen wirken.

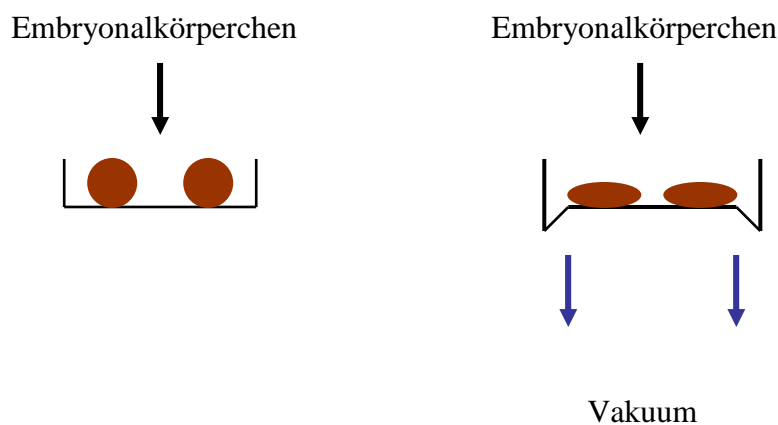


Abbildung 2-3 Behandlung der Embryonalkörperchen mit mechanischer Zugbelastung

Auf der linken Seite der Grafik sieht man EBs auf der elastischen Membran sitzend. Kommt es, wie auf der rechten Seite der Grafik zu einem ansaugenden Vakuum, werden durch eine Längendehnung der Membran die aufsitzenden EBs einer mechanischen Dehnung unterzogen.

2.5 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

2.5.1 Technik

Die Absorption von Licht definierter Wellenlänge durch fluoreszierende Substanzen kann dazu führen, dass bestimmte Elektronen aus dem Grundzustand in einen angeregten, energiereicheren Zustand übergehen. Ein Teil der aufgenommenen Energie kann in andere Energieformen wie z. B. Wärme umgewandelt werden, der restliche Teil hingegen wird als Fluoreszenzlicht emittiert (Schild, 1996).

Das emittierte Licht ist energieärmer und langwelliger als das Anregungslicht. Es gibt in der Fluoreszenzmikroskopie die Möglichkeit, Anregungs- und Emissionslicht durch geeignete Filter und dichroische Spiegel voneinander zu trennen. So gelangt nur das kurzwellige Anregungslicht auf das zu untersuchende Präparat und nur das langwellige Emissionslicht zum Okular, Photomultiplier oder zur Kamera und somit zum Betrachter.

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (cLSM) bietet der Wissenschaft die Möglichkeit, klare Tiefenschnitte von dreidimensionalen Geweben anzufertigen, ohne diese zu zerstören und unbrauchbar zu machen.

Durch die Abbildung einer nahezu punktförmigen Lichtquelle (in Abb.2.4 als Laser, Linse und Lochblende dargestellt) auf die Probe (Anregungsvolumen) wird das Streulicht von außerhalb der Fokalebene liegenden Gebieten fast vollständig unterdrückt. Das gleiche Volumen (Detektionsvolumen) wird dann auf eine Lochblende (Detektorlochblende) mit einem Durchmesser kleiner als 1mm vor dem Detektor abgebildet. Mit der Lochblende selektiert man einen Bildpunkt für den Detektor. Objektpunkte, die axial verschoben sind, werden in der Ebene der Lochblende als unscharfe Flächen abgebildet. Hierbei bestimmt das Verhältnis dieser Fläche zur Fläche der Lochblende die Unterdrückung des Objektpunktes. Die Abbildung 2.4 zeigt schematisch den Strahlengang eines cLSMs.

Die Bestrahlungszeit eines Gegenstandspunktes dauert nur wenige Millisekunden. Daher ist in der Regel ein Laser erforderlich, um ausreichend Fluoreszenz anzuregen. Alle weiteren Punkte werden während dieses Zeitintervalls nicht angestrahlt und können daher nicht ausbleichen oder verändert werden.

Das Prinzip der cLSM resultiert in einer deutlichen Erhöhung des Kontrastes und einem wesentlich geringeren Anteil an störender Fluoreszenz von außerhalb der Fokusebene.

Die Lochblende ermöglicht die Darstellung eines Bildes von sehr geringer Größe, weniger als 1 mal 1 μm des Gegenstandes. Das aus der Lochblende austretende Licht wird von einem Photomultiplier detektiert und die Information an einen Computer weitergegeben. Dieser speichert die Information als ein Bildelement (Pixel) mit einer Helligkeitsinformation als erstes Pixel einer Grafik ab. Die automatische Rastereinrichtung des cLSMs richtet dann den Strahlengang des Anregungs- und Emissionslichtes auf einem benachbarten Gegenstandspunkt der Fokusebene (Ablenkung in der x-Achse).

In der Grafik wird ein zweites Bildelement gespeichert. Ist die erste Zeile des Bildes, üblicherweise mit 512 Pixel, gefüllt springt das System in die zweite Spalte (Ablenkung in der y-Achse). Auf diese Art und Weise werden alle 512 Zeilen gespeichert. Das dargestellte Bild zeigt die Intensität der Fluoreszenz innerhalb der Fokusebene und wird auch als „optischer Schnitt“ bezeichnet.

Sollen optische Schnitte aus mehreren, aufeinander folgenden Ebenen aufgenommen werden, kann dies durch Heben bzw. Senken des Objektisches erreicht werden. Dadurch wird die räumliche Ausdehnung des Präparats optisch aufgelöst und kann mittels geeigneter Computerprogramme ausgewertet werden.

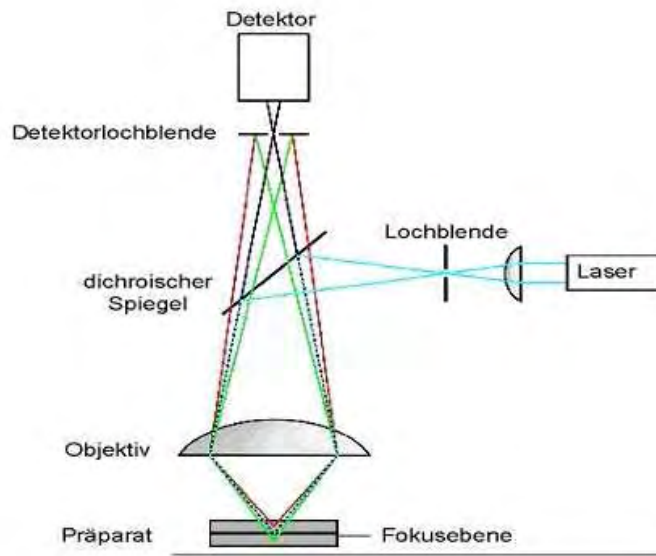


Abbildung 2-4 Vereinfachter Strahlengang eines cLSMs, modifiziert nach der Internetseite www.uk.plbio.kvl.dk

Das Licht einer punktförmigen Lichtquelle (Laser, Linse und Lochblende) wird, wie in der oberen Skizze erkennbar, über einen dichroischen Spiegel in den Strahlengang des Mikroskops eingebracht und durch das Objektiv in das Präparat fokussiert.

Reflektiertes oder Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene wird durch das Objektiv und die Detektorlochblende (pinhole) von einem Detektor (z.B. ein Photomultiplier) aufgenommen. Licht aus Ebenen über oder unter der Fokusebene wird durch die Detektorlochblende abgeschirmt.

2.5.2 Präparation der EBs für die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (cLSM)

Nach dem Einwirken mechanischer Zugbelastung werden die Zellen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Die EBs werden auf der Kollagenmembran sitzend ausgeschnitten und auf einem Objektträger gelegt. Anschließend benetzt man die Zelloberfläche mit einer Glycerol-PBS-Lösung (Verhältnis 1:1) und deckt sie mit einem dünnen Deckgläschen ab. Die Analyse der Zellen unter dem cLSM erfolgt sofort.

2.6 Immunzytochemie

In dem folgenden Abschnitt sind alle in der Dissertation eingesetzten primären Antikörper mit ihrer Spezifität beschrieben:

Der monoklonale PECAM-1 (CD31) spezifische Antikörper stammt aus der Ratte und wurde für die Erkennung des 130-140 kDA großen Oberflächenproteins, CD31 entwickelt, welches bedeutsam für Zell-zu-Zell-Interaktionen, Zell-Matrix-Interaktionen und im Rahmen der zellulären Signaltransduktion ist. CD31 kann zusätzlich in kleinen Mengen auf Blutplättchen und Leukozyten nachgewiesen werden. Der Antikörper wird in einer Konzentration von 1:200 eingesetzt.

Der monoklonale Anti- α -Aktinin spezifische Antikörper stammt aus der Maus. Das α -Aktinin ist ein Aktin-Bindungsprotein, das sowohl in Muskelzellen als auch in anderen Zellen exprimiert wird. In glatter Muskulatur befindet sich α -Aktinin vermehrt in Dense-Körperchen und Plaques, die für dieses Gewebe charakteristisch sind. Der Antikörper reagiert spezifisch mit dem α -Aktinin der Skelett- und Herzmuskeln. Der Antikörper detektiert die Z-Scheibe in Stressfasern von Myotubuli in Skelett- und Herzmuskelzellen, allerdings nicht die nicht-sarkomerischen Muskelemente (Bindegewebe, Epithel, Nerven, glatte Muskulatur). Der Antikörper wird in einer Konzentration 1:200 eingesetzt.

Der monoklonale HIF-1 α spezifische Antikörper wird in der Maus hergestellt und ermöglicht die Darstellung der HIF-1 α -Expression in biologischen Geweben. HIF-1 α reichert sich unter hypoxischen Bedingungen sehr schnell im Zellkern an und heterodimerisiert dort mit ARNT (aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator), das auch als HIF-1 β bezeichnet wird. HIF-1 α wird eine aktivierende Rolle in der Angio- und Vaskulogenese zugeschrieben, besonders in der Regulierung der VEGF-Genexpression. Der Antikörper wird in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt.

Der monoklonale VEGF (C-1) spezifische Antikörper ist ein IgG_{2a} aus der Maus und wird für immunzytochemische Färbungen der VEGF-Expression in Geweben eingesetzt. VEGF ist ein dimerisches Glykoprotein, das strukturell homolog zu PDGF ist. Einige Varianten von VEGF wurden durch mRNA Splicing nachgewiesen. Die Expressierung von VEGF wird unter anderem auch der Induzierung von HIF-1 α und ROI zugeschrieben. Der Antikörper wird in einer Konzentration von 1:200 eingesetzt.

Der polyklonale Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) spezifische Antikörper markiert die p44/42 mitogen-aktivierte Proteinkinase (p44/42 MAPK), auch extrazellulär regulierte Kinase genannt. Der Antikörper wird im Kaninchen erzeugt. Die ERK 1/2-Aktivierung erfolgt durch

Phosphorylierung von Threonin 202 und Tyrosin 204 in der katalytischen Region der MAPK. Die MAPK-Signalkaskade wird durch neurotrophische und Wachstumsfaktoren aktiviert und spielt eine Rolle in Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Der Antikörper wird in einer Konzentration von 1:200 eingesetzt.

Der polyklonale Phospho-SAPK/JNK spezifische Antikörper detektiert die Stress-aktivierte Proteinkinase. Die Aktivierung läuft in diesem Fall über die Phosphorylierung von Threonin 183 und Tyrosin 185. Zellulärer Stress und Zytokine können diese Reaktion hervorrufen. Der Antikörper wird im Kaninchen erzeugt und in einer Konzentration von 1:200 eingesetzt.

Der polyklonale Phospho-p38 spezifische MAPK Antikörper stammt aus dem Kaninchen und erkennt die aktivierte Form der Mitogen-aktivierten Proteinkinase. Die Aktivierung läuft über die Phosphorylierung von Threonin 180 und Tyrosin 182. Ursache der Aktivierung sind zellulärer Stress und Zytokine. Der Antikörper wird in einer Konzentration von 1:200 eingesetzt.

Die polyklonalen Antikörper zur spezifischen Detektierung der NADPH-Oxidase Untereinheiten stammen, bis auf den Antikörper, der für die Detektierung von p67-phox entwickelt wurde, aus der Ziege. Der Antikörper gegen p67-phox wird aus dem Kaninchen isoliert. Die Antikörper gegen p47-phox und p67-phox binden an die namensgleichen NADPH-Oxidase Untereinheiten im Zytosol, welche nach der Aktivierung der Oxidase zur Plasmamembran wandern und dort mit dem Flavocytochrom den aktiven Proteinkomplex formieren. Die Antikörper gegen p22-phox bindet mit der membrangebundenen gleichnamigen Untereinheit der NADPH-Oxidase. Der primäre Antikörper gegen *Nox 4* stammt aus der Maus. Alle Antikörper zur Detektierung der NADPH-Oxidase Untereinheiten werden in einer Konzentration von 1:50 eingesetzt.

2.6.1 Sekundäre Antikörper

Zur Detektion der primären Antikörper werden in den immunzytochemischen Färbungen sekundäre Antikörper eingesetzt. Diese enthalten als Fluorochrom ein Indocarbocyanin.

Gearbeitet wird in den Experimenten mit folgenden Substanzen:

FITC konjugiertes Ziege anti-Maus IgG

Cy5 konjugiertes Schaf anti-Maus IgG

Cy5 konjugiertes Maus anti-Ziege IgG

Cy5 konjugiertes Ziege anti-Ratte IgG

Cy5 konjugiertes Kaninchen anti-Ratte IgG

Alle sekundären Antikörper werden für die immunzytochemischen Färbungen in der Konzentration von 1:100 eingesetzt.

Die Herstellung der sekundären Antikörper basiert auf Immunelektrophorese.

Der FITC-Antikörper weist ein Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 490 nm und ein Emissionsmaximum von 529 nm auf. Die Anregung erfolgt mit einem Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm.

Der Cy5-Antikörper wird mit einem Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm angeregt. Das Anregungsmaximum liegt bei 650 nm und das Emissionsmaximum bei 674 nm.

2.6.2 Durchführung der immunzytochemischen Markierung

Als Immunzytochemie wird in der Biologie eine Methode bezeichnet, mit der Antigene im Gewebe mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden können. Damit kann beispielsweise bestimmt werden, in welchem Gewebe ein spezifisches Protein vorhanden und in welchem Kompartiment der Zellen es lokalisiert ist.

Grundlage für die Durchführung einer immunzytochemischen Färbung ist ein Antikörper, der spezifisch gegen das Antigen gerichtet ist, das man darstellen möchte. In allen immunzytochemischen Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde mit der indirekten Immunfluoreszenzmethode gearbeitet, um die gesuchten Proteine sichtbar zu machen. Bei dieser Methode wird im ersten Schritt das zu untersuchende Gewebe mit einem primären Antikörper inkubiert. Im zweiten Schritt wird dann ein Antikörper eingesetzt, der sich gegen den ersten Antikörper richtet.

Abhängig von der Versuchsdurchführung werden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten nach einmaligem Waschen mit 1×PBS sofort mit eiskaltem 4%igem PFA für 1 Stunde auf Eis oder für 20 Minuten mit 100%igem Methanol fixiert.

Die Proben werden dreimal mit PBS gewaschen, um Reste der Fixierlösung vollständig zu entfernen.

Permeabilisiert werden die EBs durch eine Inkubation von 15 Minuten in 0,01%igem PBST. Triton X-100 ist verantwortlich für die Permeabilisierung der Zellmembran und ermöglicht es den Antikörpern, in die Zelle zu den Zielproteinen zu gelangen.

Um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper abzublocken und eine Anlagerung des primären Antikörpers an solche zu verhindern, werden die Zellen anschließend in einer 10%igen Blocklösung (10%iges Magermilchpulver in 0,01%igem PBST oder 10%iges FCS in 0,01%igem PBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Färbung der ES-Zellen mit primären Antikörpern werden diese in festgelegten Konzentrationen (siehe Abschnitt 2.7.1) in 10%igem Milchpulver in 0,01%igem PBST oder 10%igem FCS in 0,01%igem PBST für 90 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei Kühlschranktemperatur inkubiert.

Anschließend werden die Zellen fünfmal mit 0,1% PBST gewaschen.

Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgt für 60 Minuten bei Raumtemperatur und einer Konzentration von 1:100. Für die Färbung der ES-Zellen werden die sekundären Antikörper in 10%igem Milchpulver in 0,01%igem PBST oder in 10%igem FCS in 0,01%igem PBST inkubiert.

Bei diesem Vorgang werden die Zellen vor direkter Lichteinstrahlung geschützt, damit die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers nicht verloren geht.

Der letzte Schritt der immunzytochemischen Färbung ist ein fünfmaliges Waschen der ES-Zellen mit 0,1%igem PBST, um den ungebundenen sekundären Antikörper vollständig zu entfernen.

Die Zellen werden mit einem PBS-Glyzerol-Gemisch (Verhältnis 1:1) bedeckt. Von den Zellen werden Bilder unter dem cLSM aufgenommen und mit speziellen Analyseprogrammen

ausgewertet. Jedes unter dem cLSMs aufgenommene Bild eines EBs setzt sich aus sechs optischen Schnitten des Zellgewebes von jeweils circa 10 µm Dicke zusammen. Die einzelnen Schichten werden anschließend übereinander gelegt und somit die Gesamtfluoreszenz eines EBs vom Computerprogramm analysiert. Die einzelnen Ergebnisse werden anschließend untereinander in Relation gesetzt.

2.7 RT-PCR

2.7.1 Durchführung der RT-PCR

Die RT-PCR ist eine molekularbiologische Technik zur Detektion von m-RNA-Transkriptionsfragmenten.

Das Prinzip beruht hierbei auf der Gewinnung von extrahierter und gereinigter Gesamt-RNA (totaler RNA) aus lysierten Zellproben. Die RNA wird anschließend revers transkribiert ($3' \rightarrow 5'$), wodurch cDNA Stränge entstehen.

An spezifischen, durch die Basensequenz festgelegten Stellen auf der cDNA binden Oligonukleotid-Primer. Diese Primer entsprechen einem komplementären DNA-Strangabschnitt von ca. 20 bis 30 entsprechenden Basen.

Das Enzym DNA-Polymerase liest die cDNA in $3' \rightarrow 5'$ -Richtung ab und polymerisiert einen neuen cDNA-Strang in $5' \rightarrow 3'$ -Richtung. Dieser neue Strang dient dann als Matrize, sodass es letztendlich zu einer exponentiellen Zunahme des cDNA-Gehaltes kommt. Zur Herstellung der cDNA werden 2 µg der isolierten RNA in ein Gesamtvolumen von 20 µl mit MMLV RT überführt. Die Konzentration der eingesetzten Primer ist jeweils 10 pmol/20 µl entspricht 0,5 µM/L.

Die Amplifikation der cDNA wird im Icyler Optical Module[®] der Firma Biorad durchgeführt. Zur Versuchsdurchführung wird der absolute Sybr Green Fluorescein Mix verwendet.

Folgendes Programm wird zur Durchführung der RT-PCR benutzt:

+ 93°C für 15:00 Minuten zur Denaturierung (dem so genannten „hot start step“)

+ 93°C für 30 s, für 30 s Glühtemperatur (Annealingtemperatur) des Zielgenes, + 72°C für 30 s, dieser Vorgang wird 45-mal durchgeführt

+ 50°C für 10:00 Minuten

Unter Annealing versteht man die Anlagerung des Primers an das DNA-Templete. Nach dem Aufschmelzen der gesamten DNA wird das Reaktionsgemisch auf eine genau definierte Temperatur abgekühlt. Bei dieser so genannten Annealingtemperatur kommt es zur spezifischen Bindung des Primers an sein Templete, allerdings auch zur Renaturierung des ursprünglichen Doppelstranges und zur unspezifischen Anlagerung. Diese Renaturierung wird durch einen hohen Primerüberschuß verhindert. Erst nach Bindung der Primer renaturiert der Rest des Templates. Der Primer wird dadurch nicht verdrängt. Die unspezifische Anlagerung wird dadurch vermieden, dass die Annealingtemperatur knapp (ca. + 2°C) unterhalb der Schmelztemperatur liegt.

Unterschiedliche Annealingtemperaturen in der vorliegenden Studie sind

+ 60°C für HIF-1 α , *Nox 1*, GATA 4 und BACT

+ 62°C für VEGF und MEF-2c

+ 64°C für *Nox 4* und GAPDH

Der Fluoreszenzanstieg des SYBR Green wird automatisch nach jedem Extensionsschritt gemessen. Die amplifizierten Transkripte werden auf ein 2%iges Agarosegel aufgebracht und auf ihre Reinheit untersucht.

Die Ergebnisse werden über die gängige $\Delta\Delta C_T$ -Methode ermittelt. Hierbei vergleicht man die C_T -Werte des untersuchten Genes mit den C_T -Werten eines konstant exprimierten Housekeeping Genes.

2.8 Durchführung der RNA-Isolation

Bei allen beschriebenen Arbeitsschritten wird darauf geachtet, eine RNase-Kontamination zu vermeiden. Geeignete Schutzmaßnahmen sind dabei das Tragen von neuen, puderfreien

Handschuhen, das Arbeiten mit sterilen Pipettenspitzen und die Verwendung gesonderter RNA-Pipetten.

Für die RNA-Isolation wird das zu untersuchende Zellmaterial mit PBS vorsichtig von der elastischen Membran gelöst und anschließend mit eiskaltem Trizol (Zelllyse) behandelt. Nach dem Auflösen der Zellen wird der Trizollösung eiskaltes Chloroform beigefügt. Die Zellen werden mit dem Trizol und Chloroform gut durchmischt, bis das Probengemisch homogen weißlich trüb erscheint. Die einzelnen Proben werden für fünf Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend folgt für die Dauer von 20 Minuten eine Zentrifugation bei + 4°C und 10000×g. Nach dem Zentrifugieren entstehen drei Phasen. In der Unterphase am Boden der Eppendorfröhrchen (Chloroformphase) setzen sich die Proteine und Lipide ab. Die Interphase enthält leichte Proteine und DNA, in der Oberphase befindet sich die gelöste RNA.

Von diesen entstandenen drei Phasen, wird die oberste flüssige Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfröhrchen überführt. Dieser Oberphase wird erneut Chloroform zugefügt und das Gemisch unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert.

Folge dieser Zentrifugation ist eine weitere Phasenbildung. Die wässrige Oberphase kann abpipettiert und zu eiskaltem Isopropanol (Fällung der RNA) gegeben werden. Durch eine längere Einwirkzeit des Isopropanols wird der Fällungseffekt verstärkt. Nach einer Wartezeit von mindestens 20 Minuten bei einer Lagerung der Probe bei – 20°C wird diese bei den oben erwähnten Konditionen erneut zentrifugiert. Als feste Phase wird ein Pellet abgetrennt.

Nach Abnahme des flüssigen Überstandes besteht der letzte Schritt in der Waschung des RNA-Pellets. Hierzu werden 70%iges Ethanol auf die feste Phase gegeben und abschließend bei + 4°C bei 45000×g über fünf Minuten zentrifugiert. Nach der Abnahme des Ethanols wird das Pellet getrocknet (Verflüchtigung des Alkohols) und in eiskaltem nukleasefreiem Wasser resuspendiert.

In diesem Präparationsstadium kann die isolierte RNA eingefroren und bei – 20°C über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

Die Reinheit und Sauberkeit der isolierten RNA wird vor dem Einsatz im Icyler überprüft. Hierzu werden die Proben über eine Gelelektrophorese in einem 1%igem Agarosegel separiert. Hierbei werden 10 µl PCR-Produkt/Bahn wurden auf ein Agarosegel, welches 0,5

$\mu\text{g/ml}$ Ethidium Bromid enthält, aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in TBE Puffer bei 80 V für 1 Stunde. Die Gele werden unter UV-Licht mit einer Computerkamera fotografiert und auf Diskette gespeichert.

2.8.1 DNase Behandlung der isolierten RNA

Vor der Durchführung einer RT-PCR wird eine DNase-Behandlung vorgenommen, um eine Amplifikation von noch in der Probe vorhandenen genomischen Sequenzen zu verhindern.

Die isolierte RNA wird mit einem Mastermix für eine Stunde bei + 37°C inkubiert. Das Endvolumen von 50 μl wird mit nukleasefreiem Wasser auf 200 μl aufgefüllt.

Nach der Zugabe von 200 μl Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1 wird die Mischung für 10 Minuten bei + 4°C und 12500 \times g zentrifugiert. Die entstandene Oberphase kann abgenommen und nochmals mit 200 μl Chloroform unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert werden. Erneut trennt sich das Flüssigkeitsgemisch auf und die obere flüssige Phase wird abgezogen. Mit 20 μl NaOAc und 500 μl reinem Ethanol kann die RNA in einem neuen Eppendorfröhrchen gefällt werden. Die Proben werden bei obigen Bedingungen in der Zentrifuge behandelt.

Das entstandene Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen und 15 Minuten bei + 4°C und 12500 \times g zentrifugiert. Das Pellet trocknet bei Raumtemperatur und wird anschließend in nukleasefreiem Wasser resuspendiert.

Die RNA-Konzentration der Proben wird umgehend im Fotometer analysiert. Die totale RNA-Konzentration wird über die OD_{260nm} Methode bestimmt. Hierzu werden 1 μl isolierte RNA auf 99 μl RNasefreies Wasser gegeben und im Photometer die Extinktion gemessen. Dabei dienen 100 μl RNasefreies Wasser zur Eichung des Photometers. Eine optische Dichte von 1 entspricht 40 μg RNA pro ml und somit kann unter Berücksichtigung der Verdünnung die Konzentration der RNA bestimmt werden. Abweichungen zeigen Verunreinigung durch Proteine oder Phenole an. Als Maß der Reinheit der RNA wurde die OD-Ratio bestimmt. Diese sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Große Abweichungen weisen auf Verunreinigungen der RNA hin.

2.8.2 komplementäre DNA (cDNA) Synthese der isolierten RNA

cDNA ist die Kurzform für „complementary“ DNA, auf deutsch komplementäre DNA.

Sie wird genutzt, um Intron-frei mit dem Gen oder Genbestandteilen arbeiten zu können. cDNA ist beim Handling und bei der Lagerung unempfindlicher und stabiler als reine RNA. Einmal gewonnen kann sie über einen längeren Zeitraum bei – 20°C gelagert werden. Um cDNA zu gewinnen, werden 2 µg RNA in ein Gesamtvolumen von 20 µl einer aus dem murinen Leukämievirus isolierten Reversen Transkriptase (MMLV-RT) überführt. Die reverse Transkriptase nutzt die RNA als Vorlage zur Erstellung der cDNA. Die RNA wird mit der Transkriptase für eine Stunde bei + 37°C inkubiert und anschließend fünf Minuten lang auf + 94°C erhitzt. Die hohe Temperatur dient der Denaturierung der Transkriptase. Die entstandene cDNA kann im Icycler weiterverwendet werden.

2.8.2.1 Verwendete Primer der RT-PCR

Die Informationen der Primersequenzen dieser Studie wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Wartenberg des GKSS in Berlin/Teltow zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2-4 Zielgene

GATA 4	fwd	5`-TCA AAC CAG AAA ACG GAA GC-3`
	rev	5`-GTG GCA TTG CTG GAG TTA AAC-3`
HIF-1α	fwd	5`-TCA CCA GAC GAG GCA GGA AA-3`
	rev	5`-CTT GAA AAA GGG AGC CAT CA-3`
MEF-2c	fwd	5`-TCA TCT CTG TCT GGC TTC AAC-3`
	rev	5`-GGT GGT GGT ACG GTC TCC-3`
Nox 1	fwd	5`-AAT GCC CAG GAT CGA GGT-3`
	rev	5`-GAT GGA AGC AAA GGG AGT GA-3`

Nox 4	fwd	5`-GAT CAC AGA AGG TCC CTA GCA G-3`
	rev	5`-GTT GAG GGC ATT CAC CAA GT-3`
VEGF	fwd	5`-TCC ACC ATG CCA AGT GGT-3`
	rev	5`-TCG GGG TAC TCC TGG AAG AT-3`

Tabelle 2-5 Housekeeping Gene

BACT	fwd	5`-GAT GAC CCA GAT CAT GTT TGA G-3`
	rev	5`-CCA TCA CAA TGC CTG TGG TA-3`
GAPDH	fwd	5`-TCG TCC GGT AGA CAA AAT GG-3`
	rev	5`-GAG GTC AAT GAA GGG GTC GT-3`

2.9 Inhibitoren und Radikalfänger

2.9.1.1 Inhibitoren

Ein Inhibitor ist laut Definition eine chemische Komponente, welche die Fähigkeit besitzt eine enzymatische Reaktion zu blockieren oder langsamer ablaufen zu lassen.

2.9.1.1.1 SB203580 – Inhibitor der p38 Mitogen-aktivierten Kinase

Der Inhibitor SB203580 ist ein überaus selektiver und zellpermeabler Inhibitor der p38 Kinase. Bei der Substanz handelt es sich um ein Pyridinyl-Imidazol (Wang et al, 1998). Dieses bindet an der für ATP vorgesehenen Tasche von p38 (Tong et al, 1997), und dort scheint der Threoninrest an Position 106 ganz entscheidend für die Spezifität dieser Substanzklasse für p38 α und p38 β zu sein (Gum et al, 1998; Eysers et al, 1998).

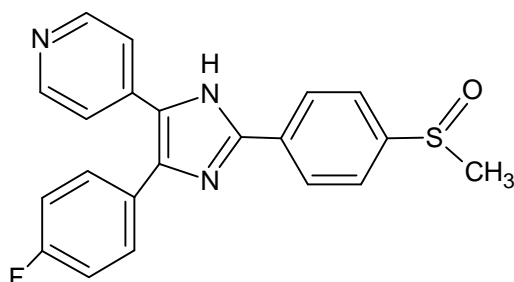


Abbildung 2-5 Strukturformel von SB203580

2.9.1.1.2 SP600125 – Inhibitor der t-Jun-NH2 terminale Kinase

Bei SP600125 handelt es sich um einen reversiblen ATP-kompetitiven Inhibitor. Intrazellulär inhibiert SP600125 die Phosphorylierung der c-Jun, die Expression der Inflammationsgene COX-2, IL-2, IFN- γ und TNF- α , sowie die Differenzierung und Aktivierung von humanen CD4 Primärkulturen (Brydon et al, 2001).

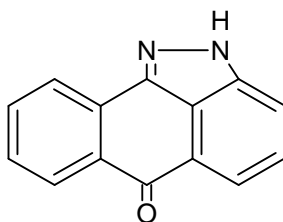


Abbildung 2-6 Strukturformel von SP600125

2.9.1.1.3 UO126 – Inhibitor der extrazellulär Signal-regulierten Kinase

UO126 wurde ursprünglich als eine Substanz identifiziert, die den Transkriptionsfaktor AP-1 antagonisiert. Analytisch stellte sich heraus, dass diese niedermolekulare Verbindung jedoch nicht direkt eine AP-1 Bindung an die DNA verhindert. Durch den Einsatz von UO126 kommt es vielmehr zu einer Inhibition von MEK 1/2. Die Folge ist eine Inhibition der ERK-Kaskade und eine dementsprechende reduzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors.

UO126 ist ein nachweislich hochselektiver Inhibitor der MEK1 und MEK2 (Cho et al, 2004). Dieser besitzt die Möglichkeit, die Aktivierung der dualspezifischen Kinasen durch Raf-1 und somit eine Phosphorylierung der Substrate sowie der nachfolgenden intrazellulären Signalkaskade zu verhindern (Davies et al, 2000).

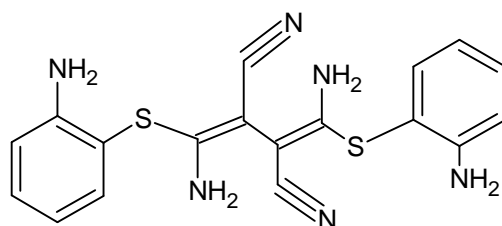


Abbildung 2-7 Strukturformel von UO126

Tabelle 2-6 Zusammenfassung und Konzentrationen Inhibitoren

Inhibitor	Angriffsort	Konzentration	Lösungsmittel	Inkubationszeit
SP203580	p38 Kinase	10 μ M	DMSO	zwei Stunden vor Induzierung bis Fixierung
SP600125	JNK Kinase	1 μ M	DMSO	zwei Stunden vor Induzierung bis Fixierung
UO126	MEK1/2	10 μ M	DMSO	zwei Stunden vor Induzierung bis Fixierung

2.9.1.2 Radikalfänger

2.9.1.2.1 Trolox

Trolox ist ein wasserlösliches, zellpermeables Vitamin E-Derivat. Es wirkt als Antioxidans und schützt die Zellen vor den schädlichen Auswirkungen der ROI (Wu et al, 1990; Raspor et al, 2005). Die Strukturformel des Vitamin E beinhaltet ein aromatisches Ringsystem mit der Funktion eines Antioxidans. Die aliphatische Strukturkomponente dient der Verankerung des Vitamins in der Phospholipid- und Lipoproteinmembran der Zelle, sowie der intrazellulären Fetttropfen.

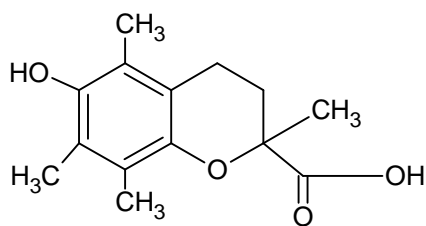


Abbildung 2-8 Strukturformel von Trolox

2.9.1.2.2 N- (2-Mercaptopropionyl)glycin

Mercaptopropionylglycin gehört, neben Zystein und Methionin, zu den schwefelhaltigen Präparaten. Schwefel ist ein essenzielles Element, genutzt zum Einbau in Aminosäuren, Proteinen und andere Biomoleküle (Atmaca, 2004).

Schwefelhaltige Substanzen haben antioxidative Wirkungen und können intrazelluläre ROI abfangen.

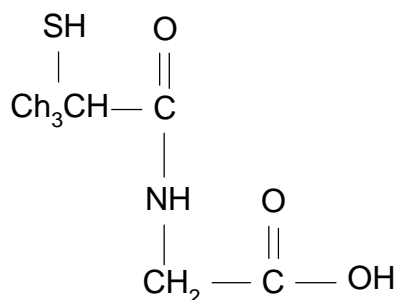


Abbildung 2-9 Strukturformel von N- (2-Mercaptopropionyl)glycin

Tabelle 2-7 Zusammenfassung der Radikalfänger

Radikalfänger	Konzentration	Lösungsmittel	Inkubationszeit
Trolox	100 µM	DMSO	2/24h*
Mercaptopropionylglycin	100 µM	DMSO	2/24h*

*bei der Untersuchung auf Gefäßstrukturen und Kardiomyozyten werden die Zellen zwei Stunden vor Induzierung bis Fixierung unter gleichen Konzentrationen der Radikalfänger im Medium inkubiert.

2.10 Nachweis reaktiver Sauerstoffintermediate mittels 2'-7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (H₂DCFDA)

2.10.1 Der Fluoreszenzfarbstoff H₂DCFDA

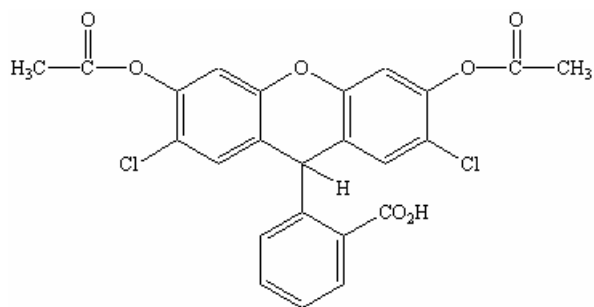
Zum Nachweis von ROI in EBs wird der Fluoreszenzfarbstoff 2'-7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (H₂DCFDA) verwendet. Die nicht fluoreszierende Substanz ist lipophil und leicht membranpermeabel. Durch passive Diffusion gelangt sie in die Zellen, wo intrazelluläre Esterasen sie in 2'-7'-Dichlorfluorescein (H₂DCF) spalten. In diesem Zustand fluoresziert der Farbstoff noch nicht, ist nun aber polar und nicht mehr fähig, die Zellmembran zu passieren.

Kommt die Substanz nun mit reaktiven Sauerstoffintermediaten in Kontakt, wird das H₂DCF sehr zügig zu der fluoreszierenden Form 2'-7'-Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert und kann nun als Indikator für die endogene, intrazelluläre Radikalproduktion angesehen werden (Rosenkranz, 1992).

DCF wird bei einer Wellenlänge von 488 nm im cLSM angeregt und sein Emissionsmaximum liegt bei 529 nm.

Die Substanz H₂DCFDA ist sehr lichtempfindlich, deshalb wird sie stets im Dunkeln gelagert und die Versuche in abgedunkelten Räumen durchgeführt.

H₂DCFDA wird für Versuchszwecke in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 20µM in serumfreiem Iscoves Medium eingesetzt.



2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat, lipophil, nicht-fluoreszierend



2',7'-Dichlorofluorescein, polar, nicht-fluoreszierend

durch ROI oxidiert zu

2'-7'-Dichlorofluorescein, polar, fluoreszierend

Abbildung 2-10 Reaktionsschema von H₂DCFDA (modifiziert nach Bass et al., 2003)

2.10.2 Versuchsdurchführung der ROI-Messung

Die Zellen werden am dritten Tag der Differenzierung auf die elastischen Membranen ausgesät und 24 Stunden später mechanischer Zugbelastung ausgesetzt. Bei zusätzlichem Einsatz von Radikalfängern werden die Zellen zwei Stunden vor Induzierung mit den Antioxidantien inkubiert.

Im Anschluss an die mechanische Dehnung wird das Nährmedium von den Zellen abgenommen und durch serumfreies Iscoves Medium mit H₂DCFDA in der oben genannten Konzentration ersetzt. Die Zellen werden für eine halbe Stunde mit dem Fluoreszenzfarbstoff H₂DCFDA bei + 37°C im Brutschrank inkubiert.

Das DCF in den ES-Zellen hat ein Anregungsmaximum von 504 nm und ein Emissionsmaximum von 529 nm. Der Farbstoff wird mit der 488 nm Linie eines Argonlasers zum Fluoreszieren angeregt. Es werden einzelne EBs (mindestens 20 pro Versuchsreihe) aufgesucht und Bilder der Zellen mit dem cLSM aufgenommen. Die Fluoreszenz der Zellen wird später im zugehörigen Analyseprogramm ausgewertet und untereinander in Relation gesetzt.

2.11 Statistik

Alle Versuche werden mindestens dreimal ($n = 3$) durchgeführt. Bei Schlüsselexperimenten wird die Anzahl der Versuche bis auf sechs ($n = 7$) erhöht, wobei n immer für die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente steht. In einem Experiment werden mindestens 20 unterschiedliche EBs ausgewertet.

Die präsentierten Daten berechnen sich als Mittelwert \pm Standardabweichung, bzw. \pm Standardfehler (bei Untersuchungen auf Fläche in μm^2). Bei unterschiedlicher Zahl der Einzeldaten werden die Mittelwerte entsprechend gewichtet und ein gewichtetes arithmetisches Mittel aller Versuche gebildet.

Die Gesamtstandardabweichung und der Gesamtstandardfehler werden aus der mittleren quadratischen Abweichung der Einzelversuche berechnet.

Die Signifikanzuntersuchung der Ergebnisse beim Vergleich von Kontrolle und Zellen unter mechanischer Zugbelastung erfolgt mittels ungepaarten t-Tests. Signifikante Unterschiede werden mit Sternchen über dem entsprechenden Balken gekennzeichnet. Statistiken, die mehrere Proben miteinander in Bezug setzen, werden mit einem einfaktoriellen Anovatest auf Signifikanz untersucht. Bei der Behandlung der Zellen mit den spezifischen Inhibitoren und Radikalfängern wird somit zusätzlich der Unterschied zur mechanisch gedehnten Probe untersucht und signifikant markiert.

Bei einem Wert von $p < 0,05$ werden die Ergebnisse als signifikant (*) interpretiert. Liegt die Wahrscheinlichkeit bei $p < 0,01$ werden die Daten als sehr signifikant (**), bzw. bei $p < 0,001$ als überaus signifikant (***) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Das physiologische Wachstums- und Differenzierungsverhalten von ES-Zellen während der Kardiovaskulogenese, ohne den Zusatz proliferationshemmender oder –fördernder Substanzen, ist in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe Sauer intensiv analysiert worden (Sachinidis et al, 2003).

Vaskularisation und Kardiomyogenese eines EBs stehen in sehr engen Zusammenhang. Erste Anzeichen der Entwicklung gefäßartiger Strukturen können ab dem fünften Tag der Differenzierung von ES-Zellen nachgewiesen werden. Die Analyse CD31 positiver Gefäßflächen kann nach einer immunzytochemischen Färbung unter dem cLSM durchgeführt werden.

Zu diesem Entwicklungszeitpunkt können spontane Gewebskontraktionen von ES-Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachten werden. Kontrahierende Areale sprechen für eine Differenzierung von ES-Zellen in Kardiomyozyten. Diese Annahme lässt sich durch eine Antikörperfärbung gegen α -Aktinin und anschließender Auswertung unter dem cLSM bestätigen.

In der vorliegenden Dissertation werden für alle durchgeführten Versuche mindestens 20 EBs am dritten Tag der Differenzierung aus der Spinnerflasche entnommen und auf die elastischen Membranen von Bioflexplatten[®] ausgesät. 24 Stunden später werden die nun adhären EBs durch das Ansetzen mechanischer Zugbelastung gedehnt. Die Auswertungen der EBs erfolgt abhängig von den zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren, Genen oder Strukturen zu unterschiedlichsten Entwicklungszeitpunkten der Zellen vorgenommen.

3.1 Einfluss mechanischer Zugbelastung auf die CD31-Expression

In diesem Versuch wird die Expression des Endothelzellmarkers CD31 im Rahmen der Gefäßdifferenzierung von ES-Zellen unter mechanischer Zugbelastung untersucht. Nach drei Tagen Differenzierung in den Spinnerflaschen werden die EBs auf die Silikonmembranen der Bioflexplatte[®] ausgesät und 24 Stunden später gedehnt. Innerhalb der Versuchsreihe werden die Silikonmembran der Bioflexplatten[®] um 5, 10, 15 oder 20% gedehnt. Ungedehnte EBs auf

Bioflexmembranen dienen als vergleichbare Kontrolle. Am Tag acht der Differenzierung erfolgt die immunzytochemische Analyse der EBs auf die CD31 positive Zellflächen (positive Zellflächen steht für die Ausdehnung von gefäßartigen Strukturen innerhalb eines EBs). Hierfür werden die Bilder der EBs unter dem cLSM aufgenommen und anschließend die PECAM-1 positiven Zellflächen mit einem speziellen Computeranalyseprogramm ausgewertet.

Abbildung 3-1 zeigt einen signifikanten Anstieg der PECAM-1 positiven Zellfläche von ES-Zellen nach mechanischer Zugbelastung. Die unbehandelte Kontrolle wird mit $100 \pm 13,3\%$ normiert. Die relative PECAM-1 positive Zellfläche nach Dehnung der flexiblen Membran um 5% liegt bei $158,7 \pm 16\%$. Wird die Dehnung auf 10% verstärkt steigt der Messwert signifikant auf $206,8 \pm 27,8\%$ an. Bei Zugbelastungen der Silikonmembran von 15% erreicht die PECAM-1 positive Zellfläche den Wert $150 \pm 20,5\%$ und bei einer Dehnung von 20% nähert sich das Ergebnis mit $105,4 \pm 14,7\%$ dem Ausgangswert der Kontrolle.

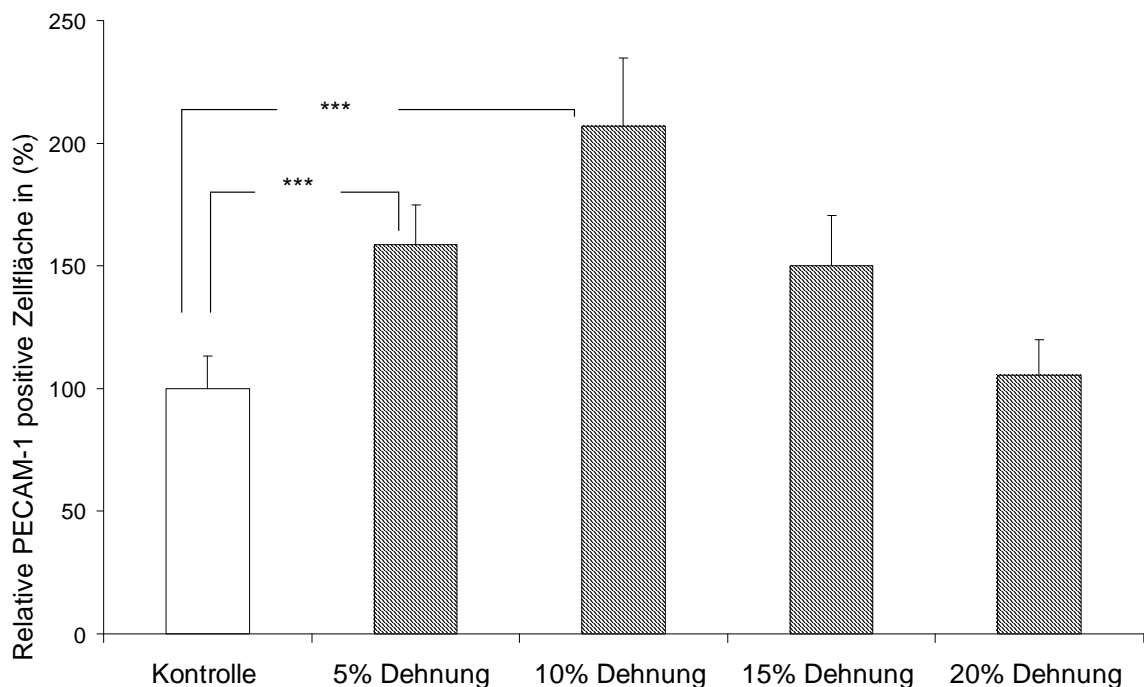
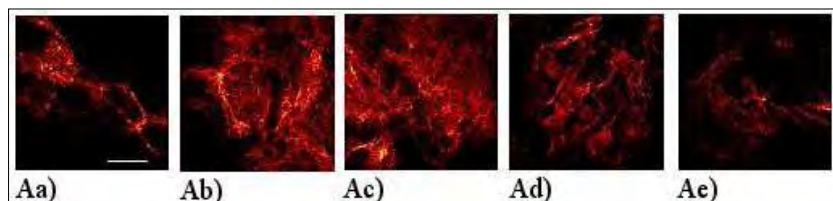


Abbildung 3-1 Einfluss von 2 Stunden mechanischer Zugbelastung auf die PECAM-1 positive Zellfläche

5%, 10%, 15% und 20% Dehnung der elastischen Membran führt zu einem prozentualen Anstieg der PECAM-1 positiven Zellfläche im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auswertung der Immunzytochemie ($n = 6$). Jedes unter dem cLSMs aufgenommene Bild eines EBs setzt sich aus sechs

optischen Schnitten des Zellgewebes von jeweils circa 10 μm Dicke zusammen. Die einzelnen Schichten werden anschließend übereinander gelegt und somit die Gesamtfluoreszenz der PECAM-1 positiven Fläche eines EBs durch ein Computerprogramm analysiert. *** $P \leq 0,001$, einfaktorierter Anovatest.

(A) Repräsentative Fluoreszenzbilder PECAM-1 positiver Zellflächen. Kontrolle (Aa), 5% Dehnung der Membran (Ab), 10% Dehnung der Membran (Ac), 15% Dehnung der Membran (Ad) und 20% Dehnung der Membran (Ae), (Balken = 50 μm).



3.2 Einfluss mechanischer Zugbelastung auf die Kardiomyozytendifferenzierung

Ziel der Untersuchung ist eine Analyse der Anzahl kontrahierender Areale in EBs unter mechanischer Zugbelastung. Hierzu wird die Anzahl der kontrahierenden Areale in der ungedehnten Kontrollprobe gleich 100% gesetzt. Die Anzahl der kontrahierenden Areale in den mechanisch gedehnten Proben werden prozentual auf die Kontrollprobe bezogen. Parallel erfolgt eine immunzytochemische Analyse der Größenausdehnung der zugehörigen Kardiomyozytenareale.

An Tag drei der Differenzierung werden die EBs aus der Spinnerflasche entnommen und auf die Silikonmembranen ausgesät. Die auf den elastischen Membranen aufsitzenden EBs werden 24 Stunden später um 5, 10, oder 20% für zwei Stunden einer mechanischen Zugbelastung ausgesetzt. Die Auswertung der kontrahierenden Areale sowie der Größenausdehnung der Kardiomyozytenareale erfolgt an Tag acht der Differenzierung. Als Vergleich wird eine unbehandelte Kontrolle hinzugezogen.

Die Zellen werden bis Tag acht der Differenzierung kultiviert und täglich unter dem Lichtmikroskop auf kontrahierende Areale untersucht. Ab Tag sieben können erste spontane Gewebekontraktionen, ein Hinweis auf das Vorhandensein von Kardiomyozyten, unter dem Lichtmikroskop vermerkt werden.

Die Anzahl und Kontraktionsfrequenz der Areale steigt während der Entwicklung der ES-Zellen kontinuierlich an.

Es werden die Anzahl der kontrahierenden Areale und die Anzahl der auf einer Platte vorhandenen EBs ausgezählt und der Prozentsatz der Kardiomyozytenareale pro Platte ermittelt und zueinander in Relation gesetzt. Die Größe dieser kontrahierenden Areale wird anschließend immunzytochemisch untersucht.

Wie die Abbildung 3-2 zeigt, wird die Anzahl kontrahierender Areale der Kontrolle mit 100% normiert. Im Vergleich zu den Kontrollwerten beträgt die Anzahl von Kardiomyozytenarealen bei 5% Dehnung der Membran $157,5 \pm 22,2\%$, bei 10% Dehnung $189 \pm 54,2\%$ und bei 20% Dehnung $221,4 \pm 67\%$. Gegenüber der Kontrolle kann bei einer 10 und 20%igen Dehnung der Membran von einer signifikanten Erhöhung der prozentualen Anzahl kontrahierender Areale gesprochen werden.

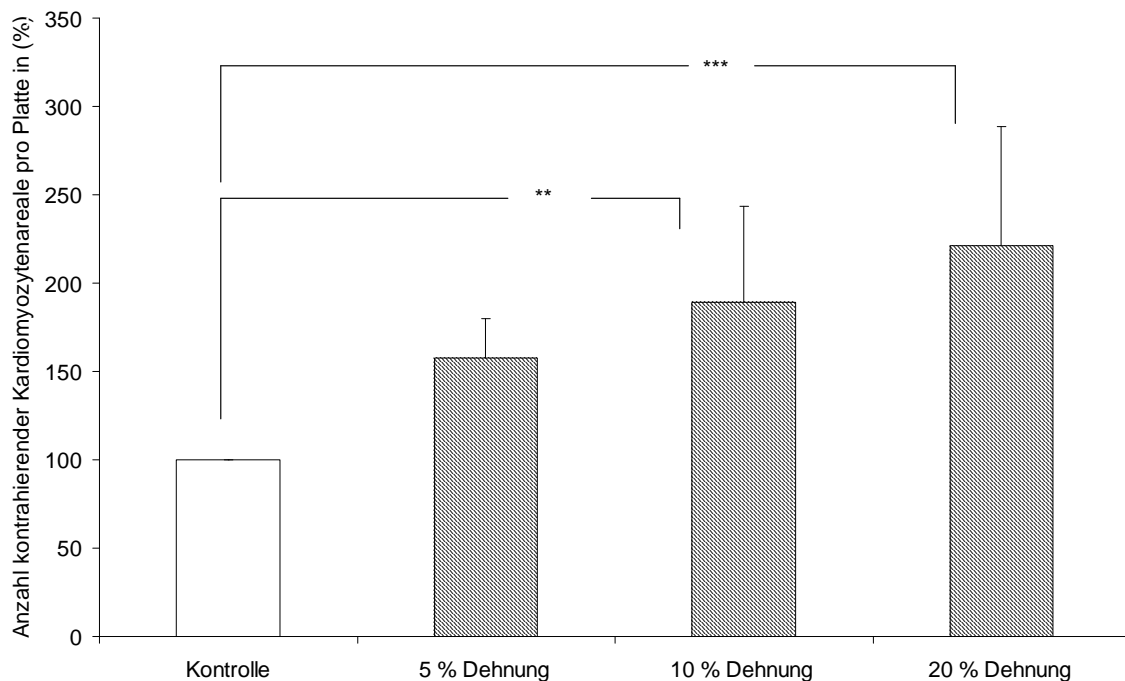


Abbildung 3-2 Einfluss von 2 Stunden mechanischer Zugbelastung (5%, 10% und 20% Dehnung der elastischen Membran) auf die Anzahl kontrahierender Areale

*5%, 10% und 20% Dehnung der elastischen Membran führt zu einem prozentualen Anstieg der Anzahl kontrahierender Areale in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Auszählung unter dem Lichtmikroskop (n = 7). ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, einfaktorierter Anovatest.*

Die Extension der Kardiomyozytenareale wird durch einen anti- α -Actinin Antikörper markiert, durch Bilder des cLSM festgehalten und mittels eines speziellen Computeranalyseprogrammes ausgewertet. Die Größe der Kardiomyozytenareale nimmt unter

Ergebnisse

mechanischer Zugbelastung kontinuierlich zu. In der Kontrollprobe sind die Kardiomyozytenareale meist klein und weisen häufig eine geringere Kontraktilität auf. Unter mechanischer Zugbelastung vergrößern sich die kontrahierenden Kardiomyozytenareale eines EBs, auch steigt häufig die Kontraktionsfrequenz.

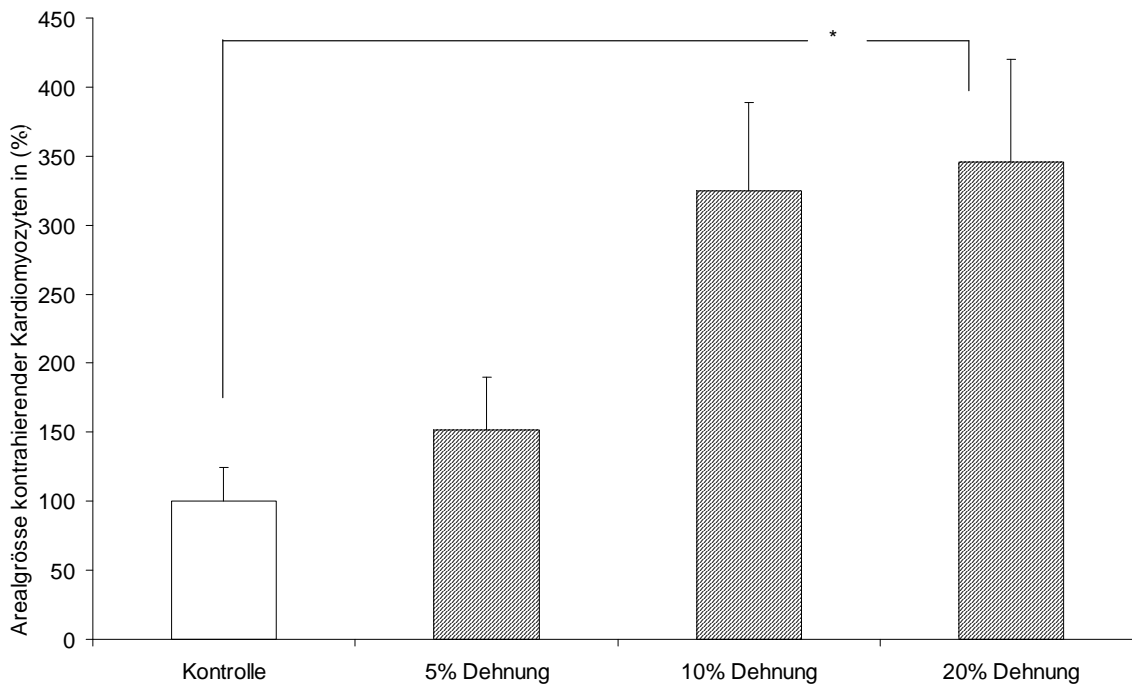


Abbildung 3-3 Einfluss von 2 Stunden mechanischer Zugbelastung (5%, 10% und 20% Dehnung der elastischen Membran) auf die Ausdehnung der Kardiomyozytenareale

5%, 10% und 20% Dehnung der elastischen Membran führt zu einer prozentualen Vergrößerung der Kardiomyozytenareale im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auswertung der Immunzytochemie ($n = 4$). Jedes unter dem cLSMs aufgenommene Bild eines EBs setzt sich aus sechs optischen Schnitten des Zellgewebes von jeweils circa $10 \mu\text{m}$ Dicke zusammen. Die einzelnen Schichten werden anschließend übereinander gelegt und die Ausdehnung der Kardiomyozytenareale in einem EB durch ein Computerprogramm analysiert. $*P \leq 0,05$, einfaktorier Anovatest. (A) Repräsentative Fluoreszenzbilder der Kardiomyozytenareale. Kontrolle (Aa), 5% Dehnung (Ab), 10% Dehnung (Ac) und 20% Dehnung (Ad), (Balken = $100 \mu\text{m}$). Die weiße Markierungslinie kennzeichnet ein einzelnes Kardiomyozytenareal.

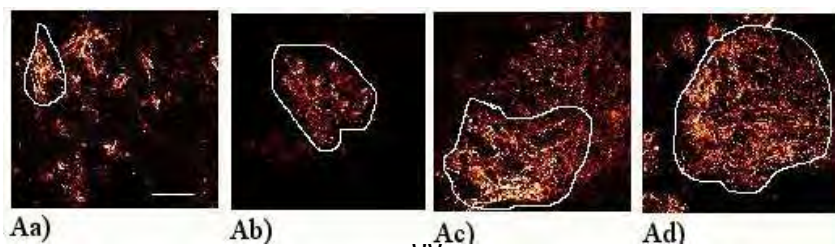


Abb. 3-3 zeigt die signifikante Vergrößerung der Kardiomyozytenareale nach mechanischer Zugbelastung. Die unbehandelte Kontrollprobe ist mit $100 \pm 24,3\%$ normiert. Die Größe der Kardiomyozytenareale beträgt bei 5% Dehnung der Membran $151,5 \pm 38,7\%$, bei 10% Dehnung der Membran $325 \pm 63,8\%$ und bei 20% Dehnung der Membran $345,4 \pm 74,4\%$. Im Vergleich zur Kontrolle lässt sich bei einer Dehnung der elastischen Membran von 10% und 20% eine signifikante Vergrößerung der Kardiomyozytenareale vermerken.

3.3 Redoxabhängige Regulation von HIF-1 α nach mechanischer Zugbelastung in ES-Zellen

In diesem Experiment wird die Rolle von HIF-1 α als Regulator der Gefäßmorphologie und Angiogenese unter mechanischer Zugbelastung untersucht.

An Tag drei der Differenzierung werden die EBs aus der Spinnerflasche entnommen und auf die Silikonmembranen ausgesät. Die elastischen Membranen mit den aufsitzenden EBs werden 24 Stunden später um 10% gedehnt. Weitere 24 Stunden nach der mechanischer Dehnung werden die EBs, je nach Versuchsansatz, mit 4%igem PFA für die immunzytochemische Färbung fixiert oder für die RNA-Isolierung mit Trizol behandelt. Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe Sauer zeigen eine maximale Aktivität von HIF-1 α in EBs während des dritten bis fünften Tages der Differenzierung (Sauer et al, 2001 und 2005). Aufgrund dieser Erkenntnisse kommt es zu einer Analyse des HIF-1 α 24 Stunden nach der mechanischen Dehnung.

Um eine Aussage über den Einfluss der ROI auf die HIF-1 α -Regulation treffen zu können, wird ein Teil der Proben 2 Stunden vor Beginn der mechanischen Zugbelastung (Dehnung um 10%) mit Radikalfängern inkubiert. Die Antioxidantien bleiben bis Kultivierungsende dem Nährmedium beigesetzt. Als Radikalfänger werden Trolox, ein Vitamin E-Derivat, und N- (2-Mercaptopropionyl)glycin, jeweils in der Konzentration von 100 μ M eingesetzt.

Die Abb. 3-4 zeigt die Regulation der HIF-1 α Expression nach mechanischer Zugbelastung. Die Steigerung der HIF-1 α Expression nach mechanischer Zugbelastung kann durch Trolox inhibiert werden. Die Kontrolle wird mit $100 \pm 17,6\%$ normiert. Unter mechanischer Zugbelastung steigt der Messwert der ES-Zellen signifikant auf $161,7 \pm 20,1\%$ an. Die

gedehnte Probe unter Troloxinkubation erreicht nur eine HIF-1 α Expression von $107,2 \pm 22,1\%$ erreicht. Die Immunofluoreszenz unter Radikalfängerinkubation ist, im Vergleich zur Transkriptionsregulation unter reiner mechanischer Induzierung, signifikant erniedrigt.

Die Kontrollzellen unter Troloxinkubation sind mit $78,2 \pm 14,6\%$ nicht signifikant verschieden zur unbehandelten Kontrolle.

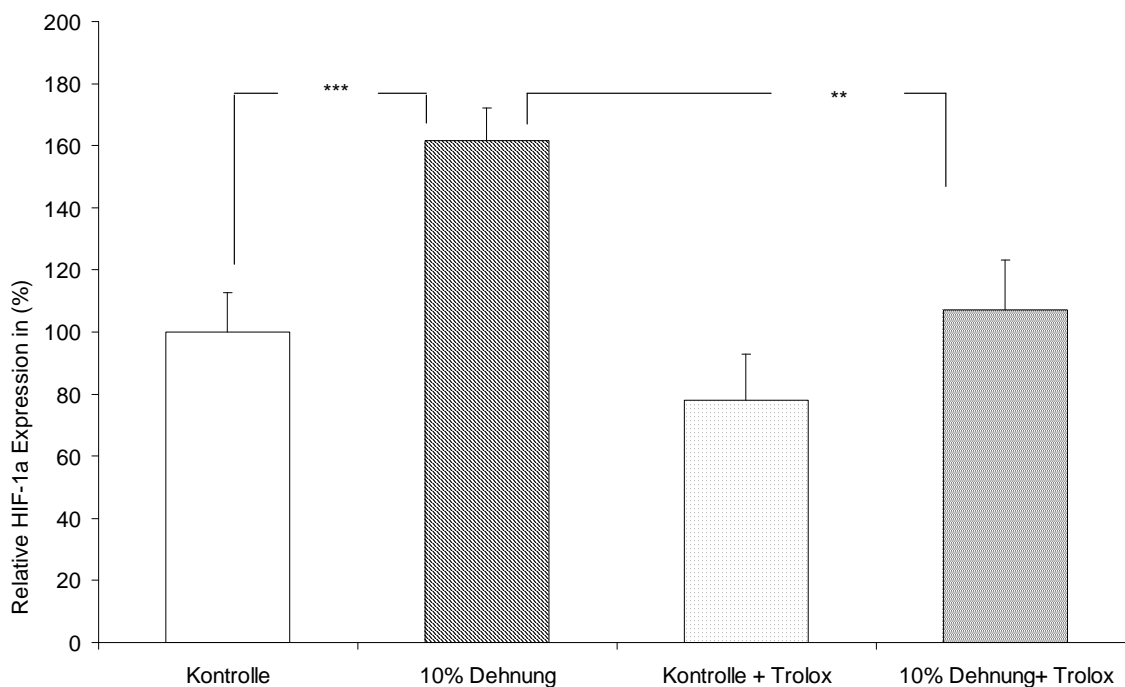


Abbildung 3-4 Einfluss von 2 Stunden mechanischer Zugbelastung auf die HIF-1 α -Expression und die Auswirkung von ROI auf den Transkriptionsfaktor.

*Mechanische Zugbelastung führt zu einem signifikanten Anstieg der HIF-1 α -Expression. Dieser Anstieg wird unter der Inkubation mit Trolox 100 μ M signifikant inhibiert. Auswertung der Immunzytochemie (n = 5). *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$, einfaktorierter Anovatest.*

Die Abb. 3-5 A) zeigt eine RT-PCR Analyse der HIF-1 α -Regulation unter mechanischer Zugbelastung und die Wirkung des Radikalfängers Trolox (100 μ M). Die Kontrolle wird mit $100 \pm 12,6\%$ normiert. Mechanische Zugbelastung führt zu einem signifikanten Anstieg der HIF-1 α -Expression auf $202 \pm 9,8\%$. Der Stimulationseffekt von HIF-1 α durch mechanische Zugbelastung kann durch Anwesenheit von Trolox im Nährmedium auf $96,7 \pm 11,6\%$ signifikant abgefangen werden. Die Troloxinkubation der Kontrolle liegt bei $95,7 \pm 9,7\%$.

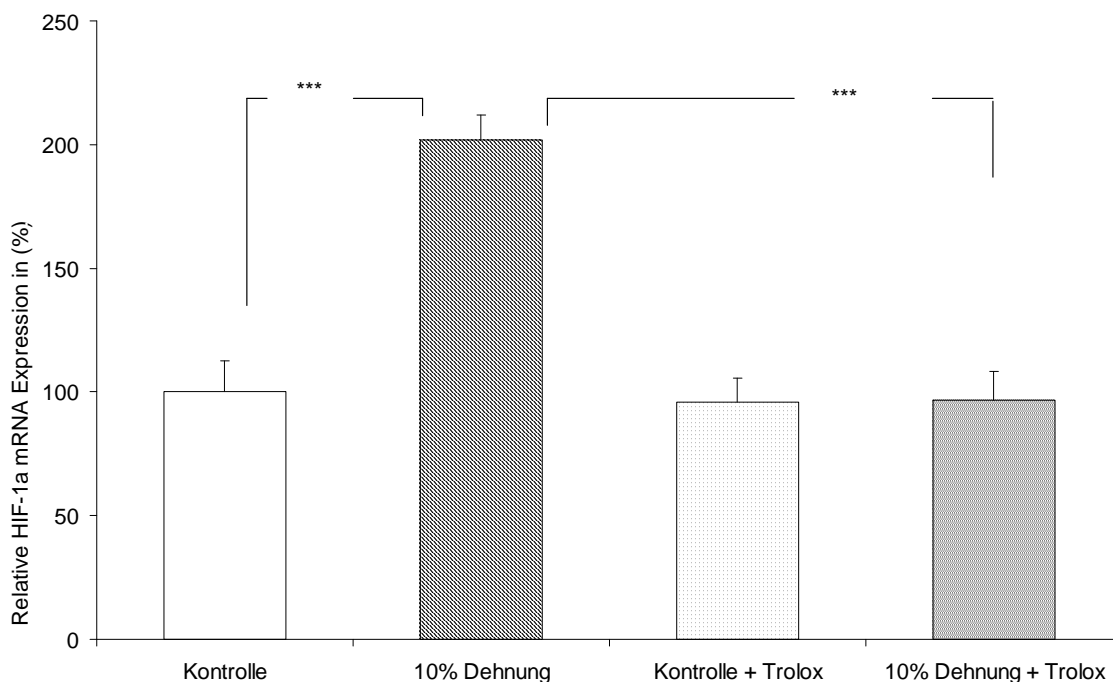


Abbildung 3-5 A) HIF-1 α mRNA-Expression nach mechanischer Zugbelastung unter dem Einfluss des Radikalfängers Trolox (100 μ M)

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es auf mRNA-Ebene zu einem signifikanten Anstieg der HIF-1 α Expression. Unter dem Einfluss von Trolox kann der Anstieg des Transkriptionsfaktors signifikant abgefangen werden ($n = 5$). *** $P \leq 0,001$, einfaktorierter Anovatest.*

Die Abb. 3-5 B) zeigt den gleichen Versuchsansatz mit dem Radikalfänger NMPG (100 μ M). Die HIF-1 α -Expression steigt unter mechanischer Zugbelastung signifikant auf $202 \pm 9,8\%$ im Vergleich zur normierten Kontrolle $100 \pm 12,6\%$ an. Unter Inkubation mit NMPG wird der Effekt der mechanischen HIF-1 α -Induzierung mit $126,3 \pm 9,4\%$ signifikant zur gedehnten Probe ohne Radikalfängerinkubation abgefangen. Die Kontrolle mit NMPG im Inkubationsmedium ist mit $87,1 \pm 5,8\%$ nicht signifikant verändert zur unbehandelten Kontrolle.

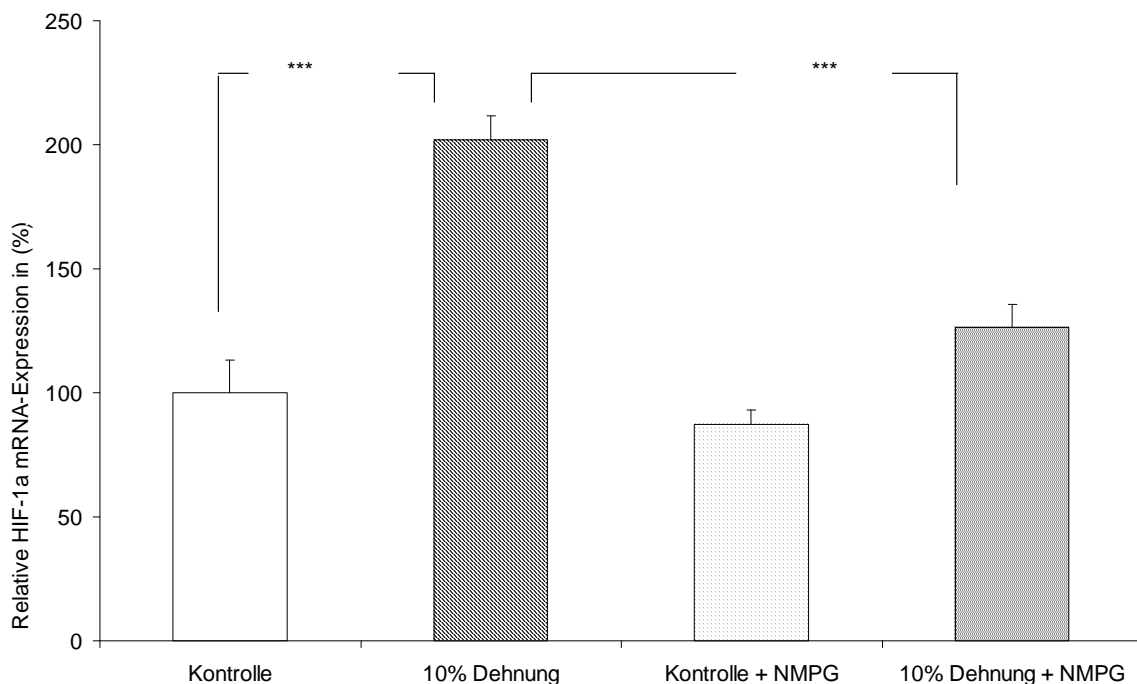


Abbildung 3-5 B) HIF-1 α mRNA-Expression nach mechanischer Zugbelastung unter dem Einfluss des Radikalfängers NMPG (100 μ M)

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es auf mRNA-Ebene zu einem signifikanten Anstieg der HIF-1 α Expression. Unter dem Einfluss von NMPG kann der Anstieg des Transkriptionsfaktors signifikant inhibiert werden (n = 5). *** $\leq P$ 0,001, einfaktorierter Anovatest.*

Mechanische Zugbelastung von ES-Zellen führt auf Protein- sowie mRNA- Ebene zu einem signifikanten Anstieg der HIF-1 α Expression. Durch den kontinuierlichen Einsatz der Radikalfänger Trolox und NMPG kann dieser Expressionsanstieg des Transkriptionsfaktors signifikant inhibiert werden.

3.4 Redoxabhängige Regulation der VEGF Expression nach mechanischer Zugbelastung

Dem Wachstumsfaktor VEGF wird im Rahmen der Vaskulogenese eine bedeutende Rolle in der Aktivierung von Endothelzellen, Perizyten und der glatten Muskulatur zugeschrieben.

Der Effekt der ROIs auf die VEGF-Expression wird durch Inkubation von EBs mit Radikalfängern im Kultivierungsmedium untersucht. Die Substanzen Trolox und NMPG werden dem Nährmedium in der Konzentration 100 μ M 2 Stunden vor Beginn der

mechanischen Zugbelastung zugegeben. An Tag drei der Differenzierung werden die EBs aus der Spinnerflasche entnommen und auf die Silikonmembranen ausgesät. Die elastischen Membranen mit den aufsitzenden EBs werden 24 Stunden später um 10% gedehnt. Weitere 24 Stunden nach der mechanischer Dehnung werden die EBs, je nach Versuchsansatz, mit 4%igem PFA für die immunzytochemische Färbung fixiert oder für die RNA-Isolierung mit Trizol behandelt.

Abb. 3-6 A) zeigt eine semiquantitative Darstellung der Proteinexpression (Immunzytochemie) von VEGF nach mechanischer Zugbelastung. Nach mechanischer Zugbelastung steigt die VEGF-Expression signifikant auf $156,2 \pm 29,7\%$ in Bezug auf die normierte Kontrolle von $100 \pm 14,7\%$ an. Dieser Anstieg der Expression des Wachstumsfaktor kann durch eine Zugabe von Trolox ($100 \mu\text{M}$) in das Kultivierungsmedium signifikant $101,4 \pm 17,4\%$ inhibiert werden. Die Kontrollprobe unter Troloxinkubation ist mit $80 \pm 12\%$ nicht signifikant verschieden zu der unbehandelten Kontrollprobe.

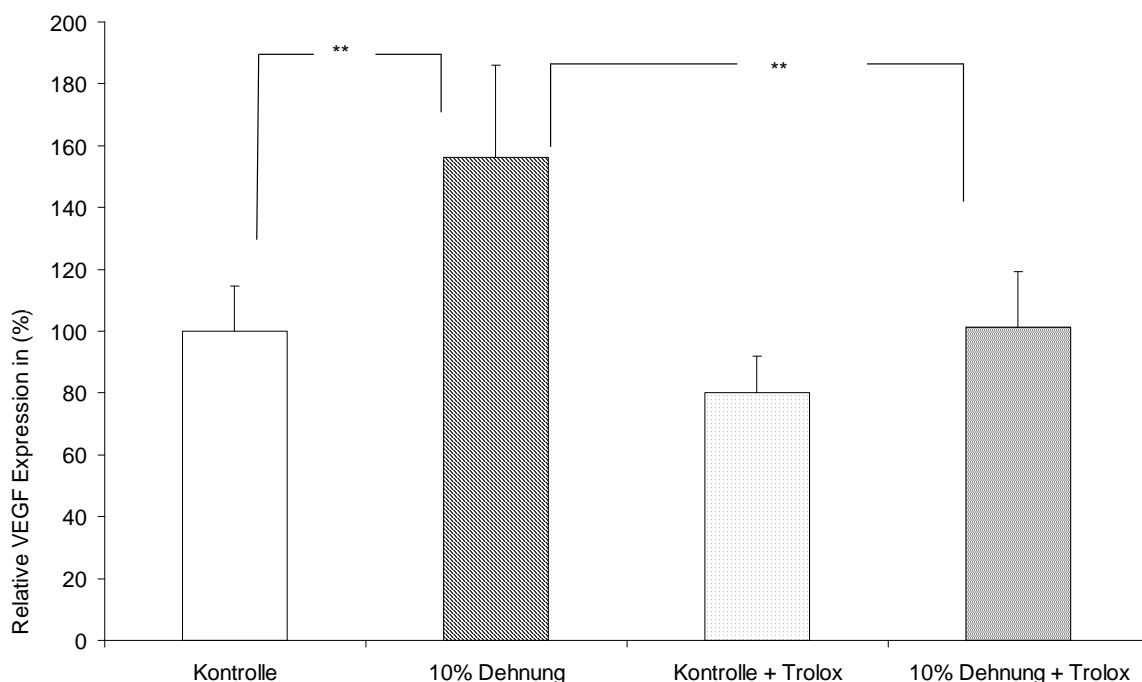


Abbildung 3-6 A) VEGF-Expression nach mechanischer Zugbelastung und der Einfluss von Trolox ($100 \mu\text{M}$)

*Unter mechanischer Zugbelastung steigt die VEGF- Expression signifikant an. Dieser Anstieg kann durch eine Inkubation mit dem Radikalfänger Trolox signifikant inhibiert werden. Auswertung der Immunzytochemie (n = 5). ** $P \leq 0,01$, einfaktorierter Anovatest.*

Abb. 3-6 B) zeigt den gleichen Versuchsansatz mit dem Einsatz des Radikalfängers NMPG (100 μ M). Die normierte Kontrolle liegt bei $100 \pm 12\%$. Der signifikante Anstieg der VEGF-Expression auf $141 \pm 17\%$ wird in diesem Experiment unter NMPG-Inkubation auf $94 \pm 11\%$ signifikant abgefangen. Eine alleinige Inkubation mit NMPG der Kontrollprobe liegt bei $86 \pm 11\%$ und ist damit nicht signifikant verschieden zur unbehandelten Kontrolle.

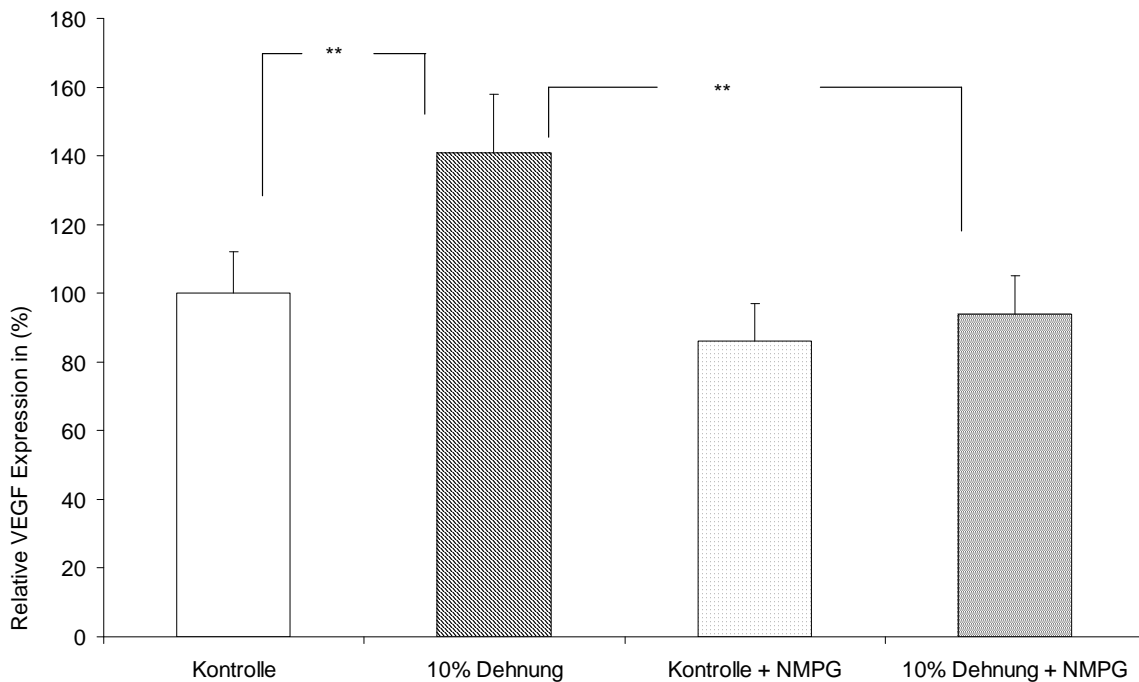


Abbildung 3-6 B) VEGF-Expression nach mechanischer Zugbelastung unter Einfluss von NMPG (100 μ M)

*Unter mechanischer Zugbelastung steigt die VEGF- Expression signifikant an. Dieser Anstieg kann durch eine Inkubation mit dem Radikalfänger NMPG signifikant inhibiert werden. Auswertung der Immunzytochemie (n = 3). * $P \leq 0,05$ Vergleich Kontrolle und 10% Dehnung, ** $P \leq 0,01$ Vergleich 10% Dehnung und 10% Dehnung unter Inkubation mit dem Radikalfänger NMPG, einfaktorierter Anovatest.*

Diagramm 3-7 zeigt die Ergebnisse des identisch durchgeführten Versuches der RT-PCR. Auch in der RT-PCR steigt die VEGF-Expression unter mechanischer Zugbelastung signifikant auf $483 \pm 16\%$ in Bezug zur normierten Kontrolle von $100 \pm 22,2\%$ an. Mit dem Radikalfänger NMPG kann der Expressionsanstieg von VEGF nach Induzierung signifikant auf $77,1 \pm 6,6\%$ inhibiert werden. Die Kontrollproben unter NMPG-Inkubation sind mit $108,6 \pm 12,8\%$ nicht signifikant verschieden zur unbehandelten Kontrolle.

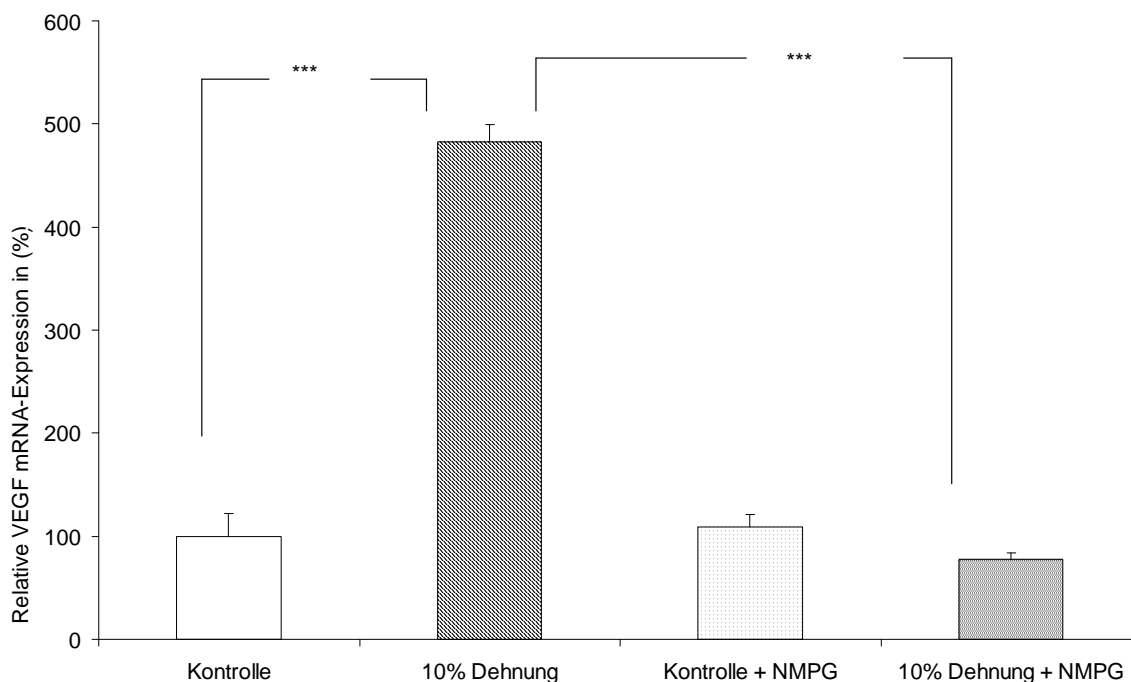


Abbildung 3-7 VEGF mRNA-Expression nach mechanischer Zugbelastung unter dem Einfluss des Radikalfängers NMPG (100 μ M)

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikantem Anstieg der VEGF mRNA-Expression. Dieser Anstieg der wachstumsfaktorspezifischen mRNA kann durch eine Inkubation der EBs mit dem Radikalfänger NMPG signifikant inhibiert werden (n=5). *** $P \leq 0,001$, einfaktorierter Anovatest.*

Mechanische Zugbelastung von ES-Zellen führt auf Protein- sowie mRNA- Ebene zu einem signifikanten Anstieg der VEGF Expression. Durch den kontinuierlichen Einsatz der Radikalfänger Trolox und NMPG kann der Expressionsanstieg des Transkriptionsfaktors signifikant inhibiert werden.

3.5 Generierung von ROI unter mechanischer Zugbelastung

In diesem Experiment wird die Rolle der ROIs als physiologischer Regulator zellulärer Prozesse und Signalwege unter der Einwirkung mechanischer Kräfte analysiert.

An Tag drei der Differenzierung werden die EBs aus der Spinnerflasche entnommen und auf die Silikonmembranen ausgesät. Die elastischen Membranen mit den aufsitzenden EBs werden 24 Stunden später um 10% gedehnt. Zwei Stunden vor Durchführung der mechanischen Induzierung wird ein Teil der Zellen mit dem Radikalfänger Trolox (100 μ M)

vorinkubiert. Im Anschluss der mechanische Zelldehnung wird den Zellen ein ROI-Indikator, das H₂DCFDA zugesetzt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wird die Fluoreszenz der Proben unter dem cLSM ermittelt.

Abb. 3.8 zeigt den signifikanten Anstieg der ROI auf $183,4 \pm 56\%$ nach mechanischer Zugbelastung im Vergleich zur normierten Kontrolle mit $100 \pm 31,9\%$. Der Einsatz von Trolox (100 μ M) führt hier zu einem signifikanten Rückgang der generierten ROI auf $93,2 \pm 28,81\%$. Das Kultivierungsmedium mit dem Radikalfänger Trolox hat keinen Einfluss auf die ROI-Generierung. Der Messwert von $91,6 \pm 21,4\%$ ist nicht signifikant verändert zur unbehandelten Kontrolle.

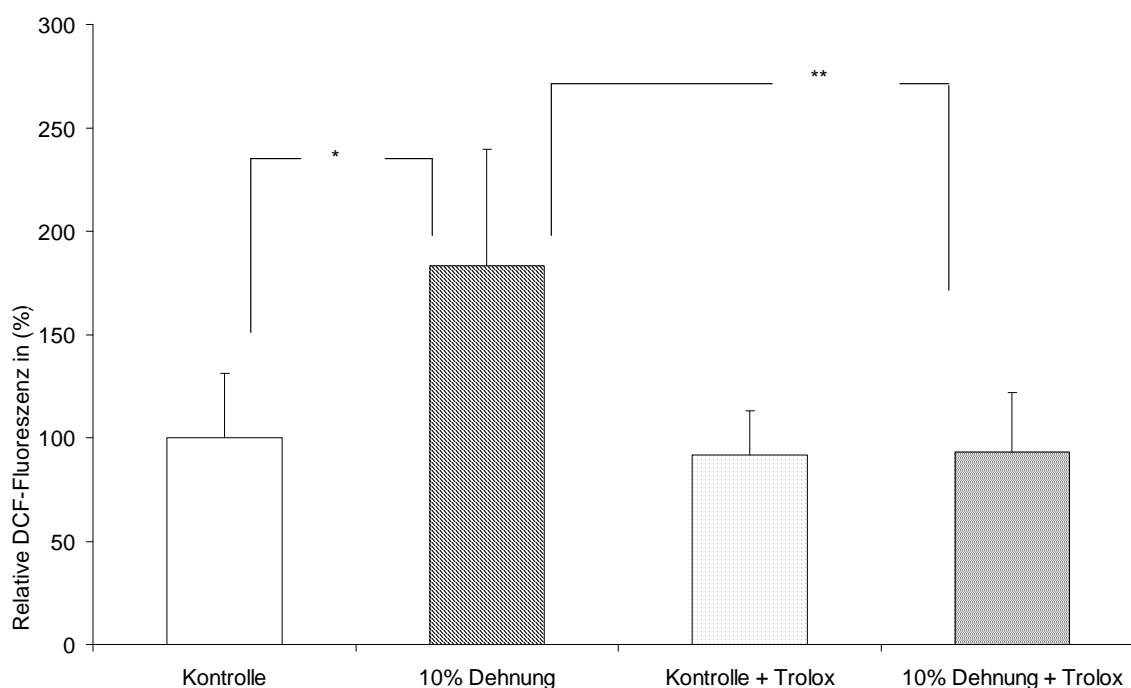


Abbildung 3-8 Relative DCF-Fluoreszenz nach mechanischer Zugbelastung und der Einfluss des Radikalfängers Trolox (100 μ M)

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der DCF-Fluoreszenz. Der Anstieg der DCF-Fluoreszenz kann durch den Einsatz des Radikalfängers Trolox signifikant inhibiert werden ($n = 5$). * $P \leq 0,05$ Vergleich Kontrolle und 10% Dehnung, ** $P \leq 0,01$ Vergleich 10% Dehnung und 10% Dehnung unter Inkubation mit dem Radikalfänger Trolox, einfaktorierter Anovatest.*

Das Diagramm 3-9 zeigt den Verlauf der ROI-Generierung über 24 Stunden nach mechanischer Zugbelastung. Die Messungen werden nach 2, 6, 12 und 24 Stunden durchgeführt.

Die Kontrolle liegt nach 2 Stunden bei einem normierten Wert von $100 \pm 8,2\%$. Während der 6, 12 und 24 Stunden Messungen der Kontrollzellen liegen die Messwerte bei $141,6 \pm 14,6\%$, $124,5 \pm 16,5\%$ und $113 \pm 13,6\%$.

Das Ergebnis der Zellen nach mechanischer Zugbelastung 2 Stunden später ist mit $247,9 \pm 39,8\%$ schon signifikant erhöht. Bis zur letzten Messung fällt dieser Messwert kontinuierlich von $239,8 \pm 25,9\%$, über $211,1 \pm 35,5\%$ auf $176 \pm 22,4\%$ ab.

Nach 24 Stunden ist die ROI-Generierung im Vergleich zum ermittelten Wert der Kontrollzellen immer noch signifikant erhöht.

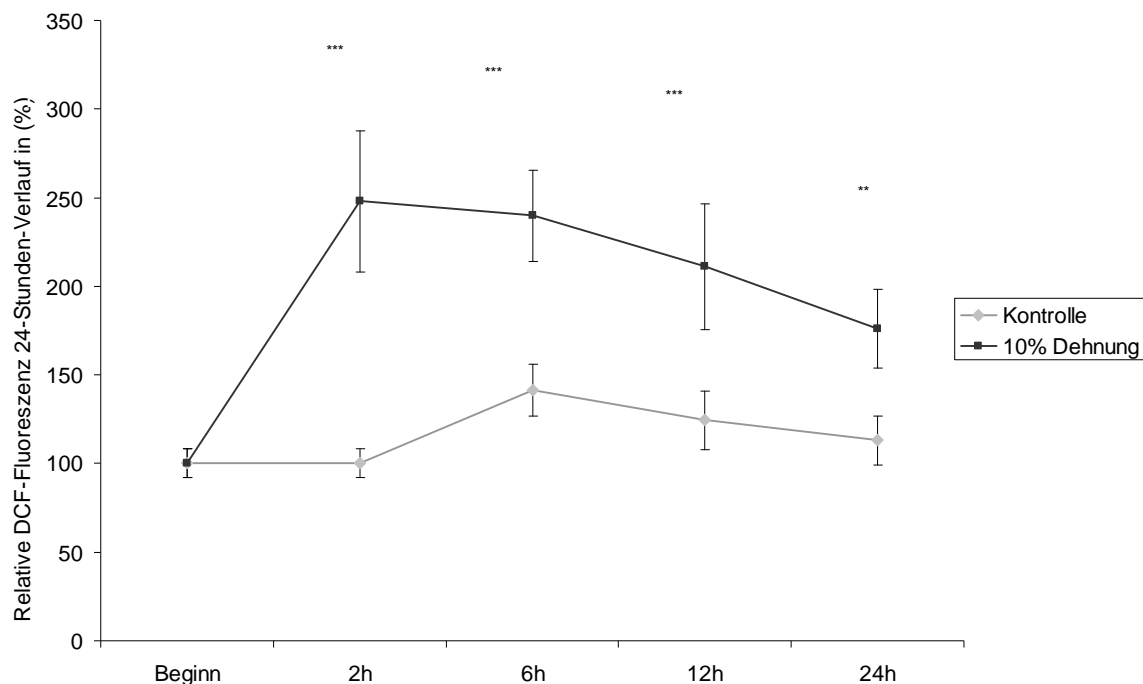


Abbildung 3-9 Verlauf der relativen DCF-Fluoreszenz über 24 Stunden nach mechanischer Zugbelastung

Unter mechanischer Zugbelastung kommt es im zeitlichen Verlauf von 24 Stunden gesehen zu einem signifikanten Anstieg der DCF-Fluoreszenz. Hierbei wird 2 Stunden nach der mechanischen Dehnung das Maximum erreicht, das kontinuierlich bis 24 Stunden nach der mechanischen Zugbelastung abfällt ($n = 3$). $***P \leq 0,001$ Vergleich zwischen Kontrollwerten 2, 6 und 12 Stunden sowie aktivierten Ebb-

*Kulturen 10% 2 , 6 und 12 Stunden nach der mechanischen Zugbelastung, ** $P \leq 0,01$ Vergleich Kontrolle 24 Stunden und 10% Dehnung 24 Stunden nach der mechanischen Zugbelastung, einfaktorieller Anovatest.*

Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der ROI Generierung, die unter Einsatz des Radikalfängers Trolox signifikant inhibiert werden kann. Das Maximum der ROI Generierung wird 2 Stunden nach der mechanischen Dehnung erreicht.

3.6 Aktivierung der MAPKs p38, ERK 1/2 und JNK durch mechanische Zugbelastung und die Rolle der ROI als Signalmoleküle

Für die Regulation der Proliferation von Zellen ist die Aktivierung bestimmter Signalkaskaden notwendig, die häufig durch die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) verkörpert werden. Die Möglichkeit der Redoxregulation von MAPKs-Signalwegen ist bereits in der Literatur beschrieben worden (Guyton et al, 1996; Tournier et al, 1997; Aikawa et al, 1997).

Für alle Untersuchungen der MAPKs werden die EBs an Tag drei der Differenzierung aus der Spinnerflasche entnommen und auf die Silikonmembranen ausgesät. Die elastischen Membranen mit den aufsitzenden EBs werden 24 Stunden später um 10% gedehnt. Direkt im Anschluss an eine 10, 30 oder 60 minütige mechanische Dehnung im Flexercell System[®] erfolgt die Fixation der EBs. Als Kontrolle dienen unbehandelte EBs.

3.7 p38

Das Diagramm 3-10 A) zeigt den Zeitverlauf der p38-Phosphorylierung unter mechanischer Zugbelastung. Die Zellen werden nach 10, 30 und 60 Minuten Dehnung im Flexercell System mit ungedehnten Kontrollproben verglichen. Das Schaubild weist einen signifikanten Anstieg der MAPK nach 10 und 30 Minuten mechanischer Zugbelastung auf.

Der Kontrollwert wird mit $100 \pm 21,1\%$ normiert. Unter mechanischer Zugbelastung steigt die p38-Aktivierung nach 10 Minuten auf $164,6 \pm 31,9\%$ und nach 30 Minuten auf $188,6 \pm 38,3\%$ an.

Nach 60 Minuten erreicht die Aktivierung der MAPK einen Wert von $137,6 \pm 31\%$.

Sowohl der Messwert nach 10 und nach 30 Minuten ist im Vergleich zum Kontrollwert signifikant erhöht.

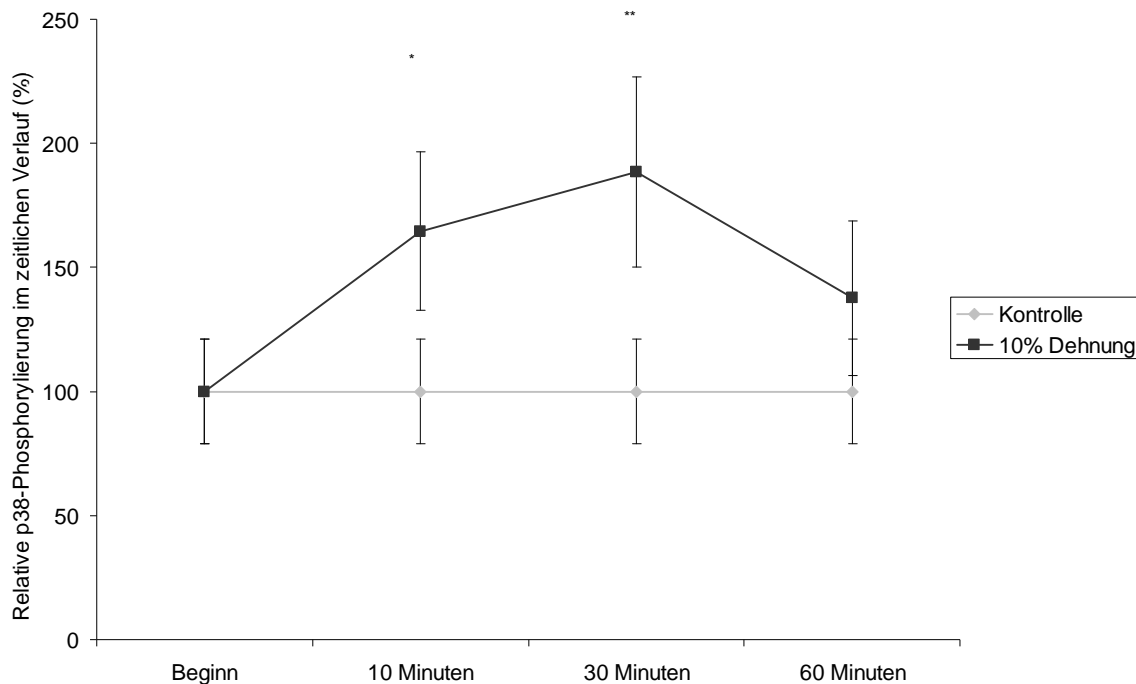


Abbildung 3-10 A) Phosphorylierung von p38 unter mechanischer Zugbelastung

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der p38 Phosphorylierung nach 10 und 30 Minuten. Auswertung der Immunzytochemie (n = 5). * $P \leq 0,5$ Vergleich Kontrolle und 10% Dehnung nach 10 Minuten, ** $P \leq 0,01$ Vergleich Kontrolle und 10% Dehnung nach 30 Minuten, einfaktorierter Anovatest.*

In Abb. 3-10 B) wird dieser signifikante Anstieg der p38 MAPK nach 30 Minuten Dehnung der Zellen im Vergleich zur Kontrollprobe in einem Balkendiagramm dargestellt.

Der Kontrollwert wird mit $100 \pm 21,1\%$ normiert. Unter mechanischer Zugbelastung steigt die p38-Aktivierung nach 30 Minuten signifikant auf den Messwert von $188,6 \pm 38,3\%$ an.

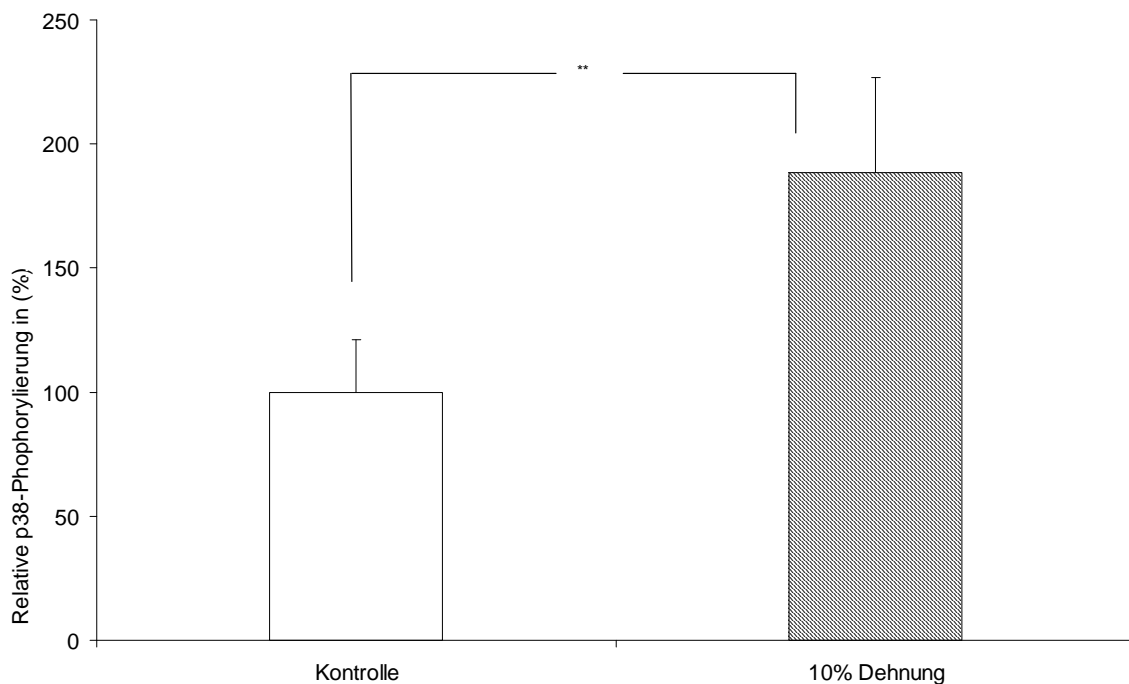


Abbildung 3-10 B) Phosphorylierung von p38 unter mechanischer Zugbelastung

Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der p38 Phosphorylierung nach 30 Minuten. Auswertung der Immunzytochemie (n = 5).

***P≤0,01, ungepaarter t-Test.*

In einem weiteren Experiment (Abb. 3-11) wird die Phosphorylierung der MAPK im Zusammenhang mit der ROI-Generierung untersucht.

Ein Teil der Zellen wird 2 Stunden vor Beginn der mechanischen Zugbelastung mit dem Radikalfänger Trolox (100 µM) im Kultivierungsmedium vorinkubiert.

Die Kontrolle wird mit $100 \pm 13,5\%$ normiert. Der Messwert der EBs unter mechanischer Zugbelastung ist nach 30 Minuten mit $152 \pm 17\%$ im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erhöht. Der Anstieg der MAPK kann über eine Inkubation mit dem Radikalfänger Trolox auf $98 \pm 13,2\%$ signifikant inhibiert werden. Der Messwert der Kontrollzellen unter Troloxinkubation liegt gemittelt bei $90 \pm 11,5\%$.

Das Ergebnis liefert Hinweise auf eine redoxabhängige Phosphorylierung von p38 unter mechanischer Zugbelastung.

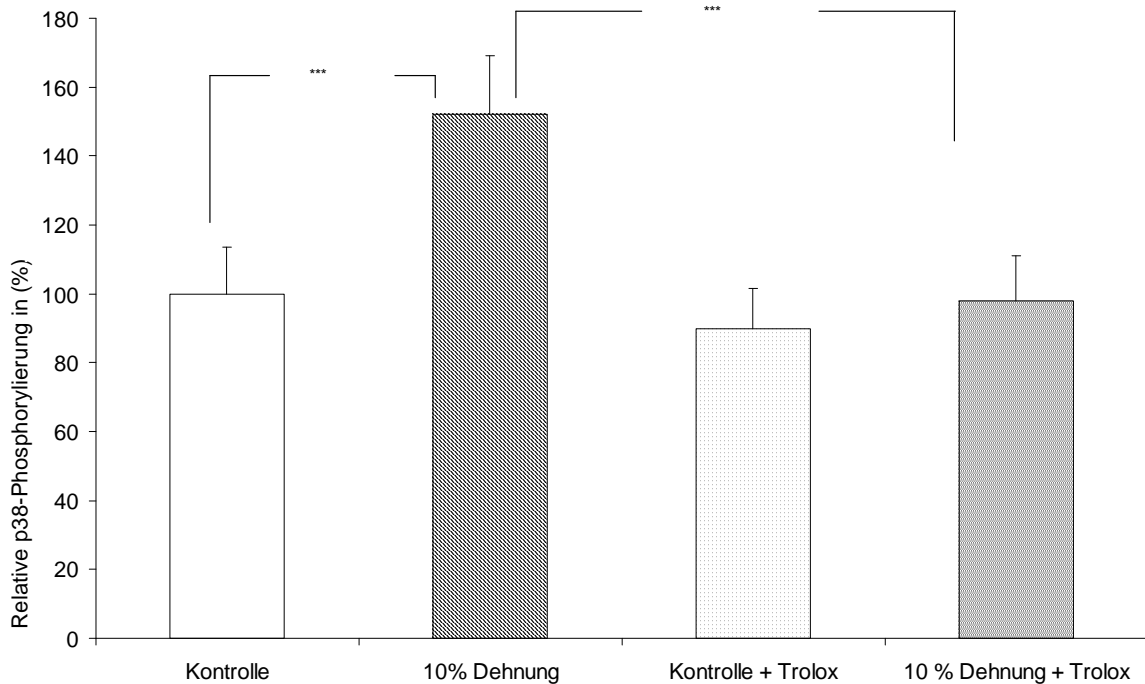
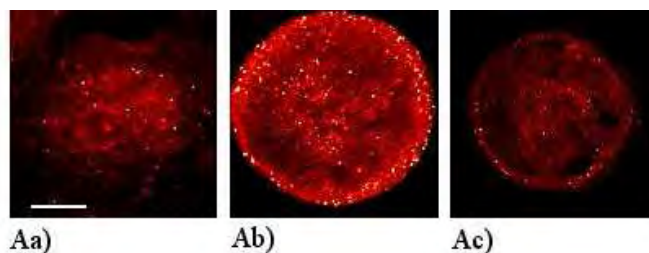


Abbildung 3-11 Phosphorylierung von p38 nach 30 Minuten mechanischer Zugbelastung und dem Einfluss von Trolox (100 μ M)

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der p38-Phosphorylierung nach 30 Minuten. Der Anstieg der Phosphorylierung kann durch eine Inkubation der Zellen mit dem Radikalfänger Trolox signifikant inhibiert werden. Auswertung der Immunzytochemie ($n = 4$). *** $P \leq 0,001$, einfaktorierter Anovatest.*

Repräsentative Fluoreszenzbilder der p38-Phosphorylierung. (Aa) Kontrolle, (Ab) EBs unter mechanischer Zugbelastung, (Ac) EBs unter mechanischer Zugbelastung + Trolox (100 μ M). Balken = 50 μ m.



3.8 ERK 1/2

Die Abb. 3-12 A) zeigt den zeitlichen Verlauf der ERK 1/2-Phosphorylierung. Die maximale Phosphorylierung der MAPK tritt nach 10 Minuten mechanischer Zugbelastung auf. Der

Kontrollwert wird mit $100 \pm 21,7\%$ normiert. Nach 10 Minuten Dehnung der Zellen liegt der Messwert erhöht bei $149,2 \pm 29,5\%$. Die Ergebnisse der Messungen nach 30 ($92,4 \pm 34,7\%$) und 60 ($118,6 \pm 28,6\%$) Minuten liegen im Bereich des Kontrollwertes.

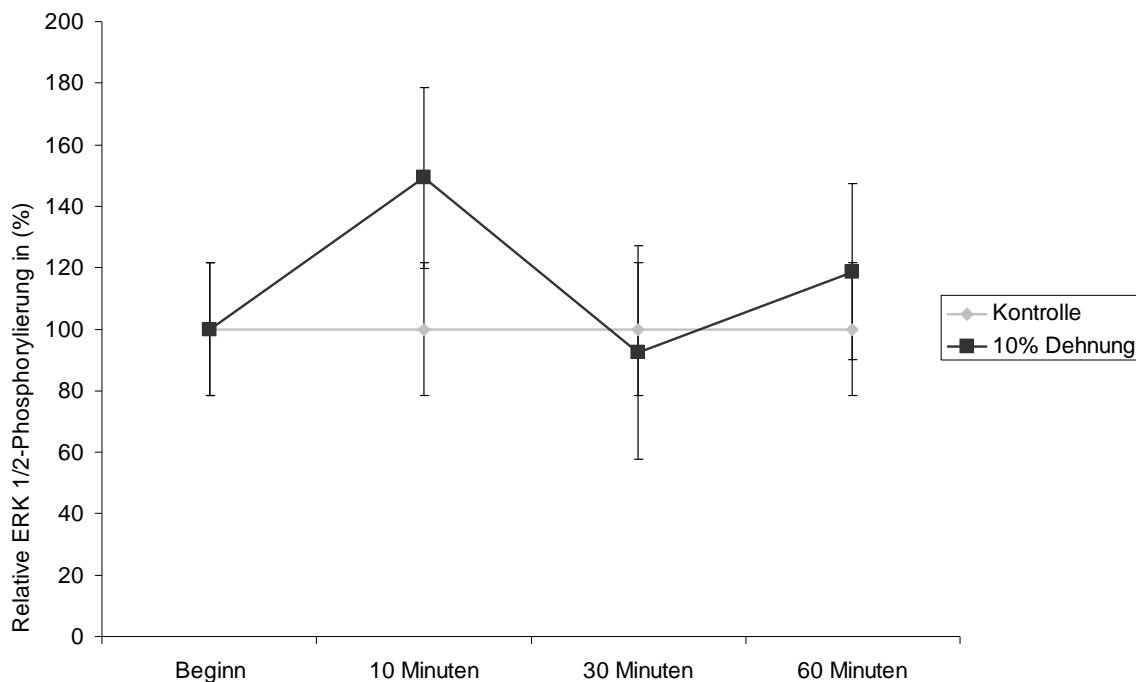


Abbildung 3-12 A) Phosphorylierung von ERK 1/2 unter mechanischer Zugbelastung

Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem Anstieg der ERK 1/2 Phosphorylierung nach 10 Minuten. Auswertung der Immunzytochemie (n = 4).

Das Diagramm 3-12 B) zeigt den Anstieg von ERK 1/2 nach 10 Minuten mechanischer Zugbelastung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe dargestellt in einem Balkendiagramm.

Der Kontrollwert wird mit $100 \pm 21,7\%$ normiert. Nach 10 Minuten Dehnung der Zellen liegt der Messwert signifikant erhöht bei $149,2 \pm 29,5\%$.

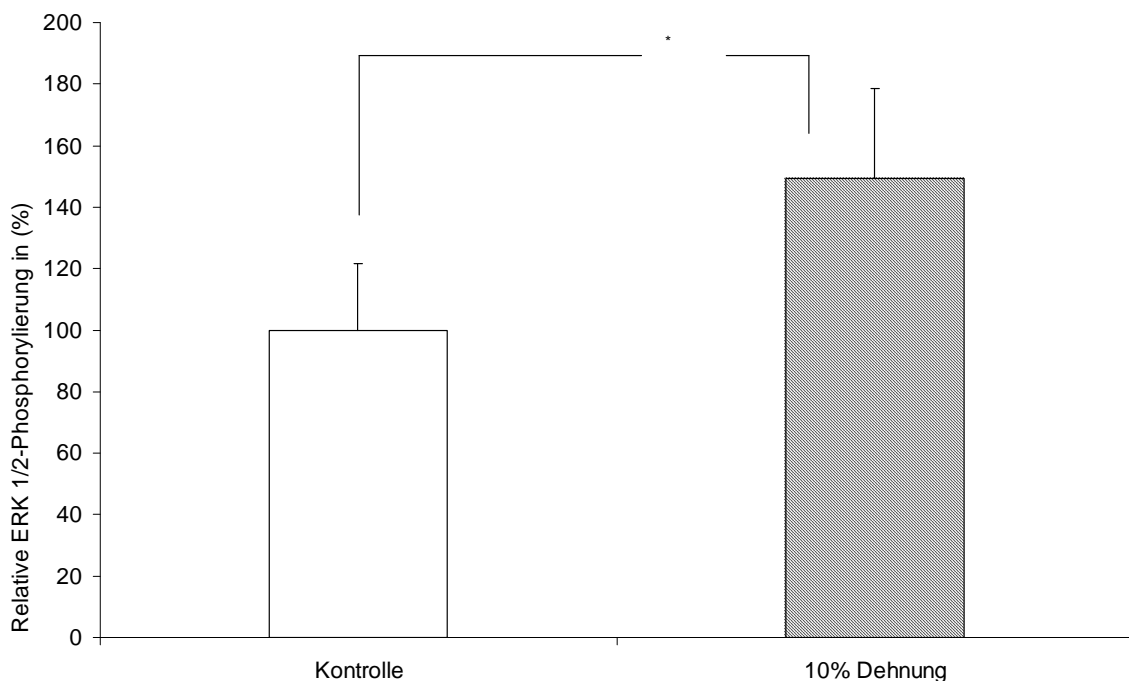


Abbildung 3-12 B) Phosphorylierung von ERK 1/2 nach 10 Minuten mechanischer Zugbelastung

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der ERK 1/2 Phosphorylierung nach 10 Minuten. Auswertung der Immunzytochemie (n = 4). *P≤0,05, ungepaarter t-Test.*

Durch eine zusätzliche Inkubation von Zellen mit Trolox (100 µM) im Nährmedium soll die Redoxsensitivität der ERK 1/2–Phosphorylierung untersucht werden (siehe Abbildung 3-13).

Die ES-Zellen zeigen im Vergleich zur normierten Kontrolle 100± 18,1% unter mechanischer Zugbelastung einen signifikanten Anstieg von ERK 1/2 auf 171,3 ± 16,2%. Dieser Effekt kann durch eine Inkubation mit dem Radikalfänger Trolox auf 127 ± 18,9% signifikant inhibiert werden. Der Messwert der Kontrollzellen unter Troloxinkubation liegt bei 101,1 ± 16,7% .

Das Ergebnis liefert Hinweise auf eine redoxabhängige Phosphorylierung von ERK 1/2 unter mechanischer Zugbelastung.

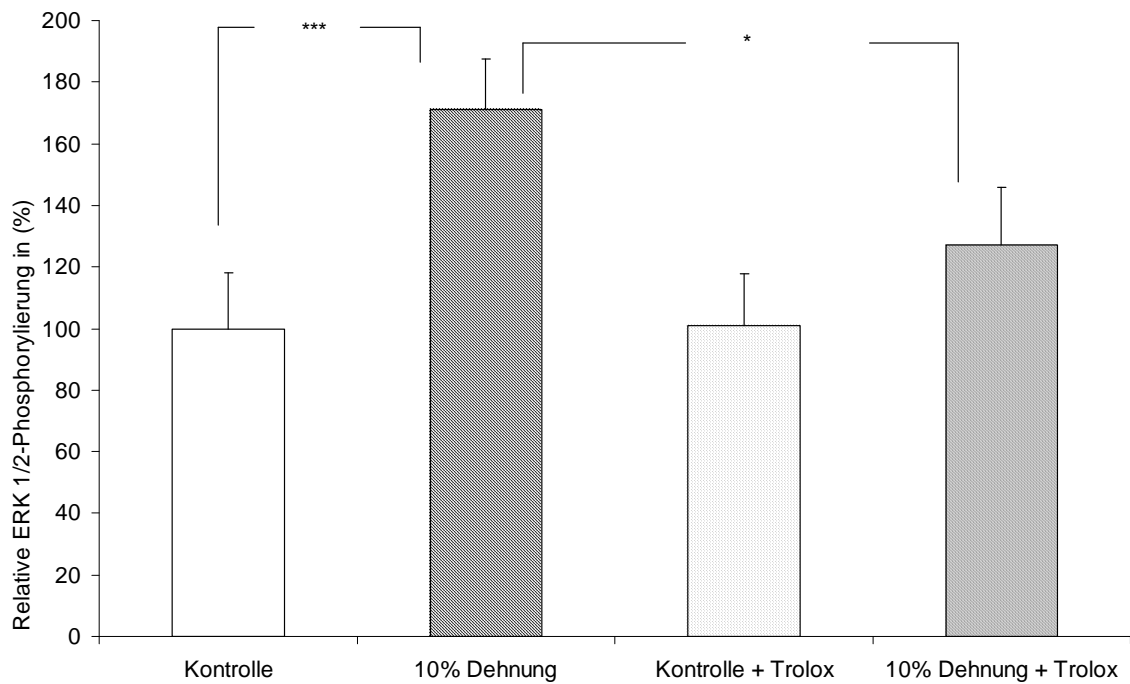
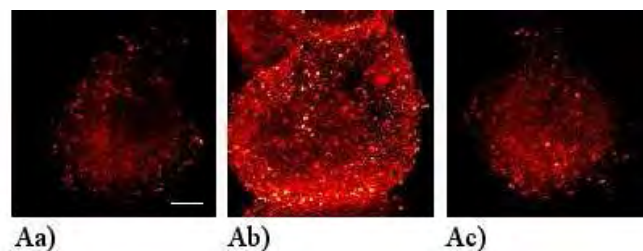


Abbildung 3-13 Phosphorylierung von ERK 1/2 unter 10 Minuten mechanischer Zugbelastung und dem Einfluss von Trolox (100 μ M)

Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der ERK 1/2 - Phosphorylierung nach 30 Minuten. Der Anstieg der Phosphorylierung kann durch eine Inkubation der Zellen mit dem Radikalfänger Trolox signifikant inhibiert werden. Auswertung der Immunzytochemie ($n = 4$). *** $P \leq 0,001$ Vergleich Kontrolle und 10% Dehnung, * $P \leq 0,05$ Vergleich 10% Dehnung und 10% Dehnung nach Inkubation mit dem Radikalfänger Trolox, einfaktorieller Anovatest.

(A) Repräsentative Fluoreszenzbilder der ERK 1/2-Phosphorylierung. (Aa) Kontrolle, (Ab) EBs unter mechanischer Zugbelastung, (Ac) EBs unter mechanischer Zugbelastung + Trolox (100 μ M). Balken = 50 μ m.



3.9 JNK

Die Abbildungen 3-14 A) und B) zeigen die JNK-Phosphorylierung unter mechanischer Zugbelastung.

Im zeitlichen Verlauf der MAPK-Phosphorylierung ist JNK nach 10 Minuten mechanischer Zugbelastung mit $150,2 \pm 22,8\%$ im Vergleich zur normierten Kontrolle mit $100 \pm 18,8\%$ signifikant erhöht. Nach 30 Minuten Behandlung im Flexercell System[®] sinkt der Messwert auf $136 \pm 21,8\%$ ab, um sich nach 60 Minuten Dehnung mit $121,3 \pm 20,8\%$ dem Kontrollwert zu nähern.

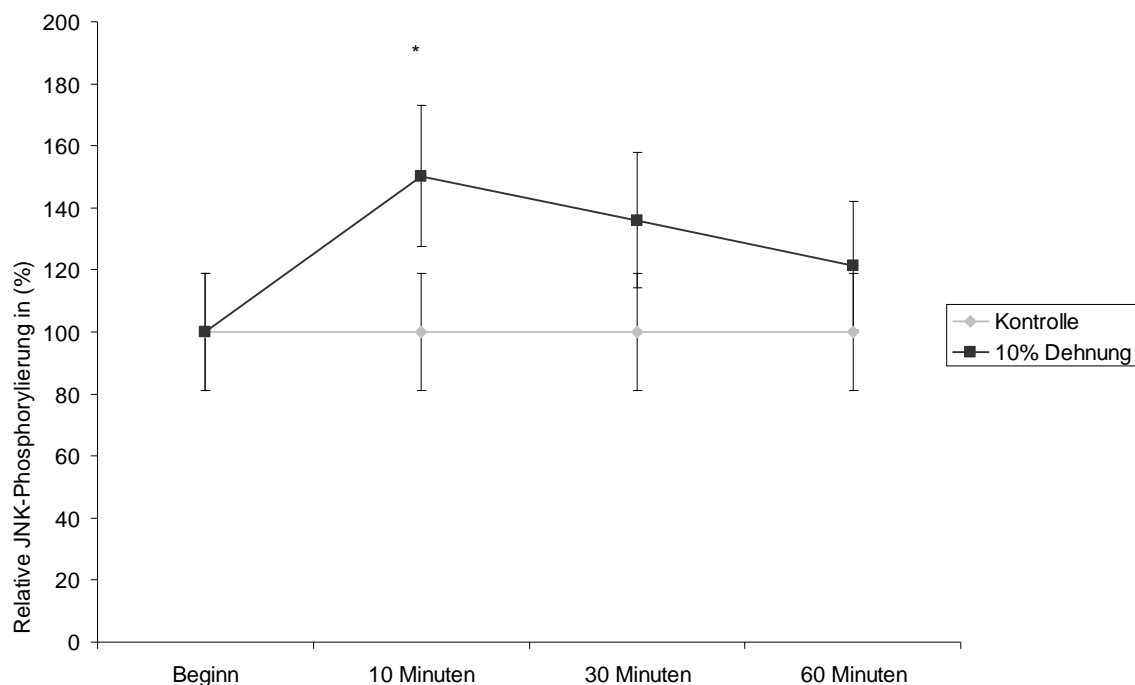


Abbildung 3-14 A) Phosphorylierung von JNK unter mechanischer Zugbelastung

Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem Anstieg der JNK- Phosphorylierung nach 10 Minuten. Auswertung der Immunzytochemie ($n = 4$). * $P \leq 0,05$, einfaktorier Anovatest.

Das Diagramm 3-15 B) zeigt die Phosphorylierung von JNK nach 10 Minuten mechanischer Zugbelastung im Vergleich zur Kontrolle. Die Darstellung erfolgt in einem Balkendiagramm.

Nach 10 Minuten mechanischer Zugbelastung ist MAPK-Phosphorylierung mit $150,2 \pm 22,8\%$ im Vergleich zur normierten Kontrolle mit $100 \pm 18,8\%$ signifikant erhöht.

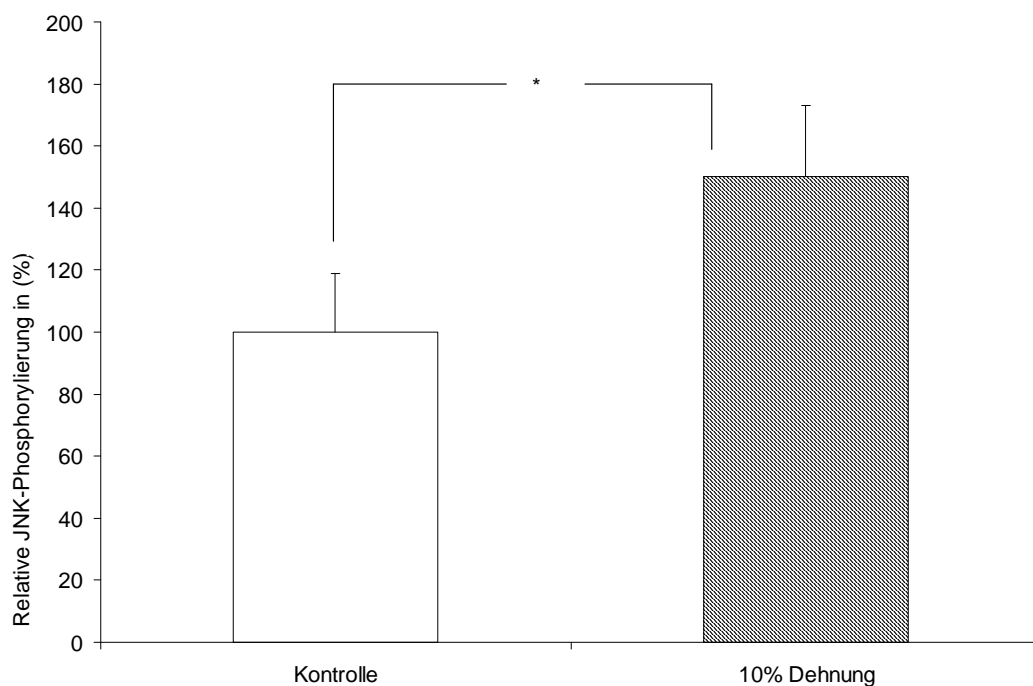


Abbildung 3-14 B) Phosphorylierung von JNK nach 10 Minuten mechanischer Zugbelastung

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der JNK-Phosphorylierung nach 10 Minuten. Auswertung der Immunzytochemie (n = 4). *P≤0,05, ungepaarter t-Test.*

Die Abbildung 3-15 stellt die redoxabhängige Phosphorylierung von JNK unter mechanischer Zugbelastung dar. Die Kontrolle wird mit 100± 11,3% normiert. Die Zellen sind unter mechanischer Zugbelastung mit 157 ± 15,8% signifikant erhöht. Durch eine Inkubation mit dem Radikalfänger Trolox (100 µM) wird dieser Anstieg auf 111 ± 12,0% signifikant inhibiert. Die Inkubation der Kontrollzellen mit dem Radikalfänger liegt bei 99,7 ± 6,7%.

Das Ergebnis liefert Hinweise auf eine redoxabhängige Phosphorylierung von JNK unter mechanischer Zugbelastung.

Ergebnisse

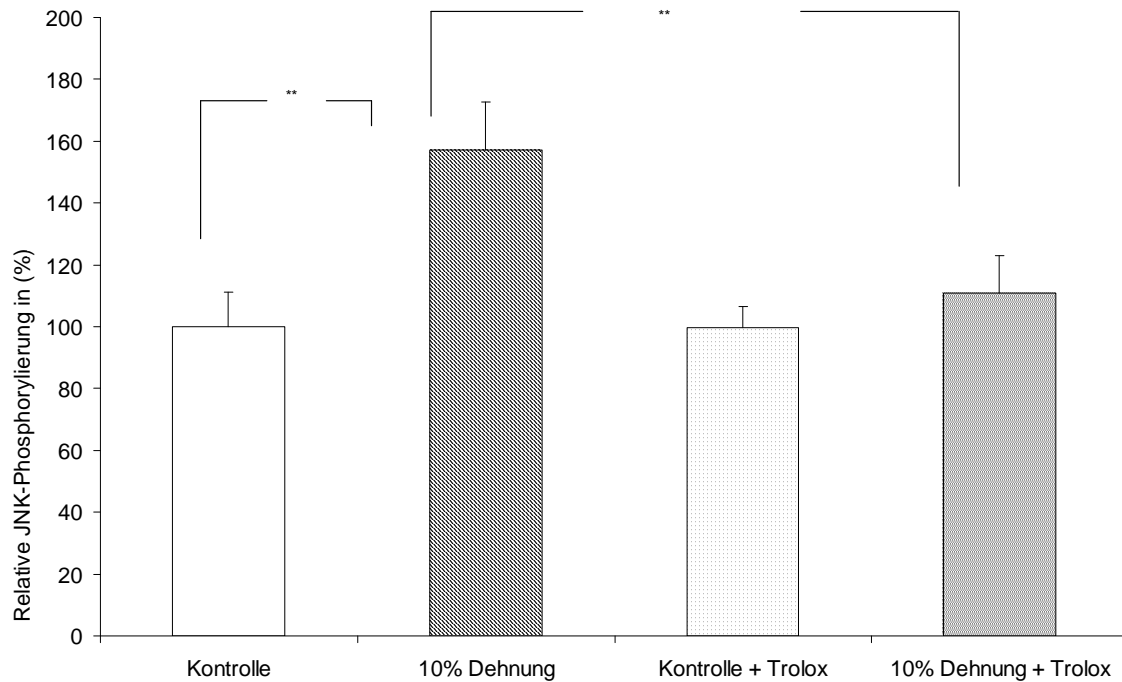
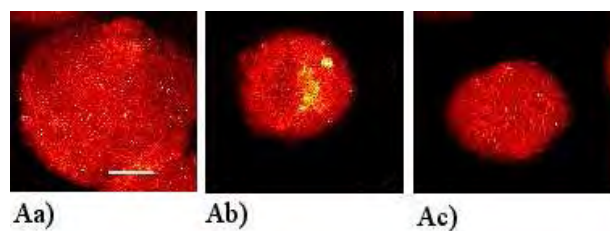


Abbildung 3-15 Phosphorylierung von JNK nach 10 Minuten mechanischer Zugbelastung und dem Einfluss von Trolox (100 μ M)

Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der JNK-Phosphorylierung nach 30 Minuten. Der Anstieg der Phosphorylierung kann durch eine Inkubation der Zellen mit dem Radikalfänger Trolox signifikant inhibiert werden. Auswertung der Immunzytochemie ($n = 3$). $**P \leq 0,01$, einfaktorier Anovatest.

(A) Repräsentative Fluoreszenzbilder der JNK-Phosphorylierung. (Aa) Kontrolle, (Ab) EBs unter mechanischer Zugbelastung, (Ac) EBs unter mechanischer Zugbelastung + Trolox (100 μ M). Balken = 50 μ m.



3.10 Die Funktion der MAPKs in der Vaskulo- und Kardiomyogenese von ES-Zellen unter mechanischer Zugbelastung

Die Experimente dienen der Analyse der Bedeutung der unterschiedlichen MAPKs auf die kardiovaskuläre Differenzierung von ES-Zellen.

In den folgenden Versuchen wird die MAPK p38 mit dem spezifischen Inhibitor SB203580 (1 μ M) geblockt. Bei der Substanz handelt es sich um ein Pyridinyl-Imidazol, das auch die Phosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase B beeinflusst.

Bei ERK 1/2 kommt der Inhibitor UO126 (10 μ M) zum Einsatz. Die chemische Substanz stellt einen hochselektiven Inhibitor der MEK1 und MEK2 dar. Die MEK 1/2 ist der Signalkaskade ERK 1/2 vorgeschaltet.

Die MAPK JNK wird in diesen Untersuchungen durch den Blocker SP600125 (1 μ M) inhibiert. Bei SP600125 handelt es sich um einen reversiblen ATP-kompetitiven Inhibitor.

Nach drei Tagen Differenzierung in den Spinnerflaschen werden die EBs auf die Silikonmembranen der Bioflexplatte[®] ausgesät und 24 Stunden später um 10% gedehnt. Zwei Stunden vor Beginn der mechanischen Zugbelastung bis zum Auswertungszeitpunkt (Tag acht der Differenzierung) bleiben die Inhibitoren in den genannten Konzentrationen dem Nährmedium zugesetzt. Die Zellen werden täglich mikroskopisch begutachtet. Die ES-Zellen erscheinen bis zur Fixierung unbeschädigt, sodass ein toxischer Einfluss der Inhibitorsubstanzen auszuschließen ist.

Das Diagramm 3-16 zeigt die Rolle der verschiedenen MAPKs im Rahmen Kardiomyozytendifferenzierung.

Es werden die Anzahl der kontrahierenden Areale und die Anzahl der auf einer Platte vorhandenen EBs ausgezählt und der Prozentsatz der Kardiomyozytenareale pro Platte ermittelt und zueinander in Relation gesetzt. Die Anzahl der kontrahierenden Areale ist bei mechanisch-gedehnten EBs mit $202,6 \pm 50\%$ im Vergleich zur normierten Kontrolle mit 100% signifikant erhöht. Auf den ersten Blick nehmen alle drei MAPKs signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Kardiomyozytenareale. Jedoch sind die Auswirkung der einzelnen MAPKs auf die Herzzellentwicklung differenzierter zu beschreiben. P38 beeinflusst die ES-Zelldifferenzierung in Kardiomyozyten am stärksten. Unter einer Inhibition mit SB203580 liegt der Wert der Probe unter mechanischer Zugbelastung bei $33 \pm 11\%$, der Wert der Kontrollzellen unter Inhibition mit SB203580 bei $28,2 \pm 1,7\%$. Beide Ergebnisse fallen niedriger als der Kontrollwert aus und lassen somit auf eine bedeutende Rolle von p38 als Mediator in der Kardiomyogenese schließen. Unter einer Blockade von p38 stagniert zusätzlich die Schlagfrequenz und Größenausdehnung der Kardiomyozytenareale.

Bei Proben inkubiert mit dem Inhibitor UO126 liegt die Anzahl kontrahierender Areale nach mechanischer Induzierung bei $57,2 \pm 37,6\%$, bei der Kontrollprobe Inkubiert mit UO126 liegt der Messwert bei $41,9 \pm 16,5\%$. Beide Werte liegen unter dem Messwert der Kontrollproben. Bezüglich der Größe der Kardiomyozytenareale ist lichtmikroskopisch keine signifikante Reduzierung auszumachen. Jedoch ist die Schlagfrequenz der Kardiomyozytenareale unter UO126-Inkubation reduziert.

Bei den EBs behandelt mit SP600125 ist die Auswirkung auf die Anzahl der Kardiomyozytenareale zwar immer noch signifikant erniedrigt, aber im Vergleich zu den anderen MAPKs kann man feststellen, dass der inhibierende Effekt am geringsten ausfällt. Der Wert der Probe nach mechanischer Zugbelastung und Inkubation mit SP600125 liegt bei $102 \pm 24\%$, die Kontrollprobe unter Inkubation mit SP600125 liegt bei $81 \pm 44\%$. Es werden unter dem Lichtmikroskop keine Reduzierung der Größe der kontrahierenden Areale, sowie der Schlagfrequenz beobachtet.

Das Diagramm 3-17 liefert Erkenntnisse über die Bedeutung der MAPKs auf die Vaskulogenese von ES-Zellen.

Die Kontrolle wird mit $100 \pm 9,7\%$ normiert. Die PECAM-1 positive Zellfläche unter mechanischer Zugbelastung ist mit $145 \pm 15,2\%$ signifikant erhöht.

Die Analyse der Proben inkubiert mit SB203580 ergibt einen Messwert der Kontrollzellen von $103 \pm 13\%$ und der mechanisch induzierten Zellen von $141 \pm 11,7\%$. Die Phosphorylierung von p38 nach mechanischer Zugbelastung hat somit augenscheinlich keinen Einfluss auf die Vaskulogenese der ES-Zellen.

Im Gegensatz dazu kommt es bei einer Inkubation der Zellen mit SP600125 zu einem signifikanten Rückgang der PECAM-1 positiven Fläche. Der Wert der Zellen unter mechanischer Zugbelastung liegt bei $93 \pm 12,5\%$, der Wert der inkubierten Kontrolle bei $75 \pm 15,4\%$. Während der Analyse im cLSM wird deutlich, dass eine Reduzierung der Strukturierung und Ausbildung der Gefäße eine Folge der JNK-Blockade ist.

Ergebnisse

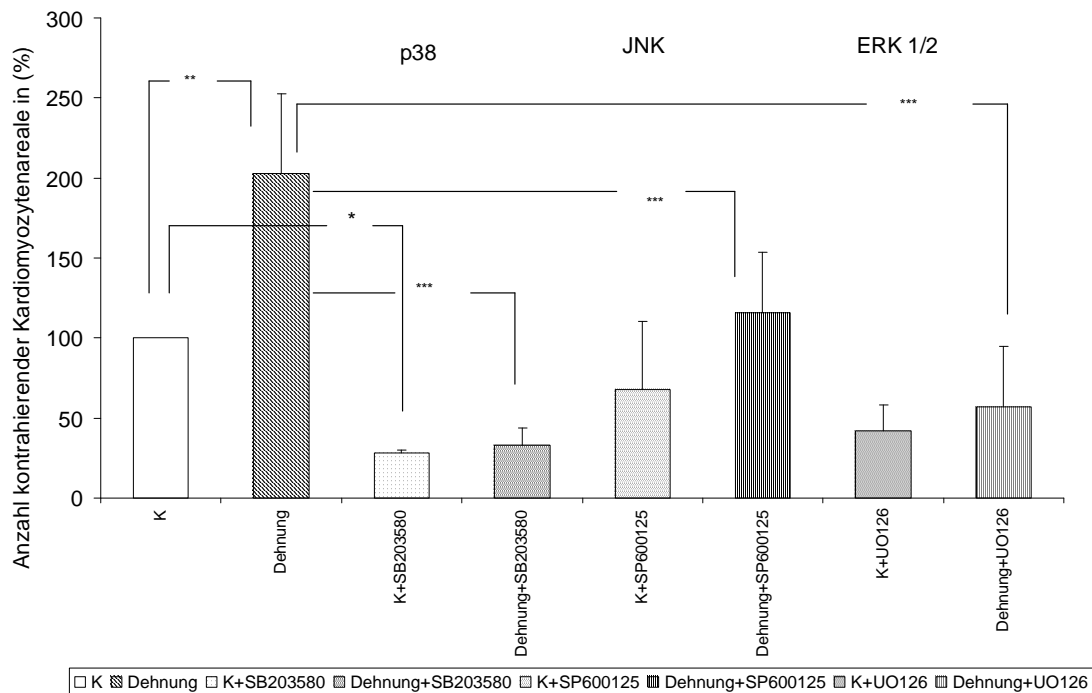
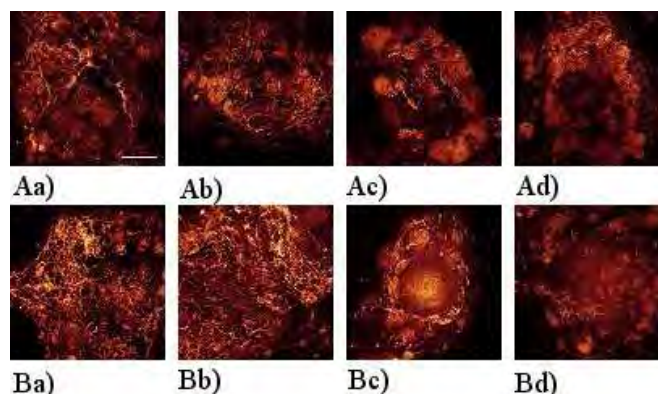


Abbildung 3-16 Rolle der MAPKs p38, JNK und ERK 1/2 nach mechanischer Zugbelastung im Rahmen der Kardiomyogenese

Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl kontrahierender Kardiomyozytenareale. Inhibiert man die drei MAPKs, so kommt es jeweils zu einem signifikanten Inhibition dieses Effektes. Auswertung unter dem Lichtmikroskop ($n = 4$). K steht in dem Diagramm für Kontrolle, Dehnung für eine 10%ige Dehnung der elastischen Membran. * $P \leq 0,05$ Vergleich Kontrolle mit Kontrolle unter SB203580 Inkubation. ** $P \leq 0,01$ Vergleich Kontrolle und 10% Dehnung und Vergleich 10% Dehnung und 10% Dehnung unter SP600125. *** $P \leq 0,001$ Vergleich 10% Dehnung und 10% Dehnung unter SB203580 und UO126. Einfaktorieller Anovatest.

(A) Repräsentative Fluoreszenzbilder der Kontrollzellen. (Aa) Kontrolle, (Ab) Kontrolle inkubiert mit SB203580, (Ac) Kontrolle inkubiert mit SP600125, (Ad) Kontrolle inkubiert mit UO126.

(B) Repräsentative Fluoreszenzbilder der gedehnten Zellen. (Ba) gedehnte Zellen, (Bb) gedehnte Zellen inkubiert mit SB203580, (Bc) gedehnte Zellen inkubiert mit SP600125, (Bd) gedehnte Zellen inkubiert mit UO126. Balken = 50 μm .



Ähnliches Zellverhalten wird von ES-Zellen unter der Inkubation mit UO126 beobachtet. Nicht nur die PECAM-1 positive Zellfläche, sondern auch die Gefäßstruktur der EBs geht verloren. Die positive Zellfläche der mechanisch-induzierten Zellen unter SP600125-Inkubation liegt bei $85 \pm 15\%$ und ist im Vergleich zu den gedehnten, aber nicht mit UO126 behandelten Zellen, signifikant erniedrigt. Die PECAM-1 positive Zellfläche der Kontrollzellen liegt bei $66 \pm 11,2\%$.

3.11 Die Rolle der NADPH-Oxidase als eine Quelle der ROI unter mechanischer Zugbelastung

In der Literatur wurden auch in nicht phagozytierenden Zelltypen enzymatische und nicht enzymatische Quellen beschrieben, die an der Freisetzung von ROI beteiligt sind (Mohazzab et al, 1994; Boveris et al, 1972; Freeman, 1982; Wientjes et al, 1995). An ES-Zellen konnte bereits nachgewiesen werden, dass ein beachtlicher Anteil endogener ROI von der NADPH-Oxidase produziert wird (Sauer et al 2000; Sauer et al, 2005).

Die EBs werden an Tag drei der Differenzierung aus der Spinnerflasche entnommen und auf die Silikonmembranen ausgesät. Die elastischen Membranen mit den aufsitzenden EBs werden 24 Stunden später um 10% gedehnt. Weitere 24 Stunden später erfolgt die Analyse der Zellen.

Die Abbildung 3-18 A-D zeigt die Regulation der Expression der vier NADPH-Oxidase Untereinheiten nach mechanischer Zugbelastung.

Beispiel A zeigt die Regulierung der Expression von *NOX 4*. Die Kontrolle wird mit $100 \pm 18\%$ normiert. Das Ergebnis der mechanisch induzierten ES-Zellen liegt bei $167 \pm 22\%$ und ist signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht.

In Diagramm B wird die Steigerung der Expression von p22-phox nach mechanischer Dehnung demonstriert. Die Kontrolle wird mit $100 \pm 19,2\%$ normiert. Der Messwert nach mechanischer Zugbelastung ist mit $148,2 \pm 24,8\%$ signifikant.

Ergebnisse

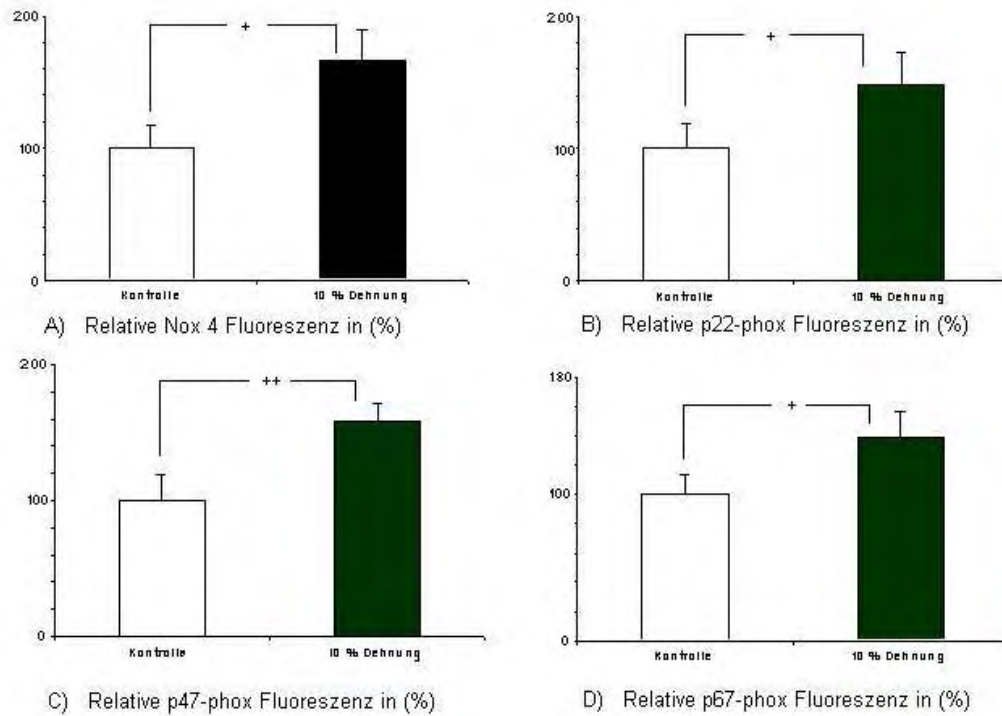
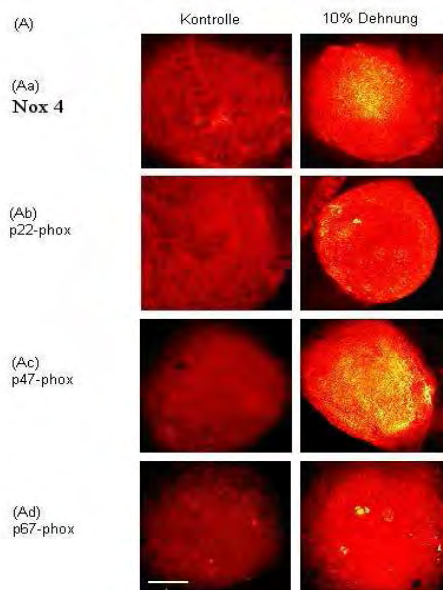


Abbildung 3-18 Regulation der NADPH-Oxidase Untereinheiten A) Nox 4, B) p22-phox, C) p47-phox und D) p67-phox nach mechanischer Zugbelastung

Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der NADPH-Oxidase Untereinheiten Nox 4, p22-phox, p47-phox und p67-phox. Auswertung der Immunzytochemie. Nox 4, und p67-phox ($n = 3$), p22-phox und p47-phox ($n = 4$). $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0001$ ungepaarter t -Test.

(A) Repräsentative Fluoreszenzbilder der NADPH-Oxidase Untereinheiten. (Aa) Nox 4, (Ab) p22-phox, (Ac) p47-phox, (Ad) p67-phox. Balken = 50 μm .



In Grafik C wird die zytosolische Untereinheit p47-phox analysiert. Die Kontrolle wird mit $100 \pm 19,3\%$ normiert. Nach mechanischer Zugbelastung ist hier ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Expression auf $159 \pm 12,7\%$ im Vergleich zur normierten Kontrolle zu beobachten.

Diagramm D veranschaulicht die Regulation der Expression der NADPH-Oxidase Untereinheit p67-phox nach mechanischer Zugbelastung. Die mechanisch gedehnten EBs sind mit $139,1 \pm 17,3\%$ im Vergleich zur normierten Kontrolle mit $100 \pm 13,3\%$ signifikant erhöht.

In der RT-PCR werden *Nox 2* (NADPH-Oxidase 2) und ihre Homologe *Nox 1*, *Nox 3* und *Nox 4* nach mechanischer Zugbelastung untersucht. Die EBs werden an Tag drei der Differenzierung aus der Spinnerflasche entnommen und auf die Silikonmembranen ausgesät. Die elastischen Membranen mit den aufsitzenden EBs werden 24 Stunden später um 10% gedehnt. Weitere 24 Stunden später erfolgt die Analyse der Zellen mittels der PCR-Methode.

Bei der Analyse der ES-Zellen auf *Nox 3* gibt es keine Möglichkeit, ein spezifisches Signal in den Zellen mittels der PCR-Methode zu detektieren. Diese Erkenntnis lässt eine Expression von *Nox 3* in ES-Zellen während der Differenzierung als unwahrscheinlich erscheinen.

Die Anwesenheit von *Nox 2* in ES-Zellen ist mittels PCR zu detektieren, doch reicht die Quantität der Expression nicht zur Auswertung. Man kann aufgrund dieser Erkenntnisse mutmaßen, dass *Nox 2* bei der Differenzierung von ES-Zellen anteilmäßig eine Rolle zu spielen scheint.

Die Homologe *Nox 1* und *4* lassen sich mittels PCR detektieren und analysieren.

Die Abbildung 3-19 zeigt die Expression von *Nox 1* und *Nox 4* nach mechanischer Zugbelastung.

Die Analyse der Expression von *Nox 1* ergibt einen Messwert der mechanisch gedehnten Probe von $176 \pm 21,2\%$. Im Vergleich zur normierten Kontrolle mit dem Messwert $100 \pm 12\%$ ist dieser Wert signifikant erhöht.

Eine größere Expressionssteigerung nach mechanischer Stimulierung von ES-Zellen erfährt *Nox 4*, wie in Abbildung 3-19 dargestellt.

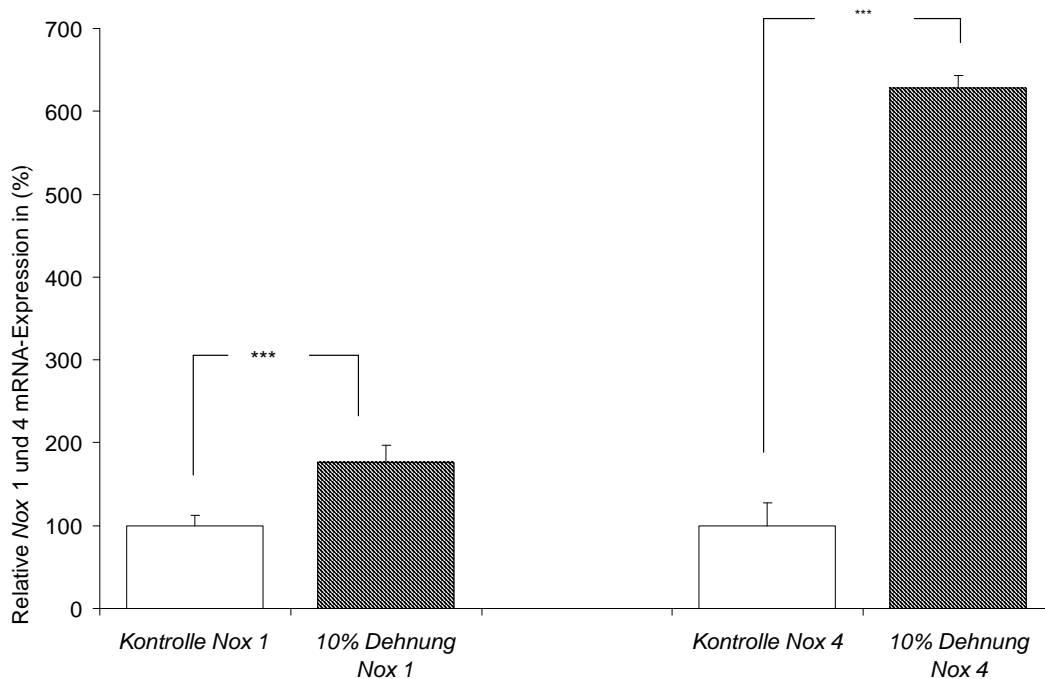


Abbildung 3-19 *Nox 1* und *Nox 4* mRNA-Expression nach mechanischer Zugbelastung

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einer signifikanten Aktivierung von *Nox 1* und *Nox 4* auf mRNA-Ebene. Auswertung der RT-PCR (n = 4). *** $P \leq 0,001$, ungepaarter t-Test.*

Die Kontrolle wird mit $100 \pm 27,1\%$ normiert. Nach mechanischer Zugbelastung ist der Messwert mit $628 \pm 15,28\%$ signifikant erhöht.

Mechanische Zugbelastung führt laut der erzielten Ergebnisse zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase Untereinheiten auf Protein-, sowie mRNA-Ebene.

3.12 Die Aktivierung kardialer Transkriptionsfaktoren von ES-Zellen nach mechanischer Zugbelastung

3.12.1 Die Untersuchung von GATA 4 nach mechanischer Zugbelastung

Der Transkriptionsfaktor GATA 4 ist in der Embryogenese für die Entwicklung des Herzschauches von großer Bedeutung (Kuo et al, 1997).

Die EBs werden an Tag drei der Differenzierung aus der Spinnerflasche entnommen und auf die Silikonmembranen ausgesät. Die elastischen Membranen mit den aufsitzenden EBs werden 24 Stunden später um 10% gedehnt. Weitere 24 Stunden später erfolgt die Analyse der Zellen mittels der Methode der PCR.

Das Diagramm 3-20 zeigt einen signifikanten Anstieg von GATA 4 mRNA nach mechanischer Zugbelastung auf $162 \pm 15,8\%$ im Vergleich zum Messwert der normierten Kontrolle von $100 \pm 13,8\%$. Unter NMPG-Inkubation kommt es bei den ES-Zellen unter mechanischer Zugbelastung zu einem signifikanten Anstieg von GATA 4 auf $402 \pm 11,3\%$, bei den Kontrollzellen mit Radikalfängerinkubation zu einem Anstieg von $227 \pm 13,6\%$.

Aufgrund dieses Versuchsergebnisses lässt sich festhalten, dass der Einsatz der Antioxidans die Expression von GATA 4 steigert.

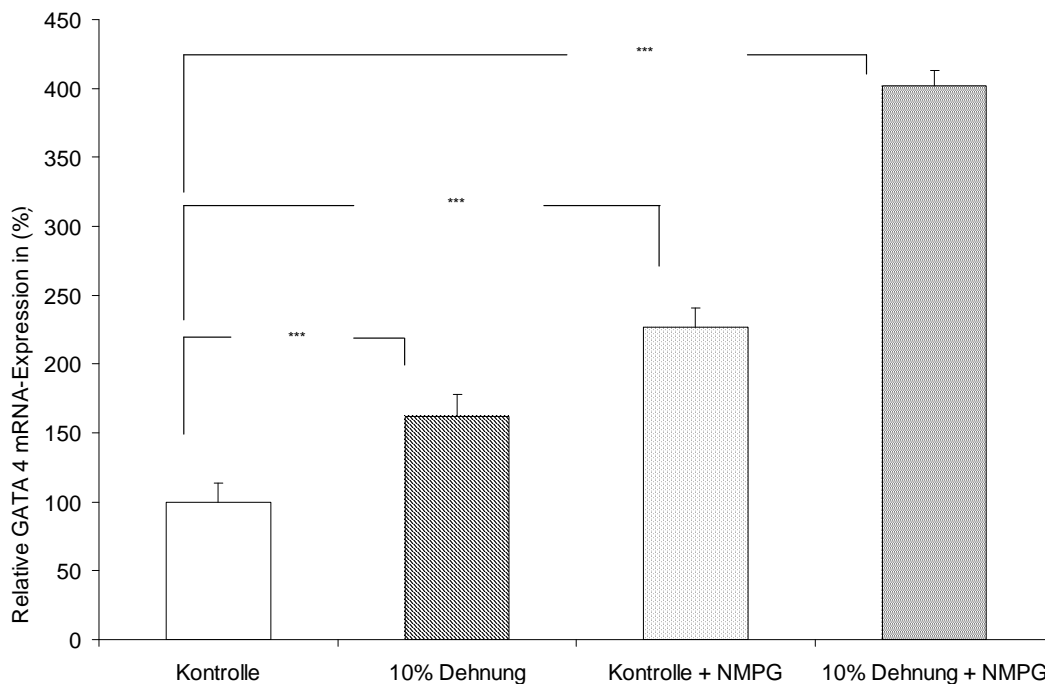


Abbildung 3-20 GATA 4 mRNA-Expression nach mechanischer Zugbelastung und Einfluss von NMPG (100 μ M)

*Mechanische Zugbelastung führt zu einem Anstieg der GATA 4 mRNA-Expression. Dieser Expressionsanstieg lässt sich durch eine Inkubation mit dem Radikalfänger NMPG noch verstärken. Auswertung der RT-PCR (n = 4)*** $P \leq 0,001$, einfaktorierter Anovatest.*

3.12.2 Die Untersuchung von MEF-2c nach mechanischer Zugbelastung

MEF-2c ist als kardialer Transkriptionsfaktor wichtig für die embryonale Entwicklung des Herzens und des vaskulären Plexus.

Die EBs werden an Tag drei der Differenzierung aus der Spinnerflasche entnommen und auf die Silikonmembranen ausgesät. Die elastischen Membranen mit den aufsitzenden EBs werden 24 Stunden später um 10% gedehnt. Weitere 24 Stunden später erfolgt die Analyse der Zellen mittels der Methode der PCR.

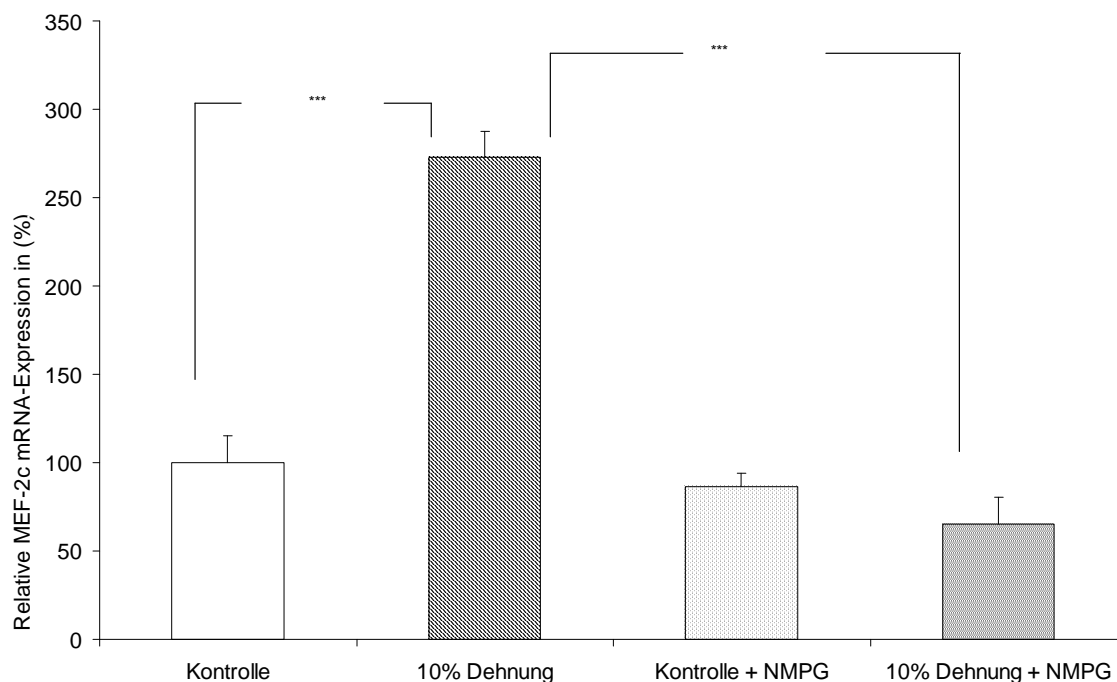


Abbildung 3-21 MEF-2c mRNA-Expression nach mechanischer Zugbelastung und Einfluss von NMPG (100 μ M)

*Mechanische Zugbelastung führt zu einem Anstieg der MEF-2c mRNA-Expression. Dieser Expressionsanstieg lässt sich durch eine Inkubation mit dem Radikalfänger NMPG signifikant inhibieren. Auswertung der RT-PCR (n = 4).*** $P \leq 0,001$, einfaktorierter Anovatest.*

Abb. 3-21) zeigt das Untersuchungsergebnis der MEF-2c mRNA- Regulation unter mechanischer Zugbelastung. Die Kontrolle wird mit $100 \pm 15,4\%$ normiert. Unter mechanischer Zugbelastung steigt die MEF-2c mRNA-Expression auf $273 \pm 14,4\%$ signifikant an. Zusätzlich werden Zellen vor der mechanischen Induzierung mit NMPG (100 μ M) inkubiert. Unter Inkubation mit dem Radikalfänger kann der Effekt der Expressionssteigerung von MEF-2c mRNA unter mechanischer Zugbelastung auf $65 \pm 15,8\%$ signifikant inhibiert werden. Die NMPG-Inkubation von Kontrollzellen liegt bei $86,5 \pm 7,4\%$ und ist nicht signifikant verändert zu der Kontrollprobe. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint die MEF-2c-Expression abhängig von der zellulären ROI-Konzentration zu sein.

3.13 Der Einfluss der Radikalfänger Trolox und NMPG auf die Endothelzell- und Kardiomyozytendifferenzierung von ES-Zellen nach mechanischer Zugbelastung

Ziel dieser Experimente ist eine Analyse der Vaskulo- und Kardiomyogenese von ES-Zellen in Abhängigkeit von der ROI-Generierung.

Nach drei Tagen Differenzierung in den Spinnerflaschen werden die EBs auf die Silikonmembranen der Bioflexplatte[®] ausgesät und 24 Stunden später gedehnt. Ein Teil der Zellen wird zwei Stunden vor Beginn der mechanischen Zugbelastung bis zum Zeitpunkt der Fixierung mit den jeweiligen Radikalfängern im Nährmedium (jeweils 100 μ M) inkubiert. Am Tag acht der Differenzierung erfolgt die Analyse der PECAM-1 positiven Fläche (Analyse unter dem cLSM), sowie die Anzahl der kontrahierenden Areale (Auswertung unter dem Lichtmikroskop).

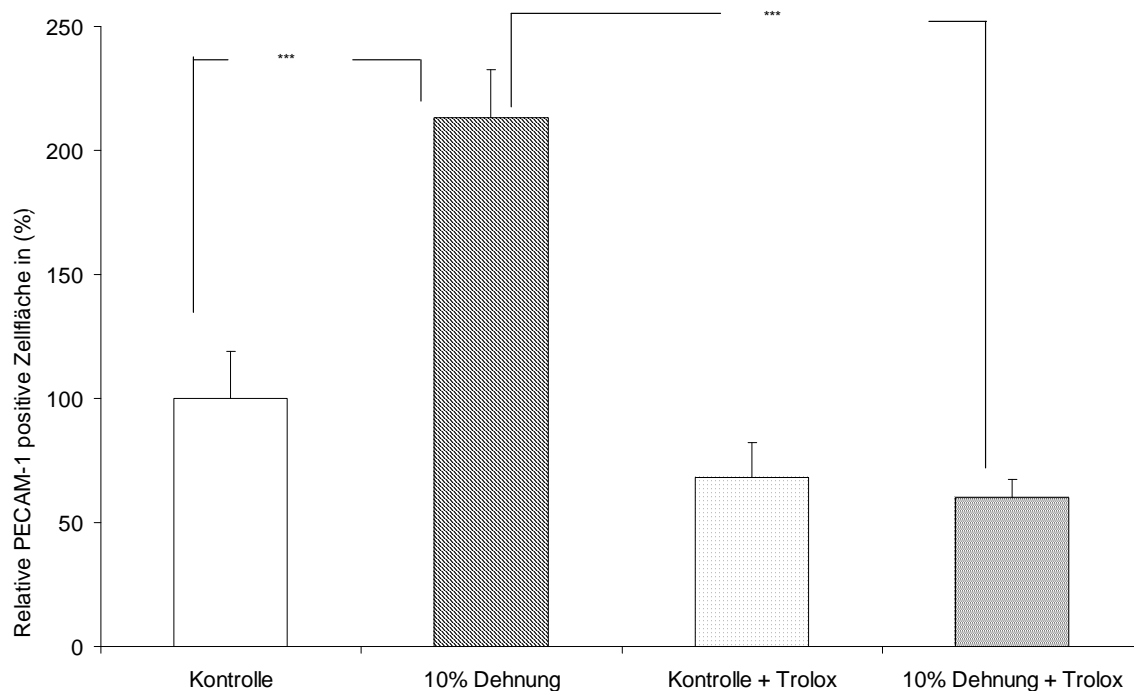


Abbildung 3-22 A) und B) zeigen die Auswirkungen der Radikalfänger auf die Größe der PECAM-1 positiven Zellfläche.

In Grafik A) ist die PECAM-1 positive Zellfläche nach mechanischer Zugbelastung mit $213 \pm 19,4$ im Vergleich zur normierten Kontrolle mit $100 \pm 18,8\%$ signifikant erhöht. Dieser Effekt kann durch eine Inkubation mit Trolox auf $60,2 \pm 7,4\%$ signifikant abgefangen werden.

Die Troloxinkubation der Kontrollzellen liegt bei einem Messwert von $68,2 \pm 14\%$ und ist somit im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht signifikant verändert.

Abbildung 3-22 A) PECAM-1 positive Zellfläche nach mechanischer Zugbelastung und Auswirkung des Radikalfängers Trolox (100 μ M)

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der PECAM-1 positiven Zellfläche. Dieser Anstieg kann durch den Einsatz des Radikalfängers Trolox signifikant inhibiert werden. Auswertung der Immunzytochemie (n=4). *** $P \leq 0,001$, einfaktorierter Anovatest.*

Diagramm B) zeigt die PECAM-1 positive Fläche unter mechanischer Zugbelastung und NMPG-Inkubation der EBs. Die Kontrolle wird mit $100 \pm 17,2\%$ normiert. Die PECAM-1 positive Gewebsfläche ist mit $260 \pm 19\%$ signifikant erhöht. Diese Vergrößerung der Gefäßfläche kann durch NMPG-Inkubation auf $147 \pm 20,6\%$ signifikant inhibiert werden. Die mit dem Radikalfänger NMPG behandelte Kontrollprobe liegt bei $96,4 \pm 19,8\%$.

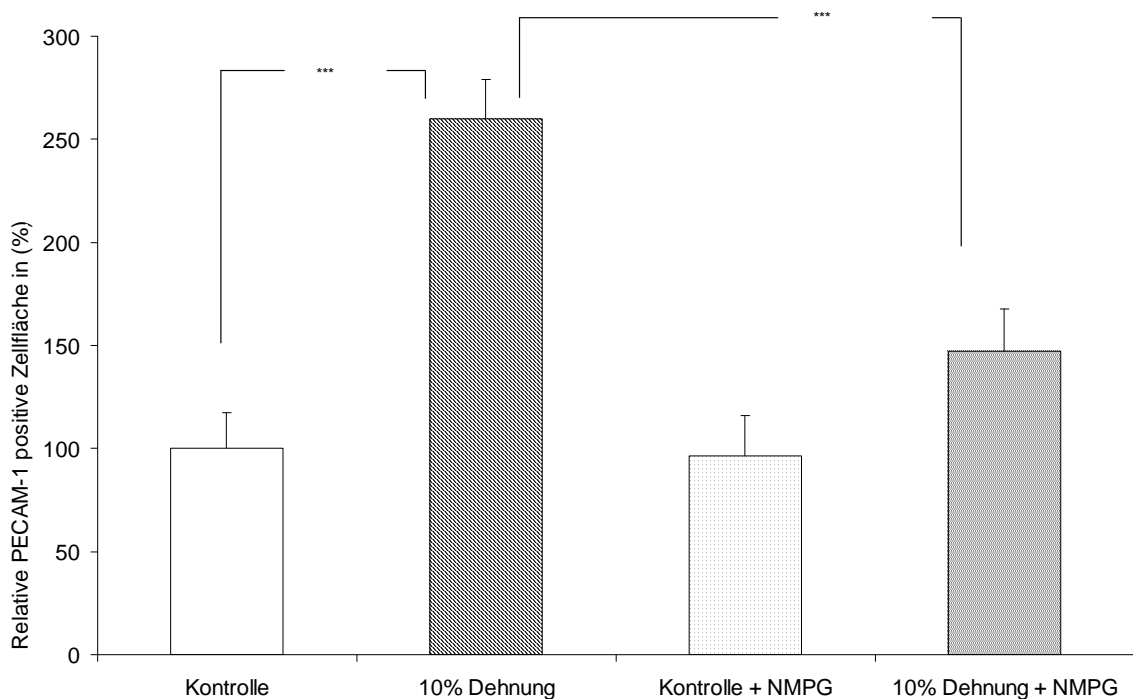


Abbildung 3-22 B) PECAM-1 positive Zellfläche nach mechanischer Zugbelastung und Auswirkung des Radikalfängers NMPG (100 μ M)

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der PECAM-1 positiven Zellfläche. Dieser Anstieg kann durch den Einsatz des Radikalfängers NMPG signifikant inhibiert werden. Auswertung der Immunzytochemie (n=4). *** $P \leq 0,001$, einfaktorierter Anovatest.*

Die Abbildungen 3-23 A) und B) zeigen die Anzahl kontrahierender Areale unter Radikalfängerinkubation. Es werden die Anzahl der kontrahierenden Areale und die Anzahl der auf einer Platte vorhandenen EBs ausgezählt und der Prozentsatz der Kardiomyozytenareale pro Platte ermittelt und zueinander in Relation gesetzt

Diagramm A) zeigt mit Trolox inkubierte EBs. Die Kontrollprobe wird mit 100% normiert. Nach mechanischer Zugbelastung ist die Anzahl der Kardiomyozytenareale mit $204,9 \pm 57,5\%$ signifikant erhöht. Die Anzahl der kontrahierenden Areale kann durch eine Troloxinkubation auf $80,5 \pm 33,8\%$ signifikant reduziert werden. Bei den Kontrollzellen unter Troloxinkubation liegt der Messwert bei $60,1 \pm 30,9\%$.

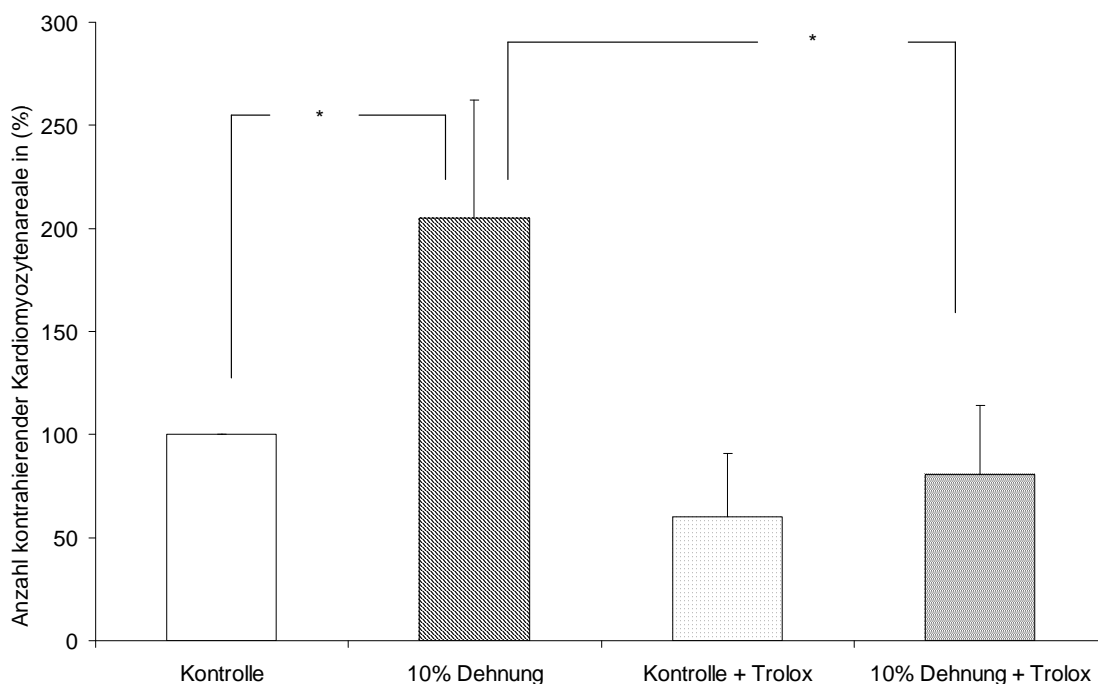


Abbildung 3-23 A) Anzahl kontrahierender Areale nach mechanischer Zugbelastung und Einfluss des Radikalfängers Trolox (100 µM)

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl der kontrahierenden Kardiomyozytenareale. Unter Inkubation der ES-Zellen mit dem Radikalfänger Trolox kann dieser Effekt signifikant inhibiert werden. Auswertung unter dem Lichtmikroskop (n = 3). * $P \leq 0,05$, einfaktorierter Anovatest.*

In Diagramm 3-23 B) ist eine Reduzierung der Anzahl kontrahierender Areale unter der Inkubation mit NMPG zu beobachten. Die Kontrolle wird mit 100% normiert. Nach

mechanischer Zugbelastung steigt die prozentuale Anzahl der Kardiomyozytenareale im Vergleich zur Kontrolle signifikant auf $217 \pm 93\%$ an.

Die Anzahl der Kardiomyozytenareale unter NMPG-Inkubation kann in den ES-Zellen nach mechanischer Zugbelastung signifikant auf $60 \pm 23\%$ abgefangen werden. Das Ergebnis der mit NMPG inkubierten Kontrollzellen liegt bei $47 \pm 9\%$.

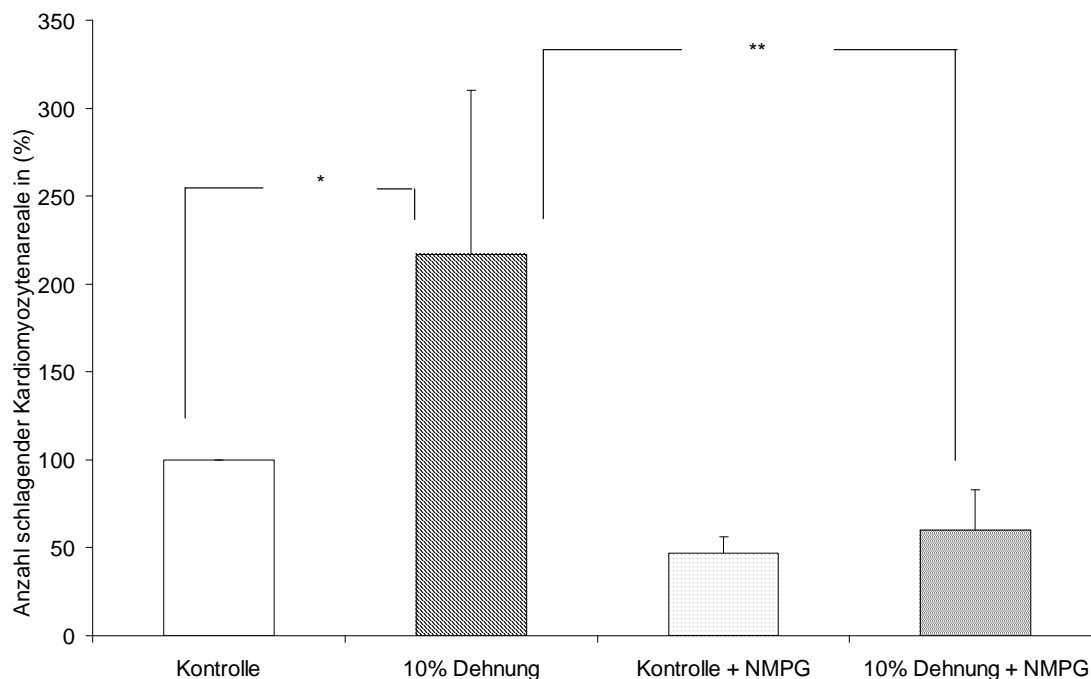


Abbildung 3-23 B) Anzahl kontrahierender Areale nach mechanischer Zugbelastung und Einfluss des Radikalfängers NMPG (100 μ M)

*Unter mechanischer Zugbelastung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl der kontrahierenden Kardiomyozytenareale. Unter Inkubation der ES-Zellen mit dem Radikalfänger NMPG kann dieser Effekt signifikant inhibiert werden. Auswertung unter dem Lichtmikroskop ($n = 4$). * $P \leq 0,05$ Vergleich Kontrolle und 10% Dehnung. ** $P \leq 0,01$ Vergleich 10% Dehnung und 10% Dehnung unter Inkubation mit dem Radikalfänger NMPG, einfaktorierter Anovatest.*

3.14 Untersuchung der Zytotoxizität mechanischer Zugbelastung auf ES-Zellen der Maus.

Da sich die Frage stellt, ob eine extern einwirkende mechanische Zugbelastung toxisch auf die behandelten EBs wirkt wird ein Sytox Green[®]-Assay durchgeführt.

Sytox Green[®] färbt mit hoher Affinität Nukleinsäuren an und dringt durch permeabilisierte Zellmembranen toter Zellen. Der Farbstoff ist nicht in der Lage die intakte Zellmembran von lebenden Zellen zu durchdringen.

Die Fluoreszenz steigt dabei proportional zum Anteil toter Zellen in der Kultur.

Die Anregung des Farbstoffes erfolgt dabei unter dem cLSM bei 488 nm, die Messung der Fluoreszenz liegt bei 490 nm.

Zur Versuchsdurchführung werden EBs nach mechanischer Induzierung 25 Minuten in einem 100 nM Iscoves Medium inkubiert und die Anzahl der Sytox Green[®] positiven Zellen ausgezählt. Es können keine aussagekräftigen Unterschiede im Vergleich der Kontrolle und der Probe unter mechanischer Zugbelastung nachgewiesen werden. Somit gibt es kein Indiz, dass die in dieser Studie angewendeten mechanischen Kräfte zytotoxisch auf ES-Zellen wirken.

4 Diskussion

Das naturwissenschaftliche Interesse an der Entwicklungsbiologie von ES-Zellen steigt heutzutage stetig an. So weckt das gegenwärtige Wissen über kardiovaskuläre Differenzierung Hoffnungen auf einen medizinischen Einsatz in der Patiententherapie. Die klinische Forschung setzt hohe Erwartungen auf den therapeutischen Einsatz von Stammzellen zur Behandlung der unterschiedlichsten Erkrankungen, beispielsweise zur Gegensteuerung bei einem nicht regenerativen Verlust spezifischer Körperzellen. Ziel der Grundlagenforschung an ES-Zellen ist, die gewonnenen in *vitro* Kenntnisse in naher Zukunft in *vivo* an Patienten anzuwenden.

Der Zusammenhang zwischen mechanischer Stimulation und den morphogenetischen Prozessen der Herzschlauchentwicklung, der myokardialen Trabekulation, der kardialen Muskelfaseranordnung und der Herzklappenentstehung wird schon seit längerer Zeit diskutiert (Taber, 1998). Es ist anzunehmen, dass ES-Zellen während des Wachstums im dreidimensionalen Gewebeverband ständigen mechanischen Zugbelastungen ausgesetzt sind. Während der Differenzierung der EBs gewinnen diese an Größe und Volumen; dadurch kommt es in *vitro* in den EBs zu wachsenden Gewebsspannungen. Die entstehenden Kräfte setzen an jeder einzelnen Zelle des Gewebes an. Die Folge kann eine Initialisierung embryonaler Differenzierungsabläufe sein, wie beispielsweise eine induzierte Kardiomyogenese.

Durch Einwirken externer physikalischer Kräfte auf Stammzellen nach Transplantation in das Empfängergewebe könnten die Zellen gezielt zum Zellüberleben, zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden. Gerade am Herzen treten physiologisch eine große Zahl unterschiedlichster Krafteinwirkungen auf. So könnte beim Herzinfarktpatienten das kontrahierende Organ selbst eine Differenzierung der injizierten Stammzellen zu funktionstüchtigen Kardiomyozyten im infarkten Gewebe unterstützen. Der Erfolg der klinischen Therapie mit ES-Zellen könnte durch den Einsatz mechanischer Induzierungen positiv beeinflusst werden.

Die vorliegende Dissertation beschreibt die Vaskulo- und Kardiomyogenese von ES-Zellen der Maus der Stammzelllinie CCE S103, die durch kurzzeitig ansetzende mechanische

Zugbelastung induziert wird. In diesem Zusammenhang kann intrazellulär freigesetzten ROIs eine wichtige Rolle als Signalmoleküle innerhalb der kardiovaskulären Signalkaskade zugestanden werden.

Die im Abschnitt Ergebnisse erhobenen Daten werden in diesem Teil der Promotionsarbeit im Detail erklärt, bewertet und diskutiert.

4.1 Die positive Auswirkung mechanischer Zugbelastung auf die kardiovaskuläre Differenzierung von ES-Zellen der Maus

Für die aktuelle Forschung ist es von großem Interesse, neue Erkenntnisse über Regulationsmechanismen der Differenzierung von ES-Zellen zu erlangen, zumal diese Thematik viele Fragen bis heute unbeantwortet lässt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen, dass die Dehnung einer elastischen Membran und einer damit verbundenen Dehnung und Stauchung der anhaftenden ES-Zellen zu einer vermehrten Differenzierung in Endothelzellen und Kardiomyozyten führt.

In Abschnitt 3.1 wird gezeigt, dass eine zweistündige Dehnung der Membran um 10% die Größe der PECAM-1 positiven Gefäßflächen signifikant erhöht. Bei einer noch stärkeren Zugbelastung der Zellen kann dieser positive Effekt wieder aufgehoben werden.

Die Herzmuskelzellen (Abschnitt 3.2), erreichen bei einer Dehnung der Silikonmembran um 20% eine maximale Anzahl kontrahierender Areale. Eine noch stärkere Dehnung der Membran der Bioflexplatten konnte aufgrund der technischen Gegebenheiten des Flexercell Systems[®] nicht durchgeführt werden.

Die Tatsache, dass abhängig von der Stärke der Membrandehnung die Differenzierung der ES-Zellen unterschiedlich induziert wird, lässt sich mit einer vermehrten Freisetzung von ROI unter zunehmender mechanischer Einwirkung begründen. Diese ROI fungieren in niedrigen Konzentrationen als intrazelluläre Signalmoleküle, können aber in zu hohen Konzentrationen auch zu Zell- und Gewebeschäden führen. Der durch ROI ausgelöste oxidative Stress schädigt auf der Ebene der DNA und endet häufig in der Apoptose von Zellen (Kim et al, 2005).

Überdehnung der Zellverbände durch zu massive mechanische Zugbelastung können zu irreversiblen Schäden führen. Als Folge hiervon kann eine Reduzierung der Differenzierung der ES-Zellen auftreten.

Dass bei verschiedenen starken Dehnungen der Membran die maximale Induzierung der Gefäßflächengröße und der kontrahierenden Herzmuskelzellen auftreten, kann auf den unterschiedlichen Signalkaskaden der Kardio- und Vaskulogenese beruhen. Die Kaskaden können wiederum unterschiedlich sensibel auf intrazelluläre ROI-Konzentrationen und Überdehnungsschäden reagieren.

Das intensive Studium der Kardiomyozytendifferenzierung von ES-Zellen zeigt ein vermehrtes Vorkommen kontrahierender Areale in zueinander benachbarten Gewebsbereichen. Kontrahierende Areale können durch ihre Eigenbewegung somit die umliegenden Zellen zur verstärkten Kardiomyogenese anregen. Diese Eigenschaft kann unter stärkerer mechanischer Zugbelastung eine maximale Induzierung der Kardiomyogenese bewirken.

Im Abschnitt 1.1 der Dissertation wird der Einfluss mechanischer Zugbelastung auf Zellen und Gewebeverbände beschrieben. Die Arbeitsgruppe Sauer untersuchte die Auswirkung eines kurzzeitig angelegten elektrischen Feldes auf die Differenzierung von ES-Zellen der Maus. Infolge der Strombehandlung kam es, abhängig von der gewählten Stromdosis, zu einer redoxabhängigen Stimulierung der Kardiovaskulogenese. Die Studie sieht in den generierten ROIs ein wichtiges Signalmolekül der untergeordneten Signalkaskade (Sauer et al, 2005).

Mechanische Dehnung als Hauptursache der kardialen Hypertrophie wird schon seit längerer Zeit thematisiert. Neonatale Kardiomyozyten steigern unter Einwirkung mechanischer Kräfte die Sekretion und Produktion vasoaktiver Peptide, wie Angiotensin II und Endothelin, die wiederum Schlüsselrollen in der kardialen Hypertrophie einnehmen (Komuro I, 2001 und 2000).

Eine sehr aktuelle Untersuchung beschäftigt sich mit dem Effekt laminarer Scherkräfte auf ES-Zellen (Illi et al, 2005). Scherstress steigerte hier die Lysinacetylierung von Histon H3 an Position 14, die Serinphosphorylierung an Position 10 (S10) und die Lysinmethylierung an Position 79 (K79). Zusätzlich wurden Herzmarker durch den Scherstress positiv beeinflusst.

Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen einer japanischen Arbeitsgruppe (Yamamoto et al, 2004). In den Versuchen wurden Flk-1-positive ES-Zellen der Maus einem statischen Flüssigkeitsstrom ausgesetzt. Als Folge konnten einen Expressionsanstieg des Flk-1, des vaskulären endothelialen Cadherin und des PECAM-1 auf Protein- sowie auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

Die redoxsensitive Regulation der PECAM-1 Thyrosinphosphorylierung in Zellen unter H₂O₂ Inkubation konnte von einer amerikanischen Arbeitsgruppe (Maas et al, 2003) gezeigt werden. Die Forscher fanden heraus, dass PECAM-1 ein Sensor für oxidativen Stress, besonders im Entzündungsprozess, darstellt.

Somit konnte wissenschaftlich schon mehrfach ein Zusammenhang zwischen mechanischen, extern einwirkenden Kräften und einer gesteigerten kardiovaskulären Differenzierung gezeigt werden. ROIs können hierbei wichtige Bedeutung in der Signaltransduktion einnehmen.

4.2 Die Rolle von HIF-1 α und VEGF in der vaskulären Signalkaskade von ES-Zellen nach mechanischer Zugbelastung

Bedeutung und Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor HIF-1 α und der VEGF-Expression in der vaskulären Signalkaskade ist schon intensiv untersucht worden (Akeno et al, 2002; Shih et al, 2001).

In der vorliegenden Studie kommt es nach mechanischer Zugbelastung auf Gen- und Proteinebene zu einer signifikant gesteigerten HIF-1 α -Expression. Gleichzeitig steigt nach mechanischer Stimulierung die VEGF-Expression in ES-Zellen der Maus (siehe Abschnitt 3.3/3.4).

Die Involvierung der VEGF-Expression in die Vaskulogenese von ES-Zellen der Maus konnte durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe Sauer/Wartenberg bewiesen werden (Wartenberg et al, 2001).

Eine deutsche Arbeitsgruppe aus Münster (Petersen et al, 2004) erhielt durch zyklische Dehnung von Fibroblasten ähnliche Resultate. Folge der mechanischen Induzierung waren ein gleichzeitiger Anstieg von HIF-1 α und VEGF.

Der redoxensitive Zusammenhang zwischen einer ROI-Generierung und dem HIF-1 α und dem VEGF-Anstieg konnte schon in einer Studie der Arbeitsgruppe Sauer/Wartenberg über die Auswirkungen von elektrischen Feldern auf die Stammzellendifferenzierung nachgewiesen werden (Sauer et al, 2005).

Die Aktivierung von HIF-1 α als Zellantwort auf Verschiebungen von intrazellulären Sauerstoffkonzentrationen wurde kürzlich in einer aktuellen deutschen Studie nochmals aufgegriffen (Kietzmann et al, 2005).

Unter mechanischer Zugbelastung kann in der vorliegenden Promotionsarbeit eine Abhängigkeit der intrazellulären ROI-Freisetzung und eine Steigerung von HIF-1 α und VEGF gezeigt werden. Durch Vorinkubation der Zellen mit freien Radikalfängern konnten erzielte Stimulationseffekte in der Vaskulogenese konsequent inhibiert werden.

HIF-1 α kann in seiner Aktivität auch durch Erk 1/2 und JNK beeinflusst werden (Liu et al, 2003; Commerford, 2004).

Mechanische Zugbelastung führt angesichts der vorliegenden Ergebnisse zu einer vermehrten Generierung intrazellulärer ROI. Die Veränderung der zellulären ROI kann zu einer Stimulierung von HIF-1 α und des VEGF führen. VEGF spielt eine Schlüsselrolle in der Differenzierung und im Wachstum von Endothelzellen.

4.3 Die Funktion intrazellulärer ROI in der kardiovaskulären Signalkaskade von ES-Zellen nach mechanischer Zugbelastung

Die Stimulation der ROI durch mechanische Zugbelastung wird an Tag vier der Differenzierung analysiert. Zu diesem Zeitpunkt der ROI-Generierung befinden sich die Stammzellen in einem undifferenzierten Entwicklungsstadium. In *vitro* bilden sich die Zelllinien des Herzkreislaufsystems zwischen Tag 6 und 9 der Entwicklung aus (Hescheler et al, 1999).

Augenscheinlich ist die Erhöhung der ROI-Konzentration zu diesem Zeitpunkt ein entscheidendes Ereignis, das die unterschiedlichen Differenzierungsprogramme und –abläufe einleitet. Da ROI frei im Zellgewebe diffundieren und zellmembranpermeable Moleküle sind,

ist anzunehmen, dass individuelle Zellen durch ROI-Konzentrationen in ihrer Differenzierungsfähigkeit zu beeinflussen sind.

Bei der Thematik der Stammzellforschung liefert die vorliegende Dissertation neue Erkenntnisse und Informationen. Im angewendeten Versuchsmodell werden durch mechanische Zugbelastung einerseits kurzfristig die ROI-Konzentrationen erhöht (Abschnitt 3.5). Andererseits wird durch eine Aktivierung der NADPH-Oxidase für eine langfristige Steigerung des intrazellulären ROI-Niveaus gesorgt (Abschnitt 3.8).

Die Induzierung der ROIs durch zyklische, mechanische Zugbelastungen bei Endothelzellen (Howard et al, 1997; De Keulenaar et al, 1998; Hwang et al, 2003; Wang et al, 2001), bei Zellen der glatten Muskulatur (Cowan et al, 2003; Grote et al, 2003; Chen et al, 2003) und bei isolierten Herzmuskelzellen des Ventrikels (Aikawa et al, 2001; Yatamoto et al, 1999) ist ein bereits intensiv untersuchtes Phänomen.

Die Arbeitsgruppe Sauer/Wartenberg wies in früheren Studien darauf hin, dass es auch bei unbehandelten Stammzellen im Differenzierungsstadium zu einer kontinuierlichen Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen kommt (Sauer et al, 2000). Die intrazellulär erzeugten ROIs greifen in Signalkaskaden ein, aktivieren Transkriptionsfaktoren und Gene und beeinflussen somit zielgerichtet die kardiovaskuläre Differenzierung. Somit scheinen ROIs in niedrigen Konzentrationen signalvermittelnde Moleküle zu sein.

Eine induzierte Kardiomyogenese durch geringe ROI-Konzentrationen in nanomolaren Bereich, ausgelöst durch elektrische Felder oder exogen appliziertes H₂O₂, demonstrierte die Arbeitsgruppe Sauer/Wartenberg mehrfach (Sauer et al 1999; Sauer et al, 2000). Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen der Cardiotrophin-1 (CT-1) -Induzierung in embryonalen Kardiomyozyten und der ROI-Konzentration gezeigt werden.

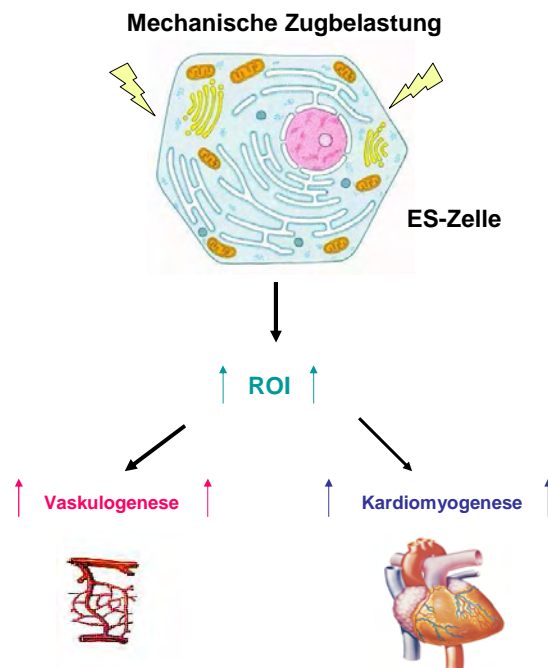


Abbildung 4-1 ROIs als wichtiger Signaltransduktor in der Vaskulo- und Kardiomyogenese von ES-Zellen der Maus nach mechanischer Zugbelastung

Experimentelle mechanische Zugbelastung erhöht die intrazelluläre ROI-Generierung. Die freigesetzten ROIs nehmen als Signalmoleküle Einfluss auf die kardiovaskuläre Differenzierung von ES-Zellen der Maus.

4.4 Die Rolle der NADPH-Oxidase nach mechanischer Zugbelastung bei der Freisetzung von ROI

Unter den möglichen Entstehungsmöglichkeiten von ROIs innerhalb der Zelle ist bis heute die enzymatische Aktivität der NADPH-Oxidase von phagozytierenden Zellen am besten analysiert. Das Vorhandensein dieser Plasmamembran-gebundenen Oxidase konnte auch in nicht phagozytierenden Zellen beschrieben werden (Segal et al, 1997).

In Stammzellen können die NADPH-Oxidase Untereinheiten p47-phox, p22-phox, gp91-phox und p67-phox während der Differenzierung nachgewiesen werden (Sauer et al, 2005).

Es stellt sich nun die Frage, ob die durch mechanische Zugbelastung induzierten ROIs durch die NADPH-Oxidase generiert werden.

In der vorliegenden Dissertation kann eine Aktivierung der NADPH-Oxidase Untereinheiten *Nox 4*, p22-phox, p47-phox und p67-phox 24 h nach mechanischer Dehnung der Zellen mittels der immunzytochemischen Färbung nachgewiesen werden (Abschnitt 3.8). Diese Daten können auch auf m-RNA Ebene experimentell belegt werden. Die RT-PCR zeigt eine verstärkte Expression der *Nox 1* und *Nox 4*.

In der Literatur existieren bereits viele Beispiele, laut denen ROIs nach Stimulation phagozytierender oder nicht phagozytierender Zellen durch Liganden freigesetzt werden. In den meisten Fällen kann dort die NADPH-Oxidase als Quelle der ROI-Produktion ausgemacht werden (Thannickal et al, 2000; Thannickal et al, 1998).

Eine Aktivierung der NADPH-Oxidase in Endothelzellen durch mechanische Dehnung konnte schon von einer amerikanischen Forschergruppe demonstriert werden (Chapmann et al, 2005). In den Experimenten wurden pulmonale Endothelzellen zyklischen Zugbelastungen ausgesetzt. Nach zwei Stunden mechanischer Induzierung konnte ein Anstieg der NADPH-Oxidase Aktivität vermerkt werden. Gleichzeitig wurden in diesen Experimenten ein intrazellulärer Anstieg der ROI-Generierung beobachtet.

Ähnliche Resultate liefert eine Studie über glatte Arterienmuskulatur unter zyklischer Zugbelastung (Mata-Greenwood et al, 2005). Unter mechanischer Dehnung stieg in den Muskelzellen die NADPH-Oxidase an. Gleichzeitig konnte eine erhöhte intrazelluläre ROI-Konzentration vermerkt werden.

Frühere Studien der Arbeitsgruppe Sauer/Wartenberg setzten sich mit Aktivierung der NADPH-Oxidase durch exogen zugeführte physikalische Stimuli auseinander. Während der Differenzierung von ES-Zellen kommt es zu einer kontinuierlichen Freisetzung von ROI in EBs, deren Quelle eine NADPH-Oxidase darstellt. Durch den konsequenten Einsatz spezifischer Blocker der NADPH-Oxidase, wurde die durch elektrische Felder induzierte Radikalfreisetzung deutlich verringert (Sauer et al, 2005).

Die in der Studie erzielten Daten weisen auf eine Beteiligung der NADPH-Oxidase als Ursprungsquelle der intrazellulären ROI hin. Die Aktivität der Oxidase kann durch mechanische Zugbelastung induziert werden (siehe Abschnitt 3.8).

4.5 Die Rolle der MAPKs nach mechanischer Zugbelastung in der kardiovaskulären Signaltransduktion

Für die Vermittlung und Modulation von Informationen zwischen dem Zellkern und den an der Zellmembran sitzenden Rezeptoren ist ein Netzwerk verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden notwendig.

Unter diesen Kaskaden mit ihren zahlreichen Enzymen, Aktivierungsschritten und Interaktionen spielen die drei mitogen aktivierten MAPKs p38, ERK 1/2 und JNK in der Regulation von Zelldifferenzierung und -proliferation eine wichtige Rolle (siehe auch Abschnitt 1.10).

Die exogene Applikation mechanischer Zugbelastung auf ES-Zellen führt zu einer signifikanten Induzierung der kardiovaskulären Differenzierung (siehe Abschnitt 4.1).

Ein zu klärender Punkt bleibt weiterhin, ob und inwiefern die drei mitogen aktivierten MAPKs bei der Übermittlung dieser Differenzierungsreize eine Rolle spielen.

Um dies herauszufinden werden die Zellen nach Stimulierung durch mechanische Reize auf die Aktivierung der Mapkinasen hin untersucht. Es wird mit phosphospezifischen Antikörpern gearbeitet, die nur auf die aktive Form des entsprechenden Enzyms reagieren.

4.6 Mechanische Zugbelastung als Aktivator von p38

Dass mechanische Zugbelastung als wichtiger Stimulator der MAPK p38-Aktivität in ES-Zellen der Maus anzusehen ist, kann im Abschnitt 3.7 gezeigt werden.

Nach einer halben Stunde mechanischer Stimulierung ist das Maximum der Aktivierung erreicht. Durch den Einsatz von Radikalfängern kann die redoxabhängige Phosphorylierung erfolgreich inhibiert werden.

Ein Ausschalten der MAPK durch den spezifischen Inhibitor SB203580 lässt unterschiedliche Aussagen über die Rolle der p38 in der Vaskulo- und Kardiomyogenese zu (siehe Abschnitt 3.10). Die MAPK p38 ist von entscheidender Bedeutung in der embryonalen Kardiomyogenese. Das Phänomen lässt sich bei den mechanisch-gedehnten Zellen, sowie bei

den Kontrollzellen beobachten. Durch eine konsequente Inhibition der MAPK mit SB203580 kommt es zu einer signifikanten Reduzierung der kontrahierenden Kardiomyozytenareale (siehe Abbildung 3.16). Die Vaskulogenese hingegen scheint von der Aktivierung der MAPK p38 unbeeinflusst. Bei der Untersuchung PECAM-1 positiven Gefäßareale kommt es zu keiner signifikanten Veränderung (siehe Abbildung 3.17).

Schon seit einem längerem Zeitraum wird der p38 MAPK-Aktivierung eine besondere Rolle in der Herzmuskeldifferenzierung zugeteilt. In der Literatur wurde eine Aktivierung der MAPK p38 im Zusammenhang mit einer gesteigerten MEF-2c Aktivität beschrieben (Zao et al, 1999).

Weiterhin konnten Wissenschaftler durch eine Inhibition von p38 mit spezifischen Blockern Differenzierungsabläufe bestimmter Muskelzelllinien und humaner primärer Myozyten unterdrücken und verzögern. Gleichzeitig wurde durch externe Aktivierung der Mapkinase eine Transkriptionssteigerung von MEF-2c durch direkte Phosphorylierung erreicht (Wu et al, 2000).

Zusammenhänge zwischen der p38-, sowie der ERK 1/2-Aktivierung konnten mit der stress-induzierten Steigerung der GATA 4 Bindungsbereitschaft im adulten Herzen festgestellt werden (Tenhunen et al, 2004). Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass es vergleichbare Abläufe in der Differenzierung von ES-Zellen in Kardiomyozyten und Endothelzellen sowie im adulten, intakten Herzen gibt.

Die Verbindung zwischen ROI und der Tätigkeit der MAPKs werden schon länger diskutiert (Torres et al, 2003; Sauer et al, 2001) und bestätigen die in unserer Studie erhobenen Daten.

Dass zwischen der p38-Aktivierung und der embryonalen Vaskulogenese kein sichtbarer Zusammenhang zu sehen ist, zeigte die Arbeitsgruppe Sauer/Wartenberg schon zu einem früheren Zeitpunkt. Bei den Untersuchungen des Einflusses elektrischer Felder auf die Vaskulogenese von ES-Zellen konnten keine Hinweise auf eine Involvierung der p38 MAPK in die vaskuläre Signalkaskade gefunden werden (Sauer et al, 2000).

4.7 Mechanische Zugbelastung als Aktivator von ERK 1/2

In der vorliegenden Studie kann eine Aktivierung von ERK 1/2 durch mechanische Zugbelastung gezeigt werden. Die maximale Aktivität der MAPK tritt nach 10minütiger mechanischer Dehnung auf (siehe Abschnitt 3.8). Durch Inkubation mit dem Radikalfänger Trolox kann dieser Effekt konsequent inhibiert werden. Rückschlüsse auf eine Verbindung zwischen der ROI-Generierung und der ERK 1/2 -Aktivierung sind somit nahe liegend.

Durch Inhibition von ERK 1/2 mit dem spezifischen Inhibitor UO126 lässt sich eine Reduzierung der Anzahl kontrahierender Areale, sowie der PECAM-1 positiven Gefäßfläche feststellen (siehe Abbildungen 3.16 und 3.17).

Nach mechanischem Einfluss konnte eine Aktivierung von ERK 1/2 in Endothelzellen schon mehrfach gezeigt werden (Offenberg Sweeny et al, 2004; Alexander, 2004).

Eine sehr aktuelle Studie beschreibt die Auswirkungen von ERK 1/2 auf Endothelzellen. Die humanen Lungenepithelzelllinien H441 und MLE15 wurden zyklischer mechanischer Zugbelastung ausgesetzt. Dieser Stimulus wurde für die normale Entwicklung der Lunge als wesentlich angesehen. Nach kurzer Stresseinwirkung konnte ein Anstieg der intrazellulären ROI beobachtet werden. Die generierten ROI hatten eine Aktivierung von ERK 1/2 und letztendlich eine Endothelzellproliferation zur Folge. Diese Zellproliferation konnte durch Inkubation der Zellen mit (N-)Acetylcystein sowie durch den Einsatz der spezifischen ERK 1/2 Blocker UO126 und PD98059 unterdrückt werden (Chess et al, 2005).

Durch Aktivierung der MAPKs ERK 1/2 und p38 wurde eine stressinduzierte Steigerung der GATA 4-Bindung im adulten Herzen festgestellt (Tenhunen et al, 2004).

Durch die Dehnung von Muskelzellen konnte eine Aktivierung der ERK 1/2 Phosphorylierung beobachtet werden (Hornberger et al, 2005).

Die Untersuchungen von Effekten elektrischer Felder auf die Vaskulogenese von ES-Zellen der Maus liefern weitere Erkenntnisse über die Involvierung von ERK 1/2 in die Signalkaskade der Gefäßentwicklung. Die ERK 1/2 -Aktivierung konnte durch den Radikalfänger Trolox inhibiert werden und deutet auf eine redoxsensible Regulierung von ERK 1/2 hin (Sauer et al, 2005).

4.8 Mechanische Zugbelastung als Aktivator von JNK

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen eine Aktivierung der MAPK JNK nach 10 Minuten mechanischer Zugbelastung. Der Effekt kann durch eine Inkubation mit dem Radikalfänger Trolox kontinuierlich inhibiert werden (siehe Abschnitt 3.9).

Die nach dem Einsatz des JNK-Blockers SP600125 erzielte Ergebnisse, schreiben der Proteinkinase eine wichtige Bedeutung in der kardiovaskulären Differenzierung von ES-Zellen der Maus zu (siehe Abbildungen 3.16 und 3.17). Betrachtet man die unterschiedlichen Einflüsse der drei untersuchten MAPKs auf die Herzzellentwicklung genauer, lässt sich erkennen, dass die prozentuale Anzahl der kontrahierenden Areale trotz eines signifikanten Ergebnisses bei der Blockade von JNK mit dem Inhibitor SP600125 am geringsten reduziert werden. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ist kein Unterschied in Größe und Schlagfrequenz der Areale zu erkennen.

Mechanische Kräfte als Aktivatoren von JNK wurden in der Literatur schon mehrfach beschrieben. Daher trägt das Enzym auch den Namen „stress-aktivierte Proteinkinase“. Weiterhin nehmen inflammatorische Zytokine, Tumornekrosefaktoren, bakterielle Endotoxine und chemischer sowie osmotischer Schock Einfluss auf intrazelluläre JNK Prozesse (Paul et al, 1997).

Der Einfluss intrazellulärer ROI-Konzentrationen auf die JNK-Aktivierung ist in der Forschung ein schon häufig diskutiertes Thema (Torres et al, 2003; Sauer et al, 2005; Sauer et al, 2001).

In neuesten Untersuchungen wird die JNK-Aktivität in der Kardiomyogenese in Zusammenhang mit einer gesteigerten MEF-2c-Expression gesehen. Experimentell wurden neonatale Ventrikelfibrozyten der Ratte mechanischer Zugbelastung ausgesetzt. Es kommt unter den Stimuli zu einer vermehrten JNK-Phosphorylierung. Dieser Phosphorylierung folgt eine verstärkte MEF-2c DNA-Bindungsaktivität (Nadruz et al, 2005).

Der kardiale Transkriptionsfaktor MEF-2c ist wiederum bedeutend für die Herzformation, den kardialen Auswurf und die Entstehung des rechten Ventrikels während der embryonalen Entwicklung der Maus (Dodou et al, 2004).

Die Rolle der JNK in der Vaskulogenese sieht eine japanische Arbeitsgruppe (Naruishi et al, 2003) in der Aktivierung von AP-1 in Fibroblasten. AP-1 nimmt eine Schlüsselrolle in der Transkription von VEGF ein. VEGF ist nachweislich für die Einleitung der Angio- und Vaskulogenese mitverantwortlich. Die Expressierung des VEGF konnte durch den Einsatz von SP600125 erfolgreich inhibiert werden.

Ähnliche Ergebnisse liefern frühere Studien der Arbeitsgruppe Sauer/Wartenberg. Unter Einwirkungen kurzzeitiger elektrischer Felder auf ES-Zellen kam es zu einer Aktivierung der JNK-Phosphorylierung. Die JNK-Induzierung nimmt hier Einfluss auf die Größe der PECAM-1 positiven Zellfläche. Durch Behandlung der Zellen mit SP600125 konnte dieser Effekt durchweg inhibiert werden (Sauer et al, 2005).

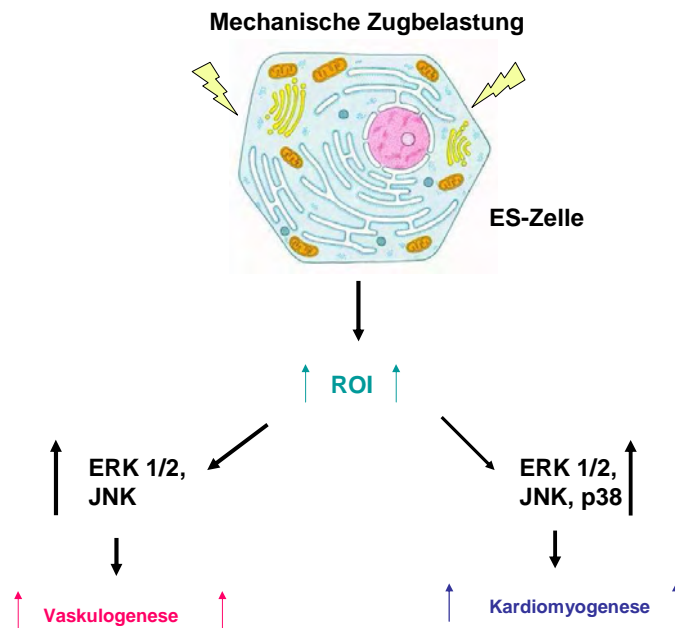


Abbildung 4-2 Funktion der MAPKs p38, ERK 1/2 und JNK in der kardiovaskulären Differenzierung von ES-Zellen der Maus nach mechanischer Zugbelastung

Durch die extern zugeführte mechanische Zugbelastung kommt es zu einer redoxsensitiven Phosphorylierung der drei untersuchten MAPKs. Durch Einsatz von spezifischen MAPKs Inhibitoren konnte ein Einfluss von JNK und ERK 1/2 auf die Vaskulogenese festgestellt werden. Die Kardiomyogenese wird von allen drei MAPKs, am deutlichsten jedoch von der MAPK p38, signifikant reguliert.

4.9 Die Funktion der kardialen Transkriptionsfaktoren GATA 4 und MEF-2c nach mechanischer Zugbelastung

Über die Feststellung hinaus, dass mechanische Zugbelastung zu einer prozentualen Zunahme kontrahierender Kardiomyozytenareale in ES-Zellen führt, liefert die vorliegende Dissertation Hinweise auf eine gesteigerte Expression kardialer Transkriptionsfaktoren (siehe Abschnitt 3.12).

Die vorliegenden Ergebnisse der Promotionsarbeit zeigen einen signifikanten Anstieg des kardialen Transkriptionsfaktors MEF-2c nach mechanischer Zugbelastung. Der Effekt kann durch eine durchgehende Behandlung der Zellen mit Radikalfängern inhibiert werden.

Parallel steigt die GATA 4 Expression unter mechanischer Dehnung signifikant an. Die GATA 4-Expression verstärkt sich paradoxer Weise unter Inkubation mit Antioxidantien in den gedehnten, sowie den Kontrollzellen. Diese Aussage scheint ein Hinweis auf eine ROI-unabhängige Aktivierung von GATA 4 zu sein. Der experimentell ausgelöste GATA 4-Anstieg unter Radikalfängerinkubation spielt keine Rolle in der Kardiomyogenese. Unter Versuchsbedingungen kommt es weder zu einem Anstieg von MEF-2c oder einer Zunahme der Anzahl kontrahierender Areale.

Die unterschiedliche Regulation kardialer Transkriptionsfaktoren unter ROI-Generierung innerhalb der Differenzierung deuten auf ein sehr sensitives Zusammenspiel zwischen redoxabhängigen und –unabhängigen Faktoren hin.

In der Literatur wird laminarer Scherstress als Ursache einer verstärkten MEF-2c-Expression in ES-Zellen der Maus angesehen (Illi et al, 2005).

Die Bedeutung von GATA 4 in der kardialen Differenzierung von ES-Zellen wurde erfolgreich von einer japanischen Arbeitsgruppe (Kawamura et al, 2005) gezeigt. Die HATs Aktivität von p300 ist für die Acetylierung und DNA -Bindung von GATA 4 wichtig. Unter der Expression von p300 kommt es während der Differenzierung von Stammzellen zu einer vermehrten Bindung von acetyliertem GATA 4 an die DNA.

Der Anstieg der GATA 4-Expression nach mechanischer Dehnung konnte von finnischen Forschern (Pikkarainen et al, 2003) an kultivierten Kardiomyozyten gezeigt werden.

Eine Aktivierung der Bindungsaktivität von MEF-2c unter oxidativen Stress in humaner Muskulatur kann wissenschaftlich belegt werden (Al-Kalili et al, 2004). Hydrogenperoxid im Nährmedium simuliert in diesem Experiment den oxidativen Stress.

Eine japanische Arbeitsgruppe (Suzaki et al, 2002) zeigte, dass eine Inkubation von PC12 Zellen mit H₂O₂ eine signifikant gesteigerte DNA-Bindungsaktivität von MEF-2c mit sich zieht.

Die Expressionssteigerung von MEF-2c, induziert durch die MAPKs p38, ist bekannt (Zhao et al, 1999) und ist in den hier diskutierten Experimenten von Bedeutung. Eine Inhibition der p38 MAPK durch SB203580 führt zu einem signifikanten Rückgang der kardialen Differenzierung.

Die Involvierung von ERK 1/2 in die myogene Transkription wird schon in Abschnitt 4.4.3 ausführlich diskutiert (Tenhunen et al, 2004).

4.10 Schematische Zusammenfassung der mechanisch-stimulierten kardiovaskulären Signalkaskade von ES-Zellen der Maus

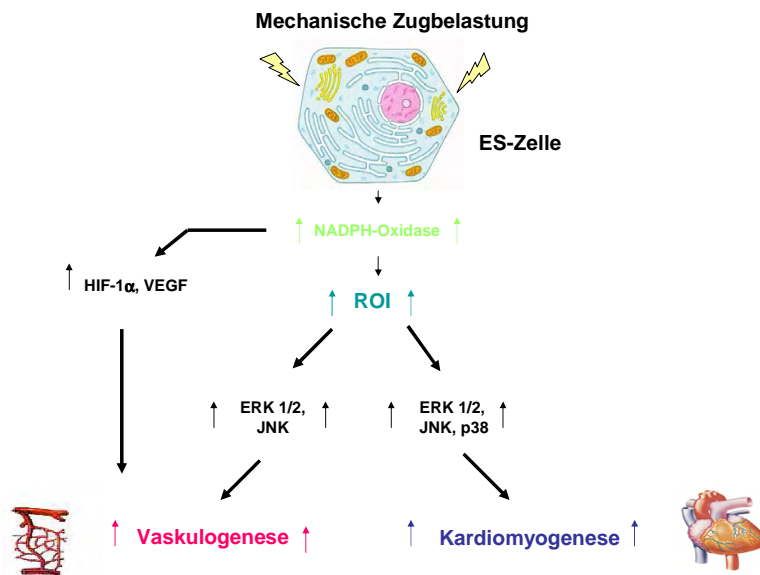


Abbildung 4-3 Zusammenfassung der kardiovaskulären Differenzierung von ES-Zellen nach mechanischer Zugbelastung

Nach mechanischer Zugbelastung kommt es zu einer redoxsensitiven Regulation von HIF-1 α , VEGF und den MAPKs. HIF-1 α und VEGF sind für die Einleitung der Vaskulogenese verantwortlich. Die aktivierten MAPKs induzieren die vaskuläre, sowie die kardiale Differenzierung.

5 Zusammenfassung

Die Mechanismen der kardiovaskulären Differenzierung pluripotenter ES-Zellen der Maus sind bisher unbekannt. Einen möglichen Differenzierungsstimulus stellen mechanische Zugbelastungen dar, die auf physiologische Art und Weise im wachsenden Gewebe erzeugt werden.

Die vorliegende Arbeit vertritt die Hypothese, dass die kardiovaskuläre Differenzierung ES-Zellen der Maus durch exogen-applizierte mechanische Zugbelastung induziert werden kann.

Hierbei werden folgende Versuchsergebnisse erzielt:

Mechanische Zugbelastung an ES-Zellen erhöht dosisabhängig die Anzahl spontan kontrahierender Foci von Kardiomyozyten und vergrößert parallel hierzu deren Gewebsfläche.

Mechanische Zugbelastung führt dosisabhängig zu einer Vergrößerung der PECAM-1 positiven Zellfläche und erhöht sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die Expression des proangiogenen Transkriptionsfaktors HIF-1 α und des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF.

Mechanische Zugbelastung führt zu einer Erhöhung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffmediatoren (ROI) -Konzentrationen. Als Quelle der freigesetzten ROI kann die NADPH-Oxidase angesehen werden.

Die mechanisch-induzierte intrazelluläre ROI-Generierung führt innerhalb kurzer Zeit zu einer Aktivierung der MAPKs p38, ERK 1/2 und JNK. Infolge spezifischer Inhibition der einzelnen MAPKs kann allen drei Informationsvermittlern eine entscheidende Rolle bei der Kardiomyogenese zugesprochen werden. JNK und ERK 1/2 nehmen weiterhin signifikanten Einfluss auf die vaskuläre Differenzierung.

Mechanische Zugbelastung verstärkt die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren. Folge dieses signifikanten Expressionsanstieges ist eine prozentuale Erhöhung der Anzahl kontrahierender Kardiomyozytenareale.

6 Literatur

Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* 271:16586-19590 (1996)

Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinase through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 100:1813-1821 (1997)

Aikawa R, Nagai T, Tanaka M, Zou Y, Ishihara T, Takano H, Hasegawa H, Akazawa H, Mizukami M, Nagai R, Komuro I. Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 289:901-907 (2001)

Akeno N, Robins J, Zhang M, Czyzyk-Krzeska MF, Clemens TL. Induction of vascular endothelial growth factor by IGF-I in osteoblast-like cells is mediated by the PI3K signaling pathway through the hypoxia-inducible factor-2alpha. *Endocrinology* 143:420-425 (2002)

Alexander LD, Alagarsamy S, Douglas JG. Cyclic stretch-induced cPLA2 mediates ERK 1/2 signaling in rabbit proximal tubule cells. *Kidney Int* 65:551-563 (2004)

Ali MH, Schumacker PT. Endothelial responses to mechanical stress: Where is the mechanosensor? *Crit Care Med* 30:S198-S206(2002)

Ali MH, Pearlstein DP, Mathieu CE, Schumacker PT. Mitochondrial Requirement for Endothelial Responses to Cyclic Strain :Implications for Mechanotransduction. *Am J Physiol Lung* 287:L486-496 (2004)

Al-Kalili L et al. MEF2 activation in differentiated primary human skeletal muscle cultures requires coordinated involvement of parallel pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1410-1416 (2004)

Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J* 45:776-788 (2004)

Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The Production by leucocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52:741-744 (1973)

Baldwin HS, Shen HM, Yan HC, DeLisser HM, Mickanin C, Trask T, Kirschbaum NE, Newman PJ, Albelda SM. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (Pecam-1/CD31):alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* 120:2539-2553 (1994)

Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, Krause KH, Cox JA. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (*NOX5*). *J Biol Chem* 279:18583-18591 (2004)

Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formations by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130:1910-1917 (1983)

Bayraktutan U, Draper N, Lang D, Shah AM. Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 38:256-262 (1998)

Bielinska M, Narita N, Wilson DB. Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development. *Int J Dev Biol* 43:183-205 (1990)

Boveris A., Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128:617-630 (1972)

Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminale kinase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 98:13681-13686 (2001)

Capdevila J, Parkhill L, Chacos N, Okita R, Masters BS, Estabrook RW. The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P-450. *Biochem Biophys Res Commun* 101:1357-1363 (1981)

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439 (1996)

Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, Hassid A, Desai LP, Waters CM. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung* 289:L834-L941 (2005)

Charron F, Paradis P, Bronchain O, Nemer G, Nemer M. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol* 19:4355-4365 (1996)

Chen Q, Li W, Quan Z, Sumpio BE. Modulation of vascular smooth muscle cell alignment by cyclic strain is dependent on reactive oxygen species and P38 mitogen-activated protein kinase. *J Vasc Surg* 37:660-668 (2003)

Chess PR, O'Reilly MA, Sachs F, Finkelstein JN. Reactive oxidant and p42/44 MAP kinase signaling is necessary for mechanical strain-induced proliferation in pulmonary epithelial cells. *J Appl Physiol* 99:1226-1232 (2005)

Cho DG, Mulloy MR, Chang PA, Johnson MD, Aharon AS, Robison TA, Buckles TL, Byrne DW, Drinkwater DC Jr. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway by U0126 attenuates neuronal damage following circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127:1033-1040 (2004)

Comerford KM, Cummins EP, Taylor CT. c-Jun NH₂-terminal kinase activation contributes to hypoxia-inducible factor 1 α -dependent P-glycoprotein expression in hypoxia. *Cancer Res* 64:9057-9061 (2004)

Cowan DB, Jones M, Garcia LM, Noria S, del Nido PJ, McGowan FX Jr. Hypoxia and stretch regulate intercellular communication in vascular smooth muscle cells through reactive oxygen species formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1754-1760 (2003)

Cross AR. p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558). *Biochem J* 349:113-117 (2000)

Davis WL, Crawford LA, Cooper OJ, Farmer GR, Thomas DL, Freeman BL. Ethanol induces the generation of free radicals by neural crest in cells *in vitro*. *J Craniofac Genet Dev Biol* 10:277-293 (1990)

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351:95-105 (2000)

De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* 82:1094- 1101 (1998)

Denhardt DT. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell:the potential for multiplex signaling. *Biochem J* 318:729-747 (1996)

Diatchuk V, Lotan O, Koshkin V, Wikstroem P, Pick E. Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. *Biol Chem* 272:13292-301 (1997)

Djordjevic T, Pogrebniak A, BelAiba RS, Bonello S, Wotzlaw C, Acker H, Hess J, Gorkach A. The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 38:616-630 (2005)

Dodou E, Verzi MP, Anderson JP, XU SM, Black BL. Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development* 131:3931-3942 (2004)

Dong J, Everitt JJ, Lau SS, Monks TJ. Induction of ERK1/2 and histone H3 phosphorylation within the outer stripe of the outer medulla of the Eker rat by 2,3,5-tris-(glutathion-S-yl)hydroquinone. *Toxicol Sci* 80:350-357 (2004).

Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM, Lambeth JD. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *Cell Biol* 154:879-891 (2001)

Epstein ND, Davis JS. Sensing stretch is fundamental. *Cell* 112:147-150 (2003)

Escobales N, Crespo MJ. Oxidative-nitrosative stress in hypertension. *Curr Vasc Pharmacol* 3:231-246 (2005)

Eyers PA, Craxton M, Morrice N, Cohen P, Goedert M. Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem Biol* 5:321-328 (1998)

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18:4-25 (1997)

Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:851-858 (1998)

Foncea R, Carvajal C, Almarza C, Leighton F. Endothelial cell oxidative stress and signal transduction. *Biol Res* 33:89-96 (2000)

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-426 (1982)

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu rev Biochem* 64:97-112 (1995)

Fry RC. The effect of leukaemia inhibitory factor (LIF) on embryogenesis. *Reprod Fertil Dev* 4:449-458 (1992)

Fukui T, Lassegue B, Kai H, Alexander RW, Griendling KK. Cytochrome b-558 alpha-subunit cloning and expression in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Acta* 1231: 215-219 (1995)

Ghosh M, Wang HD, McNeill JR. Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 141:562-573 (2004).

Gough NM, Gearing DP, King JA, Wilson TA, Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D. Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia-inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 85:2623-2627 (1998)

Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, Hegel C, Bader L, Rose F, Fink L, Ghofrani HA, Schermuly RT, Schmidt HH, Seeger W, Hanze J. Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36:1279-1288 (2004)

Gum RJ, McLaughlin MM, Kumar S, Wang Z, Bower MJ, Lee JC, Adams JL, Livi GP, Goldsmith EJ, Young PR. Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. *J Biol Chem* 273:15605-15610 (1998)

Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271:4138-4142 (1996)

Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, Schieffer B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res* 92:e80-e86 (2003)

Heath JK, Smith AG, Hsu LW, Rathjen PD. Growth and differentiation factors of pluripotential stem cells. *J Cell Sci Suppl* 13:75-85 (1990)

Hedges SB. The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet* 3:838-49 (2002)

Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res* 95:449-458 (2004)

Heng BC, Haider HK, Sim EK, Cao T, Ng SC. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage *in vitro*. *Cardiovasc Res* 62:34-42 (2004)

Hescheler J, Fleischmann BK, Wartenberg M, Bloch W, Kolossov E, Ji G, Addicks K, Sauer H. Establishment of ionic channels and signalling cascades in the embryonic stem cell-

derived primitive endoderm and cardiovascular system. *Cells Tissues Organs* 165:153-164 (1999)

Hescheler J, Wartenberg M, Fleischmann BK, Banach K, Acker H, Sauer H. Embryonic stem cells as a model for the physiological analysis of the cardiovascular system. *Methods Mol Biol* 185:169-87 (2002)

Honda S, Hjelmeland LM, Handa JT. Oxidative stress-induced single-strand breaks in chromosomal telomeres of human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2139-2144 (2001)

Hornberger TA, Armstrong DD, Koh TJ, Burkholder TJ, Esser KA. Intracellular signaling specificity in response to uniaxial vs. multiaxial stretch: implications for mechanotransduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C185-C194 (2005)

Howard AB, Alexander RW, Nerem RM, Griendling KK, Taylor WR. Cyclic strain induces an oxidative stress in endothelial cells. *Am J Physiol* 272:C421-C427 (1997)

Hwang J, Ing MH, Salazar A, Lassegue B, Griendling K, Navab M, Sevanian A, Hsiai TK. Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ Res* 93:1225-1232 (2003)

Zhong H, Semenza GL, Simons JW, De Marzo AM. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 is an early event in prostate carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 28:88-093 (2004)

Illi B, Scopece A, Nanni S, Farsetti A, Morgante L, Biglioli P, Capogrossi MC, Gaetano C. Epigenetic histone modification and cardiovascular lineage programming in mouse embryonic stem cells exposed to laminar shear stress. *Circ Res* 96:501-508 (2005).

Jones SA, Wood JD, Coffey MJ, Jones OT. The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts. *FEBS Lett* 355:178-182 (1994)

Kanatsu M, Nishikawa SI. In *vitro* analysis of epiblast tissue potency for hematopoietic cell differentiation. *Development* 223:193-202 (1996)

Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol* 4:E2-E5 (2002)

Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD. BMK 1/ERK 5 regulates seruminduced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J* 16, 7054-7066 (1997)

Kaushal S, Schneider JW, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. *Science* 18;266:1236-1240 (1994)

Kawamura et al. Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *J Biol Chem* 280:19682-19688 (2005).

Kietzmann T, Gorlach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol* (2005)

Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, Fukumoto M. NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 254:237-243 (2000)

Kim KS, Hwang HA, Chae SK, Ha H, Kwon KS. Upregulation of Daxx mediates apoptosis in response to oxidative stress. *J Cell Biochem* 96:330-338 (2005)

Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98:216-224 (1996)

Komuro I. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Jpn Circ J* 65:353-358 (2001)

Komuro I. Molecular mechanism of mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Jpn Heart J* 41:117-129 (2000)

Kovacic B, Ilic D, Damsky CH, Gardner DG. c-Src activation plays a role in endothelin-dependent hypertrophy of the cardiac myocyte. *J Biol Chem* 273:35185-35193 (1998)

Kunath T, Strumpf D, Rossant J. Early trophoblast determination and stem cell maintenance in the mouse--a review. *Placenta* 25:S32-S38 (2004)

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

Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : *nox1* mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 88:888-894 (2001)

Leblond CP. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. *Natl Cancer Inst* 14:119-150 (1964)

LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412:877-884 (2001)

Leifer D, Golden J, Kowall NW. Myocyte-specific enhancer binding factor 2C expression in human brain development. *Neuroscience* 63:1067-1079 (1994)

Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr* 287:R1014-R1030 (2004)

Liberatore CM, Yutzey KE. MAP kinase activation in avian cardiovascular development. *Dev Dyn* 230:773-780 (2004)

Liang Q, De Windt LJ, Witt SA, Kimball TR, Markham BE, Molkentin JD. The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in *vitro* and in *vivo*. *J Biol Chem* 276:30245-30253 (2001).

Liu C, Shi Y, Han Z, Pan Y, Han S, Chen Y, Lan M, Qiao T, Fan D . Suppression of the dual-specificity phosphatase MKP-1 enhances HIF-1 trans-activation and increases expression of EPO. *Biochem Biophys Res Commun* 312:780-786 (2003)

Liu M, Post M. Invited review: mechanochemical signal transduction in the fetal lung. *J Appl Physiol* 89:2078-2084 (2000)

Maas M, Wang R, Paddock C, Kotamraju S, Kalyanaraman B, Newman PJ, Newman DK. Reactive oxygen species induce reversible PECAM-1 tyrosine phosphorylation and SHP-2 binding. *Am J Physiol Heart Circ* 285:H2336-H2344 (2003).

Maity P, Biswas K; Roy S, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcerant mechanistic update. *Mol Cell Biochem* 253:329-338 (2003)

Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated *in vitro* from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 75:223-244 (1994)

Markou T, Lazou A. Phosphorylation and activation of mitogen- and stress- activated protein kinase-1 in adult rat cardiac myocytes by G-Protein-coupled receptor agonists requires both extracellular-signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem J* 365:757-763 (2002)

Martin GR. 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 (1981)

Massey V. Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J Biol Chem* 269: 22459-22462 (1994)

Mata-Greenwood E, Grobe A, Kumar S, Noskina Y, Black SM. Cyclic stretch increases VEGF expression in pulmonary arterial smooth muscle cells via TGF-beta1 and reactive oxygen species: a requirement for NAD(P)H oxidase. *Am J Physiol Lung* 289:L288-L289 (2005).

McDermott JC, Cardoso MC, Yu YT, Andres V, Leifer D, Krainc D, Lipton SA and Nadal-Ginard B. hMEF2C gene encodes skeletal muscle- and brain-specific transcription factors. *Mol Cell Biol* 13:2564-2577 (1993)

Mereau A, Grey L, Piquet-Pellorce C, Heath JK. Characterization of a binding protein for leukemia inhibitory factor localized in extracellular matrix. *J Cell Biol* 122:713-719 (1993)

Mohazzab KM, Wolin MS. Properties of a superoxide anion-generating microsomal NADH oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO₂ sensor. *AM J Physiol* 267:L823-L831 (1994)

Molkentin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83:1125-1136 (1995)

Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275:38949-38952 (2000)

Moore KA, Polte T, Huang S, Shi B, Alsberg E, Sunday ME, Ingber DE. Control of basement membrane remodeling and epithelial branching morphogenesis in embryonic lung by Rho and cytoskeletal tension. *Dev Dyn* 232:268-281 (2005)

Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:174-179 (1994)

Murfee WL, Van Gieson EJ, Price RJ, Skalak TC. Cell proliferation in mesenteric microvascular network remodeling in response to elevated hemodynamic stress. *Ann Biomed Eng* 32:1662-1666 (2004)

Nadruz W Jr, Corat MA, Marin TM, Franchini KG. Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: Role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. *Cardiovasc Res* 68:87-97 (2005)

Naruishi K, Nishimura F, Yamada-Naruishi H, Omori K, Yamaguchi M, Takashiba S. C-jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP600125, blocks interleukin (IL)-6-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) production: cyclosporine A partially mimics this inhibitory effect. *Transplantation* 76:1380-1382 (2003)

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13:9-22 (1999)

Nicholas SB, Philipson KD. Cardiac expression of the Na(+)/Ca(2+) exchanger NCX1 is GATA factor dependent. *Am J Physiol* 277:H324-H330 (1999)

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-391 (1998)

Niemann H, Kues WA. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim Reprod Sci* 79:291-317 (2003)

Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418:96-99 (2002)

O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J* 290:41-49 (1993)

Ono K., Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12:1-13 (2000)

Pesce M, Gross MK, Scholer HR. In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays* 20:722-732 (1998)

Pikkarainen S, Tokola H, Majalahti-Palviainen T, Kerkela R, Hautala N, Bhalla SS, Charron F, Nemer M, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. GATA-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program. *J Biol Chem* 278:23807-23816 (2003)

Petersen W, Varoga D, Zantop T, Hassenpflug J, Mentlein R, Pufe T. Cyclic strain influences the expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) in tendon fibroblasts. *J Orthop Res* 22:847-853 (2004)

Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther* 4:315-321 (2005)

Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of Angiogenesis by hypoxia, role of the HIF system. *Nat Med* 9:677-684 (2003)

-
- Raspor P, Plesnicar S, Gazdag Z, Pesti M, Miklavcic M, Lah B, Logar-Marinsek R, Poljsak B. Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman-2-carboxyl acid). *Cell Biol Int* 29:57-63 (2005)
- Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323:445-448 (1986)
- Rosengarten C, Dealmeida A, Stanley CP, Wessels A, Gourdie RG, Thompson RP, Sedmera D. Hemodynamics is a key epigenetic factor in development of the cardiac conduction system. *Circ Res* 93:77-85 (2003)
- Rosenkranz AR, Schmaldienst S, Stuhlmeier KM, Chen W, Knapp W, Zlabinger GJ. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Methods* 156:39-45 (1992)
- Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 58:278-291 (2003)
- Sauer H, Bekhite M, Hescheler J, Wartenberg M. Redox control of angiogenic factors and CD31-positive vessel-like structures in mouse embryonic stem cells after direct current electrical field stimulation. *Exp Cell Res* 304:380-390 (2005).
- Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, Wartenberg M. Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-Kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Letters* 476:218-223 (2000)
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11:173-186 (2001)
- Sauer H, Theben T, Hescheler J, Lindner M, Brandt MC, Wartenberg M. Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. *AM J Physiol Heart Circ.* 281:H411-H421 (2001)
- Schild D. Laser scanning microscopy and calcium imaging. *Cell Calcium* 19:281-296 (1996)

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

Schöler HR. Das Potential von Stammzellen in: P. Dabrock u. J. Ried (Hrsg.); *Therapeutisches Klonen als Herausforderung für die Statusbestimmung des menschlichen Embryos*. Verlag mentis, Paderborn 1. Auflage S.31-35 (2005)

Segal AW, Shatwell KP. The NADPH oxidase of phagocytic leucocytes. *Ann N Y Acad Sci* 832:215-222 (1997)

Semenza GL. HIF-1, O(2) and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107:1-3 (2001)

Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* 78:1025-1042 (2005).

Shih SC, Claffey KP. Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF-beta activation of VEGF expression. *Growth Factors* 19:19-34 (2001)

Shyy JY, Chien S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* 91:769-775 (2002)

Skalak TC, Price RJ. The role of mechanical stresses in microvascular remodeling. *Microcirculation* 3:143-165 (1996)

Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:435-462 (2001)

Smith DK, Treutlein HR. LIF receptor-gp130 interaction investigated by homology modeling: implications for LIF binding. *Protein Sci* 7:886-896 (1998)

Smith SK, Charnock-Jones DS, Sharkey AM. The role of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 in human reproduction. *Hum Reprod Suppl* 3:237-243 (1998)

Suzaki Y, Yoshizumi M, Kagami S, Koyama AH, Taketani Y, Houchi H, Tsuchiya K, Takeda E, Tamaki T. Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein

kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. *J Biol Chem* 277:9614-9621 (2002)

Suzuki YJ, Nagase H, Day RM, Das DK. GATA-4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart. *J Mol Cell Cardiol* 37:1195-1203 (2004)

Taber LA. Biomechanics of cardiovascular development. *Annu Rev Biomed Eng* 3:1-25 (2001)

Taber LA. Mechanical aspects of cardiac development. *Prog Biophys Mol Biol* 69:237-255 (1998)

Takenaka Y, Miki M, Yasuda H, Mino M. The Effect of alpha-tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane proteins thiols induced by free radicals generated in different sites. *Arch Biochem Biophys* 285:344-350 (1991)

Tam PP, Gad JM, Kinder SJ, Tsang TE, Behringer RR. Morphogenetic tissue movement and the establishment of body plan during development from blastocyst to gastrula in the mouse. *Bioessays* 23:508-517 (2001)

Tenhunen O, Sarman B, Kerkela R, Szokodi I, Papp L, Toth M, Ruskoaho H. Mitogen-activated protein kinases p38 and ERK 1/2 mediate the wall stress-induced activation of GATA-4 binding in adult heart. *J Biol Chem* 279:24852-24860 (2004)

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung* 279:L1005-L1028 (2000)

Thannickal VJ, Fanburg BL. Tyrosine phosphorylation regulates H₂O₂ production in lung fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1. *J Biol Chem* 273:23611-23615 (1998)

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147 (1998)

Tong L, Pav S, White DM, Rogers S, Crane KM, Cywin CL, Brown ML, Pargellis CA. A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nat Struct Biol* 4:311-316 (1997)

Torres M, Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 17:287-296 (2003)

Tournier C, Thomas G, Pierre J, Jacquemin C, Pierre M, Saunier B. Mediation by arachidonic acid metabolites of the H₂O₂-induced stimulation of mitogen-activated protein kinases (extracellular-signal-regulated kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase). *Eur J Biochem* 244:587-595 (1997)

Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 264:85-97 (2004)

Vaux EC, Metzen E, Yeates KM, Ratcliffe PJ. Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood* 98:296-302 (2001)

von Offenberg Sweeny N, Cummins PM, Birney YA, Cullen JP, Redmond EM, Cahill PA. Cyclic strain-mediated regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 expression and activity. *Cardiovasc Res* 63:625-634 (2004)

Voronov DA, Alford PW, Xu G, Taber LA. The role of mechanical forces in dextral rotation during cardiac looping in the chick embryo. *Dev Biol* 272:339-350 (2004)

Voronov DA, Taber LA. Cardiac looping in experimental conditions: effects of extraembryonic forces. *Dev Dyn* 224:413-421 (2002)

Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, Miyazawa N, Iwanaga T, Takeda S, Watanabe TK, Tanigami A. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology* 42:162-165 (2003)

Wang DS, Proffit D, Tsao PS. Mechanotransduction of endothelial oxidative stress induced by cyclic strain. *Endothelium* 8:283-291 (2001)

Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270:1230-1237 (1995)

Wang H, Riha GM, Yan S, Li M, Chai H, Yang H, Yao Q, Chen C. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1817-1823 (2005).

Wang Z, Canagarajah BJ, Boehm JC, Kassisa S, Cobb MH, Young PR, Abdel-Meguid S, Adams JL, Goldsmith EJ. Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure* 6:1117-11128 (1998)

Waterston et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562 (2002)

Wartenberg M, Donmez F, Ling FC, Acker H, Hescheler J, Sauer H. 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 (2001)

Wartenberg M, Gunther J, Hescheler J, Sauer H. The embryoid body as a novel *in vitro* assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest* 78:1301-1314 (1998)

Weissmann IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100:157-168 (2000)

Wientjes FB, Segal AW. NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin cell Biol* 6:357-365 (1995)

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 92:2260-2268 (1998)

Wiley LM, Kidder GM, Watson AJ. Cell polarity and development of the first epithelium. *Bioessays* 12:67-73 (1990)

Wilson S, Belham CM, Robinson CJ, Scott PH, Gould GW Plevin R. Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal* 9:403-410 (1997)

Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 48:173-182 (1991)

Wu TW, Hashimoto N, Wu J, Carey D, Li RK, Mickle DA, Weisel RD. The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. *Biochem Cell Biol* 68:1189-1194 (1990)

Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, Tamura K, Wen F, Feramisco JR, Karin M, Wang JY, Puri PL. p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol Cell Biol* 20:3951-3964 (2000)

Yamamoto K, Dang QN, Kennedy SP, Osathanondh R, Kelly RA, Lee RT. Induction of tenascin-C in cardiac myocytes by mechanical deformation. Role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 274:21840-21846 (1999)

Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, Ohura N, Matsushita A, Kamiya A, Ando J. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Heart Circ* 288:H1915-H1924 (2005)

Yang J, Boerm M, McCarty M, Bucana C, Fidler IJ, Zhuang Y, Su B. Mekk3 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Nat Genet* 24:309-313 (2000)

Zhao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, di Padova F, Olson EN, Ulevitch RJ, Han J. Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol* 19:21-30 (1999)

7 Veröffentlichungen

Physiologenkongress März 2005 in Göttingen: Posterpräsentation.

Schmelter M, Ateghang B, Helmig S, Wartenberg M, Sauer H. Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *FASEB J* 20:1182-1184 (2006)

8 Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. H. Sauer bedanken, der es mir ermöglicht hat, die Daten der vorliegenden Dissertation in seinem Labor anzufertigen. In langen Gesprächen und Diskussionen motivierte er mich immer wieder aufs Neue interessanten Fragestellungen nachzugehen. Durch sein kompetentes Fachwissen wurden mir die nötigen Hintergrundinformationen zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation geliefert.

Allen Mitarbeitern des Labors möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gegenseitige Unterstützung danken. Mein besonderer Dank gilt meinen Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe Sauer bestehend aus Martina Buggisch, Sabine Lange, Bernadette Ateghang, Manju Padmasekar, Rajender Nandigama und Elham Sharifpanah. Euch danke ich für Eure Geduld, die Schulter zum Ausweinen und die schönen Stunden, auch außerhalb des Labors.

Herrn Prof. Dr. Gerstberger danke ich dafür, dass er die vorliegende Dissertation extern betreute. Während der Korrekturen unterstützte er mich intensiv und war sehr interessiert an der Thematik der Dissertation.

Zu großem Dank bin ich auch dem Graduiertenkolleg „Vaskuläre Medizin“ der Justus-Liebig-Universität verpflichtet, welches mich als Stipendiatin während der Anfertigung dieser Dissertation finanziell unterstützt und wissenschaftlich gefördert hat.

Danken möchte ich auch all den lieben Menschen, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Meinen Freunden danke ich dafür, dass sie immer zu mir gestanden haben, und mich ermutigt haben nicht aufzugeben. Bei meiner Familie bedanke ich mich, da sie mir alle Unterstützung dieser Welt gegeben haben. Meinem Vater möchte ich besonders für die schnelle und genaue Korrektur meiner Rechtschreibung und Zeichensetzung danken. Mein letzter Dank gilt Sven, der mich immer unterstützt, mein Computerfachwissen verzweifelt erweitert und immer an mich geglaubt hat.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

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

ISBN 3-8359-5136-X

